

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

**ELETROFIAÇÃO DE NANOFIBRAS POLIMÉRICAS PARA USO EM
ENGENHARIA TECIDUAL**

Felipe Castro Menezes

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, Julho de 2017.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

**ELETROFIAÇÃO DE NANOFIBRAS POLIMÉRICAS PARA USO EM
ENGENHARIA TECIDUAL**

Felipe Castro Menezes

Dissertação realizada sob a orientação da Prof^ª.
Dr^ª. Rosane Michele Duarte Soares, apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos
Materiais da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul em preenchimento parcial dos
requisitos para a obtenção do título de Mestre em
Ciência dos Materiais.

Porto Alegre, Julho de 2017.

AGRADECIMENTOS

A todos os colegas de laboratório do K102. Por sempre estarem disponíveis a tudo que precisei e contribuírem para a ampliação do meu conhecimento, além dos momentos de descontração e conversas.

Aos meus “parcerias de laboratório”, em especial ao Cleverson Alves e Guilherme Belmonte pelos conversas, risadas, cafezinhos e toda a ajuda e apoio durante meu mestrado.

Agradeço à Fernanda Trindade Gonzalez Dias pela disponibilidade de me ajudar em algumas análises e a Universidade de Caxias do Sul, por permitirem o uso de algumas análises na Universidade.

À minha orientadora, Rosane Soares, por disponibilizar o laboratório e a oportunidade de realizar a minha pesquisa no mestrado.

Aos meus pais Altair e Rosele, e a minha irmã Itiana, por todo o apoio nesta minha caminhada, por todos os ensinamentos e amor durante toda minha vida.

À minha namorada Bruna, que me incentiva e apoia nas minhas decisões. Agradeço pelo carinho e amor, durante todo este tempo que estamos juntos.

Ao PGCIMAT, CAPES e CNPQ, pela oportunidade de desenvolver meu projeto

LISTA DE TRABALHOS GERADOS

Pôster: Efeito do alinhamento de nanofibras de PCL/Gelatina, Menezes,F.C.; Soares, R. M. D.; Belmonte, G. K., 9º Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais (COLAOB). 13º Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais- SLABO (9º COLAOB), 2016: Foz do Iguaçu – Paraná, Brasil.

Apresentação Oral: Effect of alignment on PCL/gelatin electrospun nanofibers, Menezes, F.C.; Soares, R. M. D, XV Brazilian MRS Meeting (SBPMAT), 2016: Campinas -São Paulo.

Pôster: Fabricação e Caracterização de Nanofibras Biopoliméricas, Menezes,F.C.; Soares, R. M. D., I Encontro Multidisciplinar em Ciência dos Materiais do Rio Grande do Sul - 1º MultiMAT, 2016: Porto Alegre - Rio Grande do Sul.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1	OSSO E MATRIZ ÓSSEA.....	4
2.2	ENGENHARIA DE TECIDO ÓSSEA (ETO).....	5
2.3	POLICAPROLACTONA.....	6
2.4	GELATINA	7
2.5	HIDROXIAPATITA	8
2.6	RETICULAÇÃO	10
2.7	ELETROFIAÇÃO	11
2.7.1	Parâmetros da Solução:	12
2.7.2	Parâmetros do Processo.....	13
2.7.3	Parâmetros Ambientais: Temperatura e Umidade	14
3	OBJETIVOS	15
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4	METODOLOGIA	16
4.1	PREPARO DAS SOLUÇÕES.....	16
4.1.1	Preparo da Solução de PCL.....	16
4.1.2	Eletrofiação da Blenda PCL/GE	16
4.1.3	Eletrofiação da Blenda PCL/GE/HA.....	17
4.2	PROCESSO DE ELETROFIAÇÃO	17
4.3	RETICULAÇÃO DAS NANOFIBRAS COM GELATINA	18
4.4	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRAS	18
4.4.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	18
4.4.2	Microscopia Eletrônica de Varredura por emissão de campo (MEV-FEG)	19
4.4.3	Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier no modo de Refletância Total Atenuada (FTIR – ATR)	19
4.4.4	Ângulo de Contato em Água (WCA).....	20
4.4.5	Grau de Intumescimento (GI)	21
4.4.6	Análise de Solubilidade	21
4.4.7	Análise Mecânica.....	22
4.4.8	Análise Termogravimétrica (TGA).....	22
4.4.9	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	23

4.4.10 Cultura Celular	23
4.4.11 Proliferação e Ensaio Metabólicos	24
4.4.12 Ensaio de Diferenciação Celular	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
5.1 MORFOLOGIA DAS NANOFIBRAS ELETROFIADAS	27
5.2 INCORPORAÇÃO DA HIDROXIAPATITA	30
5.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (FTIR-ATR).....	31
5.4 MOLHABILIDADE DAS NANOFIBRAS	33
5.5 GRAU DE INTUMESCIMENTO (GI) e SOLUBILIDADE.....	35
5.7 PROPRIEDADE MECÂNICA (ENSAIO DE TRAÇÃO)	36
5.8 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA	39
5.9 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).....	41
5.10 PROLIFERAÇÃO E ENSAIOS METABÓLICOS	43
5.10.1 Ensaio Alamar Blue para quantificação celular.....	43
5.10.2 Perfil Proliferativo	44
5.11 ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....	45
6 CONCLUSÕES.....	47
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do Osso.....	5
Figura 2: Estrutura molecular da policaprolactona	7
Figura 3. Estrutura da gelatina.	7
Figura 4. Estrutura da hidroxiapatita.	9
Figura 5. Reticulação da gelatina com EDC.	11
Figura 6. Esquema da morfologia das nanofibras com variação da viscosidade.	12
Figura 7. Processo de eletrofição.....	17
Figura 8. Ilustração interfaces de ângulo de contato.....	20
Figura 9. Micrografia de MEV das nanofibras eletrofiadas e suas respectivas distribuições de tamanho das nanofibras. Nanofibras Aleatórias: PCL(A), PCL/GE (C), PCL/GE/HA (E). Nanofibras Alinhadas: PCL (B), PCL/GE (D), PCL/GE/HA (F).	29
Figura 10. Micrografia de MEV das nanofibras reticuladas. Nanofibras reticuladas aleatórias: PCL/GE/EDC (A), PCL/GE/HA/EDC (C). Nanofibras reticuladas alinhadas: PCL/GE/EDC (B), PCL/GE/HA/EDC (D).	30
Figura 11. Micrografia de MEV e espectro de EDS da nanofibra aleatória PCL/GE/HÁ.....	31
Figura 12. Espectros de FTIR das nanofibras coletadas em tambor rotatório: (a)PCL/GE/HA/EDC, (b) PCL/GE/HA, (c) PCL/GE/EDC, (d) PCL/GE, (e) PCL.....	32
Figura 13. Espectros de FTIR das substâncias puras: (a) gelatina, (b) PCL.	32
Figura 14. Ângulo de Contato das nanofibras obtidas em placa e em tambor rotatório.	34
Figura 15. Intumescimento das nanofibras: (a) Nanofibras Alinhadas, (b) Nanofibras Aleatórias	36
Figura 16. Propriedades mecânicas das nanofibras: (a) Módulo de Young, (b) Tensão Máxima e (c) Elongamento Máximo.....	38
Figura 17. Análise Termogravimétrica das nanofibras alinhadas (a), aleatórias (b).....	40
Figura 18. Derivada da perda de massa das nanofibras alinhadas (a), aleatórias (b).....	40
Figura 19. Ensaio Alamar Blue de quantificação celular das nanofibras eletrofiadas. Alterações relacionadas com o tempo na fluorescência Alamar Blue, em culturas prévias de hMSCs, após exposição a biomateriais por 1, 4 e 7 dias.....	44
Figura 20. Análise de quantificação de dsDNA das nanofibras eletrofiadas. Alterações relacionadas ao tempo no perfil proliferativo pelo ensaio de quantificação de dsDNA PicoGreen® em hMSCs após exposição a biomateriais durante 1, 4 e 7 dias.....	45

Figura 21. Ensaio de diferenciação celular das nanofibras por atividade alcalina fosfatase. A diferenciação osteogênica de hMSCs in vitro medida por atividade alcalina fosfatase..... 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ângulo de Contato das nanofibras obtidas em placa e em tambor rotatório.....	34
Tabela 2. Resultados das análises de propriedades mecânicas obtida para as nanofibras	37
Tabela 3. Resultados da análise termogravimétrica das nanofibras.	41
Tabela 4 Análise dos termogramas de DSC obtidos das nanofibras. (2° ciclo de aquecimento).	42

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – ácido acético
AF – ácido fórmico
ALP – atividade alcalina fosfatase
DMA – análise dinâmico-mecânica
DMF – dimetilformamida
DSC – análise exploratória calorimétrica
ECM – matriz extracelular nativa
ET – engenharia de tecidos
ETO – engenharia de tecidos ósseos.
EDC – hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDS – espectroscopia por dispersão de energia de raios X
EM – elongação máxima
FT-IR – Infravermelho com Transformada de Fourier
FDA – Órgão de Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos
GE – gelatina
hMSCs – células tronco mesenquimais humanas
MEM – meio essencial mínimo
MEV – microscopia eletrônica de varredura
MEV-FEG – microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo
E – módulo de Young
PAN – poliácridonitrila
PBS – solução padrão de fosfato
PCL policaprolactona
PGA – poli (ácido glicólico)
PLA – poli (ácido láctico)
PLCL – poli (L-lactide-co-3-caprolactona)
PLGA – poli (ácido láctico-co-glicólico)
PVP – poli (vinilpirrolidona)
HA – hidroxiapatita
HFIP – 1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol
TCPS – plástico tratado com cultura de tecidos

T_g – temperatura de transição vítrea

TGA – análise termogravimétrica

TM – tensão máxima

GA – glutaraldeído

GI – grau de intumescimento

WCA – ângulo de contato em água

RESUMO

Este trabalho tem por objetivo a obtenção de nanofibras de blendas de policaprolactona (PCL), gelatina (GE), com a adição de hidroxiapatita (HA), através do processo de eletrofiação, a fim de mimetizar a matriz celular nativa (ECM). As nanofibras foram produzidas com o intuito de apresentar boas propriedades térmicas, mecânicas e de superfície, adequadas à utilização na área de engenharia de tecidos ósseos (ETO). Para obtenção de nanofibras com morfologia diferenciada, utilizou-se um coletor estacionário e um tambor rotatório, obtendo materiais com fibras alinhadas ou distribuídas aleatoriamente.

Devido as características hidrofílicas das nanofibras de gelatina, foi efetuada a reticulação química nas nanofibras com este polímero após eletrofiação, utilizando o agente de reticulação hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC). A reticulação mostrou-se efetiva, impedindo a dissolução das nanofibras em ambiente aquoso, comprovado pelo teste de intumescimento e solubilidade. As matrizes, de maneira geral, apresentaram dimensões em escala nanométrica, com presença de gotas em sua morfologia, dependendo da composição polimérica. O alinhamento das nanofibras ocasionou uma melhora nas propriedades mecânicas em relação as fibras com orientação aleatória, tornando o material mais rígido e resistente a tração. A eletrofiação de blendas permitiu a obtenção de fibras mais hidrofílicas. As propriedades térmicas demonstraram que as nanofibras produzidas são estáveis para utilização na temperatura de utilização médica.

Os testes biológicos demonstram que as nanofibras com estruturas alinhadas e aleatórias obtidas permitiram a proliferação celular e a diferenciação osteogênica, apresentando potencial de serem utilizadas na engenharia de tecidos ósseos.

ABSTRACT

This work aims to obtain nanofibers by electrospinning technique with blends of polycaprolactone (PCL), gelatin (GE), and with the addition of hydroxyapatite (HA), in order to mimic a native cell matrix (ECM). Nanofibers were fabricated with the purpose of presenting good thermal, mechanical and surface properties, to be used in the area of bone tissue engineering (ETO). To obtain nanofibers with differentiated morphology, we used a stationary collector and a rotatory drum collector, obtaining materials with aligned or randomly fibers distributed.

Due to the hydrophilic characteristics of the gelatin nanofibers, chemical crosslinking was performed in electrospun fibers containing this polymer with 1-ethyl-3- (3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC). The crosslinking was effective, preventing the dissolution of the nanofibers in an aqueous environment, been proved by the swelling test and solubility. The scaffolds, in general, presented dimensions in nanometric, with presence of beads in their morphology, depending on the polymer composition. The alignment of the nanofibers caused an improvement in the mechanical properties compared with fibers in random orientation, making the material more rigid and resistant to traction. Electrospun blends allowed the production of more hydrophilic fibers. Thermal properties have demonstrated that the nanofibers produced are stable for use at the temperature of medical use.

Biological assays demonstrate that both random and aligned nanofibers structures, allowed the cell proliferation and osteogenic differentiation, presenting potential to be used in tissue engineering.

1. INTRODUÇÃO

Anualmente, 2,2 milhões de enxertos ósseos são utilizados em procedimentos ortopédicos, e o constante aumento da longevidade das pessoas no mundo, têm trazido a necessidade de se inovar e criar materiais que possam melhorar a qualidade de vida das pessoas, que apresentam inúmeros problemas ósseos e necessidades de próteses. Visando reparar tecidos lesionados, há algumas possibilidades de enxerto que podem ser utilizadas, como o auto enxerto (transferência de um tecido, órgão, ou parte do indivíduo para outra parte do mesmo indivíduo), o aloenxerto (enxerto em que o doador pertence à mesma espécie do receptor, porém é geneticamente diferente), e o xenotransplante (proveniente de uma espécie diferente). Entretanto, o auto-enxerto apresenta a limitação de pouca disponibilidade e possibilidade de morbidade no local de retirada do material, e os aloenxertos e xenotransplantes, por sua vez, possuem risco de transmissão de doenças e rejeição.^{1,2}

Como alternativa a estes problemas, a engenharia de tecidos (ET) é uma área multidisciplinar que têm como objetivo estudar e criar materiais que possam reparar ou substituir tecidos ou órgão lesionados, sendo amplamente estudada em busca de soluções.³ Dentre as áreas da engenharia de tecidos, destaca-se a investigação de materiais capazes de promover a regeneração óssea.

O osso é um complexo composto de material nanocompósito inorgânico-orgânicos, consistindo de 65-70% de hidroxiapatita (HA) e 30-35% composto orgânico, basicamente de Colágeno Tipo I.⁴ Para se obter a estrutura da matriz extracelular óssea é necessário que o material possua propriedades de ambos os componentes do tecido ósseo.⁵

Dentre os métodos de produção de estruturas tridimensionais que mimetizem a matriz extracelular nativa (ECM), a eletrofiação é uma técnica que tem atraído atenção por ser um método simples e versátil que permite a criação de fibras em escala nanométrica com as características necessárias para o uso na ET.^{6,7} A versatilidade desta técnica se deve ao grande número de materiais que podem ser utilizados, desde polímeros naturais e sintéticos, cerâmicos e blendas diversas.⁸

O aparelho de eletrofiação é constituído basicamente de uma fonte de alta voltagem, um coletor e uma bomba peristáltica. O processo se dá pela aplicação de um campo elétrico utilizando uma fonte de alta voltagem, que causa uma indução às cargas poliméricas e, por consequência, resulta na repulsão de cargas na solução. Para a criação das nanofibras é necessário que a tensão aplicada supere a tensão superficial do líquido. Ao longo do caminho

percorrido pelo jato, ocorre a evaporação do solvente utilizado, e então a fibra é coletada.⁹⁻¹¹

Dentre os polímeros passíveis de processamento por eletrofiação e também com características adequadas à engenharia de tecidos, destaca-se a policaprolactona (PCL). A PCL é um poliéster sintético, biocompatível e biodegradável, sendo aprovado seu uso médico pelo órgão do governo americano de administração de comida e drogas (FDA).¹²⁻¹⁴ A degradação mais lenta dos polímeros sintéticos em relação aos naturais está relacionado a sua estrutura semi-cristalina.¹⁵

Polímeros sintéticos como PCL, apresentam boas propriedades mecânicas, porém a sua hidrofobicidade ocasiona falha no reconhecimento celular, resultando em pouca adesão, migração e proliferação celular. Como consequência, processos de modificação química ou mistura de polímeros naturais e sintéticos são realizadas a fim melhorar a compatibilidade do material com as células. Por outro lado, sua compatibilidade em blendas estimulou pesquisas no desenvolvimento de materiais com potencial uso na área biomédica.^{14,16,17}

A gelatina (GE) por sua vez, é um polímero natural biocompatível, derivado do colágeno por desnaturação térmica ou física e degradação química.¹⁸ Além de poder simular a estrutura da matriz extracelular, este material têm propriedade hidrofílicas, apresenta algumas vantagens em relação ao colágeno, como não induzir a problemas de rejeição imune, mantendo as pistas moleculares que podem regular o comportamento celular, e um custo mais barato.^{19,20}

As nanofibras de gelatina fabricadas por eletrofiação apresentam algumas limitações, dentre estas, a rápida degradação *in vivo* e *in vitro*. Desta forma, tratamentos posteriores, como a reticulação são necessários para superar esta limitação do material. A reticulação é um processo que possibilita a formação de ligações amida entre os grupos amino e carboxil das moléculas de gelatina.²¹ Este processo pode não só aumentar a estabilidade do material em solventes polares, como também causar melhoras nas propriedades termomecânicas do polímero.²⁰

De maneira geral, os biomateriais preparados para regeneração de ossos devem apresentar propriedades mecânicas e estruturais similares ao osso.²² As estruturas produzidas ainda devem ser favoráveis a adesão celular, proliferação e diferenciação celular, para que o tecido original possa ser efetivamente regenerado.²³

Fibras em escala nanométrica ou micrométrica com diferentes morfologias podem ser produzidas pela técnica de eletrofiação, resultando em materiais que respondem diferente a estímulos físicos ou biológicos. O alinhamento de fibras utilizando um coletor rotatório têm sido utilizado na engenharia de tecidos ósseos, melhorando as propriedades mecânicas do material, como maior rigidez, além de apresentar melhoras em adesão e proliferação celular,

guiar o crescimento celular e obter uma melhor diferenciação osteogênica.^{24,25}

A utilização de blendas de polímeros naturais, sintéticos e materiais cerâmicos, apresentando propriedades diversificadas aos materiais puros, surge com uma alternativa para se obter biomateriais com boas propriedades mecânicas e bom reconhecimento para o uso na engenharia de tecidos ósseos (ETO).^{6,26-28}

Com base no exposto, preparou-se através da eletrofiação, nanofibras com morfologias aleatória e alinhadas, compostas pela blenda polimérica de PCL/GE reticuladas com hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e com incorporação de HA, visando a aplicação destes biomateriais na regeneração de tecidos ósseos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 OSSO E MATRIZ ÓSSEA

O osso é um tecido conjuntivo mineralizado, um material biocerâmico composto de material orgânico, principalmente de colágeno tipo I e material inorgânico, composto por hidroxiapatita.²⁹ Apesar de seu aspecto rígido, é um órgão altamente dinâmico e exerce diversas funções importantes no corpo, como suporte, locomoção e proteção de tecidos moles, armazenamento de cálcio e fosfato e a medula óssea.³⁰ A estrutura do osso é mostrada na figura 1.

Este material exhibe diferentes tipos de células em sua composição: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.³¹

Osteoblastos mononucleados: São aproximadamente 4-6% do total de células do osso e são responsáveis pela formação óssea.³²

Osteócitos: São derivados dos osteoblastos, sendo responsáveis pela desintegração da matriz óssea por osteólise osteocística.³¹

Osteoclastos multinucleados: São derivados de precursores hematopoiéticos, sendo responsáveis diretamente pela reabsorção óssea.³³

A matriz extracelular é um ambiente com diversos componentes e funções, otimizado para a residência das células que além de fornecer apoio estrutural, é um canal de comunicação célula-célula e repositório de fatores de crescimento. A ECM óssea é um ambiente que contém osteoblastos e osteoclastos, células primárias que mantêm a função de homeostase (condição de relativa estabilidade da qual o organismo necessita para realizar suas funções adequadamente para o equilíbrio do corpo) do osso.³⁴

As proteínas na matriz extracelular do osso também podem ser proteínas estruturais (colágeno e fibronectina) e proteínas com funções especializadas, como as que regulam o diâmetro das fibrilas de colágeno, moléculas sinalizadoras, fatores de crescimento, como enzimas, entre outras funções. A quantidade relativa de cada um destes constituintes varia com a idade, local, gênero, e estado de saúde.³⁴

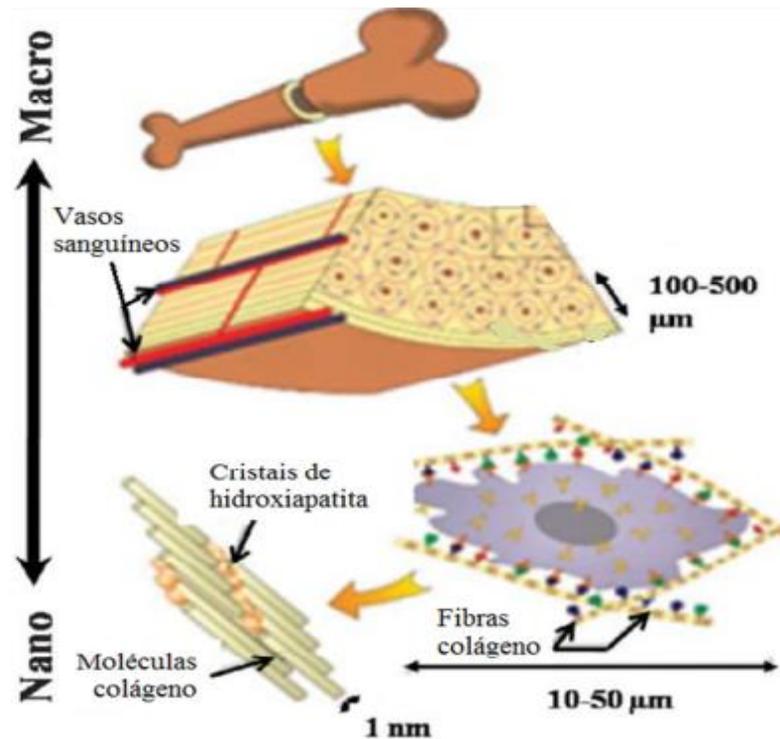


Figura 1. Estrutura do Osso. Adaptado de Mitra³¹

2.2 ENGENHARIA DE TECIDO ÓSSEA (ETO)

Os enxertos ósseos têm sido utilizados em diversos processos clínicos, para uma melhora na regeneração e reparação do osso. Os procedimentos clínicos atuais como os auto-enxertos e aloenxertos, apresentam algumas limitações e deficiências, como complicações clínicas para o reparo e regeneração óssea.

O procedimento clínico mais utilizado ainda nos dias atuais é o auto-enxerto, operação em que consiste na transferência de um tecido, órgão ou parte dele para outra parte do corpo do mesmo indivíduo, pois os materiais são histocompatíveis e não imunogênicos, possuindo todas as propriedades básicas necessárias para o enxerto ósseo. Este procedimento apresenta inúmeros problemas, podendo resultar em lesão e morbidades no local do doador, assim como problemas de dor crônica, sangramento, inflamação e infecção. Além disto este procedimento é inviabilizado pela falta de disponibilidade quando há necessidade de se utilizar maiores volumes de materiais.³⁵

Os aloenxertos são o segundo procedimento mais comum nos enxertos ósseos. Ele envolve o transplante de tecido ósseo de outra pessoa (sem ser o próprio paciente), normalmente de um cadáver. Este procedimento possui risco de imunorreações e transmissão de infecções.³⁵

Como alternativa aos métodos de enxerto relatados, a pesquisa de materiais na engenharia de tecidos ósseos têm atraído atenção nas últimas décadas. Este campo de pesquisa têm objetivo de criar materiais que melhorem a reparação e regeneração óssea, sendo uma alternativa aos métodos de enxerto e os problemas causados por este processo.³⁶

A seleção dos materiais para produção de matrizes tridimensionais é de fundamental importância pois as propriedades finais do material, dependem das características dos materiais originais. Deseja-se que os biomateriais utilizados na engenharia de tecido óssea possuam uma superfície que suporte a adesão, proliferação, migração e crescimento celular, além de possuir outros requisitos físico e químicos.³⁷ Visando a obtenção de materiais com essas características, blendas dos poliméricos e cerâmicos se tornaram bons candidatos a serem utilizados na ETO, pois apresentam características de ambos os materiais e se assemelham ao osso, que é um material compósito, formado por parte orgânica (fibras de colágeno) e cristais inorgânicos de hidroxiapatita.³⁵

2.3 POLICAPROLACTONA

Este polímero é um excelente material para ser usado na área de biomateriais por ser aprovado pela Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos (FDA), tendo sido utilizado na área médica e dispositivos de entrega de fármacos.³⁸

A policaprolactona (PCL) é um poliéster com estrutura semicristalina, que apresenta temperatura de transição vítrea (T_g) de aproximadamente -60°C e temperatura de fusão entre 59 e 64°C .³⁹

Este material é produzido por dois métodos, o de polimerização por abertura de anel da ϵ -Caprolactona ou por policondensation do ácido 6-hidroxicapróico.⁴⁰

O PCL (figura 2) é metabolizado como os polímeros sintéticos poli (ácido glicólico) (PGA) e poli (ácido láctico) (PLA), gerando um metabolito, o ácido 6-hidroxi-hexanóico.⁴¹ Dentre os poliésteres conhecidos, o PCL degrada-se de forma mais lenta, devido a presença de seus cinco grupos de unidade repetitivas CH_2 -, limitando as suas aplicações médicas. Este polímero é sujeito a degradação hidrolítica devido a suscetibilidade de hidrólise de seus grupos de ésteres alifático.⁴²

Fibras de PCL, blendas e compósitos deste polímero têm sido fabricados, se tornando um material promissor na área de engenharia de tecidos ósseos. Nanofibras de PCL foram eletrofiadas e revestidos com Cálcio (Ca) e Fósforo (P) por imersão em solução de fluido

corporal simulado (PBS) com sucesso. Este material quando revestido demonstrou boas propriedades para engenharia de tecidos ósseas. Análises *in vivo* de fibras eletrofiadas de PCL revestidos por Ca e P, utilizando método de imersão em solução de fluido corporal simulado, demonstraram que após 3 meses de implante em coelhos, houve formação de tecido ósseo e preenchimento de 70% da matriz polimérica, apresentando potencial para aplicações na área de ETO.⁴³ Soongee e colaboradores, produziram fibras PCL e Quitosana. Esta blenda de polímero sintético e natural, melhorou a rigidez, tornou o material mais hidrofílico e melhorou as propriedades biológicas do material em comparação ao polímero puro, resultando em uma maior interação entre células-tronco mesenquimais e o biocompósito.¹⁷

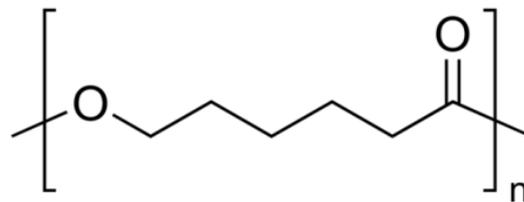


Figura 2: Estrutura molecular da policaprolactona

2.4 GELATINA

A Gelatina (GE) é um material natural biodegradável, biocompatível obtido através da hidrólise parcial do colágeno nativo, que é a proteína estrutural mais abundante encontrada na pele, tendões, cartilagens e ossos de animais vivos.⁴⁴ Existem dois métodos de hidrólise que produzem dois tipos de gelatina: Gelatina Tipo A, por processo ácido e Tipo B por processo alcalino. As duas gelatinas apresentam diferenças principalmente quanto a composição de aminoácidos, padrão de polipeptídios, turbidez e propriedades espumantes.⁴⁵ A estrutura da gelatina (figura 3) é apresentada abaixo.

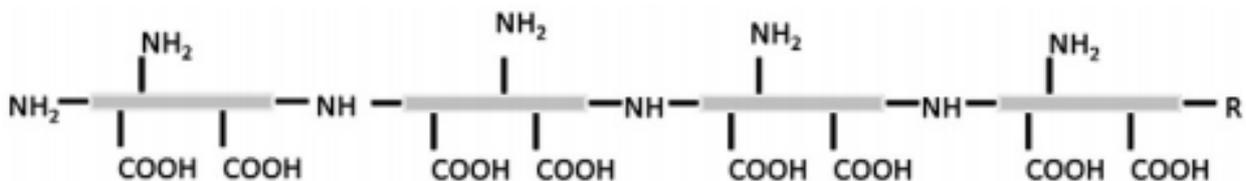


Figura 3. Estrutura da gelatina.⁴⁶

A gelatina apresenta propriedades como boa solubilidade em água, excelente afinidade celular, além de ser não imunogênico e possuir boa disponibilidade comercial.⁴⁷ Por possuir propriedades favoráveis à área biomédica, nanofibras de gelatina e blendas com o polímero têm sido eletrofiadas utilizando diversos solventes, se adequando a diversas aplicações biomédicas como cicatrização de pele⁴⁸, área cardíaca⁴⁹, nervos⁵⁰, cartilagem e ossos⁵¹.

A produção de nanofibras via técnica de eletrofição, têm sido investigada nos últimos anos, como um material que pode simular a matriz extracelular (ECM) em forma de fibras em escala nanométrica. A utilização de solventes polares melhora a eletrofição de fibras de gelatina, uma vez que a formação dos materiais em ambiente aquoso é um desafio devido aos grupos amina e ácido carboxílico que se ionizam em água produzindo um polieletrólito que promove formação de um sol coloidal. Fibras de hidroxiapatita/gelatina foram eletrofiadas com sucesso utilizando solvente orgânico 1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol (HFIP) por Kim e colaboradores.⁵² Fibras de gelatina também foram obtidas por Nuanchan e colaboradores, em seu estudo dos efeitos causados pelos solventes na eletrofição do material. Neste trabalho foi verificado a influência de diversos solventes polares, como 2,2,2-trifluoretanol, ácido acético glacial, e blendas com outros solventes na eletrofição.⁵³

Para se obter materiais com propriedades superiores a somente um tipo de polímero na área biomédica, pesquisadores têm estudado a eletrofição de blendas de gelatina. Fibras de gelatina/poli(vinilpirrolidona) (PVP) foram produzidas em ácido acético/água, produzindo fibras sem toxicidade.⁵⁴ A fabricação de blenda de gelatina e poli(ácido lático) por eletrofição, demonstrou que o uso de dois polímeros juntos favoreceu a adesão celular e suportou o crescimento celular, obtendo maior viabilidade celular que o material de PLA.⁵⁴

2.5 HIDROXIAPATITA

Diversos materiais cerâmicos têm sido utilizados na área de engenharia óssea. Dentre os utilizados, podem ser de origem natural, como hidroxilapatita coralina e sintéticos como a hidroxiapatita. O interesse neste material deve-se principalmente fato de que é osteocondutivo, tendo capacidade de servir de arcabouço para a migração de células ósseas e osteoindutivo, induzindo a célula mesenquimal indiferenciada, presente na área receptora, a se transformar em uma célula formadora de osso, um osteoblasto. Estes materiais apesar de terem bons resultados na regeneração de ossos, apresentam pouca estabilidade mecânica por ser frágil, podendo ser utilizado em compósitos.^{55,56}

A hidroxiapatita (HA) é um material cerâmico de fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e possui estequiometria exata de Ca/P de 1,67. A estrutura da hidroxiapatita é mostrada na figura 4. Este material têm demonstrado ser um bom suporte a regeneração óssea e osteoindução devido à sua similaridade com o tecido ósseo.³⁶ Por este motivo ela têm sido utilizada na ETO, facilitando a fixação, a proliferação e a diferenciação de células osteoblásticas humanas e promovendo o crescimento para dentro do osso nativo.⁵⁷

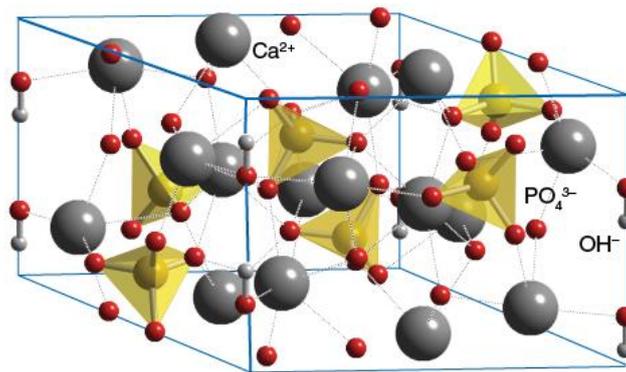


Figura 4. Estrutura da hidroxiapatita.⁵⁸

Os materiais compósitos de cerâmicos e polímeros com a hidroxiapatita atraiu a atenção de vários pesquisadores, pois o compósito apresenta os benefícios de ambos os seus componentes. Vários compósitos foram obtidos para o uso na ETO, utilizando polímeros como poli (ácido láctico) (PLA)⁵⁹, poli(ácido láctico-co-glicólico)PLGA⁶⁰ e a PCL⁶¹.

Partículas de hidroxiapatita foram adicionados a poliuretanos comerciais, reforçando mecanicamente nanofibras eletrofiadas. Além de se obter maior módulo de Young e resistência ao escoamento, a adição do material cerâmico melhorou viabilidade celular e melhor suporte a deposição de matriz extracelular óssea.³⁷

Kim e colaboradores, sintetizaram nanocompósitos de gelatina e hidroxiapatita. Seus resultados demonstraram que o nanocompósito obteve melhor resultado na análise alcalina fosfatase que a gelatina pura ou compósito convencional. Ele também obteve uma maior taxa de ligação de células osteoblásticas MG63 e melhor proliferação.⁶² Segundo Peter e colaboradores, a adição de hidroxiapatita a matrizes de PLA melhorou a osteocondutividade e a proliferação celular de osteoblastos em 6 semanas de cultivo *in vivo*, demonstrando uma

superioridade do compósito em relação ao polímero puro para utilização na engenharia de tecidos ósseos.⁶³

2.6 RETICULAÇÃO

Os polímeros naturais como a gelatina apresentam desvantagem por apresentar solubilidade em água, limitando seu uso em diversas aplicações. Uma forma de ultrapassar este problema é a reticulação da cadeia, ou seja, realizar ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas. Além de melhorar as propriedades de solubilidade, a estabilidade térmica, mecânica e degradação podem ser alteradas.^{64,65}

Há vários métodos diferentes de reticulação de polímeros, como os métodos físicos de tratamento dehidrotérmico (DHT)⁶⁶, tratamento com luz ultravioleta (UV)⁶⁷, tratamento químico utilizando agentes reticuladores como glutaraldeído (GA)⁶⁸ e hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC).^{20,69}

O glutaraldeído é um dos reticulantes mais estudados e conhecidos, porém o mesmo possui a desvantagem de apresentar toxicidade à células e tecidos.⁶⁵

Por sua vez, O EDC, é um agente de reticulação que ao contrário de outras moléculas como glutaraldeído, não é incorporado ao gerar reticulações, podendo ser removido após sucessivas lavagens, seus resíduos de reação podem ser removidos e, desta forma, não induzir efeitos citotóxicos.⁷⁰

A reação de reticulação com EDC é apresentada na figura 5. Primeiramente o EDC é protonado e liga-se ao grupo ácido carboxílico contido no amino ácido aspártico e glutâmico da proteína, formando o composto intermediário o-isoaciluréia. Segue-se o ataque nucleofílico das funções amina ao intermediário, gerando os grupos amida e simultaneamente liberando o derivado de ureia do reagente EDC. Em seguida podem ser feitas lavagens sucessivas para remover o reagente ativador e deixar o material reticulado sem resíduos químicos tóxicos que possa causar danos as células.^{71,72}

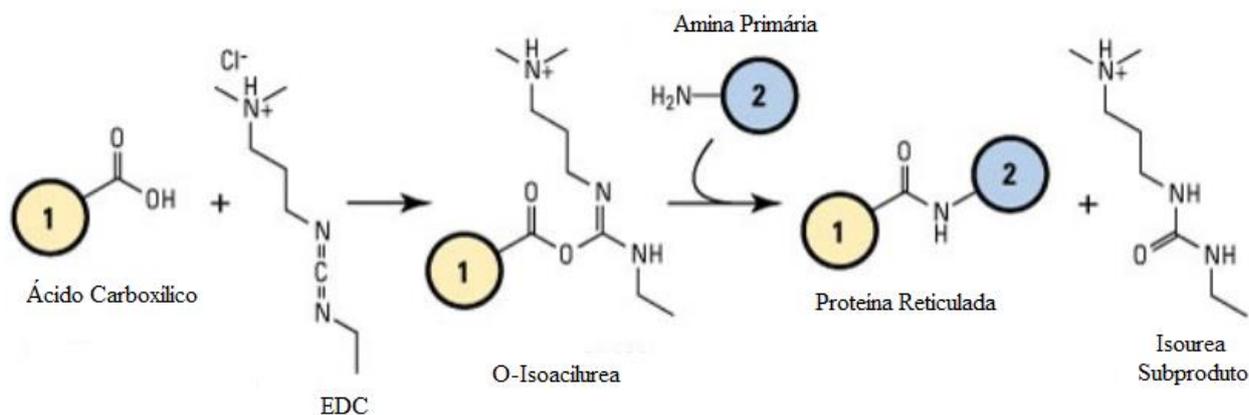


Figura 5. Reticulação da gelatina com EDC. 1 e 2 são moléculas de gelatina. Adaptado de Thermofisher Scientific.⁷³

2.7 ELETROFIAÇÃO

A eletrofiação permite a produção de fibras em escalas macro e nanométrica que podem mimetizar a matriz extracelular nativa pois as nanofibras possuem características como alta área superficial por volume e grande quantidade de poros de tamanho pequeno. A sua versatilidade se deve ao fato de que diversos tipos de materiais podem ser utilizados para fabricação de materiais estruturados, desde polímeros naturais ou sintéticos à compósitos.^{9,74}

O processo de eletrofiação é baseado na utilização de forças eletrostáticas para fabricar fibras, e o aparelho pode ser dividido em 3 componentes básicos: uma fonte de alta voltagem, bomba de vazão para seringa e um coletor metálico.

A aplicação de uma alta voltagem em uma solução ou material fundido, induz ao carregamento da solução e criação de forças repulsivas entre as cargas da solução, que aumenta quanto maior o campo elétrico induzido pela mudança na voltagem aplicada. Quando as forças elétricas estão equilibradas com a tensão superficial inicia a formação do cone de Taylor, uma região em que a gota se torna um formato aproximadamente cônico. Quando as forças elétricas superam a tensão superficial, um jato de fibra carregada é ejetado da ponta da agulha que apresenta o cone de Taylor, indo em direção ao coletor metálico. Durante o processo de viagem ao coletor, o solvente é evaporado no processo.⁷⁵

No processo de eletrofiação, diversos parâmetros pode ser ajustados, produzindo fibras com diferentes morfologias. Os processos de controle pode ser divididos em ⁷⁶:

✓ Parâmetros da solução: viscosidade, concentração polimérica e condutividade.

✓ Parâmetros do processo: voltagem, distância entre ponta da agulha e coletor, taxa de vazão, geometria do coletor utilizado.

✓ Parâmetros Ambientais: temperatura e umidade.

2.7.1 Parâmetros da Solução:

2.7.1.1 Concentração Polimérica, Viscosidade e Peso Molecular

A concentração polimérica e viscosidade é um dos fatores mais importantes no que tange a eletrofição. A solução ao ser eletrofiada deve possuir uma concentração mínima, permitindo o emaranhamento adequado das cadeias poliméricas, suficiente viscosidade para a formação do jato polimérico. Abaixo de certa concentração e viscosidade, a aplicação da voltagem resulta em eletrospray e formação de gotas devido à instabilidade Rayleigh (quebra da cadeia no capilar). Se a concentração for muito alta, e a solução muito viscosa, não haverá formação do jato na eletrofição.⁷⁷ A representação da figura 6, mostra a dependência da concentração polimérica e viscosidade na eletrofição.

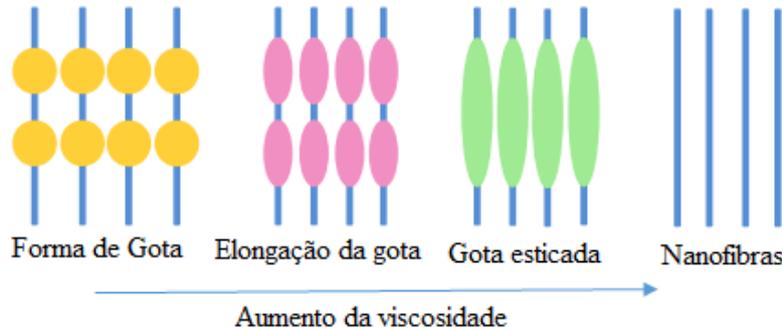


Figura 6. Esquema da morfologia das nanofibras com variação da viscosidade. Adaptado de Haider, A. et al.⁹

2.7.1.2 Condutividade Elétrica

A condutividade elétrica de uma solução é determinada pelo potencial de movimento dos íons presentes na solução. Após a aplicação de um potencial, a corrente irá fluir, sendo proporcional ao tipo de íons e concentração da solução.⁷⁸ A formação do jato polimérico e o diâmetro da fibra está intimamente ligado a condutividade da solução, que reflete a densidade

de carga no jato. Se a solução possuir condutividade elétrica muito baixa, o cone de Taylor não será formado, já soluções com maior condutividade, apresentam maior alongamento do jato e, por consequência, fibras com um diâmetro menor.^{9,10}

2.7.2 Parâmetros do Processo

2.7.2.1 Voltagem Aplicada

A voltagem aplicada e o campo elétrico resultante têm influência na morfologia e diâmetro final das fibras obtidas. Este parâmetro influencia na formação do cone de Taylor, no estiramento e aceleração do jato, resultando em diferentes morfologias. Normalmente uma força eletrostática maior resulta em fibras com diâmetros menores devido ao maior estiramento da solução polimérica com relação as repulsões de cargas existentes no jato polimérico.^{9,79}

2.7.2.2 Taxa de Vazão

A taxa de vazão determina a quantidade de solução transferida, influenciando na velocidade do jato polimérico no momento da eletrofiação, modificando o diâmetro final da nanofibras obtidas. Fibras com maior vazão apresentam normalmente maior diâmetro médio, enquanto uma menor vazão tende a produzir fibras mais uniformes. Esta diferença de morfologias deve-se à taxa de evaporação do solvente no trajeto do jato até o coletor metálico. Uma grande velocidade de vazão pode não deixar que o solvente evapore totalmente, ocasionando fibras com gotas e fibras que se aglutinam.^{80,81}

2.7.2.3 Distância entre Agulha e Coletor

A distância entre a agulha e o coletor é outro parâmetro estudado que controla a morfologia e o tamanho da fibra. Geralmente distâncias muito pequenas podem criar gotas na estrutura devido a não evaporação do solvente e também ao pouco alongamento da fibra polimérica. Já distâncias maiores, podem gerar fibras com diâmetro menor devido ao maior estiramento.⁷⁹ Porém, Sencadas e colaboradores observou que houve um aumento do diâmetro das fibras de quitosana com o aumento da distância entre a placa coletora e a ponta da agulha, que pode ser explicada pela diminuição da força do campo elétrico resultando em uma força eletrostática menor e por consequência mudança no estiramento das fibras.⁸²

2.7.2.4 Geometrias de Coletores

A natureza do coletor na eletrofiação é um fator que influencia as características morfológicas e físicas das nanofibras eletrofiadas. O coletor mais usual é a placa metálica estática que resulta na coleção de fibras orientadas randomicamente. Outra forma de se obter nanofibras, é a utilização de coletor com sistema rotatório que permite a obtenção de um conjunto de fibras alinhadas.⁸³

Um tambor rotativo pode ser utilizado para se obter fibras de maneira alinhada. O diâmetro da fibra alinhada pode ser controlada pela velocidade de rotação do tambor rotatório. O alinhamento das nanofibras, bem como o grau de alinhamento melhora com a velocidade utilizada. Rotações mais baixas, tendem a obter fibras com menor alinhamento.⁸⁴ Velocidades muito altas, podem ocasionar quebras na fibra depositada.⁸⁵

2.7.3 Parâmetros Ambientais: Temperatura e Umidade

Os parâmetros de temperatura e umidade também afetam a morfologia e o diâmetro final da fibra obtida. A umidade está relacionada à taxa de evaporação do solvente, quando a umidade é muito baixa, o solvente pode evaporar muito rapidamente. Entretanto, uma elevada umidade pode ocasionar fibras com diâmetros maiores, devido ao pequeno estiramento da fibra, além de poder ocasionar aglomerações das fibras por ainda possuírem solvente.⁸⁶

A temperatura da solução utilizada modifica a taxa de evaporação do solvente e o aumento da mesma diminui a viscosidade da solução.⁸⁷ Com uma maior temperatura e menor viscosidade, fibras com menor diâmetro são produzidas. No trabalho de Chi Wang e colaboradores, fibras de poliacrilonitrila (PAN) 6 % (m/m) em dimetilformamida (DMF) foram eletrofiadas em diferentes temperaturas. Com o aumento da temperatura no processo de eletrofiação, fibras com diâmetro menor foram obtidas.⁸⁸

3 OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo a obtenção de nanofibras poliméricas a partir das blendas de policaprolactona e gelatina, com e sem a adição de hidroxiapatita. As nanofibras foram obtidas pelo processo de eletrofição, utilizando diferentes coletores, um estacionário e um tambor rotatório. Além disso, quando houve a adição de gelatina, as nanofibras foram modificadas por reticulação química com o agente reticulador hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dietilaminopropil) carbodiimida (EDC).

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as morfologias das nanofibras e a presença de HA por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a técnica de espectroscopia de energia dispersiva (EDS);
- Avaliar a estabilidade térmica e a cristalinidade das nanofibras por análise termogravimetria (TGA) e análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC);
- Investigar as propriedades mecânicas das nanofibras por meio do ensaio de tração x deformação utilizando o equipamento de análise dinâmico mecânica (DMA);
- Estudo das propriedades de superfície dos materiais eletrofiados utilizando a técnica de ângulo de contato em água (WCA);
- Avaliar o desempenho das matrizes quanto a proliferação, atividade metabólica e diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais humanas (hMSC).

4 METODOLOGIA

Materiais: policaprolactona ($M_n = 80\ 000$), gelatina tipo B da pele bovina, hidroxiapatita (grau de reagente), hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dietilaminopropil) carbodiimida (EDC) (grau de pureza de 98%) e Fosfato de Potássio Monobásico. Todos da marca Sigma-Aldrich. Fosfato de Potássio Dibásico P.A (Vetec), Ácido Acético Glacial P.A. ACS (Anidrol) e Ácido Fórmico 85% P.A (Neon), Etanol 96% P.A. (Vetec), Células tronco mesenquimais humanas (hMSCs, Lonza), meio mínimo essencial (MEM) alpha (Life Technologies), soro bovino fetal (Atlanta Biologicals), gentamicina (Sigma Aldrich).

4.1 PREPARO DAS SOLUÇÕES

As nanofibras foram fabricadas utilizando aparelho de eletrofição da marca Instron. Todas as soluções foram feitas utilizando os solventes Ácido Acético (AA) e Ácido Fórmico (AF) na proporção 9:1 (v/v).

A proporção de solventes utilizados bem como a concentração polimérica de cada uma das soluções a serem eletrofiadas, foram escolhidas após a realização de amplos testes em laboratório e a otimização do processo de eletrofição.

4.1.1 Preparo da Solução de PCL

Para fabricação das nanofibras de PCL, foram preparadas soluções de PCL 15% (m/v) em AA/AF com ajuda de um agitador magnético por um período de 24h a temperatura ambiente. Após o preparo das soluções, as fibras foram eletrofiadas.

4.1.2 Eletrofição da Blenda PCL/GE

Foram preparadas soluções com concentração polimérica total de 15 % (m/v) de PCL/GE com uma proporção mássica de PCL:GE de 60:40 (m/m). Os polímeros foram dissolvidos simultaneamente nos solventes com agitação magnética por um período de 24h a temperatura ambiente.

4.1.3 Eletrofiação da Blenda PCL/GE/HA

Para o preparo das soluções de PCL/GE/HA, preparou-se soluções de PCL/GE 15% (m/v) (60:40 m/m) em AA/AF (9:1 v/v), incorporando à solução 10 % em massa de hidroxiapatita em relação a massa presente de PCL/GE.

Primeiramente a hidroxiapatita foi dispersa em AA/AF (9:1 v/v), utilizando o aparelho de ultrassom (Cristófoli, Brasil) com frequência ultrassônica de 42 kHz, por um tempo de 30 min para dispersão. Após este procedimento foi adicionado o PCL/GE 15 % (m/v) na proporção mássica de 60:40, e agitou-se a solução por 24h a temperatura ambiente.

4.2 PROCESSO DE ELETROFIAÇÃO

Os parâmetros de eletrofiação utilizados abaixo, foram escolhidos após a otimização do processo de eletrofiação com os materiais utilizados neste trabalho.

Os parâmetros do processo de fabricação das nanofibras foram de uma vazão de 0,5 mL/h, distância fixa de 15 cm entre a ponta da agulha e os coletores, e Seringas de 1 mL (Labor Import 0,45 mm x 13 mm) com uma agulha 22 G x 1`. Utilizou-se dois coletores com geometrias diferentes a fim de se obter morfologias finais diferentes, um coletor metálico e tambor rotatório com velocidade de 2.000 rotações por minuto. O processo de eletrofiação de PCL se deu com a aplicação uma voltagem de 21,5 kV, enquanto foram utilizados uma diferença de potencial de 24,5 kV para ambas as blendas de PCL/GE e de PCL/GE/HA. Um esquema do processo de eletrofiação é mostrado na figura 7.

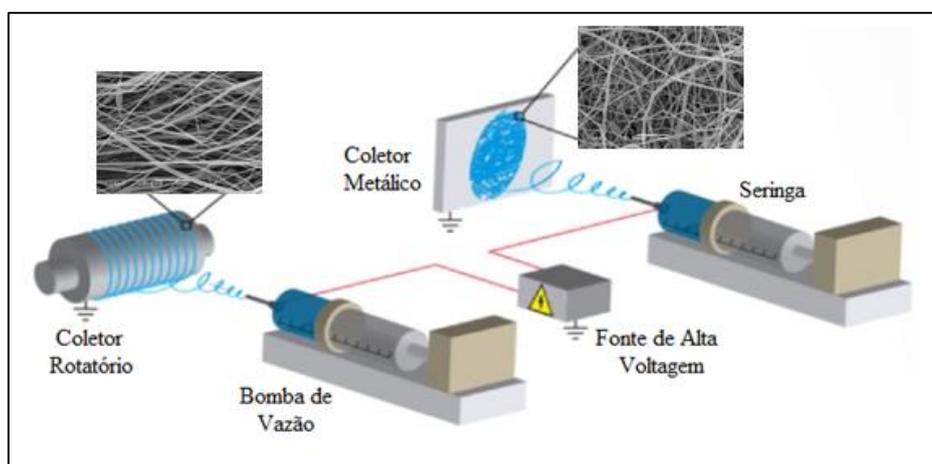


Figura 7. Processo de eletrofiação. Figura adaptada de Xiang Gao.⁸⁹

4.3 RETICULAÇÃO DAS NANOFIBRAS COM GELATINA

A reticulação das nanofibras com gelatina, PCL/GE e PCL/GE/HA foram realizadas por imersão das nanofibras em solução de etanol 90% (v/v) com pH 4,5 contendo 30 mM de EDC por um período de 24h em temperatura ambiente. Após a reticulação, as nanofibras foram lavadas por imersão em uma solução padrão de fosfato (PBS) 0,1 M com pH 7,4 por 2 h, seguido de lavagem em água deionizada. Ao final deste processo, as fibras foram secas em estufa a 30 ° C por 24h e guardadas em dissecador. As fibras reticuladas foram nomeadas como PCL/GE/EDC e PCL/GE/HA/EDC com morfologia aleatória e alinhada.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRAS

4.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de Varredura é uma técnica com aplicação em diversas áreas como a biologia, metalurgia, engenharias e química, que nos fornece detalhes da morfologia e identificação de elementos químicos para os materiais analisados, podendo chegar a aumentos de 300.000 vezes ou mais.

O princípio de funcionamento desta técnica é a incidência de um feixe de elétrons acelerado, sob vácuo, até a amostra. O sinal da imagem resulta da interação do feixe incidente com a superfície da amostra, que produz elétrons e fótons que podem ser coletados nos detectores e convertidos em sinal de vídeo. A profundidade máxima de detecção, portanto, a resolução espacial, depende da energia com que estas partículas ou raios atingem o detector, ou são capturadas pelo mesmo. Diferentes sinais podem ser emitidos pela amostra. Os mais utilizados para obtenção da imagem são originários dos elétrons secundários que possuem mais baixa energia (<50eV) e/ou dos elétrons retroespalhados, que por sua vez possuem energia que varia de 50 eV, até o valor de energia de energia do elétron primário. Os elétrons de alta energia por serem resultantes de um colisão elástica provem de camadas superficiais da amostra.⁹⁰

Para avaliação da morfologia das nanofibras obtidas, foram realizadas análises no Centro de Microscopia e Microanálise da UFRGS com um equipamento de microscopia eletrônica de varredura JEOL (JSM 6060), operando com um potencial de aceleração de feixe de 10keV. As nanofibras foram previamente metalizadas com ouro. Os diâmetros das fibras

foram calculados através do software de imagem ImageJ (National Institute of Health, USA), a partir de uma média de 100 medidas analisadas aleatoriamente por imagem.

4.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura por emissão de campo (MEV-FEG)

No microscópio eletrônico de varredura com canhão de emissão de campo, tem-se um feixe extremamente estreito de elétrons de energia controlada com precisão pelo canhão. Um campo elétrico faz com que os elétrons de alta energia sejam emitidos a partir de um filamento.

O EDS (detector de energia dispersiva de raio-x) proporciona a identificação de elementos químicos constituintes do material analisado. Ele se baseia no fato de que quando um feixe de elétrons incide sobre o material a ser analisado, os elétrons mais externos dos átomos são excitados mudando de níveis energéticos e ao retornarem a sua posição inicial, liberam energia adquirida a qual é emitida em comprimento de onda no espectro de raios-x característico, sendo detectado e determinado o átomo emissor da energia característica.⁹¹

Para avaliar e comprovar a hidroxiapatita contida nas nanofibras, realizou-se a análise de espectroscopia de dispersão de energia (EDS) utilizando o equipamento FEG-SEM TESCAN (MIRA3). O potencial de aceleração de feixe foi mantido em 15 keV. A análise foi realizada na Universidade de Caxias do Sul.

4.4.3 Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier no modo de Refletância Total Atenuada (FTIR – ATR)

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier é uma técnica experimental que pode nos dar evidências dos grupos funcionais presentes no material a ser estudado. Este método se baseia na absorção de frequências de radiação na região do infravermelho pelos grupos funcionais, fazendo com que as ligações entre átomos e grupos de átomos vibrem em frequências específicas características dos átomos presentes nos grupos funcionais da molécula. O espectro registra os resultados através de um gráfico de absorbância versus o número de onda. A localização de uma banda de absorção no infravermelho (IV) pode ser especificada pelo seu número de onda, ν , medido em centímetros recíprocos (cm^{-1}), ou através do seu comprimento de onda (λ).⁹²

A espectroscopia de refletância total atenuada (ATR) utiliza o fenômeno de reflexão interna total. Um feixe de radiação entra em um cristal, sendo totalmente refletido na interface do cristal e amostra quando o ângulo de incidência entre as interfaces é maior do que o ângulo crítico, onde este último é uma função dos índices de refração das duas superfícies. O feixe penetra uma fração de um comprimento de onda na amostra analisada, absorvendo seletivamente a radiação. A faixa de penetração típica é de alguns micrometros (0,5 – 3). Após percorrer ao longo do cristal em contato com a amostra, o feixe chega a um detector que mede a radiação atenuada resultante, plotando o resultado como uma função do comprimento de onda pelo espectrômetro e dá origem às características espectrais de absorção da amostra.^{93,94}

Os espectros de FTIR – ATR das amostras foram determinados em um equipamento de modelo Alpha-P (Bruker) com prisma de Diamante, a 45 graus, no modo de refletância total atenuada entre 4000 cm⁻¹ a 500 cm⁻¹, utilizando 24 varreduras em resolução de 4 cm⁻¹.

4.4.4 Ângulo de Contato em Água (WCA)

A análise WCA é uma técnica simples e confiável sobre a molhabilidade do material analisado. Ela mede o quanto uma gota de água se espalha sobre a superfície do material, obtendo então informações sobre a hidrofobicidade ou hidrofiliicidade do material.⁹⁵

O ângulo de contato θ é definido como o ângulo formado pelo equilíbrio entre a gota sobre as três tensões interfaciais como demonstrado na figura 5. Ele pode ser calculado segundo a equação de Young, na qual γ_{lv} , γ_{sv} , and γ_{sl} são as tensões interfaciais liquido-vapor, solido-vapor e solido-liquido respectivamente. Quanto mais baixo o ângulo de contato θ , mais hidrofílico é o material.⁹⁶

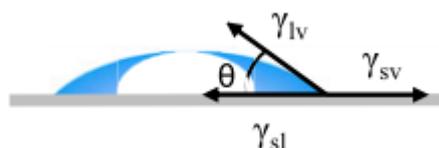


Figura 8. Ilustração interfaces de ângulo de contato. Adaptado de Yuehua Yuan e T. Randall Lee.⁹⁶

$$\cos \theta = \gamma_{sv} - \gamma_{sl} / \gamma_{lv} \quad (1)$$

O WCA das nanofibras foi realizado no equipamento Kruss DSA 30 composto de uma microseringa e uma câmera acoplada, utilizando o método da gota sésil. Na superfície do material depositou-se gotas de água deionizada (3 µL). Realizou-se três medidas em diferentes posições. As imagens foram digitalizadas no equipamento pelo software “Drop Shape Analysis System” e posteriormente os ângulos calculados pelo software Surftens 4.5.

4.4.5 Grau de Intumescimento (GI)

Para esta análise, utilizou-se amostras em triplicatas com dimensões de 10 mm x 10 mm. As nanofibras com morfologia aleatória e alinhadas foram imersas em solução tampão fosfato (PBS) por 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 24 h e 48 h, para se determinar o grau de intumescimento das nanofibras. Inicialmente pesou-se em balança analítica as amostras secas, obtendo seu peso inicial. Nos tempos indicados, as amostras foram retiradas do PBS, retirou-se o excesso de solução com gaze e realizou-se a pesagem das amostras antes de retornarem a imersão.

Os cálculos do Intumescimento das nanofibras foram realizados conforme a Equação 2 ⁹⁷:

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

Na qual o M_f é a massa da amostra após o tempo de imersão e M_i é a massa da amostra seca inicial.

4.4.6 Análise de Solubilidade

A análise de solubilidade prevê a resistência a perda de massa da nanofibras quando elas são submetidas a imersão em PBS durante um determinado tempo.⁹⁴ Para o teste de solubilidade, pesou-se a massa das amostras inicialmente antes da imersão em PBS, e pesou-se as mesmas secas após 48 h em estufa a 30° C até a massa ficar constante. As solubilidades foram obtidas através da Equação 3:

$$\text{Solubilidade} = \frac{(M_i - M_s)}{M_i} \times 100 \quad (3)$$

No cálculo, M_i é a massa da amostra inicial seca antes da imersão e M_s é a massa da amostra depois da imersão por 48 h e seca.

4.4.7 Análise Mecânica

Para se analisar as propriedades mecânicas de um material, um dos ensaios mais comuns é o de tração, na qual uma amostra é deformada, geralmente até sua fratura, mediante uma carga de tração crescente aplicada uniaxialmente ao longo do eixo mais comprido de um corpo de prova. O resultado do ensaio é um gráfico de carga ou força aplicada em função do alongamento.⁹⁸

O ensaio de tração foi realizado em um equipamento DMA Q800, TA Instruments, utilizando o modo de tensão de filme. Utilizou-se uma força de pré carga de 0,0010N, uma rampa com taxa de 0,5 N/min e força limite de 18N com temperatura de 25°C. Os testes foram realizadas em 3 replicatas de cada amostra de nanofibra. Para medição da espessura das amostras foi utilizado um micrometro eletrônico (Schut, modelo filleta,) com medição de 0-25mm e erro de 0,001mm. Foram obtidos a partir dos experimentos: Módulo de Young (E), resistência a tração máxima (RTM) e alongação máxima (EM).

4.4.8 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica é definida como um processo que envolve a medida da variação de massa de uma amostra em função da temperatura enquanto é submetido a uma programação controlada. O equipamento é composto de uma microbalança, um forno, um programador de temperatura e um computador. A perda de massa em temperatura controlada pode ser aplicada para estudar a decomposição térmica de materiais e sua estabilidade térmica, determinação de umidade, teor de voláteis e de cinzas, estudos cinéticos de reações, entre outras aplicações.⁹⁹

A técnica foi realizada em um aparelho T.A. Instrument, modelo QA 50. A massa das amostras analisadas variou entre 8 a 10 mg de amostra. A temperatura utilizada foi de 25 ° C a 700 ° C com uma rampa de aquecimento de aquecimento de 20 ° C/min, sob atmosfera inerte de nitrogênio.

4.4.9 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

É uma técnica de análise térmica na qual mede-se a diferença entre o fluxo de calor da amostra e de um material de referência submetidas a uma programação controlada de temperatura.

As medidas de calorimetria exploratória diferencial foram realizadas em um equipamento de DSC Q20 (TA Instruments) em atmosfera de nitrogênio. As nanofibras foram pesadas em torno de 6-8 mg. O procedimento utilizado foi uma taxa de aquecimento e resfriamentos de 10°C/min. Primeiramente aqueceu-se as amostras, de 25°C a 200°C com isoterma de 5 min na temperatura final. Após resfriou-se as amostras até 0°C e aqueceu-se até 200°C novamente. Calculou-se a cristalinidade do PCL nas nanofibras na segunda curva de aquecimento, conforme a equação 4. Foi utilizado a entalpia de fusão de 135 J/g para PCL 100 % cristalino.¹⁰⁰ O equipamento se encontra no Instituto de Química da UFRGS.

$$X_c = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_f^\circ \cdot W} \times 100 \quad (4)$$

Na qual X_c é a cristalinidade, ΔH_f é a entalpia de fusão da amostra, ΔH_f° é a entalpia de fusão do PCL 100 % cristalino, W é a fração mássica de PCL.

4.4.10 Cultura Celular

A análise de cultura celular bem como todas as outras análises biológicas que serão descritas foram realizadas nos Estados Unidos na Universidade Rutgers - The State University of New Jersey no New Jersey Center for Biomaterials.

As células-tronco humanas mesenquimais (hMSCs, Lonza) foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM) alfa (Life Technologies) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Atlanta Biologicals) e 35 ug / mL de gentamicina (Sigma Aldrich) a 37 °C em 5% CO₂/ 95% de atmosfera de ar. As células foram passadas após atingirem a confluência e mantidas a uma densidade de 3,6 x 10³ e 1,8 x 10⁴ células / cm².

4.4.11 Proliferação e Ensaios Metabólicos

A semeadura de células em estruturas tridimensionais é uma abordagem promissora para induzir a formação de tecido *in vivo*. Para desenvolver materiais com essa capacidade, é necessário semear células *in vitro* e subsequentemente realizar a cultura celular no biomaterial.

O método de quantificação de DNA (PicoGreen) é uma técnica importante de quantificação do número de células presentes nos biomateriais produzidos, elucidando processos *in vitro* e *in vivo* tais como a proliferação das células.¹⁰¹

O AlamarBlue é utilizado para medir quantitativamente/qualitativamente a viabilidade de linhas celulares de mamíferos, bactérias e fungos, incorporando um indicador de crescimento fluorométrico/colorimétrico rápido, sensível e confiável. Ele é um corante azul não-fluorescente que ao ser reduzido, muda de cor e se torna altamente fluorescente. As células viáveis mantêm um ambiente redutor no seu citoplasma. Desta forma, a alteração ocorrida no reagente quando incubado com células viáveis, pode ser detectada utilizando instrumentos de medição de fluorescência ou absorvância.¹⁰²

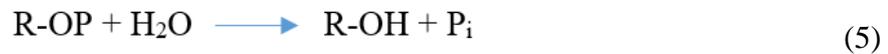
Foram realizadas análises de proliferação e a atividade metabólica de hMSCs cultivadas em matrizes fibrosas foram medidas ao longo de sete dias. As nanofibras foram cortadas em círculos de 1 cm de diâmetro e esterilizadas sob UV durante duas horas de cada lado. Cada material pré-cortado foi colocado no fundo de uma placa não tratada de 48 poços utilizando um pré-esterilizado O-ring. As nanofibras foram acondicionadas com meio de crescimento hMSC completo a 37 ° C durante 1 hora antes de semear as células. As hMSC foram semeadas gota a gota sobre a superfície do material a $8,5 \times 10^3$ células / poço num volume de 150 uL. As células foram também semeadas diretamente sobre cultura de tecidos plásticos tratados como controles. O meio foi trocado a cada 2-3 dias. As amostras (n = 3) foram recolhidas nos Dias 1, 4 e 7 para a quantificação de DNA pelo ensaio de quantificação de dsDNA PicoGreen® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A atividade metabólica foi medida nos Dias 1, 4 e 7 utilizando AlamarBlue (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante (n = 3).

4.4.12 Ensaios de Diferenciação Celular

A fosfatase alcalina é uma enzima fosfomonohidrolase inespecífica, capaz de hidrolisar monoésteres de fosfato, pirofosfato, diésteres de fosfato, bem como catalisar reações de

tranfosforilização, sendo denominada de “alcalina por sua habilidade de efetuar estas reações mais eficientemente em pH acima do Neutro (pH 8-11).¹⁰³

A fosfatase alcalina catalisa a seguinte reação geral:



Onde a hidrólise de R-OP origina um fosfato inorgânico (Pi), e um álcool, açúcar, fenol, etc.

O mecanismo com o qual esta enzima realiza sua função não é completamente compreendido, mas parece agir tanto para aumentar a concentração local de fosfato inorgânico, um promotor de mineralização, como para diminuir a concentração de pirofosfato extracelular, um inibidor da formação mineral. Evidências sugerem que a enzima está envolvida na mineralização esquelética, sendo associada com a membrana plasmática dos osteoblastos, os quais brotam para formar as vesículas da matriz vistas no osso em desenvolvimento. Para colaborar com as evidências de sua importância na mineralização óssea, pessoas que apresentam um grande número de doenças no fígado e nos ossos, apresentam alteração no nível e atividade da fosfatase alcalina.¹⁰⁴ Um exemplo são pessoas pacientes que sofrem de hipofosfatase, que têm um defeito na ALP e são caracterizados por mineralização esquelética anormal.¹⁰⁵ Por estes motivos, o marcador ALP têm sido utilizado para verificar se o biomaterial apresenta indícios de uma boa mineralização na ETO.

A diferenciação de hMSC foi realizada através da quantificação de atividade alcalina fosfatase sob condições induzidas (n = 3) e não induzidas (n = 3).

As nanofibras foram cortadas em círculos de 1,5 cm de diâmetro e esterilizados sob UV durante duas horas de cada lado. Cada nanofibra pré-cortada foi colocada no fundo de um poço de uma placa não tratada de 24 poços utilizando O anéis pré-esterilizados. As nanofibras foram acondicionadas em meios MEM alfa completos a 37 ° C durante uma hora antes da semeadura de células. As hMSCs foram semeadas gota a gota sobre a superfície das matrizes a 2,5x10⁴ células / poço em 200 uL. As células foram também semeadas diretamente sobre o plástico tratado com cultura de tecidos como controles. Deixou-se as células aderirem durante 30 minutos a 37 ° C, depois adicionaram-se 300 ul adicionais de meio completo a cada poço. Após 24 horas de incubação, o meio foi alterado em todas as amostras. Aqueles em condições não induzidas foram cultivados em meios de crescimento de hMSC completos, enquanto que aqueles em condições induzidas foram cultivados em meio osteogênico (meio de crescimento

hMSC completo contendo fosfato de b-glicerol 200 μ M, ácido ascórbico 50 ng / ml e dexametasona 0,2 nM). As células foram cultivadas nas nanofibras durante 14 dias. Mídia foi trocado a cada 2-3 dias. Após 14 dias, as nanofibras foram lavadas uma vez com PBS e a atividade de ALP foi quantificada utilizando um kit de ensaio fluorimétrico de atividade de fosfatase alcalina (Biovision) de acordo com as instruções do fabricante. A atividade de ALP foi normalizada pela quantificação de DNA, medida pelo ensaio de quantificação de dsDNA Picogreen® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 MORFOLOGIA DAS NANOFIBRAS ELETROFIADAS

A morfologia das nanofibras, bem como a distribuição de tamanho quanto aos diâmetros da fibra, podem ser visualizadas nas imagens apresentadas na figura 9. As nanofibras de PCL apresentaram morfologia com presença de gotas ao longo da fibra. Após a adição de GE, a morfologia sofreu alterações, com redução do número de gotas e maior uniformidade. A presença de gelatina favoreceu o processo de eletrofiação devido à susceptibilidade dos seus grupos amino e carboxílico à ionização, o que aumenta a condutividade da solução, produzindo assim fibras uniformes e com diâmetro médio menores em comparação aos materiais eletrofiados de PCL.¹⁰⁶ A adição de HA na mistura PCL/GE, não alterou a distribuição do diâmetro das fibras.

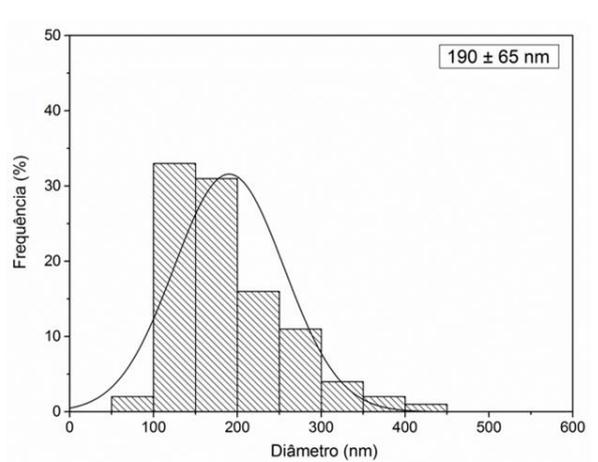
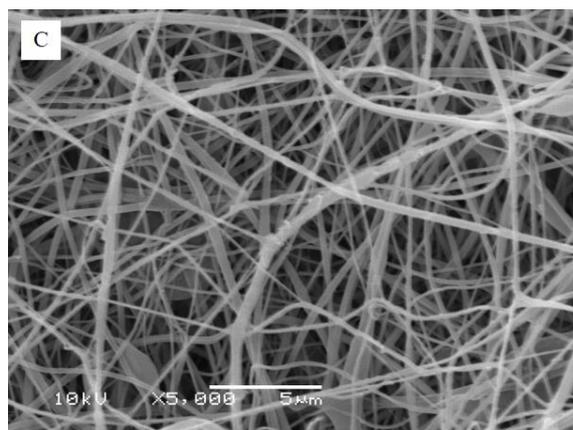
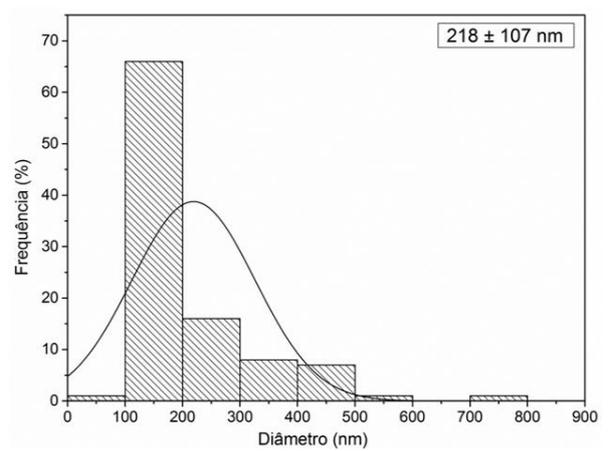
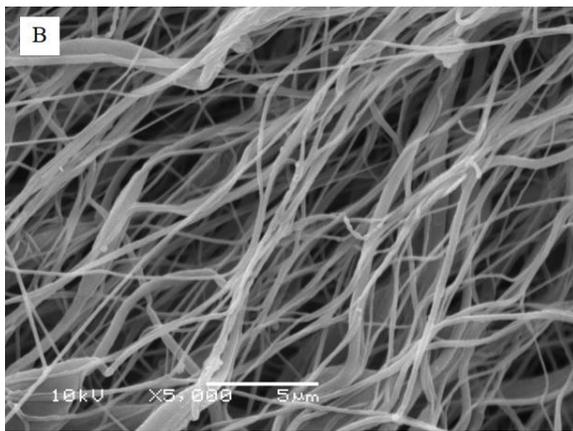
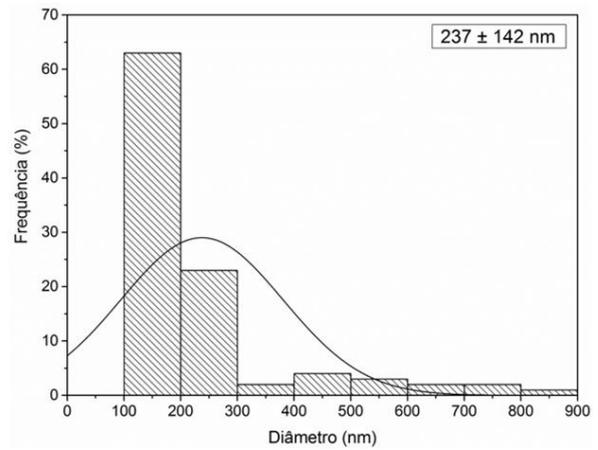
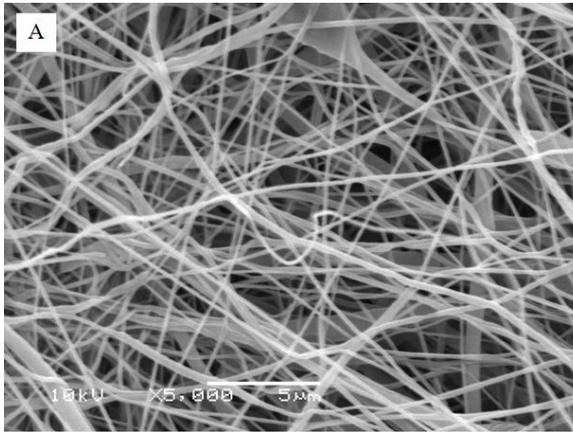
A análise dos diâmetros médios das fibras mostrou que houve mínima diferença na média dos diâmetros, quando as fibras foram recolhidas em coletores de variadas geometrias, tais como placa coletora e tambor rotatório. Entretanto, mudanças no diâmetro de fibras foi observado por Doustgani e colaboradores ao eletrofiar fibras de PCL, poli (álcool vinílico) PVA e nanopartículas de hidroxiapatita nHA. O aumento da rotação de 100 rpm para 3000 rpm, ocasionou a diminuição no diâmetro de 339 ± 107 nm para 123 ± 32 nm. Isto deve-se à força de tração feita pela alta rotação do coletor, estirando as fibras que são coletadas e por consequência diminuindo o seu diâmetro final.²⁵

A obtenção de apenas uma pequena variação nos diâmetros é relacionada provavelmente à velocidade de rotação utilizada, que não foi suficiente para haver um grande estiramento das fibras ao serem coletadas. Desta maneira, conclui-se que apesar da orientação das fibras ter sido alterada, não houve impactos no diâmetro da mesma.

As nanofibras reticuladas são apresentadas na figura 10. Sua morfologia mostrou agrupamentos de fibras, provavelmente em função do processo de reticulação. No entanto, apesar do processo de imersão em solução de EDC e das sucessivas lavagens do material, as fibras mantiveram-se presentes, mostrando que não houve total coalescência ou desaparecimento da morfologia em função da modificação química.

Comportamento similar foi observado por BARNES e colaboradores, ao reticular nanofibras de colágeno tipo II, na presença de 20 mM e 200 mM de EDC.¹⁰⁷

O aglutinamento de fibras que se fundem também foi encontrado para fibras de colágeno reticulados com vapor de glutaraldeído. Sisson e colaboradores justificaram essa modificação morfológica devido ao vapor de água presente no ar durante a reticulação.¹⁰⁸



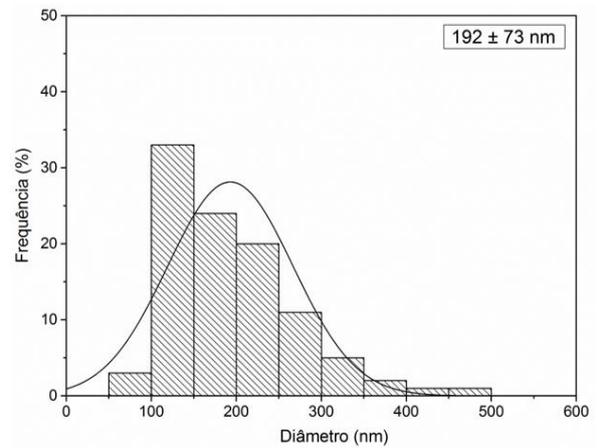
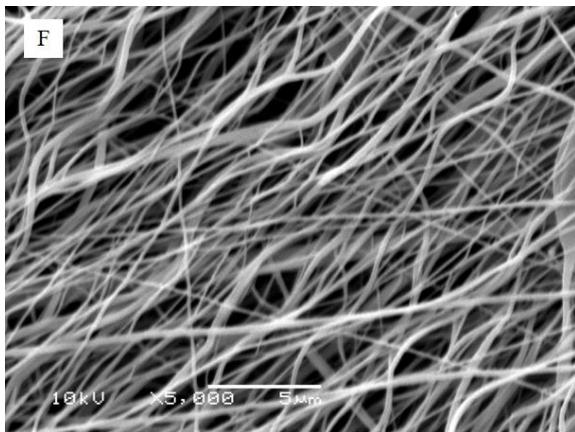
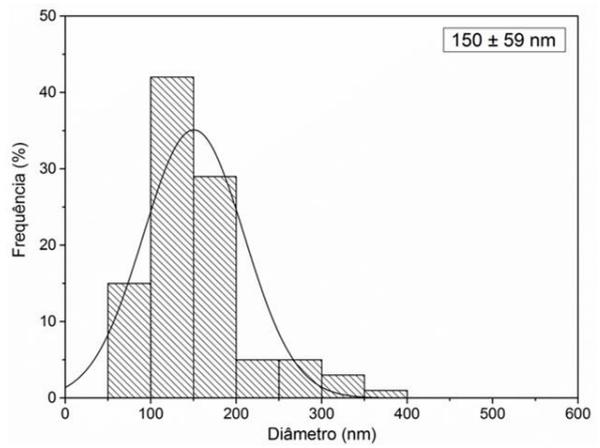
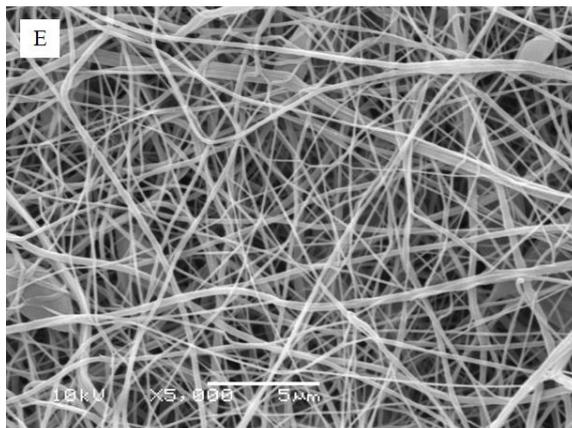
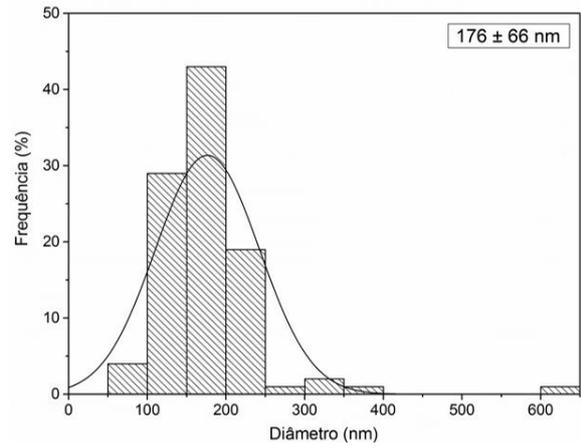
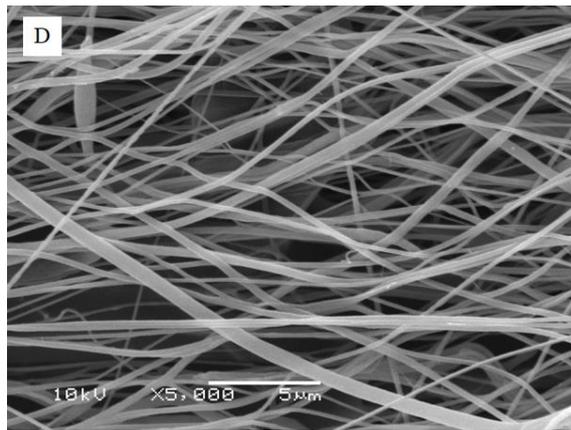


Figura 9. Micrografia de MEV das nanofibras eletrofiadas e suas respectivas distribuições de tamanho das nanofibras. Nanofibras Aleatórias: PCL(A), PCL/GE (C), PCL/GE/HA (E). Nanofibras Alinhadas: PCL (B), PCL/GE (D), PCL/GE/HA (F).

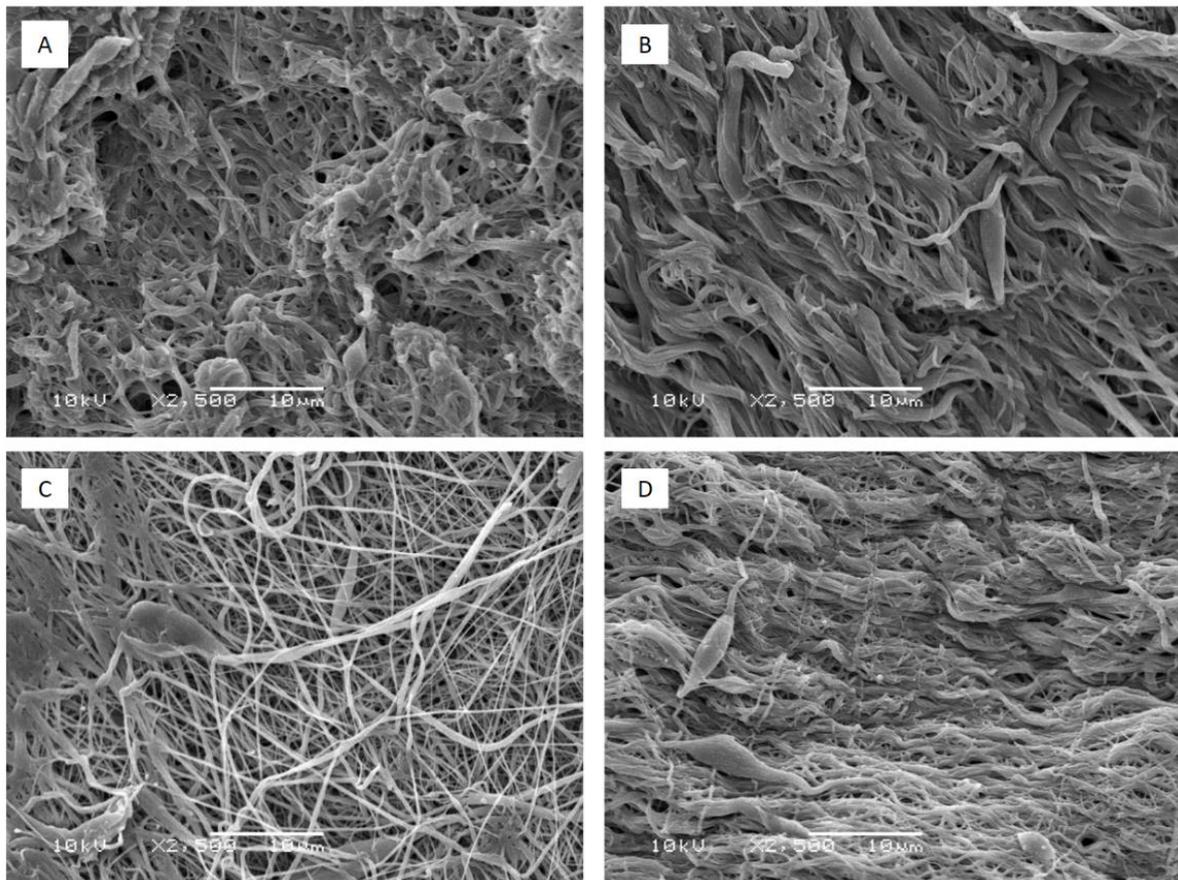


Figura 10. Micrografia de MEV das nanofibras reticuladas. Nanofibras reticuladas aleatórias: PCL/GE/EDC (A), PCL/GE/HA/EDC (C). Nanofibras reticuladas alinhadas: PCL/GE/EDC (B), PCL/GE/HA/EDC (D).

5.2 INCORPORAÇÃO DA HIDROXIAPATITA

A utilização da análise de MEV-FEG ilustrou a presença de HA nas nanofibras de PCL/GE/HA (figura 11). A presença de HA foi identificada e confirmada pela análise EDS, analisando uma parte do cristal presente na estrutura, identificando picos de Ca e P, que são a composição principal da HA. Como as amostras foram metalizadas em ouro antes da análise, picos de ouro aparecem no espectro. A imagem também ilustrou a morfologia da nanofibra com a presença de pequenas aglomerações de HA ao redor das fibras (figura 11). Alguns agregados de HA também foram observados por MEV ao longo de fibras de Colágeno com 30% em massa de Hidroxiapatita, no trabalho de Shu-Hua e colaboradores.¹⁰⁹ As aglomerações de partículas de HA nas nanofibras se deve a problemas de dispersão de HA na solução de PCL/GE antes da eletrofiação, uma vez que há pouca afinidade da HA com solventes orgânicos. Este problema já foi relatado na literatura por Jaiswal e colaboradores ao se obter nanofibras utilizando a

blenda de policaprolactona e gelatina com adição de 42% em peso de HA antes da eletrofição. Porém o autor conseguiu uma boa dispersão quando utilizou outro método de incorporação de hidroxiapatita através de nucleação *in situ* de nano hidroxiapatita ao se imergir fibras de PCL/GE em soluções com cálcio e fosfato. ¹¹⁰

A presença de hidroxiapatita superficialmente em fibras proporcionou uma superfície áspera com interações eficientes entre as células e a hidroxiapatita para Ramier e colaboradores, ao formar fibras de poli(3-hidroxiбутирато) PHB com HA (15% m/m) utilizando método de eletrofição/eletropulverização. ¹¹¹

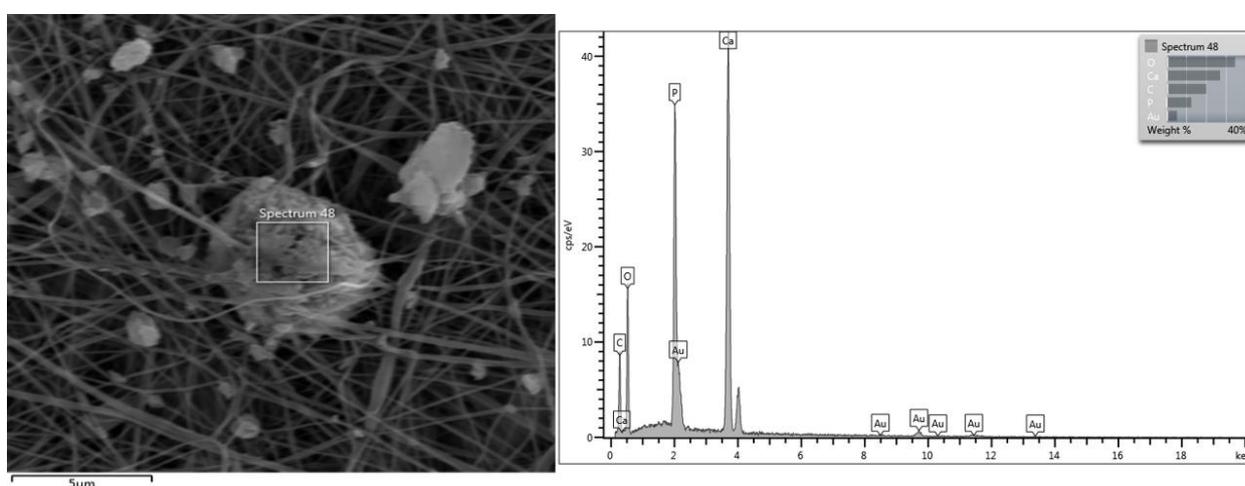


Figura 11. Micrografia de MEV e espectro de EDS da nanofibra aleatória PCL/GE/HA

5.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (FTIR-ATR)

Os espectros de infravermelho das nanofibras eletrofiadas são apresentados na figura 12. As nanofibras de PCL mostraram as bandas características deste polímero em 2941 cm^{-1} e 2864 cm^{-1} (estiramento assimétrico e simétrico $-\text{CH}_2$ respectivamente), 1724 cm^{-1} (estiramento carbonil $\text{C}=\text{O}$), 1293 cm^{-1} (estiramento $\text{C}-\text{O}$ e $\text{C}-\text{C}$), 1239 cm^{-1} (estiramento assimétrico $\text{C}-\text{O}-\text{C}$) e 1166 cm^{-1} (estiramento simétrico $\text{C}-\text{O}-\text{C}$). ¹¹² A fibra de PCL/GE além dos picos de PCL, apresentou as bandas característica da gelatina em 3295 cm^{-1} devido ao estiramento $\text{N}-\text{H}$ da ligação amida, estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ em 1644 cm^{-1} (amida I), ligação $\text{N}-\text{H}$ em 1541 cm^{-1} (amida II), movimento para fora do plano $\text{N}-\text{H}$ em 670 cm^{-1} .^{113,114} A figura 13 apresenta o FTIR das substâncias puras PCL e Gelatina, para confirmação das bandas encontradas nas nanofibras. Também foi possível identificar nas fibras reticuladas todas as bandas

características de PCL/GE. Como esperado, a obtenção de nanofibras em diferentes coletores, não modificou a estrutura química dos materiais constituintes das nanofibras.

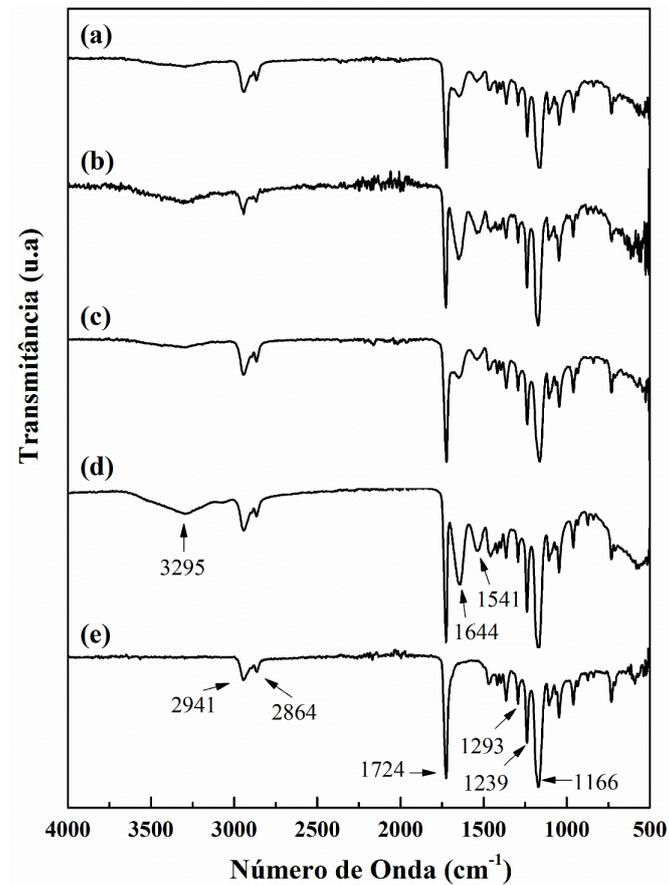


Figura 12. Espectros de FTIR das nanofibras coletadas em tambor rotatório: (a)PCL/GE/HA/EDC, (b) PCL/GE/HA, (c) PCL/GE/EDC, (d) PCL/GE, (e) PCL.

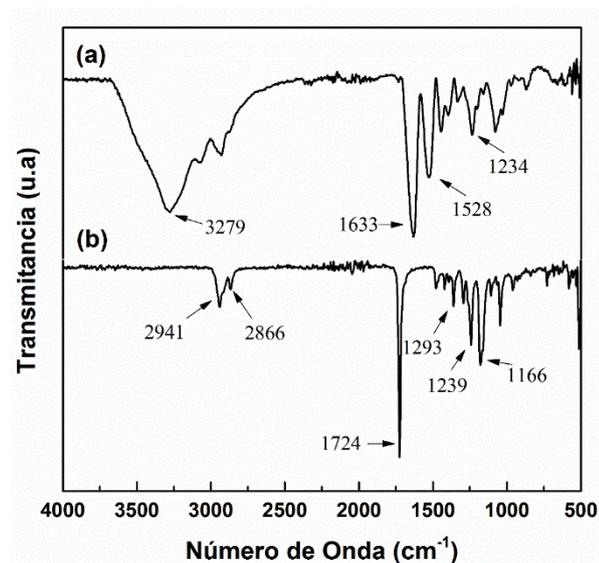


Figura 13. Espectros de FTIR das substâncias puras: (a) gelatina, (b) PCL.

5.4 MOLHABILIDADE DAS NANOFIBRAS

A propriedade de molhabilidade da superfície das nanofibras é importante para sua aplicação como material em engenharia de tecidos. Os resultados da WCA são mostrados na figura 14 e na tabela 1. A hidrofobicidade das nanofibras PCL é bem demonstrada pelos seus valores de WCA, que são superiores a 90° .^{115,116} O ângulo de contato obtido para o PCL foi de $122 \pm 2^\circ$, valor próximo ao encontrado por Jiajia e colaboradores de $129,6^\circ$.¹¹⁷

A molhabilidade do nanofibras com estrutura aleatória de PCL diminui quando a gelatina foi adicionada, mudando o ângulo de contato para $34 \pm 2^\circ$ na PCL/GE aleatória, se tornando uma matriz hidrofílica. A diminuição do ângulo de contato, resultando na maior hidrofiliabilidade com a adição de gelatina é atribuído aos grupos funcionais amina e carboxílico, capazes de absorver água.²⁴ A diminuição do ângulo de contato com adição de gelatina foi relatado por Zheng e colaboradores, quando eletrofiou fibras de gelatina e policaprolactona. Enquanto o WCA de nanofibras de PCL/GE (70:30) foi de $32,7^\circ$, na proporção de 50:50 obtiveram ângulo de $10,8^\circ$.²⁶

As nanofibras com hidroxiapatita PCL/GE/HA obtiveram ângulos similares as nanofibras com gelatina, sendo mais hidrofílicos que a PCL pura. A diminuição no ângulo de contato foi reportada por Hassan M. I. et al, com incorporação de 10 e 20% de hidroxiapatita em fibras de PCL pura, mudando o WCA de $127,3 \pm 2,4^\circ$ para $112,7 \pm 3,1^\circ$ e $106,3 \pm 4,5^\circ$ respectivamente.⁶¹

A reticulação das nanofibras com gelatina ocasionou um pequeno aumento no ângulo de contato quando comparado as fibras com gelatina não reticuladas. As fibras de PCL/GE/EDC aleatórias e alinhadas obtiveram ângulo de contato de 66 ± 3 e $62 \pm 4^\circ$, enquanto as não reticuladas obtiveram ângulo de 34 ± 2 e $33 \pm 3^\circ$. As fibras reticuladas com hidroxiapatita, PCL/GE/HA/EDC com morfologias aleatórias e alinhadas, obtiveram ângulo de contato de 48 ± 3 e $51 \pm 5^\circ$ respectivamente, enquanto as não reticuladas PCL/GE/HA obtiveram ângulo de 35 ± 6 e $36 \pm 4^\circ$.

O maior WCA obtido quando as nanofibras foram reticuladas, deve-se sobretudo, a estrutura mais densa, com menor espaçamento interfibrilar, impedindo a absorção de água na estrutura fibrilar do material.¹¹⁸ As diferentes morfologias obtidas na eletrofiação, com diferentes coletores, fibras com organização aleatória ou alinhada, não causaram alteração no ângulo de contato das amostras.

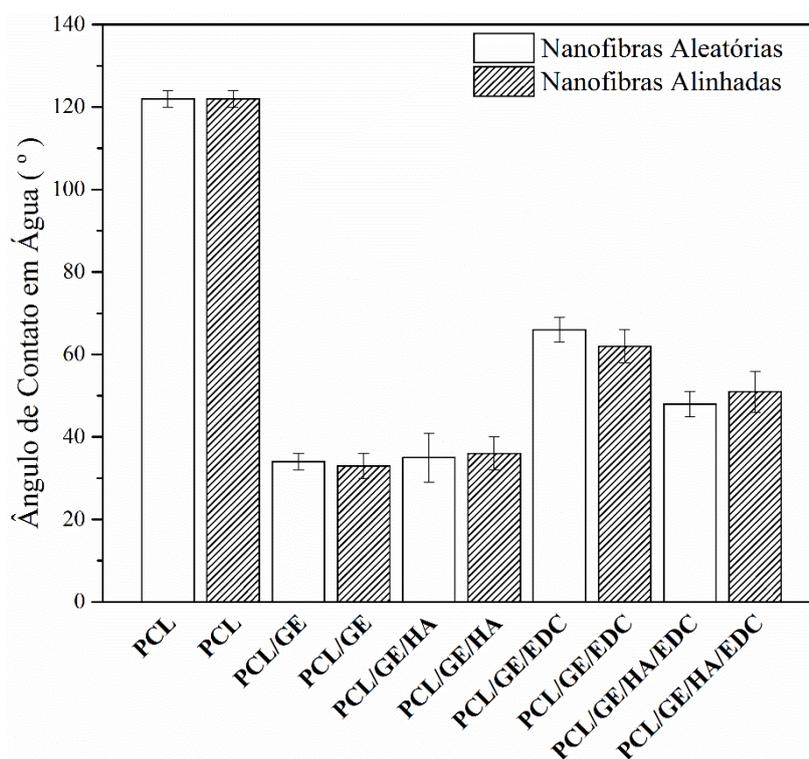


Figura 14. Ângulo de Contato das nanofibras obtidas em placa e em tambor rotatório.

Tabela 1. Ângulo de Contato das nanofibras obtidas em placa e em tambor rotatório.

Nanofibras	WCA (°)
PCL ^R	122 ± 2
PCL ^A	122 ± 2
PCL/GE ^R	34 ± 2
PCL/GE ^A	33 ± 3
PCL/GE/HA ^R	35 ± 6
PCL/GE/HA ^A	36 ± 4
PCL/GE/EDC ^R	66 ± 3
PCL/GE/EDC ^A	62 ± 4
PCL/GE/HA/EDC ^R	48 ± 3
PCL/GE/HA/EDC ^A	51 ± 5

^A Nanofibras Alinhadas;

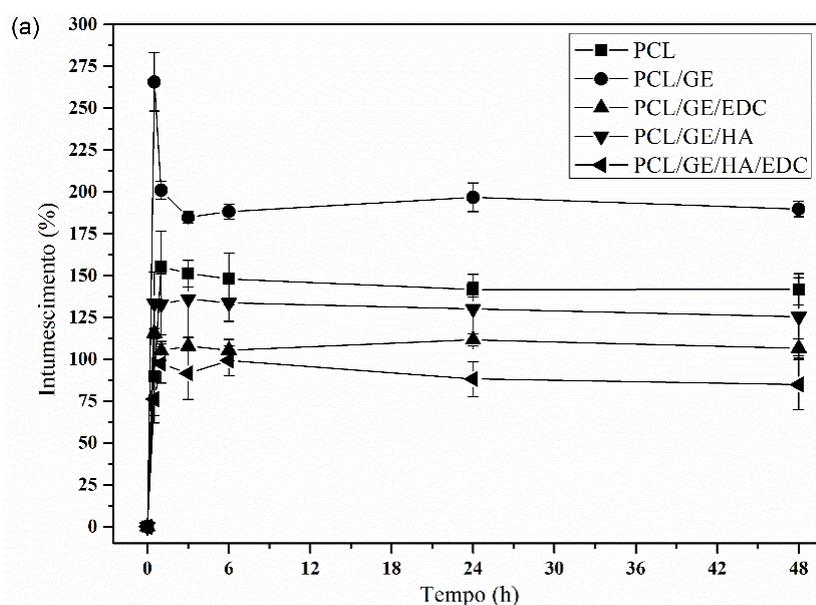
^R Nanofibras Aleatórias

5.5 GRAU DE INTUMESCIMENTO (GI) e SOLUBILIDADE

A figura 15 mostra o grau de intumescimento para as nanofibras. As nanofibras com PCL/GE mostraram o maior grau de intumescimento, obtendo GI de 266 ± 17 % para alinhada e 250 ± 29 % para aleatória. Após 30 minutos de imersão, houve uma diminuição do grau de intumescimento, isto pode ter ocorrido por solubilização da gelatina no meio, uma vez que o material ainda não estava reticulado. Isto também ocorreu para a fibra PCL/GE/HA.

A reação de reticulação com EDC diminuiu o intumescimento das nanofibras obtidas, sendo uma indicação de uma reação bem sucedida. O menor grau de intumescimento atingido após a reticulação geralmente ocorre pela redução da mobilidade das cadeias poliméricas decorrentes das ligações químicas oriundas da reação com EDC. Como consequência, há uma alteração estrutural das nanofibras impedindo absorção de água.^{118,119} Essa redução no intumescimento de gelatina reticuladas com EDC foi relatado por Siqueira e colaboradores. Em seu estudo, os materiais produzidos por *casting* obtiveram uma diminuição de intumescimento (de um fator de 4,3), quando comparados aos filmes não reticulados. Segundo os autores, estas alterações foram oriundas das ligações de hidrogênio entre grupos amida, levando a uma estrutura mais rígida¹¹⁸

As fibras de PCL/GE/HA com diferentes morfologias, obtiveram graus de intumescimentos diferentes. O menor GI para a nanofibra alinhada pode ter ocorrido pela dissolução da gelatina e hidroxiapatita ao mesmo tempo em que houve inchamento nos instantes iniciais de imersão



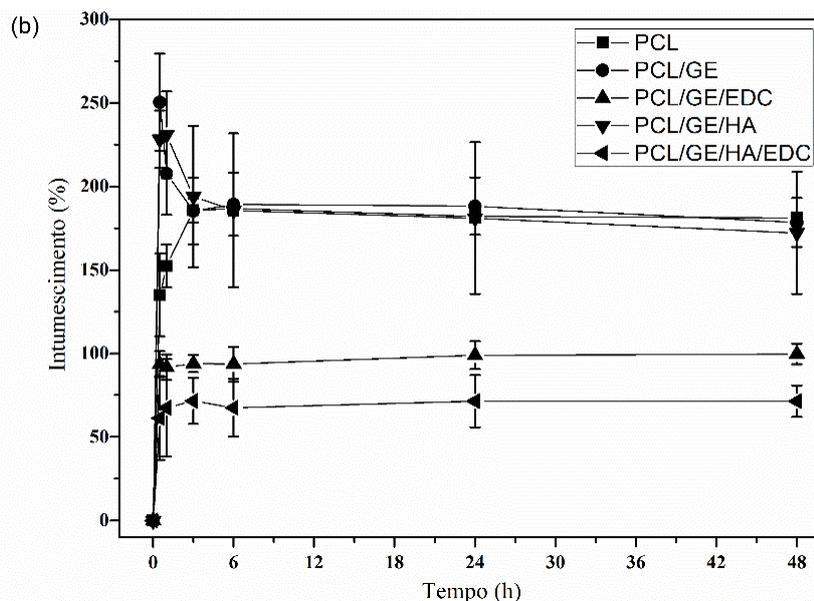


Figura 15. Intumescimento das nanofibras: (a) Nanofibras Alinhadas, (b) Nanofibras Aleatórias

Pelo teste de solubilidade identificou-se que as nanofibras reticuladas não apresentaram perda de massa, após 48 h de imersão. Isto demonstra que foi possível a obtenção de nanofibras com estabilidade em ambiente aquoso após a reticulação química. Entretanto as fibras não reticuladas de PCL/GE e PCL/GE/HA obtiveram perda de massa de $11 \pm 1,1 \%$ e $17 \pm 4,1 \%$ quando obtidas com morfologia aleatória, e $14 \pm 1,3 \%$ e $27 \pm 2,5 \%$ quando alinhadas.

5.7 PROPRIEDADE MECÂNICA (ENSAIO DE TRAÇÃO)

Foi realizada a análise mecânica do material com o teste de tensão vs deformação, obtendo o módulo de Young (E), tensão máxima (TM) e alongamento máximo (EM) das nanofibras aleatórias e alinhadas. Os resultados são apresentados na figura 16 e na tabela 2.

As nanofibras com morfologia aleatória e alinhadas de PCL apresentaram propriedades mecânicas com comportamento elástico, com o menor módulo de young comparado as outras nanofibras obtidas. Obteve-se um valor de tensão máxima similar ao obtido por Chakrapani e colaboradores, que obtiveram tensão máxima de $1,88 \pm 1,3 \text{ MPa}$.¹²⁰

A adição da gelatina a fibra de PCL melhorou a resistência e rigidez da nanofibras. O aumento do E e TM, pode estar ocorrendo pois a cadeia da gelatina pode estar interagindo com o PCL ou a gelatina está agindo como uma barreira que dificulta a movimentação e

deslizamento das cadeias poliméricas. Uma melhora no módulo elástico também foi relatada por Deepika Gupta e colaboradores ao adicionar gelatina a PCL, aumentando de 2,5 MPa para 6,0 Mpa para esta propriedade, porém não houve mudanças na tensão máxima e alongamento máximo.¹²¹ O aumento das propriedades de módulo de Young e resistência máxima do material foi relatado por J. Lee e coautores, diminuindo a elongação do polímero comparado ao poli(L-lactide-co-3-caprolactona) (PLCL) puro, quando eletrofiaram a blenda de PLCL e gelatina (70:30). O autor também eletrofiou a gelatina pura, obtendo uma fibra rígida, com pouca elongação e com módulo de Young muito maior que o PLCL.¹²²

Tabela 2. Resultados das análises de propriedades mecânicas obtida para as nanofibras

Nanofibras	Elongamento Máximo (%)	Tensão Máxima (MPa)	Módulo de Young (MPa)
PCL ^R	118 ± 9	2,4 ± 0,6	0,024 ± 0,003
PCL ^A	67 ± 5	7,7 ± 1,1	0,12 ± 0,022
PCL/GE ^R	70 ± 13	4,7 ± 0,5	0,27 ± 0,056
PCL/GE ^A	34 ± 2	18,1 ± 1,2	0,97 ± 0,036
PCL/GE/HA ^R	66 ± 9	5,7 ± 0,8	0,32 ± 0,104
PCL/GE/HA ^A	27 ± 2	10,5 ± 0,8	0,59 ± 0,093
PCL/GE/EDC ^R	61 ± 19	7,8 ± 0,4	1,40 ± 0,096
PCL/GE/EDC ^A	58 ± 4	19,9 ± 0,6	2,28 ± 0,182
PCL/GE/HA/EDC ^R	51 ± 6	10,3 ± 0,6	2,63 ± 0,586
PCL/GE/HA/EDC ^A	41 ± 5,23	21,5 ± 0,1	2,90 ± 0,326

^A Nanofibras Alinhadas; ^R Nanofibras Aleatórias

As fibras que continham hidroxiapatita também mostraram valores de propriedades mecânicas maiores que àqueles do PCL, sendo mais rígidas e com maior E e TM do que as nanofibras de PCL. A melhora da propriedade mecânica com adição de HA, deve-se as características deste material cerâmico, que possui boa rigidez, e o mesmo pode estar agindo como uma carga, dificultando a mobilidade das cadeias poliméricas de policaprolactona e gelatina. Uma melhora nas propriedades mecânicas com adição de hidroxiapatita também foi relatada por Keivani e colaboradores. Ele produziu fibras com maior E e TM em suas fibras com hidroxiapatita em comparação a fibras de PCL pura.¹²³

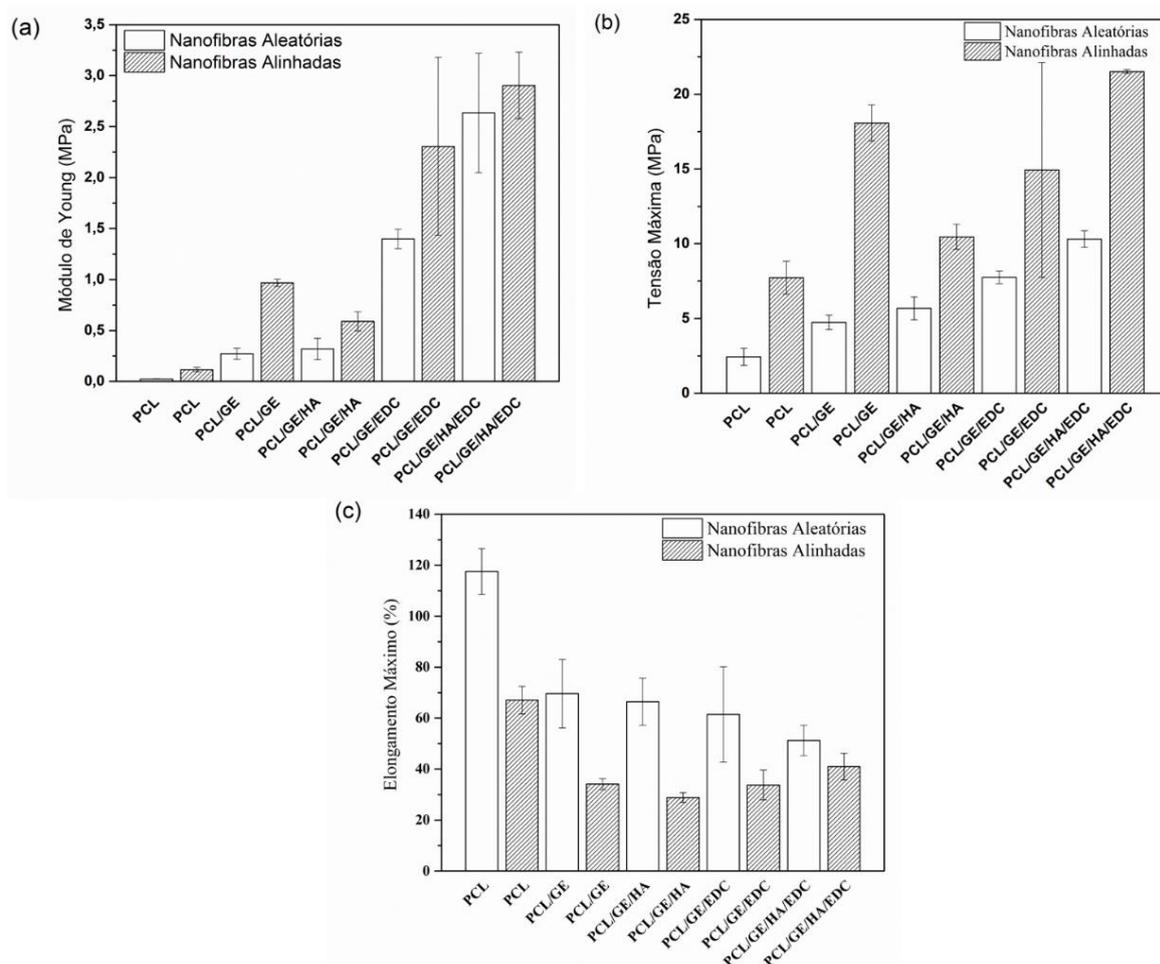


Figura 16. Propriedades mecânicas das nanofibras: (a) Módulo de Young, (b) Tensão Máxima e (c) Elongamento Máximo.

A reticulação das nanofibras também ocasionou uma melhora nas propriedades mecânicas do material, obtendo-se fibras mais rígidas devido as ligações químicas criadas no material, dificultando a movimentação das cadeias do material quando sujeitos a uma força de tração. Um trabalho realizado por Kevin et al, mostrou que fios extrudados de colágeno após serem reticulados quimicamente ou fisicamente, aumentaram significativamente a resistência e rigidez do material.¹²⁴

Geralmente, o alinhamento de fibras ocasiona melhora nas propriedades mecânicas do material, obtendo materiais mais rígidos, porém as vezes acabam apresentando um menor alongamento. Este comportamento foi observado para materiais compósitos de matriz poliéster reforçados por fibras alinhadas de sisal, obtendo três vezes mais resistência do que o compósito com fibras dispostas em ordem aleatória, devido a anisotropia causada pelo alinhamento.¹²⁵

A mudança nas propriedades mecânicas também ocorre para nanofibras eletrofiadas, como as fibras de PCL/Quitosana obtidas por Cooper e colaboradores. As propriedades de módulo de Young, tensão máxima, resistência ao escoamento e alongamento máximo obtiveram incremento com a modificação da morfologia do polímero, tornando assim o material alinhado mais dúctil em comparação a fibras com orientação randômicas.¹²⁶

Observa-se que o alinhamento das nanofibras provocou de maneira geral um melhoramento das propriedades mecânicas do material em todas nanofibras fabricadas, com aumento de E e TM, quando tensionadas na direção do alinhamento das nanofibras. Porém, apesar do aumento da rigidez do material, houve ainda um decréscimo na propriedade de deformação máxima do material, se tornando menos elástico. A modificação nas propriedades mecânicas dos materiais obtidos em coletor rotatório na eletrofição, demonstra que o alinhamento proporciona propriedades anisotrópicas nas nanofibras quando submetidos a força de tração, obtendo uma melhor resistência quando comparado a nanofibras com estrutura aleatória.

5.8 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

O comportamento térmico de degradação das amostras foi realizado através da análise termogravimétrica. Obteve-se o mesmo número de estágios para ambos os tipos de nanofibras eletrofiadas, com morfologia aleatória e alinhada, porém percebe-se uma pequena diminuição na temperatura de degradação máxima quando as nanofibras foram alinhadas. Para explicar esta diminuição, supomos que as interações intermoleculares nas fibras alinhadas são menores do que as de morfologia aleatória.

Os resultados da análise são apresentados na tabela 3 e observados nos gráficos de TGA e DTG nas figuras 17 e 18. As nanofibras de PCL apresentaram somente um estágio de degradação com perda total de sua massa neste estágio. As nanofibras de PCL aleatória apresentou degradação entre 324 ° C e 455 ° C, enquanto a PCL alinhada de 312 ° C à 433 ° C. A literatura apresenta resultados para degradação de PCL, na qual o polímero se degrada em apenas único estágio, com aproximadamente 88% de perda de massa.¹²⁷

As amostras puras de gelatina obtiveram dois estágios de degradação. O primeiro está relacionado a perda de água, de aproximadamente 12 %, e o segundo a degradação das cadeias da gelatina. Estes dois estágios de degradação também foram relatados por Sneh Gautam e

colaboradores, ao eletrofiar fibras de PCL/GE.¹¹⁴ As nanofibras que contém gelatina e policaprolactona PCL/GE, apresentaram três estágios de degradação, sendo o primeiro relacionado a água adsorvida em sua estrutura. O segundo estágio obtido na análise é associado a quebra da cadeia da gelatina e ruptura das ligações peptídicas, gerando produtos com massa molecular menor. Já a terceira análise é relacionada a degradação polimérica do PCL.

As nanofibras com hidroxiapatita, PCL/GE/HA alinhadas e aleatórias, reticuladas ou não, obtiveram os mesmos estágios de degradação que as nanofibras de PCL/GE, obtendo um percentual residual mais elevado, pois a hidroxiapatita é um composto cerâmico inorgânico que não se decompõe na faixa de temperatura analisada.

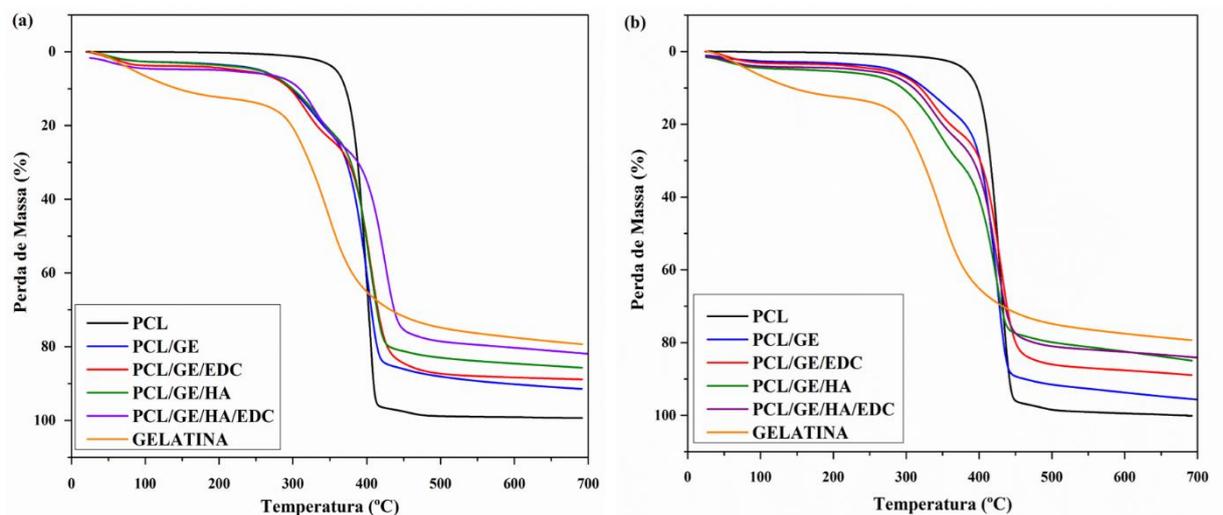


Figura 17. Análise Termogravimétrica das nanofibras alinhadas (a), aleatórias (b).

Obs: A curva da gelatina no TGA é o material em pó.

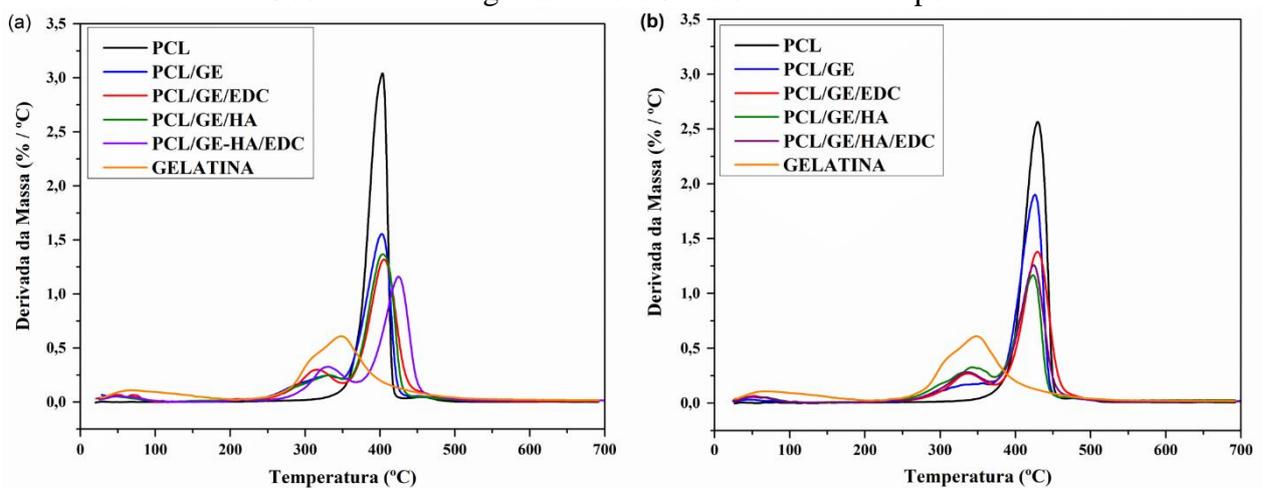


Figura 18. Derivada da perda de massa das nanofibras alinhadas (a), aleatórias (b).

Obs.: A curva gelatina no DTG é o material em pó.

Tabela 3. Resultados da análise termogravimétrica das nanofibras.

AMOSTRAS	PRIMEIRO ESTÁGIO		SEGUNDO ESTÁGIO		TERCEIRO ESTÁGIO		RESIDUO ^c (%)
	T1 ^a	PM (%) ^b	T2 ^a	PM (%) ^b	T3 ^a	PM (%) ^b	
GE puro	68	12	349	67			21
PCL^R	-	-	430	100			0
PCL^A	-	-	403	99			1
PCL/GE^R	46	2	356	14	426	79	5
PCL/GE^A	47	2	331	19	402	70	9
PCL/GE/HA^R	49	3	341	25	423	55	17
PCL/GE/HA^A	49	3	332	19	404	64	14
PCL/GE/EDC^R	53	3	337	19	429	67	11
PCL/GE/EDC^A	44	4	316	20	405	65	11
PCL/GE/HA/EDC^R	51	4	337	19	424	61	16
PCL/GE/HA/EDC^A	50	5	331	21	424	57	17

a Temperatura máxima da taxa de degradação

^A Nanofibras Alinhadas

b Porcentagem de perda de massa em cada estágio.

^R Nanofibras Aleatórias

c Massa Residual.

5.9 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

Para investigar a estrutura das nanofibras eletrofiadas, mediu-se a cristalinidade analisando a segunda varredura de aquecimento através da análise exploratória diferencial. A Tabela 4 apresenta os resultados, mostrando que os pontos de fusão e a temperatura de cristalização permaneceram constantes, mesmo para as diferentes composições das nanofibras, reticuladas ou não, e com diferentes orientações. Uma vez que não houve alterações na T_m com diferentes composições, há uma indicação de imiscibilidade nos componentes da fibra.¹²⁸ Esses valores não sofreram variação, e são referentes a fusão do PCL, polímero semi-cristalino, enquanto gelatina é um polímero amorfo.¹²⁷

Tabela 4 Análise dos termogramas de DSC obtidos das nanofibras. (2° ciclo de aquecimento).

Nanofibras	T _m (°C)	T _c (°C)	ΔH _f (J/g)	X _c (%)
PCL ^R	57,3	30,0	55,3	40,9
PCL ^A	56,4	29,9	63,6	47,1
PCL/GE ^R	57,3	31,5	31,7	39,2
PCL/GE ^A	56,8	31,2	28,7	35,4
PCL/GE/HA ^R	56,4	29,5	22,8	31,3
PCL/GE/HA ^A	56,8	31,4	28,3	38,8
PCL/GE/EDC ^R	56,8	30,9	35,3	43,5
PCL/GE/EDC ^A	56,6	30,3	34,0	42,0
PCL/GE/HA/EDC ^R	57,2	29,8	29,9	41,1
PCL/GE/HA/EDC ^A	57,5	31,3	32,5	44,6

T_m = Temperatura de Fusão

T_c = Temperatura de Cristalização

ΔH_f = entalpia de fusão

X_c = Cristalinidade da nanofibras

A cristalinidade mostrou variações com a adição de GE. As mudanças que ocorrem, em comparação à cristalização da PCL, podem ser explicadas usando o conceito das interações hidrofóbicas de PCL. Polímeros com interações hidrofóbicas e estrutura apolar como PCL, tendem a se agregar para minimizar o contato com água. Neste caso, com a adição de gelatina, um polímero amorfo e hidrofílico, são esperadas alterações na agregação polimérica da PCL, ocasionando perturbações na cristalização da PCL. Kolbuk e colaboradores, também relatou diminuições na cristalinidade de nanofibras de PCL, quando elas foram eletrofiadas com 50% de gelatina na composição.¹²⁹ Também observou-se que o alinhamento proporcionou uma maior cristalinidade polimérica, de 41% para 47% com alinhamento para o PCL. Isto deve ter ocorrido devido a força exercida pelo rotor ao alinhar as fibras, obtendo uma melhor organização estrutural do PCL ao longo das fibras. A cristalinidade da fibra randômica com

hidroxiapatita, apresentou a menor cristalinidade, que pode ter ocorrido pela aglomeração que ocasiona um impedimento físico das moléculas de PCL. Um aumento na cristalinidade também foi observado ao se reticular as nanofibras, obtendo valores similares ao PCL puro.

5.10 PROLIFERAÇÃO E ENSAIOS METABÓLICOS

5.10.1 Ensaio Alamar Blue para quantificação celular

O Alamar Blue é um corante que tem sido usado para medir efetivamente atividade metabólica inata em células animais. Quando adicionada a culturas de células, a forma oxidada de Alamar Blue é convertida na forma reduzida devido à redução química do meio, resultante da atividade metabólica das células. A magnitude da redução do corante correlaciona-se linearmente com o número de células.¹³⁰

Os controles utilizados nestas experiências foram células semeadas diretamente em plástico tratado com cultura de tecidos (TCPS). As barras representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * P <0,05 em comparação com o TCPS de controle; #P <0,05 em comparação com PCL/GE/HA/EDC aleatória após 4 dias de tratamento; e ∞ P <0,05 em comparação com PCL não alinhada/utilizando ANOVA de sentido único teste de comparação múltipla de Tukey. ^A nanofibras alinhadas, ^R nanofibras aleatórias.

A alteração da fluorescência de Alamar Blue (i.e. taxa de crescimento) foi significativamente maior no TCPS no primeiro dia vs. TCPS no pós-teste de 4 e 7 dias [análise de variância de duas vias (ANOVA) / Bonferroni pós teste, ap <0,001]. A fluorescência de Alamar Blue foi significativamente maior em todas as diferentes nanofibras no primeiro dia + vs sétimo dia (ANOVA bidirecional, F = 89,61, p <0,001).

Os resultados mostraram que todos os tipos de biomateriais avaliados neste trabalho induzem redução significativa da atividade metabólica em contato com as células, já após 24 horas de exposição, quando comparadas às células semeadas diretamente no plástico tratado com cultura de tecidos (TCPS) usado como controle. (Figure 19). Curiosamente, após 4 dias é possível observar uma acentuada redução da atividade metabólica / efeito citotóxico das células expostas a nanofibras de PCL/GE/HA/EDC com morfologia aleatória quando comparado as demais nanofibras fabricadas. Do mesmo modo, após 7 dias de exposição, observa-se uma redução mais acentuada da atividade metabólica nas células expostas ao PCL de morfologia aleatória. A menor atividade metabólica do PCL-R encontrado está de acordo com outros

autores que mostram que devido à baixa hidrofiliçidade deste polímero ocorre uma redução da adesão celular.^{131,132}

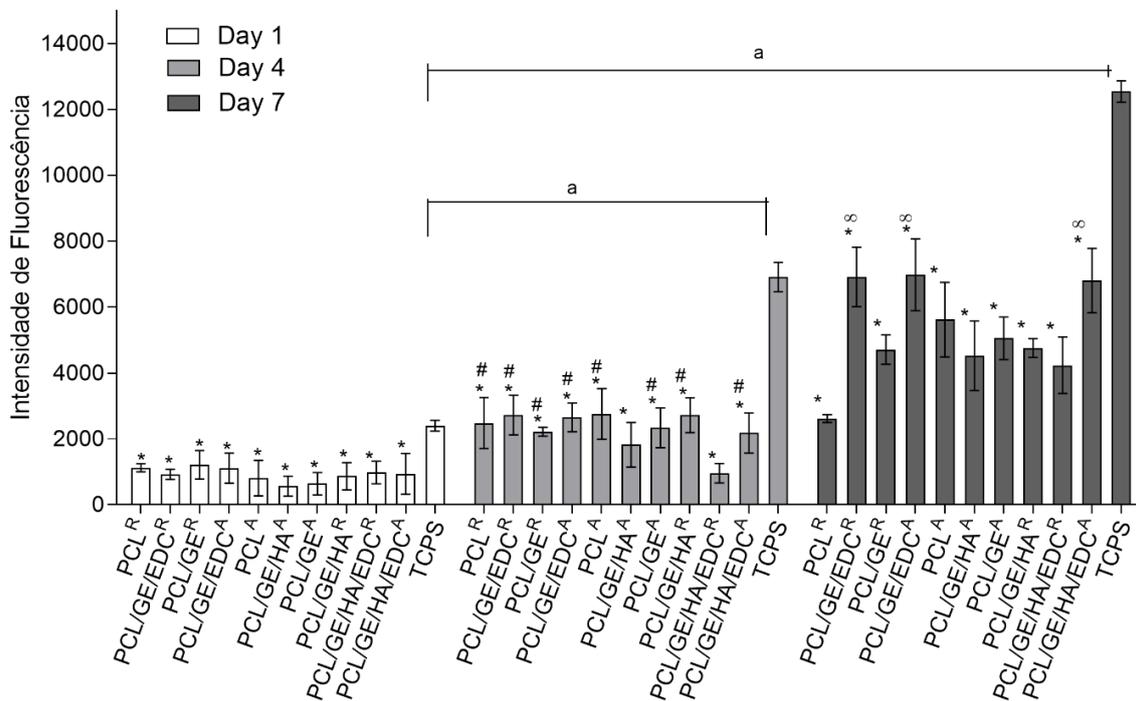


Figura 19. Ensaio Alamar Blue de quantificação celular das nanofibras eletrofiadas. Alterações relacionadas com o tempo na fluorescência Alamar Blue, em culturas prévias de hMSCs, após exposição a biomateriais por 1, 4 e 7 dias.

No entanto, a exposição após 7 dias das amostras de PCL/GE/EDC aleatória, PCL/GE/EDC alinhada e PCL/GE/HA/EDC alinhada não reduziram a viabilidade de uma forma marcada como as outras nanofibras. A análise entre os diferentes dias indica um aumento significativo na atividade metabólica na célula semeada em TCPS. É possível observar uma diferença significativa nas células expostas as diferentes nanofibras somente entre o primeiro versus o sétimo dia.

5.10.2 Perfil Proliferativo

O conteúdo de DNA em células expostas a diferentes nanofibras foi utilizado para demonstrar a capacidade proliferativa dessas células após o tratamento. Os resultados mostraram um aumento no dsDNA após 4 dias de exposição, mas após 7 dias houve diminuição na quantidade de corante incorporado, indicando diminuição da capacidade proliferativa (Figura 20), reforçando os dados de citotoxicidade observados pelo teste de Alamar blue. É importante notar

que este perfil de citotoxicidade não foi observado em células não expostas a biomateriais (TCPS).

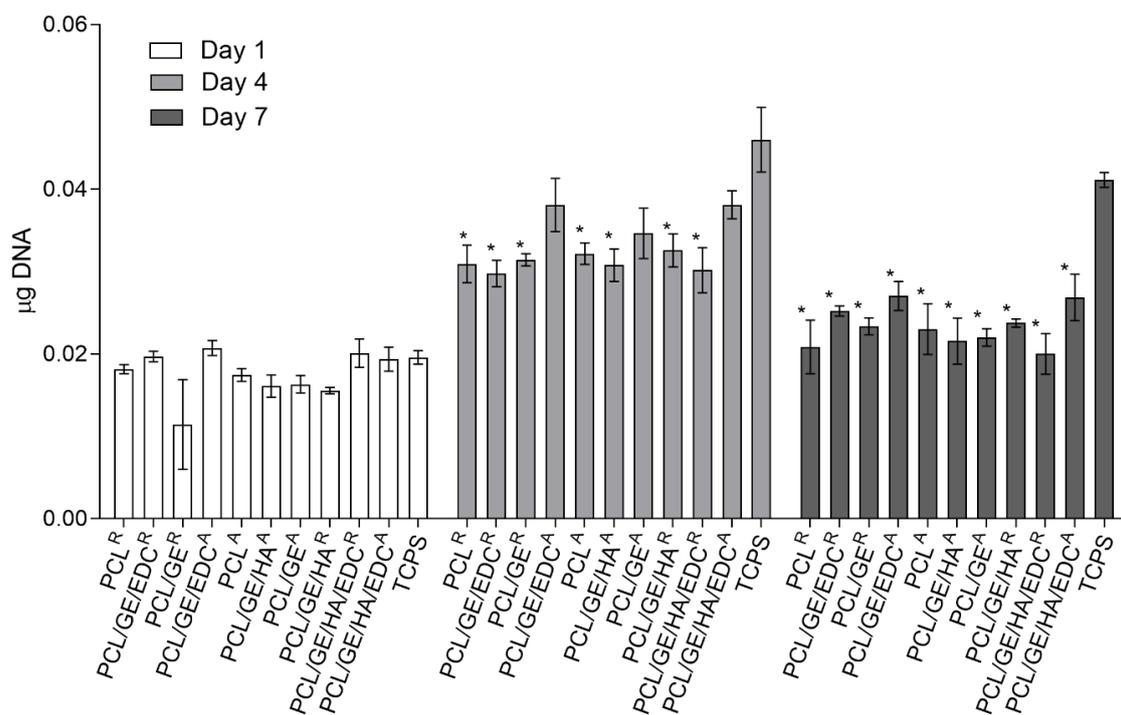


Figura 20. Análise de quantificação de dsDNA das nanofibras eletrofiadas. Alterações relacionadas ao tempo no perfil proliferativo pelo ensaio de quantificação de dsDNA PicoGreen® em hMSCs após exposição a biomateriais durante 1, 4 e 7 dias.

Os controles utilizados nestas experiências foram células semeadas diretamente em plástico tratado com cultura de tecido (TCPS). As barras representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * $P < 0,05$ em comparação com o TCPS de controle utilizando ANOVA de sentido único com teste de comparação múltipla de Tukey. ^A nanofibras alinhadas, ^R nanofibras aleatórias.

5.11 ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR

As nanofibras submetidas ao ensaio de diferenciação celular, seja no meio induzido (osteogênico), como no meio não induzido, conseguiram obter a diferenciação celular, independente dos polímeros utilizados e da orientação das fibras. Quando o meio não foi induzido, obteve-se uma maior osteoindução em todas as diferentes nanofibras em comparação ao controle. Entretanto, após 14 dias de cultura sob indução osteogênica, a atividade da enzima fosfatase alcalina, um marcador precoce de osteogênese, aumentou aproximadamente 27 vezes em células não expostas as nanofibras (TCPS), comparando ao crescimento em meios

osteogênicos sobre células não induzidas (Figura 21), que é estatisticamente significativa entre dois grupos. No entanto, houve uma redução significativa de diferenciação celular com meio osteogênico ao expor aos biomateriais. Este problema pode estar relacionado ao fato de que as células estão presas na matrix das nanofibras, dificultando a leitura da análise. Este problema foi relatado por alguns autores.^{110,133}

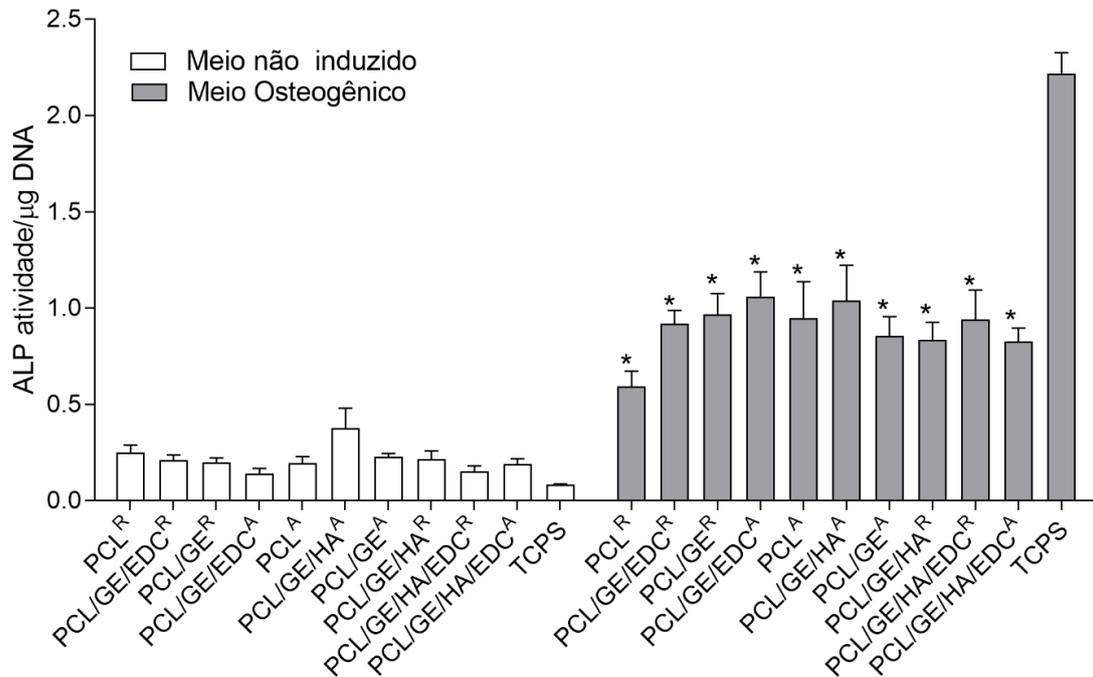


Figura 21. Ensaio de diferenciação celular das nanofibras por atividade alcalina fosfatase. A diferenciação osteogênica de hMSCs in vitro medida por atividade alcanina fosfatase. A atividade de ALP na ausência das nanofibras está significativamente aumentada quando em meio osteogênico após 14 dias (27x; * $p < 0,01$). A osteoindução foi significativamente maior em todas as diferentes nanofibras em meio não induzido versus meio osteogênico (ANOVA bidirecional, $F = 378,8$, pós-teste de Bonferroni, $p < 0,001$).

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível obter nanofibras com diferentes orientações de PCL e GE com incorporação de HA, utilizando coletores com diferentes geometrias. Foi possível caracterizar as bandas características de PCL e GE utilizando o FTIR. As nanofibras com gelatina em sua composição foram reticuladas com sucesso, obtendo menores graus de GI e não solubilizaram em ambiente aquoso. Utilizando o MEV, foi possível analisar a morfologia das amostras eletrofiadas e a distribuição dos tamanhos de suas fibras. Todas nanofibras foram obtidas fibras em escala nanométrica, porém obteve-se fibras que apresentaram algumas gotas ao longo de sua estrutura. Foi possível comprovar a incorporação da hidroxiapatita utilizando MEV-FEG com EDS, identificando os picos dos elementos Ca e P. A formação de blendas de PCL/GE e PCL/GE/HA permitiu a obtenção de uma superfície mais hidrofílica em comparação ao polímero puro de PCL, que apresentou características hidrofóbicas. O alinhamento das nanofibras e a adição da hidroxiapatita, de maneira geral, ocasionou uma melhora das propriedades mecânicas do material, obtendo fibras com mais rígidas e resistentes.

Os testes biológicos demonstram que as nanofibras com estruturas alinhadas e aleatórias obtidas, permitiram a proliferação celular e a diferenciação osteogênica, apresentando potencial de serem utilizadas na engenharia de tecidos. Entretanto, as nanofibras produzidas necessitam de futuras análises biológicas relacionadas a toxicidade, uma vez que o controle obteve melhores índices de proliferação, viabilidade celular e diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bishop, A., Bala, C.; Biopolymer-hydroxyapatite composite coatings prepared by electrospinning by electrospinning. **2006**, 17, 902-906.
2. Oryan, A., Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N; Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J. Orthop. Surg. Res.* **2014**, 9(18), 1-27.
3. Armentano, I, Dottori, M, Fortunati. E, Mattioli S, Kenny JM; Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. *Polym. Degrad. Stab.* **2010**, 95(11), 2126-2146.
4. Linh., Min, Y., Lee, B.; Hybrid hydroxyapatite nanoparticles-loaded PCL / GE blend fibers for bone tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed.* **2013**, 24(5), 1-19.
5. Sharma, C., Dinda, A.K., Potdar, P.D., Chou, C.F., Mishra, N.C.; Fabrication and characterization of novel nano-biocomposite scaffold of chitosan-gelatin-alginate-hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C.* **2016**, 64, 416-427.
6. Kim, M.S., Jun I, Shin, Y.M, Jang, W, Kim SI; The Development of Genipin-Crosslinked Poly (caprolactone) (PCL)/ Gelatin Nanofibers for Tissue Engineering Applications. , 91-100.
7. Bhardwaj, N., Kundu, S.C; Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol. Adv.* **2010**, 28(3), 325-347.
8. Storti, E., Roso, M., Modesti, M., Aneziris CG, Colombo P; Preparation and morphology of magnesium borate fibers via electrospinning. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2016**, 36(10), 2593-2599.
9. 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. *Arab. J. Chem.* 2015.
10. Tan, S.H., Inai, R., Kotaki, M., Ramakrishna S; Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process. *Polymer (Guildf).* **2005**, 46(16), 6128-6134.
11. Ahmed, F.E., Lalia, B.S., Hashaikeh, R.; A review on electrospinning for membrane fabrication: Challenges and applications. *Desalination.* **2015**, 356, 15-30.

12. Van Der Schueren, L., De Schoenmaker, B., Kalaoglu, Ö.I., De Clerck, K.; An alternative solvent system for the steady state electrospinning of polycaprolactone. *Eur. Polym. J.* **2011**, 47(6), 1256-1263.
13. Luo, C.J., Stride, E., Edirisinghe, M.; Mapping the influence of solubility and dielectric constant on electrospinning polycaprolactone solutions. *Macromolecules.* **2012**, 45(11), 4669-4680.
14. Woodruff, M.A., Hutmacher, D.W.; The return of a forgotten polymer— Polycaprolactone in the 21st century. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, 35(10), 1217-1256.
15. Gholipour, K. A., Bahrami, S.H.; Effect of Changing Solvents on Poly(ϵ -Caprolactone) Nanofibrous Webs Morphology. *J. Nanomater.* **2011**, 2011, 1-10.
16. Steyaert, I., Schueren, L. Van Der., Rahier, H., Clerck, K. De.; An Alternative Solvent System for Blend Electrospinning of Polycaprolactone / Chitosan Nanofibres. **2012**, 321-322(1), 71-75.
17. Hong, S., Kim, G.; Fabrication of electrospun polycaprolactone biocomposites reinforced with chitosan for the proliferation of mesenchymal stem cells. *Carbohydr. Polym.* **2011**, 83(2), 940-946.
18. Padrão, J., Machado, R., Casal, M., et al.; Antibacterial performance of bovine lactoferrin-fish gelatine electrospun membranes. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, 81, 608-614.
19. Gnani, S., Fornasari, B.E., Tonda-turo, C., Laurano, R.; The Effect of Electrospun Gelatin Fibers Alignment on Schwann Cell and Axon Behavior and Organization in the Perspective of Artificial Nerve Design. 2015, 12925-12942.
20. Zhan, J., Lan, P.; The Review on Electrospun Gelatin Fiber Scaffold. *J. Res. Updat. Polym. Sci.* **2012**, 1(2), 59-71.
21. Tomihata, K., Ikada, Y.; Cross-linking of gelatin with carbodiimides. *Tissue Eng.* **1996**, 2(4), 307-313.
22. Venkatesan, J., Bhatnagar, I., Manivasagan, P., Kang, K., Kim, S.; Alginate composites for bone tissue engineering: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, 72C, 269-281.
23. Rogina, A.; Electrospinning process: Versatile preparation method for biodegradable and

- natural polymers and biocomposite systems applied in tissue engineering and drug delivery. *Appl. Surf. Sci.* **2014**, 296, 221-230.
24. Meng, Z.X., Wang, Y.S., Ma, C., Zheng, W., Li, L., Zheng, Y.F.; Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C.* **2010**, 30(8), 1204-1210.
 25. Doustgani, A., Vasheghani-Farahani, E., Soleimani, M.; Aligned and random nanofibrous nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering Nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Nanomed J.* **2013**, 1(1), 20-27.
 26. Zheng, R., Duan, H., Xue, J., et al.; The influence of Gelatin/PCL ratio and 3-D construct shape of electrospun membranes on cartilage regeneration. *Biomaterials.* **2014**, 35(1), 152-164.
 27. He, X.; Electrospun gelatin / PCL and collagen / PLCL scaffolds for vascular tissue engineering. 2014, 2335-2344.
 28. Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M.P., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M-H., Ramakrishna, S.; Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Biomaterials.* **2008**, 29(34), 4532-4539.
 29. Boskey, A.L.; Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *Bonekey Rep.* **2013**, 2(447), 1-11.
 30. Florencio-Silva, R., Sasso, G.R.D.S., Sasso-Cerri, E., Simões, M.J., Cerri, P.S.; Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res. Int.* **2015**, 2015, 1-17.
 31. Mitra, J., Tripathi, G., Sharma, A., Basu, B.; Scaffolds for bone tissue engineering: role of surface patterning on osteoblast response. *RSC Adv.* **2013**, 3(28), 11073.
 32. Capulli, M., Paone, R., Rucci, N.; Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, 561(May), 3-12.
 33. Sasaki, T.; Differentiation and functions of osteoclasts and odontoclasts in mineralized tissue resorption. *Microsc. Res. Tech.* **2003**, 61(6), 483-495.
 34. Hwang, M.P., Subbiah, R., Kim, I.G., et al.; Approximating bone ECM: Crosslinking directs individual and coupled osteoblast/osteoclast behavior. *Biomaterials.* **2016**, 103,

- 22-32.
35. Amini, A.R., Laurencin, C.T., Nukavarapu, S.P.; Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **2012**, 40(5), 363-408.
 36. Ramachandran, K., Gouma, P-I.; Electrospinning for bone tissue engineering. *Recent Pat. Nanotechnol.* **2008**, 2(1), 1-7.
 37. Tetteh, G., Khan, A.S., Delaine-Smith RM, Reilly GC, Rehman IU; Electrospun polyurethane/hydroxyapatite bioactive Scaffolds for bone tissue engineering: The role of solvent and hydroxyapatite particles. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2014**, 39, 95-110.
 38. Loh, X.J.; The Effect of pH on the hydrolytic degradation of Poly(ϵ -caprolactone)-block-Poly(thylene glycol) copolymers. *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, 127(3), 2046-2056.
 39. Ghadi, R., Muntimadugu, E., Domb, A.J., Khan, W., Zhang, X.; *Synthetic Biodegradable Medical Polymer*. Elsevier Ltd; 2017.
 40. Labet, M., Thielemans, W.; Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38(12), 3484-3504.
 41. Cohn, D., Stern, T., González, M.F., Epstein, J.; Biodegradable poly(ethylene oxide)/poly(ϵ -caprolactone) multiblock copolymers. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, 59(2), 273-281.
 42. Abedalwafa, M., Wang, F., Wang, L., Li, C.; Biodegradable poly- ϵ -caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: A review. *Rev. Adv. Mater. Sci.* **2013**, 34(2), 123-140.
 43. Nguyen, T-H., Bao, T.Q., Park, I., Lee, B-T.; A novel fibrous scaffold composed of electrospun porous poly (ϵ -caprolactone) fibers for bone tissue engineering. *J. Biomater. Appl.* **2012**, 28(4), 514-528.
 44. Ko, J.H., Yin, H., An, J., et al.; Characterization of cross-linked gelatin nanofibers through electrospinning. *Macromol. Res.* **2010**, 18(2), 137-143.
 45. Erencia, M., Cano, F., Tornero, J.A., Fernandes, M.M., Tzanov, T.; Electrospinning of gelatin fibers using solutions with low acetic acid concentration : Effect of solvent composition on both diameter of electrospun fibers and cytotoxicity. **2015**, 42115, 1-11.

46. Gautam, S., Kumar, A., Chandra, N.; Fabrication and characterization of PCL / gelatin composite nano fibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. *Mater. Sci. Eng. C.* **2013**, 33(3), 1228-1235.
47. Bowlin, G.L.; The Use of Natural Polymers in Tissue Engineering: A Focus on Electrospun Extracellular Matrix Analogues. **2010**, 2, 522-553.
48. Yao, C-H., Yeh, J-Y., Chen, Y-S., Li, M-H., Huang, C-H.; Wound-healing effect of electrospun gelatin nanofibres containing Centella asiatica extract in a rat model. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2015**, 11(3), 905-915.
49. Elamparithi, A., Punnoose, A.M., Paul, S.F.D., Kuruvilla, S.; Gelatin electrospun nanofibrous matrices for cardiac tissue engineering applications. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* **2017**, 66(1), 20-27.
50. Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M.P., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M.H., Ramakrishna, S.; Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Biomaterials.* **2008**, 29(34), 4532-4539.
51. Kim, H.W., Yu, H.S., Lee, H.H.; Nanofibrous matrices of poly(lactic acid) and gelatin polymeric blends for the improvement of cellular responses. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* **2008**, 87(1), 25-32.
52. Kim, B.H., Song, J., Kim, H.; Nanofiber Generation of Gelatin -Hydroxyapatite Biomimetics for Guided Tissue Regeneration. *Adv. Funct. Mater.* **2005**, 15, 1988-1994.
53. Hoktaweesap, N.C., Rayanarakul, K.A., Ong DAHT, Eechaisue CM, Upaphol PS; Electrospun Gelatin Fibers : Effect of Solvent System on Morphology and Fiber Diameters. **2007**, 39(6), 622-631.
54. Helena, T., Salles, C., Bertachini, C., Akira, M.; Electrospinning of Gelatin / Poly (Vinyl Pyrrolidone) Blends from Water / Acetic Acid Solutions. *Mater. Res.* **2015**, 18(3), 509-518.
55. Protese news: Osteogênese, osteoindução e osteocondução, disponível em <http://inpn.com.br/ProteseNews/Materia/Index/132480> (acesso em 05/06/17).
56. Salgado, J., Coutinho, O.P., Reis, R.L.; Bone Tissue Engineering : State of the Art and Future Trends. *Macromol. Biosci.* **2004**, 4(8), 743-765.

57. Costa, D.O., Allo, B. Aa., Klassen, R., Hutter, J.L., Dixon, S.J., Rizkalla, A.S.; Control of surface topography in biomimetic calcium phosphate coatings. *Langmuir*. **2012**, 28(8), 3871-3880.
58. *University of Liverpool - Hydroxyapatite structure*, disponível em <http://www.chemtube3d.com/solidstate/SShydroxyapatite.htm> (acesso em 16/06/2017) .
59. Kim, H-W., Lee, H-H., Knowles, J.C.; Electrospinning biomedical nanocomposite fibers of hydroxyapatite/poly(lactic acid) for bone regeneration. *Clin. Exp. Rheumatol*. **2006**, 79(3), 643-649.
60. Ngiam, M., Lia, o S., Patil, A.J., Cheng, Z., Chan, C.K., Ramakrishna, S.; The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering. *Bone*. **2009**, 45(1), 4-16.
61. Hassan, M.I., Sultana, N., Hamdan, S.; Bioactivity Assessment of Poly (ϵ -caprolactone)/ Hydroxyapatite Electrospun Fibers for Bone Tissue Engineering Application. **2014**, 2014.
62. Kim, H.W., Kim, H.E., Salih, V.; Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin-hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*. **2005**, 26(25), 5221-5230.
63. Ma, P.X., Zhang, R.Y., Xiao, G.Z., Franceschi, R.; Engineering new bone tissue in vitro on highly porous poly(α -hydroxyl acids)/hydroxyapatite composite scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res*. **2001**, 54(2), 284-293.
64. Fiorani, A., Gualandi, C., Panseri, S., et al.; Comparative performance of collagen nanofibers electrospun from different solvents and stabilized by different crosslinkers. *J. Mater. Sci. Mater. Med*. **2014**, 25(10), 2313-2321.
65. Reddy, N., Reddy, R., Jiang, Q.; Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends Biotechnol*. **2015**, 33(6), 362-369.
66. Ratanavaraporn, J., Damrongsakkul, S., Sanchavanakit, N., Banaprasert, T., Kanokpanont, S.; Comparison of Gelatin and Collagen Scaffolds for Fibroblast Cell Culture. *J. Met. Mater. Miner*. **2006**, 16(1), 31-36.
67. Masutani, E.M., Kinoshita, C.K., Tanaka, T.T., Ellison, A.K.D., Yoza BA; Increasing

- thermal stability of gelatin by UV-induced cross-linking with glucose. *Int. J. Biomater.* **2014**, 2014(2014), 1-9.
68. Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Rubini, K., Roveri, N.; Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials.* **2001**, 22(8), 763-768.
 69. Ratanavaraporn, J., Rangkupan, R., Jeeratawachai, H., Kanokpanont, S., Damrongsakkul, S.; Influences of physical and chemical crosslinking techniques on electrospun type A and B gelatin fiber mats. *Int. J. Biol. Macromol.* **2010**, 47(4), 431-438.
 70. Jarquin, Y. K., Arenas A.J.; Structural Effect of Different EDC Crosslinker Concentration in Gelatin- Hyaluronic Acid Scaffolds. *J. Bioeng. Biomed. Sci.* **2016**, 6(2), 1-6.
 71. Chen, P-R., Kang, P-L., Su, W-Y., Lin, F-H., Chena, M-H.; The Evaluation of Thermal Properties and in vitro test of carbodiimide or glutaraldehyde cross-linked gelatin for PC 12 cells culture. *Biomed. Eng. Appl. basis Commun.* **2005**, 17(2), 44-49.
 72. Lai, J-Y., Li, Y-T.; Influence of Cross-Linker Concentration on the Functionality of Carbodiimide Cross-Linked Gelatin Membranes for Retinal Sheet Carriers. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2011**, 22(1-3), 277-295.
 73. ThermoFisher Scientific; *Carbodiimide Crosslinker Chemistry*, disponível em <https://www.thermofisher.com/dk/en/home/life-science/protein-biology/proteinbiology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/carbodiimide-crosslinker-chemistry.html> (acesso em 04/06/17).
 74. Dubský, M., Kubinová, S., Sirc, J., et al.; Nanofibers prepared by needleless electrospinning technology as scaffolds for wound healing. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2012**, 23(4), 931-941.
 75. Goh, Y., Shakir, I., Hussain, R.; Electrospun fibers for tissue engineering , drug delivery , and wound dressing. **2013**, 48(8), 3027-3054.
 76. Pham, Q.P., Sharma, U., Mikos, A.G.; Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications : A Review. *Tissue Eng.* **2006**, 12(5), 1197-1221.
 77. Ghorani, B., Tucker, N.; Food Hydrocolloids Fundamentals of electrospinning as a novel

- delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. *Food Hydrocoll.* **2015**, 51, 227-240.
78. Stanger, J., Tucker, N., Staiger, M.; *Electrospinning*; Smithers Rapra Technology: United Kingdom. 16 (10), **2005**, p.1-216.
 79. Ghorani, B., Tucker, N.; Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. *Food Hydrocoll.* **2015**, 51, 227-240.
 80. Zong, X., Kim, K., Fang, D., Ran, S., Hsiao, B.S., Chu, B.; Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer (Guildf)*. **2002**, 43(16), 4403-4412.
 81. Ingavle, G.C., Leach, J.K.; Advancements in Electrospinning of Polymeric Nanofibrous Scaffolds for Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part B.* **2014**, 20(4), 277-293.
 82. Sencadas, V., Correia, D.M., Areias, A., et al.; Determination of the parameters affecting electrospun chitosan fiber size distribution and morphology. *Carbohydr. Polym.* **2012**, 87(2), 1295-1301.
 83. Baji, A., Mai, Y.W., Wong, S.C., Abtahi, M., Chen, P.; Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties. *Compos. Sci. Technol.* **2010**, 70(5), 703-718.
 84. Putti, M., Simonet, M., Solberg, R., Peters, G.W.M.; Electrospinning poly (ϵ -caprolactone) under controlled environmental conditions : Influence on fiber morphology and orientation. *Polymer (Guildf)*. **2015**, 63, 189-195.
 85. Huang, Z.M., Zhang, Y.Z., Kotaki, M., Ramakrishna, S.; A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.* **2003**, 63(15), 2223-2253.
 86. Li, Z., Wang, C.; Effects of Working Parameters on Electrospinning. In: *One-Dimensional Nanostructures.* **2013**, 15-29.
 87. Seeram, R., Fujihara, K., Teo, W-E., Lim, T-C., Ma, Z.; *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers.* World Scientific Publishing Company: Singapore, **2005**.
 88. Wang, C., Chien, H.S., Hsu, C.H, Wang, Y.C., Wang, C.T., Lu, H.A.; Electrospinning

- of polyacrylonitrile solutions at elevated temperatures. *Macromolecules*. **2007**, 40(22), 7973-7983.
89. Gao, X., Zhang, X., Song, J., et al.; Osteoinductive peptide-functionalized nanofibers with highly ordered structure as biomimetic scaffolds for bone tissue engineering. *Int. J. Nanomedicine*. **2015**, 10(1), 7109-7128.
90. Dedavid, B.A., Gomes, C.I., Machado, G.; *Microscopia Eletrônica de Varredura - Aplicações e Preparação de Amostras - Materiais Poliméricos, Metálicos e Semicondutores*. EDIPUCRS : Porto Alegre, **2007**.
91. *Espectrometria de energia dispersiva de raios-X - EDS*, disponível em <http://www.degeo.ufop.br/laboratorios/microlab/mev.htm> (acesso em 08/02/17).
92. Solomons, T.W.G.; *Química Orgânica*. 9 ed. LTC: Rio de Janeiro - RJ; **2009**.
93. Stuart, B.; *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, disponível em <http://www.kinetics.nsc.ru/chichinin/books/spectroscopy/Stuart04.pdf> (acesso em 03/03/17).
94. Bruker.; *Attenuated Total Reflection (ATR) – a versatile tool for FT-IR spectroscopy*, disponível em https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/OpticalSpectroscopy/FT-IR/ALPHA/AN/AN79_ATR-Basics_EN.pdf (acesso em 03/03/17).
95. Weibel, D.E.; *Polymer Assisted Surface Modification by Photons*. Nova Science Publishers, Inc.: New York, **2011**.
96. Yuan, Y., Lee, T.R.; Contact Angle and Wetting Properties. *Surface Science Techniques*. **2013**, 51, 3-34.
97. Zhang, S., Huang, Y., Yang, X., et al.; Gelatin nanofibrous membrane fabricated by electrospinning of aqueous gelatin solution for guided tissue regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. A*. **2009**, 90(3), 671-679.
98. Callister, W.D.J.; *Ciência E Engenharia de Materiais - Uma Introdução*; LTC: Rio de Janeiro, **2000**.
99. Lucas, E.F., Soares, B.G., Monteiro, E.; *Caracterização de Polímeros - Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica*; E-papers Serviços Editoriais: Rio de Janeiro - RJ,

2001.

100. Denis, P.; Electrospinning and Structure of Bicomponent Polycaprolactone / Gelatin Nanofibers Obtained Using Alternative Solvent System Electrospinning and Structure of Bicomponent Polycaprolactone / Gelatin Nanofibers Obtained Using Alternative Solvent System. *Int. J. Polym. Mater.* **2015**, 64, 354-364.
101. Chen, Y., Sonnaert, M., Roberts, S.J., Luyten, F.P., Schrooten, J.; Validation of a PicoGreen-Based DNA Quantification Integrated in an RNA Extraction Method for Two-Dimensional and Three-Dimensional Cell Cultures. *Tissue Eng. Part C Methods.* **2012**, 18(6), 444-452.
102. Pierce, B.; *The thermo Scientific - alamarBlue Cell Viability Assay Reagent*, disponível em <http://www.interchim.fr/ft/6/66941P.pdf> (acesso em 10/02/17).
103. Simão, A.M.S.; Estudos das características cinéticas da fosfatase alcalina reconstituída em sistemas vesiculares Estudos das características cinéticas da fosfatase alcalina reconstituída em sistemas vesiculares. Tese de doutorado em Química, USP, Ribeirão Preto, **2008**.
104. BioVision; *Alkaline Phosphatase Activity Fluorometric Assay Kit*, disponível em <http://www.biovision.com/alkaline-phosphatase-activity-fluorometric-assay-kit.html> (acesso em 03/01/17).
105. Sabokbar, A., Millett, P.J., Myer, B., Rushton, N.; A rapid, quantitative assay for measuring alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells in vitro. *Bone Miner.* **1994**, 27(1), 57-67.
106. Denis, P., Dulnik, J., Sajkiewicz, P.; Electrospinning and Structure of Bicomponent Polycaprolactone/Gelatin Nanofibers Obtained Using Alternative Solvent System. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* **2014**, 64(7), 354-364.
107. Barnes, C.P., Pemble, C.W., Brand, D.D., Simpson, D.G., Bowlin, G.L.; Cross-Linking Electrospun Type II Collagen Tissue Engineering Scaffolds with Carbodiimide in Ethanol. *Tissue Eng.* **2007**, 13(7), 1593-1605.
108. Sisson, K., Zhang, C., Farach-Carson, M.C., Chase, D.B., Rabolt, J.F.; Evaluation of cross-linking methods for electrospun gelatin on cell growth and viability. *Biomacromolecules.* **2009**, 10(7), 1675-1680.

109. Teng, S-H., Lee, E-J., Wang, P., Kim, H-E.; Collagen/hydroxyapatite composite nanofibers by electrospinning. *Mater. Lett.* **2008**, 62(17–18), 3055-3058.
110. Jaiswal, A.K., Chhabra, H., Soni, V.P., Bellare, J.R.; Enhanced mechanical strength and biocompatibility of electrospun polycaprolactone-gelatin scaffold with surface deposited nano-hydroxyapatite. *Mater. Sci. Eng. C.* **2013**, 33(4), 2376-2385.
111. Ramier, J., Boudierlique, T., Stoilova, O., et al.; Biocomposite scaffolds based on electrospun poly(3-hydroxybutyrate) nanofibers and electrosprayed hydroxyapatite nanoparticles for bone tissue engineering applications. *Mater. Sci. Eng. C.* **2014**, 38(1), 161-169.
112. Schindler, C., Williams, B.L., Patel, H.N., Thomas, V., Dean, D.R.; Electrospun polycaprolactone/polyglyconate blends: Miscibility, mechanical behavior, and degradation. *Polym. (United Kingdom)*. **2013**, 54(25), 6824-6833.
113. Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M.P., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M.H., Ramakrishna, S.; Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Biomaterials*. **2008**, 29(34), 4532-4539.
114. Gautam, S., Dinda, A.K., Mishra, N.C.; Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. *Mater. Sci. Eng. C.* **2013**, 33(3), 1228-1235.
115. Gomes, S.R., Rodrigues, G., Martins, G.G., et al.; In vitro and in vivo evaluation of electrospun nanofibers of PCL, chitosan and gelatin: A comparative study. *Mater. Sci. Eng. C.* **2015**, 46, 348-358.
116. Prabhakaran, M.P., Venugopal, J.R., Chyan, T. T., et al.; Electrospun biocomposite nanofibrous scaffolds for neural tissue engineering. *Tissue Eng. Part A.* **2008**, 14(11), 1787-1797.
117. Xue, J., He, M., Liu, H., et al.; Drug loaded homogeneous electrospun PCL/gelatin hybrid nanofiber structures for anti-infective tissue regeneration membranes. *Biomaterials*. **2014**, 35(34), 9395-9405.
118. Siqueira, N.M., Paiva, B., Camassola, M., et al.; Gelatin and galactomannan-based scaffolds: Characterization and potential for tissue engineering applications. *Carbohydr. Polym.* **2015**, 133, 8-18.

119. Zhou, Z., Yang, Z., Huang, T., et al.; Effect of Chemical Cross-linking on Properties of Gelatin/Hyaluronic Acid Composite Hydrogels. *Polym. Plast. Technol. Eng.* **2013**, 52(1), 45-50.
120. Chakrapani, V.Y., Gnanamani, A., Giridev, V.R., Madhusoothanan, M., Sekaran, G.; Electrospinning of Type I Collagen and PCL Nanofibers Using Acetic Acid. *J. Appl. Polym. Sci.* **2012**, 125(4), 3221-3227.
121. Gupta, D., Venugopal, J., Prabhakaran, M.P., et al.; Aligned and random nanofibrous substrate for the in vitro culture of Schwann cells for neural tissue engineering. *Acta Biomater.* **2009**, 5(7), 2560-2569.
122. Lee, J., Tae, G., Kim, Y.H., Park, I.S., Kim, S.H.; The effect of gelatin incorporation into electrospun poly(l-lactide-co-ε-caprolactone) fibers on mechanical properties and cytocompatibility. *Biomaterials.* **2008**, 29(12), 1872-1879.
123. Keivani, F., Shokrollahi, P., Zandi, M., Irani, S., Shokrollahi, F., Khorasani, S.C.; Engineered electrospun poly(caprolactone)/polycaprolactone-g-hydroxyapatite nanofibrous scaffold promotes human fibroblasts adhesion and proliferation. *Mater. Sci. Eng. C.* **2016**, 68, 78-88.
124. Cornwell, K.G., Lei, P., Andreadis, S.T., Pins, G.D.; Crosslinking of discrete self-assembled collagen threads: Effects on mechanical strength and cell–matrix interactions Kevin. *J Biomed Mater Res A.* **2007**, 80(2), 362-371.
125. Joseph, K., Medeiros, E.S., Carvalho, L.H.; Compósitos de matriz poliéster reforçados por fibras curtas de sisal. *Polímeros.* **1999**, 9(4), 136-141.
126. Cooper, A., Bhattarai, N., Zhang, M.; Fabrication and cellular compatibility of aligned chitosan-PCL fibers for nerve tissue regeneration. *Carbohydr. Polym.* **2011**, 85(1), 149-156.
127. Gautam, S., Amit, C.C., Dinda, K.; Fabrication and characterization of PCL / gelatin / chitosan ternary nanofibrous composite scaffold for tissue engineering applications. **2014**, 1076-1089.
128. Rezende, C.A., Duek, E.A.R.; Blendas de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)/ poli (ácido láctico): degradação in vitro. *Polímeros.* **2003**, 13(1), 36-44.
129. Kołbuk, D., Sajkiewicz, P., Maniura-weber, K., Fortunato, G.; Structure and morphology

- of electrospun polycaprolactone / gelatine nanofibres. *Eur. Polym. J.* **2013**, 49(8), 2052-2061.
130. Al-Nasiry, S., Geusens, N., Hanssens, M., Luyten, C., Pijnenborg, R.; The use of alamarBlue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Hum. Reprod.* **2007**, 22(5), 1304-1309.
 131. Kim, C.H., Khil, M.S., Kim, H.Y., Lee, H.U., Jahng, K.Y.; An Improved Hydrophilicity via Electrospinning for Enhanced Cell Attachment and Proliferation. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **2006**, 78(2), 283-290.
 132. Li, W., Cooper, J.A., Mauck, R.L., Tuan, R.S.; Fabrication and characterization of six electrospun poly (-hydroxy ester)-based fibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Acta Biomater.* **2006**, 2, 377-385.
 133. Jones, G.L., Walton, R., Czernuszka, J., Griffiths, S.L., Haj, A.J. El, Cartmell, S.H.; Primary human osteoblast culture on 3D porous collagen-hydroxyapatite scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* **2010**, 94, 1244-1250.