

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO –  
PROPIEX  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE  
MATERIAIS – PPGCEM**

**ERIC DA SILVA MARTINELLO ROCHA**

**MEMBRANA ELETROFIADA DE POLI(ÁCIDO LÁTICO) PLA, QUITOSANA E  
VIDRO BIOATIVO DO SISTEMA LZS ( $\text{Li}_2\text{O-ZrO}_2\text{-SiO}_2$ ) PARA APLICAÇÃO EM  
REGENERAÇÃO DE CARTILAGEM**

**Criciúma, julho de 2023**

**ERIC DA SILVA MARTINELLO ROCHA**

**MEMBRANA ELETROFIADA DE POLI (ÁCIDO LÁTICO) PLA, QUITOSANA E  
VIDRO BIOATIVO DO SISTEMA LZS (Li<sub>2</sub>O-ZrO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub>) PARA APLICAÇÃO EM  
REGENERAÇÃO DE CARTILAGEM**

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

Orientador(a): Prof<sup>a</sup> Dra. Sabrina Arcaro

Coorientador: Prof. Dr. Oscar Rubem Klegues

Montedo

**Criciúma, julho de 2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

R672i Rocha, Eric da Silva Martinello.

Membrana eletrofiada de poli (ácido lático) PLA, quitosana e vidro bioativo do sistema LZS (Li<sub>2</sub>O-ZrO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub>) para aplicação em regeneração de cartilagem / Eric da Silva Martinello Rocha. - 2023.

107 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Criciúma, 2023.

Orientação: Sabrina Arcaro.

Coorientação: Oscar Rubem Klegues Montedo.

1. Materiais biomédicos. 2. Engenharia de tecidos. 3. Cartilagem hialina - Regeneração. 4. Quitosana. 5. Ácido poliláctico. 6. Biovidros. 7. Engenharia biomédica. I. Título.

CDD 23. ed. 610.28

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101  
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC


Eric da Silva Martinello Rocha

Membrana eletrofiada de PLA, quitosana e vidro bioativo do sistema LZS para aplicação em regeneração de cartilagem.

Esta Dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre(a) em Ciência e Engenharia de Materiais pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais - PPGCEM (Área de concentração: Tecnologia de Materiais) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Criciúma, SC, 31 de julho de 2023.

**Banca Examinadora:**

Documento assinado digitalmente  
 **MATHEUS VINÍCIUS GREGORY ZIMMERMANN**  
Data: 19/04/2024 16:56:13-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

**Prof. Dr. Matheus Vinicius Gregory Zimmermann**  
Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC

Documento assinado digitalmente  
 **PAULO CESAR LOCK SILVEIRA**  
Data: 22/04/2024 17:46:13-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

**Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira**  
Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC

Documento assinado digitalmente  
 **MARCIA ADRIANA TOMAZ SANTANA**  
Data: 22/04/2024 17:27:03-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

**Profª Drª Marcia Adriana Tomaz Duarte**  
DBM Eletrotech

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de reverenciar a Deus pelo dom da vida e a possibilidade que me deu de realizar e concluir este trabalho. Aos meus pais, Santos Rocha (em memória) e Matilde da Silva Rocha por todos os ensinamentos e por sempre estar ao meu lado. A minha família a qual eu amo imensamente e onde eu encontro força para seguir em frente, Maiara Clementino Martinello Rocha, minha esposa, e aos meus filhos, Lucca Martinello Rocha e Murilo Martinello Rocha, amo todos vocês. Esta nova etapa da minha vida, o mestrado, foi com certeza um divisor de águas, tanto no crescimento em conhecimento, quanto no profissional. Porém nada disso seria possível sem a participação de pessoas as quais tive o imenso prazer de conhecer e compartilhar momentos. De uma forma muito especial quero começar agradecendo minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sabrina Arcaro por sua dedicação, conhecimento e compromisso com a excelência, desempenhando um papel fundamental no meu aprendizado e conseqüentemente elevando o nível deste trabalho. Sou extremamente grato pelo seu tempo a mim dedicado. Muitos foram os momentos de dificuldade durante o processo e seu apoio sempre me motivou a continuar e crescer cada vez mais. Também gostaria de agradecer profundamente ao meu coorientador Prof. Dr Oscar Rubem Klegues Montedo. Sua participação e colaboração na construção deste trabalho sempre foram de forma pontual e assertiva, sempre com uma palavra sábia no momento correto. Quero transmitir meus sinceros agradecimentos a todo o corpo docente e funcionários do PPGCEM e do Iparque da UNESC, em especial, a Vivian, os Profs. Drs. Elídio Angioletto, Fabiano Raupp Pereira, e todos os outros professores que contribuíram para a minha capacitação. Gostaria ainda de agradecer as pessoas que contribuíram no meu dia a dia, o Henrique Borba pela ajuda prestada durante meus experimentos, a Natália, a Jordana e todos que de alguma forma passaram por esta etapa da minha vida, levarei para sempre as amizades e os bons momentos que tivemos juntos. Agradeço também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brasil) que fomentaram e possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também a Márcia Duarte e a DBM Eletrotech que não mediram esforços para nos auxiliar na implementação da eletrofiação no laboratório. Para terminar, gostaria de salientar que as habilidades e experiências aqui adquiridas,

levarei para o resto da minha vida, tendo a certeza de que estou fechando este ciclo sendo uma pessoa melhor do que quando entrei. Obrigado a todos.

## RESUMO

O dano à cartilagem hialina é um desafio para o tratamento regenerativo devido à sua fraca capacidade de regeneração. O desenvolvimento de *scaffolds* porosos com quitosana, poli(ácido lático), PLA e um vidro bioativo, pode proporcionar um avanço na regeneração, combinando a biodegradabilidade do PLA com as propriedades bioativas da quitosana e do LZS para obter membranas com porosidade e tamanho de poros adequados para manter as células mesenquimais no local da lesão. Desta forma este trabalho buscou desenvolver membranas de PLA, quitosana e vidro bioativo do sistema LZS por eletrofição para aplicação em regeneração de cartilagem hialina. Após dissolver cada material separadamente, eles foram homogeneizados e logo após eletrofiado. Membranas contendo somente PLA puro foram produzidas a fim de ajustar os parâmetros da eletrofição. Posteriormente, quantidades diferentes de quitosana com (0,9; 9, 17 e 23 % (v/v)) foram adicionadas ao PLA. Por fim, foi adicionado 0,5 e 1 % (v/v) do vidro bioativo do sistema LZS. A influência das adições da quitosana e do LZS foram avaliadas por meio de caracterizações químicas, físicas, térmicas, morfológicas, de superfície, de bioatividade, degradabilidade e citotoxicidade. Os resultados mostraram que ao adicionar a quitosana houve uma redução do diâmetro das fibras de 5,74 para até 1,18  $\mu\text{m}$ , a porosidade aumentou para valores de até 50% e o tamanho dos poros obteve uma distribuição mais homogênea de 18,53; 28,41; 28,26 e 29,50  $\mu\text{m}$ . Tal tamanho é ideal para membranas de regeneração de cartilagem. A absorção de fluidos das membranas de PLA foi de até 67 %, enquanto com a adição de quitosana aumentou a absorção para até 79%. Após imersão das membranas em fluido corpóreo simulado (SBF) por até 28 dias foi possível perceber a formação de  $(\text{PO}_4^{3-})$ , grupo que confirma a bioatividade com a formação de fosfatos de cálcio como a hidroxiapatita. Foi possível analisar a perda de massa das membranas comprovando a sua degradabilidade, com massa resultante de 5,86; 3,29; 0,75 e 1,25% para PLA puro, PLA/Q17, PLA/Q17LZS0,5 e PLA/Q17/LZS1. Estas mesmas membranas ainda obtiveram resultados de viabilidade celular acima de 75 %. Por fim, os resultados obtidos, mostraram a possibilidade de desenvolver uma membrana composta por PLA, quitosana e LZS com potencial para aplicação em regeneração de cartilagem hialina.

Palavras-chave – Regeneração de cartilagem; membranas; PLA; Quitosana; vidro bioativo LZS; electrospinning.

## ABSTRACT

Damage to hyaline cartilage is a challenge for regenerative treatment due to its poor ability to regenerate. The development of porous scaffolds with chitosan, poly (lactic acid), PLA and a bioactive glass can provide an advance in regeneration, combining the biodegradability of PLA with the bioactive properties of chitosan and LZS to obtain membranes with porosity and pore size adequate to maintain mesenchymal cells at the site of injury. Thus, this work sought to develop PLA, chitosan and bioactive glass membranes from the LZS system by electrospinning for application in hyaline cartilage regeneration. After dissolving each material separately, they were homogenized and then electrospun. Membranes containing only pure PLA were produced to adjust the electrospinning parameters. Subsequently, different amounts of chitosan (0.9, 9, 17 and 23% (v/v)) were added to PLA. Finally, 0.5 and 1% (v/v) of bioactive glass from the LZS system were added. The influence of the additions of chitosan and LZS were evaluated through chemical, physical, thermal, morphological, surface, bioactivity, degradability and cytotoxicity characterizations. The results showed that when adding chitosan there was a reduction in the diameter of the fibers from 5.74 to up to 1.18  $\mu\text{m}$ , the porosity increased to values of up to 50% and the pore size obtained a more homogeneous distribution of 18.53; 28.41; 28.26 and 29.50  $\mu\text{m}$ . Such size is ideal for cartilage regeneration membranes. The fluid absorption of the PLA membranes was up to 67%, while the addition of chitosan increased the absorption to up to 79%. After immersing the membranes in simulated body fluid (SBF) for up to 28 days, it was possible to notice the formation of  $(\text{PO}_4^{3-})$ , a group that confirms the bioactivity with the formation of calcium phosphates such as hydroxyapatite. It was possible to analyze the mass loss of the membranes, proving their degradability, with a resulting mass of 5.86; 3.29; 0.75 and 1.25% for pure PLA, PLA/Q17, PLA/Q17LZS0.5 and PLA/Q17/LZS1. These same membranes still achieved cell viability results above 75%. Finally, the results obtained showed the possibility of developing a membrane composed of PLA, chitosan and LZS with potential for application in hyaline cartilage regeneration.

Keywords – Cartilage regeneration; membranes; PLA; Chitosan; bioactive glass LZS; electrospinning.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Os três componentes essenciais que constituem a tríade da engenharia tecidual.....	22
Figura 2: Representação esquemática da cartilagem hialina.....	23
Figura 3: Polimerização do PLA por abertura de anel.....	26
Figura 4: Estrutura química do Poli (ácido láctico) - PLA.....	27
Figura 5: Estrutura química da quitina e quitosana.....	29
Figura 6: Representação esquemática sobre as possibilidades de processamento da quitosana em diferentes formas.....	30
Figura 7: Esquema convencional de um aparelho de eletrofiação.....	39
Figura 8: Fluxograma do desenvolvimento do trabalho.....	43
Figura 9: Figura esquemática de um sistema de <i>electrospinning</i> .....	46
Figura 10: Formação do cone de Taylor em evidência e a formação de um fio.....	47
Figura 11: Ângulos de contato dos líquidos com superfícies sólidas, para líquidos: (a) perfeitamente molhante; (b) predominantemente molhante; (c) predominantemente não-molhante; (d) não-molhante (OGEDA, 2010).....	51
Figura 12: Espectro de FTIR obtidos do PLA puro.....	54
Figura 13: Análise térmica do PLA puro.....	56
Figura 14: Espectro de FTIR obtidos da quitosana pura.....	58
Figura 15: Análise térmica da quitosana pura.....	60
Figura 16: Espectro de FTIR obtidos do vidro bioativo do sistema LZS.....	61
Figura 17: Análise térmica do vidro bioativo do sistema LZS.....	62
Figura 18: Foto de uma tentativa de eletrofiação da quitosana pura.....	63
Figura 19: imagens de estereoscópio das membranas produzidas com PLA..	64
Figura 20: Imagens de MEV das membranas de PLA de 10 e 15 kV .....	65
Figura 21: Imagens obtidas em estereoscópio das membranas de PLA/quitosana .....	66
Figura 22: Imagem de MEV das membranas contendo PLA e quitosana .....	67
Figura 23: Algumas das características estruturais importantes encontradas em uma junta de joelho típica e as escalas de comprimento relevantes.....	69
Figura 24: Imagens de MEV das duas membranas contendo LZS, em destaque a presença das partículas de LZS nas membranas.....	73

Figura 25: Em cor azul o silício, confirmando a presença do LZS nas membranas .....	74
Figura 26: Espectro de FTIR comparando as quatro membranas.....	75
Figura 27: Análise térmica das 4 membranas .....	77
Figura 28: Espectros de FTIR para as 4 membranas com 0, 7, 14, 21 e 28 dias	78
Figura 29: Micrografias obtidas por MEV com o antes e depois da exposição das 4 membranas com 28 dias em SBF .....	80
Figura 30: Micrografia das 4 membranas feita no MEV com EDS após a exposição de 28 dias em SBF, ao lado o gráfico obtido por EDS identificando os elementos presentes.....	81
Figura 31: Imagens das membranas expostas em fluido corpóreo simulado (SBF) com 7, 14, 21 e 28 dias.....	83
Figura 32: Acompanhamento do pH medido a cada dois dias durante uma semana de exposição das membranas ao SBF.....	85
Figura 33: Viabilidade celular em culturas incubadas com as membranas. Cada poço recebe um pedaço de membrana e as células do poço ficam em contato com ela por 48 h. Para cada material e período n = 4. Análise estatística utilizada ANOVA de 1 fator, p < 0,05.....	86

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Módulo de elasticidade do tecido da cartilagem hialina e cartilagem articular bovina.....	24
Tabela 2: Derivados à base de quitosana e suas importantes propriedades. ...	31
Tabela 3: Composição nominal (mol %) dos testes dos vidros bioativos. ....	33
Tabela 4: Parâmetros do processo de eletrofiação. ....	40
Tabela 5: Composição química dos biovidros do sistema LZS. ....	42
Tabela 6: Quantidades de cada componente das soluções para fabricação das membranas .....	44
Tabela 7: Quantidades de cada componente das soluções para fabricação das membranas com LZS .....	45
Tabela 8: Relação entre o número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) e o grupo funcional das bandas encontradas no PLA.....	55
Tabela 9: Relação entre o número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) e o grupo funcional das bandas encontradas na quitosana .....	58
Tabela 10: grupos funcionais e o número de onda característico do PLA puro.	61
Tabela 11: apresenta os diâmetros das fibras, porosidade, espessura e absorção de fluidos das membranas obtidas.....	65
Tabela 12: resultados de diâmetro das fibras, porosidade, tamanho dos poros e espessura das membranas contendo PLA e quitosana .....	68
Tabela 13: Resultados do teste de molhabilidade das membranas de PLA e PLA e quitosana.....	71
Tabela 14: Resultados de diâmetro das fibras, porosidade, tamanho dos poros e espessura das membranas contendo PLA/quitosana/LZS de 0,5 e 1% de LZS	73
Tabela 15: Valores dos pesos das membranas antes e após os 28 dias em (SBF) .....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATD - Análise Termodiferencial

$\beta$ -TCP -  $\beta$ -tricálcio fosfato

DCM - Diclorometano

DRX - Difração de raios X

DSC - Calorimetria de varredura diferencial

FTIR - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

HCA - Hidroxicarbonatoapatita

HEPES - (4- (2-hidroxietil) - Ácido 1-piperazino-etanossulfônico

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetil2--tiazolil)2-, 5-difenil2-H-tetrazólio

pH - Potencial hidrogeniônico

SBF - fluido corporal simulado

TCP - fosfato tricálcico

TG - Análise termogravimétrica

UV - Ultravioleta

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>21</b>
3.1 ENGENHARIA TECIDUAL .....	21
<b>3.1.1 Tecido Cartilaginoso</b> .....	<b>23</b>
3.2 BIOMATERIAIS PARA REGENERAÇÃO DE TECIDO CARTILAGINOSO .....	24
<b>3.2.1 Poli (ácido láctico) PLA</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2.2 Quitosana</b> .....	<b>29</b>
<b>3.2.3 Vidros Bioativos</b> .....	<b>32</b>
3.2.3.1 Composições de vidros bioativos.....	33
3.2.3.2 Vidro bioativo do sistema LZS.....	35
<b>3.2.4 Scaffolds</b> .....	<b>36</b>
3.3 ELETROFIAÇÃO ( <i>ELECTROSPINNING</i> ).....	38
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
4.1 MATERIAIS .....	41
<b>4.1.1 Polímero sintético: Poli (ácido Láctico) PLA</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1.2 Polímero natural: Quitosana</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1.2 Vidro bioativo do sistema LZS</b> .....	<b>42</b>
4.2 MÉTODOS .....	42
<b>4.2.1 Preparo das soluções para eletrofiação</b> .....	<b>43</b>
4.2.1.1 Preparo das soluções de PLA .....	43
4.2.1.2 Preparo das soluções de quitosana .....	43
4.2.1.3 Preparo das soluções de PLA e quitosana.....	44
4.2.1.4 Preparo das soluções de PLA e quitosana com adição de vidro bioativo .....	44
<b>4.2.2 Influência das variáveis do processo de eletrofiação na obtenção de membranas</b> .....	<b>45</b>
4.2.2.1 Eletrofiação de quitosana pura.....	46
4.2.2.1.1 Eletrofiação de PLA.....	46
4.2.2.1.2 Eletrofiação de PLA e quitosana .....	48
4.2.2.1.3 Eletrofiação de PLA, quitosana e LZS.....	48
<b>4.2.3 Caracterização das membranas</b> .....	<b>48</b>
4.2.3.1 Caracterização morfológica: Microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV); análise química pontual.....	48
4.2.3.2 Caracterizações físicas: Porosidade das membranas.....	49
4.2.3.3 Absorção de Fluidos.....	50
4.2.3.3 Análise dos grupos funcionais presentes: Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	50
4.2.3.4 Análise da molhabilidade por ângulo de contato .....	51
4.2.3.5 Análises térmicas .....	51
4.2.3.6 Bioatividade e Biodegradabilidade .....	52

4.2.4.9 Citotoxicidade .....	53
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS DE PARTIDA .....	54
<b>5.1.1 PLA.....</b>	<b>54</b>
5.1.1.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) por reflexão total atenuada (ATR) .....	54
5.1.1.2 Análise térmica diferencial (ATD) e termogravimétrica (TG) .....	55
<b>5.1.2 Quitosana .....</b>	<b>57</b>
5.1.2.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) por reflexão total atenuada (ATR) .....	57
5.1.2.2 Análise térmica diferencial (ATD) e termogravimétrica (TG) .....	59
<b>5.1.3 LZS .....</b>	<b>60</b>
5.1.3.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) por reflexão total atenuada (ATR) .....	60
5.1.3.2 Análise térmica diferencial (ATD) e termogravimétrica (TG) .....	61
5.2 SELEÇÃO DOS PARÂMETROS DE ELETROFIAÇÃO .....	62
<b>5.2.1 Eletrofiação de quitosana pura.....</b>	<b>62</b>
<b>5.2.2 Eletrofiação de PLA .....</b>	<b>64</b>
5.3 INFLUÊNCIA DA QUITOSANA NAS MEMBRANAS DE PLA .....	66
<b>5.3.1 Características físicas e morfológicas.....</b>	<b>66</b>
<b>5.3.2 Molhabilidade .....</b>	<b>70</b>
5.4 INFLUÊNCIA DA QUITOSANA E DO LZS NAS MEMBRANAS DE PLA.....	72
<b>5.4.1 Análise das características físicas e morfológicas .....</b>	<b>72</b>
<b>5.3.2 Análise dos grupos funcionais presentes nas membranas.....</b>	<b>74</b>
<b>5.3.3 Comportamento térmico das membranas .....</b>	<b>75</b>
5.5 BIOATIVIDADE, BIODEGRADABILIDADE E CITOTOXICIDADE DAS MEMBRANAS DE PLA + QUITOSANA + LZS	77
<b>5.5.1 Bioatividade .....</b>	<b>77</b>
<b>5.5.2 Biodegradabilidade.....</b>	<b>82</b>
<b>5.3.7 Citotoxicidade .....</b>	<b>85</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>87</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A busca da ciência por qualidade de vida e longevidade tem gerado cada vez mais a necessidade de se buscar alternativas para o reparo, regeneração e/ou substituição de tecidos vivos que sofreram traumas ou patogenias. Neste cenário, a possibilidade de introdução de materiais sintéticos no corpo - biomateriais - aparece como uma opção promissora há alguns anos. O corpo humano é formado por quatro tipos de tecidos: epitelial, conjuntivo (adiposo, cartilagenoso, ósseo e sanguíneo), muscular (liso, esquelético e cardíaco) e tecido nervoso. Cada tecido é composto por dois elementos essenciais: matriz e células (ZHANG *et al.*, 2013).

O tecido conjuntivo do tipo cartilagenoso, por sua vez, é dividido em três tipos de cartilagens: hialina, fibrosa e elástica. A cartilagem hialina requer uma atenção maior, pois é ela que recobre ossos longos do corpo, onde estarão localizadas as lesões adquiridas ao longo da vida (MONTANARI, 2016).

A cartilagem é formada por células denominadas condroblastos, células jovens, que são células originadas das células mesenquimais produzidas dentro da medula óssea (células tronco), e os condrócitos que são as células já maduras que estão envolvidas por uma matriz extracelular; além disso, esse tecido complexo possui água e uma rede de proteínas (proteoglicano e colágeno tipo II) (PORTAL; ROSA; SIMONI, 2019). O osso localizado logo abaixo da cartilagem é chamado de osso subcondral e é constituído de água, hidroxapatita (HA) e feixes de fibras de (colágeno tipo I) (NOOEALD *et al.*, 2012).

Atualmente, o dano à cartilagem hialina é um grande problema de saúde que afeta pessoas de todas as idades, cerca de 528 milhões de pessoas em todo o mundo são afetadas pela osteoartrite (CRUZ; ESPANHA; MARCONCIN, 2023). Com o passar dos anos, são acumuladas diversas lesões na cartilagem (em tornozelos, joelhos e quadril), que com o tempo, transformam-se em lesões sérias e graves. Devido à fraca capacidade de regeneração e pelo fato de a cartilagem ser avascular, ou seja, ela não recebe sangue, o tratamento regenerativo da cartilagem continua sendo um grande desafio clínico.

Tratamentos convencionais por microfraturas podem ser realizados nas lesões da cartilagem hialina utilizando artroscopia. Nesta técnica cirúrgica, o osso subcondral sofre várias perfurações para que, através delas, as células tronco mesenquimais possam fluir e se diferenciar em condroblastos, passando a

condrócitos e por fim gerar uma nova cartilagem (DE GIROLAMO *et al.*, 2018). Este tipo de tratamento foi considerado como padrão-ouro pela medicina, porém ainda é insuficiente para adequada recuperação articular, não obtendo-se tão eficientemente regeneração da cartilagem (PORTAL; ROSA; SIMONI, 2019). Isso porque quando estes materiais derivam de dentro da medula para preencher o espaço vazio gerado por uma lesão, boa parte deste material se perde na própria fluidez do corpo, uma vez que não há contensão destas células em cima da região lesionada, impossibilitando uma regeneração completa.

Neste sentido, o desenvolvimento de uma estrutura tridimensional porosa que sirva como arcabouço (*scaffolds*) capaz de induzir e manter as células mesenquimais provenientes da medula óssea no local da lesão é essencial. Para isso, o *scaffold* deve ter a capacidade de replicar a arquitetura natural e as propriedades fisiológicas da cartilagem articular e tecidos ósseos subcondrais (PARK *et al.*, 2009). Os *scaffolds* existentes no mercado e em estudos científicos são comumente produzidos a partir de materiais metálicos (JIANG; NING, 2020), vidros bioativos (VUKAJLOVIC *et al.*, 2019) e cerâmica (BUNPETCH *et al.*, 2019). Quando estes *scaffolds* têm uma espessura reduzida, pode ser também chamado de membrana.

As membranas compósitos de polímero e cerâmica ou vidros bioativos podem estimular a adesão e proliferação de condrócitos e células-tronco mesenquimais da medula óssea e facilitam de uma forma significativa o preenchimento dos defeitos na cartilagem hialina (REN *et al.*, 2019).

Existem diversos métodos para a produção de membranas, porém um método que é bastante utilizado é a eletrofiação (do inglês *electrospinning*). O sistema de eletrofiação consiste em três componentes principais, formados por uma fonte de alta tensão, uma seringa com tubo capilar (onde contém o material que será eletrofiado) e um coletor aterrado geralmente por uma placa metálica. A fonte de alta tensão oferece carga de polaridade na solução dentro da seringa, que então é projetada para o coletor de polaridade oposta (SILL; VON RECUM, 2008). O material dentro da seringa é geralmente um polímero que já foi dissolvido completamente em certos solventes. A solução polimérica é introduzida para dentro da seringa e submetida a um campo elétrico, onde uma carga elétrica é induzida sobre sua superfície. A partir do campo elétrico, que supera a tensão superficial, um jato de solução é ejetado ao coletor aterrado. Enquanto o material percorre o espaço entre a ponta do capilar e o coletor,

o solvente é evaporado, sendo coletado apenas o polímero no final do processo (BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

Os vidros bioativos, por sua vez, poderiam ser materiais usados para a produção de membranas para regeneração de cartilagem, pois são materiais que não são apenas inertes e capazes de serem mantidos dentro do corpo humano sem serem tóxicos ou degradados, mas que também podem desempenhar um papel ativo nos processos de cicatrização dos tecidos. O desenvolvimento desta classe de biomateriais começou na década de 1970, quando Hench e seu grupo desenvolveram uma série de vidros bioativos  $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$  (Bioglass® 45S5) com alta bioatividade (LARRY; HENCH, 2006). Esses vidros bioativos destacaram-se rapidamente pela capacidade de formar uma camada de hidroxiapatita carbonatada em sua superfície, fase química responsável por formar uma forte ligação com o tecido mole (por exemplo: cartilagens) e duro (por exemplo: osso) (DE AZA *et al.*, 2007; JONES, 2015). Isso ocorre após a implantação do material pela liberação de íons quando em contato com o meio (HENCH, 2015). Além da formação da camada de apatita, essa liberação de íons favorece a migração, adesão, proliferação e diferenciação das células responsáveis pela deposição tecidual (HENCH; KOKUBO, 1998). Assim, o vidro do sistema LZS ( $19,58\text{Li}_2\text{O}\cdot 11,10\text{ZrO}_2\cdot 69,32\text{SiO}_2$ ) pode ser promissor para essas aplicações. O LZS é uma nova classe de materiais bioativos que está recentemente sendo estudada. A obtenção de *scaffolds* rígidos (POSSOLLI *et al.*, 2022b), o controle da dissolução, a bioatividade, a citotoxicidade com células-tronco (POSSOLLI *et al.*, 2022a) e sua resposta biológica em contato com osteoblastos humanos (SOUZA *et al.*, 2018) já têm demonstrado significativa relevância para aplicação em campos que requerem bioatividade para regeneração de tecidos.

Contudo, um vidro é rígido e não possui semelhança mecânica com cartilagem. Para que se assemelhe a cartilagem, polímeros naturais ou sintéticos podem ser utilizados. Os polímeros possuem cinética de degradação controlada e propriedades mecânicas reguladas de acordo com a composição. Os polímeros biodegradáveis podem ser classificados quanto à sua origem, em polímeros naturais ou sintéticos, e dependendo de sua estrutura química e fonte, podem ser classificados em polissacarídeos, proteínas e polímeros bacterianos. Um exemplo de polímero sintético biodegradável é o PLA(ácido polilático), que é produzido por fermentação microbiana de fontes ricas em carbono, amido de milho, cana-de-açúcar e mandioca

(SARASAM; KRISHNASWAMY; MADIHALLY, 2006; PIRES *et al.*, 2023). É considerado um polímeros promissor em aplicações médicas, como suturas, placas ósseas, suportes para regeneração de tecidos, em medicina regenerativa e outros campos da indústria, devido às suas propriedades mecânicas, biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de ser facilmente processado em diferentes formas e tamanhos (LIU *et al.*, 2006).

Os polímeros naturais provenientes da gelatina, quitosana, ácido hialurônico, colágeno, alginato, glicosaminoglicano, amido e polímeros bacterianos, por sua vez, são menos propensos a causar uma reação imunológica no corpo. Isso significa que eles são mais seguros e menos propensos a causar efeitos colaterais indesejados. Localmente podem facilitar a proliferação e diferenciação celular (NOOE AID *et al.*, 2012).

A quitosana, por sua vez, é um polissacarídeo obtido a partir da desacetilação parcial da quitina, que está presente nas carapaças de crustáceos, insetos e moluscos. Devido a conter micronutrientes como hidroxiapatita e outras semelhanças com a matriz extracelular dos tecidos cartilagosos, a quitosana se assemelha à cartilagem nativa (PUPPI *et al.*, 2010). A desvantagem dos polímeros naturais, como a quitosana, é apresentar baixo peso molecular (10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup> g/mol); isto gera uma dificuldade na elaboração de partículas, fios, fibras e filmes. A solução poderia ser aumentar a concentração das soluções de quitosana, porém, as soluções concentradas de quitosana costumam ter uma alta viscosidade, o que pode afetar negativamente o processo de eletrofição. Além disso, a quitosana tem uma solubilidade limitada em solventes orgânicos com alta volatilidade. Isso pode dificultar a obtenção de uma solução polimérica adequada para a eletrofição, já que é necessário um polímero dissolvido em um solvente que evapore no caminho para o coletor para realizar o processo (MALLICK *et al.*, 2018).

Para solucionar esses problemas, a composição de 2 ou mais grupos de polímeros pode modular propriedades importantes para obtenção de um biomaterial. Tanto a quitosana quanto o PLA são biodegradáveis, o que significa que em aplicações de engenharia tecidual se degradam naturalmente por processos biológicos. A incorporação de quitosana no PLA pode ainda melhorar a eletrofição do compósito, permitindo a obtenção de fibras ou membranas com estruturas porosas, tamanhos controlados de fibras e de poros, melhorando a adesão e proliferação celular (AUGUSTINE *et al.*, 2020).

No entanto, é importante considerar as proporções de cada material, as condições de eletrofição e as características específicas desejadas para a aplicação final, para obter um compósito com as propriedades mais adequadas para a finalidade pretendida.

Neste contexto, este trabalho avaliou a obtenção de membranas eletrofiadas compostas por PLA, quitosana e vidro bioativo do sistema LZS com propriedades semelhantes a cartilagem hialina, boa molhabilidade, porosidade e tamanho de poros adequados para que haja penetração dos fluidos corpóreos e bioatividade. O LZS já teve sua bioatividade e não citotoxicidade avaliadas em trabalho do grupo de pesquisa CERTEC (POSSOLLI *et al.*, 2022a). Além disso, íons bioativos como lítio, zinco, estrôncio, manganês e silício, por exemplo, são fatores essenciais na regeneração de tecidos (DENG *et al.*, 2017). Além da formação da camada de hidroxiapatita advinda da bioatividade, essencial para regeneração, essa liberação de íons favorece a migração, adesão, proliferação e diferenciação das células responsáveis pela deposição do tecido (THOMPSON; HCNCH, 1998).

Apesar de existir na literatura estudos para a produção de membranas que envolvem um polímero unido a uma cerâmica, não foram encontrados estudos construindo uma membrana a partir de PLA, quitosana e vidro bioativo do sistema LZS. Esta composição também não foi considerada anteriormente para uso em regeneração de cartilagem.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Desenvolver membranas de PLA, quitosana e vidro bioativo do sistema LZS por eletrofiação com propriedades adequadas para aplicação em regeneração de cartilagem hialina.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

São objetivos específicos deste trabalho:

- Avaliar a influência das variáveis do processo de eletrofiação para obtenção de membranas de PLA;
- Avaliar a influência da quitosana e LZS na morfologia das fibras, porosidade e molhabilidade das membranas;
- Avaliar os efeitos da adição de quitosana e LZS na bioatividade, biodegradabilidade e citotoxicidade das membranas produzidas.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 ENGENHARIA TECIDUAL

A engenharia tecidual é uma ciência multidisciplinar. Seu conceito surgiu no final da década de 80 e consiste em aplicar os princípios e métodos de engenharia e ciências da vida para obter substitutos biológicos para restaurar, regenerar, manter ou melhorar a função de tecidos e ajudar a restaurar estrutura-função em tecidos normais e patológicos de mamíferos. Quando a estrutura biológica de um tecido não pode ser naturalmente reparada, uma alternativa viável é utilizar um implante feito de um biomaterial.

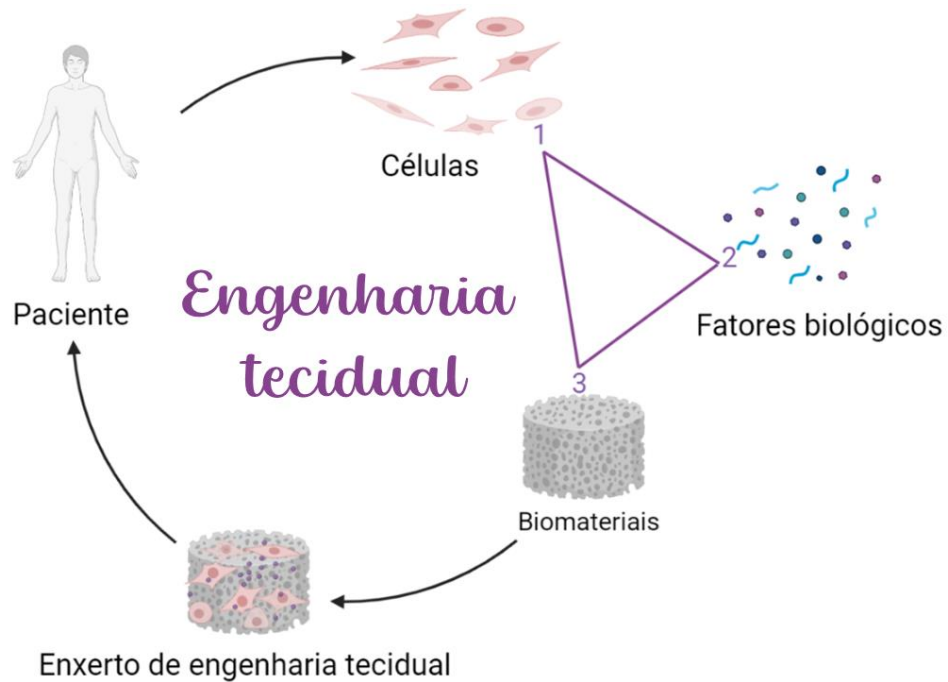
A terapia celular da engenharia tecidual é considerada uma tríade (MURPHY *et al.*, 2013), que pode ser dividida em:

1. Um *scaffold* que fornece estrutura e substrato para crescimento e desenvolvimento de tecido;
2. Uma fonte de células para facilitar a formação de tecido necessária: esta pode ser oriunda da medula óssea ou utilizar células cultivadas *in vitro* ou *in vivo*;
3. Fatores de crescimento ou estímulos biofísicos para direcionar o crescimento e diferenciação de células dentro do *scaffold*.

Com a combinação destes três fatores com uma fonte vascular, as interações entre as moléculas da matriz extracelular e as células-tronco irão criar uma base capaz de fornecer componentes reais desenvolvidos a partir dessa tríade, com capacidade de regeneração de tecidos lesados (JAKAB *et al.*, 2019).

A Figura 1 mostra de uma forma esquemática e sequencial a distribuição da tríade da engenharia tecidual. Como já descrito, ela é composta por células, matriz celular e sinais reguladores que são estímulos para diferenciação e crescimento dos compostos presentes dentro dos *scaffolds*. Na engenharia tecidual, para promover a regeneração ou reparo dos tecidos, podem ser usados recursos como a implantação de células, tecidos ou fatores de auto crescimento em um suporte biológico ou sintético (*scaffolds*), capazes de produzir uma construção tridimensional, que tem por objetivo se assemelhar ao tecido danificado (PORTAL; ROSA; SIMONI, 2019). As células utilizadas podem ser do próprio paciente (ZHANG *et al.*, 2008).

Figura 1: Os três componentes essenciais que constituem a tríade da engenharia tecidual.



Fonte: Autor, 2023

Essas possibilidades levaram a muitos avanços. Atualmente é possível a obtenção de materiais que se assemelham aos tecidos originais em aparência e função (NORMAN; DESAI, 2006). Vale salientar que os tecidos geralmente apresentam duas partes principais: as células e a matriz. As células fornecem a funcionalidade biológica e a matriz fornece uma estrutura tridimensional para que seja possível o crescimento celular (NORMAN; DESAI, 2006; MARINS, 2019).

Os *scaffolds* devem suportar a reprodução, o crescimento e proliferação de células, ter uma razão entre elevada área superficial e baixo volume, apresentar alta porosidade e morfologia semelhantes à matriz original e se degradar no corpo a uma taxa consistente com o crescimento do novo tecido (PRABHAKARAN; VENUGOPAL; RAMAKRISHNA, 2009).

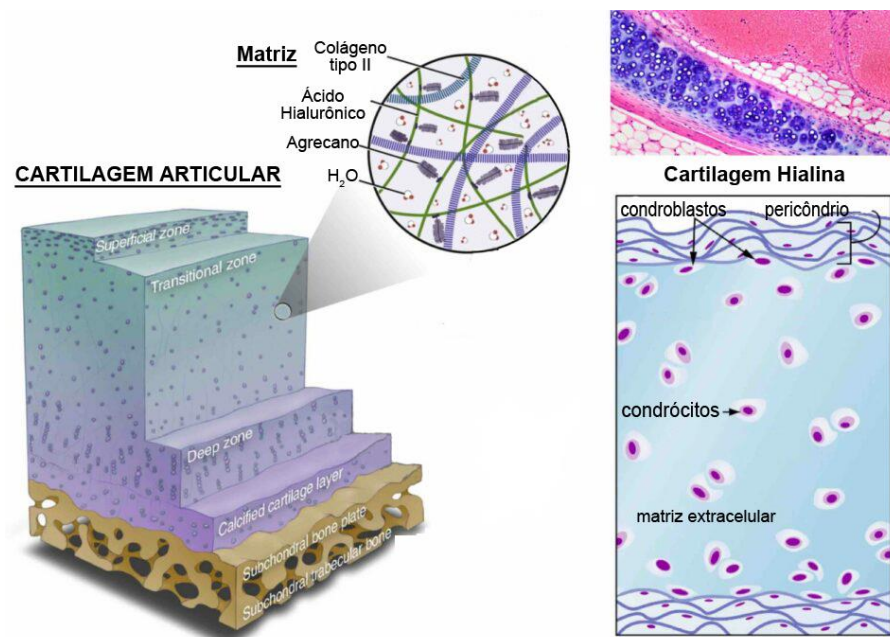
No caso do tecido cartilaginoso, a engenharia tecidual vem sendo desenvolvida e tem se demonstrado como um método eficaz para superar as limitações dos tratamentos convencionais. *Scaffolds*, matrizes extracelulares e hidrogéis têm sido usados para controlar as funções celulares e guiar a regeneração de novos tecidos (EVIANA PUTRI *et al.*, 2020).

### 3.1.1 Tecido Cartilaginoso

O tecido cartilaginoso é classificado como tecido conjuntivo especial, que possui uma característica rígida. Ele desempenha a função de suporte dos tecidos moles, revestindo as superfícies articulares com a função de absorver choques e facilitar os deslizamentos, ele também tem um papel fundamental na formação e o crescimento dos ossos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Existem três tipos de cartilagem presente no corpo humano: hialina, elástica e fibrosa, esta última também pode ser chamada de fibrocartilagem. A cartilagem hialina articular (representação esquemática na Figura 2) recobre os ossos longos do corpo. Ela é uma forma avascular de tecido conjuntivo, ou seja, ela não recebe sangue diretamente. Por esse motivo há uma dificuldade enorme de regeneração da cartilagem hialina.

Figura 2: Representação esquemática da cartilagem hialina.



Fonte: (KARPSTEIN, 2022), adaptado pelo autor.

Ela é composta de células denominadas condrocitos e de matriz extracelular de aparência homogênea e altamente especializada. Os condrocitos são células maduras oriundas dos condroblastos, que são células originais das células mesenquimais presentes na medula óssea. Os condrocitos também são responsáveis pela manutenção da matriz e regulam o metabolismo da cartilagem. A matriz

extracelular da cartilagem é sólida e levemente maleável (SALATI *et al.*, 2020). Em termos estruturais, a cartilagem hialina articular é rica em matriz extracelular, na qual se encontram distribuídos condrócitos isolados ou em grupos clonais organizados em pequenas colônias celulares. Os condrócitos são responsáveis pela secreção dos componentes da matriz cartilaginosa, como colágeno, glicoproteínas e proteoglicanos. A nutrição do tecido cartilaginoso ocorre via capilares contidos no pericôndrio, um tecido conjuntivo que envolve a cartilagem e que tem células tronco mesenquimais adultas chamadas condroblastos (CRUZ *et al.*, 2017).

Assim, é natural que em algum momento da vida, as pessoas se deparem com lesões condrais. Isso acontece devido à dificuldade de regeneração da cartilagem. Com o passar dos anos, as cirurgias de reparação desses defeitos tiveram evoluções, visando a reconstrução de uma cartilagem mais semelhante possível da cartilagem nativa. Portanto, estruturas de cartilagem ideais para engenharia tecidual devem possuir a mesma estrutura da cartilagem nativa, bem como a mesma função fornecida pelo microambiente para a regeneração da cartilagem (LI *et al.*, 2019). Como a cartilagem por si só não produz novas células, cirurgias que ocasionam microfraturas nos ossos subcondrais são realizadas. A partir destas pequenas perfurações, as células mesenquimais chegam até a matriz (membrana), onde existem alguns materiais estimulantes e capazes de fazer a diferenciação e incentivar o crescimento deste novo tecido cartilaginoso (MURPHY *et al.*, 2013).

A Tabela 1 mostra o módulo de elasticidade do tecido da cartilagem hialina humano femoral.

Tabela 1: Módulo de elasticidade do tecido da cartilagem hialina e cartilagem articular bovina.

<b>Material do tecido</b>	<b><math>E_t</math> [GPa]</b>
Cartilagem hialina femoral humana	0,5
Cartilagem articular bovina	0,9

Fonte: JANČÁŘ *et al.* (2007), adaptado pelo Autor.

### 3.2 BIOMATERIAIS PARA REGENERAÇÃO DE TECIDO CARTILAGINOSO

Biomateriais têm sido definidos de diversas maneiras ao longo do tempo. Um biomaterial é uma substância ou uma combinação de substâncias unidas para

promover interações com sistemas biológicos, visando tratar, aumentar ou até mesmo substituir quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo (PARIDA; BEHERA; CHANDRA MISHRA, 2012).

Os biomateriais ainda devem satisfazer alguns requisitos, destacando-se: serem biocompatíveis, terem propriedades mecânicas adequadas e com formatos pretendidos, além de permitir o crescimento e a proliferação celular (GÓMEZ *et al.*, 2016). Eles também podem ser classificados como: (I) bioinertes, quando este biomaterial tem pouca interação junto aos tecidos circundantes; (II) bioreabsorvíveis, quando este biomaterial é absorvido ou dissolvido ao entrar em contato com o tecido; (III) bioativos, quando ao ser implantado provoca uma reação biológica específica na interface do biomaterial, resultando na formação de uma ligação entre o material e o tecido; e (IV) biotoleráveis, que provocam uma reação inflamatória local, que é aceita pelo organismo que o isola, com uma camada de tecido conjuntivo em uma espécie de cápsula (ZHAO *et al.*, 2011; TEIXEIRA; COSTA, 2013).

Todas as classes de materiais podem ser utilizadas como biomateriais (metais, cerâmicas, polímeros ou a combinação deles formando compósitos), desde que atendam os pré-requisitos citados (WILLIAMS, 2009).

Os metais, devido às suas propriedades mecânicas, normalmente são utilizados na substituição de tecidos duros, tais como: articulações de quadril, raízes de dentes e placas ósseas. Eles são utilizados geralmente na forma de ligas metálicas, como o aço inoxidável, ligas de cobalto e de titânio. A desvantagem é na existência de efeitos tóxicos dos elementos como níquel, cromo e cobalto (OKAZAKI; GOTOH, 2005).

As cerâmicas são caracterizadas pela dureza, resistência à corrosão, desgaste e rigidez. As cerâmicas podem ser inertes, quando não são absorvidas pelo corpo (alumina e zircônia), bioativas ou com a superfície reativa (vidros, vitrocerâmicas, hidroxiapatita, biocimentos), bioabsorvíveis e biodegradáveis (aluminatos e fosfatos de cálcio). Normalmente, o uso das biocerâmicas é direcionado quando se faz necessário uma elevada resistência mecânica à compressão (SIQUEIRA; ZANOTTO, 2011; PARIDA; BEHERA; CHANDRA MISHRA, 2012).

Os polímeros, por sua vez, podem ser naturais ou sintéticos. Eles formam a classe com maior diversidade de biomateriais. Eles também apresentam uma maior diversidade e processabilidade quando comparados aos metais e às cerâmicas, o que

permite uma maior potencialidade e propriedades, conferindo mais possibilidades aos materiais para diversas aplicações (KOHANE; LANGER, 2008).

Para ampliar as possibilidades de utilização dos biomateriais, pode-se unir as classes combinando características de biocompatibilidade, bioatividade, propriedades mecânicas, entre outras. Esta união, chamada de compósitos, gera um aumento de biomateriais úteis para a engenharia tecidual. Um exemplo seria a incorporação de cerâmicas junto a matrizes poliméricas, gerando compósitos com propriedades melhores do que as dos materiais sozinhos (ORÉFICE; HENCH; BRENNAN, 2000).

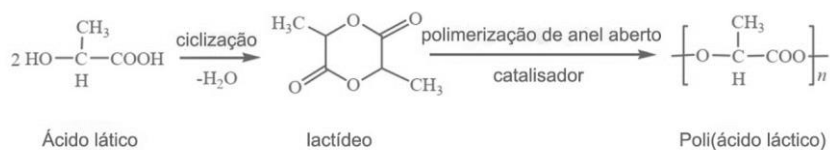
Ainda, os biomateriais podem ser em escala nanométrica. Estes materiais nanoestruturados constituem uma alternativa aos macroestruturados ou microestruturados, pois podem possuir propriedades superiores, já que dimensões reduzidas à escala nanométrica promovem uma maior interação entre os componentes devido as altas áreas superficiais (OMANOVI *et al.*, 2019).

### 3.2.1 Poli (ácido láctico) PLA

O poli (ácido láctico) – PLA é um material de grande interesse na área científica, por ser um polímero biodegradável e bioabsorvível, e pela sua grande utilização na área biomédica.

O PLA pode também ser sintetizado por polimerização por abertura de anel (ROP), conforme mostra a Figura 3, um método importante e eficaz para fabricar PLA de alto peso molecular. Porém, esta reação requer uma pureza maior do monômero do lactídeo, obtido por dimerização do monômero de ácido láctico. A partir de um catalisador, o PLA é obtido com o monômero sob vácuo ou uma atmosfera inerte. Ao controlar o tempo de residência e as temperaturas em combinação com o tipo de catalisador e concentração, é possível controlar a proporção e a sequência de D- e L-ácido láctico (LA), unidades no polímero final.

Figura 3: Polimerização do PLA por abertura de anel.

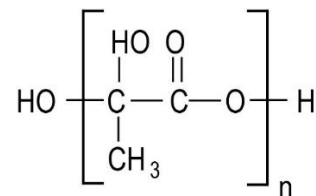


Fonte: (XIAO *et al.*, 2006)

O PLA é um poliéster alifático linear e com temperatura de transição vítrea entre 50 e 80 °C e temperatura de fusão entre 130 e 180 °C. Pode ser produzido a partir de fontes renováveis como: milho, trigo, beterraba e cana de açúcar. O monômero do PLA é o ácido láctico, que é produzido a partir de diversas fontes naturais (etileno, etanol, acetaldeído ou acetileno), sendo a principal fonte a fermentação de carboidratos. O ácido láctico é uma molécula orgânica que apresenta dois grupos funcionais: álcool e ácido carboxílico (MORAIS *et al.*, 2017).

A Figura 4 apresenta a estrutura química do Poli (ácido láctico) - PLA. Devido a sua ótima processabilidade térmica, o PLA pode ser processado por fundição, extrusão, sopro e fiação de fibras o que faz aumentar as suas vantagens em comparação com outros biomateriais poliméricos tais como poli(etileno glicol) (PEG), poli(hidroxiálcanoatos) (PHAs), e poli(caprolactona) (PCL) (RHIM *et al.*, 2006). As propriedades mecânicas são comparáveis com as dos polímeros provenientes de fontes fósseis, especialmente, elevado módulo de elasticidade, rigidez, transparência, e comportamento termoplástico, permitem que ele seja um forte candidato a substituir polímeros usados hoje na indústria de fabricação de embalagens e fios têxtil.

Figura 4: Estrutura química do Poli (ácido láctico) - PLA.



Fonte: SOUZA; MELO; ARAUJO (2012)

Porém, seu alto custo ainda limita a sua utilização para aplicações mais nobres (BURCZAK; GAMIAN; KOCHMAN, 1996).

Para a obtenção do PLA, dois métodos sintéticos são utilizados: Policondensação direta (incluindo policondensação de solução e policondensação de fusão) e polimerização de abertura de anel (RP).

Na policondensação em solução é adicionado um solvente orgânico capaz de dissolver o PLA. Tal solvente não interfere na reação e a mistura é submetida a um refluxo com remoção da água gerada no processo de policondensação; este método é bastante viável para alcançar um alto peso molecular (OHTA; OBUCHI; YOSHIDA, 1995).

Ao contrário da policondensação em solução, a policondensação por fusão de monômeros pode acontecer sem a necessidade de qualquer solvente orgânico, mas para que isso ocorra a temperatura da reação deve estar e permanecer acima da temperatura de fusão do polímero (GAO *et al.*, 2002; PEREIRA; MORALES, 2014).

O PLA é bastante utilizado na área biomédica por ser um produto não tóxico e nem cancerígeno para o corpo humano, e por atender as propriedades mecânicas necessárias para aplicação. As aplicações clínicas atuais envolvem suturas reabsorvíveis, parafusos ortopédicos, hastes/pinos e placas (AVÉROUS, 2004; ZHU; JI; SHEN, 2002; SAINI; ARORA; KUMAR, 2016). O PLA tem sido bastante utilizado também em sistemas carreadores (nanopartículas, micropartículas e microcápsulas) para a liberação controlada de material genético (DNA, RNA), peptídeos/proteínas, polissacarídeos e diversos tipos de drogas (MAKADIA; SIEGEL, 2011; MANAVITEHRANI *et al.*, 2016). Ainda na área médica, materiais à base de PLA também têm sido amplamente utilizados para fabricar *scaffolds* para aplicações ortopédicas, nervosas e cardiovasculares (SUBRAMANIAN; KRISHNAN; SETHURAMAN, 2009; SAVIOLI LOPES; JARDINI; MACIEL FILHO, 2012) e como implantes para reconstruções ósseas (GRANCIANINOV *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2021).

Como cada polímero possui distintas propriedades (biodegradáveis e não biodegradáveis) estes podem ser combinados por mistura com PLA, ou mesmo novas propriedades podem surgir nos compósitos, devido às interações entre os componentes. Materiais biodegradáveis misturados com PLA incluem poli(etilenoglicol) (PEG), poli(L-hidroxiacetato) (PHA), poli(L-hidroxiaceto) (PLA), poli(L-lactato) (PLLA), poli(D,L-lactato) (PDLLA), poli(ε-caprolactona) (PCL), poli(butileno adipato-cotereftalato) (PBAT), quitosana e amido (SHETH; KUMAR; DAVE, 2008).

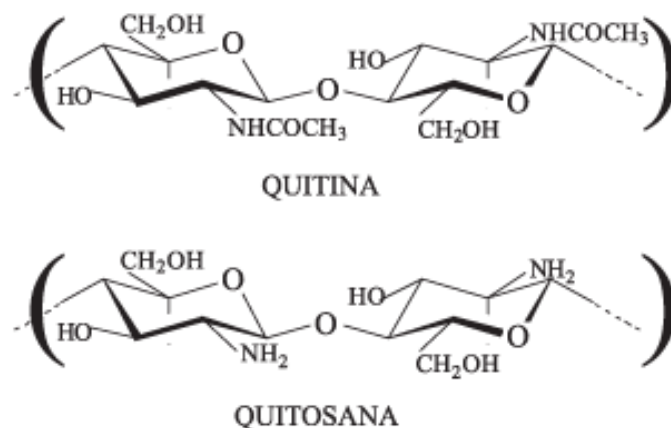
Por fim vale salientar que a degradação do PLA resulta em ácido láctico, que é fisiologicamente produzido pelo organismo e eliminado pelas vias metabólicas naturais (LANAO *et al.*, 2013). Mais especificamente, no corpo humano ocorre o rompimento de cadeia em oligômeros e finalmente em unidades monoméricas de ácido láctico que são inteiramente reabsorvíveis como um intermediário natural no metabolismo (L - isômero). Contudo, *In vitro* a elevada concentração local dos produtos de degradação pode afetar a diferenciação celular e *in vivo* a dissolução do polímero está frequentemente acompanhada pela fragmentação em pequenas partículas, capazes de provocar uma resposta inflamatória localizada (GARCÍA-

GARETA; COATHUP; BLUNN, 2015). Portanto, esses produtos sempre precisam ser acompanhados.

### 3.2.2 Quitosana

Quitosana é um polímero natural, produzida por meio da desacetilação da quitina, segundo biopolímero mais abundante na natureza, derivado do exoesqueleto de crustáceos. Sua estrutura química é composta por unidades de glucosamina e N-acetilglucosamina, conforme mostra a Figura 5 (EFTEKHARI *et al.*, 2020; FRANK *et al.*, 2020). Como um polímero natural, a quitosana possui propriedades favoráveis em aplicações na engenharia tecidual, além de outras aplicações biomédicas, como na entrega de fármacos. Sua aplicação nesta área está relacionada à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e ausência de toxicidade. Além disso, a quitosana apresenta diferentes propriedades medicinais: antimicrobiana, antioxidante e antitumoral, que aumenta sua importância nas aplicações biomédicas (INANLI *et al.*, 2020). Foi demonstrado que este tipo de substrato é capaz de interagir com células vivas, sem apresentar sinais de citotoxicidade ou desencadear uma resposta imunitária (DO NASCIMENTO; LOMBELLO, 2016).

Figura 5: Estrutura química da quitina e quitosana.



Fonte: ANITHA *et al.* (2014).

A quitosana tem aplicações versáteis na engenharia tecidual, tais como cicatrização de feridas, como excipientes para entrega de drogas e entrega de genes. Eles também oferecem a vantagem de ser facilmente processado em géis,

membranas, nanofibras, nanofibrilas, micropartículas de esferas, nanopartículas, *scaffolds* e formas esponjosas, conforme esquema mostrado por Anitha *et al.* (2014) na Figura 6.

Figura 6: Representação esquemática sobre as possibilidades de processamento da quitosana em diferentes formas.



Fonte: ANITHA *et al.* (2014) modificada pelo autor.

Segundo Rolim *et al.* (2018), para a obtenção da quitosana usa-se uma solução alcalina (por exemplo, solução de NaOH) que remove, simultaneamente, as proteínas e desacetila a quitina. Dependendo da concentração dessa solução alcalina, alguns glicanos solúveis são removidos. O processamento de cascas de crustáceos envolve, principalmente, a remoção de proteínas e a dissolução do carbonato de cálcio, que, em conchas de caranguejo, está presente em concentrações elevadas. Logo após, se faz a desacetilização da quitina restante, podendo ser em hidróxido de

sódio a 40% e 120 °C durante um período de 1 a 3 h. Esse tratamento produz uma quitosana.

Conforme Ahmed *et al.* (2018), atualmente existem muitas membranas produzidas a partir da quitosana. Estudos recentes mostram que cada vez mais ela se torna matéria-prima dentro da engenharia tecidual, sendo utilizada em diversos tipos de aplicações e principalmente para regenerações e reparos de tecidos (SADEGHIANMARYAN *et al.*, 2020). A Tabela 2 mostra as propriedades da quitosana quando derivada de diferentes composições.

Tabela 2: Derivados à base de quitosana e suas importantes propriedades.

<b>Derivação</b>	<b>Propriedades importantes</b>
<b>N-succinil-N-octil de quitosana</b>	A solubilidade e aumentos de taxol exibiu uma liberação sustentada e maior atividade citotóxica contra HepG2, A549, BGC e K562
<b>N-octil-N-trimetil de quitosana</b>	Alta eficiência de encapsulamento, estabilidade satisfatória e carregamento de drogas
<b>N-mPEG-N-octil-O-sulfato de quitosana</b>	A solubilidade do paclitaxel na solução micelar mPEGOSC foi amplamente aumentada
<b>Quitosana-enxerto-poli(etil)enimina</b>	Liberação eficiente de DNA plasmidial
<b>Quitosana-poli-L-arginina e quitosana-poli(etil)enoglicol</b>	Maior viabilidade celular, redução da hemólise dos eritrócitos
<b>Açúcar de quitosana híbridos</b>	Aumento da atividade antimicrobiana
<b>Quitosana galactosilada</b>	Matriz extracelular sintética para fixação de hepatócitos
<b>Quitosana-glutaraldeído</b>	Biocompatível, induz vascularização
<b>Quitosana-enxerto-policaprolactona</b>	Mineralização celular aprimorada e atividade ALP
<b>Carboximetilquitosana imobilizada com fosfatase alcalina</b>	Atividade de ALP celular aprimorada e deposição de cálcio por osteoblastos
<b>Hidroxiapatita ligada a quitosana</b>	Osteocondutividade

Fonte: AHMED *et al.* (2018) modificado pelo autor.

Todavia, a desvantagem dos polímeros naturais é de apresentar baixo peso molecular para obtenção de membranas de quitosana pura, além de instabilidade na elaboração de partículas, fios, fibras e filmes. Por essa razão, é comum a obtenção de compósitos a partir de quitosana, adicionando materiais poliméricos ou cerâmicos (incluindo vidros) às formulações (KOUCHAK *et al.*, 2014).

### 3.2.3 Vidros Bioativos

Os vidros bioativos são vidros que possuem a capacidade de interagir com as células e induzir uma atividade biológica específica humana, o que demonstra o processo de reparo e/ou regeneração tecidual (SANTANA; SANTOS, 2021). O desenvolvimento desses materiais para uso na medicina teve início por volta de 1969, quando o professor Larry Hench e colaboradores, visando o desenvolvimento de materiais que se assemelhassem em composição química ao osso, deram origem a certas formulações vítreas que apresentavam a capacidade de formar uma ligação química com tecidos vivos, especialmente os tecidos duros. A primeira formulação de vidro bioativo foi o 45S5, patenteado como Biovidro®. É um vidro do sistema quaternário  $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$  que exibe notáveis propriedades de interação com os tecidos vivos, estimula a formação de hidroxiapatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$  e a remineralização dos tecidos duros, por meio da reação com os fluídos corporais (SOUZA; PEITL; ZANOTTO, 2015). Surgiu como uma alternativa aos materiais inertes, dando origem ao campo das cerâmicas bioativas, grupo de materiais caracterizado como aqueles que induzem uma resposta biológica específica na sua superfície, resultando na formação de uma ligação entre os tecidos e os materiais implantados (GERHARDT; BOCCACCINI, 2010).

A composição dos vidros bioativos é baseada normalmente em dióxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ) (LAIA; SÁ; PEREIRA, 2020), mas atualmente há uma grande flexibilidade e variações de composição, tais como a adição de  $\text{CaF}_2$ ,  $\text{K}_2\text{O}$ ,  $\text{MgO}$  e  $\text{B}_2\text{O}_3$ . Existem também outros sistemas como vidros boratos e fosfatos que têm demonstrado boas propriedades bioativas. Além disso, muitos trabalhos já demonstram a incorporação de várias concentrações de íons com atividades fisiológicas e propriedades terapêuticas, que podem ser adicionados à formulação geral de um vidro bioativo. Esses íons são liberados durante o processo de dissolução do material e tem a capacidade de executar uma ação terapêutica no corpo humano (BRAUER, 2015). Sabe-se que vários íons inorgânicos, como cálcio, fósforo, silício, estrôncio, zinco, dentre outros, estão envolvidos no metabolismo ósseo e possuem um papel fisiológico na angiogênese e no crescimento e mineralização de tecidos (HOPPE; GÜLDAL; BOCCACCINI, 2011). Em particular, íons metálicos podem agir como cofatores de enzimas, influenciando vias de sinalização e estimulando efeitos metabólicos, que ocorrem durante a formação do tecido, tornando-os atrativos para uso como agentes

terapêuticos no campo da engenharia de tecidos (MOURIN; CATTALINI; BOCCACCINI, 2012).

### 3.2.3.1 Composições de vidros bioativos

#### - Silicatos

Como exemplo de vidros bioativos baseados em silicatos, é possível citar o primeiro vidro bioativo disponibilizado comercialmente. O Bioglass® 45S5 apresenta uma composição aproximada de 45% de SiO<sub>2</sub>, 24,5% de Na<sub>2</sub>O, 24,5% de CaO e 6% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (% em peso). Outro vidro bioativo a base de silicato é o vidro 13-93, que tem composição modificada em relação ao 45S5, possuindo melhores propriedades em relação ao escoamento viscoso e menor tendência à cristalização quando comparado ao vidro 45S5 (SANCHEZ *et al.*, 2010). A Tabela 3 a seguir mostra uma comparação da composição entre os dois (BROWN *et al.*, 2008).

Tabela 3: Composição nominal (mol %) dos testes dos vidros bioativos.

Vidro	Na <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> O	MgO	CaO	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	SiO <sub>2</sub>
13-93	6	7,9	7,7	22,1	1,7	54,6
45S5	24,3	-	-	26,9	2,5	46,3

Fonte BROWN *et al.* (2008).

Atualmente, busca-se cada vez mais composições vítreas que comportem processos de aquecimento/resfriamento, sem que isto leve à cristalização descontrolada dos vidros bioativos (SOUZA; PEITL; ZANOTTO, 2015).

Um outro vidro bioativo desenvolvido mais recentemente é o F18. O F18 é pertencente do sistema SiO<sub>2</sub>-Na<sub>2</sub>O-K<sub>2</sub>O-MgO-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> desenvolvido no Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) da Universidade Federal de São Carlos. Pode ser trabalhado de formas diferentes (fibras, blocos, *scaffolds*, por exemplo) para auxiliar tratamentos de processos de infecção dentro da medicina. O F18 em manta ou em pó apresentou uma atividade bactericida bastante elevada. A eliminação de microrganismos foi muito próxima de 100% (CAMPANINI; SOUZA; FILHO, 2015).

### - Boratos

Alguns vidros boratos, devido a sua baixa durabilidade química, se degradam mais rapidamente e, por isso, convertem-se mais facilmente em hidroxiapatita (RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2019). Em 1997, Brink experimentou pela primeira vez um vidro composto com boro em aplicações médicas. Com o intuito de aumentar a manufatura sem perder a bioatividade, ele adicionou boro em vidros de silicatos (PORTES; SATO; PEDROCHI, 2018). Um exemplo de um borato é o 13-93B2 com composição 6Na<sub>2</sub>O-20CaO-12K<sub>2</sub>O-5MgO-53B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-4P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (em mol%); este vidro bioativo fabricado pelo método *Polymer foam replication* (Replicação de espuma de polímero), é um dos mais promissores materiais utilizados na fabricação de *scaffolds* tipo espuma (KAUR *et al.*, 2013).

Vidros bioativos a base de boro tem se mostrado bons biomateriais no suporte da diferenciação e proliferação celular *in vitro*. Porém, a grande preocupação em relação aos boratos é a toxicidade (RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2019).

Balakrishnan, Joshi e Banerjee (2013) criaram um hidrogel para a regeneração de cartilagem, usando um derivado dialdeído com vidro bioativo a base de boro. Este composto demonstrou uma adequada integração no local do defeito da cartilagem e com força de ruptura suficiente para suportar a pressão exercida sobre a cartilagem. Condrócitos aglomerados foram encontrados migrando através do *scaffold* e mantendo a expressão gênica. Isto demonstrou que este simples sistema de hidrogel inspirado na natureza tem o potencial para muitas aplicações na área de engenharia tecidual.

### - Fosfatos

Vidros bioativos a base de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> também estão sendo largamente estudados para aplicações de reparo na engenharia tecidual, já que seus componentes principais (fósforo, cálcio e sódio) estão presentes na porção inorgânica do tecidos e, por isso, possui uma grande afinidade com o mesmo (TALLIA *et al.*, 2018).

Existem muitos tipos de fosfatos de cálcio que podem ser obtidos por muitos métodos e técnicas de sínteses diferentes. Wu *et al.* (2019), em um estudo recente, desenvolveram um *scaffold* de vidro bioativo a base de β-tricálcio fosfato carregado de condócitos/osteoblastos (β-TCP) e um *scaffold* biocerâmico de β-TCP carregado de condócitos, visando melhorias no tratamento de defeitos da cartilagem articular. Os *scaffolds* apresentaram: (i) boa capacidade de regeneração da cartilagem; (ii)

ampla disponibilidade de células da medula óssea; (iii) ausência de formação de defeitos na área doadora em pacientes; e (iv) menor possível perda de sangue e infecção. Assim sendo, os *scaffolds* de vidros bioativos carregados com condrócitos/osteoblastos podem ser potencialmente usados para tratar defeitos da cartilagem e podem beneficiar pacientes com necessidade de reparo da cartilagem.

### 3.2.3.2 Vidro bioativo do sistema LZS

Novas estratégias no desenvolvimento de vidros bioativos representam uma promissora base de biomaterial para induzir a regeneração de tecidos desejáveis. O vidro do sistema LZS ( $\text{Li}_2\text{O-ZrO}_2\text{-SiO}_2$ ) apresenta uma série de interessantes propriedades técnicas, tais como elevada resistência mecânica, elevada dureza na superfície, elevada resistência à abrasão e química, boa resistência ao choque térmico, entre outras que podem variar dependendo da composição química e das condições de tratamentos térmicos empregados, transformando-se em um vitrocerâmico com propriedades igualmente interessantes (ARCARO, 2016).

Oliveira (1997) investigou amplamente esse sistema ternário, variando teor de  $\text{ZrO}_2$  de 0 a 13,04% molar para vidros de relação molar  $\text{SiO}_2/\text{Li}_2\text{O}$  de 70/30 a 78/22. Oliveira, após experimentar várias adições de  $\text{ZrO}_2$  a um vidro do sistema  $\text{Li}_2\text{O-SiO}_2$  chegou à conclusão de que o limite máximo de solubilidade permitida para este óxido neste sistema seria de 11,10%, para que não ocorresse a cristalização no precursor vitrocerâmico (vidro) após solidificação ao ar. Algumas características foram observadas quando adicionado a  $\text{ZrO}_2$ . Dentre elas pode-se destacar uma melhora na durabilidade química e propriedades físicas, além de uma redução no coeficiente de expansão térmica do vidro, aumento de dureza e densidade, e quando tratado termicamente houve uma forte tendência à cristalização. Este vitrocerâmico apresenta temperatura de transição vítrea em torno de 600 °C e cristalização em torno de 860 °C das fases silicato de zircônio e dissilicato de lítio, que são responsáveis pelas boas propriedades desse material. A cristalização dessas fases no sistema investigado ocorre sem a adição de qualquer agente nucleante.

Este material teve suas propriedades ainda mais estudadas e compreendidas nos trabalhos de Teixeira, Oliveira e Boehs (2012) e Arcaro (2016). Além disso, muito recentemente sua bioatividade foi avaliada e comprovada. Nestes materiais, a presença do lítio como íon bioativo favorece a ação do material em nível celular,

acelerando o processo de deposição da hidroxiapatita (POSSOLLI *et al.*, 2021). Possolli *et al.* (2021) investigaram a bioatividade, a citotoxicidade e a dissolução do LZS e concluíram que os vidros e as vitrocerâmicas bioativas deste sistema não apresentaram citotoxicidade. Assim sendo, este material se torna bastante atrativo dentro da medicina e pode ser muito promissor dentro da engenharia tecidual.

#### 3.2.4 Scaffolds

Conforme citado anteriormente, um tecido necessita de células e de uma matriz para que possa se desenvolver. Os *scaffolds* funcionam como matriz para a restauração de um tecido danificado ou formação de um novo tecido, seja funcionando como base para o crescimento celular ou como veículo para a entrega de substâncias biologicamente ativas (MORENO MADRID *et al.*, 2019).

Dentro da engenharia tecidual, os *scaffolds* consistem em estruturas tridimensionais altamente porosas com estrutura similar ao tecido que se deseja mimetizar (DENG; KUIPER, 2018). Para que apresente um alto desempenho, é importante que o *scaffold* possua uma macro porosidade interconectada, permitindo o crescimento tecidual ao longo de toda sua estrutura e o transporte de nutrientes, além de uma estrutura microporosa, permitindo a adesão proteica, adesão celular e auxiliando na homeostase (ROSETI *et al.*, 2017a).

Com a falta de tratamentos eficientes para defeitos condrais, a engenharia tecidual tem estimulado pesquisas para a formação de tecidos de cartilagem, combinando *scaffolds* porosos, biocompatíveis com células-tronco na presença de estímulos externos ou internos (KARABIYIK ACAR *et al.*, 2021). Por tanto, um *scaffold* deve comportar algumas características para ser considerado dentro da engenharia tecidual; dentre estes requisitos estão porosidade, maleabilidade, molhabilidade, biocompatibilidade, ser capaz de induzir o crescimento celular e diferenciação celular. Sendo primordial então para a formação de uma matriz na recuperação de uma cartilagem, os *scaffolds* de engenharia tecidual ideais devem ser capazes de simular o ambiente natural da matriz extracelular, ser biocompatíveis para promover interações celulares, e ter propriedades mecânicas apropriados para suportar as forças externas durante a regeneração do tecido (ROSETI *et al.*, 2017b). Portanto, estes *scaffolds* devem fornecer soluções promissoras que aumentam a cicatrização e diminuem a necessidade de procedimentos cirúrgicos complicados (CHENG *et al.*,

2019). Uma outra característica é que a estrutura do *scaffold*, além de fornecer sustentação mecânica e orientação espacial para o crescimento e a diferenciação celular, deve permitir o transporte de nutrientes, metabólitos, fatores de crescimento e outras moléculas regulatórias importantes para as células e para a matriz extracelular (CRUZ *et al.*, 2017).

Assim, cada vez mais pesquisas empregando compostos bioativos, que modificam as características dos materiais, estão sendo feitas visando a obtenção de *scaffolds* com porosidade e tamanho de poros ideais para regeneração e crescimento celular (MASSIMINO, 2020). O tamanho ideal dos poros podem variar entre 50 a 300  $\mu\text{m}$ , dependendo do tipo da membrana (WANG *et al.*, 2017; MALLICK *et al.*, 2018).

Quando os *scaffolds* são produzidos com espessuras muito pequenas, eles podem ser chamados simplesmente de membranas. Membranas com bons resultados têm usado como base polímero e cerâmica em sua composição.

Em um estudo recente, Huang *et al.* (2018) mostraram que ao incorporar cerâmicas de hidroxiapatita e fosfato  $\beta$ -tricálcio junto a um polímero de poli- $\epsilon$ -caprolactona, as membranas fabricadas apresentaram superfícies mais lisas, melhoraram as propriedades mecânicas e também a proliferação celular, quando comparadas às membranas apenas com polímero.

A aplicação de membranas polímero/cerâmica é especialmente interessante na engenharia tecidual óssea e cartilaginosa, onde esses são utilizados como uma estrutura tridimensional para promover o reparo de defeitos, atuando como suporte para crescimento, proliferação e diferenciação celular (REZWAN *et al.*, 2006; HOLZAPFEL *et al.*, 2013; XIAO *et al.*, 2015; WANG; LIN; KANG, 2019).

Acredita-se ainda que membranas com esse tipo de estrutura possa auxiliar na adesão de proteínas e células, devido à interconectividade dos poros existentes, auxiliando também na formação do novo tecido. Além disso, sua porosidade e sua maior área superficial também pode permitir a incorporação de agentes antibacterianos (nanopartículas de prata) e/ou medicamentos (antibióticos e anti-inflamatórios) visando à liberação local na região do defeito, atuando dessa forma na erradicação da infecção e na reparação e recuperação do tecido (KUNDU *et al.*, 2010; DORJ *et al.*, 2014; TROMBETTA *et al.*, 2017; DANG *et al.*, 2019).

Atualmente, existem diversas técnicas convencionais bem consolidadas para obtenção de *scaffolds* e membranas, tais como eletrofiação, liofilização, impressão 3D, entre outras (WANG *et al.*, 2017; MALLICK *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2021).

### 3.3 ELETROFIAÇÃO (*ELECTROSPINNING*)

Formar fibras sintéticas por meio de atração eletrostática é um processo utilizado há mais de 100 anos. Este procedimento, reconhecido como eletrofiação ou *electrospinning* em inglês, utiliza uma fonte de alta tensão para obter carga de uma certa polaridade em uma solução de polímero ou de uma mistura, que é então acelerado em direção a um coletor de polaridade oposta (KLEIVAITE; MILAŠIUS, 2018).

Embora tenha sido patenteado por Cooley no início do século passado, no ano de 1902, a produção prática em escala nanométrica de fibras por meio da eletrofiação foi se popularizar por volta de 1995, quando Doshi e Reneker redescobriram a técnica (DOSHI; RENEKER, 1995). A princípio, este longo período de estagnação parece estranho, porém a falta de utilização desta técnica se deu por falta de melhores aparelhos para a caracterização das fibras em escalas reduzidas (XUE *et al.*, 2019).

Em suma, um aparelho de eletrofiação é composto por quatro componentes principais: uma fonte de alta tensão, um coletor metálico - onde serão depositadas as fibras a serem coletadas, um depósito contendo o material a ser eletrofiado e um tubo capilar, que normalmente é utilizado uma agulha hipodérmica (MERCANTE *et al.*, 2017).

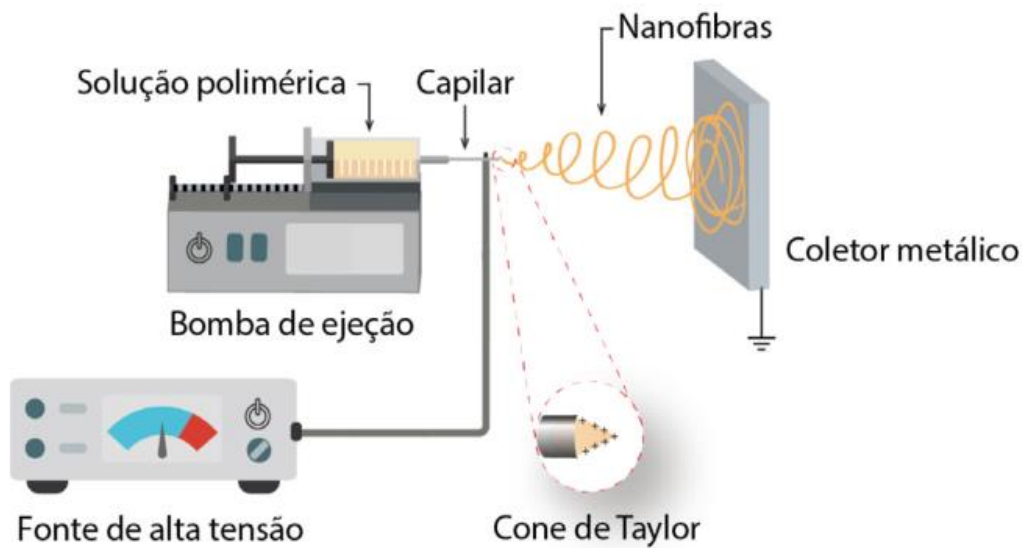
O processo inicia quando a solução contida dentro do reservatório é pressionada (a pressão é realizada pela própria máquina e pode ser controlada) e ao passar pelo capilar o material se mantém na ponta da agulha, formando uma gota que permanece ali por uma força de tensão superficial (ALVES; BERGMANN, 2008; MERCANTE *et al.*, 2021). Na sequência, um campo elétrico é aplicado (que pode variar entre 5 a 50 kV) e ao atingir um valor crítico, estas forças elétricas repulsivas superam a tensão superficial, estas gotas se transformam em fios muito finos, geralmente em formatos cônicos que são conhecidas como cone de Taylor (COSTA *et al.*, 2012; XUE *et al.*, 2017, 2019). A partir disso, são atraídos para o coletor e ao percorrerem este caminho sofrem a evaporação de solventes e a solidificação das nano fibras eletrofiadas, as quais são depositadas no coletor aterrado, sob a forma de membrana (PATEL *et al.*, 2020; MERCANTE *et al.*, 2021), conforme esquematizada na Figura 7.

Em tese, o sistema de eletrofiação pode ser dividido em quatro etapas subsequentes: (I) formação da gota na ponta do capilar e início da formação do cone

de Taylor; (II) projeção do jato carregado em uma linha reta na direção do coletor; (III) afinamento do fio disparado pelo jato na presença do campo elétrico e um aumento de instabilidade elétrica; e (IV) solidificação da fibra no coletor já em forma de membrana (LU; WANG; WEI, 2009; LEMOS, 2017).

Contudo, apesar de parecer simples, o sistema de eletrofiação deve levar em conta alguns parâmetros que influenciam, tais como: parâmetros de solução, parâmetros de processo e parâmetros ambientais, conforme apresentado na Tabela 4. O controle destes parâmetros permite ajustar características das membranas formadas, como: a morfologia, o diâmetro ou espessura e também o alinhamento das fibras, estes reguladores são de extrema importância para a formação das membranas e para as áreas que serão aplicadas (MERCANTE *et al.*, 2021).

Figura 7: Esquema convencional de um aparelho de eletrofiação.



Fonte: MERCANTE *et al.* (2021).

Tabela 4: Parâmetros do processo de eletrofiação.

<b>Parâmetros de solução</b>	Massa molecular	A massa molecular do polímero está diretamente relacionada com o comportamento reológico da solução. O aumento da massa molecular tende a favorecer a formação de fibras mais homogêneas.
	Concentração/ Viscosidade	Observa-se uma tendência de formação de fibras mais espessas com o aumento da concentração/viscosidade da solução.
	Condutividade	O aumento da condutividade tende a favorecer a obtenção de fibras com menores diâmetros e sem defeitos.
<b>Parâmetros de processo</b>	Voltagem aplicada	Geralmente, o aumento da voltagem favorece a formação de fibras com menores diâmetros. No entanto, a partir de certo ponto o aumento da voltagem pode estar relacionado com a formação de fibras mais espessas e com defeitos.
	Vazão da solução	O aumento da vazão favorece a formação de fibras com maiores diâmetros e defeitos.
	Distância de trabalho	Deve apresentar valor adequado para garantir o alongamento do jato e evaporação do solvente. Maiores distâncias favorecem a formação de fibras com menores diâmetros.
<b>Parâmetros ambientais</b>	Temperatura	A temperatura afeta a viscosidade da solução e o processo de evaporação do solvente. Temperaturas mais elevadas favorecem a formação de fibras com menores diâmetros.
	Umidade relativa	Afeta o processo de evaporação do solvente. Uma maior umidade relativa tende a induzir a formação de poros na superfície das fibras.

Fonte: MERCANTE *et al.* (2021) modificada pelo autor.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

Neste trabalho, membranas de PLA, quitosana e LZS foram produzidas. Os materiais utilizados são descritos nas sessões 4.1.1, 4.1.2 e 4.1.3.

#### 4.1.1 Polímero sintético: Poli(ácido Lático) PLA

Os pellets do poliácido lático (PLA) utilizados foram obtidos da empresa National 3D. O PLA foi caracterizado quanto a sua estrutura química e propriedades térmicas, por meio de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) por reflexão total atenuada (ATR) e por análise térmica diferencial (ATD) e termogravimétrica.

Para identificar e confirmar a presença de grupos funcionais específicos no polímero PLA, bem como verificar a pureza do produto utilizado, foi usado espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) com acessório de refletância total atenuada (ATR-FTIR, Tensor II modelo, Bruker).

A fim de se determinar a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) do PLA como fornecido, a pureza, e a estabilidade, análises de ATD/TG foram realizadas em equipamento analisador simultâneo de ATD e TG (SDT-Q600, TA instruments). Pellets de PLA foram submetidos a um aquecimento de até 1100 °C a uma taxa de 10 °C/min em atmosfera de ar sintético.

#### 4.1.2 Polímero natural: Quitosana

Quitosana de médio peso molecular com grau de desacetilização de 90% (Êxodo Científica, Brasil) foi utilizada. O grau de desacetilação utilizado foi sugerido por Mallick *et al.* (2018). A quitosana foi caracterizada quanto a sua estrutura química e propriedades térmicas por meio de FTIR – ATR e por análise térmica ATD/TG.

Para identificar e confirmar a presença de grupos funcionais específicos da quitosana, bem como verificar a pureza do produto utilizado, foi usado espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) com acessório de refletância total atenuada (ATR-FTIR, Tensor II modelo, Bruker).

A decomposição térmica da quitosana foi acompanhada por ATD/TG; foram realizadas em equipamento analisador simultâneo de ATD e TG (SDT-Q600, TA instruments).

#### 4.1.2 Vidro bioativo do sistema LZS

O vidro bioativo do sistema  $\text{Li}_2\text{O-ZrO}_2\text{-SiO}_2$  (LZS) utilizado foi produzido em um trabalho anterior (ARCARO, 2016), baseado nos estudos de Oliveira (1997), por meio de fusão das matérias-primas a 1550 °C durante 4 h e resfriado em água para formar fritas. Posteriormente, as fritas foram moídas até que obtivessem um tamanho  $d_{50}$  de 3,5  $\mu\text{m}$  e área superficial específica de 2,5  $\text{m}^2/\text{g}$ . A análise química do vidro bioativo utilizado é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5: Composição química dos biovidros do sistema LZS.

Óxidos constituintes	Quantidade (%)
$\text{Al}_2\text{O}_3$	0,95
$\text{CaO}$	0,05
$\text{Fe}_2\text{O}_3$	0,05
$\text{Li}_2\text{O}$	8,63
$\text{Na}_2\text{O}$	0,05
$\text{SiO}_2$	68,02
$\text{TiO}_2$	0,05
$\text{ZrO}_2$	22,2
<b>Total</b>	<b>100,00</b>

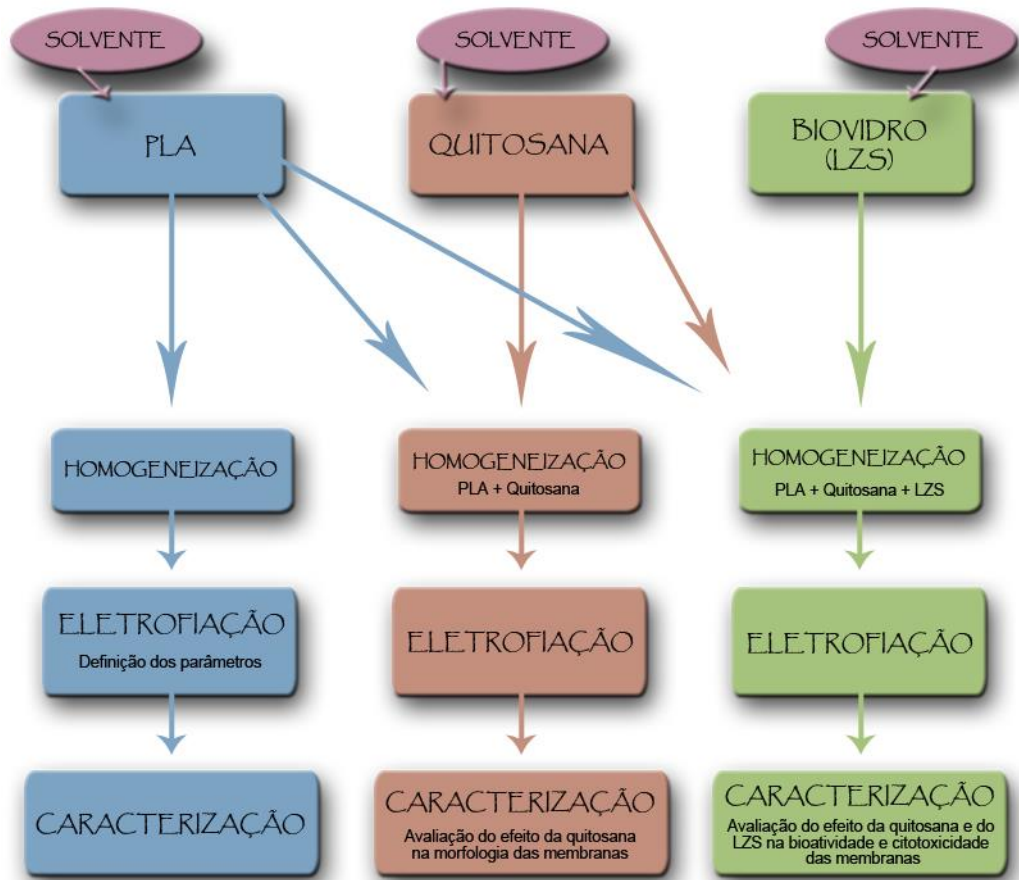
Fonte: ARCARO, (2016) modificado pelo autor.

Para fins de comparação, o LZS também foi caracterizado quanto a sua estrutura química por FTIR – ATR e por ATD/TG, no mesmo equipamento e condições de análise que o PLA e a quitosana.

## 4.2 MÉTODOS

Esta sessão apresenta os métodos utilizados neste trabalho. O fluxograma apresentado na Figura 8 ilustra as etapas envolvidas para preparação das membranas. Cada etapa será descrita posteriormente.

Figura 8: Fluxograma do desenvolvimento do trabalho.



Fonte: Autor, 2023

## 4.2.1 Preparo das soluções para eletrofiação

### 4.2.1.1 Preparo das soluções de PLA

Inicialmente, foi preparada uma solução 10% (m/v) de PLA. Neste caso, 3,0 g de PLA em um Erlenmeyer contendo 30 mL de clorofórmio (Synth, Brasil). A homogeneização foi realizada em um agitador magnético (Fisotam 753 A) sob a temperatura ambiente e velocidade de 300 rpm. O conjunto foi mantido sob agitação constante por 24 h.

### 4.2.1.2 Preparo das soluções de quitosana

Para a obtenção da solução de quitosana, foi preparada uma solução de quitosana a 2% (m/v) dissolvendo-se 2 g de quitosana em 100 mL de Ácido acético (Fmaia São Paulo, Brasil). O ácido acético foi selecionado devido ser o solvente que

dissolve a quitosana e apresenta menor nocividade (GENG; KWON; JANG, 2005). A homogeneização foi realizada em um agitador magnético (Fisotam 753 A) sob a temperatura ambiente e velocidade de 300 rpm. O conjunto foi mantido sob agitação constante por 24 h. A metodologia de preparação da solução foi baseada em Sambudi et al. (2015).

#### 4.2.1.3 Preparo das soluções de PLA e quitosana

As soluções de PLA e quitosana previamente preparadas foram homogeneizadas em diferentes concentrações de acordo com a Tabela 6. Cada solução foi homogeneizada em agitador magnético em 300 rpm por aproximadamente 30 min e logo após foi eletrofiada.

Tabela 6: Quantidades de cada componente das soluções para fabricação das membranas

Solução	Solução PLA (mL)	Solução Quitosana (mL)	Volume total solução (mL)	Quitosana solução (% v/v)	Quitosan (% massa)	PLA (% massa)
PLA/Q1	20	0,2	20,02	0,999 (~1%)	0,004	2
PLA/Q9	20	2	22	9,09	0,04	2
PLA/Q17	20	4	24	16,67	0,08	2
PLA/Q23	20	6	26	23,07	0,12	2
PLA/Q28	20	8	28	28,57	0,16	2

Fonte: Autor, 2023

#### 4.2.1.4 Preparo das soluções de PLA e quitosana com adição de vidro bioativo

Para a obtenção das suspensões contendo PLA, quitosana e LZS, foram dispersos separadamente 0,05 g e 0,1 g de vidro bioativo LZS em 4 mL de clorofórmio e agitada por 30 min.

Posteriormente, foi misturada à solução de PLA, esta segunda etapa também foi agitada por 30 min; por último, a solução já contendo PLA e LZS foi misturada com a solução de quitosana e mais uma vez agitada por 30 min. As quantidades de vidro

bioativo foram selecionadas com base no trabalho de Kandelousi *et al.* (2019). A adição de 4 mL referente ao LZS, foram descontados da solução de PLA, ou seja, não houve alteração na quantidade final em termos de volume da solução.

Tabela 7: Quantidades de cada componente das soluções para fabricação das membranas com LZS

Solução	Solução PLA (mL)	Solução Quitosana (mL)	Volume total solução (mL)	Quitosana solução (% v/v)	LZS (g)	Quitosana (% massa)	PLA (% massa)
PLA/Q17/LZS0,5	20	4	24	16,67	0,05	0,08	1,6
PLA/Q17/LZS1	20	4	24	16,67	0,1	0,08	1,6

Fonte: Autor, 2023

#### 4.2.2 Influência das variáveis do processo de eletrofiação na obtenção de membranas

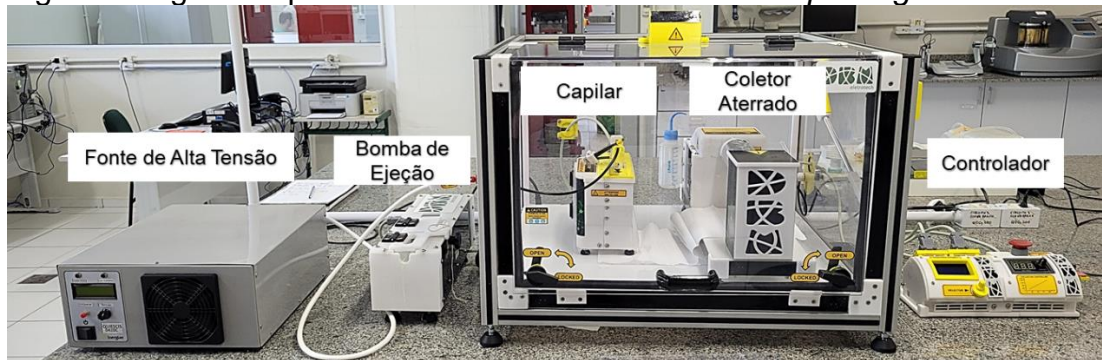
Após agitação, cada solução (PLA puro, e as composições de PLA e quitosana, e as de PLA, quitosana e LZS) foram colocadas numa seringa de plástico de 5 mL bico *luer slip* com uma agulha metálica de 25x0,7 mm (Descarpack, Brasil) e foram submetidas ao processo de eletrofiação. O sistema de eletrofiação é constituído basicamente em duas partes, que sofrem entre si uma diferença de potencial. Desta maneira, um lado libera o material que está inserido dentro da seringa em forma de fio muito fino, enquanto o outro lado recebe e enrola estes fios. O sistema de formação de jato consiste, conforme mostra a Figura 9, em uma bomba de infusão composta por uma seringa que, ligada a uma fonte de alta tensão formando o lado positivo do aparato, do outro lado o coletor que acoplado a um eletrodo negativo, funciona como terra puxando estes fios em sua direção e armazenando em um cilindro que rotaciona a partir da rotação de um motor.

Através da agulha, gotas das soluções contendo PLA, PLA e quitosana ou PLA, quitosana e LZS fluíram em direção ao coletor. Durante o processo, o tubo capilar permaneceu conectado à fonte de alta tensão.

A eletrofiação pode ser usada sob combinações de três diferentes parâmetros: o primeiro é a distância entre a ponta da agulha da seringa e o coletor

que pode ser de (10-20 cm). O segundo é a tensão da fonte (até 20 kV) e o terceiro parâmetro é o fluxo da bomba de infusão que poderia variar entre (0,1- 1 mL/h).

Figura 9: Figura esquemática de um sistema de *electrospinning*.



Fonte: Autor, 2023

#### 4.2.2.1 Eletrofiação de quitosana pura

Este trabalho avaliou inicialmente a eletrofiação da quitosana pura. Neste sentido, quitosana dissolvida em ácido acético foi utilizada, mas não houve formação de fibras. Todas as variações de distância entre eletrodos, tensão e rotação foram utilizadas, mas sem sucesso. Diferentes concentrações de soluções também foram testadas, mas não foi possível obter fibras. Houve apenas a formação de gotas coalescidas de quitosana.

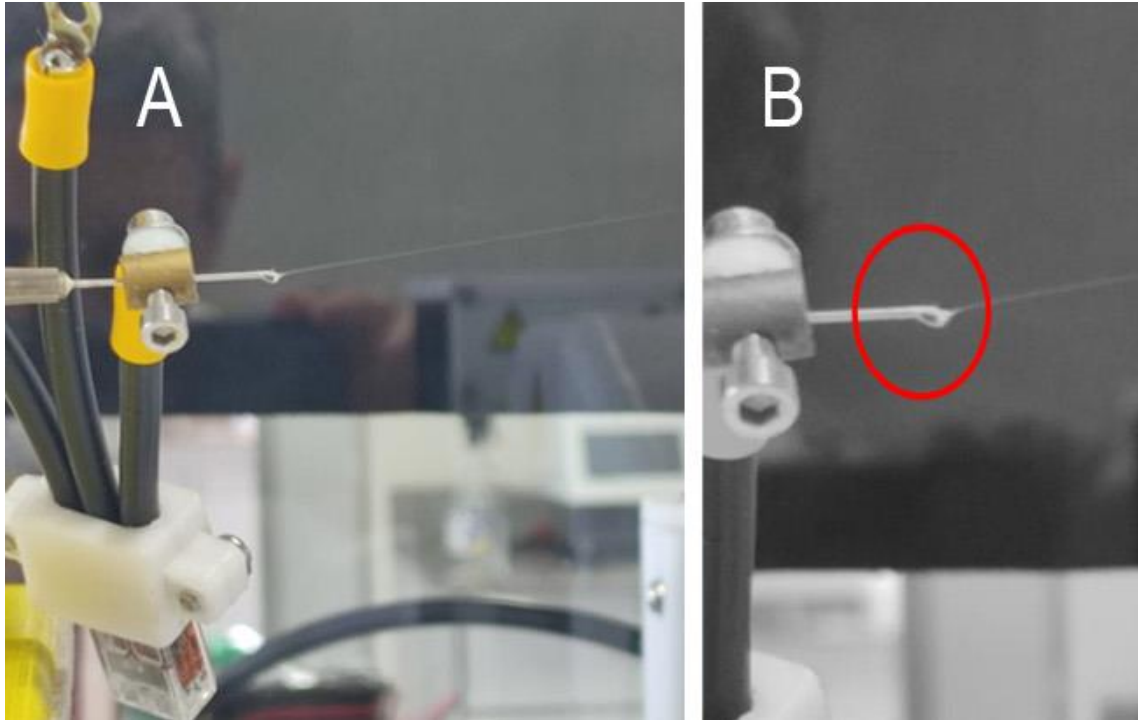
#### 4.2.1.1 Eletrofiação de PLA

Uma solução contendo 10% de PLA, usando clorofórmio como solvente, foi preparada e inserida na seringa e submetida a eletrofiação. A Figura 10 mostra a formação do cone de Taylor e a formação nítida de um fio em direção ao coletor, requisitos indispensáveis para produção de fibras e posteriormente de uma membrana com boas propriedades (SUN *et al.*, 2020).

A partir de tal observação, foi iniciada a eletrofiação de 10 mL de solução. A tensão foi variada de 7,5 a 17 kV, mantendo os demais parâmetros de eletrofiação fixos (15 cm de distância, 45 rpm de rotação e 0,15 mL/min de vazão). Observou-se que não ocorre eletrofiação para tensões menores de 10 kV. Também não foram

realizados experimentos acima de 15 kV por questões de segurança, pois ao chegar em 17 kV há geração de um campo elétrico muito alto que foi capaz de desligar o equipamento.

Figura 10: Formação do cone de Taylor em evidência e a formação de um fio



Fonte: Autor, 2023

Após a caracterização das membranas, foi fixada a tensão para as demais membranas produzidas, mantendo os seguintes parâmetros entre tensão, distância e vazão: 15 kV, 15 cm, 0,15 mL/min.

Cada membrana foi coletada em temperatura ambiente, 25 °C, em um anteparo coberto por uma folha de alumínio por 30 min. As membranas coletadas permaneceram em repouso por no mínimo 24 h para secagem a temperatura ambiente.

Para seleção de cada condição, as membranas foram caracterizadas quanto a sua porosidade, tamanho de poro, diâmetro das fibras, molhabilidade e capacidade de absorção de água.

#### 4.2.1.2 Eletrofiação de PLA e quitosana

Após a avaliação da influência das variáveis do processo de eletrofiação para obtenção de membranas de PLA, foram produzidas as membranas de PLA e quitosana.

Membranas de PLA com diferentes adições de quitosana foram obtidas mantendo os parâmetros de eletrofiação selecionados na etapa anterior (15 kV, 15 cm de distância, 45 rpm de rotação e 0,15 mL/min de vazão).

Novamente para cada condição, as membranas foram caracterizadas quanto a sua porosidade, tamanho de poro, diâmetro das fibras, molhabilidade e capacidade de absorção de água.

#### 4.2.1.3 Eletrofiação de PLA, quitosana e LZS

Após selecionada a melhor condição PLA/Quitosana, LZS foi adicionado à solução de acordo com o descrito no item 4.2.1.4 e eletrofiado nos parâmetros indicados nas etapas anteriores (15 kV, 15 cm de distância, 45 rpm de rotação e 0,15 mL/min de vazão).

### 4.2.3 Caracterização das membranas

#### 4.2.3.1 Caracterização morfológica: Microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV); análise química pontual

Inicialmente, um microscópio estereoscópio (Bioptika, 12MP USB2.0) foi utilizado a fim de se confirmar a formação de fibras pelo processo de eletrofiação.

A microscopia eletrônica de varredura (Jeol, JSM - 6610LV, com microsonda de EDS) foi utilizada para a avaliação morfológica das membranas de PLA, PLA e quitosana e PLA, quitosana e LZS. Para obtenção das imagens as amostras foram recobertas com ouro e foi usado uma tensão de 15 kV. A partir das imagens foi possível analisar o tamanho de poros, além dos diâmetros das fibras. O diâmetro médio e o desvio padrão das fibras foi calculado pelo software *Image J* (pelo menos 50 fibras foram avaliadas por imagem por meio da metodologia do método do

intercepto linear). Este teste também serviu para a averiguação da qualidade da fibra gerada, presença ou ausência de defeitos.

A análise química pontual foi realizada por EDS acoplado ao MEV para identificação e análise qualitativa da distribuição do LZS nas membranas. Por EDS foi possível identificar tanto o Zr como o Si presentes no LZS e ausentes nas membranas de PLA e PLA e quitosana.

#### 4.2.3.2 Caracterizações físicas: Porosidade das membranas

##### Densidade aparente

Para caracterizar a densidade aparente geométrica, foi cortada as membranas em partes de aproximadamente 1 cm x 1 cm e logo após foram medidas as dimensões (a espessura foi medida no micrometro, Mitutoyo, modelo IP65); posteriormente foi pesada e depois foi calculado a densidade aparente conforme a Equação 1.

$$D_{ap} = \frac{m}{v} \quad \text{Equação (1)}$$

onde  $D_{ap}$  é a densidade aparente,  $m$  é a massa em g e  $v$  é volume em  $\text{cm}^3$ .

##### Densidade real por picnometria

A densidade real de cada amostra foi determinada por picnometria ao gás hélio (AccuPyc 1340, Micromeritics, USA).

##### Densidade relativa

A densidade relativa foi calculada relacionando-se as medidas de densidade aparente e real das amostras, conforme a Equação 2.

$$D_{rel} = \left( \frac{D_{ap}}{D_{real}} \right) \quad \text{Equação (2)}$$

onde  $D_{rel}$  é a densidade relativa,  $D_{ap}$  é a densidade aparente ( $g/cm^3$ ) e  $D_{real}$  é a densidade real ou verdadeira do sólido ( $g/cm^3$ ).

### Porosidade

A porosidade foi calculada a partir dos valores da densidade relativa, conforme a Equação 3.

$$P = (1 - D_{rel}) \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

onde P é porosidade em (%).

#### 4.2.3.3 Absorção de Fluidos

A absorção de fluidos (AF), dada em g fluido / g membrana, foi calculada segundo a Equação 4, onde  $M_s$  (g) é a massa das membranas secas e  $M_m$  (g) é a massa após 24 h de imersão das membranas em 20 mL de água destilada. Vale ressaltar que após serem retiradas da solução, foi retirado o excesso de água com um lenço de papel antes de pesar.

$$AF = \frac{M_m - M_s}{M_s} \quad \text{Equação (4)}$$

#### 4.2.3.3 Análise dos grupos funcionais presentes: Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para determinar os grupos funcionais presentes nas membranas, foi usado espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) com acessório de refletância total atenuada (ATR-FTIR, Tensor II modelo, Bruker) com comprimento de onda entre 4000 a 400  $cm^{-1}$  e 200 scans.

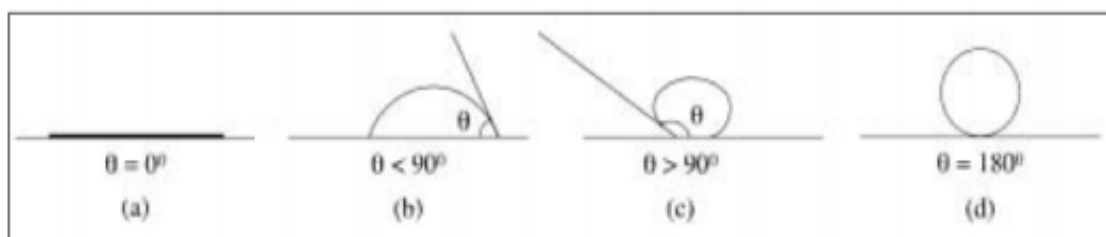
#### 4.2.3.4 Análise da molhabilidade por ângulo de contato

A fim de se investigar o ângulo de molhabilidade entre o líquido e a superfície das membranas de PLA, PLA e quitosana e PLA, quitosana e vidro bioativo, foi utilizado um medidor de ângulo de contato LB-DX. Este teste foi importante para mostrar a capacidade de molhabilidade de cada uma das membranas e prever se os fluidos poderão molhar ou não a superfície das membranas.

A determinação do ângulo de contato foi realizada à temperatura ambiente e as gotas de cada solução foram depositadas com o auxílio de uma seringa, com volume útil de 0,1 mL. Foi utilizada uma solução de fluido corporal simulado (SBF), baseada em Kokubo e Takadama (2006). A imagem da gota em contato com a superfície foi capturada por uma câmera digital acoplada ao equipamento, e o cálculo do ângulo de contato foi realizado por meio do *software* de análise de imagens *Image J*. Esta etapa do trabalho foi desenvolvida em parceria com a Prof.<sup>a</sup> Dra. Annelise Kopp Alves da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Para a classificação do grau de molhabilidade entre um líquido e a membrana, foi utilizado os valores de ângulos de contato dos líquidos com superfícies sólidas, descritos na Figura 11.

Figura 11: Ângulos de contato dos líquidos com superfícies sólidas, para líquidos: (a) perfeitamente molhante; (b) predominantemente molhante; (c) predominantemente não-molhante; (d) não-molhante (OGEDA, 2010).



Fonte: OGEDA, (2010).

#### 4.2.3.5 Análises térmicas

Para se analisar a temperatura de degradação das membranas e confirmar que não sofreram degradação não prevista na temperatura do corpo humano, foram realizadas análises térmicas. As análises das amostras deste trabalho foram

realizadas em equipamento analisador simultâneo de ATD e TG (SDT-Q600, TA instruments). Foram preparadas amostras de 10 mg das membranas de PLA, PLA e quitosana e PLA, quitosana e vidro bioativo LZS, todas já eletrofiadas. Logo após, foram submetidas a um aquecimento de até 1100 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min em atmosfera de ar sintético.

#### 4.2.3.6 Bioatividade e Biodegradabilidade

A fim de se analisar a bioatividade das membranas, foi realizado um teste por exposição ao fluido corporal simulado (SBF), preparado de acordo com o método de Kokubo e Takadama (2006), no padrão (ISO / FDIS 23317, 2007). Para a produção do SBF, foram utilizados os seguintes íons: Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. As membranas foram cortadas em pedaços de 1 cm x 1 cm e foram imersas em 10 mL de SBF em frascos de polipropileno mantidos a 37 °C por 7, 14, 21 e 28 dias. As soluções de SBF foram substituídas semanalmente e o pH foi acompanhado durante esse tempo. Mudanças de pH podem indicar os possíveis produtos de degradação formados.

Após a exposição ao SBF, as membranas foram avaliadas por:

- MEV com EDS – com objetivo de identificar a formação de fosfatos de cálcio na superfície das membranas, característicos da bioatividade;
- FTIR – para avaliar os grupos funcionais característicos presentes nas membranas e identificar a formação de fosfatos de cálcio característicos da bioatividade;
- Perda em massa - A perda de massa (PM, %) foi calculada pela Equação (5) em que M<sub>s</sub> (g) é a massa das membranas secas e M<sub>f</sub> (g) é a massa após 28 dias de imersão das membranas em SBF.

$$PM = \frac{M_s - M_f}{M_s} \cdot 100$$

Equação (5)

#### 4.2.4.9 Citotoxicidade

Como a membrana produzida tem como objetivo o reparo ou regeneração de cartilagem em humanos, foi avaliado a citotoxicidade *in vitro* dos biomateriais produzidos. Ao analisar a citotoxicidade *in vitro*, é possível avaliar se as membranas são seguras e não danificam as células no local da lesão ou defeito da cartilagem. Isso permitirá o desenvolvimento de terapias de regeneração de cartilagem mais eficazes e seguras, melhorando a qualidade de vida dos pacientes. Fibroblastos murinos L929 foram cultivados em meio *Eagle* modificado por *Dulbecco* (DMEM) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 50 unidades/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina, e 5 células/poço em placas de cultura de 96 poços e mantidas em incubadora a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> por 24 h.

Cada membrana foi testada usando um ensaio de resazurina (SIMÕES *et al.*, 2021) para se avaliar a citotoxicidade. Inicialmente, as membranas foram esterilizadas com luz ultravioleta por 1 h. Posteriormente, uma membrana (Ø 1 mm) foi inserida em cada poço de análise como suporte para o crescimento celular. Após a incubação, o meio de cultura foi substituído por DMEM contendo as membranas. Culturas de controle foram incubadas em DMEM completo por 48 h.

O reagente sal sódico de resazurina (10% v/v) foi adicionado aos poços após cada tempo de incubação e as culturas foram incubadas por 4 h, seguidas de leituras colorimétricas realizadas em 570 e 600 nm. Este ensaio mede a atividade metabólica das células com base no aspecto colorimétrico final dos produtos reagidos. Todos os tratamentos foram realizados em quadruplicata e a análise estatística utilizada foi ANOVA *one-way* usando o Software Statistic.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS DE PARTIDA

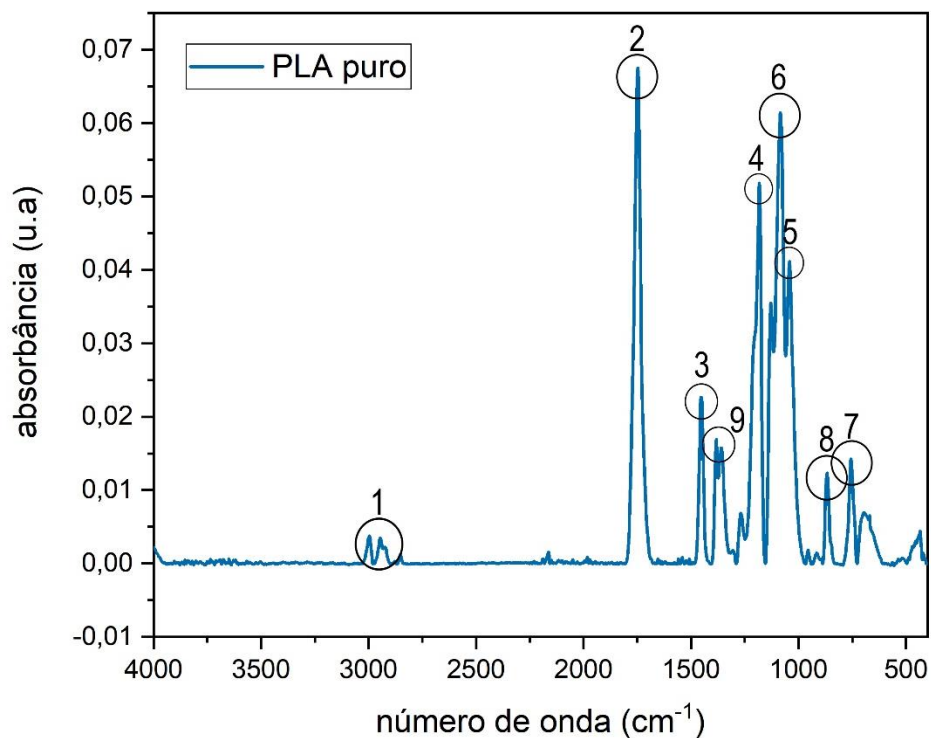
#### 5.1.1 PLA

##### 5.1.1.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) por reflexão total atenuada (ATR)

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica que permite identificar as diferentes ligações químicas presentes em uma amostra, por meio da análise das vibrações moleculares que ocorrem em diferentes regiões do espectro infravermelho. O PLA é um polímero biodegradável obtido a partir do ácido lático e a espectroscopia de infravermelho pode fornecer informações sobre a estrutura química, tais como as ligações presentes e a presença de impurezas.

Os espectros de FTIR obtidos para o pellet de PLA são apresentados na Figura 12 e detalhado na Tabela 8.

Figura 12: Espectro de FTIR obtidos do PLA puro.



Fonte: Autor, 2023

Os números (1-9) indicados na Figura 12, foram utilizados para identificar os grupos funcionais e são descritos na Tabela 8. Observa-se por meio do espectro, bandas em  $760\text{cm}^{-1}$  referentes aos grupos de estiramento C-H;  $870\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento C-C; 1080, 1100 e  $1182\text{ cm}^{-1}$  referentes aos grupos de estiramentos C-O; 1348-1388 referente ao estiramento assimétrico  $\text{CH}_3$ ; 1454, 2944-2995  $\text{cm}^{-1}$  referentes aos grupos C-H de dobramento e estiramento respectivamente e a  $1750\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento da carbonila do grupo éster. Essas bandas são características do PLA (POPELKA; MACHOVÁ; RYPÁČEK, 2007).

Tabela 8: Relação entre o número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) e o grupo funcional das bandas encontradas no PLA

Número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ )	Grupo funcional	Indicação no gráfico:
	Descrição / Fórmula	
<b>3000 – 2850</b>	Estiramento -CH	1
<b>1750 – 1745</b>	Estiramento C=O	2
<b>1500 – 1400</b>	Dobramento C-H	3
<b>1100 – 1000</b>	Estiramento -C-O	4
<b>1080 – 1085</b>	Estiramento -C-O	5
<b>1181</b>	Estiramento simétrico C-O-O	6
<b>800 - 754</b>	Estiramento C-H	7
<b>870</b>	Estiramento C-C	8
<b>1348-1388</b>	Estiramento assimétrico $\text{CH}_3$	9

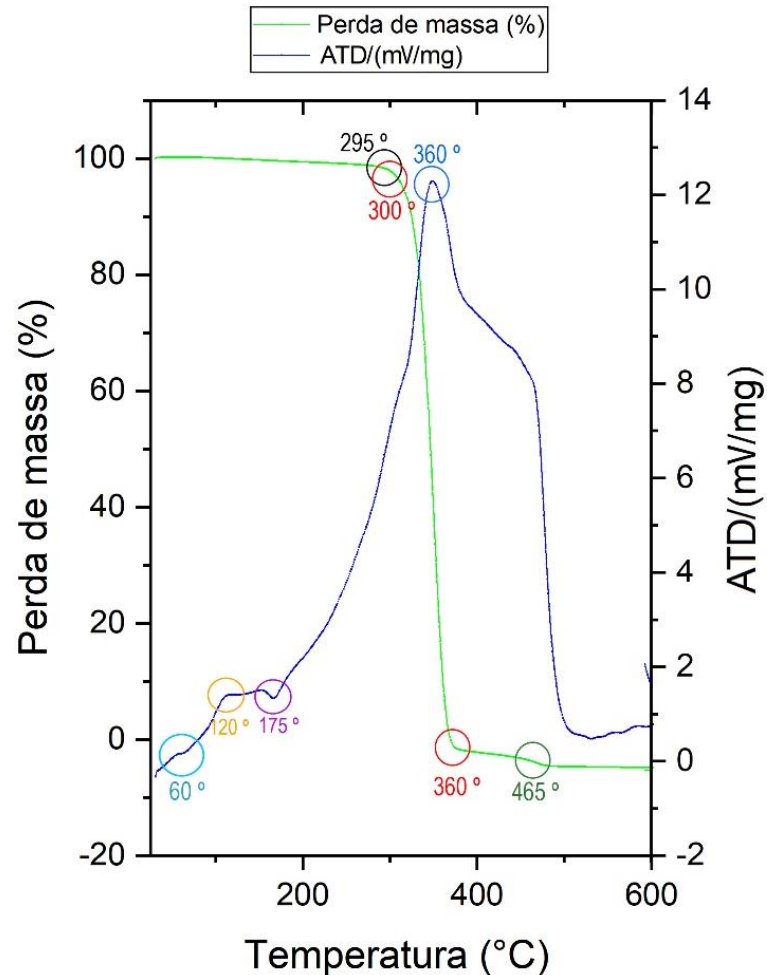
Fonte: Autor, 2023

#### 5.1.1.2 Análise térmica diferencial (ATD) e termogravimétrica (TG)

A fim de se verificar o comportamento térmico do PLA, bem como compreender sua decomposição térmica, análise térmica diferencial (ATD) e termogravimétrica (TG) foram realizadas nos pellets de PLA. A Figura 13 mostra as curvas obtidas. Inicialmente, observa-se que a estabilidade térmica do polímero se manteve até  $295\text{ }^\circ\text{C}$ , já que não houve perda de massa nem eventos térmicos até tal temperatura. A degradação térmica relacionada a perda de massa começa a partir de  $300\text{ }^\circ\text{C}$  e tem sua degradação quase que completa até  $360\text{ }^\circ\text{C}$  com uma perda em

massa de 98%. Estas temperaturas são condizentes com as temperaturas características do PLA (SANTANA *et al.*, 2014).

Figura 13: Análise térmica do PLA puro.



Fonte: Autor, 2023

Pela análise de ATD, é possível perceber 3 eventos térmicos característicos. Observa-se uma mudança de linha de base entre 50 e 65 °C e 2 eventos exotérmicos em 120 e 360 °C, além de um evento endotérmico em 175 °C. Na faixa de temperatura de 50 a 65 °C, ocorre a transição vítrea do material. A transição vítrea é uma mudança na estrutura molecular do PLA que ocorre quando o material é aquecido a uma determinada temperatura, resultando em um aumento na mobilidade das moléculas e uma diminuição na rigidez do material. O primeiro evento exotérmico na temperatura de 120 °C, ocorreu devido à cristalização a frio do PLA (SAEIDLOU *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2017). A cristalização é um processo em que as cadeias poliméricas se organizam em uma estrutura ordenada, resultando em um aumento na densidade e

rigidez do material (OLIVEIRA; LUZ, 2016). A temperatura de fusão do PLA foi observada em 175 °C (evento endotérmico). O segundo evento exotérmico está ligado a degradação do PLA que ocorreu por volta dos 360 °C (GUPTA; REVAGADE; HILBORN, 2007). A degradação térmica é um processo em que as moléculas do PLA começam a se quebrar devido à alta temperatura, resultando na perda de massa do material. A perda de massa total do PLA ocorreu em 465 °C. Tais temperaturas características também estão descritas por outros autores (SANTANA *et al.*, 2018; NERES *et al.*, 2021).

Para aplicação do PLA em meios biológicos é importante atentar-se ao comportamento térmico em temperaturas de até no máximo 45 °C. Percebe-se que não houve nenhuma alteração no PLA nesta temperatura. O ensaio até temperaturas mais altas foi útil para entender o comportamento térmico geral do polímero e confirmar que não há a presença de cargas ou impurezas. A presença deste tipo de materiais alteraria o comportamento térmico do PLA.

### 5.1.2 Quitosana

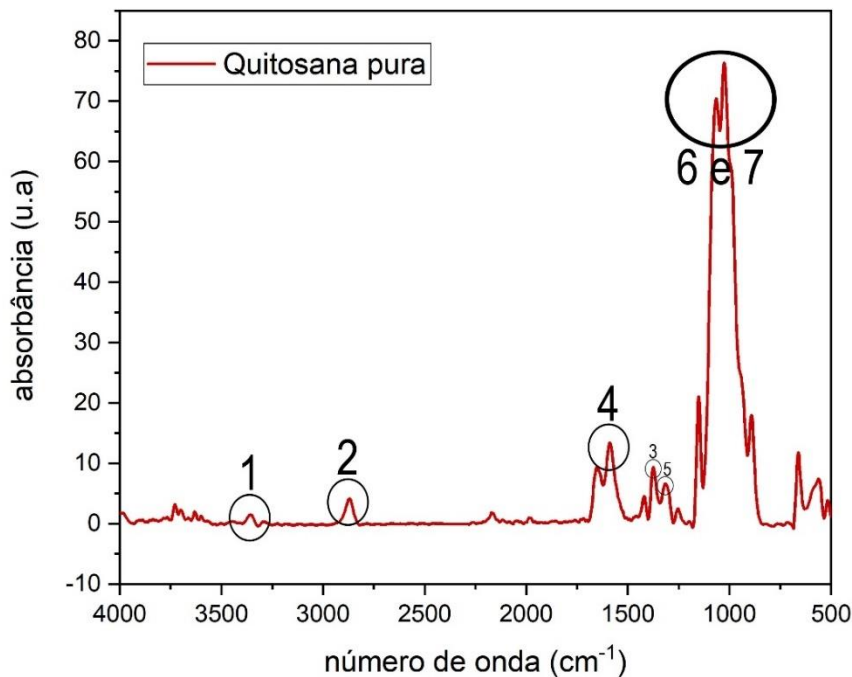
#### 5.1.2.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) por reflexão total atenuada (ATR)

Com o intuito de verificar os grupos funcionais da quitosana e a presença de possíveis impurezas, foi realizado uma análise de FTIR da quitosana em pó como recebida. O espectro obtido a partir da quitosana em pó está mostrado na Figura 14. Os números (1-7) foram utilizados para identificar os grupos funcionais e são descritos na Tabela 9.

Bandas de estiramento entre 3400 a 3500  $\text{cm}^{-1}$  foram atribuídas aos grupos de O-H e/ou N-H, como as ligações de hidrogênio intermoleculares das cadeias do polissacarídeo, conforme observadas também por (WANG; DU; LIU, 2004; FIDÉLES; FOOK; TOMÁS, 2010). As bandas entre 2918 e 2880  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas às vibrações de estiramento do grupo C-H. Banda característica da quitosana apresentada como deformação angular do  $\text{CH}_2$  também aparece na região de 1407  $\text{cm}^{-1}$ . As bandas a 1643 e 1553  $\text{cm}^{-1}$  correspondem ao modo de vibração por estiramento da ligação C=O e à deformação da ligação N-H, respectivamente. A formação em conjunto dessas duas bandas (C=O e N-H), indicam a presença de grupos amidas segundo (OSMAN;

AROF, 2003). Da mesma maneira, a banda na região de  $1378\text{ cm}^{-1}$  é uma vibração de deformação angular simétrica dos grupos metil ( $\text{CH}_3$ ) do grupo acetamida como apresentado por (TORRES *et al.*, 2005). Esta informação é um indicativo de que a quitosana usada neste trabalho é um produto parcialmente desacetilado (SIONKOWSKA *et al.*, 2004) e de fato está de acordo com o informado pelo fabricante. As bandas de absorção entre  $1152$  e  $895\text{ cm}^{-1}$  de estiramento de ligações C-O-C e as bandas entre  $1057$  e  $1027\text{ cm}^{-1}$  de vibrações de estiramento do grupo C-O são características da estrutura sacarídica da quitosana segundo mostra (MINCHEVA *et al.*, 2004).

Figura 14: Espectro de FTIR obtidos da quitosana pura.



Fonte: Autor. 2023

Tabela 9: Relação entre o número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) e o grupo funcional das bandas encontradas na quitosana

Número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ )	Grupo funcional Descrição / Fórmula	Indicação no gráfico:
3500 - 3400	Estiramento O-H / N-H	1
2918 - 2880	Estiramento C-H	2
1407	Deformação CH <sub>2</sub>	3

<b>1553 - 1643</b>	Estiramento C=O / N-H	4
<b>1378</b>	Deformação CH <sub>3</sub>	5
<b>1152 – 895</b>	Estiramento C-O-C	6
<b>1057 – 1027</b>	Estiramento C-O	7

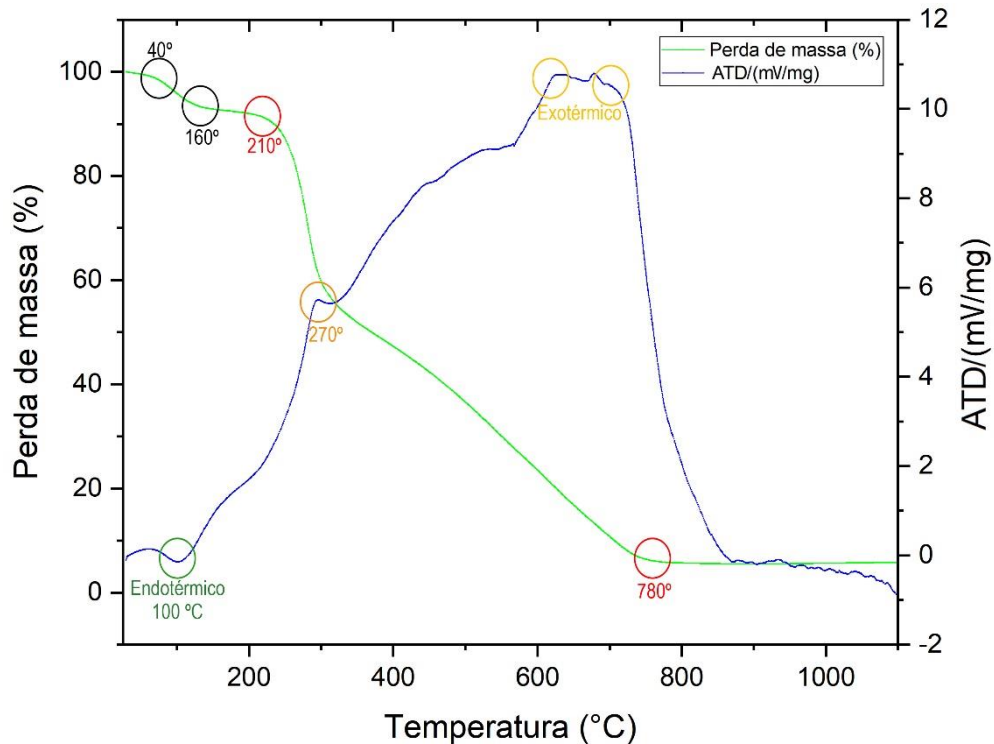
Fonte: Autor, 2023

### 5.1.2.2 Análise térmica diferencial (ATD) e termogravimétrica (TG)

A Figura 15 mostra o resultado da TG e DTA da quitosana pura, onde é possível observar a perda de massa em dois estágios na quitosana pura. O primeiro, no intervalo entre 40 e 160 °C, com perda de massa de aproximadamente 8%, que está relacionada à perda de moléculas de água durante o aquecimento que estariam ligados aos grupamentos amino e hidroxila, através de pontes de hidrogênio. Este evento está relacionado tanto com as interações polímero-água, quanto com a capacidade do polímero reter água (FRÁGUAS *et al.*, 2015). O segundo com início próximo a 210 e a 780 °C, com a perda de massa de aproximadamente 94%. Esta perda é atribuída ao processo de decomposição que inicia quebrando aleatoriamente as ligações glicosídicas, em seguida sofre a decomposição das unidades acetiladas e desacetiladas do polímero. Contudo, como o ensaio é feito em atmosfera de um gás inerte, a perda da massa está relacionada mais ao efeito térmico do que ao efeito reacional das moléculas (DE MOURA; AOUADA; MATTOSO, 2008b). Para a análise da DTA o primeiro estágio das curvas, pode-se observar um evento endotérmico em 100 °C, que corresponde à eliminação de voláteis da amostra, sendo que essa eliminação é um pouco discreta, devido à interação forte de pontes de hidrogênio entre moléculas de quitosana e água (DE MOURA; AOUADA; MATTOSO, 2008a). A quitosana não apresenta nenhuma transição endotérmica entre a temperatura ambiente e 250 °C, indicando a falta de qualquer cristalino ou qualquer outra mudança de fase durante o processo de aquecimento. O segundo pico exotérmico centrado em torno de 270 °C é devido à degradação oxidativa da amostra (SREENIVASAN, 1996). O terceiro evento, é correspondente ao processo de decomposição do material, este evento exotérmico conforme está identificado no gráfico aconteceu no intervalo de 620 a 720 °C (JAYAKUMAR *et al.*, 2008). Algumas pequenas diferenças entre os autores pode estar relacionada com as condições de realização da análise e do equipamento

utilizado, que podem causar pequenas mudanças na curva TG e DTA conforme comenta (CAVALHEIRO *et al.*, 1995).

Figura 15: Análise térmica da quitosana pura.



Fonte: Autor, 2023

### 5.1.3 LZS

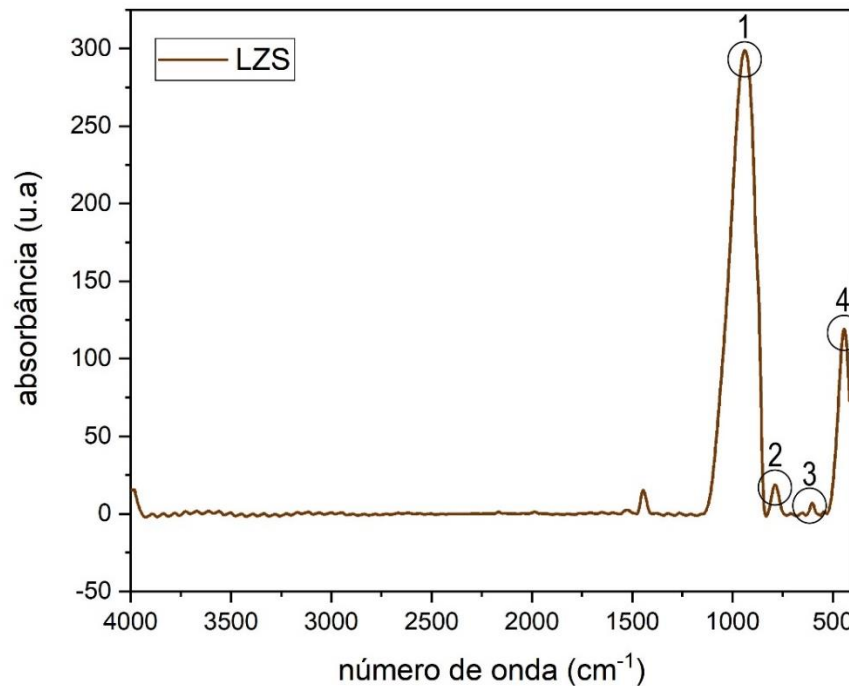
O sistema vítreo LZS é amorfo e, portanto, não possui fases cristalinas presentes. Sua estrutura amorfa é bem estabelecida e já foi estudada em vários trabalhos (ARCARO, 2016; POSSOLLI *et al.*, 2021). Neste trabalho foi realizado análises de FTIR e análise térmica a fim de comparação com os polímeros e para fins de comparação após a obtenção das membranas.

#### 5.1.3.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) por reflexão total atenuada (ATR)

A Figura 16 mostra o resultado da análise de FTIR para o vidro LZS puro. O espectro de infravermelho do vidro LZS apresenta bandas de absorção características das ligações químicas presentes na estrutura do vidro, como a banda de estiramento

da ligação O-Si-O em torno de  $900\text{ cm}^{-1}$ , em  $780\text{ cm}^{-1}$  também referente ao Si-O-Si,  $625\text{ cm}^{-1}$  referente ao O-Li-O e  $456\text{ cm}^{-1}$  referente ao grupo  $\text{SiO}_2$ . Estes resultados para o sistema LZS se aproximam dos resultados apresentados por Possolli *et al.* (2021).

Figura 16: Espectro de FTIR obtidos do vidro bioativo do sistema LZS



Fonte: Autor, 2023

Tabela 10: grupos funcionais e o número de onda característico do PLA puro.

Número de ondas (cm <sup>-1</sup> )	Grupo funcional	Indicação no gráfico:
1)	Descrição / Fórmula	
<b>900</b>	O-Si-O	1
<b>780</b>	Si-O-Si	2
<b>625</b>	O-Li-O	3
<b>456</b>	$\text{SiO}_2$	4

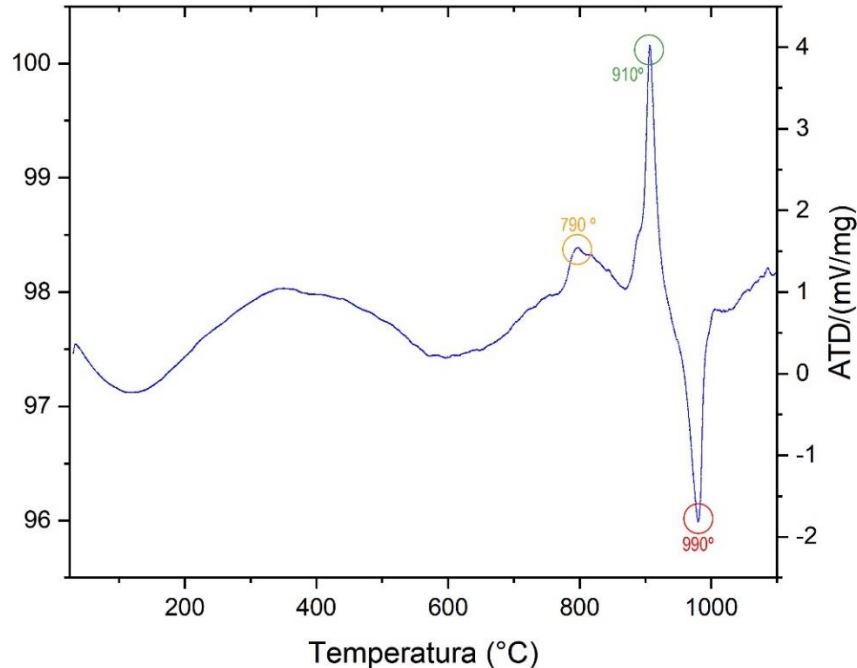
Fonte: Autor, 2023

### 5.1.3.2 Análise térmica diferencial (ATD) e termogravimétrica (TG)

A Figura 17 mostra o ATD do precursor vitrocerâmico do sistema LZS. O primeiro evento acontece em torno de  $790\text{ °C}$ ; este fenômeno está relacionado à

transição vítrea ( $T_g$ ) do material. É possível perceber um segundo evento, exotérmico, de cristalização ( $T_c$ ) em  $910\text{ }^\circ\text{C}$ , o qual indica a cristalização das principais fases, como silicato de zircônio e dissilicato de lítio.

Figura 17: Análise térmica do vidro bioativo do sistema LZS.



Fonte: Autor, 2023

Existe um terceiro evento, porém endotérmico, em  $990\text{ }^\circ\text{C}$ , que é referente ao início da fusão das fases cristalinas desenvolvidas no LZS. Isso ocorre porque este vidro é um precursor vitrocerâmico (ARCARO, 2016). É possível perceber que o material quase não sofreu perda de massa. Não há nenhum indicativo de degradação ou transição de fases do LZS em temperaturas de fluidos biológicos.

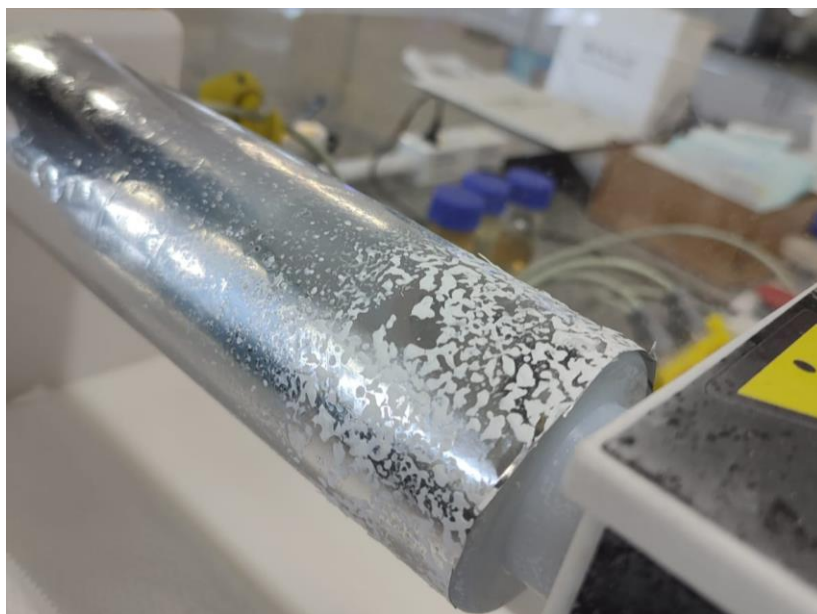
## 5.2 SELEÇÃO DOS PARÂMETROS DE ELETROFIAÇÃO

### 5.2.1 Eletrofiação de quitosana pura

Este trabalho avaliou inicialmente a eletrofiação da quitosana pura. A Figura 18 mostra uma tentativa de eletrofiação de uma membrana utilizando quitosana dissolvida em ácido acético. Observa-se que não houve formação de fibras. Houve apenas a formação de gotas coalescidas de quitosana. Os polímeros naturais são amplamente utilizados na fabricação de membranas e *scaffolds*, uma vez que

apresentam diversos benefícios para essa aplicação. No entanto, a eletrofição desses materiais pode representar um desafio. A quitosana pura, por exemplo, é um polímero natural que já foi estudada na eletrofição de *scaffolds*, e alguns trabalhos relatam sucesso na produção de fibras eletrofiadas com esse material (VASCONCELOS *et al.*, 2006; KUNTZLER; COSTA; MORAIS, 2018). No entanto, reproduzir esses resultados pode ser difícil, uma vez que a massa molar desse polímero nem sempre é constante e o grau de desacetilação é o único fator controlável quando se adquire a quitosana por meio de empresas especializadas. Outro aspecto é relacionado a condutividade elétrica da solução que pode não ser suficiente para formar o cone de Taylor. Por fim, as condições climáticas também podem interferir mais fortemente na formação de fibras deste tipo de material conforme apresenta (MERLINI *et al.*, 2014), estes autores investigaram a influência da temperatura e umidade relativa do ar na eletrofição de polímeros. Os autores concluíram que um ambiente com baixa umidade relativa do ar e temperatura moderada é o mais adequado para a produção de fibras eletrofiadas de alta qualidade (CHRONAKIS, 2005; MERLINI *et al.*, 2014). A partir de então, buscou-se o desenvolvimento de membranas compostas com o PLA, pois a literatura relata que o PLA é um polímero com ótimos resultados na formação de fios e com propriedades de bioatividade e biodegradabilidade importantes para a aplicação em regeneração de cartilagem (CIOCCA *et al.*, 2019).

Figura 18: Foto de uma tentativa de eletrofição da quitosana pura.

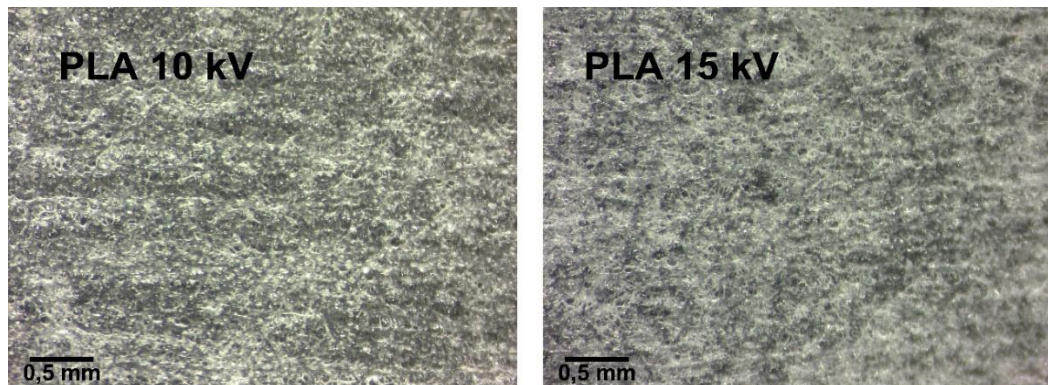


Fonte: Autor, 2023

### 5.2.2 Eletrofiação de PLA

A eletrofiação utilizando PLA foi bem-sucedida com soluções contendo 10% do polímero. A validação do sucesso das membranas depende da modificação de diferentes parâmetros do processo e a caracterização posterior das membranas. Neste sentido, a Figura 19 mostra imagens de estereoscópio de duas membranas produzidas com PLA com o intuito de comparar o efeito das tensões do equipamento na formação das fibras. Foram usados 10 e 15 kV. Conforme pode se observar pelas imagens não houve mudanças significativas visíveis nesta magnificação entre as duas tensões. Contudo, na membrana obtida com 10 kV há um maior coalescimento das fibras, possivelmente pela grande dimensão das fibras obtidas devido a tensão ser insuficiente para obter fios de qualidade. Aparentemente 15 kV é capaz de gerar fibras mais bem definidas e membranas com uma maior porosidade.

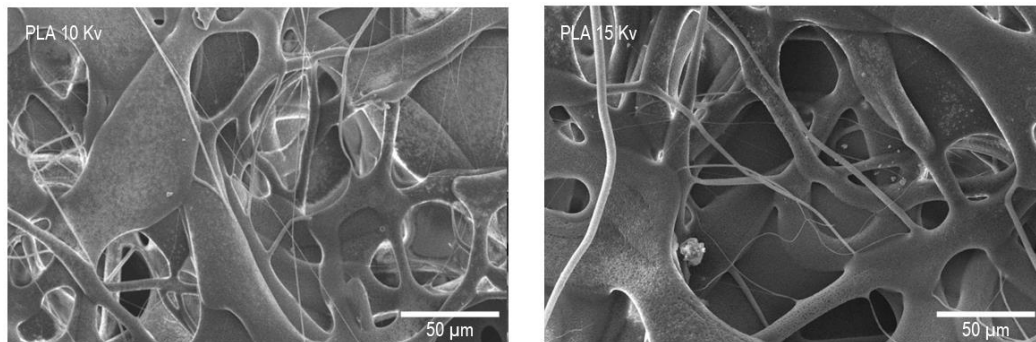
Figura 19: imagens de estereoscópio das membranas produzidas com PLA.



Fonte: Autor, 2023

A Figura 20 mostra as micrografias obtidas a partir do MEV das membranas de PLA obtidas nas diferentes condições de tensão. A análise morfológica das membranas de PLA evidenciou a presença de diferentes tamanhos de fibra detalhadas na Tabela 11. Há a presença de uma grande quantidade de fibras coalescidas e de tamanho heterogêneo. A média do tamanho das fibras ficou em  $5,74 \pm 5 \mu\text{m}$ , para as membranas eletrofiadas em 10 e 15 kV. A porosidade, por sua vez, sofreu variação e foi influenciada pela tensão durante a eletrofiação. Uma porosidade de 12,5% foi alcançada para a membrana eletrofiada a 10 kV, enquanto 18,8% para a membrana eletrofiada com uma tensão de 15 kV.

Figura 20: Imagens de MEV das membranas de PLA de 10 e 15 kV



Fonte: Autor, 2023

O tamanho dos poros está diretamente relacionado ao diâmetro das fibras e à maneira como elas se interconectam. Os poros obtidos nas membranas têm uma distribuição de tamanhos muito heterogênea. Apesar de heterogênea, percebe-se que os poros são maiores que 100  $\mu\text{m}$ .

Não houve variação significativa na espessura das membranas que se manteve próximo a 900  $\mu\text{m}$ .

Tabela 11: apresenta os diâmetros das fibras, porosidade, espessura e absorção de fluidos das membranas obtidas.

Tensão (kV)	Média diâmetro das fibras ( $\mu\text{m}$ )	Porosidade (%)	Espessura da membrana ( $\mu\text{m}$ )	Tamanho de poro ( $\mu\text{m}$ )	Absorção de fluidos (%)
7,5	Não eletrofiou	Não eletrofiou	Não eletrofiou	Não eletrofiou	Não eletrofiou
10	5,74 $\pm$ 5,00	12,5 $\pm$ 0,4	900 $\pm$ 0	>100	63 $\pm$ 3
15	5,74 $\pm$ 5,10	18,8 $\pm$ 1,6	870 $\pm$ 0	>100	67 $\pm$ 2
17	*	*	*		

\*excesso da tensão gerava um campo elétrico muito alto capaz de desligar o equipamento

Fonte: Autor, 2023

Não há na literatura uma porosidade exata para membranas de aplicação em cartilagem. Porém, considerando o estudo de (ZENG; RUCKENSTEIN, 1996), valores a partir de 40% de porosidade já seriam suficientes para este tipo de aplicação. Com relação ao tamanho das fibras, devem ter dimensões menores que 7  $\mu\text{m}$ , segundo Tavares (2011).

O comportamento de absorção de fluidos desempenha um papel significativo na adesão celular, biocompatibilidade e desempenho biológico (SHERWOOD *et al.*, 2002). Porém a partir dos resultados obtidos na Tabela 11, percebe-se que membranas produzidas somente com PLA são pouco atrativas para a finalidade deste trabalho, que busca uma homogeneidade tanto no diâmetro das fibras quanto na distribuição e tamanhos dos poros. Porém, vale ressaltar que o melhor resultado para a membrana produzida foi com a tensão em 15 kV. Esta tensão foi utilizada para continuidade do trabalho, produzindo membranas de PLA e quitosana.

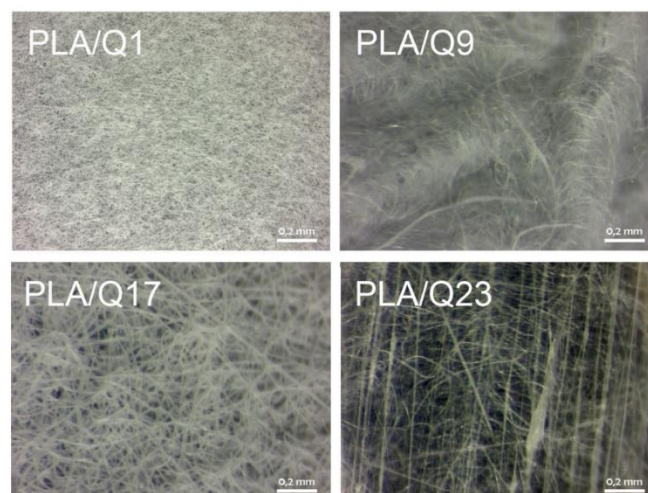
### 5.3 INFLUÊNCIA DA QUITOSANA NAS MEMBRANAS DE PLA

#### 5.3.1 Características físicas e morfológicas

Membranas de PLA com diferentes adições de quitosana foram obtidas mantendo-se os parâmetros de eletrofição selecionados na etapa anterior (15 kV, 15 cm de distância, 45 rpm de rotação e vazão de 0,15 mL/min).

A Figura 21 mostra imagens obtidas em microscópio estereoscópio, em que se percebe claramente a formação de fibras para todas as membranas produzidas. Observa-se também que há diferenças significativas nos tamanhos de fibras formadas e na porosidade das membranas. Apesar de ser observada uma homogeneidade da disposição das fibras nas membranas, imagens de MEV foram necessárias para melhor definição.

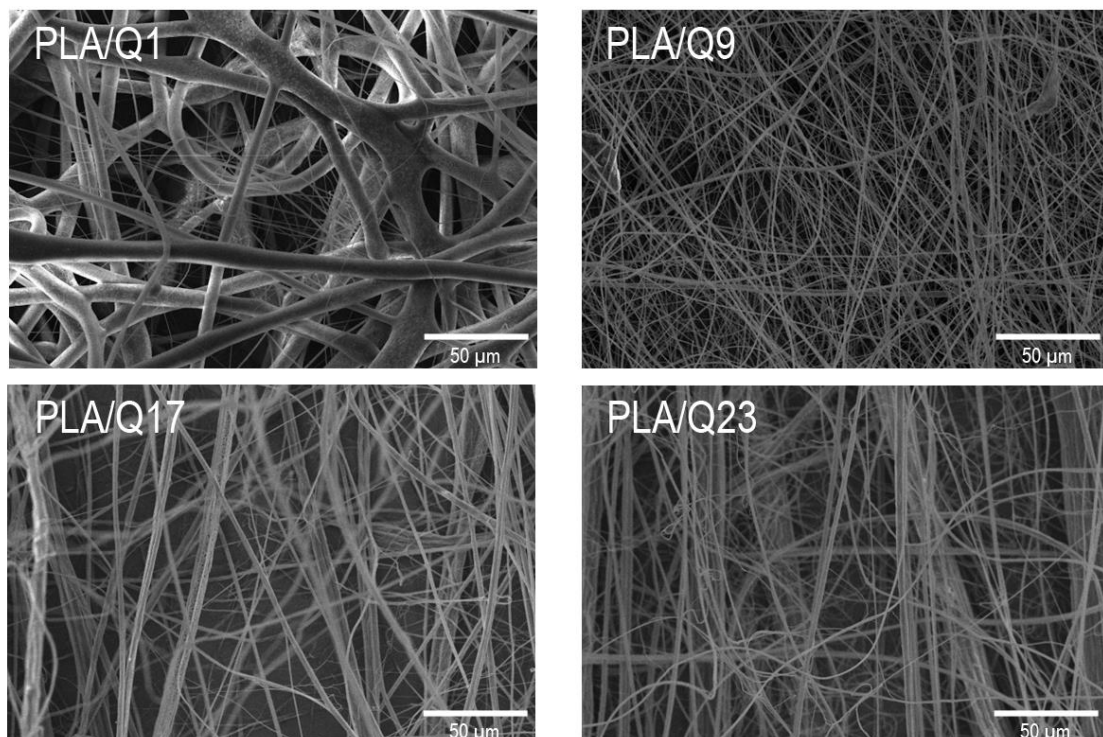
Figura 21: Imagens obtidas em estereoscópio das membranas de PLA/quitosana



Fonte: Autor, 2023

A Figura 22 mostra as micrografias obtidas a partir do MEV para as membranas de PLA e quitosana produzidas. A análise morfológica das membranas mostra claramente que ao se adicionar a quitosana, as membranas obtiveram mudanças significativas. Não é mais observado coalescimento das fibras, os diâmetros das fibras e dos poros é menor e mais homogêneo e a porosidade é maior, conforme os valores demonstrados na Tabela 12, quando se compara com a membrana apenas com PLA mostrada na Tabela 11. O tamanho médio das fibras é detalhado na Tabela 12 e mostra que a adição de 0,9% de quitosana produziu fibras de  $3,47 \pm 3,20 \mu\text{m}$ , enquanto de PLA puro foi de  $5,74 \pm 5,10 \mu\text{m}$ . Com a adição de 9% de quitosana, houve também uma diminuição do tamanho das fibras, chegando a  $1,18 \pm 0,40 \mu\text{m}$ . Com o aumento da quantidade de quitosana, o tamanho das fibras aumenta para até  $2,04 \mu\text{m}$ , o que pode estar relacionado a um aumento da viscosidade da solução. Aumentos da viscosidade podem de fato levar a aumento da espessura das fibras (MALLICK *et al.*, 2018).

Figura 22: Imagem de MEV das membranas contendo PLA e quitosana



Fonte: (Autor)

A porosidade, por sua vez sofreu alteração e a quantidade adicionada de quitosana contribuiu para um aumento de porosidade até a adição de 17% de

quitosana, que alcançou 50,2%, enquanto para a membrana eletrofiada com apenas PLA a porosidade ficou em apenas em 18,8%. Ou seja, a quitosana teve um papel fundamental no tamanho dos poros e no diâmetro das fibras, contribuindo assim para uma maior porosidade das membranas. Dois fatores podem ser considerados para a melhor processabilidade e melhores resultados na relação entre PLA e quitosana, diferentes concentrações de quitosana fizeram com que houvesse um aumento do tamanho de poros, e está diferente quantidade de solução está relacionado também a um aumento da viscosidade segundo (MALLICK *et al.*, 2018).

Tabela 12: resultados de diâmetro das fibras, porosidade, tamanho dos poros e espessura das membranas contendo PLA e quitosana

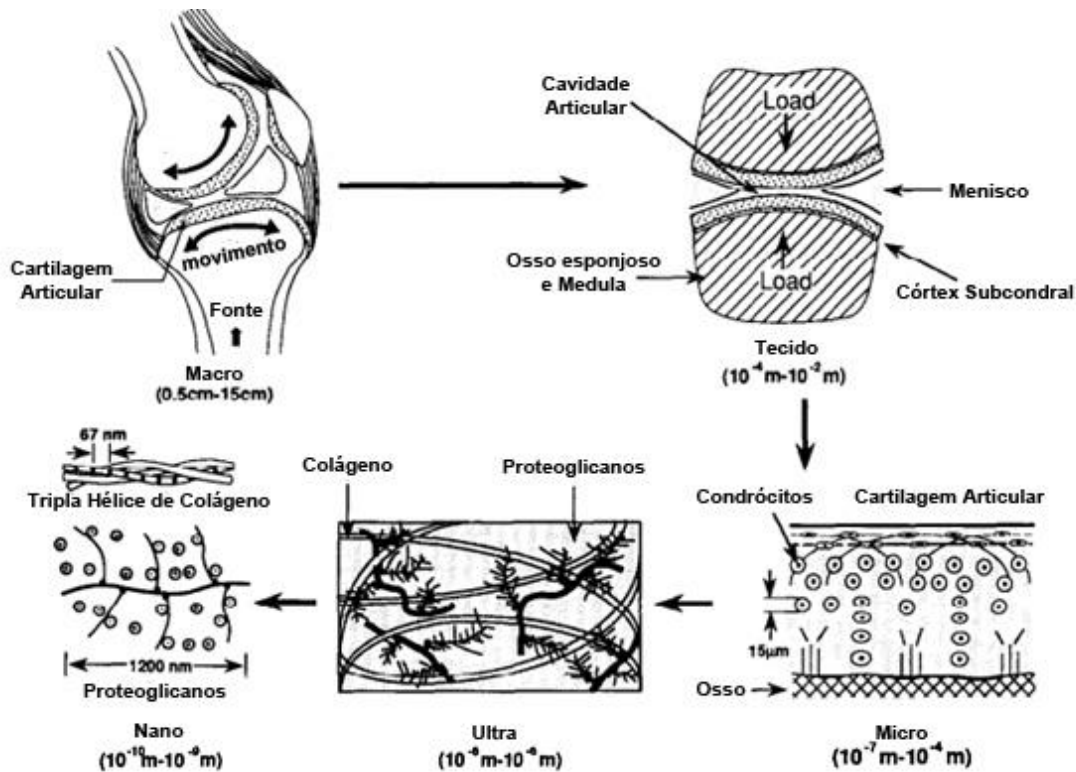
Membrana	Quantidade de quitosana (%)	Diâmetro das fibras ( $\mu\text{m}$ )	Porosidade (%)	Tamanho dos poros ( $\mu\text{m}$ )	Espessura da membrana ( $\mu\text{m}$ )	Taxa de absorção de fluidos %
<b>PLA/Q1</b>	1	3,47 $\pm$ 3,20	30,9 $\pm$ 0,1	18,53 $\pm$ 12,70	950 $\pm$ 0	70 $\pm$ 2
<b>PLA/Q9</b>	9	1,18 $\pm$ 0,40	40,3 $\pm$ 0,4	28,41 $\pm$ 9,50	1010 $\pm$ 0	71 $\pm$ 4
<b>PLA/Q17</b>	17	2,04 $\pm$ 20	48,3 $\pm$ 0,3	28,26 $\pm$ 10,30	760 $\pm$ 0	75 $\pm$ 3
<b>PLA/Q23</b>	23	1,73 $\pm$ 0,95	50,2 $\pm$ 1,1	29,50 $\pm$ 11,60	810 $\pm$ 0	79 $\pm$ 3
<b>PLA/Q28</b>	28	Não eletrofiou	Não eletrofiou	Não eletrofiou	Não eletrofiou	Não eletrofiou

Fonte: Autor, 2023

Em relação ao tamanho dos poros, o principal objetivo deste trabalho foi produzir membranas capazes de receber os principais elementos para a formação de uma cartilagem nativa (condrócitos, fibras de colágeno, proteoglicanos). Os tamanhos dos poros apresentados na Tabela 12 mostram que a adição a partir de 9% de quitosana mantém o tamanho de poros em torno de 28  $\mu\text{m}$ . Neste tamanho é possível receber os principais elementos para formação da cartilagem e são tamanhos de poros característicos de membranas contendo quitosana (LIU *et al.*, 2005; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2015). A Figura 23 mostra em detalhes os tamanhos dos condrócitos 15  $\mu\text{m}$ , fibras de colágeno 0,067  $\mu\text{m}$ , proteoglicanos 1,2  $\mu\text{m}$ , elementos fundamentais para a formação da cartilagem. Ao se analisar os tamanhos de tais elementos, e considerando os valores apresentados na Tabela 12, podemos

considerar que as membranas obtidas podem atuar como *scaffold*, permitindo o crescimento celular e a formação de um novo tecido (MOW; RATCLIFFE; ROBIN POOLE, 1992; TSCHAIKOWSKY *et al.*, 2021).

Figura 23: Algumas das características estruturais importantes encontradas em uma junta de joelho típica e as escalas de comprimento relevantes



Fonte: MOW; RATCLIFFE; ROBIN POOLE (1992).

Com relação à absorção de fluidos ao incorporar a quitosana, houve um aumento da absorção de fluidos em comparação com as membranas de PLA puro, já discutida anteriormente. Nota-se que a absorção de fluidos está diretamente relacionada com a porosidade, ou seja, quanto maior a porosidade, maior a absorção de fluidos. O tamanho dos poros também é maior e esses caminhos maiores favorecem a maior absorção de fluidos subsequentes. A capacidade das membranas de absorver uma quantidade significativa de fluido é um indicador positivo de sua capacidade de promover a regeneração dos tecidos. A maior absorção de fluidos foi ocasionada pela adição da quitosana, que é um polissacarídeo naturalmente hidrofílico. A hidrofiliabilidade da quitosana, em particular, se dá como função de seus grupos desacetilados, que possuem associação com os grupos de hidroxilas e amino,



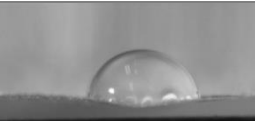
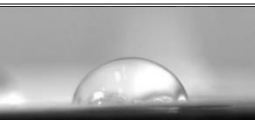

consequentemente caracterizando está forte afinidade por moléculas polares (ASSIS; VALMIR L. DA, 2003).

### 5.3.2 Molhabilidade

Para as membranas produzidas, foi realizada também a análise da molhabilidade. A molhabilidade é uma propriedade física que descreve a capacidade de um líquido se espalhar e entrar em contato com uma superfície sólida. A análise da molhabilidade geralmente envolve a medição do ângulo de contato formado entre a gota de líquido e a superfície sólida. Ao se avaliar o ângulo de contato de membranas eletrofiadas para aplicação como biomateriais na regeneração de cartilagem, é possível selecionar materiais com propriedades de superfície mais adequadas que promovam a adesão celular, distribuição uniforme de células e interação favorável com o ambiente biológico. Isso pode melhorar a eficiência e os resultados da regeneração da cartilagem. A análise do ângulo de contato é importante para entender como as membranas eletrofiadas de PLA e quitosana interagem com líquidos, incluindo fluidos corporais.

O ângulo de contato é a medida da energia de interação entre a superfície de um sólido e um líquido. Ele é definido como o ângulo formado entre a superfície sólida e a interface líquido-ar, no ponto onde as três fases se encontram (BEAKE; LING; LEGGETT, 1998). Quando o ângulo de contato é baixo, o líquido se espalha facilmente sobre a superfície sólida, indicando que a superfície é hidrofílica (atrai água). Por outro lado, um ângulo de contato alto indica uma superfície hidrofóbica (repelente à água). Assim sendo, para  $\theta < 90^\circ$  significa um caráter hidrofílico, já para  $90^\circ < \theta < 150^\circ$  significa um caráter hidrofóbico (DA SILVA *et al.*, 2020). A Tabela 13 mostra os resultados das análises do ângulo de contato das membranas obtidas.

Tabela 13: Resultados do teste de molhabilidade das membranas de PLA e PLA e quitosana

Membrana	Quantidade (%)	Ângulo de contato
PLA	100	 $94 \pm 2^\circ$
PLA/Q1	99/1	 $89 \pm 6^\circ$
PLA/Q9	91/9	 $89 \pm 2^\circ$
PLA/Q17	83/17	 $83 \pm 2^\circ$
PLA/Q23	77/23	 $88 \pm 0^\circ$

Fonte: Autor, 2023

A partir dos ângulos de contato medidos para as membranas, é possível afirmar que a membrana produzida com PLA puro possui ângulo de contato maior que  $90^\circ$ , demonstrando assim um caráter levemente hidrofóbico. Os resultados estão de acordo com a literatura, que aborda valores semelhantes para o ângulo de contato do PLA (COOLS; DE GEYTER; MORENT, 2014; MACEDO; CARMONA; ROSA, 2014).

Com a adição de quitosana, observa-se que todos os valores de ângulo de contato estão abaixo de  $90^\circ$ , porém considerando o desvio padrão, as membranas PLA/Q1 e PLA/Q9 podem ficar acima de  $90^\circ$  não permitindo desta forma, afirmar que elas possuem caráter hidrofílico. Sendo assim as únicas duas membranas com caráter hidrofílico são PLA/Q17 e PLA/Q23. Além disso, percebe-se uma diminuição do ângulo de contato, principalmente para a adição de 17% de quitosana.

Para membranas de quitosana pura, a literatura relata ângulos de contato com valores que vão de  $60$  a  $83^\circ$  (TONHI; DE GUZZI PLEPIS, 2002). Já para compósitos de membranas contendo PLA e quitosana Thomas *et al.* (2020) apresentaram

resultados que foram de 73 até 83°. As variações dos valores dos ângulos são dependentes de uma série de fatores que vão desde a pureza do material precursor até a rugosidade final do filme (SILVA; SANTOS, 2018).

Avaliando-se todos os resultados das caracterizações físicas e morfológicas das membranas contendo PLA e quitosana apresentados na Tabela 12 e também quanto ao ângulo de contato apresentado na Tabela 13, a que demonstrou estar dentro de todos os parâmetros e atendendo aos principais requisitos, foi a membrana composta por PLA e 17% de quitosana. Desta forma, esta membrana foi reproduzida com a adição de vidro bioativo LZS.

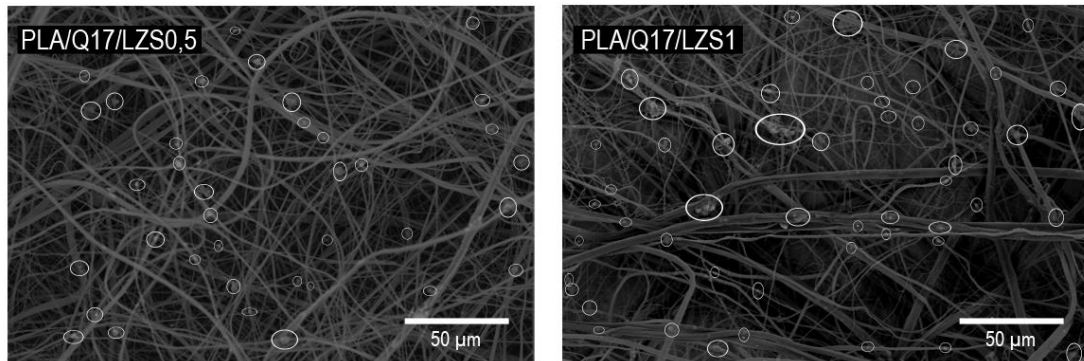
## 5.4 INFLUÊNCIA DA QUITOSANA E DO LZS NAS MEMBRANAS DE PLA

### 5.4.1 Análise das características físicas e morfológicas

Membranas de 83% da solução de PLA com 17% de quitosana foram eletrofiadas com diferentes adições de LZS. Os parâmetros de eletrofiação foram os mesmos selecionados na etapa anterior (15 kV, 15 cm de distância, 45 rpm de rotação e 0,15 mL/min de vazão).

A Figura 24 mostra as membranas contendo LZS e logo abaixo a Tabela 14, com os respectivos valores. Na imagem é possível ver destacado com círculos a presença do LZS nas membranas. De modo geral, as membranas contendo LZS não tiveram mudanças significativas em termos de espessura da fibra nem na média do tamanho dos poros, o que não muda nada, já que o objetivo da adição do LZS seria proporcionar bioatividade às membranas. As duas membranas produzidas satisfazem todos os requisitos necessários para uma membrana a ser aplicada na regeneração da cartilagem. Assim sendo, como será mostrado nas discussões a seguir, o LSZ pode desempenhar o papel importante de bioatividade, uma vez que não interferiu morfológicamente nas membranas.

Figura 24: Imagens de MEV das duas membranas contendo LZS, em destaque a presença das partículas de LZS nas membranas.



Fonte: Autor, 2023

Tabela 14: Resultados de diâmetro das fibras, porosidade, tamanho dos poros e espessura das membranas contendo PLA/quitosana/LZS de 0,5 e 1% de LZS

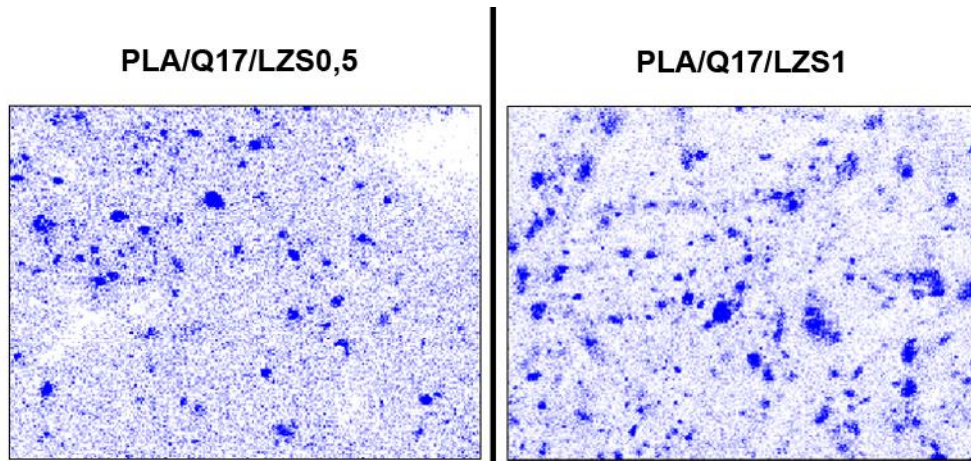
Membrana	Diâmetro das fibras (µm)	Porosidade (%)	Tamanho dos poros (µm)	Espessura das membranas (µm)	Taxa de absorção de fluidos %
PLA/Q17/LZS0,5	1,91 ± 1,02	46,5 ± 0,9	26,1 ± 11,7	930 ± 0	76 ± 2
PLA/Q17/LZS1	2,01 ± 1,43	48,1 ± 0,4	25,6 ± 12,4	880 ± 0	73 ± 3

Fonte: Autor, 2023

De fato, o material particulado observado nas amostras corresponde ao LZS e está bem distribuído em toda a extensão da membrana. A Figura 25 mostra a imagem obtida por EDS, em que os pontos azuis são característicos de Silício. O Silício está presente majoritariamente no LZS. O aumento de LZS para 1 também provocou um aumento da quantidade de LZS na amostra.

Os valores obtidos para a absorção de fluidos demonstraram que o LZS pareceu não exercer influência nesta propriedade, uma vez que os resultados se mantiveram similares, comparados aos resultados das membranas contendo PLA e quitosana.

Figura 25: Em cor azul o silício, confirmando a presença do LZS nas membranas



Fonte: Autor, 2023

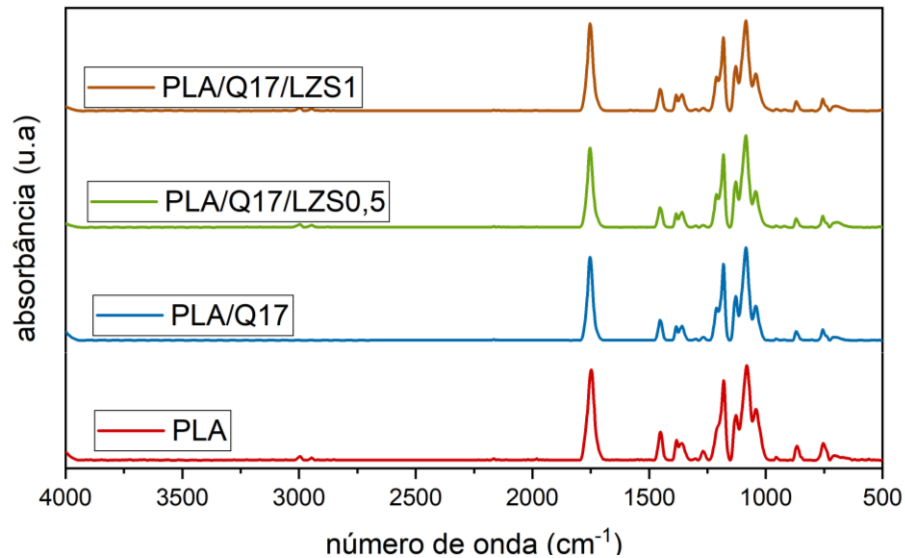
### 5.3.2 Análise dos grupos funcionais presentes nas membranas

A fim de se avaliar as interações químicas entre os materiais presentes nas membranas, ensaios de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR/ATR), também foram realizados para as membranas de PLA, PLA/quitosana com 17% de quitosana e para as membranas de PLA/quitosana/LZS com 0,5 e 1% de LZS. A Figura 26 apresenta os resultados.

Como o PLA está em uma proporção maior que a quitosana naturalmente as bandas mais evidentes são os de PLA. Contudo, existem bandas típicas da quitosana em 1407 e 1378  $\text{cm}^{-1}$  referentes às ligações  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ , respectivamente, que são as mais intensas observadas para a quitosana. De forma geral, há uma sobreposição dos polímeros puros; ou seja, as bandas espectrais de infravermelho não são afetadas pela composição da mistura.

Este comportamento ocorre porque não houve interação específica entre a quitosana e o PLA e, portanto, este comportamento sugere uma certa imiscibilidade deste composto (SUYATMA *et al.*, 2004).

Figura 26: Espectro de FTIR comparando as quatro membranas



Fonte: Autor, 2023

Da mesma forma que para as amostras de quitosana e PLA, a adição de LZS não formou novos grupos funcionais. Observa-se apenas a sobreposição das bandas referentes aos materiais PLA, quitosana e LZS.

### 5.3.3 Comportamento térmico das membranas

A análise do comportamento térmico das membranas eletrofiadas é importante para se avaliar a estabilidade térmica das mesmas. Isso porque quando uma membrana é utilizada como biomaterial, ela deve ser capaz de suportar as condições ambientais e as condições do corpo humano, sem sofrer degradação ou perda de funcionalidade.

A exposição a temperaturas elevadas pode alterar as propriedades da membrana, como a porosidade, a espessura, a resistência mecânica e a capacidade de interação com as células do organismo. Além disso, a degradação térmica pode levar à liberação de subprodutos tóxicos, que podem causar danos às células e tecidos circundantes. Portanto, é essencial entender como as membranas eletrofiadas se comportam em diferentes condições de temperatura e como a estrutura e propriedades das membranas mudam em resposta ao aumento da temperatura. As membranas obtidas usando PLA, PLA/Q17, PLA/Q17/LZS0,5 e PLA/Q17/LZS1 foram analisadas.

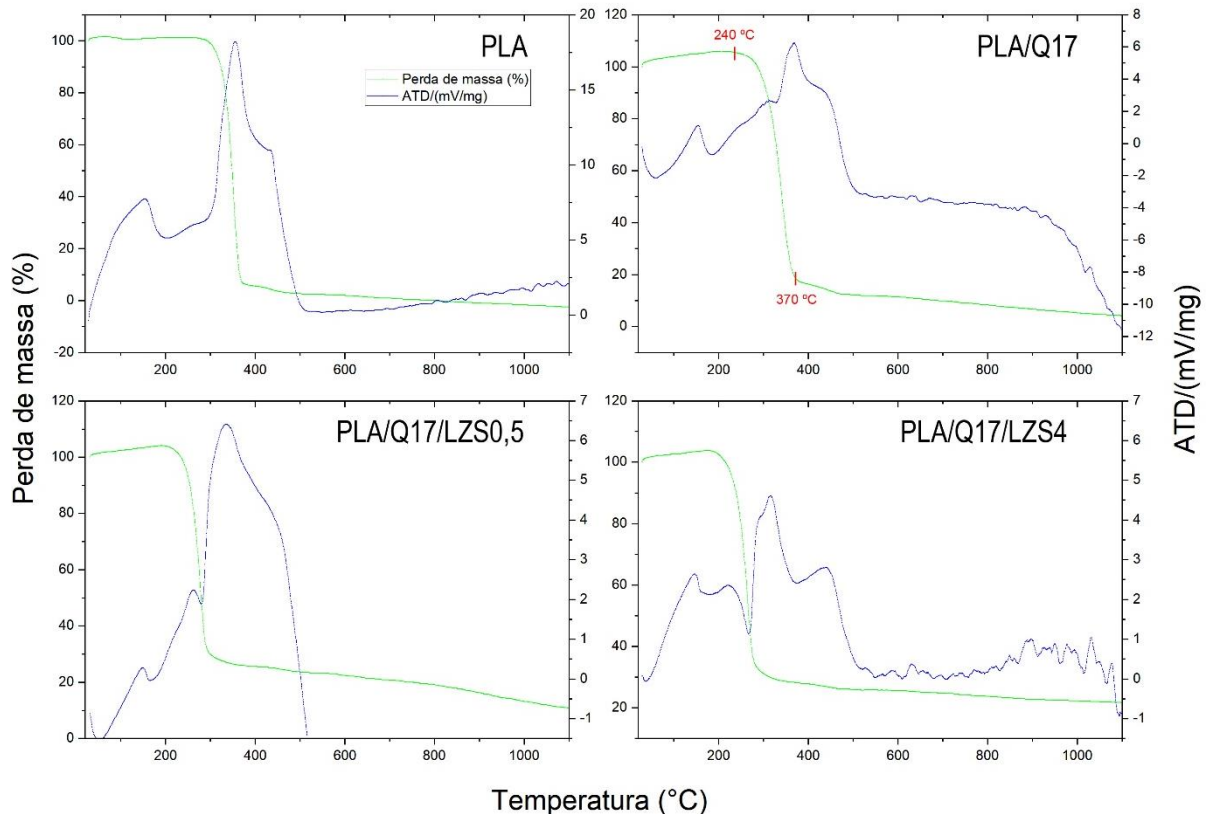
A Figura 27 mostra que para a membrana contendo somente PLA, não houve mudanças significativas em comparação com a análise feita do material puro, mostrado na Figura 13 e já discutida anteriormente. Ou seja, não houve degradação até 45 °C, valores acima da temperatura do corpo humano. Ainda é possível afirmar ao comparar os resultados do PLA puro com as membranas de PLA, que o processo de eletrofiação não alterou as características do polímero.

Para a membrana composta de PLA e quitosana, foi observado uma queda de temperatura para a estabilidade térmica em relação à membrana de PLA puro. A estabilidade térmica foi até a temperatura de 240 °C, logo após segue com uma rápida perda da massa que vai até a temperatura de 370 °C. Esses valores, tanto da estabilidade térmica quanto da perda de massa, que ficaram diferentes entre as duas membranas, podem ser atribuídos à degradação da estrutura do sacarídeo (quitosana), que por volta de 300 °C inicia degradação da estrutura sacarídea da molécula, incluindo a desidratação dos anéis sacarídeos e a polimerização e decomposição das unidades acetiladas e desacetiladas e isso pode ter afetado a estabilidade térmica na blenda PLA-quitosana (PAULINO *et al.*, 2006; ANDRADE; LADCHUMANANANDASIVAM; NASCIMENTO, 2010). Os eventos exotérmicos já foram discutidos anteriormente.

A Figura 27 mostra ainda as duas membranas compostas com LZS. Os gráficos mostram que não houve interferência com a presença do LZS; essa não identificação do LZS aconteceu pela pequena quantidade adicionada e provavelmente deve estar junto ao ruído identificado no gráfico. É possível, porém, se identificar pontos característicos da quitosana, como os eventos endotérmicos, já discutidos anteriormente.

Vale ressaltar que o objetivo da análise era comprovar que as membranas suportariam a temperatura do corpo humano, que é em torno de 37° C; assim, todas as membranas foram aprovadas.

Figura 27: Análise térmica das 4 membranas



Fonte: Autor, 2023

## 5.5 BIOATIVIDADE, BIODEGRADABILIDADE E CITOTOXICIDADE DAS MEMBRANAS DE PLA + QUITOSANA + LZS

### 5.5.1 Bioatividade

A bioatividade é uma propriedade dos materiais que se refere à capacidade de interagir com o ambiente biológico, estimulando respostas favoráveis no organismo. Um material bioativo é capaz de promover interações específicas com células, tecidos ou fluidos biológicos, desencadeando processos biológicos benéficos, como adesão celular, proliferação, diferenciação celular e formação de tecido (ANDRADE; DOMINGUES, 2006). A Figura 28 mostra os espectros de FTIR obtidos a partir das membranas de PLA, PLA/quitosana, PLA/quitosana/LZS0,5 e PLA/quitosana/LZS1 após os diferentes tempos de imersão em SBF. Conforme observado, não houve muitas mudanças significativas com o passar dos dias em exposição ao SBF. Porém o objetivo principal deste teste é a comprovação da

presença dos grupos funcionais característicos de fosfatos, como a hidroxiapatita (HA), que podem se depositar ao longo do tempo, demonstrando a bioatividade da membrana. As bandas que caracterizam a fase das apatitas estão geralmente entre: 491 até 563  $\text{cm}^{-1}$ , indicando deformação, e 1043 até 1088  $\text{cm}^{-1}$ , indicando o estiramento dos grupos fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), conforme mostra Richards *et al.* (2018). A banda referente ao estiramento do ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) é revelada em 1090 e 1044  $\text{cm}^{-1}$  nos gráficos, e o pico referente à deformação do ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) está em 491  $\text{cm}^{-1}$ ; estes valores são condizentes com Camargo *et al.* (2014), porém estas bandas algumas vezes podem estar mascaradas no gráfico. Além disso, o teste de FTIR das amostras das membranas revelou também uma banda entre 3200 até 3500  $\text{cm}^{-1}$  em algumas amostras, que é característico de  $\text{H}_2\text{O}$  e relacionado com a hidroxiapatita, pois são relacionadas com a absorção do estiramento (O–H) do OH estrutural e da  $\text{H}_2\text{O}$  adsorvida, (NETO, 2009). E em 1650  $\text{cm}^{-1}$  é referente à deformação angular assimétrica fora do plano de (H–O–H), causado pela adsorção de  $\text{H}_2\text{O}$  também relacionado a hidroxiapatita conforme (SANTOS *et al.*, 2005).

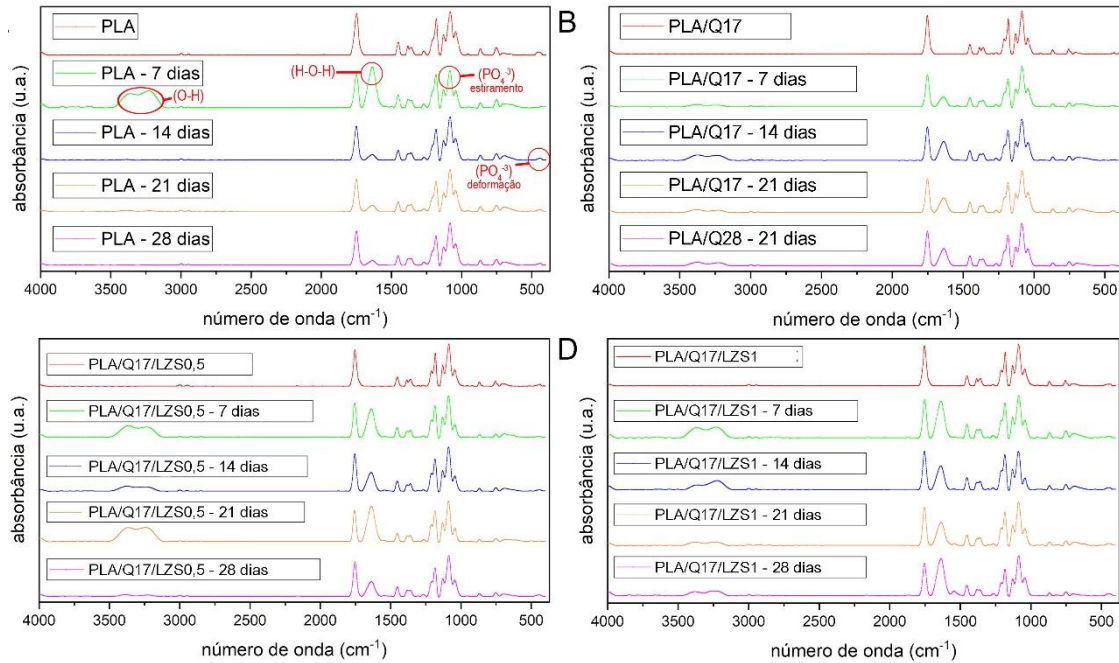
Desta forma ao observar os resultados de FTIR obtidos, percebe-se que as membranas de PLA puro já tiveram alguma atividade de bioatividade, já que há pequenas bandas referentes a hidroxiapatita, o que já era esperado, já que a literatura reporta alguma bioatividade neste material (SAINI; ARORA; KUMAR, 2016).

Com a adição de quitosana, percebe-se claramente um aumento das bandas referentes a hidroxiapatita, principalmente aumentando com o aumento do tempo de exposição ao SBF.

Por fim, a adição de LZS nas membranas claramente aumentou a intensidade das bandas de hidroxiapatita desde os tempos mais curtos de exposição, confirmando que há bioatividade desde os 7 dias de exposição.

Tais resultados indicam uma interação favorável do material com o ambiente biológico desde as fases iniciais de implantação. Isso pode promover a regeneração de tecidos, melhorar a integração com o tecido circundante, acelerar a cicatrização e aumentar a biocompatibilidade do material, contribuindo para melhores resultados clínicos em aplicações biomédicas e de engenharia de tecidos.

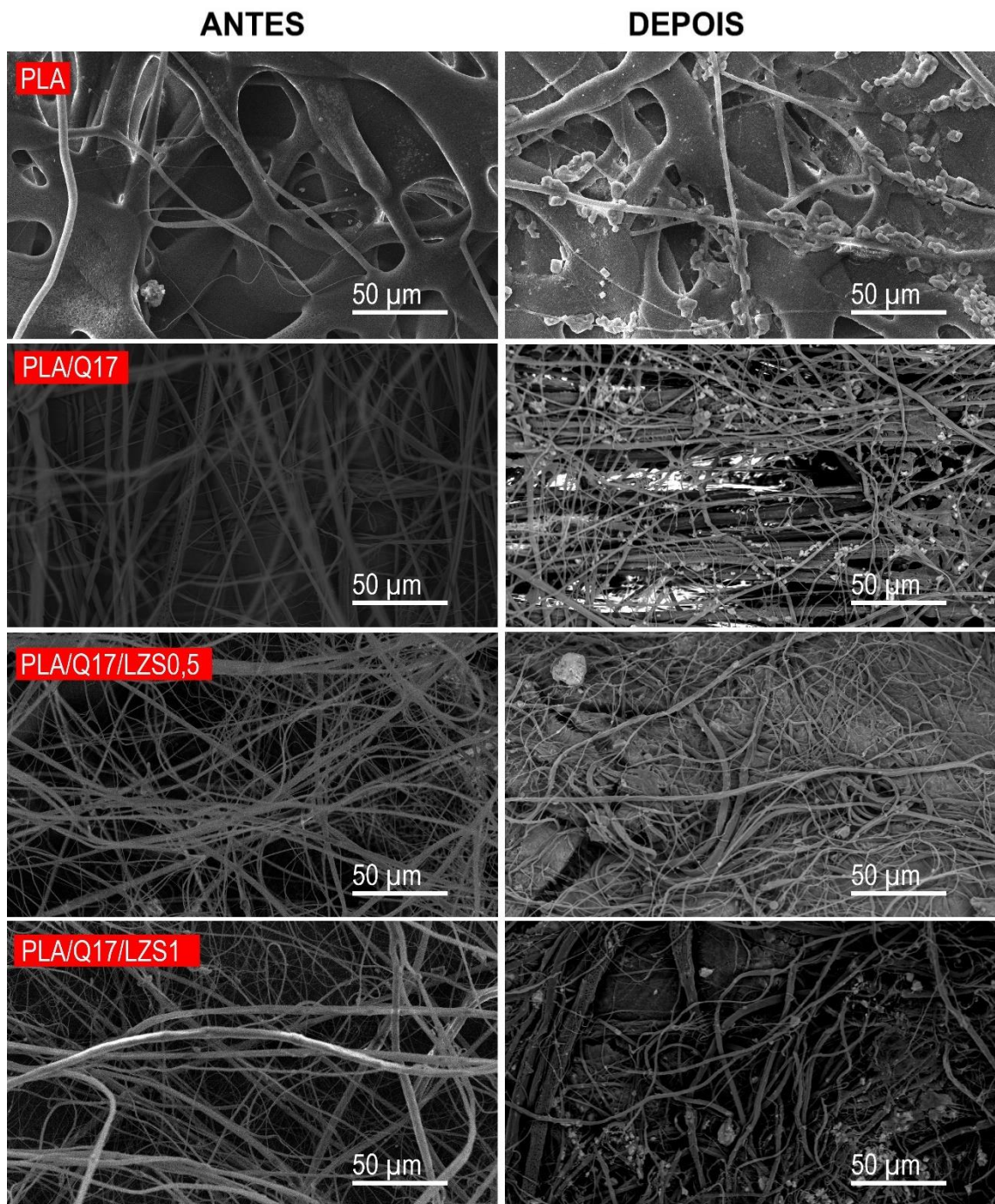
Figura 28: Espectros de FTIR para as 4 membranas com 0, 7, 14, 21 e 28 dias



Para confirmar a formação de hidroxiapatita na superfície das amostras, imagens de MEV foram realizadas nas membranas de PLA, PLA/Q17, PLA/Q17/LZS0,5 e PLA/Q17/LZS1 antes e após 28 dias em exposição ao SBF. Em uma análise visual, é possível perceber facilmente a diferença entre as membranas antes e depois do SBF, pois claramente as membranas expostas apresentaram material particulado presente entre as fibras que indicam a formação da hidroxiapatita.

Merecem destaque as amostras das membranas contendo LZS. É possível perceber presença de particulados referente ao LZS, mas também a presença de muitos materiais particulados que provavelmente são referentes à hidroxiapatita. Embora todos os materiais usados na produção destas membranas tenham a bioatividade, estudos anteriores (LEE *et al.*, 2009; POSSOLI *et al.*, 2019) mostram que a sílica, que neste trabalho está contida no LZS, tem uma excelente capacidade de formação de apatita em SBF, assim como o lítio com íon promotor da bioatividade. Assim sendo, a maior formação da hidroxiapatita pode ser atribuída aos grupos silanol que atraem íons de cálcio e, logo após, seguido pela deposição de ânions como fosfato e carbonato (BOHNER; LEMAITRE, 2009), que participam do processo de formação da hidroxiapatita em vidros bioativos.

Figura 29: Micrografias obtidas por MEV com o antes e depois da exposição das 4 membranas com 28 dias em SBF

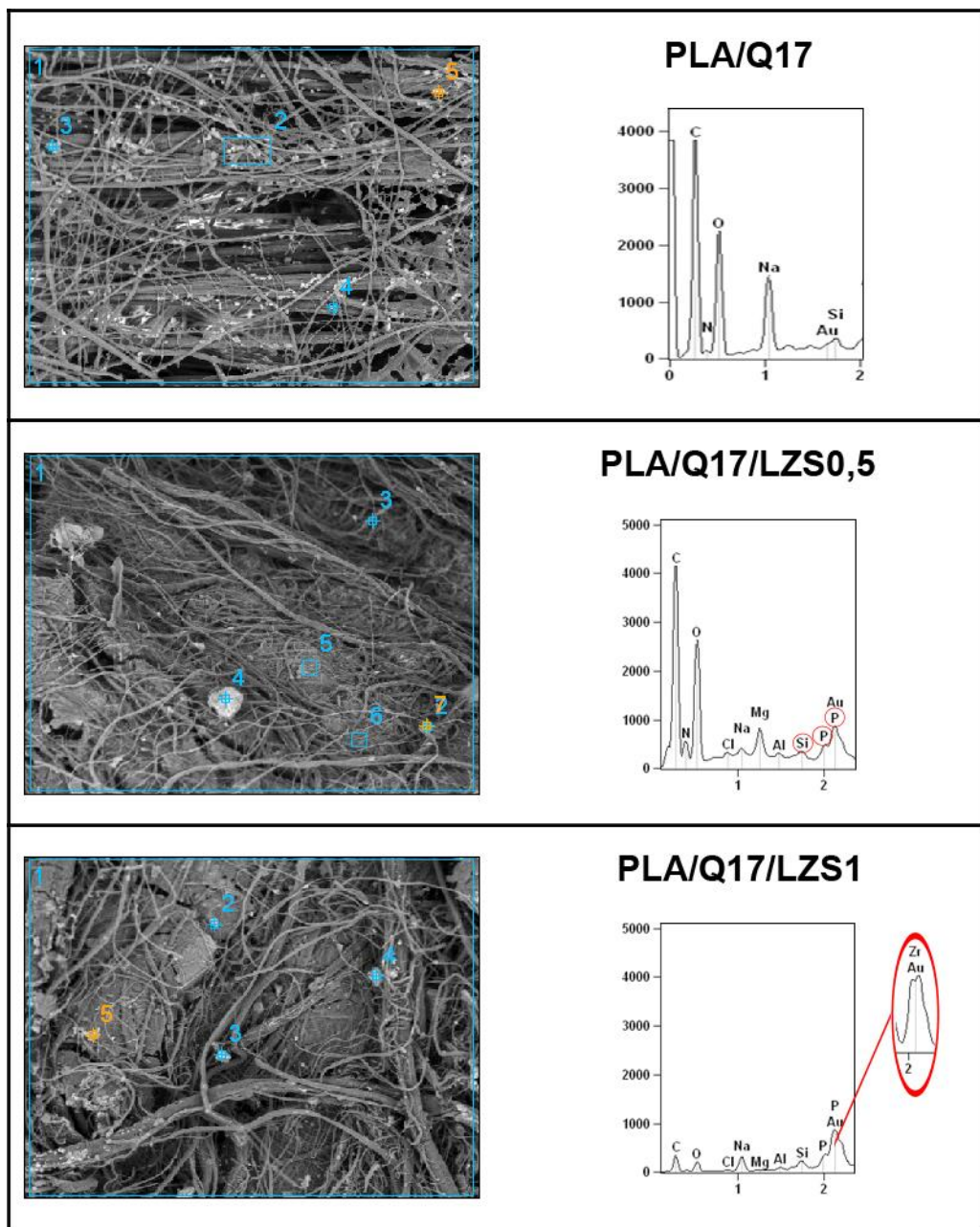


Fonte: Autor, 2023

Para confirmar a presença de cálcio e fósforo nas amostras, a análise química pontual foi realizada. A Figura 30 mostra o resultado de EDS nas três membranas. A caracterização por EDS demonstrou na membrana (A), a presença dos elementos químicos presentes na quitosana e PLA (O, C, N) conforme sugere (CALIMAN, 2011;

SOUZA; BORGES; PRADO, 2021). A presença do fósforo nas membranas (B) e (C) que contém o vidro bioativo LSZ, mostra a presença da hidroxiapatita. Podemos confirmar a presença do LZS nestas duas membranas com a identificação dos elementos químicos (Si e Zr).

Figura 30: Micrografia das 4 membranas feita no MEV com EDS após a exposição de 28 dias em SBF, ao lado o gráfico obtido por EDS identificando os elementos presentes.



Fonte: Autor, 2023

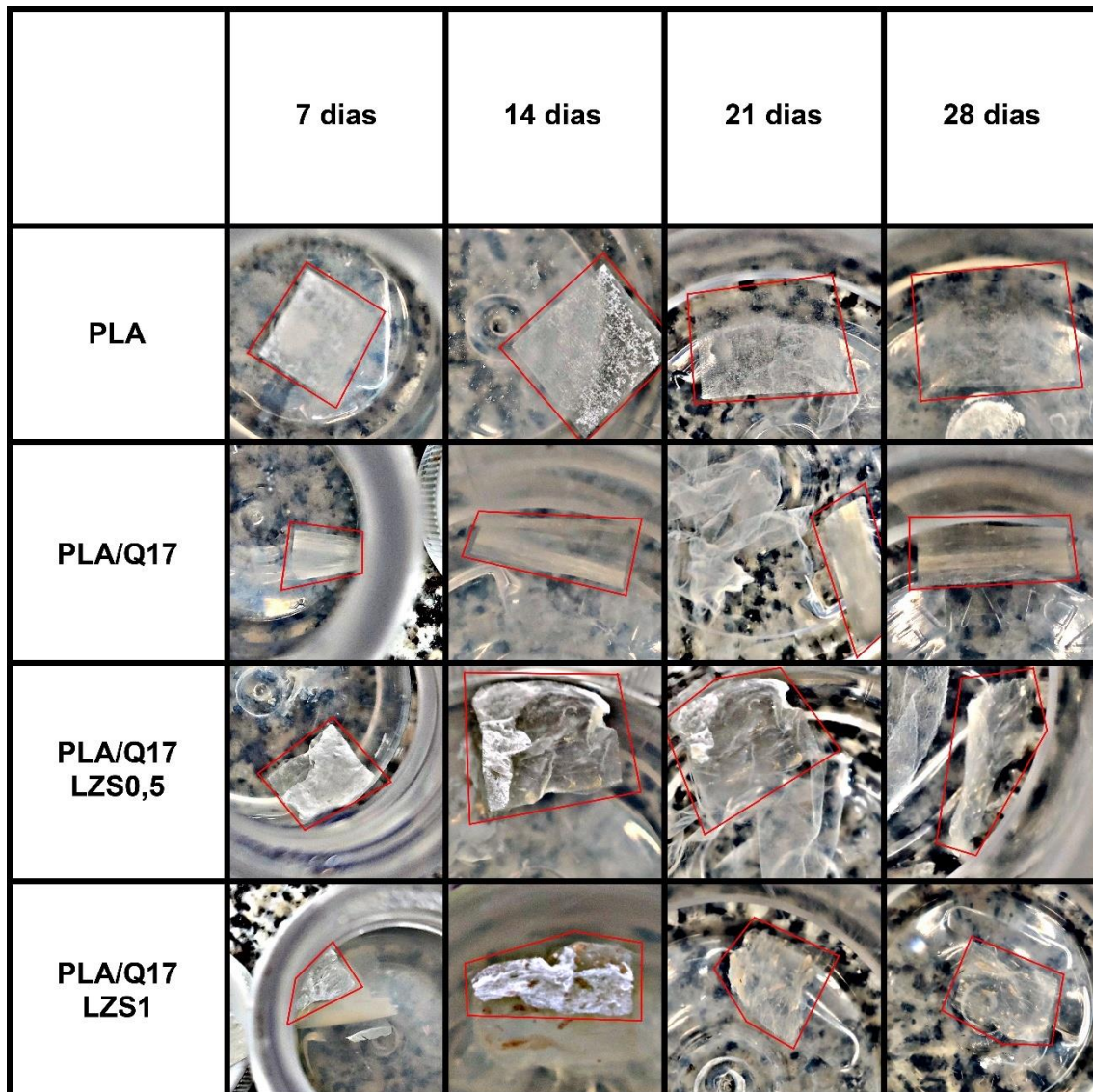
### 5.5.2 Biodegradabilidade

Nas micrografias das membranas expostas em fluido corpóreo simulado (SBF) obtidas por MEV na Figura 30, observa-se que há uma degradação visual das amostras. Este fato era esperado, já que tanto o PLA quanto a quitosana são biodegradáveis e em biomateriais considerados como bioabsorvíveis (SPIN-NETO *et al.*, 2008; GONZAGA; SOUZA, 2021)

A Figura 31 mostra fotografias que também evidenciam a degradação do PLA ao longo do tempo de exposição ao SBF. A degradação do PLA ocorre por meio de processos químicos e biológicos. Quando exposto ao SBF, o PLA pode sofrer hidrólise, que é a quebra das ligações éster nas cadeias poliméricas na presença de água. Ao longo do tempo de exposição ao SBF, a degradação do PLA resulta na redução do peso molecular do polímero, o que afeta suas propriedades físicas e mecânicas e, por isso, nas imagens de MEV e na análise visual das fotografias se observa uma degradação. A estrutura polimérica do PLA é gradualmente quebrada em segmentos menores, até que o material seja completamente metabolizado e absorvido pelo organismo.

É possível perceber também, a partir dos resultados, que as membranas contendo quitosana não tiveram uma degradação total nesse período de tempo. Isso pode ser por causa do grau de desacetilação da quitosana. Quitosana com maior grau de desatilação, ou seja, acima de 85%, apresenta menor degradação em meio aquoso e degradará após em um tempo maior; por outro lado, o grau de desacetilação entre 65 e 82% leva a uma degradação mais rápida (TOMIHATA; IKADA, 1997; DORATI *et al.*, 2018). O grau de desacetilação da quitosana usada para este trabalho foi de  $\geq 75\%$ .

Figura 31: Imagens das membranas expostas em fluido corpóreo simulado (SBF) com 7, 14, 21 e 28 dias



Fonte: Autor, 2023

A fim de se avaliar a perda da massa ao longo dos 28 dias de imersão em SBF, elas foram pesadas antes de serem colocadas no líquido e após os 28 dias depois de secarem. Estes valores estão descritos na Tabela 15 com a perda em massa e a massa resultante expressas em porcentagem. A partir dos resultados, é possível perceber que após os 28 dias, as membranas tiveram uma degradação acima de 94,14%, o que já era esperado, pois o PLA é biodegradável e bioabsorvível (LANAO et al., 2013). A adição de quitosana aumentou ainda mais a degradação, o que também era esperado (RIZAL *et al.*, 2021), assim como o LZS. O LZS, por sua vez, tem conhecidamente uma perda de massa com o passar do tempo devido à lixiviação

dos íons  $\text{Si}^+$  e  $\text{Li}^+$ , conforme relatado por Possoli (2019). Esses íons são responsáveis pelo aumento da bioatividade nas membranas, observado no FTIR.

Tabela 15: Valores dos pesos das membranas antes e após os 28 dias em (SBF)

<b>Membrana</b>	<b>Perda em massa (%) (SBF)</b>	<b>Massa resultante (%)</b>
<b>PLA</b>	94,14	5,86
<b>PLA/quitosana</b>	96,71	3,29
<b>PLA/quitosana/LZS 0,5</b>	99,25	0,75
<b>PLA/quitosana/LZS 1</b>	98,75	1,25

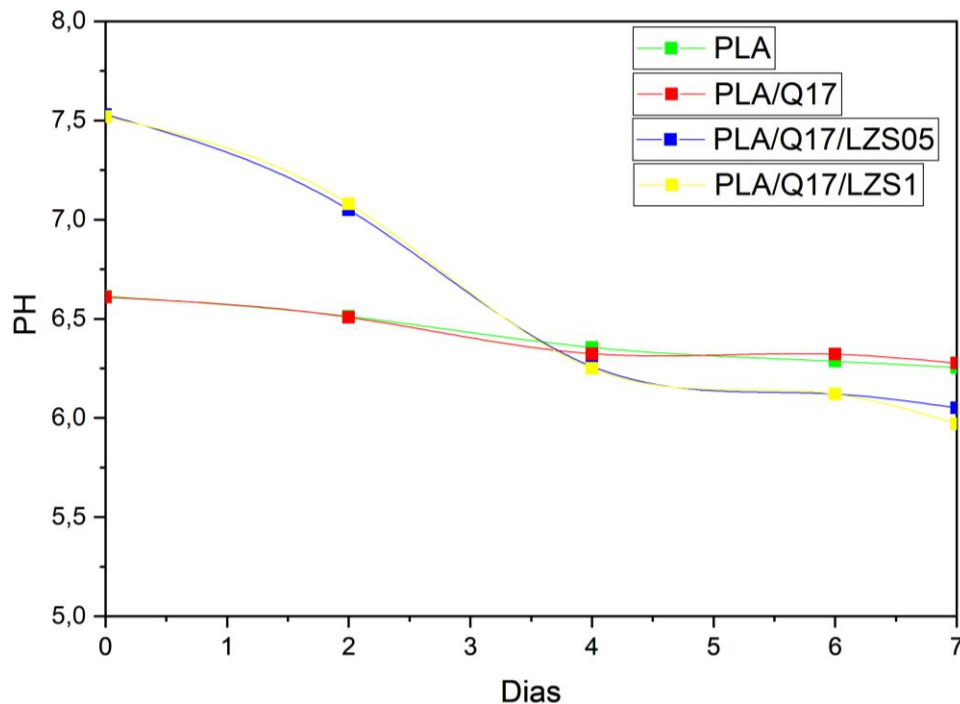
Fonte: Autor, 2023

Durante o tempo de exposição, o pH foi medido e acompanhado durante uma semana, antes da troca do SBF. O SBF era trocado a cada 7 dias para evitar saturação. Os resultados são apresentados na Figura 32. Após uma semana, os resultados finais do pH foram respectivamente  $5,85 \pm 0,07$ ;  $5,95 \pm 0,18$ ;  $6,00 \pm 0,17$ ;  $5,97 \pm 0,20$  para as membranas de PLA, PLA/quitosana, PLA/quitosana/LZS 0,5 e PLA/quitosana/LZS 1.

Sabendo-se que o pH partiu de 7,41, que é o pH do SBF e dos fluidos corporais, observa-se que houve uma diminuição do pH. Esta diminuição do pH, tornando o meio um pouco mais ácido, ocorreu devido à degradação do material. Este comportamento detectado indica que os oligômeros do polímero começam a se tornar solúveis durante a hidrólise e, portanto, produzem subprodutos que tornam a solução mais ácida, uma vez que a degradação do PLA libera o ácido lático (GRANCIANINOV *et al.*, 2019). A hidrólise é responsável pela degradação inicial do PLA. A criação dos oligômeros e monômeros de ácido lático se deve à degradação que ocorre dentro e na superfície do polímero. Além disso, a difusão de água degrada a microestrutura do polímero ao formar cavidades internas (MEDEIROS, 2018).

Apesar de estudos mais aprofundados serem necessários, sabe-se que o ácido lático não é tóxico ao corpo humano e que o PLA já é utilizado como implante no corpo humano há bastante tempo (GRANDE; CARVALHO; PESSAN, 2010).

Figura 32: Acompanhamento do pH medido a cada dois dias durante uma semana de exposição das membranas ao SBF



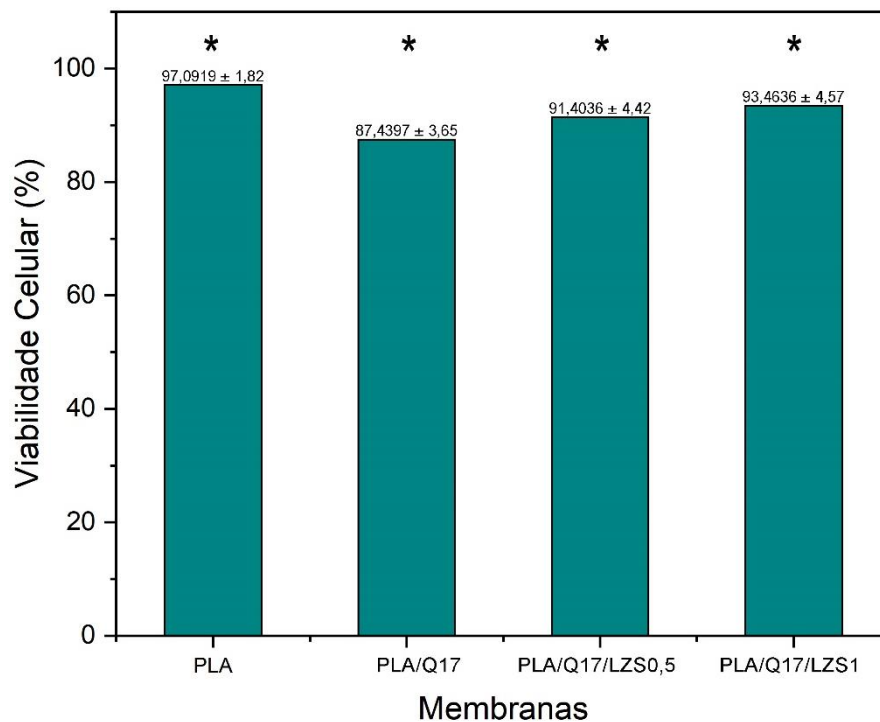
Fonte: Autor, 2023

### 5.3.7 Citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* é essencial para determinar se as membranas eletrofiadas são seguras e biocompatíveis para uso como biomateriais na regeneração de cartilagem. Isso garante que o material não cause danos celulares e não interfira nas funções celulares necessárias para o processo de regeneração. Os resultados do teste de citotoxicidade para as membranas de PLA, PLA e quitosana e PLA, quitosana e LZS, utilizando células fibroblásticas, são apresentados na Figura 33. Observa-se que a viabilidade das células ultrapassou 75% em todas as concentrações e condições, ou seja, não apresentaram citotoxicidade. Para a membrana com somente PLA, a viabilidade ultrapassou 97%, mostrando um resultado muito favorável e condizente com os resultados existentes na literatura (MÜLLER *et al.*, 1996; JEONG *et al.*, 2018). Na membrana composta por PLA/quitosana, a viabilidade reduziu para 87%, porém esta redução não inviabilizou esta membrana, pois a viabilidade se manteve acima de 75%. Por fim, as membranas que contêm PLA/quitosana/LZS apresentaram um aumento acima de 91% na viabilidade celular. Esse resultado demonstra a importância do uso do vidro biotivo LZS, pois seu uso na

membrana, além de aumentar a bioatividade do biomaterial, melhorou significativamente a viabilidade celular se comparada ao teste da membrana de PLA e quitosana, chegando a ultrapassar 93% para a membrana com 1% de LZS.

Figura 33: Viabilidade celular em culturas incubadas com as membranas. Cada poço recebe um pedaço de membrana e as células do poço ficam em contato com ela por 48 h. Para cada material e período  $n = 4$ . Análise estatística utilizada ANOVA de 1 fator,  $p < 0,05$ .



Fonte: Autor, 2023

A alta viabilidade celular observada neste estudo é importante porque indica que as membranas têm potencial para serem usadas em aplicações de medicina regenerativa sem causar danos às células circundantes.

Em resumo, esses resultados sugerem que as membranas produzidas com PLA, quitosana e LZS com alta viabilidade celular e diferentes porosidades podem ser usadas como uma opção potencialmente promissora para reparo/regeneração de cartilagem. No entanto, mais estudos e ensaios clínicos ainda são necessários para validar a eficácia e segurança desses materiais.

## 6 CONCLUSÃO

Foram desenvolvidas com sucesso membranas eletrofiadas compostas com PLA, quitosana e vidro bioativo do sistema LZS.

As variáveis do processo mais importantes foram a tensão e a quantidade de quitosana incorporada nas membranas. A tensão mais adequada, a distância entre eletrodos e a vazão necessária para eletrofiar as soluções produzidas e produzir membranas livres de defeitos foram de 15 kV, 15 cm e 0,15 mL/min, respectivamente.

Foi possível adicionar 17% de quitosana às membranas, o que ocasionou modificações significativas principalmente nas características morfológicas das membranas. Com a incorporação da quitosana, as membranas tiveram um aumento para até 50% de porosidade, com tamanho de poros de até 29  $\mu\text{m}$  e diâmetro de fibras variando de 1,18 a 3,47  $\mu\text{m}$ , dependendo da quantidade de quitosana adicionada. A adição da quitosana tornou as membranas hidrofílicas.

Por fim, com a adição do LZS nas membranas de PLA e quitosana, pode-se perceber um aumento da bioatividade, comprovada pela formação de hidroxiapatita. As membranas produzidas não foram citotóxicas pra células de fibroblastos e são biodegradáveis/bioabsorvíveis.

Para trabalhos futuros, as membranas de PLA/Q17/LZS0,5 demonstraram ter grande potencial de utilização clínica em especial para a regeneração da cartilagem hialina.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, S. et al. A review on chitosan centred scaffolds and their applications in tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 849–862, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.176>>.
- ALVES, A. K.; BERGMANN, C. P. **Obtenção de micro e nanofibras de TiO<sub>2</sub> por electrospinning: Caracterização de propriedades e atividades fotocatalíticas.** 2008. 2008.
- ANDRADE, Â. L.; DOMINGUES, R. Z. Cerâmicas bioativas - Estado da arte. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 100–104, 2006.
- ANDRADE, S. M. B. de; LADCHUMANANANDASIVAM, R.; NASCIMENTO, R. M. Extração E Caracterização De Quitina E Quitosana E a Sua UTILIZAÇÃO NA FABRICAÇÃO DE NANOFIBRAS. n. 1, 2010.
- ANITHA, A. et al. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 9, p. 1644–1667, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.02.008>>.
- ARCARO, S. **SÍNTESE, PROCESSAMENTO COLOIDAL E SINTERIZAÇÃO DE COMPÓSITOS NANOESTRUTURADOS DO SISTEMA LZS (Li<sub>2</sub>O-ZrO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub>) + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.** 2016. 2016. Disponível em: <<https://www.infodesign.org.br/infodesign/article/view/355%0Ahttp://www.abergo.org.br/revista/index.php/ae/article/view/731%0Ahttp://www.abergo.org.br/revista/index.php/ae/article/view/269%0Ahttp://www.abergo.org.br/revista/index.php/ae/article/view/106>>.
- ASSIS, O. B. G.; VALMIR L. DA, S. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros**, v. 13, n. 4, p. 223–228, 2003.
- AUGUSTINE, R. et al. Electrospun chitosan membranes containing bioactive and therapeutic agents for enhanced wound healing. **International Journal of Biological**

**Macromolecules**, v. 156, p. 153–170, 2020.

AVÉROUS, L. Biodegradable multiphase systems based on plasticized starch: A review. **Journal of Macromolecular Science - Polymer Reviews**, v. 44, n. 3, p. 231–274, 2004.

BALAKRISHNAN, B.; JOSHI, N.; BANERJEE, R. Borate aided Schiff's base formation yields in situ gelling hydrogels for cartilage regeneration. **Journal of Materials Chemistry B**, p. 5564–5577, 2013.

BEAKE, B. D.; LING, J. S. G.; LEGGETT, G. J. Correlation of friction, adhesion, wettability and surface chemistry after argon plasma treatment of poly(ethylene terephthalate). **Journal of Materials Chemistry**, v. 8, n. 12, p. 2845–2854, 1998.

BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. **Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique** *Biotechnology Advances*, 2010. .

BOHNER, M.; LEMAITRE, J. Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? **Biomaterials**, v. 30, n. 12, p. 2175–2179, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.01.008>>.

BRAUER, D. S. Bioactive glasses - Structure and properties. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 54, n. 14, p. 4160–4181, 2015.

BROWN, R. F. et al. Growth and differentiation of osteoblastic cells on 13-93 bioactive glass fibers and scaffolds. **Acta Biomaterialia**, v. 4, n. 2, p. 387–396, 2008.

BUNPETCH, V. et al. **Silicate-based bioceramic scaffolds for dual-lineage regeneration of osteochondral defect** *Biomaterials*, 2019. .

BURCZAK, K.; GAMIAN, E.; KOCHMAN, A. Long-term in vivo performance and biocompatibility of poly(vinyl alcohol) hydrogel macrocapsules for hybrid-type artificial pancreas. **Biomaterials**, v. 17, n. 24, p. 1–6, 1996. Disponível em: <<papers2://publication/uuid/5A4BA949-9A12-4E58-B892-BE4DB0F551B2>>.

CALIMAN, L. B. Síntese E Caracterização De Hidroxiapatita Obtida a Partir Da Casca De Ovo De Avestruz. v. 3, n. 2017, p. 88, 2011. Disponível em:

<[http://propemm.vi.ifes.edu.br/wp-content/uploads/2012/05/Síntese-e-caracterização-de-Hidroxiapatita-obtida-a-partir-da-casca-de-ovo-de-avestruz\\_Lorena-Batista.pdf](http://propemm.vi.ifes.edu.br/wp-content/uploads/2012/05/Síntese-e-caracterização-de-Hidroxiapatita-obtida-a-partir-da-casca-de-ovo-de-avestruz_Lorena-Batista.pdf)>.

CAMARGO, C. L. et al. Síntese De Hidroxiapatita Por Precipitação Em Diferentes Temperaturas. **XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB 2014**, p. 1333–1336, 2014.

CAMPANINI, L. A.; SOUZA, C. W. O. de; FILHO, O. P. **Avaliação da atividade bactericida do biovidro F18 e F18 com prata para aplicações médicas**. 2015. 2015. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/7319>>.

CAVALHEIRO, G. et al. **Influence of experimental factors on results of thermogravimetric analysis** *Química Nova*, 1995. .

CHENG, A. et al. Advances in Porous Scaffold Design for Bone and Cartilage. **Tissue Engineering**, v. 25, n. 1, p. 14–29, 2019.

CHRONAKIS, I. S. Novel nanocomposites and nanoceramics based on polymer nanofibers using electrospinning process - A review. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 167, n. 2–3, p. 283–293, 2005.

CIOCCA, B. E. et al. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DA ELETROFIAÇÃO NA SÍNTESE DE FIBRAS DE POLIÁCIDO LÁCTICO ( PLA ). p. 214–220, 2019.

COOLS, P.; DE GEYTER, N.; MORENT, R. **PLA enhanced via plasma technology: A review**. [s.l: s.n.]

COSTA, R. G. F. et al. Electrospinning of polymers in solution. Part II: Applications and perspectives | Eletrofiação de polímeros em solução. Parte II: Aplicações e perspectivas. **Polimeros**, v. 22, n. 2, p. 178–185, 2012.

CRUZ, I. B. M. da et al. Potencial regenerativo do tecido cartilaginoso por células-tronco mesenquimais: atualização, limitações e desafios. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 52, n. 1, p. 2–10, 2017.

CRUZ, I. C. F. dos R. da; ESPANHA, M. M. M. R.; MARCONCIN, P. E. P. **ANÁLISE**

**DA AUTOEFICÁCIA PARA O EXERCÍCIO FÍSICO EM PARTICIPANTES DO PROGRAMA PLE<sup>2</sup>NO – osteoartrose e / ou prótese do joelho e / ou anca**  
**Relatório de Estágio elaborado com vista à obtenção do Grau de Mestre em Exercício e Saúde.** 2023. 2023.

DA SILVA, V. A. O. P. et al. Lab-Made 3D-Printed Contact Angle Measurement Adjustable Holder. **Química Nova**, v. 43, n. 9, p. 1312–1319, 2020.

DANG, H. P. et al. 3D printed dual macro-, microscale porous network as a tissue engineering scaffold with drug delivering function. **Biofabrication**, v. 11, n. 3, p. 035014, 26 abr. 2019. Disponível em:  
 <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/2053-1583/abe778>>.

DE AZA, P. N. et al. **Cerámica y Vidrio Bioactive glasses and glass-ceramics.** [s.l: s.n.].

DE GIROLAMO, L. et al. Acetabular Chondral Lesions Associated With Femoroacetabular Impingement Treated by Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis or Microfracture: A Comparative Study at 8-Year Follow-Up. **Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery**, v. 34, n. 11, p. 3012–3023, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.arthro.2018.05.035>>.

DE MOURA, M. R.; AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H. C. Preparation of chitosan nanoparticles using methacrylic acid. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 321, n. 2, p. 477–483, 2008a.

DE MOURA, M. R.; AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H. C. Preparation of chitosan nanoparticles using methacrylic acid. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 321, n. 2, p. 477–483, maio 2008b. Disponível em:  
 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979708001549>>.

DENG, C. et al. 3D Printing of Bilineage Constructive Biomaterials for Bone and Cartilage Regeneration. **Advanced Functional Materials**, v. 27, n. 36, 2017.

DENG, Y.; KUIPER, J. **Functional 3D tissue engineering scaffolds.** [s.l: s.n.]

DO NASCIMENTO, M. H. M.; LOMBELLO, C. B. Hidrogéis a base de ácido

hialurônico e quitosana para engenharia de tecido cartilaginoso. **Polimeros**, v. 26, n. 4, p. 360–370, 2016.

DORATI, R. et al. Study on hydrophilicity and degradability of chitosan/poly(lactide-co-polycaprolactone) nanofibre blend electrospun membrane. **Carbohydrate Polymers**, v. 199, p. 150–160, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.050>>.

DORJ, B. et al. A novel therapeutic design of microporous-structured biopolymer scaffolds for drug loading and delivery. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 3, p. 1238–1250, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.11.002>>.

DOSHI, J.; RENEKER, D. H. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. **Journal of Electrostatics**, v. 3, p. 1698–1703, 1995.

EFTEKHARI, A. et al. The Use of Nanomaterials in Tissue Engineering for Cartilage Regeneration ; Current Approaches and Future Perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, 2020.

EVIANA PUTRI, N. R. et al. Preparation of PLGA-collagen hybrid scaffolds with controlled pore structures for cartilage tissue engineering. **Progress in Natural Science: Materials International**, v. 30, n. 5, p. 642–650, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2020.07.003>>.

FIDÉLES, T. B.; FOOK, M. V. L.; TOMÁS, H. M. P. G. **FILMES RETICULADOS DE QUITOSANA PARA APLICAÇÃO COMO BIOMATERIAL**. 2010. 2010.

FRÁGUAS, R. M. et al. Preparo e caracterização de filmes comestíveis de quitosana. **Polímeros**, v. 25, n. spe, p. 48–53, dez. 2015. Disponível em: <<https://www.scientific.net/AMM.291-294.778>>.

FRANK, L. A. et al. Chitosan as a coating material for nanoparticles intended for biomedical applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 147, n. November 2019, p. 104459, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104459>>.

GAO, Q. et al. Direct synthesis with melt polycondensation and microstructure

analysis of poly(L-lactic acid-co-glycolic acid). **Polymer Journal**, v. 34, n. 11, p. 786–793, 2002.

GARCÍA-GARETA, E.; COATHUP, M. J.; BLUNN, G. W. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. **Bone**, v. 81, p. 112–121, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2015.07.007>>.

GENG, X.; KWON, O. H.; JANG, J. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. **Biomaterials**, v. 26, n. 27, p. 5427–5432, 2005.

GERHARDT, L. C.; BOCCACCINI, A. R. Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. **Materials**, v. 3, n. 7, p. 3867–3910, 2010.

GÓMEZ, S. et al. Design and properties of 3D scaffolds for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 42, p. 341–350, 2016.

GONZAGA, G. L.; SOUZA, A. M. C. de. **COMPORTAMENTO DA BIODEGRADAÇÃO DE AMOSTRAS DE PLA NATURAL E PIGMENTADO OBTIDAS POR IMPRESSÃO 3D**. 2021. 2021.

GRANCIANINOV, K. J. S. et al. ESTUDO DA DEGRADAÇÃO IN VITRO DE IMPLANTE BIOABSORVÍVEL BASEADO NO POLÍMERO POLI ( ÁCIDO LÁCTICO ) PLA , PARA RECONSTRUÇÕES ÓSSEAS. p. 269–274, 2019.

GRANDE, R.; CARVALHO, A. J. F. de; PESSAN, L. A. **ESTUDO E DESENVOLVIMENTO DE BLENDS TERNÁRIAS BIODEGRADAVEIS A PARTIR DE POLI(ÁCIDO LÁCTICO), POLI(ALCOOL VINÍLICO) E QUITOSANA**. 2010. 2010.

GUPTA, B.; REVAGADE, N.; HILBORN, J. Poly(lactic acid) fiber: An overview. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 32, n. 4, p. 455–482, 2007.

HENCH, L. L. The future of bioactive ceramics. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, n. 2, 2015.

HENCH, L. L.; KOKUBO, T. Properties of bioactive glasses and glass-ceramics. In: **Handbook of Biomaterial Properties**. [s.l.] Springer US, 1998. p. 355–363.

HOLZAPFEL, B. M. et al. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 4, p. 581–603, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.009>>.

HOPPE, A.; GÜLDAL, N. S.; BOCCACCINI, A. R. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. **Biomaterials**, v. 32, n. 11, p. 2757–2774, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.004>>.

HUANG, B. et al. Polymer-ceramic composite scaffolds: The effect of hydroxyapatite and  $\beta$ -tri-calcium phosphate. **Materials**, v. 11, n. 1, 2018.

INANLI, A. G. et al. **The impact of chitosan on seafood quality and human health: A review** *Trends in Food Science and Technology*, 2020. .

ISO / FDIS 23317. Implants for surgery — In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials standardization. **2007**, v. 2007, p. 13, 2007.

JAKAB, K. et al. Non-medical applications of tissue engineering: biofabrication of a leather-like material. **Materials Today Sustainability**, v. 5, p. 1–26, 2019.

JANČÁŘ, J. et al. Mechanical response of porous scaffolds for cartilage engineering. **Physiological Research**, v. 56, n. SUPPL. 1, 2007.

JAYAKUMAR, R. et al. Synthesis of phosphorylated chitosan by novel method and its characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, n. 4, p. 335–339, 2008.

JEONG, H. et al. Mechanical properties and cytotoxicity of PLA/PCL films. **Biomedical Engineering Letters**, v. 8, n. 3, p. 267–272, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13534-018-0065-4>>.

JIANG, D.; NING, F. Fused filament fabrication of biodegradable PLA/316L composite scaffolds: Effects of metal particle content. **Procedia Manufacturing**, v. 48, p. 755–762, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.promfg.2020.05.110>>.

JONES, J. R. **Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids** *Acta Biomaterialia*, 2015. .

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica I**. [s.l: s.n.]

KANDELOUSI, P. S. et al. The effect of bioactive glass nanoparticles on polycaprolactone/chitosan scaffold: Melting enthalpy and cell viability. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 34, n. 1, p. 97–111, 2019.

KARABIYIK ACAR, Ö. et al. Chondro-inductive hyaluronic acid/chitosan coacervate-based scaffolds for cartilage tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 188, p. 300–312, out. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813021016366>>.

KARPSTEIN, A. **Cartilagem do Joelho - Clínica do Joelho**. Disponível em: <<https://www.clinicadojoelho.med.br/cartilagem-do-joelho/>>. Acesso em: 24 fev. 2022.

KAUR, G. et al. Review Article A review of bioactive glasses : Their structure , properties , fabrication , and apatite formation. p. 254–274, 2013.

KLEIVAITE, V.; MILAŠIUS, R. Electrospinning - 100 Years of Investigations and Still Open Questions of Web Structure Estimation. **Autex Research Journal**, v. 18, n. 4, 2018.

KOHANE, D. S.; LANGER, R. Polymeric biomaterials in tissue engineering. **Pediatric Research**, v. 63, n. 5, p. 487–491, 2008.

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

KOUCHAK, M. et al. Chitosan and polyvinyl alcohol composite films containing nitrofurazone: Preparation and evaluation. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 17, n. 1, p. 14–20, 2014.

KUNDU, B. et al. Development of new localized drug delivery system based on ceftriaxone-sulbactam composite drug impregnated porous hydroxyapatite: A

systematic approach for in vitro and in vivo animal trial. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 8, p. 1659–1676, 2010.

KUNTZLER, S. G.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. de. Development of electrospun nanofibers containing chitosan/PEO blend and phenolic compounds with antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 800–806, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.224>>.

LAIA, A. G. S. de; SÁ, M. A. de; PEREIRA, M. de M. **Caracterização estrutural e avaliação in vitro e in vivo do estímulo angiogênico do cobalto incorporado em vidro bioativo e desenvolvimento de scaffolds híbridos de poli (álcool vinílico) / vidro bioativo contendo cobalto**. 2020. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1843/36452>>.

LANAO, R. P. F. et al. Physicochemical properties and applications of poly(lactic-co-glycolic acid) for use in bone regeneration. **Tissue Engineering - Part B: Reviews**, v. 19, n. 4, p. 380–390, 2013.

LARRY, R.; HENCH, L. The story of Bioglass. **J Mater Sci: Mater Med**, v. 17, n. 11, p. 967–978, nov. 2006.

LEE, E. J. et al. Membrane of hybrid chitosan-silica xerogel for guided bone regeneration. **Biomaterials**, v. 30, n. 5, p. 743–750, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.10.025>>.

LEMOS, L. Síntese por Electrospinning e Caracterização Microestrutural de Fibras de Titanato de Bário e Estrôncio Síntese por Electrospinning e Caracterização Microestrutural de Fibras de Titanato de Bário e Estrôncio. 2017.

LI, Q. et al. 3D printed silk-gelatin hydrogel scaffold with different porous structure and cell seeding strategy for cartilage regeneration. **Bioactive Materials**, v. 6, n. 10, p. 3396–3410, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.03.013>>.

LI, Y. et al. Three-Dimensional Porous Scaffolds with Biomimetic Microarchitecture and Bioactivity for Cartilage Tissue Engineering. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, 2019.

- LIU, H. et al. Porous poly (DL-lactic acid) modified chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 19, n. 4, p. 303–322, 2005.
- LIU, R. et al. Preparation of insulin-loaded PLA/PLGA microcapsules by a novel membrane emulsification method and its release in vitro. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 51, n. 1, p. 30–38, 2006.
- LU, X.; WANG, C.; WEI, Y. One-dimensional composite nanomaterials: Synthesis by electrospinning and their applications. **Small**, v. 5, n. 21, p. 2349–2370, 2009.
- MACEDO, J. R. N.; CARMONA, V. N.; ROSA, D. S. Estudo da superfície de compósitos PLA-Amido-Algodão para a degradação do compósito. n. October, 2014.
- MAKADIA, H. K.; SIEGEL, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. **Polymers**, v. 3, n. 3, p. 1377–1397, 2011.
- MALLICK, S. P. et al. Design and evaluation of chitosan/poly(L-lactide)/pectin based composite scaffolds for cartilage tissue regeneration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 909–920, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.049>>.
- MANAVITEHRANI, I. et al. Biomedical applications of biodegradable polyesters. **Polymers**, v. 8, n. 1, 2016.
- MARINS, N. H. Membranas Nanofibras Obtidas por Electrospinning Contendo Nanopartículas de Pentóxido de Nióbio e suas Aplicações em Biomateriais. **Angewandte Chemie International Edition**, 6(11), 951–952., p. 5–24, 2019.
- MASSIMINO, L. C. **Scaffolds de biopolímeros e resina de Jatobá para utilização em engenharia tecidual**. 2020. 2020.
- MEDEIROS, C. B. S. de. Avaliação De Peças De Poli(Ácido Láctico) (Pla) Impressas Para Aplicações Biomédicas. p. 86, 2018.
- MERCANTE, L. et al. Nanofibras Eletrofiadas E Suas Aplicações: Avanços Na Última

Década. **Química Nova**, v. 44, n. 6, p. 717–736, 2021.

MERCANTE, L. A. et al. Electrospinning-based (bio)sensors for food and agricultural applications: A review. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 91, p. 91–103, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2017.04.004>>.

MERLINI, C. et al. Electrically pressure sensitive poly(vinylidene fluoride)/polypyrrole electrospun mats. **RSC Advances**, v. 4, n. 30, p. 15749–15758, 2014.

MINCHEVA, R. et al. Hydrogels from chitosan crosslinked with poly(ethylene glycol) diacid as bone regeneration materials. **E-Polymers**, n. 058, p. 1–11, 2004.

MONTANARI, T. **Histologia: Texto, atlas e roteiro para aulas práticas**. [s.l.: s.n.]

MORAIS, D. D. S. et al. MEMBRANAS DE POLI(ÁCIDO LÁTICO) - (PLA) E SEUS BIONANOCOMPÓSITOS COM ARGILA BENTONÍTICA. p. 1–16, 2017.

MORENO MADRID, A. P. et al. Advances in additive manufacturing for bone tissue engineering scaffolds. **Materials Science and Engineering C**, v. 100, n. March, p. 631–644, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.037>>.

MOURIN, V.; CATTALINI, J. P.; BOCCACCINI, A. R. Metallic ions as therapeutic agents in tissue engineering scaffolds : an overview of their biological applications and strategies for new developments. n. December 2011, p. 401–419, 2012.

MOW, V. C.; RATCLIFFE, A.; ROBIN POOLE, A. Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. **Biomaterials**, v. 13, n. 2, p. 67–97, 1992.

MÜLLER, R. H. et al. Cytotoxicity of magnetite-loaded polylactide, polylactide/glycolide particles and solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 138, n. 1, p. 85–94, 1996.

MURPHY, C. M. et al. CELL-SCAFFOLD INTERACTIONS IN THE BONE TISSUE ENGINEERING TRIAD. **European Cells and Materials**, v. 26, p. 120–132, 2013.

NERES, K. S. V. et al. Caracterização de novo filamento compósito PLA/Cu para o

processo de Modelagem por Fusão e Deposição / Characterization of new PLA/Cu composite filament for Fused Deposition Modelling. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 6, p. 57314–57334, 2021.

NETO, J. D. S. R. HIDROXIAPATITA SINTÉTICA NANOESTRUTURADA E ESMALTE DENTAL AQUECIDOS I IRRADIADOS POR LASER DE Er,Cr:YSGG. p. 118, 2009.

NOOEAIID, P. et al. Osteochondral tissue engineering: Scaffolds, stem cells and applications. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 16, n. 10, p. 2247–2270, 2012.

NORMAN, J.; DESAI, T. **Methods for Fabrication of Nanoscale Topography for TissueEngineering Scaffolds**, 2006. .

OGEDA, T. L. Físico-Química Experimental Ângulos de Contato. 2010.

OHTA, M.; OBUCHI, S.; YOSHIDA, Y. Preparation process of polyhydroxycarboxylic acid. 1995. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/US5444143>>.

OKAZAKI, Y.; GOTOH, E. Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro. **Biomaterials**, v. 26, n. 1, p. 11–21, 2005.

OLIVEIRA, A. P. N. **Progettazione, Caratterizzazione ed Ottenimento di Vetri-Vetroceramici Appartenenti al Sistema LZS**. 1997. Università Degli Studi di Modena, Facoltà di Ingegneria, 1997.

OLIVEIRA, J. M. DE; LUZ, S. M. DA. **OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPÓSITOS BIODEGRADÁVEIS DE POLIÁCIDO LACTICO (PLA) REFORÇADOS COM FIBRAS DE CURAUÁ**. 2016. 152 2016. Disponível em: <<file:///Users/andreataquez/Downloads/guia-plan-de-mejora-institucional.pdf>%0A<http://salud.tabasco.gob.mx/content/revista>%0A[http://www.revistaalad.com/pdfs/Guias\\_ALAD\\_11\\_Nov\\_2013.pdf](http://www.revistaalad.com/pdfs/Guias_ALAD_11_Nov_2013.pdf)%0A<http://dx.doi.org/10.15446/revfacmed.v66n3.60060>.%0A<http://www.cenetec>.>.

OMANOVI, E. et al. Nanocomposites : a brief review. 2019.

ORÉFICE, R. L.; HENCH, L. L.; BRENNAN, A. B. In Vitro Bioactivity of Polymer Matrices Reinforced with a Bioactive Glass Phase. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 1, p. 78–85, 2000.

OSMAN, Z.; AROF, A. K. FTIR studies of chitosan acetate based polymer electrolytes. **Electrochimica Acta**, v. 48, n. 8, p. 993–999, 2003.

PARIDA, P.; BEHERA, A.; CHANDRA MISHRA, S. Classification of Biomaterials used in Medicine. **International Journal of Advances in Applied Sciences**, v. 1, n. 3, p. 31–35, 2012.

PARK, K. M. et al. Thermosensitive chitosan-Pluronic hydrogel as an injectable cell delivery carrier for cartilage regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 6, p. 1956–1965, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2009.01.040>>.

PATEL, K. D. et al. Molecularly Imprinted Polymers and Electrospinning: Manufacturing Convergence for Next-Level Applications. **Advanced Functional Materials**, v. 30, n. 32, 2020.

PAULINO, A. T. et al. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, n. 1, p. 98–103, 2006.

PEREIRA, R. B.; MORALES, A. R. Estudo do comportamento térmico e mecânico do PLA modificado com aditivo nucleante e modificador de impacto. **Polimeros**, v. 24, n. 2, p. 198–202, 2014.

PIRES, P. C. et al. Polymer-based biomaterials for pharmaceutical and biomedical applications: A focus on topical drug administration. **European Polymer Journal**, v. 187, n. October 2022, 2023.

POPELKA, Š.; MACHOVÁ, L.; RYPÁČEK, F. Adsorption of poly(ethylene oxide)-block-poly lactide copolymers on poly lactide as studied by ATR-FTIR spectroscopy. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 308, n. 2, p. 291–299, 2007.

PORTAL, L. M.; ROSA, P. A. H. da; SIMONI, B. I. Restauração da cartilagem hialina articular com uso de células-tronco mesenquimais, hidrogel de colágeno tipo II e condroblastos em lesão troclear do joelho. 2019. Disponível em:

<<http://hdl.handle.net/10183/201566>>.

PORTES, P. N.; SATO, F.; PEDROCHI, F. **CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE IN VITRO DO SISTEMA VÍTREO: 60B2O3 - 5CaF2 - (20-x)Na2O - (15-x)CaO - 2xP2O5 (x= 0, 1, 2)**. 2018. 5 2018.

POSSOLLI, M. et al. Dissolution , bioactivity behavior , and cytotoxicity. n. May, p. 1–12, 2021.

POSSOLLI, N. M. et al. Dissolution, bioactivity behavior, and cytotoxicity of 19.58Li2O·11.10ZrO2·69.32SiO2 glass–ceramic. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 110, n. 1, p. 67–78, 2022a.

POSSOLLI, N. M. et al. LZS bioactive glass-ceramic scaffolds: Colloidal processing, foam replication technique and mechanical properties to bone tissue engineering. **Open Ceramics**, v. 9, p. 100219, mar. 2022b.

PUPPI, D. et al. Polymeric materials for bone and cartilage repair. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 35, n. 4, p. 403–440, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.01.006>>.

REN, X. et al. **Aligned porous fibrous membrane with a biomimetic surface to accelerate cartilage regeneration****Chemical Engineering Journal**, 2019. .

REZWAN, K. et al. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 18, p. 3413–3431, 2006.

RHIM, J. W. et al. Effect of the processing methods on the performance of polylactide films: Thermocompression versus solvent casting. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 101, n. 6, p. 3736–3742, 2006.

RICHARDS, J. M. et al. Crystallinity of hydroxyapatite drives myofibroblastic activation and calcification in aortic valves. **Acta Biomaterialia**, v. 71, p. 24–36, abr. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706118301077>>.

RIZAL, S. et al. Functional properties and molecular degradation of schizostachyum brachycladum bamboo cellulose nanofibre in PLA-chitosan bionanocomposites.

**Molecules**, v. 26, n. 7, 2021.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, R. et al. Development of gelatin / chitosan / PVA hydrogels : Thermal stability , water state , viscoelasticity , and cytotoxicity assays.

**journal of applied polymer science**, v. 47149, p. 1–9, 2019.

RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, M. et al. Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

ROLIM, A. E. H. et al. Chitosan scaffolds - Physico - Chemical and biological properties for bone repair. **Revista Virtual de Quimica**, v. 10, n. 2, p. 211–228, 2018.

ROSETI, L. et al. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. **Materials Science and Engineering C**, v. 78, p. 1246–1262, 2017a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.017>>.

ROSETI, L. et al. Scaffolds for Bone Tissue Engineering\_ State of the art and new perspectives \_ Enhanced Reader.pdf. **Materials Science and Engineering C**, 2017b.

SADEGHIANMARYAN, A. et al. Extrusion-based printing of chitosan scaffolds and their in vitro characterization for cartilage tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3179–3192, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.180>>.

SAEIDLLOU, S. et al. Poly(lactic acid) crystallization. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 12, p. 1657–1677, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2012.07.005>>.

SAINI, P.; ARORA, M.; KUMAR, M. N. V. R. Poly(lactic acid) blends in biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 47–59, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.014>>.

SALATI, M. A. et al. Agarose-Based Biomaterials : Opportunities and Challenges in Cartilage Tissue Engineering. **Polymers**, p. 1–15, 2020.

SAMBUDI, N. S. et al. Electrospun chitosan/poly(vinyl alcohol) reinforced with CaCO<sub>3</sub> nanoparticles with enhanced mechanical properties and biocompatibility for cartilage tissue engineering. **Composites Science and Technology**, v. 106, p. 76–84, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.compscitech.2014.11.003>>.

SANCHEZ, C. et al. “ Chimie douce ”: A land of opportunities for the designed construction of functional inorganic and hybrid organic-inorganic nanomaterials. **Comptes rendus - Chimie**, v. 13, n. 1–2, p. 3–39, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.crci.2009.06.001>>.

SANTANA, L. et al. AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DAS CARACTERÍSTICAS TÉRMICAS DE FILAMENTOS DE PLA PARA IMPRESSORAS 3D DE CÓDIGO ABERTO. 2014.

SANTANA, L. et al. A comparative study between PETG and PLA for 3D printing through thermal, chemical and mechanical characterization. **Revista Materia**, v. 23, n. 4, 2018.

SANTANA, L. D. A. B.; SANTOS, E. A. dos. **BIOATIVIDADE: UMA PROPRIEDADE SECUNDÁRIA EM VIDROS BIOATIVOS DE COMPOSIÇÕES COMPLEXAS?** 2021. 2021.

SANTOS, M. L. et al. Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: Nitrato de cálcio e ácido fosfórico. **Ecletica Quimica**, v. 30, n. 3, p. 29–35, 2005.

SARASAM, A. R.; KRISHNASWAMY, R. K.; MADIHALLY, S. V. Blending chitosan with polycaprolactone: Effects on physicochemical and antibacterial properties. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 4, p. 1131–1138, 2006.

SAVIOLI LOPES, M.; JARDINI, A. L.; MACIEL FILHO, R. Poly (lactic acid) production for tissue engineering applications. **Procedia Engineering**, v. 42, p. 1402–1413, 2012.

SHERWOOD, J. K. et al. A three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair. **Biomaterials**, v. 23, n. 24, p. 4739–4751, 2002.

SHETH, M.; KUMAR, R. A.; DAVE, V. Biodegradable Polymer Blends of Poly ( lactic acid ) and Poly ( ethylene glycol ) PL. p. 1495–1505, 2008.

SILL, T. J.; VON RECUM, H. A. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. **Biomaterials**, v. 29, n. 13, p. 1989–2006, 2008.

SILVA, J. L. M. da; SANTOS, Z. M. dos. Estudo das propriedades mecânicas de membranas modificadas de quitosana. 2018.

SIONKOWSKA, A. et al. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. **Biomaterials**, v. 25, n. 5, p. 795–801, 2004.

SIQUEIRA, R. L.; ZANOTTO, E. D. Biosilicato®: Historico De Uma Vitroceramica Brasileira De Elevada Bioatividade. **Quimica Nova**, v. 34, n. 7, p. 1231–1241, 2011.

SOUSA, S. A. V. de et al. ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DO PECÍOLO DE BURITI PARA PREPARAÇÃO DE COMPÓSITOS BIO-BASEADOS COM MATRIZ DE PLA. n. June 2020, p. 1–6, 2017.

SOUZA, D. D. de; MELO, T. J. A. de; ARAUJO., E. M. **DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE BIONANOCOMPOSITOS DE PLA/ARGILA E DE (PBAT/PLA)/ARGILA**. 2012. 2012.

SOUZA, J. R. de; BORGES, A. L. S.; PRADO, R. F. do. BIOMATERIAL POLIMÉRICO OBTIDO POR ELETROFIAÇÃO : nanofibras de ácido polilático incorporadas de biovidro dopado com estrôncio e cobalto. 2021.

SOUZA, M. T. et al. Lithium-zirconium silicate glass-ceramics for restorative dentistry: Physicochemical analysis and biological response in contact with human osteoblast. **Materialia**, v. 2, p. 37–45, out. 2018.

SOUZA, M. T.; PEITL, O.; ZANOTTO, E. D. **DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE TECIDOS VÍTREOS FLEXÍVEIS ALTAMENTE BIOATIVOS**. 2015. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/7282>>.

SPIN-NETO, R. et al. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 37, n. 2, p. 155–161, 2008.

SREENIVASAN, K. Thermal stability studies of some chitosan-metal ion complexes using differential scanning calorimetry. **Polymer Degradation and Stability**, v. 52, n. 1, p. 85–87, 1996.

SUBRAMANIAN, A.; KRISHNAN, U. M.; SETHURAMAN, S. Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration. **Journal of biomedical science**, v. 16, p. 108, 2009.

SUN, L. et al. Poly( $\gamma$ -glutamic acid)-based electrospun nanofibrous mats with photodynamic therapy for effectively combating wound infection. **Materials Science and Engineering C**, v. 113, n. January, p. 110936, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110936>>.

SUYATMA, N. E. et al. Mechanical and barrier properties of biodegradable films made from chitosan and poly (lactic acid) blends. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 12, n. 1, p. 1–6, 2004.

TALLIA, F. et al. Bouncing and 3D printable hybrids with self-healing properties. **Materials Horizons**, p. 849–860, 2018.

TAVARES, V. A. C. D. B. Matrizes de policaprolactona e quitosano para aplicação em engenharia de tecidos. p. 59, 2011.

TEIXEIRA, C. M. L. C.; COSTA, A. C. F. de M. Obtenção e caracterização de compósitos hidrogel/hidroxiapatita para uso dermatológico. 2013.

TEIXEIRA, J. D.; OLIVEIRA, A. P. N. de; BOEHS, L. **Processamento e caracterização de vitrocerâmica do sistema Li<sub>2</sub>O-ZrO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub> (LZS) aplicada em ferramenta de corte**. 2012. 2 2012.

THOMAS, M. S. et al. Polylactic acid/nano chitosan composite fibers and their morphological, physical characterization for the removal of cadmium(II) from water. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 137, n. 34, p. 1–13, 2020.

THOMPSON, I. D.; HCNCH, L. L. Mechanical properties of bioactive glasses, glass-ceramics and composites. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine**, v. 212, n. 2, p. 127–136, 1998.

TOMIHATA, K.; IKADA, Y. In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. **Biomaterials**, v. 18, n. 7, p. 567–575, 1997.

TONHI, E.; DE GUZZI PLEPIS, A. M. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. **Química Nova**, v. 25, n. 6 A, p. 943–948, 2002.

TORRES, M. A. et al. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros**, v. 15, n. 4, p. 306–312, 2005.

TROMBETTA, R. et al. 3D Printing of Calcium Phosphate Ceramics for Bone Tissue Engineering and Drug Delivery. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 45, n. 1, p. 23–44, 2017.

TSCHAIKOWSKY, M. et al. Hybrid fluorescence-AFM explores articular surface degeneration in early osteoarthritis across length scales. **Acta Biomaterialia**, v. 126, p. 315–325, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.03.034>>.

VASCONCELOS, C. L. De et al. Effect of Molecular Weight and Ionic Strength on the Formation of Polyelectrolyte Complexes Based on Poly(methacrylic acid) and Chitosan. p. 1245–1252, 2006.

VUKAJLOVIC, D. et al. Chitosan based polymer/bioglass composites for tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 96, p. 955–967, mar. 2019. Disponível em: <[https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493118306829?casa\\_token=ALAPI7zFkFMAAAAA:mV\\_uPmh9n7mfiCxgM5h3OliopwuTPho6URLzy76bhJINFci8aPegm80g-CuJr6uLxRL6Ke-KLIM](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493118306829?casa_token=ALAPI7zFkFMAAAAA:mV_uPmh9n7mfiCxgM5h3OliopwuTPho6URLzy76bhJINFci8aPegm80g-CuJr6uLxRL6Ke-KLIM)>.

WANG, C. et al. Two-phase electrospinning to incorporate growth factors loaded chitosan nanoparticles into electrospun fibrous scaffolds for bioactivity retention and cartilage regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 79, p. 507–515,

2017.

WANG, W. et al. 3D printing of PLA/n-HA composite scaffolds with customized mechanical properties and biological functions for bone tissue engineering.

**Composites Part B: Engineering**, v. 224, n. May, p. 109192, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2021.109192>>.

WANG, X.; DU, Y.; LIU, H. Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan-Zn complex. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 1, p. 21–26, 2004.

WANG, X.; LIN, M.; KANG, Y. Engineering Porous  $\beta$ -Tricalcium Phosphate ( $\beta$ -TCP) Scaffolds with Multiple Channels to Promote Cell Migration, Proliferation, and Angiogenesis. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 11, n. 9, p. 9223–9232, 2019.

WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5897–5909, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.027>>.

WU, S. et al. Allogenic chondrocyte / osteoblast-loaded  $\beta$  - tricalcium phosphate bioceramic scaffolds for articular cartilage defect treatment. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 1570–1576, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1604534>>.

XIAO, L. et al. Poly ( Lactic Acid ) -Based Biomaterials : Synthesis , Modification and Applications. 2006.

XIAO, X. et al. The promotion of angiogenesis induced by three-dimensional porous beta-tricalcium phosphate scaffold with different interconnection sizes via activation of PI3K/Akt pathways. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–11, 2015.

XUE, J. et al. **Electrospun Nanofibers: New Concepts, Materials, and Applications** *Accounts of Chemical Research*, 2017. .

XUE, J. et al. Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 8, p. 5298–5415, 2019.

ZENG, X.; RUCKENSTEIN, E. Control of pore sizes in macroporous chitosan and

chitin membranes. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 35, n. 11, p. 4169–4175, 1996.

ZHANG, S. et al. Bi-layer collagen/microporous electrospun nanofiber scaffold improves the osteochondral regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 7, p. 7236–7247, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.003>>.

ZHANG, Y. et al. Electrospun biomimetic nanocomposite nanofibers of hydroxyapatite/chitosan for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 29, n. 32, p. 4314–4322, nov. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961208005322>>.

ZHAO, L. M. et al. Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 3, p. 353–362, 2011.

ZHU, H.; JI, A.; SHEN, J. Surface engineering of poly (DL-lactic acid) by entrapment of biomacromolecules. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 23, n. 14, p. 819–823, 2002.