

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ
INSTITUTO DE MACROMOLÉCULAS PROFESSORA ELOISA MANO – IMA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE
POLÍMEROS

TALITA NASCIMENTO DA SILVA

**ARCABOUÇOS ELETROFIADOS DO TIPO *CORE-SHELL* PVA/PLA
CONTENDO BMP-2 PARA REGENERAÇÃO PERIODONTAL**

Rio de Janeiro
2017

TALITA NASCIMENTO DA SILVA

**ARCABOUÇOS ELETROFIADOS DO TIPO *CORE-SHELL* PVA/PLA
CONTENDO BMP-2 PARA REGENERAÇÃO PERIODONTAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em ciências e tecnologia de polímeros do Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências, em Ciência e Tecnologia de Polímeros.

Orientador: Prof Dr. Paulo Henrique de Souza Picciani
Coorientadora: Prof^a Dra. Franceline Reynaud

Rio de janeiro

2017

CIP - Catalogação na Publicação

S586a SILVA, TALITA NASCIMENTO DA
 ARCABOUÇOS ELETROFIADOS DO TIPO CORE-SHELL
PVA/PLA CONTENDO BMP-2 PARA REGENERAÇÃO PERIODONTAL
/ TALITA NASCIMENTO DA SILVA. -- Rio de Janeiro,
2017.
 126 f.

 Orientador: Paulo Henrique de Souza Picciani.
 Coorientadora: Franceline Reynaud.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Instituto de Macromoléculas
Professora Eloisa Mano, Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Polímeros, 2017.

 1. BIOMATERIAIS. 2. ENGENHARIA DE TECIDOS. 3.
FIBRAS CORE-SHELL. 4. ELETROFIAÇÃO. I. Picciani,
Paulo Henrique de Souza, orient. II. Reynaud,
Franceline , coorient. III. Título.

TALITA NASCIMENTO DA SILVA

**ARCABOUÇOS ELETROFIADOS DO TIPO CORE-SHELL PVA/PLA
CONTENDO BMP-2 PARA REGENERAÇÃO PERIODONTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Polímeros do Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano, Universidade Federal do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências, em Ciência e Tecnologia de Polímeros.

Aprovado em: 19 de julho de 2017.

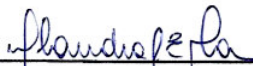
BANCA EXAMINADORA



Orientador Prof. Paulo Henrique de Souza Picciani
Universidade Federal do Rio de Janeiro



Coorientadora Prof^a Franceline Reynaud
Universidade Federal do do Rio de Janeiro



Prof^a Claudia Regina Elias Mansur
Universidade Federal do Rio de Janeiro



Dr^a. Vania Emerich Bucco de Campos
Universidade Federal do Rio de Janeiro



Dr^a. Raquel Pires Gonçalves
Universidade Federal do Rio de Janeiro

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas que estiveram comigo nesta jornada. Primeiro agradeço à Deus todas as oportunidades que tive e ainda terei, sem Ele nada seria possível. Aos meus pais, em especial, por todos os anos que estiveram ao meu lado, este trabalho é um dos resultados de todos os investimentos que fizeram. Sem eles nada seria possível, e com todo seu amor, carinho e dedicação me incentivam a ir mais longe.

Agradeço a orientação do Prof. Paulo Picciani que me ajudou a desenvolver este trabalho com muita dedicação, atenção e generosidade. À minha coorientadora Prof.^a Fran, um agradecimento em especial, pois, sempre me ensinou, desde a iniciação científica. Agradeço também a disponibilidade da doutora Raquel Gonçalves que me guiou em diversos momentos e me ensinou a técnica de eletrofiação.

Agradeço muito todo o carinho recebido da minha avó Anatália que sempre fez questão de me lembrar que primeiro vem os estudos. Aos meus amados familiares que contribuíram para a realização de vários sonhos, este é um deles. Registro também a minha gratidão ao meu companheiro de emoções e aventuras Fernando D. Correa, obrigada por sempre estar ao meu lado, me incentivar e lembrar do que é possível.

AGRADECIMENTOS

Prof. Carlos Augusto Barboza- Departamento De Morfologia (UFRN)

Fernanda Ginani- Departamento De Morfologia (UFRN)

Cilene Labre - Labnano (CBPF)

Braulio Archanjo (INMETRO)

Prof^a. Maria Bernadete Pierre - Laboratório De Pesquisa Em Micro E
Nanotecnologia Farmacêutica E Farmacotécnica (UFRJ)

Marcia Sader- Laboratório de Superfícies Poliméricas e Asfálticas (COPPE, UFRJ)

RESUMO

A engenharia de tecidos é um campo interdisciplinar de pesquisa que tem como objetivo restaurar, manter ou melhorar tecidos previamente danificados. Atualmente, os suportes poliméricos biocompatíveis têm sido utilizados para promover o crescimento e proliferação de células com a finalidade de desenvolver enxertos, próteses, peles artificiais e cartilagens. A eletrofiação é amplamente estudada por ser um método capaz de produzir nanofibras que permitem a fixação e proliferação de células, gerando um arcabouço funcional que é adequado para vários tipos de órgão ou tecido. Nesta Dissertação, a técnica de eletrofiação foi utilizada para obtenção de fibras *core-shell* e monolíticas, a partir dos polímeros biocompatíveis poli(ácido láctico) e poli(álcool vinílico). As nanofibras foram fabricadas variando os parâmetros da eletrofiação coaxial, com destaque para os mais importantes: tensão, vazão interna e externa. Essas nanofibras foram caracterizadas quanto a sua morfologia, comportamento térmico, cristalinidade e perfil de liberação. Para os testes de liberação foi adicionada albumina bovina. Como a principal finalidade das fibras foi a restauração do tecido periodontal, em um segundo momento, o fator de crescimento BMP-2 (proteína morfogenética humana) foi incorporado às fibras coaxiais, de forma que no teste *in vitro* fosse observado proliferação e diferenciação das células pré-osteoblásticas do tipo MC3T3. Os resultados demonstraram que as fibras formadas apresentaram diâmetros de até 250nm. De acordo com as imagens de microscopia eletrônica foi observada a superfície das nanofibras, espessura, além de ter a morfologia *core-shell* confirmada. Segundo os resultados de difração de raio-X e teste de ângulo de contato, as fibras eletrofiadas apresentaram baixo grau de cristalinidade e baixa hidrofobicidade. Estes resultados influenciaram nos testes de liberação e *in vitro* nos quais foram analisados o modelo de liberação obtido e comportamento das células em contato com as fibras.

PALAVRAS-CHAVE: BIOMATERIAIS. ELETROFIAÇÃO. FIBRAS CORE-SHELL. ENGENHARIA DE TECIDOS.

ABSTRACT

Tissue engineering is an interdisciplinary field of research that aims to restore, maintain or improve previously damaged tissue. Currently, biocompatible scaffolds have been used to promote cellular growth and proliferation in order to develop grafts, prostheses, artificial skins and cartilage. Electrospinning is widely studied as a method capable of producing nanofibers which allows cell attachment and proliferation, generating a functional scaffold that is suitable for many types of organ or tissue. In this work, electrospinning was used to obtain *core-shell* and monolithic fibers from the biocompatible poly (lactic acid) and poly (vinyl alcohol) polymers. Nanofibers were manufactured by optimizing process parameters of coaxial electrospinning with emphasis on the most relevant ones: voltage, internal and external flows. All nanofibers were characterized according to morphology, thermal behavior, crystallinity and release profile. For the release tests, bovine albumin was added into internal fiber. As the main purpose of the fibers was periodontal restoration, in a second moment, growth factor BMP-2 was incorporated into coaxial fibers, so that *in vitro* tests were observed proliferation and differentiation of pre osteoblastic cells of the type MC3T3. Results demonstrated that fibers formed with diameters up to 250nm. According to electronic microscopy images, it was observed: surface of nanofibres, thickness and *core-shell* morphology confirmed. X-Ray diffraction analysis and contact angle tests showed fibers with low crystal degree and low hydrophobicity. These results influenced release and *in vitro* tests in which release model obtained and behavior from cells attached in fibers were analyzed.

Keywords: Biomaterials. Electrospinning. Core-shell fibers. Tissue engineering.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVO	3
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1	ENGENHARIA DE TECIDOS	4
3.2	ARCABOUÇOS POLIMÉRICOS PARA ENGENHARIA DE TECIDOS	5
3.1.1	Estruturas dos arcabouços poliméricos	8
3.2.2	Métodos de obtenção de arcabouços poliméricos	9
3.3	ELETROFIAÇÃO	10
3.3.1	Parâmetros da eletrofiação	12
3.3.1.1	Parâmetros relacionados à solução	12
3.3.1.2	Parâmetros relacionados ao processo de eletrofiação	14
3.3.1.3	Parâmetros relacionados ao ambiente	16
3.4	ELETROFIAÇÃO COAXIAL	17
3.4.1	Parâmetros relacionados à eletrofiação coaxial	19
3.5	ELETROFIAÇÃO APLICADA À ENGENHARIA DE TECIDOS	20
3.5.1	Engenharia de tecidos para aplicação óssea	21
3.5.1.1	Periodonto	23
3.6	CULTIVO DE CÉLULAS EM ARCABOUÇOS ELETROFIADOS	26
3.6.1	Uso de fatores de crescimento no cultivo celular	27
3.6.1.1	Proteínas morfogênicas ósseas do tipo 2 (BMP-2)	28
3.6.2	Uso de células para regeneração óssea guiada	30
4	Metodologia	31
4.1	MATERIAIS	34
4.2	EQUIPAMENTOS	35
4.3	MÉTODOS	36
4.3.1	Equipamento de eletrofiação	36
4.3.2	Preparo das soluções	37
4.3.3	Eletrofiação	39
4.3.4	Obtenção de Filmes de PLA	42
4.3.5	Caracterização dos polímeros, fibras monolíticas e core-shell	42

4.3.5.1	Cromatografia de permeação em gel (GPC)	42
4.3.5.2	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	43
4.3.5.3	Difratometria de raios X a altos ângulos (XRD)	43
4.3.5.4	Análise termogravimétrica (TGA)	43
4.3.5.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	43
4.3.5.6	Microscopia de Fluorescência	44
4.3.5.7	Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	44
4.3.5.8	Espectroscopia no infravermelho (FTIR)	44
4.3.5.9	Ângulo de Contato	44
4.3.6	Doseamento das fibras core-shell contendo albumina	45
4.3.7	Liberação da albumina em fibras core-shell	45
4.3.8	Cultura de células	45
4.3.8.1	Teste de viabilidade celular e proliferação celular	46
4.3.9	Ensaio de diferenciação celular	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	Cromatografia de permeação em gel (GPC)	48
5.2	MORFOLOGIA DAS FIBRAS ELETROFIADAS	48
5.2.1	Microscopia eletrônica de varredura	48
5.2.2	Microscopia de fluorescência	53
5.2.3	Microscopia de transmissão eletrônica	55
5.3	RECOBRIMENTO DAS FIBRAS DE PVA	56
5.4	HIDROFILICIDADE DOS ARCABOUÇOS	58
5.5	COMPORTAMENTO TÉRMICO E CRISTALINIDADE DAS FIBRAS ELETROFIADAS	59
5.6	ENSAIOS BIOLÓGICOS	68
5.6.1	Taxa de encapsulação dos arcabouços	69
5.6.2	Perfil de liberação	70
5.6.3	Ensaio biológicos	77
5.6.3.1	Viabilidade celular, proliferação e diferenciação de pré osteoblasto aplicados em fibras eletrofiadas	77
6	CONCLUSÕES	83

REFERÊNCIAS	84
APÊNDICE A- TRABALHO APRESENTADO EM CONGRESSO	104
APÊNDICE B- TRABALHO APRESENTADO EM CONGRESSO	105
ANEXO A- REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS OBTIDAS PELA CALORIMETRIA DE EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL DA FIBRA CORE-SHELL CT-1	106
ANEXO B- REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS OBTIDAS PELA CALORIMETRIA DE EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL DA FIBRA CORE-SHELL CT-2	107
ANEXO C- REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS OBTIDAS PELA CALORIMETRIA DE EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL DA FIBRA CORE-SHELL CT-3	108
ANEXO D- REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS OBTIDAS PELA CALORIMETRIA DE EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL DA FIBRA CORE-SHELL CI-1	109
ANEXO E- REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS OBTIDAS PELA CALORIMETRIA DE EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL DA FIBRA CORE-SHELL CI-2	110
ANEXO F- REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS OBTIDAS PELA CALORIMETRIA DE EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL DA FIBRA CORE-SHELL CI-3	111
ANEXO G- REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS OBTIDAS PELA CALORIMETRIA DE EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL DA FIBRA CORE-SHELL CE-2	112
ANEXO H- REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS OBTIDAS PELA CALORIMETRIA DE EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL DA FIBRA CORE-SHELL CE-3	113
ANEXO I- REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS OBTIDAS PELA CALORIMETRIA DE EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL DA FIBRA MONOLÍTICA DE PLA	114
ANEXO J- REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS OBTIDAS PELA CALORIMETRIA DE EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL DA FIBRA MONOLÍTICA DE PVA	115

1 INTRODUÇÃO

Os estudos no campo da engenharia de tecidos iniciaram ao longo dos anos de 1980 e têm como principal objetivo desenvolver materiais que mimetizam os tecidos biológicos de forma que possam ser aplicados como enxertos, próteses, pele artificial ou cartilagens. Os biomateriais produzidos com este propósito, também podem fornecer dispositivos que sirvam de tecido-suporte facilitando cirurgia de recuperação do tecido e a implantação de próteses como a óssea, por exemplo. Os biomateriais aplicados se originam de diversos insumos e entre estes, encontram-se polímeros naturais ou sintéticos. Os polímeros são largamente utilizados na geração de *scaffolds* ou arcabouços poliméricos que podem ser obtidos pelas técnicas de separação de fase, auto-montagem, eletrofiação, entre outros. Dentre estas técnicas, a eletrofiação é um dos métodos mais estudado e aplicado nos últimos anos (LEE; ATALA, 2013).

A eletrofiação é um método inicialmente proposto por Formhal e posteriormente redescoberto por Reneker e Doshi. No entanto, o fenômeno de eletrodinâmica conhecido como eletrofiação começou a ser aplicado à produção de nanofibras para as áreas de ciência e de nanotecnologia entre 1990 e 2000 (RENEKER, D.H., 2008). Os biomateriais são comumente aplicados a esta técnica com o objetivo de fornecer arcabouços que possuem a função de enxerto.

Os biomateriais utilizados para este fim são polímeros e a maioria pertence à família dos poliésteres. Alguns exemplos de polímeros aplicados à engenharia de tecidos são: colágeno, quitosana, alginato, poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico co-glicólico) (PLGA), poliestireno, poli(ácido L-láctico) (PLLA), polidioxinona (PDO), poli(ϵ -caprolactona-co-láctico) (PCLA) e poli(ϵ -caprolactona) (PCL). Esses polímeros permitem formação do arcabouço que proporcionará tanto a proliferação celular como a reestruturação de um tecido funcional a partir de requisitos como biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioreabsorção (ELAHI et al., 2013; OKAMOTO; JOHN, 2013).

Arcabouços poliméricos fibrosos obtidos por eletrofiação apresentam também outras vantagens como a elevada área de superfície, o que melhora a adesão celular, migração, proliferação e a manutenção do transporte de nutrientes

através da porosidade (CUI; ZHOU; CHANG, 2016). A morfologia da superfície arcabouço pode ser controlada segundo os parâmetros do processo de eletrofiação e que podem ser ajustados de acordo com o tecido alvo. As variáveis deste processo são aquelas relacionados à solução, ao ambiente e os oriundos da própria técnica. A partir destes parâmetros, é possível desenvolver diversos processos de eletrofiação, como por exemplo: *melt electrospinning*, *core-shell* e auto-montagem.

Nesta dissertação, foram desenvolvidas fibras através da técnica de eletrofiação do tipo núcleo-casca (*core-shell*). Para a composição da parte externa foi utilizado o polímero biocompatível poli(ácido láctico) PLA, enquanto que para parte interna, foi utilizado o poli(álcool vinílico) PVA. Inicialmente, as fibras foram produzidas com a parte interna da fibra veiculada a albumina para desenvolvimento de fibras com morfologia tipo núcleo-casca. E para o ensaio de liberação com os ajustes dos parâmetros da eletrofiação, foram selecionados os arcabouços com melhores características morfológicas para que então, fosse incorporado à fibra interna o fator de crescimento *bone morphogenetic human protein* - BMP-2. Com a adição deste fator, foi possível avaliar a adesão, proliferação e diferenciação das células pré-osteoblasticas *in vitro*.

As fibras foram submetidas a ensaios de liberação com a albumina de proteína modelo devido alto custo da BMP-2 e adesão, proliferação e diferenciação celular a partir de células pré-osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1. Além disso, os arcabouços contendo fator de crescimento foram submetidos a caracterizações como calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria, espectrofotometria na região do infravermelho com transformada de Fourier, microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão e difração de raio-X, de forma que os resultados celulares possam ser correlacionados à morfologia das fibras obtidas. Ao final, foi possível analisar se os arcabouços obtidos pela eletrofiação coaxial apresentariam potencial para regeneração do tecido periodontal em casos de perda óssea.

2 OBJETIVO

O objetivo geral desta Dissertação é desenvolver fibras poliméricas eletrofiadas com morfologia núcleo-casca (*core-shell*), investigando a capacidade de encapsulação de proteínas e sistema de liberação de acordo com a otimização dos parâmetros de eletrofiação coaxial. Bem como analisar, dentre estas, quais fibras são mais adequadas para recuperação do tecido ósseo periodontal.

São objetivos específicos deste trabalho:

- Correlacionar a morfologia das fibras monolíticas e *core-shell* obtidas com os parâmetros relacionados à técnica de eletrofiação;
- Comprovar o modelo de liberação obtido através das fibras *core-shell* contendo albumina e avaliar a eficiência de liberação, quando comparadas às fibras monolíticas;
- Mensurar a eficiência na proliferação e diferenciação de células pré-osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ENGENHARIA DE TECIDOS

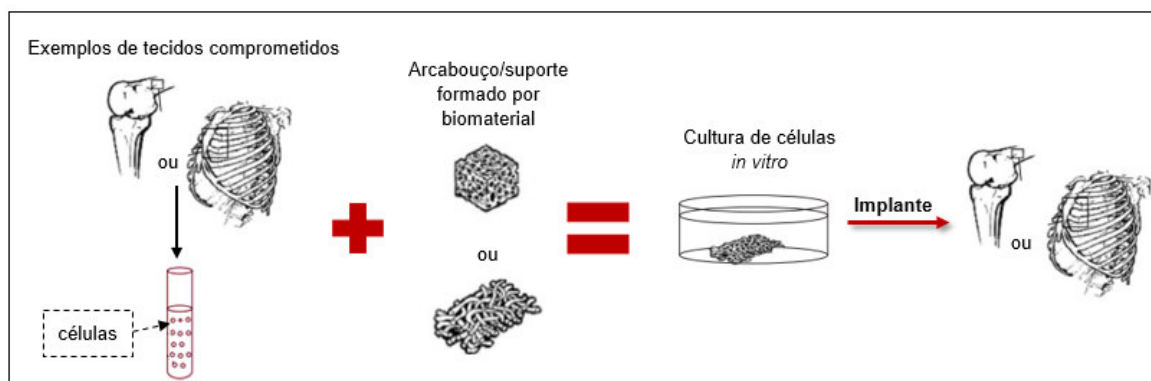
A medicina regenerativa tem se estabelecido recentemente através do desenvolvimento da engenharia de tecidos devido, em grande parte, aos pacientes com perdas ou danos em órgãos e tecidos. Este campo possui elevadas expectativas de crescimento e, segundo a organização internacional Aliança para Medicina Regenerativa (*Alliance for Regenerative Medicine -ARM*), até 2015, empresas voltadas para a medicina regenerativa e terapias avançadas levantaram mais de 9,3 trilhões de dólares (2015). Ao mesmo tempo, o Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (*National Institute of Standards and Technology -NIST*) menciona que já existem 30 produtos para medicina regenerativa atualmente no mercado.

A medicina regenerativa tem como foco a reparação de um tecido biológico específico, promovendo a regeneração celular através da combinação de *scaffolds* e fatores de crescimento (JIANG; CARBONE; LO, 2015). O termo “*Scaffolds*” é utilizado na denominação para arcabouço, suporte, matriz ou estrutura obtidos de fontes naturais ou sintéticas. Estas estruturas, em geral, possuem conformação tridimensional e permitem um desenvolvimento celular mais adequado. Conforme ocorre a degradação do próprio arcabouço, um novo tecido é formado e (KATTI; VASITA, 2006), por isso, a engenharia de tecidos é uma ciência promissora para transplante e recuperação de tecidos. A engenharia de tecidos é um campo interdisciplinar e contém tanto princípios da biologia quanto da própria engenharia usada para produzir, restaurar, manter ou melhorar tecidos e as suas respectivas funções.

Para que a engenharia de tecidos seja efetiva três componentes são necessários: em primeiro, as próprias células do tecido que será regenerado, sendo coletadas do paciente para serem cultivadas *in vitro*; em segundo, arcabouços devem ser formados por biomateriais que permitam adesão, proliferação e diferenciação das células; e, por último, podem ser usados fatores de crescimento celular. De acordo com as normas apresentadas pela Sociedade Americana de Testes e Materiais (*American Society for Testing and Materials - ASTM*), o protocolo

a ser seguido para realizar a técnica de engenharia de tecido é: (I) selecionar o biomaterial e processar o arcabouço/suporte; (II) inocular as células no suporte; (III) realizar o crescimento do tecido prematuro; (IV) crescimento do tecido em biorreator contendo sistema fisiológico e (V) implante no paciente (BARBANTI; DUEK; ZAVAGLIA, 2005). O esquema da Figura 1 apresenta estas etapas.

Figura 1- Esquema do desenvolvimento da engenharia de tecido.



Fonte: Adaptado de DUEK, E. A. R.; BARBANTI, S.; ZAVAGLIA, C.A.C. (2005, p.14).

3.2 ARCABOUÇOS POLIMÉRICOS PARA ENGENHARIA DE TECIDOS

Arcabouços poliméricos são materiais porosos compostos por matrizes poliméricas e formam um suporte tridimensional que permitem aplicações na medicina regenerativa e na engenharia de tecidos. De uma forma geral, os polímeros destinados à área de engenharia de tecidos são considerados biomateriais, pois são substâncias tanto de origem sintética como natural que podem ser usadas parcialmente ou completamente como parte de um sistema que tem o objetivo de tratar, melhorar ou substituir qualquer tecido ou órgão, mantendo sua funcionalidade (AZEVEDO et al., 2007). No entanto, em comparação aos polímeros naturais, os polímeros sintéticos apresentam a possibilidade de se adaptar melhor a funções mais específicas, o que permite controlar melhor as propriedades do arcabouço (ROBLES-VAZQUEZ et al., 2015).

Para que se melhor adeque aos seus objetivos finais, os polímeros utilizados na formação dos arcabouços devem apresentar algumas propriedades essenciais

como bioreabsorção, esterilização para prevenir infecções e similaridade às macromoléculas presentes no corpo humano, de forma que não ocorra o processo de rejeição durante o uso. A biodegradabilidade deve-se fazer presente tanto no polímero aplicado quanto no arcabouço obtido, possibilitando que as células do tecido formem sua própria matriz. O processo de degradação ocorre de acordo com a natureza do polímero e sofre influência da sua taxa de cristalização, massa molar, composição química e morfologia. Além disso, as propriedades e características do suporte empregado também intervêm na degradação como a porosidade, rugosidade e carga da superfície, presença de aditivos, além do tamanho, geometria e local que o suporte será empregado (BARBANTI; DUEK; ZAVAGLIA, 2005). Em alguns casos, as propriedades do polímero podem alterar diretamente a fisiologia de algum tecido ou órgão, como por exemplo, polímeros não degradáveis, os quais precisam ter moléculas de tamanho menor para que não afetem a depuração renal e, conseqüentemente, o material polimérico não se acumule no organismo do paciente (RAVICHANDRAN et al., 2012).

Quanto às propriedades mecânicas dos *scaffolds*, estas devem se adequar diretamente ao local de aplicação do produto, e também apresentar características similares ao tecido ou órgão que se destina. As propriedades mais importantes a serem consideradas são: resistência à tensão, resistência ao cisalhamento, elasticidade, dureza, rigidez na superfície, resistência à fadiga, ductibilidade e compressão. Um exemplo da interferência dessas particularidades é a aplicação do arcabouço polimérico na regeneração de tecido ósseo. Para este é necessário um polímero com boa elasticidade comparada ao tecido ósseo, resistência à compressão para evitar fraturas, e a rugosidade do material usado deve ser o suficiente para que as células consigam aderir adequadamente. Desta forma, é possível encontrar alguns exemplos desses materiais que estão sendo comercializados e possuem propósitos específicos na área biomédica, tais como apresentados no Quadro 1.

Quadro 1- Lista de arcabouços comercializados na área biomédica

Polímero	Propriedade	Aplicação biomédica	Nome comercial
PGA	Regeneração de tecido biológico e boas propriedades mecânicas	Dispositivo de fixação interna para ossos	Biofix® e DEXON®
PLGA	Capacidade de formar malhas e alta taxa de degradação	Enxerto de pele	Vicryl Rapid & CRYL VicrylMesh® e VicrylMesh®
PLLA	Boa resistência à tração, fibras não degradáveis e dispositivos à base de fibra	Substituição de ligamentos, vasos sanguíneos, dispositivos de fixação ortopédicos e fibras de alta resistência	DEXON® e Dacron®
PCA	Cola cirúrgica sintética, adesivo de pele, absorve e encapsula fármacos	Curativos e adesivos de aplicação tópica	Biobrane & Alloderm® e Dermabond®

Fonte: Adaptado de DHANDAYUTHAPANI B. et al. (2011).

No entanto, para serem empregados tanto na engenharia de tecidos como implantes para articulação, ósseo, cardíaco quanto na liberação de fármacos, é necessário que os polímeros, na forma de arcabouços, mantenham as mesmas características essenciais citadas anteriormente. Os demais requisitos necessários estão apresentados no Quadro 2.

Quadro 2- Requisitos dos arcabouços poliméricos para aplicação na engenharia de tecido.

Requisitos	
Capacidade de transportar sinais biomoleculares	Tamanho do poro ajustado a célula em reconstituição
Propriedades mecânicas que evitam estresse celular	Alta permeabilidade para difusão
Capacidade de ser remoldado	Promover funções celulares
Superfície capaz de fixar células	Alta porosidade

Fonte: Adaptado de CUI et al. (2004); RAVICHANDRAN et al. (2012).

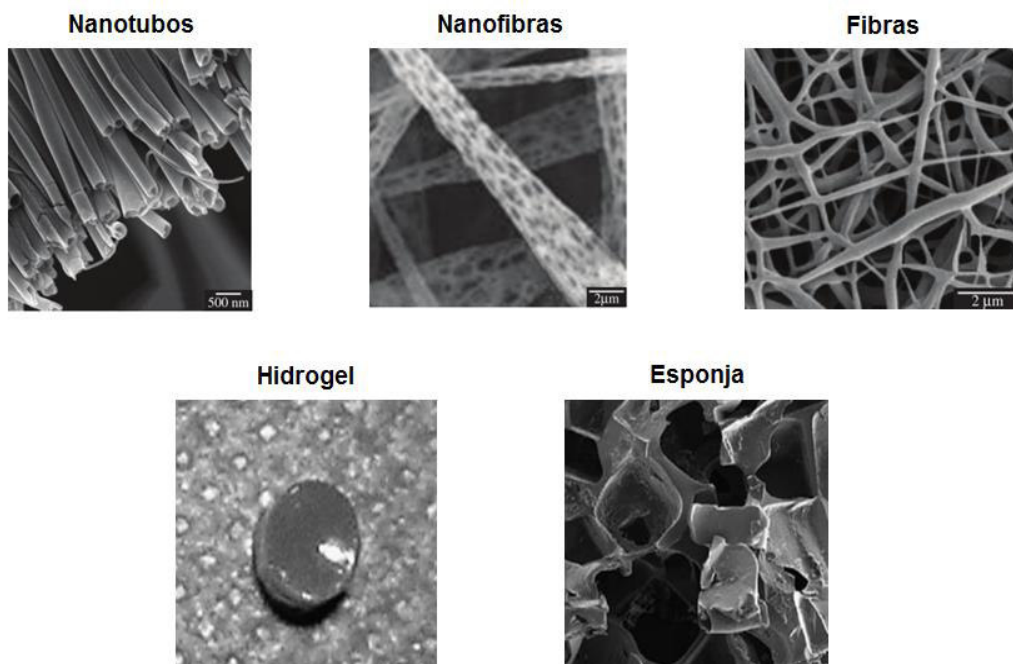
O processo de bioreabsorção também é um dos requisitos que os arcabouços com função de enxerto devem apresentar, pois desta forma, haverá reabsorção do polímero *in vivo*, enquanto o novo tecido encontra-se em desenvolvimento (BANDYOPADHYAY; BOSE; ROY, 2012). Uma das principais funções do arcabouço é mimetizar a biologia estrutural da matriz extracelular a qual é composta, principalmente, por colágeno (GHASEMI-MOBARAKEH; PRABHAKARAN; MORSHED, 2011). Como o colágeno possui a estrutura de fibra em escala nanométrica, para que o arcabouço tenha mais eficiência é necessário que este também apresente morfologia similar, podendo esta ser obtida através de técnicas diversas.

3.1.1 Estruturas dos arcabouços poliméricos

A morfologia do arcabouço é fundamental para que seja funcional quando aplicado ao tecido ou órgão alvo. Dentre as estruturas dos arcabouços, é possível encontrar: nanotubos, fibras, nanofibras, malhas, espumas, esponjas, hidrogel e esfera. De modo complementar, quanto à sua composição é possível uso tanto de polímeros quanto materiais biocerâmicos (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011). Alguns dos modelos se encontram representados na Figura 2.

Arcabouços destinados à liberação de fármacos, por exemplo, devem apresentar morfologia em géis ou com estruturas porosas, sendo nanofibras ou filmes que auxiliem no desprendimento do fármaco. Estruturas com alta porosidade são desejáveis, pois auxiliam na difusão de nutrientes e metabólitos, no entanto deve-se considerar que nesta condição, o módulo elástico do arcabouço diminui (WU, et al. 2014).

Figura 2 – Exemplos de estruturas de arcabouços poliméricos.



Fonte: Adaptado de COSTA et al. (2012, p.174) e GONÇALVES (2009, p.7).

3.2.2 Métodos de obtenção de arcabouços poliméricos

O método de produção de arcabouços poliméricos irá definir a morfologia do material atendendo a seus objetivos finais, tais como biocompatibilidade e biodegradabilidade. As técnicas mais comuns empregadas são, separação de fases induzida por solvente imiscível ou térmico, emulsão por liofilização, lixiviação, prototipagem rápida, formação de arcabouços por estímulos responsivos de hidrogéis, eletrofiação, impregnação, automontagem, entre outras. Algumas destas técnicas são discutidas neste trabalho, no entanto, o foco a seguir será a obtenção dos arcabouços através da técnica de eletrofiação.

Na separação de fases, o material é formado a partir da precipitação do polímero no seu não solvente ou por indução térmica, o tamanho médio do poro que é fornecido por esta técnica varia entre a escala micrométrica e nanométrica (LENDLEIN; SCHINKEL; WEIGEL, 2006). A liofilização produz material com alta taxa de porosidade, enquanto a lixiviação que também apresenta alta taxa de porosidade, possui uma faixa de tamanho do poro maior que 100-500 micrômetros (KIM et al., 2011).

Na formação de arcabouços por estímulos responsivos de hidrogéis, o material é formado *in situ*, através de reações químicas ou interações eletrostáticas, com a injeção do polímero e imediata gelificação (KIM et al., 2011). Outra técnica desenvolvida recentemente é a prototipagem a qual a produção ocorre a partir do uso de uma imagem digitalizada pelo computador e é capaz de proporcionar peças mais complexas com estruturas micro e nano bem definidas (HOQUE; CHUAN; PASHBY, 2011).

Para escolha da técnica mais adequada é também necessário considerar que cada uma possui suas próprias características, tais como, o uso de solvente orgânico durante o preparo pode ser nocivo para as células, por isso devem ser completamente eliminados, o formato dos poros; a temperatura usada no processo que pode degradar o polímero; o custo de produção, o tempo de fabricação. Portanto, o destino biomédico da aplicação do arcabouço irá influenciar na escolha da melhor técnica, sem que haja comprometimento das propriedades poliméricas.

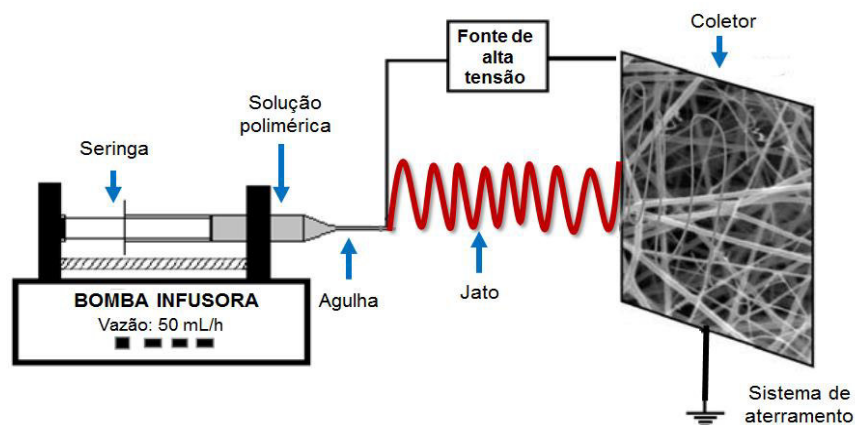
3.3 ELETROFIAÇÃO

A eletrofiação é um método de obtenção de fibras na escala micro e nanométrica que tem sido muito estudada nos últimos anos devido à facilidade de uso e à aplicação em engenharia de tecidos. A fiação eletrostática consiste basicamente na aplicação de um campo elétrico a uma solução polimérica em um sistema de aterramento (COSTA et al., 2012). Os arcabouços produzidos por este método podem apresentar morfologia fibrilar ou em tramas, porosidade elevada, boa maleabilidade, forma e tamanho diferentes como espessura média e homogeneidade da superfície. Todos estes fatores dependentes, em grande parte, das variáveis dos parâmetros durante o processo.

A Figura 3 apresenta esquematicamente o processo de eletrofiação, no qual uma seringa contendo uma solução polimérica é acoplada a uma bomba de fluxo. A bomba é responsável por controlar a vazão da solução polimérica, enquanto a agulha conectada a seringa, também se encontra ligada a uma fonte de alta tensão com polaridade negativa ou positiva. A solução polimérica é ejetada e assume o formato de uma gota na ponta da agulha que ao ser submetida ao campo elétrico, é atraída na direção do coletor. As forças eletrostáticas promovem a deformação e

consequente estiramento do jato fluido até que as forças viscosas de coesão sejam rompidas, levando a formação de um jato em direção ao coletor. Durante o caminho entre a ponta da agulha e o coletor, o solvente evapora levando à formação da fibra. O coletor é ligado ao sistema de aterramento e se encontra a uma distância determinada da agulha.

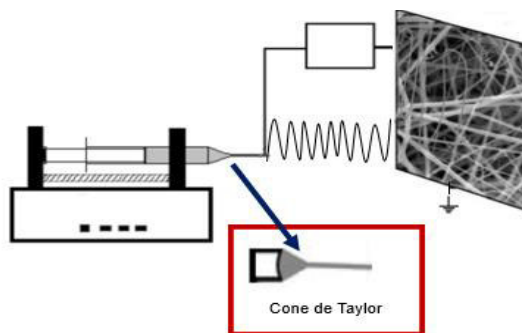
Figura 3 -Esquema da eletrofiação.



Fonte: Adaptado de SALLES, T. H. C. (2013, p.2).

Segundo estudos de Sir Geoffrey Ingram Taylor, quando a tensão é aplicada na gotícula formada na ponta da agulha ocorre um estiramento com a aparência de um cone o qual foi denominado posteriormente como cone de Taylor. Ainda nestes trabalhos, foi observado que o jato da solução é gerado no vértice do cone, por isso a eletrofiação pode gerar fibras de dimensões menores do que o diâmetro da agulha utilizada (SILL; VON, 2008). A gota da solução polimérica sofre um estiramento devido ao elevado campo elétrico aplicado (~ 100 KV/cm), levando à formação do cone de Taylor representado pela Figura 4. O cone de Taylor se forma quando a tensão aplicada permite que as forças eletrostáticas superem a tensão superficial da solução. Logo após a formação do cone, ocorre o estiramento do jato.

Figura 4- Representação do cone de Taylor.



Fonte: Adaptado de SALLES, T. H. C. (2013, p.2).

A morfologia da fibra gerada pela técnica de eletrofiação dependerá de vários fatores, cujos principais são o tipo polímero empregado, a vazão de solução, a viscosidade da solução polimérica, o solvente utilizado, a temperatura ambiente, dentre outros.

3.3.1 Parâmetros da eletrofiação

Os arcabouços poliméricos podem apresentar morfologias diferentes dependendo de seu objetivo final e, através de técnicas auxiliares usadas durante a eletrofiação, é possível alterar vários aspectos do suporte. Os parâmetros podem ser divididos em três categorias principais, parâmetros da própria solução, da técnica e os fatores relacionados ao ambiente (GOH; IMRAN; HUSSAIN, 2013).

Alguns fatores afetam diretamente o diâmetro da fibra, as propriedades reológicas da solução polimérica utilizada; a velocidade de rotação do coletor, caso seja rotacional; a tensão aplicada e condições do ambiente. O tamanho e o número de poros do arcabouço também podem ser controlados através das variáveis do processo.

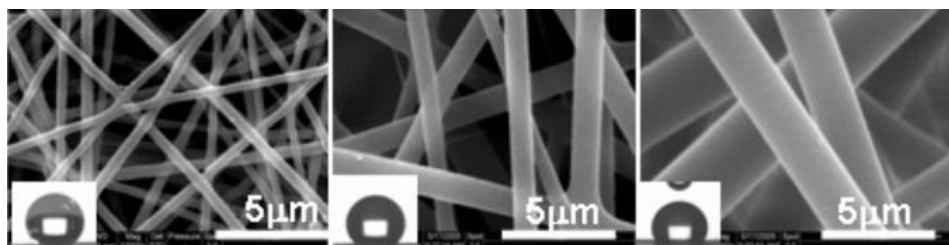
3.3.1.1 Parâmetros relacionados à solução

Dentre os parâmetros referentes à solução os mais comuns são o tipo de solvente, concentração da solução polimérica, viscosidade, tensão superficial, rigidez dielétrica e condutividade. Quando se trata de escolher o solvente adequado é necessário considerar vários aspectos, dentre eles a pressão de vapor, pois a

evaporação do solvente irá determinar o grau de porosidade na superfície das nanofibras (COSTA et al., 2012).

A concentração e, conseqüentemente a viscosidade também alteram o alinhamento das fibras o que é difícil de ser controlado apenas pelo uso da alta voltagem (SUNDARAY et al., 2004). Quando se trata de soluções com concentrações de polímeros mais baixas é viável obter uma mistura de grânulos com as fibras, já em concentrações maiores, os grânulos passam a ser fibras fusiformes (DEITZEL, 2001; HAGHI, 2007; KI, 2005; LIU, 2002; RYU, 2003). Com o aumento da concentração da solução, a viscosidade é modificada e com isso, são geradas fibras de diâmetro diferentes, como mostrado na Figura 5.

Figura 5- Fibras de diâmetros diferentes.



Fonte: Adaptado de CHANG, J; CUI, W; ZHOU, Y. (2016, p.3).

Em baixos valores de viscosidade ocorre a geração de um jato instável, resultando na dispersão de gotículas de polímero no coletor (KHORSHIDI et al., 2015), enquanto que um leve aumento da viscosidade pode levar ao aumento do diâmetro da fibra e o desaparecimento de grânulos do polímero. A viscosidade não pode ser muito elevada, pois dificulta a ejeção do jato pela seringa. Tanto a tensão superficial quanto a viscosidade elevada não permitem a formação da fibra, pois há instabilidade no jato gerado durante a técnica de eletrospinning (COSTA et al., 2012).

A condutividade da solução é influenciada de acordo com o solvente utilizado, tipo de polímero e disponibilidade de sais ionizáveis. O jato eletrofiado contendo a solução polimérica viscosa consegue ser estirado devido à repulsão entre as cargas presentes na superfície (UYAR; BESENBACHER, 2008). Conforme ocorre uma concentração de cargas, e conseqüentemente o aumento da

condutividade, é possível obter fibras com diâmetros menores (BHARDWAJ, 2010; COSTA, 2012; HASAN, 2014; SILL, 2008; UYAR, 2008).

3.3.1.2 Parâmetros relacionados ao processo de eletrofiação

Os principais parâmetros relacionados ao processo de eletrofiação são a tensão aplicada, a vazão, o tipo de coletor e a distância entre a seringa e o coletor. Os ajustes destes parâmetros estão diretamente relacionados à morfologia que as fibras eletrofiadas podem apresentar.

O campo elétrico aplicado por uma fonte de alta tensão é um dos principais fatores, pois a partir desta, o jato pode ser eletrofiado logo após a formação do cone de Taylor. Assim, com a chamada tensão crítica inicia o processo de fiação. Alguns autores relatam que o aumento da tensão leva à repulsão eletrostática das cargas, favorecendo com que as fibras permaneçam mais estreitas ocasionando uma redução dos diâmetros (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). Esta proposta teórica é representada por meio a Equação 1 onde o diâmetro da fibra é reduzido com o aumento da tensão aplicada.

Equação 1- Equação representativa da relação diâmetro da fibra em função da taxa de fluxo para diferentes voltagens.

$$\uparrow h = \left(\frac{2r_s \rho Q^3 Z}{\pi^3 \downarrow U^2} \right)^{1/6}$$

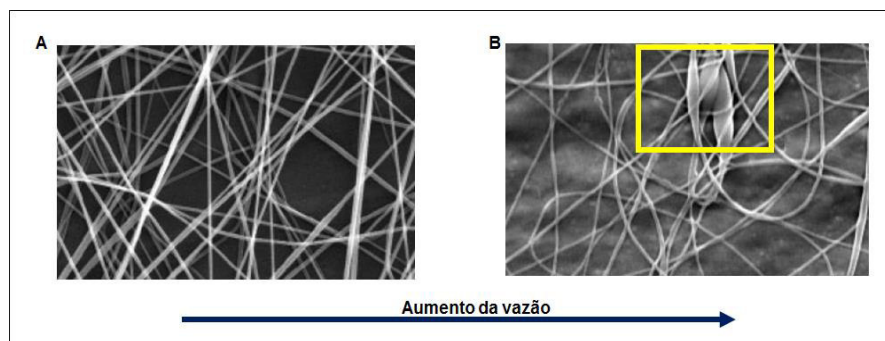
Onde:

ρ – Densidade	u – Voltagem
r_s – Resistividade da solução	Q – Vazão
h – Diâmetro da fibra	Z – Comprimento do jato

Fonte: Adaptado de CRAMARIUC, B. et al. (2013, p.191).

Outro parâmetro que pode ser controlado é a vazão a qual deve ser adequada para que haja tempo suficiente para o solvente evaporar durante o processo (YUAN et al., 2004). A vazão pode favorecer a formação de poros com uniformidade no tamanho e também pode levar à formação de fibras frisadas com formas de cordões ao invés de fibras lisas como apresentadas na Figura 6.

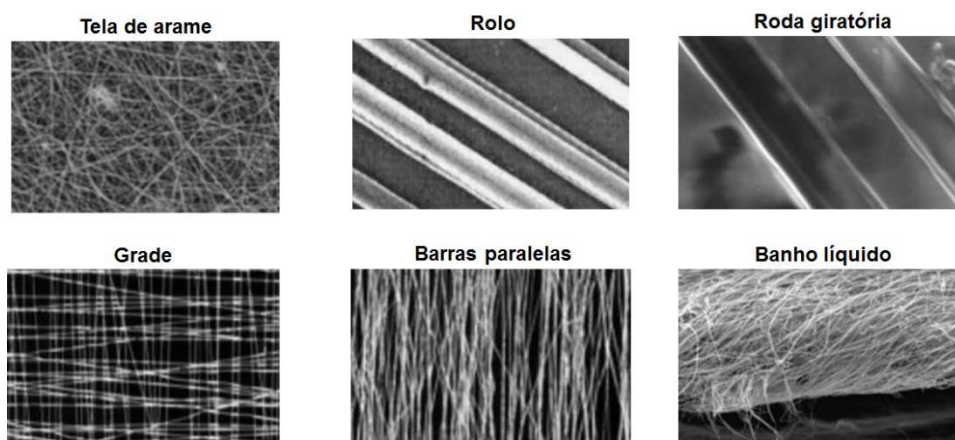
Figura 6 – Fibras obtidas por eletrofiação com vazão menor (A) com vazão maior (B). Destaque para morfologia formada na vazão maior (B).



Fonte: Adaptado de YUAN, X.; ZHANG, Y.; DONG, C.; SHENG, J. (2004, p.1706).

Dentre os parâmetros da técnica, encontra-se também o coletor que sempre se encontra ligado a um sistema de aterramento ou com carga oposta, pois durante a eletrofiação a fibra atingirá o coletor de forma mais acelerada (SILL; VON RECUM, 2008). Dessa forma, os diversos coletores que podem ser usados na eletrofiação são fixos, móveis como hastes ou rodas giratórias, banho líquido, tela de arame, em grade ou rolo e barras paralelas. E para cada coletor é possível obter uma fibra diferente como ilustrado na Figura 7.

Figura 7- Tipos de fibras obtidas de acordo com os coletores utilizados



Fonte: Li, Z.; Wang, C. (2013, p.24).

A distância entre o coletor e a seringa é considerado um importante fator, pois a intensidade do campo elétrico varia tanto com a tensão quanto com a distância aplicada (CRAMARIUC et al., 2013). A distância entre a ponta do bico

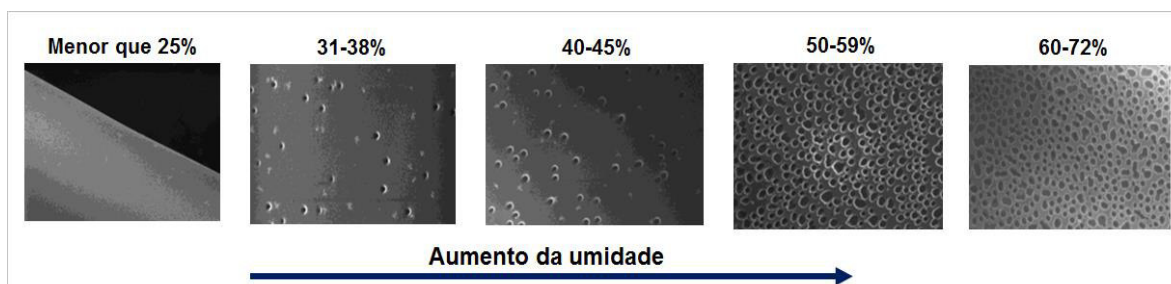
injetor e o coletor deve ter um valor mínimo para garantir a total evaporação do solvente, e um valor máximo para que o campo elétrico seja efetivo na estabilização do cone de Taylor. Consequentemente, a formação das nanofibras é favorecida.

3.3.1.3 Parâmetros relacionados ao ambiente

Os parâmetros relacionados ao ambiente também influenciam no resultado final da eletrofição, sendo os principais: a temperatura e a umidade. A variação da temperatura ambiente altera diretamente o diâmetro da fibra, visto que existe uma relação inversa entre a viscosidade e a temperatura. Assim, com o aumento da temperatura, há redução da viscosidade da solução polimérica (BHARDWAJ; KUNDU, 2010), resultando na diminuição do diâmetro da fibra.

Quanto à umidade, esta tem um papel direto na formação de fibras porosas e o aumento da umidade leva ao aumento em número, diâmetro e distribuição dos poros (BHARDWAJ, 2010; CASPER, 2004; COSTA, 2012; LI, 2013; LUO, 2010; MEGELSKI, 2010; THOMPSON, 2010). Em casos de polímeros hidrofóbicos eletrofiados, o vapor originado da umidade promove a separação de fases, levando a formação de poros na superfície da fibra (COSTA, 2012; LUO, 2010). Com o aumento dos poros, observa-se uma coalescência entre eles e o desenvolvimento de poros maiores (CASPER; STEPHENS, 2004). Este fenômeno é exemplificado na Figura 8, com as micrografias selecionadas para ilustrar o aumento dos poros junto ao aumento da umidade.

Figura 8- Micrografias selecionadas para ilustrar o aumento dos poros junto ao aumento da umidade.



Fonte: Adaptado de CASPER, C. L. et al (2004, p.574).

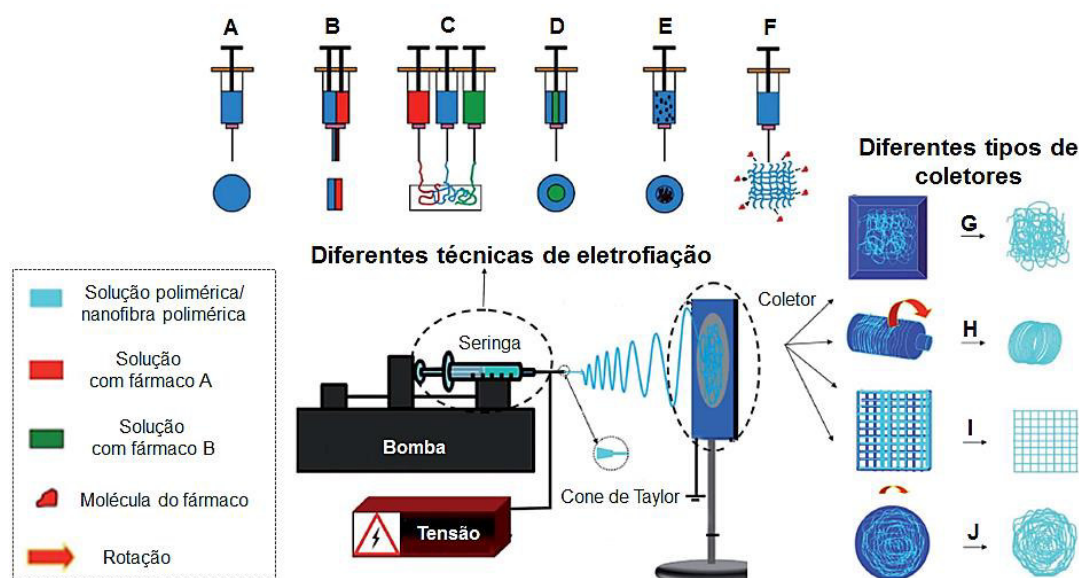
3.4 ELETROFIAÇÃO COAXIAL

Existem diversos tipos de técnicas de eletrofiação que se diferenciam de acordo com os parâmetros utilizados. Dentre eles, podem ser citados o tipo de coletor (rotação simples ou dupla, coletor fixo ou com rotação, barras simples ou duplas), o número de seringas utilizadas (eletrofiação coaxial ou multijato) ou a temperatura da solução polimérica utilizada (*melt electrospinning*). Alguns tipos de eletrofiação podem ser vistos na Figura 9.

A obtenção de fibras coaxiais é representada pela letra D no esquema da Figura 9, a principal característica é o uso de uma agulha com diâmetro menor (interna) que se encaixa de forma concêntrica dentro de uma agulha com diâmetro maior (externa). Tanto a agulha interna quanto a externa estão conectadas a seringas contendo diferentes soluções e ambas ligadas à uma fonte de alta tensão. As agulhas podem estar dispostas tanto na vertical como na horizontal. Ao ser submetida a tensão crítica ideal haverá a formação de dois cones de Taylor (referentes à solução interna e externa) quando o campo elétrico supera a tensão superficial de ambas soluções, forma-se o jato interno e externo, correspondentes ao núcleo e a casca, respectivamente. O esquema da eletrofiação coaxial é representado pela Figura 10.

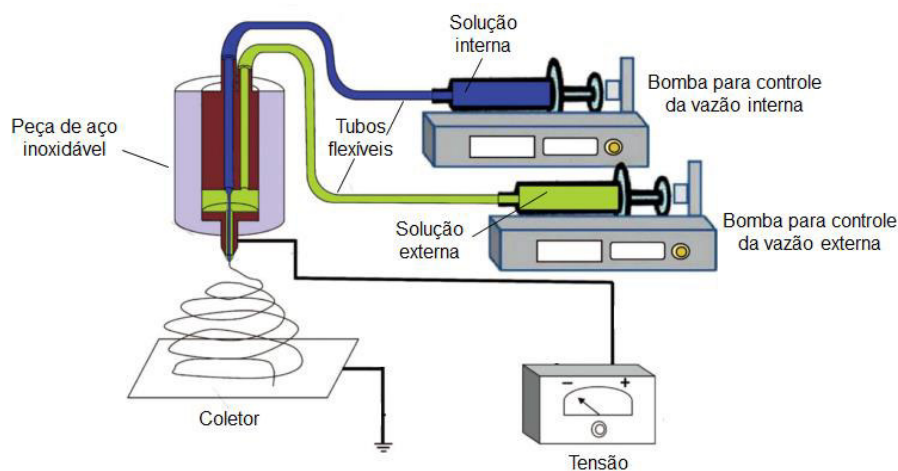
A eletrofiação, com o passar dos anos, é cada vez mais aplicada à área biomédica assim como a eletrofiação coaxial que também está ganhando destaque como pode ser visto pelo Gráfico 1. A eletrofiação quando apropriadamente utilizada, auxilia na obtenção de arcabouços com maior ou menor porosidade, homogeneidade da espessura das fibras, orientação fibrilar, entre outras características controláveis que possam ser mais adequadas a aplicação desejável. Para coaxial, a produção de fibras núcleo-casca favorece na proteção das fibras internas contra degradação externa, de enzimas, condutividade térmica e elétrica controláveis.

Figura 9- Variações da técnica de eletrofiação de acordo com o tipo de inserção de fármacos (A-F) e tipos de coletores (G-J). (A) Co-eletrofiação; (B) Eletrofiação lado a lado; (C) Eletrofiação multi-jato; (D) Eletrofiação coaxial; (E) Eletrofiação emulsificada; (F) Imobilização da superfície; (G) Placa fixa; (H) Rolo rotativo; (I) Grade; (J) Disco rotativo.



Fonte: Adaptado de VELLAYAPPAN, M. et al. (2016, p.83641).

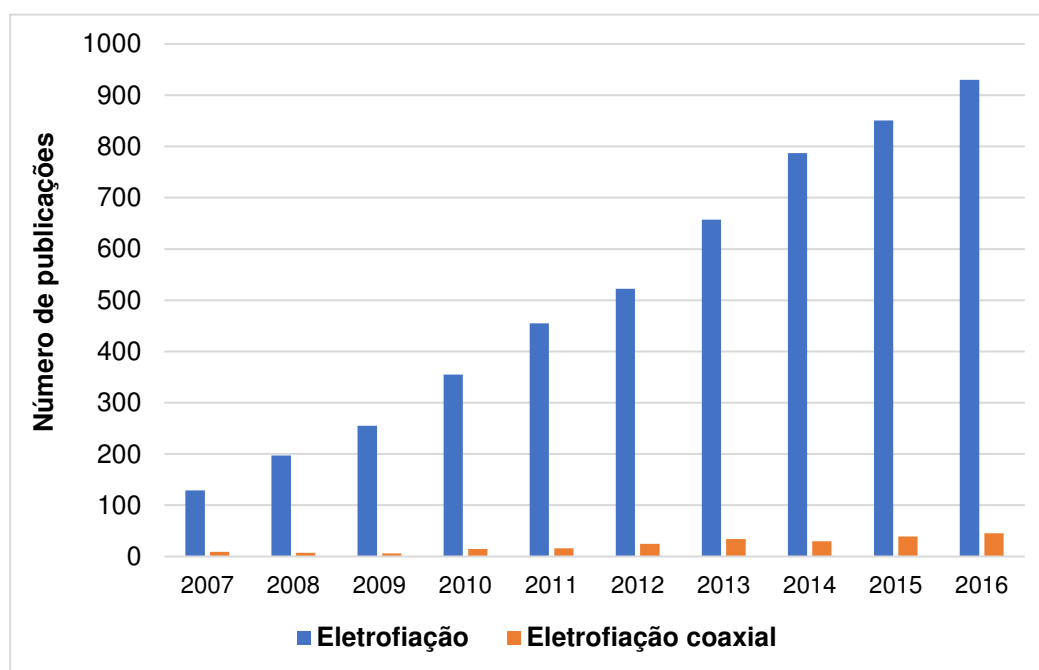
Figura 10- Esquema da eletrofiação coaxial.



Fonte: Adaptado de REZAEI et al. (2015, p.2)

Uma das principais vantagens do uso de fibras núcleo-casca eletrofiadas é a prevenção e redução bem-sucedida do fenômeno *burst* na liberação de substratos devido à barreira formada pela fibra-casca (MEINEL et al., 2012). O efeito *burst* acontece quando há liberação de uma grande parte do substrato ou fármaco de forma imediata, ou seja, não há uma liberação prolongada. A incorporação do fármaco ou substrato pode acontecer de duas formas, através do pós-tratamento de nanofibras eletrofiadas ou por eletrofiação coaxial da solução já contendo o substrato (YU et al., 2013). Assim, as fibras com morfologia núcleo-casca estão sendo amplamente desenvolvidas para aplicação biomédica nas quais é necessária uma liberação lenta e controlada.

Gráfico 1 – Número de publicações com as técnicas de eletrofiação e eletrofiação coaxial na área biomédica nos últimos 10 anos.



Fonte: Pubmed (2017).

3.4.1 Parâmetros relacionados à eletrofiação coaxial

A eletrofiação coaxial, em geral, é afetada pelos mesmos parâmetros encontrados na eletrofiação convencional de fibras monolíticas. Entretanto, é necessário ressaltar que alguns parâmetros são determinantes para formação da fibra núcleo-casca, como: tensão, vazão interna e vazão externa.

A tensão elétrica aplicada possui um ponto crítico, sendo que abaixo deste ocorre o gotejamento de parte da solução sem formação do jato ou com formação de um jato descontínuo. Acima do ponto crítico, a força do campo elétrico leva a formação de cones de Taylor separados e conseqüentemente com a formação de jatos separados, além disso, pode haver múltiplos jatos instáveis se originando a partir do jato principal ou formados a partir de um único cone Taylor. A Figura 11 demonstra os casos descritos anteriormente.

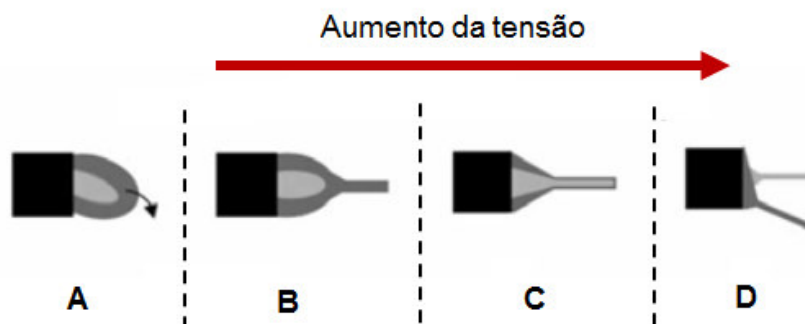
As vazões interna e externa das soluções poliméricas também afetam na formação dos jatos. No caso da vazão interna estar muito alta, o jato que forma o núcleo é fragmentado em gotas, enquanto que a vazão externa alta leva a não formação de uma fibra-núcleo contínua. Outro fato relevante, é a miscibilidade entre as soluções poliméricas, assim para que os dois jatos sejam formados separadamente e de forma concêntrica é necessário que as soluções poliméricas sejam imiscíveis entre si. O primeiro estudo referente a técnica coaxial foi realizado por Loscertales et al. (2002) o qual destaca o uso de dois líquidos imiscíveis.

3.5 ELETROFIAÇÃO APLICADA À ENGENHARIA DE TECIDOS

A técnica de eletrofiação é aplicada na área biomédica por fornecer arcabouços cuja estrutura se assemelha à matriz extracelular de modo a facilitar o desenvolvimento celular. As fibras obtidas possuem uma área superficial elevada o que garante que os poros formados estejam interconectados na proporção correta para o transporte de oxigênio e nutrientes (ZOU et al., 2012).

As células do tecido a ser reconstituído devem ser isoladas e cultivadas *ex vivo* no arcabouço polimérico para que então este seja implantado no paciente ou o arcabouço pode ser aplicado diretamente no paciente formando o tecido *in situ* (REZWAN et al., 2006). A aplicação destes materiais estende-se a tecidos do tipo vascular, ósseo, nervoso, ligamentos, além de curativos e veículo para liberação de fármacos. Dentre as várias aplicações possíveis dos arcabouços eletrofiados, o tecido ósseo é um dos mais estudados.

Figura 11- Esquema da influência da tensão na formação da fibra núcleo-casca na eletrofiação coaxial: (A) abaixo da tensão crítica com possível gotejamento das soluções; (B) abaixo da tensão crítica e formação de apenas um jato; (C) tensão crítica ideal com formação do núcleo-casca; (D) muito acima da tensão crítica com formação de mais de um cone de Taylor e múltiplos jatos.



Fonte: Adaptado de ELAHI, F.; LU, W; GUOPING, G.; KHA, F. (2013, p.6).

3.5.1 Engenharia de tecidos para aplicação óssea

O tecido ósseo é o principal componente do esqueleto e possui como funções principais armazenamento da medula óssea, suporte e proteção dos órgãos. Este tecido pode ser dividido em fração inorgânica formada por íons de fosfato, cálcio, potássio e entre outros; e em fração orgânica composta por colágeno. A hidroxiapatita (HA) é o principal integrante inorgânico do osso, por isso já existem pesquisas para formular arcabouços eletrofiados compostos por nano e micropartículas de HA (KHORSHIDI et al., 2015). As células que constituem o tecido ósseo e as suas respectivas funções podem ser classificadas em osteoblastos, responsáveis pela produção de matriz óssea; osteócitos que realizam a manutenção da matriz óssea; e osteoclastos os quais promovem a remodelagem e reabsorção óssea, sendo estas regulada por hormônios.

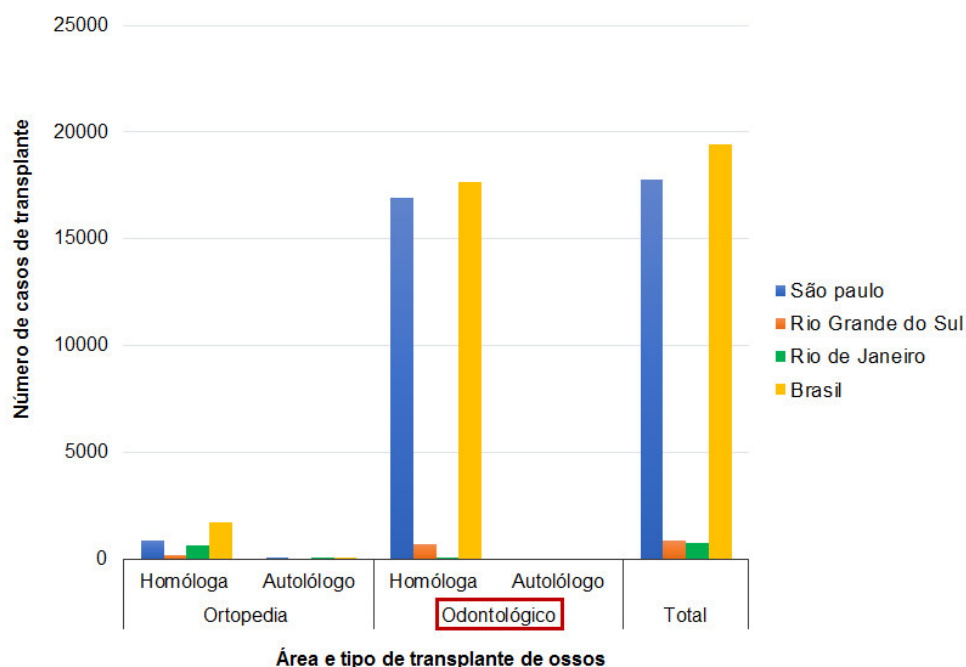
Os casos clínicos mais comuns de recuperação do tecido ósseo incluem traumas, fraturas espontâneas, má formação congênita e patologias que ocasionem perda de massa óssea como o câncer ou osteoporose. Os tipos de tratamentos mais comuns nestes casos são transplantes ósseos também chamados de enxertos e que podem ser autoenxerto ou transplante autólogo o qual é o transplante de

enxerto ósseo, a partir do tecido ósseo do próprio paciente (por exemplo: crista ilíaca ou fíbula) de um local diferente da injúria; e aloenxerto ou transplante homólogo que é o uso do tecido de outro indivíduo da mesma espécie.

Segundo a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos em 2015, o número de transplantes ósseos foi principalmente na área odontológica com destaque aos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Sul. Estes dados podem ser vistos no Gráfico 2, a seguir.

Embora alo ou autoenxertos tenham sido bem-sucedidos, surgiram casos de rejeição pelo sistema imune e risco de doenças associadas ao enxerto como infecções e hipersensibilidade (JIANG, 2015; LI, 2014; SEEHERMAN, 2002). Por isso, novas formas de tratamento alternativas começaram a surgir, como por exemplo, o uso de biomateriais poliméricos. Assim, os biomateriais poliméricos sintéticos vêm sendo cada vez mais usados como substitutos ósseos (BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY, 2012). Como a microestrutura do tecido ósseo é formada por poros, a aplicação de compósitos fibrosos eletrofiados torna-se viável, pois é possível controlar a porosidade através desta técnica. O desafio atual desta abordagem é fabricar um enxerto bioativo que mimetize a matriz extracelular com mineralização óssea eficaz (CUI; ZHOU; CHANG, 2016), por isso este campo ainda é muito estudado principalmente para aplicações odontológicas.

Gráfico 2 - Número de transplantes de ossos disponibilizados pelos 5 Bancos de Tecidos (RS,RJ,SP(3)), durante o ano de 2015. Destaque para a área odontológica.

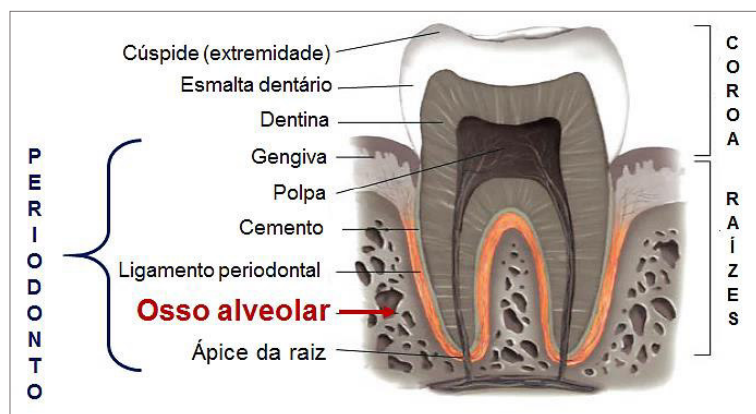


Fonte: Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos.

3.5.1.1 Periodonto

O periodonto é o tecido que tem como principal função inserir o dente no tecido ósseo dos maxilares e manter a integridade da cavidade bucal. Este tecido se encontra dividido em periodonto de proteção referente a gengiva e o periodonto de sustentação o qual inclui o cemento e osso alveolar. O osso alveolar ou osso de suporte é um tecido conjuntivo mineralizado e neste, encontra-se a união dos dentes à mandíbula por meio de fibras colágenas. A Figura 12 demonstra a visão macroscópica do dente e seus tecidos com destaques para o periodonto e osso alveolar.

Figura 12- Visão macroscópica do dente com destaques para o periodonto e osso alveolar



Fonte: Adaptado de ARCHANA, A. et al.(2014, p.50).

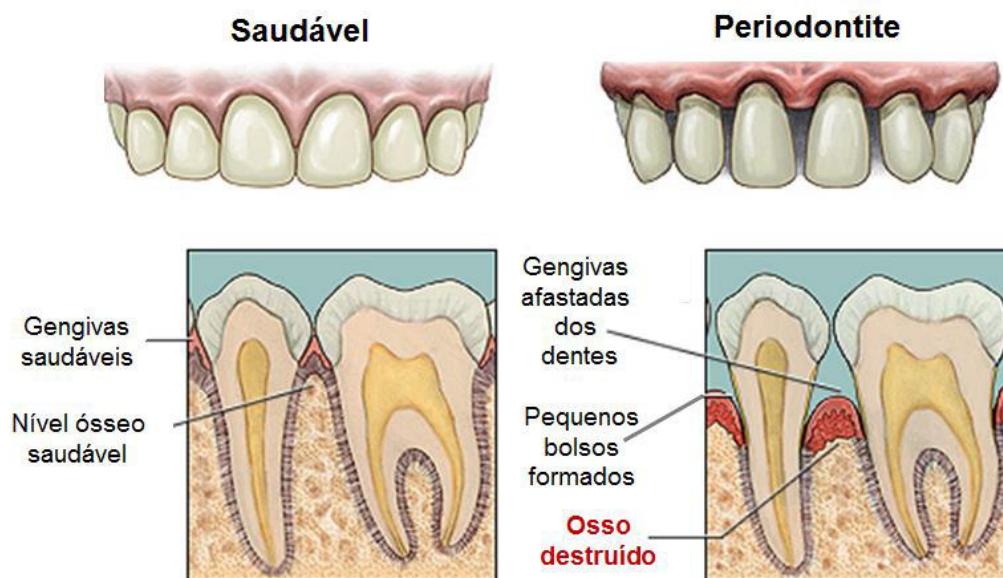
Em casos de perda óssea, há uma redução da espessura do osso alveolar o que pode ser ocasionado não somente pelas patologias que acometem o tecido ósseo, mas também por extrações dentárias traumáticas e ausência dentária congênita. A Figura 13 ilustra a diferença entre o tecido periodontal saudável e em caso de perda óssea.

Em casos clínicos que o paciente possui nível ósseo próximo ao normal, é possível uso de implantes dentários, mas se há o nível muito baixo é necessário buscar tratamentos alternativos. Isto ocorre, pois, o osso possui uma capacidade única de regeneração e durante a cicatrização de fraturas e incorporação de implantes, os osteoblastos pré-existent no tecido contribuem com apenas uma pequena porção para nova formação óssea (ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001). Assim, em algumas situações devido à extensão da injúria, o tecido ósseo não se recupera sozinho.

Para promover da recuperação buco-maxilar, a área odontológica já dispõe de diversas formas de tratamentos como o uso de enxertos, cirurgias e dispositivos como os de titânio. Segundo a Sociedade Brasileira de Odontologia, em casos de cirurgia, há o uso de implantes zigomáticos que são pinos de titânio para pacientes sem estrutura óssea necessária para posterior implantação de dentes. Ainda com esta possibilidade de tratamentos, o uso de dispositivos de titânio tem muitas

limitações como exposição da malha de titânio após a cirurgia que sobrecarga dos tecidos moles e risco de infecção levando a uma nova perda óssea (FAHMY et al., 2015).

Figura 13- Ilustração da diferença entre tecido periodontal saudável com nível ósseo normal e a periodontite com o osso destruído.



Fonte: Modern Dentistry (2016).

A regeneração óssea guiada é uma técnica muito utilizada e foi descoberta nos anos 80 como resultado do objetivo de tratar a perda de tecidos periodontais (HÄMMERLE; KARRING, 2000). Esta técnica permite que células ósseas e do ligamento periodontal possam repopular a superfície e área defeituosa (JIMI et al., 2012). Para facilitar a infiltração do tecido e formação óssea neste método, são utilizadas membranas de biomateriais que apresentam porosidade e para obtenção e controle desta propriedade, a eletrofiação é um processo promissor (LEE et al., 2013). Assim, os arcabouços têm sido utilizados como uma plataforma para crescimento celular na engenharia de tecidos, sendo muito aplicados na medicina regenerativa periodontal (CHEN et al., 2012).

Outras opções de tratamento que já podem ser encontradas no mercado são: a BoneCeramic™ que é um material cerâmico composto de hidroxiapatita e fosfato β -tricálcico, permite absorção do material enquanto é substituído pelo osso natural;

o Infuse® Bone Graft o qual é composto pela proteína morfogênica óssea recombinante (rhBMP-2). Apesar de haver alguns produtos no mercado para recuperação óssea periodontal, no geral há poucas opções de tratamento. Além disso, as pesquisas atuais apresentam discrepâncias entre esforços de pesquisa científica na engenharia de tecido ósseo e a aplicação clínica (HENKEL et al., 2013). Desta forma, a engenharia de tecidos continua sendo relevante para geração de arcabouços que auxiliem neste tipo recuperação óssea. E para recuperação de tecido periodontal, são necessários vários elementos além dos arcabouços biodegradáveis, como células e fatores de crescimento que mimetizem os processos biológicos (XIE et al., 2016).

3.6 CULTIVO DE CÉLULAS EM ARCABOUÇOS ELETROFIADOS

Os arcabouços eletrofiados têm desempenho melhorado em comparação aos arcabouços obtidos por outras técnicas pois há formação de uma interface que favorece a osteocondutividade e biocompatibilidade (PINA; RODRIGUES; REIS, 2015). Os arcabouços para enxerto ósseo precisam apresentar alta resistência à tração, à compressão, força de torção, tamanho de poros interconectividade entre os poros e porosidade ideal maior que 90% (PRAMANIK; PINGGUAN-MURPHY; ABU OSMAN, 2012). Alguns estudos demonstram que materiais nanoestruturados são mais favoráveis porque permitem maior interação entre as proteínas, sendo mais eficaz no crescimento do tecido ósseo (LI et al., 2013). Todas essas características necessárias podem ser obtidas e melhor controladas através do processo de eletrofiação, por isso os arcabouços eletrofiados são mais utilizados que arcabouços obtidos pelas técnicas de separação de fases ou de automontagem.

O crescimento das células ósseas pode ser favorecido com a formação de compósitos como demonstra o estudo realizado por Rajzer e colaboradores (2014). Neste trabalho, o arcabouço composto por poli(caprolactona), nanopartículas de fosfato de cálcio e gelatina permitiu a produção de uma matriz semelhante à óssea, além de possuir propriedades físico-químicas e biológicas melhoradas. Além do uso destes substratos para melhorarem a atividade celular, também há o uso de fatores

de crescimento que têm como objetivo estimular e acelerar a proliferação, o que resultaria em um tempo mais curto para recuperação do paciente.

3.6.1 Uso de fatores de crescimento no cultivo celular

Dentre os fatores de crescimento mais estudados e promissores, encontram-se: proteínas morfogênicas ósseas (BMPs), fatores de crescimento para fibroblastos (FGFs), o fator de crescimento para endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento transformador (TGFs), PDGFs e fatores de crescimento insulínicos (IGFs). As funções destes fatores variam com o tecido, e para as células ósseas os principais fatores que controlam a osteogênese, regeneração, através do recrutamento e diferenciação de células osteoprogenitoras são IGF, FGF, VEGF, TGF- β e BMP (BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY, 2012).

Alguns estudos demonstraram que interleucinas, TNF- α e prostaglandinas também podem estimular a migração e diferenciação de osteoblastos e osteoclastos (BUSILACCHI et al., 2013). Enquanto, o IGF ajuda na migração de diferentes células do tecido ósseo, o FGF pode ser usado para maturação do tecido ósseo formado. Já o TGF- β 1 e TGF- β 2 inibem atividade de osteoclastos e desencadeiam uma rápida maturação do colágeno em feridas (CUI et al., 2004).

Na literatura, podem ser encontrados os hormônios de crescimento usados para proliferação e diferenciação de osteoblastos (BOSE; TARAFDER, 2012). Outro fator muito adicionado aos arcabouços é o VEGF para vascularização e formação de uma rede complexa de vasos sanguíneos o que permite a difusão de oxigênio e nutrientes. O tecido ósseo é boa parte formado de fosfato de cálcio e hidroxapatita, por isso, estes também podem ser incorporados aos arcabouços, mimetizando ainda mais a matriz extracelular óssea. Fator de crescimento para hepatócitos (HGF) também induz angiogênese por promover expressão de VEGF, o HGF induz proliferação de osteoblasto e aumenta bioatividade do fosfato de cálcio.

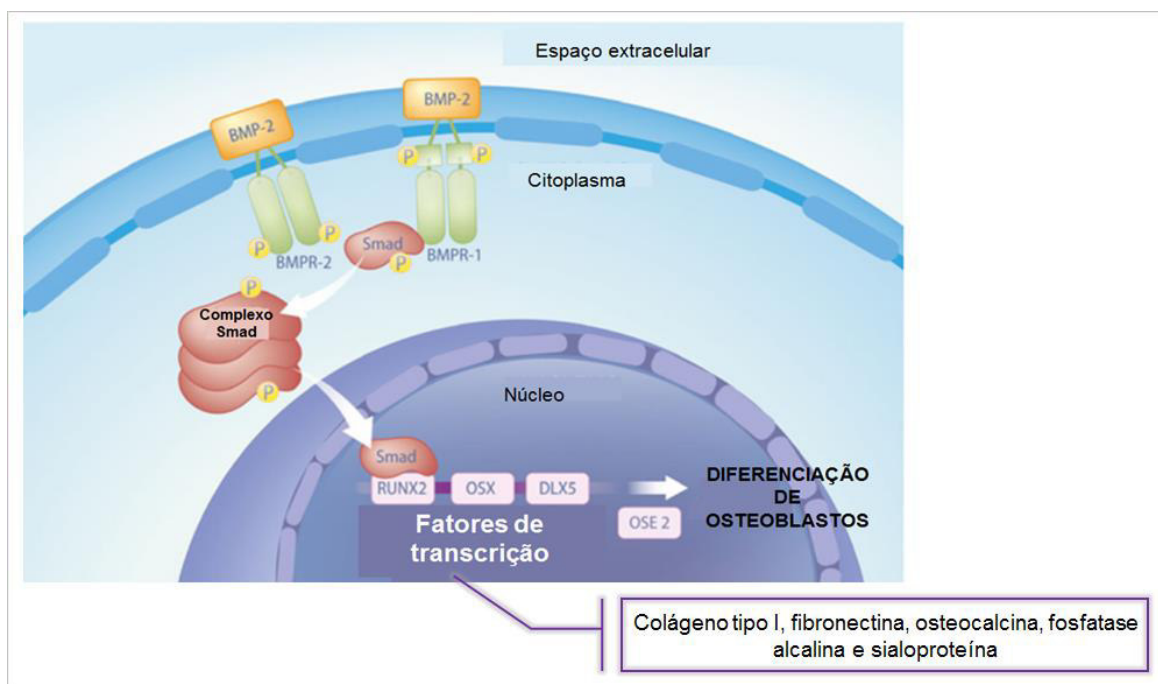
Apesar de todas essas proteínas serem aplicáveis na recuperação de tecido ósseo, as proteínas morfogênicas ósseas (BMPs) estão dentre as mais utilizadas devido a capacidade destas proteínas em desencadear toda a cascata de sinalização necessária para nova formação óssea.

3.6.1.1 Proteínas morfogênicas ósseas do tipo 2 (BMP-2)

A capacidade de regeneração óssea com o uso de matriz óssea desmineralizada é conhecida há muitos anos, contudo esta atividade foi descoberta nos anos 80, com o isolamento das proteínas morfogênicas ósseas do osso bovino (WOZNEY, J. M., 2002). Estas proteínas são divididas em subgrupos de acordo com a similaridade nas funções e sequências de aminoácidos, sendo estes: BMP-2 e 4; BMP-5, 6, 7 e 8; BMP- 9 e 10; BMP- 12,13 e 14 (BRAGDON et al., 2011). Dentre estas proteínas, a BMP-2 e 7, por terem alta eficiência foram aprovadas pela agência americana *Food and Drugs Administration* (FDA) para uso clínico em fraturas de ossos longos e abertos, promovendo a união e fusão óssea (CARREIRA, 2014; KAMIYA, 2011). A proteína BMP-2 tem sido o fator osteogênico mais estudado e uma das áreas mais aplicadas é a odontologia com a regeneração periodontal e osteointegração do implante (HONG et al., 2013).

A atuação das BMPs é a indução da diferenciação celular em osteoblastos e a sinalização ocorre através de glicoproteínas que interagem com receptores das células. Ao interagir com os receptores, BMP-2 promove ativação de uma via chamada Smad e através da fosforilação das proteínas deste complexo, há expressão dos seguintes fatores de transcrição RUNX2, OSX e DLX5 responsáveis pela produção de colágeno do tipo 1, fibronectina, entre outras proteínas. A expressão destes fatores também leva a expressão do gene OSE2 responsável pela diferenciação dos osteoblastos. Tanto a produção destas proteínas quanto a diferenciação dos osteoblastos são relevantes para regeneração óssea. A Figura 14 é esquema resumido da atuação da BMP-2 à nível celular.

Figura 14- Esquema de atuação da BMP-2 à nível celular com destaque para produção das proteínas colágeno tipo I, fibronectina, osteocalcina, fosfatase alcalina e sialoproteína, importantes para formação de um tecido ósseo novo.



Fonte: Adaptado de LIN, G. et al. (2015, p.1350).

A aplicação desta proteína não deve ser direta no seu local de ação por ser uma proteína susceptível a desnaturação por enzimas proteolíticas. Desta forma, para que haja eficiência no seu uso, a BMP-2 é utilizada em formulações dispositivos obtidos por arcabouços poliméricos. Estes arcabouços permitem que a liberação seja controlada sem sofrer o efeito *burst*, fazendo com que todo o substrato seja liberado quase que de forma imediata. A eficácia dos sistemas de liberação ainda deve ser estudada para que dessa forma haja melhoria na manipulação dos fatores de crescimento biológicos. Assim, possivelmente, haverá identificação do fator mais eficaz (BMP, TGF- β) ou de combinações de fatores de crescimento (BMP/VEGF, BMP-2/BMP-7) mais eficazes. Os perfis de liberação devem ser delineados, melhorando a eficácia osteoindutora *in vivo* (VO, T. N. et al., 2012).

3.6.2 Uso de células para regeneração óssea guiada

A engenharia de tecidos utiliza células para desenvolver substitutos biológicos que possam melhorar a função de um tecido ou órgão. As células são desenvolvidas em arcabouços tridimensionais que possuem eficiência no transporte de oxigênio e nutrientes, formando assim uma matriz óssea durante o processo de recuperação. Dentre as células utilizadas na engenharia de tecido ósseo estão as estaminais mesenquimais, células estroma da medula óssea, periostais, estaminais embrionárias e adultas (HENKEL et al., 2013). A escolha da célula depende de qual tecido ósseo será recuperado, da capacidade de isolar a célula para reprodução *in vitro*, possibilidade de extrair uma quantidade viável de células, limitação para uso clínico da célula e variação na própria população de células.

Em casos mais específicos para regeneração óssea como em periodontite onde há perda progressiva do osso alveolar, ainda há estudos sendo realizados devido dificuldade de regeneração consistente do periodonto completo (WANG, Z. et al., 2016). Algumas células mesenquimais frequentemente utilizadas neste caso são as células estaminais do ligamento periodontal (PDLSCs) ou da gengiva, células-tronco dentais, células foliculares e de polpa dentária (MOSHAVERINIA, 2014; WANG, 2016).

Muitas abordagens foram desenvolvidas para reparar a perda óssea alveolar, partir de procedimentos cirúrgicos que utilizam de enxertos ósseos autólogos e da regeneração óssea guiada (GBR) (KIM et al., 2014). A GBR emprega membranas porosas que facilitam a formação óssea, esta porosidade é um dos parâmetros mais importantes e a eletrofiação é um processo promissor para esta aplicação (LEE et al., 2013). Ao se obter a membrana, é possível cultivar as células do tecido a ser recuperado e assim, as células do próprio paciente podem ser expandidas *ex vivo* (CHEN et al., 2012). Após a cirurgia, o arcabouço é preenchido por um coágulo de sangue, fornecendo nutrientes que permitem a diferenciação das células em osteóide, este irá mineralizar e constituir o osso compacto de 3 a 4 meses após cirurgia (LIU; KERNS, 2014). O tempo de recuperação óssea varia com a localização do osso, sendo que o periodontal necessita de um tempo mais curto por ser constituído por uma lâmina mais curta (SIIVA et al., 2014).

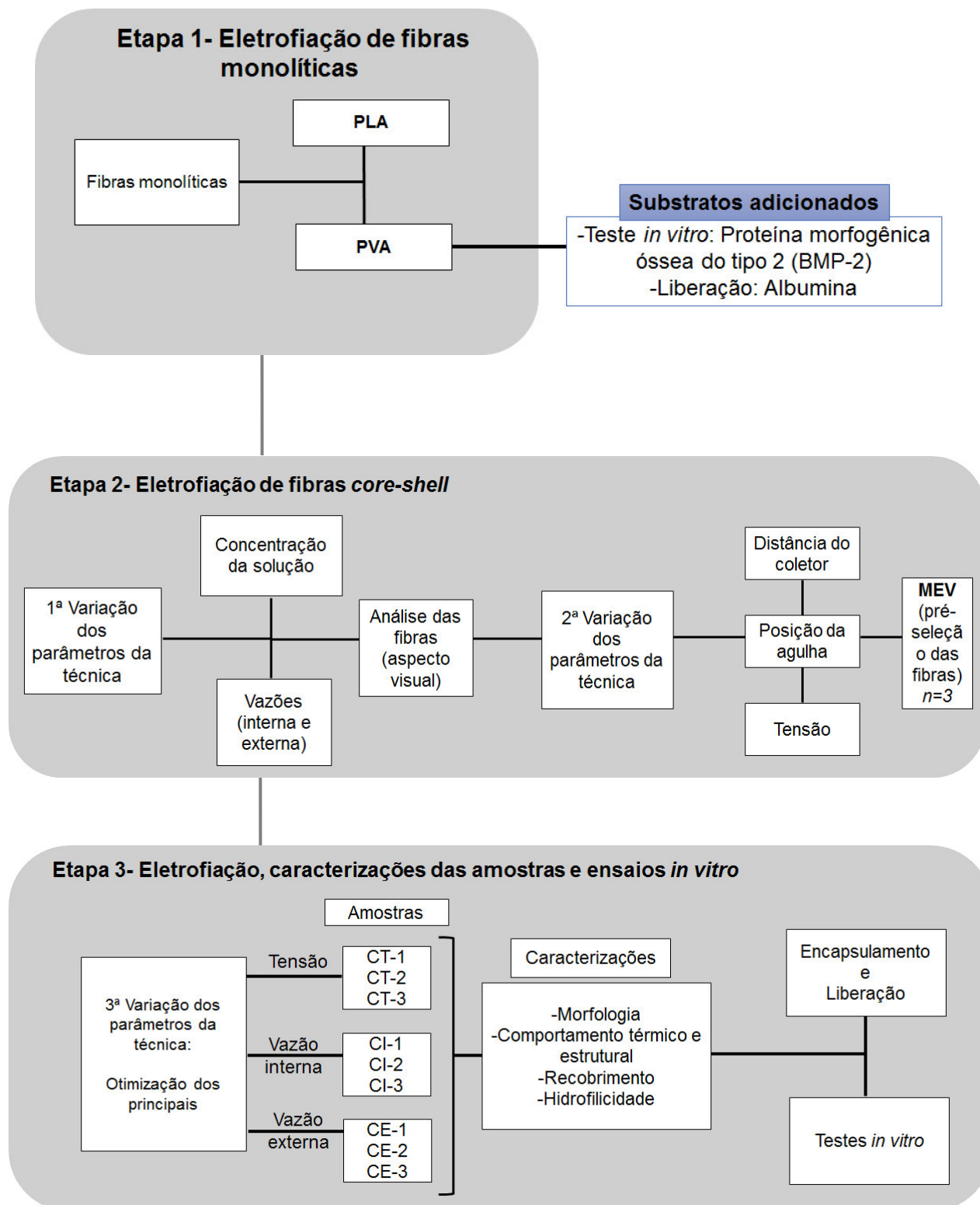
Já para estudos laboratoriais *in vitro*, as células MC3T3 são comumente utilizadas com o objetivo de confirmar a eficácia do arcabouço em promover a viabilidade celular, proliferação e a capacidade em liberar o fator de crescimento (AREIAS et al., 2012; BALLESTER-BELTRAN et al., 2011; LÜ et al., 2012; SCHOFER et al., 2012). As células MC3T3-E1 que se originam de uma linha celular pré-osteoblástica derivada da calvária murina e são muito utilizadas na osteogênese *in vitro*, sendo capazes de expressar marcadores de diferenciação osteoblástica (ADDISON et al., 2015).

4 METODOLOGIA

A abordagem metodológica adotada neste trabalho, iniciou com o desenvolvimento das agulhas concêntricas necessárias para obtenção de fibras coaxiais. Em seguida, uma relação entre os parâmetros do processo de eletrofiação com a morfologia das fibras obtidas foi desenvolvida. Com a primeira análise das fibras de acordo com aspecto visual, foram pré-selecionadas concentração da solução polimérica e as vazões. O próximo passo incluiu variação da tensão elétrica, posição do coletor e da agulha. Nesta segunda etapa as fibras foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM) de forma que uma correlação entre a forma das fibras e os parâmetros de processo fosse determinada. Na terceira parte da eletrofiação coaxial, foi realizada a otimização da tensão e vazões por serem mais relevantes na técnica coaxial, com estas fibras foram feitas todas as caracterizações morfológicas (microscopia eletrônica de transmissão, microscopia eletrônica de varredura, fluorescência e Espectrofotômetro na região do infravermelho com transformada de Fourier), aspecto térmico e cristalino, e ensaios biológicos. As fibras foram eletrofiadas com albumina para que fossem doseadas e as com maior taxa de encapsulação da proteína foram selecionadas para liberação. Posteriormente, os parâmetros utilizados para as fibras com alta taxa de encapsulamento, foram utilizados para obtenção de fibras contendo BMP-2. Assim, os arcabouços contendo BMP-2 foram avaliados em culturas de células de pré-osteoblastos com o objetivo de observar o crescimento e diferenciação celular. Por fim, as aplicações dos arcabouços incluem: liberação de proteínas, neste caso albumina e BMP-2; e na engenharia de tecidos com avaliação das membranas com

as células de pré-osteoblastos. Estas etapas estão resumidas no fluxograma da Figura 15.

Figura 15- Fluxogramas referentes aos experimentos realizados durante o estudo



Fonte: Elaborado pela autora

4.1 MATERIAIS

Os principais reagentes e solventes utilizados neste trabalho estão listados abaixo em ordem alfabética. Todos foram utilizados como recebidos.

Ácido ascórbico- Sigma Aldrich- USA

Alamar Blue – Invitrogen- USA

Albumina Bovina- 66,000 Da- Sigma-Aldrich Brasil

Antibiótico-Antimicótico- Gibco- USA

β -Glicerofosfato- Sigma Aldrich- USA

Cloreto de potássio PA- Isofar

Cloreto de sódio PA - Vetec Química Fina LTDA

Clorofórmio anidro- Sigma-Aldrich Brasil

Dexametasona- Sigma Aldrich- USA

Dimetilformamida- Vetec Química Fina LTDA

Ferro sólido – Não Informado

Fluoresceína- Sigma-Aldrich

Fosfato de potássio monobásico anidro PA- Synth- Brasil

Fosfato de sódio monobásico anidro PA- Synth- Brasil

Garrafa de cultivo celular- modelo TTP -Switzerland

Kit de identificação de fosfatase alcalina- Alkaline Phosphatase Substrate kit, Bio-Rad Laboratories- USA

Kit de identificação de osteopontina -Mouse Osteopontin ELISA- R&D Systems-USA

Papel filtro qualitativo, J-Prolab- Brasil

Placa de cultura 96 poços- TPP®

Poli (ácido láctico), Mw 93,156 Da- Sigma- Aldrich- Brasil

Poli (álcool vinílico), Mw 85.000- 124.000 Da, 99% hidrolisado- Sigma-Aldrich – Brasil

Pré-osteoblastos linhagem MC3T3-E1 Subclone 4 -American Type Culture Collection (ATCC, USA).

Proteína óssea morfogenética 2- Sigma-Aldrich

Soro fetal bovino- Gibco

4.2 EQUIPAMENTOS

Os seguintes equipamentos foram utilizados nesta Dissertação:

- Analisador Termogravimétrico (TGA) – TA Instruments - modelo TGA-7¹;
- Calorímetro exploratório diferencial (DSC) – TA Instruments - série Q - modelo Q 1000¹;
- Citometria de fluxo – Biosciences- modelo FACS Canto-II BD⁴;
- Cromatógrafo líquido (GPC)- detector de índice de refração, modelo RID 20A
- Difratômetro de raios X de alto ângulo (DRX)¹;
- Espectrofotômetro na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), equipado com o acessório de refletância total atenuada (ATR)¹;
- Fluxo laminar – Pachane Basil -modelo Pa300⁴;
- Goniômetro – Ramé-Hart Instrument Co., Modelo 500 F-1⁷;
- Leitor de microplacas -Epoch-Biotech Instruments, USA⁴;
- Microscópio Confocal, Leica TCS SP5, Leica Microsystems, GmbH ³;
- Microscópio Eletrônico de Transmissão; FEI™, Modelo Tecnai Spirit iCorr⁸;
- Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), JEOL, Modelo JSM-5300³;
- Microscópio de fluorescência, Oberkochen, modelo Zeiss Imager A2⁶;
- Ultrassom, Unique, Modelo Ultracleaner 1400²;
- Ultra-turrax, IKA®, Modelo T25 digital²;

¹ IMA – Universidade Federal do Rio de Janeiro

² Laboratório de Sistemas Híbridos – Universidade Federal do Rio de Janeiro

³ Centro Brasileiro de Pesquisa Física

⁴ Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte

⁵ Instituto de Medicina Tropical – Universidade Federal do Rio Grande do Norte

⁶ Instituto do Cérebro – Universidade Federal do Rio Grande do Norte

⁷ Laboratório de Superfícies Poliméricas e Asfálticas- Coppe, Universidade Federal do Rio de Janeiro

⁸ Cenabio - Universidade Federal do Rio de Janeiro

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Equipamento de eletrofiação

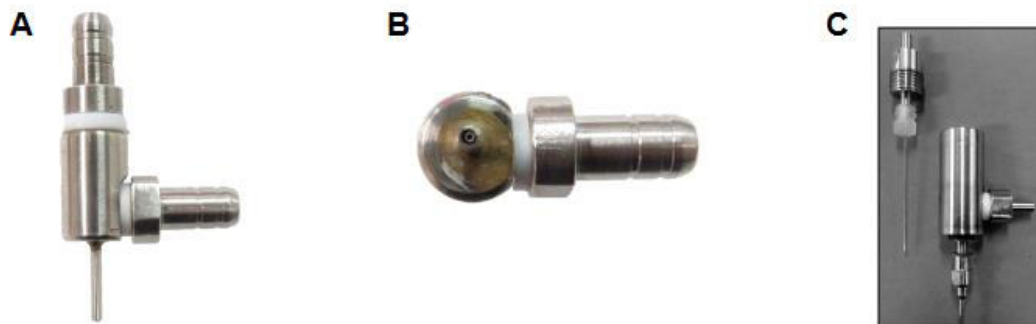
O equipamento de eletrofiação utilizado neste trabalho, consiste em uma caixa de acrílico promovendo o isolamento de um coletor recoberto por papel alumínio, uma bomba de injeção no caso de fibras monolíticas e duas bombas para fibras do tipo *core-shell*. Ainda neste caso, as bombas promoviam o controle da vazão a partir de seringas conectadas a agulha e estas últimas ligadas a um cabo de alta tensão. A Figura 16 apresenta uma fotografia do aparato de eletrofiação utilizado para ambos os tipos de fibras. Já a Figura 17 representa a peça utilizada na fabricação de fibras *core-shell* a qual possui agulhas com o calibre 21G (interna) e 18G (externa), presas de forma coaxial.

Figura 16- Equipamentos de eletrofiação utilizados na obtenção de fibras *core-shell* e monolíticas.



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 17- Peça utilizada para obtenção de fibras núcleo-casca (A). Visão superior da peça (B). Destaque para o interior da peça com a agulha interna (C)



Fonte: Elaborado pela autora

4.3.2 Preparo das soluções

Para obtenção de fibras monolíticas, foram utilizadas soluções de 10mL PVA 15% (g/mL) em água destilada e PLA 20% (g/mL) em clorofórmio, com adaptações de base nos estudos de Merkle e colaboradores (2015) e Sun e colaboradores (2006). As soluções foram preparadas previamente por 12 horas sob agitação magnética.

Para as soluções das fibras coaxiais foram preparadas utilizando água como solvente para PVA (fibra interna), enquanto que para PLA (fibra externa) foram utilizados: clorofórmio e dimetilformamida na proporção de 8:2. Para cada uma das soluções foi preparado um volume total de 10 mL, de forma prévia, sob agitação magnética. As concentrações das soluções variaram de forma que fosse possível encontrar a melhor combinação entre as soluções interna (PVA) e externa (PLA) como indica a Tabela 1. É importante ressaltar que não houve alterações quanto aos solventes utilizados para obtenção das fibras *core-shell*.

Tabela 1 Concentrações das soluções para eletrofiação de fibras coaxiais

Concentração de PLA% (g/mL)	Concentração de PVA% (g/mL)	Solventes para PLA	Solvente para PVA
15	10	CHCl ₃ :DMF (8:2)	Água destilada
15	15		
18	12,5		
20	10		
20	15		

Fonte: Elaborado pela autora

A partir destas concentrações, foram selecionadas as concentrações que proporcionaram as fibras de melhor aspecto visual, sendo para fibra externa 20% (g/mL) (PLA) e 15% (g/mL) (PVA) para interna. Após esta etapa, com o ajuste dos demais parâmetros da técnica e caracterização segundo microscopia eletônica de varredura, foram preparadas soluções para fibras internas contendo fluoresceína/ferro II para constatar a morfologia *core-shell* nos arcabouços através da microscopia de fluorescência e eletrônica de varredura. Os componentes foram adicionados diretamente às soluções poliméricas no período anterior de 12 horas sob agitação. As concentrações para cada solução encontram-se descritas na Tabela 2.

Tabela 2- Concentrações das soluções para fibras coaxiais contendo albumina e BMP-2

Tipo de fibra	Solução polimérica (g/mL)	Componente/solvente
Monolítica	PVA 15%	Albumina (5,0 mg/mL) /água
	PLA 15%	-/clorofórmio e DMF (8:2)
Núcleo-casca	PVA 15%	Albumina (5,0 mg/mL) /água
	PVA 15%	BMP-2(1 µg/mL) /água
	PLA 20%	-/clorofórmio e DMF (8:2)

Fonte: Elaborado pela autora

4.3.3 Eletrofiação

Para o preparo das fibras por eletrofiação, as soluções foram bombeadas através de uma seringa utilizando a bomba de infusão para controle da vazão, enquanto que a tensão é diretamente aplicada a solução, ao ser conectada à ponta da agulha. No caso das fibras *core-shell*, foram utilizadas duas bombas responsáveis por controle das vazões (interna e externa), sendo cada uma conectada a uma seringa. As seringas se conectavam ao único dispositivo injetor constituído por duas agulhas (interna e externa), este dispositivo recebia a fonte de alta tensão. Em ambos os casos, as fibras foram ejetadas da direção do coletor aterrado o qual encontrava-se recoberto por papel alumínio para facilitar retirada das fibras. O coletor também foi recoberto por um suporte emborrachado responsável por delimitar a área de depósito das fibras e com o objetivo de formar fibras mais espessas.

Tabela 3- Parâmetros utilizados para obtenção de fibras monolíticas

Polímero	Componente	Vazão	Tensão
PVA 15%	-	0,3 mL/h	20 kV
PVA 15%	Albumina	0,3 mL/h	20 kV
PVA 15%	BMP-2	0,3 mL/h	20 kV
PLA 20%	-	0,5 mL/h	20 kV

Fonte: Elaborado pela autora

A Tabela 3 apresenta os parâmetros que foram variados para fibras monolíticas de PLA e PVA, os demais parâmetros como distância de 15 cm e posição horizontal da agulha foram fixados.

A primeira parte dos experimentos para fibras do tipo *core-shell* incluiu a escolha da concentração das soluções interna e externa que foram determinantes para variação das vazões, à medida que a viscosidade influencia na formação do jato. Nesta etapa, as concentrações variaram entre 10-15% para PVA e 15-20%

para PLA e os demais parâmetros foram fixados em tensão 20 kV, distância 13 cm, vazão externa 0,5 mL/h e interna 0,1 mL/h. O tempo de eletrofiação neste caso foi de apenas 30 minutos afim de observar a estabilidade do processo. Em seguida, a concentração das soluções utilizadas passou a ser 15% para PVA e 20% para PLA.

A segunda parte dos experimentos consistiu em alternar os seguintes parâmetros: distância do coletor, posição da agulha e tensão. De acordo com a análise visual e do MEV das fibras, foi possível definir mais dois parâmetros: a distância do coletor e a posição da agulha. Nesta etapa, a vazão externa foi de 0,5 mL/h e interna foi reduzida para 0,06 mL/h de modo a melhorar a morfologia das fibras, pois quanto menor a vazão interna e maior a razão entre as duas vazões, mais estável a formação dos jatos. A Tabela 4 apresenta os valores utilizados nesta etapa, com destaque para os valores das tensões de 6 kV, 12 kV, 15 kV e 18 kV que durante a eletrofiação não houve formação de jato e consequentemente de fibra, por isso não foram repetidas para posição vertical da agulha e distância de 15 cm.

De acordo com as observações com relação a formação do jato, aspecto visual da fibra e imagens de microscopia eletrônica, os parâmetros escolhidos para dar continuidade ao trabalho foram: 15 cm; posição vertical; e tensões de 17 kV, 20 kV e 23 kV.

Na última parte de otimização dos parâmetros foram alteradas as vazões internas e externas, enquanto que para fibras coaxiais, foi necessário que vazões internas e externas mais baixas fossem utilizadas. Por isso, nesta fase, os experimentos foram conduzidos variando parâmetros mais importantes e que influenciam diretamente na formação das fibras *core-shell*. Estes parâmetros são: vazão interna, externa e tensão. Enquanto que os demais parâmetros foram fixados de acordo com as etapas anteriores: concentração das soluções PVA 15%, PLA 20%, distância 15 cm e posição da agulha vertical. As amostras foram denominadas de acordo com a variação destes três parâmetros: *core-shell* com alteração na tensão (CT), *core-shell* com alteração na vazão interna (CI) e externa (CE). A Tabela 5 demonstra variação dos parâmetros mais relevantes utilizados para obtenção das amostras.

Todas as fibras coaxiais foram eletrofiadas por três horas e coletadas em uma superfície circular com área de 63,58 cm². A partir destas fibras coaxiais obtidas de acordo com os parâmetros anteriores, foram feitas caracterizações segundo comportamento térmico, cristalino e morfológico. Por último, foram preparados segundo a Tabela 5, os mesmos arcabouços, no entanto, contendo a albumina como componente para delineamento do modelo de liberação.

Tabela 4- Variação da distância do coletor, posição da agulha e tensão

Distância do coletor (cm)	Posição da agulha	Tensão (kV)
10	Horizontal	6
10	Horizontal	12
10	Horizontal	15
10	Horizontal	17
10	Horizontal	18
10	Horizontal	20
10	Vertical	17
10	Vertical	23
10	Vertical	20
15	Vertical	17
15	Vertical	20
15	Vertical	23

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 5- Otimização dos parâmetros mais relevantes para obtenção de fibras *core-shell*

Amostra	Vazão externa (mL/h)	Vazão interna (mL/h)	Tensão (kV)
CT-1	0,5	0,06	17
CT-2	0,5	0,06	20
CT-3	0,5	0,06	23
CI-1	0,5	0,04	20
CI-2	0,5	0,08	20
CI-3	0,5	0,1	20
CE-1	0,2	0,06	20
CE-2	0,6	0,06	20
CE-3	1,0	0,06	20

Fonte: Elaborado pela autora

4.3.4 Obtenção de Filmes de PLA

O filme de PLA foi obtido a partir da solução PLA 20% somente em clorofórmio, sendo mantida 24 horas em agitação. Em seguida, 3mL da solução foi vertida em uma placa Petri e o filme vazado foi formado com a evaporação do solvente, após 48 horas

4.3.5 Caracterização dos polímeros, fibras monolíticas e *core-shell*

4.3.5.1 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

Os ensaios de GPC foram realizados com 5,6 mg de PLA e 2 mL de clorofórmio. Durante análise o fluxo utilizado foi de 1mL/min, temperatura do forno de 30°C e set da coluna contendo 2 colunas e 1 pré-filtro.

4.3.5.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As amostras de fibras monolíticas e *core-shell* foram primeiramente aquecidas à temperatura de 250°C, permanecendo em isoterma por 1 minuto sob atmosfera de nitrogênio. Após, a amostra foi resfriada a 10°C/min sem controle de temperatura. Para o segundo aquecimento, as amostras foram aquecidas novamente até 250°C com taxa de aquecimento de 10°C/min, sendo submetidas a um segundo resfriamento até -10°C, também a 10°C/min. Por último, as amostras foram submetidas a um terceiro aquecimento com taxa de 10°C/min. O método de DSC aplicado busca verificar alterações em temperaturas de transição vítrea (T_g), fusão (T_m) e cristalização no resfriamento (T_{cc}), além da taxa de cristalinidade.

4.3.5.3 Difractometria de raios X a altos ângulos (XRD)

As amostras foram analisadas através de XRD de forma que fosse viabilizada a caracterização da estrutura cristalina. As condições utilizadas foram varredura na faixa de ângulo 2θ de 2 a 50°, com varredura no passo de 0,02° (2θ), com intervalo de 0,6 minutos para cada amostra. A radiação utilizada foi a de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). Os dados desta análise foram tratados com o programa Origin 8.5®.

4.3.5.4 Análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica dos arcabouços eletrofiados e polímeros puros foi realizada sob atmosfera de nitrogênio com fluxo 40 mL/min, entre 30°C a 700°C e à uma velocidade de aquecimento de 10°C/min. A análise no TGA considera examinar o comportamento e a perda de massa das fibras com a alteração da temperatura através do tempo.

4.3.5.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das fibras foi avaliada através da microscopia eletrônica de varredura. As amostras foram recobertas por ouro durante 3 minutos e as análises realizadas com uma tensão de aceleração de 20 kV. As microscopias permitiram verificar a superfície das fibras e calcular o diâmetro com auxílio do programa Size Meter®.

4.3.5.6 Microscopia de Fluorescência

A microscopia de fluorescência foi aplicada para avaliar a possibilidade de formação das fibras *core-shell* que não pode ser garantida apenas pela técnica coaxial aplicada. Para esta técnica de microscopia, as fibras internas foram eletrofiadas a partir de uma solução contendo PVA 15% e fluoresceína, enquanto que a fibra externa se manteve eletrofiada com uma solução de PLA 20%. A adição de fluoresceína foi necessária para que houvesse emissão de fluorescência de cor verde durante observação no microscópio.

4.3.5.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

As amostras para microscopia eletrônica de transmissão foram obtidas, a partir da eletrofição da solução de PVA 15% contendo ferro sólido para fibra interna, enquanto que para fibra externa foi utilizada solução de PLA 20%. As soluções foram eletrofiadas diretamente no suporte recoberto por carbono e a análise foi realizada em 120kV.

4.3.5.8 Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

Para esta caracterização, foi utilizado um espectrômetro no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) equipado com o acessório de refletância total atenuada ATR permitindo analisar a composição das fibras. As amostras foram analisadas, utilizando 4 cm^{-1} de resolução e número de aquisições igual a 100.

4.3.5.9 Ângulo de Contato

A determinação do ângulo de contato da gota sobre a superfície das membranas de fibras monolíticas e *core-shell* foi realizada à temperatura ambiente. Para este ensaio, as fibras foram cortadas em amostras de 2x2 cm e fixadas em superfície metálica apoiadas na base do aparelho. Uma gota de água de 20 μL foi depositada sobre a superfície da amostra e a imagem da gota foi captada por uma câmera digital. Os valores do ângulo de contato obtidos representaram a média dos ângulos de três repetições.

4.3.6 Doseamento das fibras *core-shell* contendo albumina

O doseamento das fibras foi realizado com o objetivo de conhecer a taxa de encapsulamento da albumina a qual foi adicionada a solução correspondente à fibra interna. Para doseamento, as amostras eletrofiadas por três horas em uma área circular de 63,61 cm² foram cortadas em quatro áreas circulares de 1,76 cm² de forma que o filme fosse quantificado de forma homogênea. À cada uma das quatro amostras, foram adicionados 3 mL de água destilada para que fossem trituradas por 2 minutos com auxílio do Ultraturrax e velocidade de 17.600 rpm. Logo após, as amostras foram mantidas no Ultrassom por 30 minutos e filtradas com papel de filtro. A leitura foi feita a partir da absorbância no UV em 280 nm.

4.3.7 Liberação da albumina em fibras *core-shell*

Após doseamento, as fibras com maiores taxas de encapsulação foram submetidas ao teste de liberação a partir da placa de agitação isolada dentro da estufa para controle da temperatura. Para este teste, os arcabouços foram cortados em 3 pedaços medindo 1,76 cm² para que então fossem inseridos em tubos contendo 3 mL de tampão fosfato (pH 7,0) a 37°C e rotação de 300 rpm. As alíquotas foram coletadas nos tempos de: 15 min, 30 min, 1 h, 1,5 h, 2h, 3 h, 4 h, 5 h, 8h, 24 h, 48 h, 72 h e 1 semana. Ao final, a leitura foi feita no espectrofotômetro segundo a absorbância da albumina a 280 nm.

4.3.8 Cultura de células

Para cultura de células, foram utilizados os pré-osteoblastos da linhagem MC3T3-E1 Subclone 4. As células foram expandidas em garrafas de cultivo celular (TTP, Switzeland) contendo meio de cultivo α -MEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino e 1% da solução contendo 10.000 UI/mL de penicillina, 10.000 μ g/mL de estreptomicina e 25 μ g/mL de anfotericina B.

Fragmentos circulares com 3 mm de diâmetro foram obtidos de cada fibra com auxílio de punch cirúrgico, submetidos a desinfecção por 30 min em luz UV e adaptados a placas de 96 poços. Todo o experimento foi conduzido em quadruplicata (n=4 fragmentos por grupo e por intervalo de tempo). Para aumentar

a hidrofiliabilidade do material, os fragmentos foram cultivados overnight com 100µL de meio α -MEM adicionado de 10% de soro fetal bovino, em ambiente úmido a 37°C com 5% de CO₂. Não houve remoção do meio de cultivo nos ensaios de proliferação celular, para evitar a perda de moléculas de BMP-2 nos grupos onde a proteína foi incorporada ao arcabouço. As células MC3T3-E1 foram então adicionadas aos poços, diluídas em 100µL adicionais de meio, na densidade de 2×10^3 células/poço, e cultivadas por 24, 48 e 72 h. Poços contendo células cultivadas diretamente sobre a superfície plástica de cultivo (sem as fibras) foram utilizados como controle positivo do crescimento celular.

4.3.8.1 Teste de viabilidade celular e proliferação celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do Alamar Blue (Invitrogen, USA), um método fluorimétrico que permite a detecção da atividade metabólica das células. O método é baseado na redução da resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido), um corante azul fracamente fluorescente, em resorufina, um corante rosa com altíssima fluorescência em vermelho. Decorridos os tempos experimentais, o meio de cultivo dos poços foi removido e foram então adicionados a cada poço 200 µL de meio de cultivo contendo 10% de Alamar Blue, seguindo-se da incubação das placas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, por 4 horas, de acordo com o protocolo do fabricante. O meio contendo Alamar Blue foi então transferido para novas microplacas de cultivo de 96 poços e a absorbância das amostras foi medida em um leitor de microplacas (Epoch-Biotek Instruments, USA) nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 600 nm (oxidado). O meio de cultura puro, sem adição de células, foi considerado como branco do ensaio e o meio contendo 10% de Alamar Blue foi o controle negativo. A redução do Alamar Blue foi então calculada a partir da equação fornecida pelo fabricante.

Enquanto que a proliferação celular foi avaliada pelo ensaio de atividade metabólica mitocondrial (MTT) nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. Os poços foram incubados com 100µL de meio de cultura contendo 1mg/mL de MTT, por 4 horas, e o produto colorimétrico obtido foi solubilizado com 1 mL de dimetilsufóxido (DMSO).

A solução de cada poço foi transferida para novas placas e a absorbância das amostras medida em espectrofotômetro com filtro de 570nm.

4.3.9 Ensaio de diferenciação celular

Para avaliação da diferenciação celular, as células MC3T3-E1 foram cultivadas por 21 dias, sobre as fibras eletrofiadas em placas de 96 poços, na densidade de 2×10^3 células/poço, com meio de cultivo α -MEM. Este meio foi enriquecido com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução contendo antibióticos e antimicóticos (10.000 UI/mL de penicillina, 10.000 μ g/mL de estreptomicina e 25 μ g/mL de anfotericina B). A troca de meio foi realizada a cada 4 dias. O último meio obtido (referente aos dias experimentais 17 a 21) foi utilizado para dosagem dos níveis dos marcadores de diferenciação osteogênica, através dos kits de identificação de fosfatase alcalina (Alkaline Phosphatase Substrate kit, Bio-Rad Laboratories, USA) e osteopontina (Mouse Osteopontin ELISA, R&D Systems, USA). Poços de cultivo com células e sem biomaterial foram utilizados como controle negativo de diferenciação, enquanto o controle positivo foi constituído por células cultivadas na presença de meio de indução osteogênica: α -MEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino e acrescido de 50 mg/mL de ácido ascórbico, 10 mM de β -glicerofosfato e 0,1 mM de dexametasona (todos da Sigma Aldrich, USA).

Os dados obtidos nos ensaios de Alamar Blue e MTT e dos níveis de fosfatase alcalina e osteopontina foram submetidos a análises não paramétricas. A diferença entre os grupos para cada intervalo de tempo estudado foi avaliada pelos testes estatísticos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, considerando-se um nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Visto que o objetivo desta dissertação foi a obtenção de fibras *core-shell* para recuperação de tecido periodontal, foi necessário realizar diversas etapas de caracterização de materiais para escolher quais arcabouços seriam mais adequados para testes de liberação e *in vitro*. Neste tópico, inicialmente, serão

apresentados os resultados sobre as morfologias das fibras tanto monolíticas quanto *core-shell* obtidas pelas microscopias. Em seguida, as fibras foram caracterizadas quanto ao comportamento térmico e cristalinidade. Por fim, as membranas foram submetidas a ensaios de liberação e proliferação junto à diferenciação de células pré-osteoblásticas.

5.1 CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL (GPC)

Os polímeros PLA e PVA foram utilizados para obtenção de fibras. O PVA usado tinha com massa molar 85.000-124.000 Da e era 99% hidrolisado como informado pelo fornecedor. Já o PLA não foi informado pelo fabricante, por isso foi realizado sua caracterização com a cromatografia de permeação em gel (GPC). De acordo com GPC, a massa do PLA foi 93.156 Da. A alta massa polimérica causa viscosidade maior da solução, proporcionando o emaranhamento de cadeia poliméricas, sendo este um fator crucial para formação das fibras uniformes sem contas (TIWARI; VENKATRAMAN, 2012).

5.2 MORFOLOGIA DAS FIBRAS ELETROFIADAS

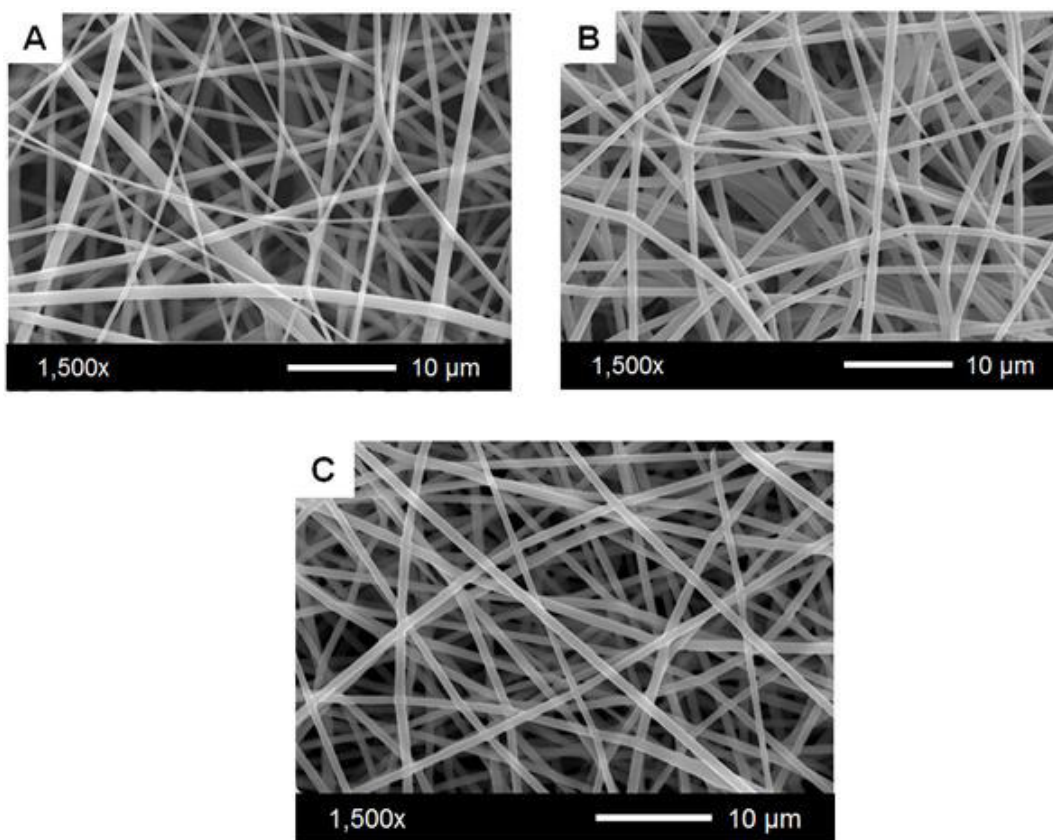
5.2.1 Microscopia eletrônica de varredura

A avaliação das fibras no MEV permitiu observar a morfologia das fibras sob aspectos de porosidade, diâmetro médio, uniformidade, bem como as modificações da superfície das fibras (rugosa ou lisa) ocasionadas pelas alterações dos parâmetros do processo.

O campo elétrico aplicado foi ajustada de acordo com a formação de jatos visualmente estáveis e fibras para que então fosse analisada a morfologia das fibras de acordo com as tensões. Na Figura 18, foi possível observar que houve formação de fibras com aspecto homogêneo e sem formação de esferas na superfície ou gotejamento das soluções. Desta forma, as tensões aplicadas estavam dentro do intervalo crítico de forma que o campo elétrico excedesse a tensão superficial das soluções poliméricas. Caso este campo fosse muito elevado, as forças eletrostáticas poderiam acelerar muito de forma que não haveria evaporação do solvente e nem formação da fibra (VELLAYAPPAN et al., 2016). Os arcabouços se

formaram nas três tensões aplicadas 17 KV, 20 KV e 23 KV. As nanofibras apresentaram os seguintes valores de diâmetros médios de acordo com as tensões aplicadas: $155 \pm 61,3$ nm para 17 KV; $149 \pm 16,9$ nm para 20 KV; $167 \pm 30,7$ nm para 23 KV.

Figura 18 – Micrografias de MEV das fibras *core-shell* CT-1 (A), CT- 2 (B) e CT-3 (C).



Fonte: Elaborado pela autora

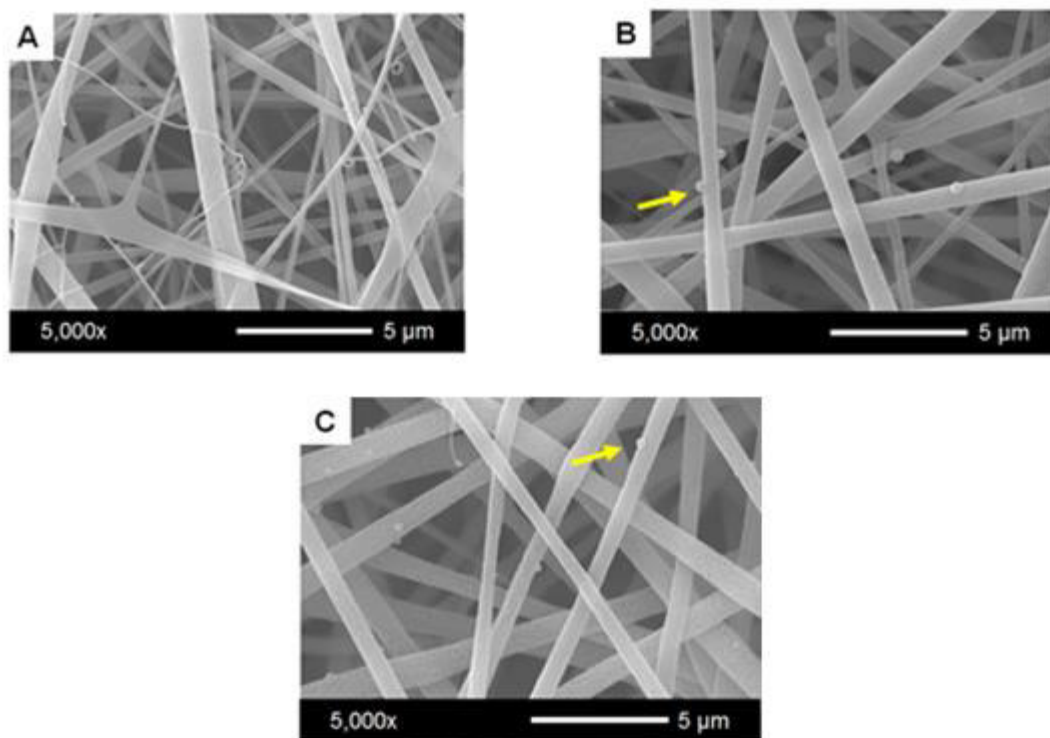
A diminuição inicial vista na espessura das fibras com alteração da tensão de 17KV para 20KV ocorre devido valor crítico de tensão. Este fator permite que haja maior grau de alongamento do jato decorrente do aumento da repulsão da carga dentro do jato e um campo elétrico externo maior em consequência da tensão aumentada (SILL; RECUM, 2008; PILLAY et al., 2013). Já a segunda alteração da tensão de 20KV para 23KV mostrou alta do diâmetro e para este último decorre da maior densidade de cargas na superfície do jato o que elevou a estabilidade do

mesmo (MATABOLA; MOUTLOALI, 2013). O estudo de Deitzel e colaboradores (2001) também demonstrou que em um aumento inicial as fibras apresentaram redução do seu diâmetro. No entanto, em um segundo momento as fibras voltaram a ter aumento do diâmetro com tensão. Apesar de muitos estudos apresentarem aumento do diâmetro com a tensão, é necessário ressaltar que a relação tensão-diâmetro funciona para determinado sistema polímero/solvente (MEECHASUE et al., 2006).

As amostras da Figura 19 demonstram o comportamento das fibras de acordo com a variação das vazões internas. Nestas micrografias, foi possível observar que a espessura média das fibras aumentou ligeiramente com o aumento na vazão interna. Assim, as espessuras encontradas para cada vazão interna foram: $124 \pm 23,9$ nm para 0,04 mL/h; $144 \pm 21,7$ nm para 0,08 mL/h; $154 \pm 38,9$ nm para 0,1 mL/h. Com o aumento da vazão interna, o jato pode ser quebrado em gotas (LU, 2016; SUN; DUAN; YUAN, 2006), por isso foi nas Figuras 19-B e 19-C foram vistas esferas na superfície das fibras externas. Desta forma, a vazão interna não pode ser muito baixa o que resultaria na incorporação insuficiente do núcleo e não deve ser alta, pois o núcleo do cone de Taylor aumentaria até que a solução do núcleo não fosse mais confinada na casca (ELAHI et al., 2010).

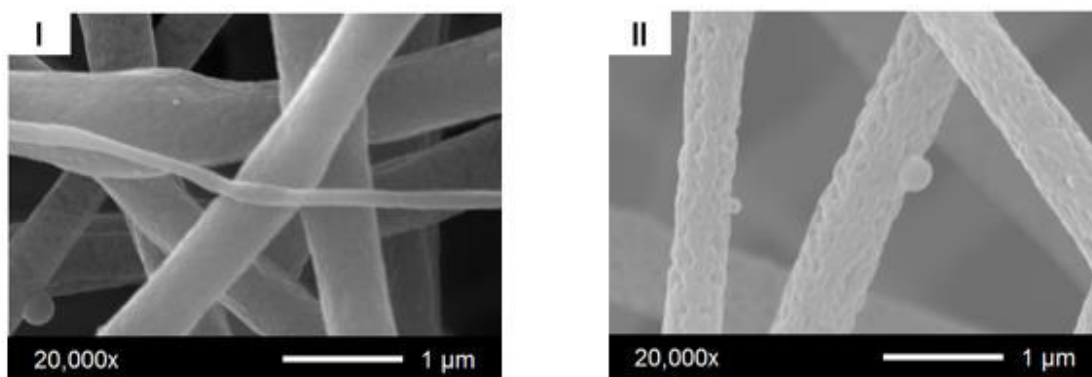
É importante destacar que as amostras de mesma vazão externa, porém com vazões internas de 0,08 mL/h e 0,1 mL/h apresentaram porosidade na superfície da fibra externa como visto na Figura 20. O aumento da vazão faz com que mais polímero seja injetado, aumentando tanto o diâmetro quanto o tamanho dos poros (MEGELSKI et al., 2002). Os poros de maior tamanho podem ser observados na Figura 20-II. A porosidade encontrada nas fibras é de grande importância neste trabalho, pois influenciam na liberação de substratos como fármacos e proteínas, além de auxiliar na dispersão de oxigênio e nutrientes durante o cultivo celular.

Figura 19 – Micrografias de MEV das fibras *core-shell* CI-1 (A), CI-2 (B) e CI-3 (C). Figuras A e B com destaques para formação de esferas nas superfícies das fibras.



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 20 – Micrografias de MEV das fibras *core-shell* CI-2 (A) e CI-3 (B). O parâmetro variado entre as figuras é a vazão da solução de PVA 15% (*core*): 0,08 mL/h (I) e 0,1 mL/h (II).



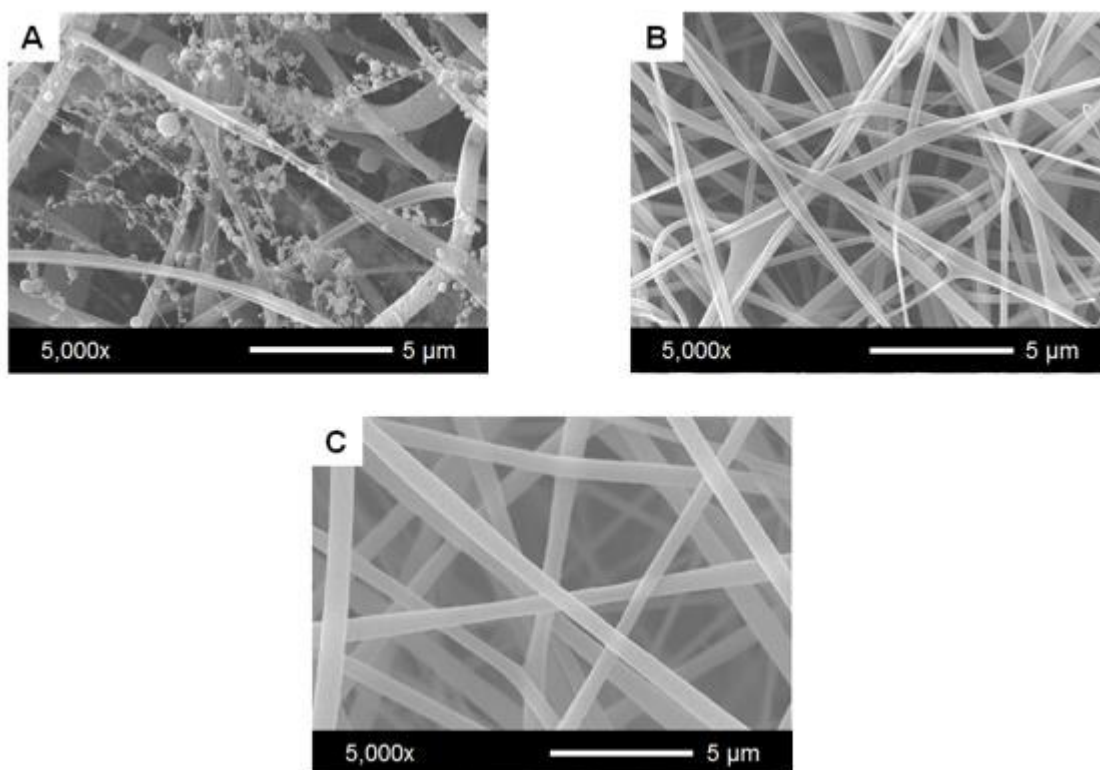
Fonte: Elaborado pela autora

As microscopias apresentadas Figura 21 indicam o comportamento das fibras com a variação da vazão externa de 0,2 mL/h, 0,6 mL/h e 1,0 mL/h. Com a

alteração na vazão externa foi possível observar o aumento da espessura nas fibras, sendo de $142 \pm 30,8$ nm para 0,6 mL/h e $244 \pm 46,3$ nm para 1,0 mL/h. A amostra representada pela Figura 21-A indica que não houve formação de nanofibras com morfologia uniforme isso pode ter ocorrido devido a razão entre a vazão externa e a interna ser apenas 3,33 vezes. Assim, a proximidade entre a vazão interna e a externa faz com que haja deformação do cone de Taylor resultando na formação de cordões devido ao grande fluxo da solução polimérica.

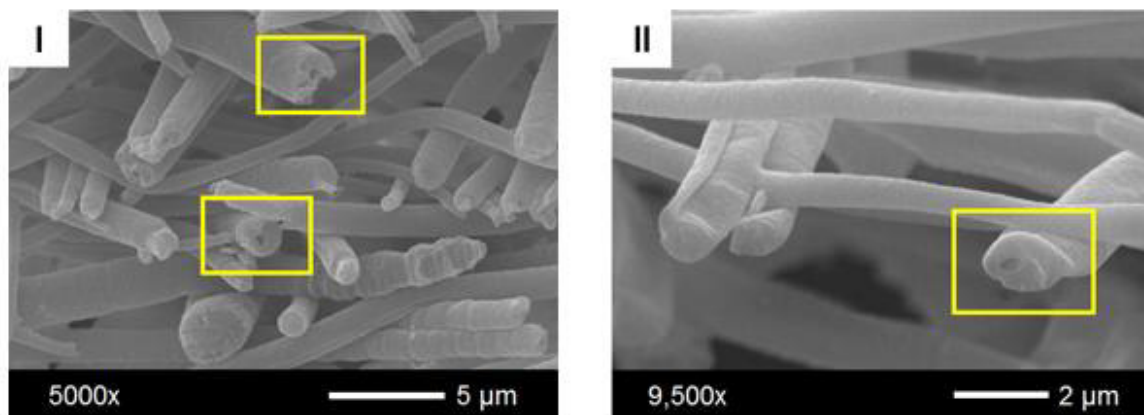
As lavagens consecutivas das fibras com água destilada e a posterior criofratura sob nitrogênio líquido permitiram que as fibras internas de PVA fossem solubilizadas e removidas. Por isso, houve formação de fibras ocas o que denota a possibilidade de formação de fibras do tipo núcleo-casca. Este efeito pode ser visto nas Figuras 22-I e 22-II onde as regiões ocas encontram-se destacadas.

Figura 21- Micrografias de MEV das fibras *core-shell* obtidas por eletrospinações das soluções de CE-1 (A), CE-2 (B) e CE-3 (C).



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 22- Micrografias de MEV das fibras *core-shell* CT-1 (I) e CT-2 (II), após lavagem e retirada da fibra interna de PVA.



Fonte: Elaborado pela autora

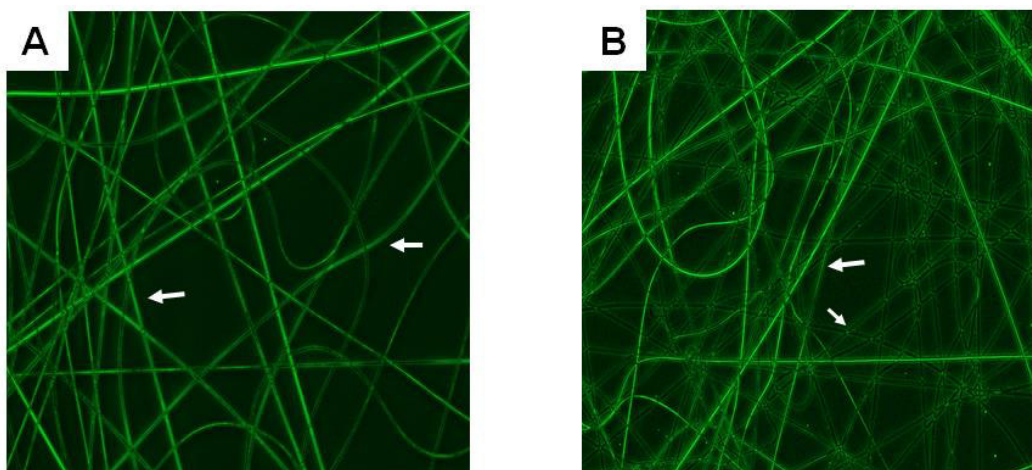
Após avaliação da superfície das fibras pelo MEV, duas condições por parâmetro foram selecionadas para microscopia de fluorescência. A seleção ocorreu de acordo com os seguintes critérios: formação de fibras, superfície regular e uniformidade entre as fibras. As fibras selecionadas foram: CT-1, CT-2, CI-1, CI-2, CE-2 e CE-3.

5.2.2 Microscopia de fluorescência

As fibras foram avaliadas afim de observar se houve chances de formação da morfologia núcleo-casca com auxílio da microscopia com fluorescência. A presença da fluoresceína na fibra interna possibilitou a visualização a partir da emissão de luz visível com o feixe incidente. As Figuras 23, 24 e 25 apresentam as imagens de microscopia de fluorescência com destaques para pequenas esferas alinhadas nas fibras internas e a formação de um jato contínuo. Nestas figuras também estão destacadas a encapsulação da fluoresceína, a partir da formação de um segmento verde envolto por um segmento de tom mais claro corresponde à fibra externa que não possui fluorescência.

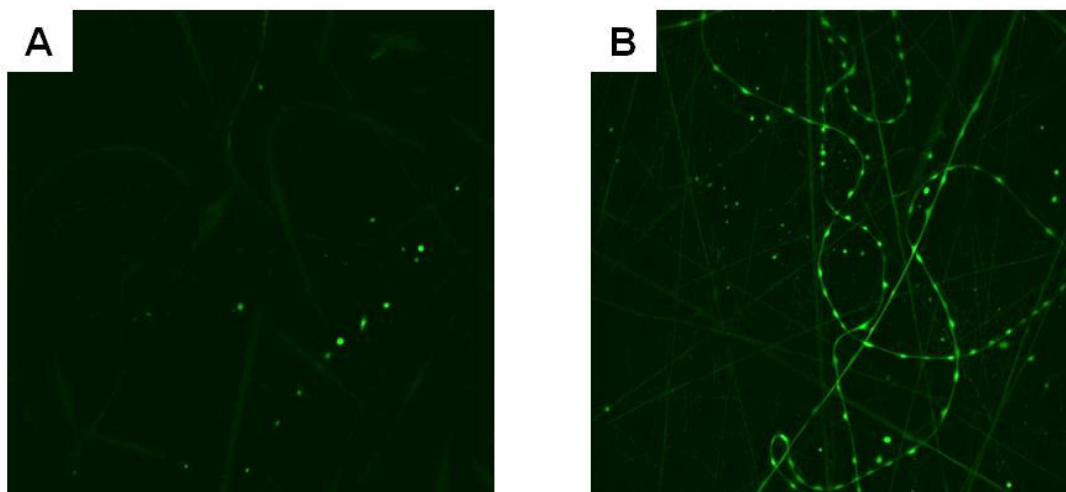
De acordo com as imagens obtidas, as fibras foram novamente selecionadas para microscopia eletrônica de transmissão afim de confirmar a morfologia *core-shell* obtida. As fibras selecionadas foram CT-2 e CE-3 e as mesmas foram utilizadas para teste de doseamento, liberação e *in vitro*.

Figura 23- Micrografias de fluorescência das fibras *core-shell* CT-1 (A) e CT-2 (B).



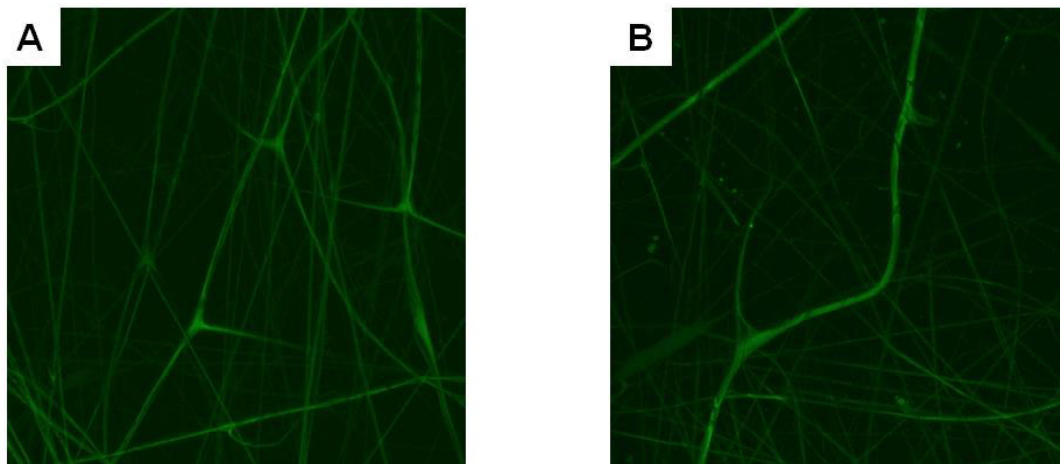
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 24 - Micrografias de fluorescência das fibras *core-shell* CI-1 (A) e CI-2 (B).



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 25- Micrografias de fluorescência das fibras *core-shell* CE-2 (A) e CE-3 (B)

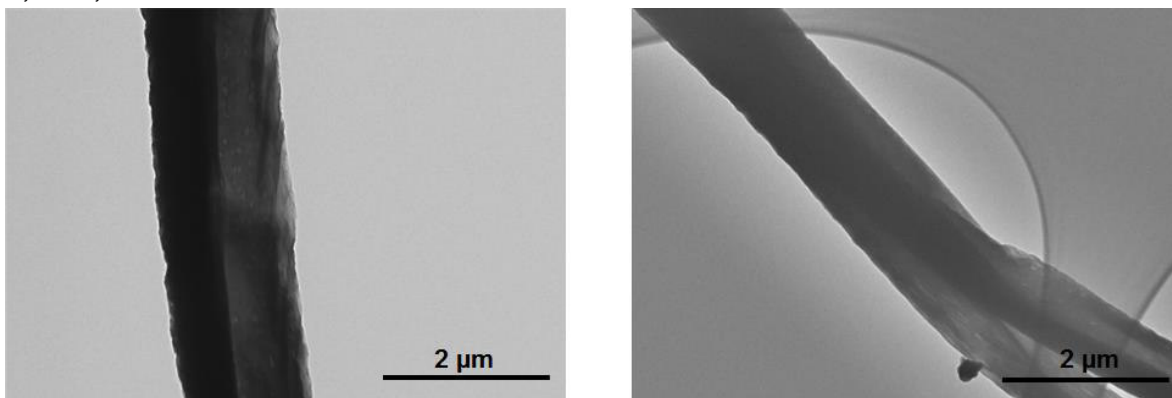


Fonte: Elaborado pela autora

5.2.3 Microscopia de transmissão eletrônica

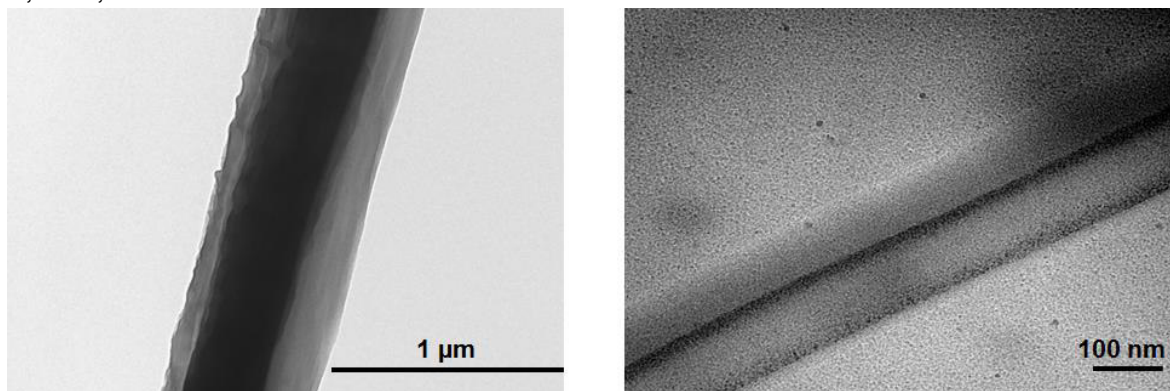
A microscopia de transmissão eletrônica proporcionou a confirmação da morfologia *core-shell*, sendo observado a interface entre a casca e o núcleo. O contraste entre as interfaces foi obtido através da adição de ferro metálico à solução de PVA. Como pode ser visto na Figuras 26 e 27, as fibras CT-2 e CE-3 formaram fibras *core-shell*.

Figura 26 – Micrografias das fibras núcleo-casca CT-2 com vazão interna/externa: 0,06/0,5 mL/h.



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 27 – Micrografias das fibras núcleo-casca CE-3, com vazão interna/externa: 0,06/1,0 mL/h.



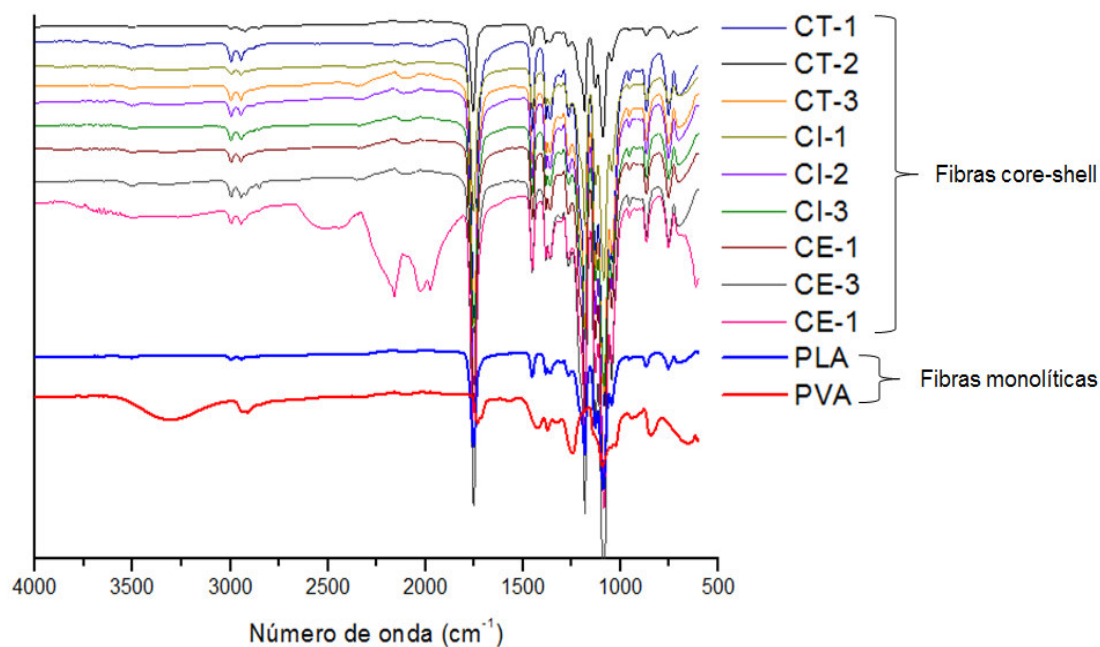
Fonte: Elaborado pela autora

5.3 RECOBRIMENTO DAS FIBRAS DE PVA

O FTIR-ATR foi utilizado para investigar a fração mais externa (casca) das fibras *core-shell*, a partir da não identificação da banca correspondente a fibra do núcleo, ou seja, a ausência da banda correspondente ao PVA. A Figura 28 representa o FTIR de todas as fibras eletrofiadas (monolíticas e *core-shell*). O FTIR da fibra monolítica de PLA e das fibras núcleo-casca apresentaram bandas nas regiões 1759, 1185, 1130 e 1089 cm^{-1} representando a estrutura dos grupos ésteres do PLA (XU et al., 2009). As bandas referentes ao PLA foram observadas em todas as amostras. Já a amostra de fibra monolítica de PVA apresentou uma banda na região 3400 cm^{-1} referente a banda do grupo O-H (SHAO et al, 2002).

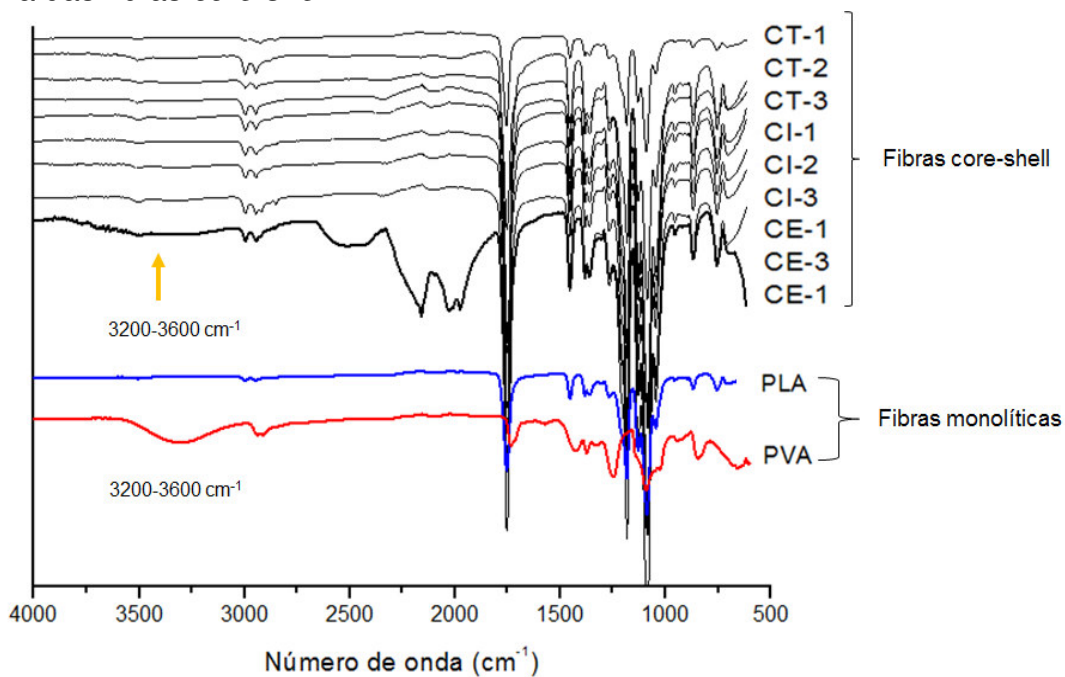
Em amostras *core-shell* como visto na literatura a banda de PVA na região de 3200-3600 cm^{-1} não é vista, pois o PVA se encontra recoberto pela fibra de PLA (KUMAR et al., 2010). Na Figura 29, a região referente a de PVA encontra-se destacada e foi observado que todas as amostras não monolíticas a banda de PVA não apareceu, ou seja, há uma possibilidade de formação de fibras núcleo-casca com exceção da amostra CE-1. A amostra CE-1 apresentou uma pequena banda na região 3000-3500 cm^{-1} denotando uma possível não formação núcleo-casca como apresentado anteriormente pelo MEV.

Figura 28 - Espectro de FTIR (ATR) fibras monolíticas e *core-shell*



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 28 - Espectro de FTIR (ATR) fibras monolíticas e *core-shell* com destaque para a banda de O-H na região de 3200-3600 cm⁻¹ presente na fibra de PVA e em uma das fibras *core-shell*.



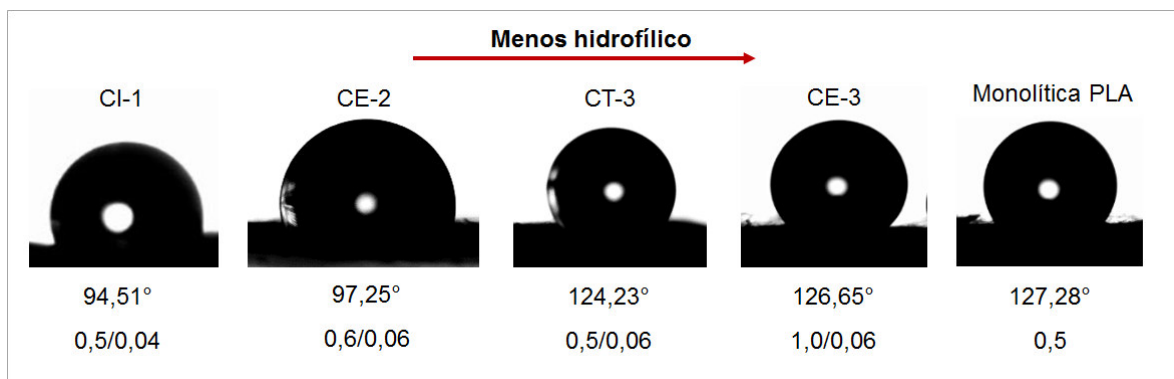
Fonte: Elaborado pela autora

5.4 HIDROFILICIDADE DOS ARCABOUÇOS

A hidrofiliicidade dos arcabouços poliméricos foi testada a partir do ângulo de contato. As superfícies de nanoestrutura compostas por fibras eletrofiadas proporcionam rugosidade suficiente para uma alta hidrofobicidade assim como uma alta força adesiva elevada com a água o que configura o “efeito pétala” (LIAO et al., 2013). Este efeito decorre da formação da gota de água na superfície o que foi visto nas amostras *core-shell* em diferentes vazões e monolítica de PLA. A Figura 30 apresenta os ângulos de contato médio amostras *core-shell* com maior razão vazão externa/interna CT-3 (8 vezes), CE-2 (10 vezes), CI-1 (12 vezes) e CE-3 (16 vezes). Observou-se que conforme reduz a vazão externa, o material se torna mais hidrofílico (Figura 30) pelas amostras *core-shell* CI-1, CE-2 e CT-3 comparadas a amostra CE-3. A amostra CE-3 apresentou maior ângulo $126,6^\circ$ dentre as fibras núcleo-casca e maior hidrofobicidade, sendo esta próxima a uma superfície superhidrofóbica (150°) (FENG et al., 2008). Isto é decorrente da maior quantidade de PLA da fibra CE-3.

A fibra monolítica de PLA apresentou maior ângulo de contato ao ser comparado às fibras núcleo-casca que mesmo com uma vazão baixa de PVA demonstraram a redução do ângulo, tornando o material mais hidrofílico. Já a Figura 31 mostra que não foi possível medir o ângulo da fibra monolítica de PVA devido sua alta hidrofiliicidade, a gota de água se desfez de imediato.

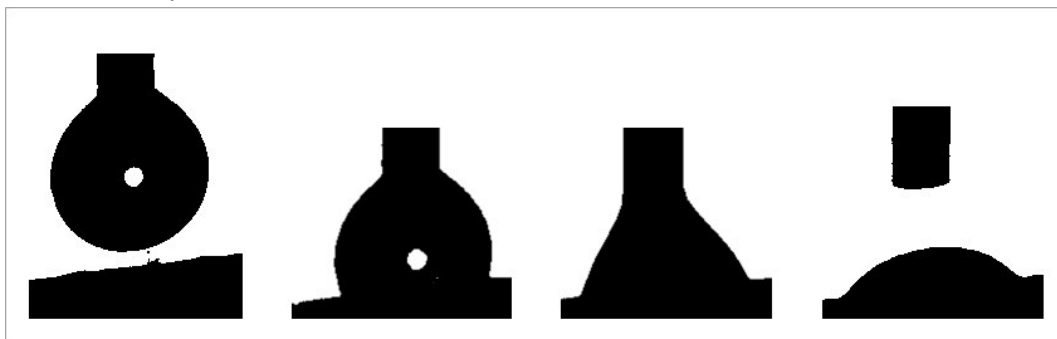
Figura 30- Teste de ângulo de contato das fibras *core-shell* e monolítica de PLA



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 31- Tentativa de medição do ângulo de contato da fibra monolítica de PVA

Fonte: Elaborado pela autora



O teste de ângulo de contato é relevante para este estudo já que a hidrofilicidade do material pode influenciar os testes biológicos material, pois se for superhidrofóbico pode dificultar a adesão celular (AREIAS et al., 2012).

5.5 COMPORTAMENTO TÉRMICO E CRISTALINIDADE DAS FIBRAS ELETROFIADAS

O comportamento térmico e a cristalinidade das fibras tanto monolíticas quanto *core-shell* foram investigados através do TGA e DSC. A Tabela 6 apresenta os valores das temperaturas onset (T_{onset}) e de degradação das fibras eletrofiadas. Ao comparar as temperaturas T_{onset} e de degradação das fibras com os polímeros comerciais utilizados não foi possível observar grandes modificações em seus valores.

As amostras compostas das mantas de PVA, fibra monolítica de PVA e *core-shell* CT-1, apresentaram duas perdas de massa, isto ocorreu, pois, o PVA sofre desidratação da cadeia por volta dos 200°C e decomposição da cadeia a 400°C (LEE, 2004; PERESIN, 2010). A amostra CT-1 mostrou tal comportamento devido a provável presença de fibras-núcleo fora da casca por instabilidade durante o processamento. A faixa de decomposição do PLA é de 325° a 375°C, enquanto que a sua temperatura de perda correspondente a 5% da massa é aproximadamente 331°C (CARRASCO et al., 2010). Neste trabalho foi visto que a temperatura de perda máxima do PLA permaneceu dentro da faixa de decomposição, assim T_{onset} (299°C) pode ser correspondido a temperatura de perda de 5% da massa.

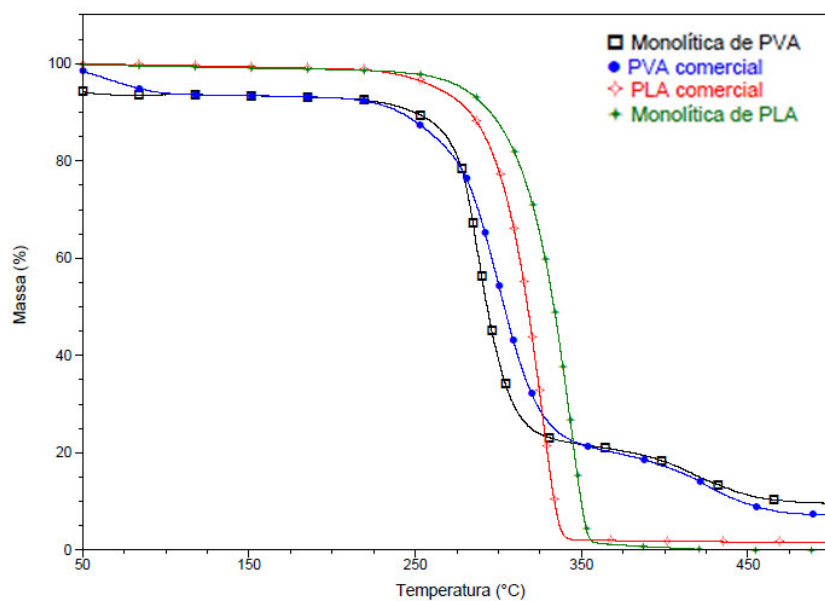
As Figuras 32, 33, 34 e 35 representam as curvas de TGA das fibras e polímeros comerciais, sendo necessário destacar que não foram observadas perdas de massa significativas ao comparar as fibras monolíticas de PLA ou PVA com o seu polímero comercial. As fibras núcleo-casca obtidas sob diferentes condições de processo também não apresentaram grandes alterações entre si e ainda com variação das vazões, as amostras permaneceram com comportamento térmico similar.

Tabela 6- Temperaturas de *on set* e de perda máxima de massa dos polímeros comerciais (PLA e PVA), fibras *core-shell* e fibras monolíticas.

Amostras	T_{onset} (°C)	T_{perda máxima} (°C)
PVA comercial	270	298/422
PLA comercial	299	326
Fibra monolítica PVA	272	286/440
Fibra monolítica PLA	314	344
CT-1	275	294/419
CT-2	271	291
CT-3	276	299
CI-1	285	311
CI-2	280	309
CI-3	270	296
CE-2	272	310
CE-3	286	327

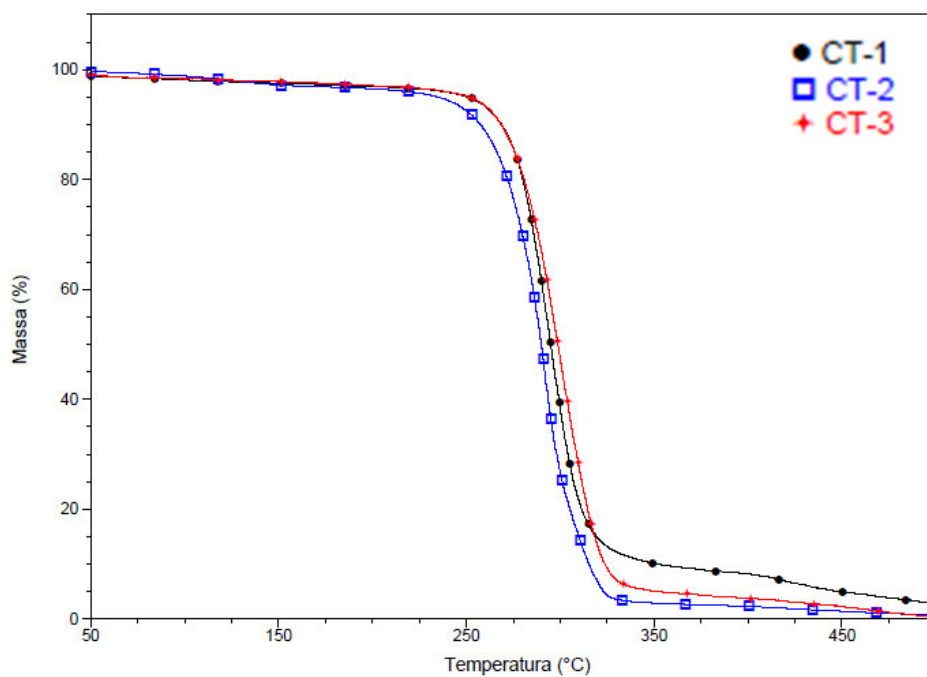
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 32-Curvas de TGA do PVA comercial, PLA comercial e fibras monolíticas de PLA e PVA.



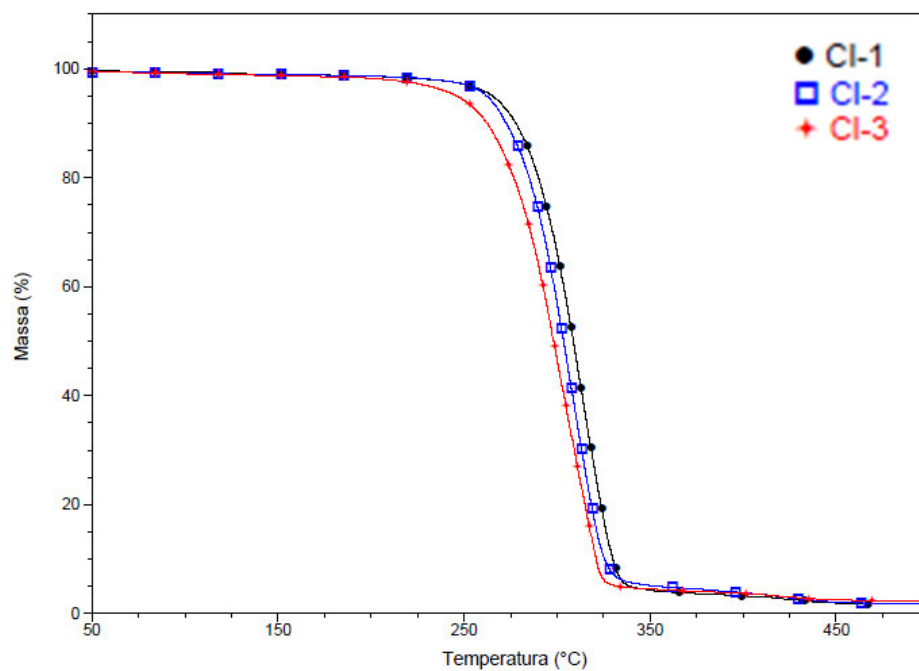
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 33- Curvas de TGA de fibras *core-shell* CT-1, CT-2 e CT-3 de acordo com a variação da tensão



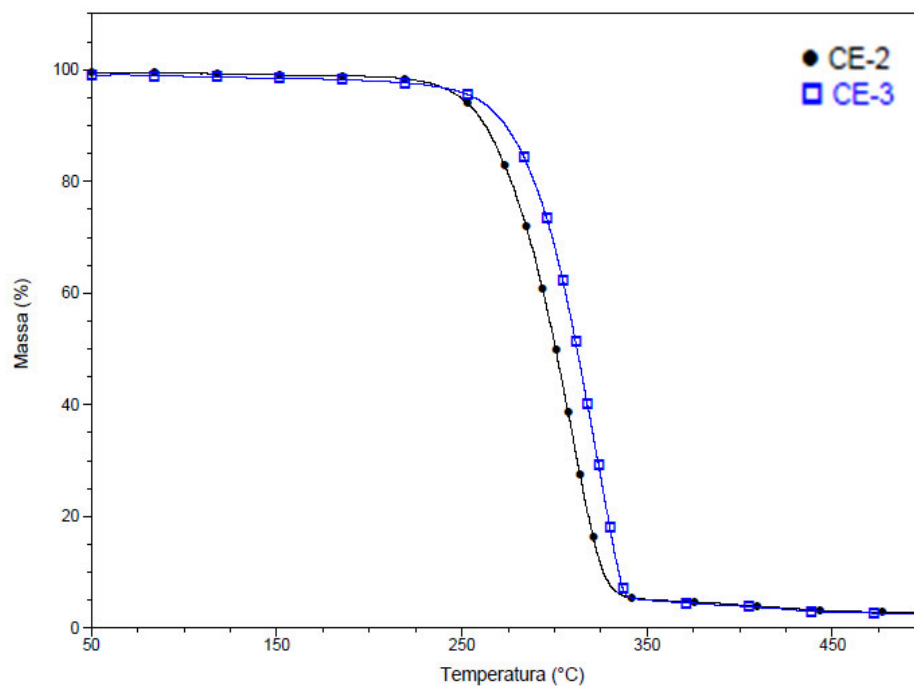
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 34- Curvas de TGA de fibras *core-shell* CI-1, CI-2 e CI- 3 de acordo com a variação da vazão interna.



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 35- Curvas de TGA de fibras *core-shell* CE-1 e CE-2 de acordo com a variação da vazão externa



Fonte: Elaborado pela autora

A partir dos resultados de difração de raios-x foi possível calcular o grau de cristalinidade através da integração da área relativa dos picos de difração com o auxílio do software *Fityk*[®]. Na Tabela 8, há os resultados da cristalinidade dos polímeros comerciais, filme de PLA, fibras monolíticas e *core-shell*. De acordo com os resultados obtidos, os polímeros comerciais apresentaram maior cristalinidade quando comparados aos materiais eletrofiados, sendo estes monolíticos ou núcleo-casca. A redução da cristalinidade do material eletrofiado é decorrente da própria técnica de eletrofiação que tende a formar cristais menores e menos ordenados (GREINER; WENDORFF, 2007; PICCIANI, 2010).

Tabela 8- Resultados em XRD da cristalinidade dos materiais: polímero comercial, filme, fibra monolítica e núcleo-casca.

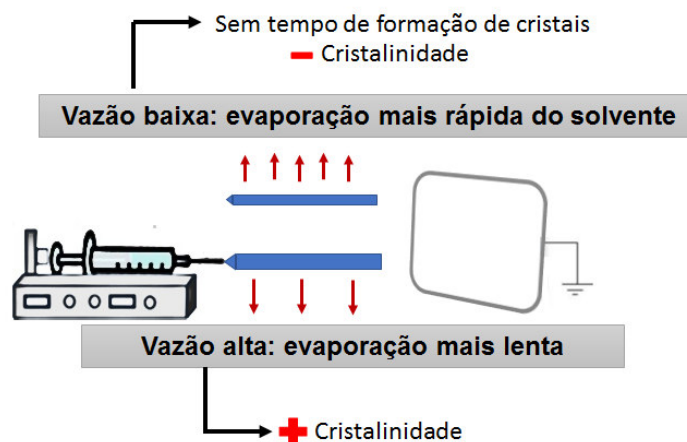
Material		Xc (XRD)
Polímeros comercial	PLA	50,29
	PVA	90,60
Filme	PLA	68,33
Fibra monolítica	PLA	25,94
	PVA	42,49
Fibra <i>core-shell</i>	CE-2	10,34
	CE-3	34,50

Fonte: Elaborado pela autora

Em comparação ao PLA matéria-prima e o filme de PLA, as fibras eletrofiadas também apresentaram menor cristalinidade 10,3% (CE-2) e 34,5% (CE-3). As fibras núcleo-casca para serem formadas precisam de vazões mais baixas que as monolíticas, assim neste caso, há menor superfície de contato do solvente, fazendo com que este evapore rapidamente. O resultado desta evaporação rápida é a redução da cristalinidade por formar cristais defeituosos. Já as fibras monolíticas possuem vazão maior e conseqüentemente, área de superfície de contato do jato é maior, permitindo que o solvente evapore mais lentamente, fazendo com que se

formem mais cristais. O esquema apresentado na Figura 36 corresponde a este efeito.

Figura 36- Esquema representando o efeito das vazões na cristalinidade das fibras



Fonte: Elaborado pela autora

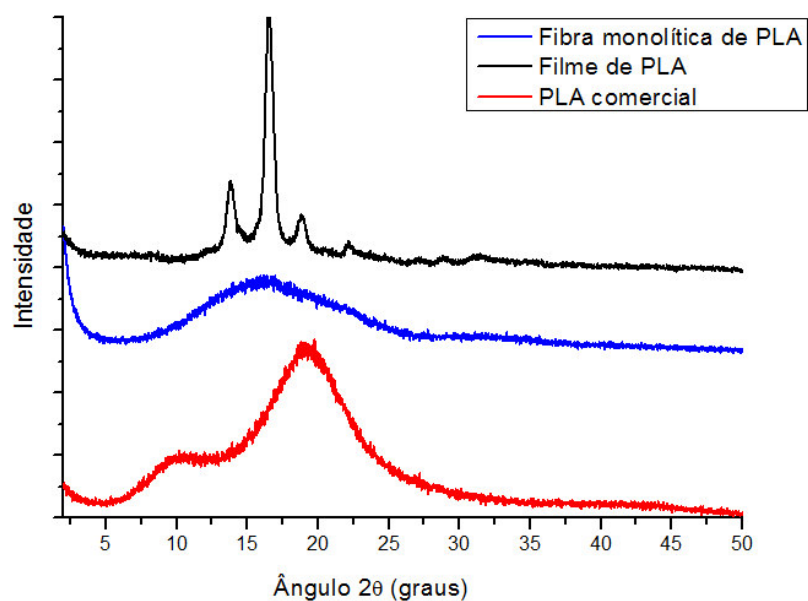
As Figuras 37, 38 e 39 apresentam os difratogramas das amostras em questão. Na Figura 37, há o XRD do PLA em *pellets*, fibra monolítica e filme de PLA. Ao comparar, o PLA comercial com picos largos de difração em $2\theta = 10^\circ$ e 20° com a fibra eletrofiada, observa-se que as fibras de PLA não apresenta picos de difração, apenas um halo amorfo, o que indica que a técnica de eletrofiação reduz significativamente a cristalinidade do PLA em comparação à matéria-prima.

O mesmo ocorre quando a manta de PLA eletrofiada é comparada ao filme vazado de PLA, pois o filme apresenta picos de difração intensos em $2\theta = 12^\circ$, 17° e 19° . Isto indica que, com a evaporação mais lenta do solvente durante a formação do filme os cristais poliméricos tem mais tempo disponível para sua formação, levando o material a desenvolver um valor de cristalinidade bem elevado.

Figura 38, compara os difratogramas das fibras monolíticas de PVA e PLA com a fibra núcleo-casca (PVA-PLA). Observou-se que as fibras de PVA apresentaram reflexões em $2\theta = 14^\circ$ (001), 17° (10~1) e 20° (101), associados a uma estrutura monoclinica (TANG; TIAN; HSU, 2015). Enquanto as fibras monolíticas de PLA apresentam apenas um halo amorfo centrado em $2\theta = 16^\circ$. O difratograma anterior das fibras núcleo-casca apresenta tanto um halo amorfo centrado em $2\theta \sim 16^\circ$ indicando a presença do PLA amorfo e três reflexões menos

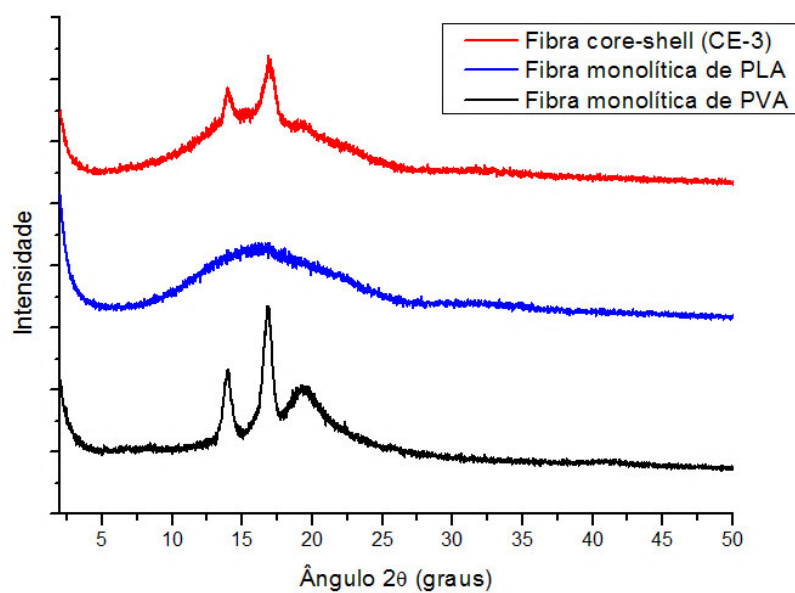
intensas em $2\theta = 14^\circ$, 17° e 20° indicando a presença do PVA com a mesma organização cristalina das fibras monolíticas.

Figura 37- Curvas de difração de raios-X do polímero comercial, filme de PLA e fibra monolítica de PLA.



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 38- Curvas de difração de raios-X das fibras monolíticas e *core-shell* CE-3

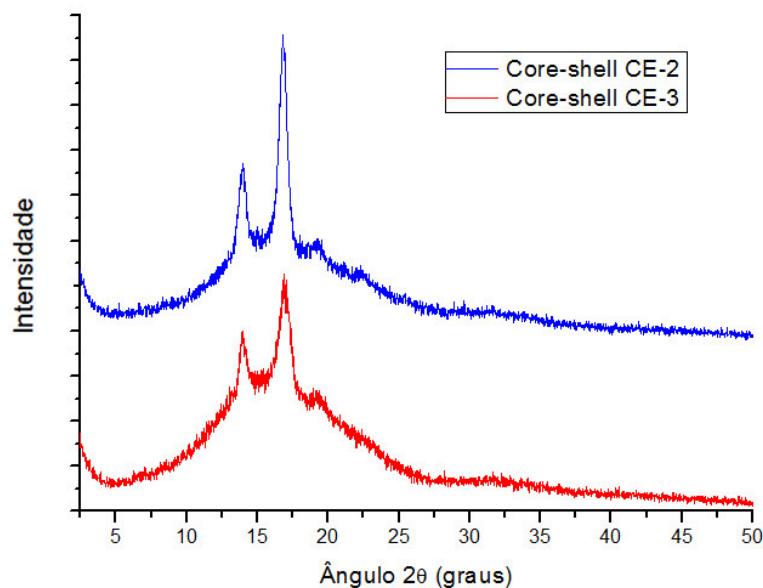


Fonte: Elaborado pela autora

A Figura 39 compara os difratogramas das amostras núcleo-casca produzidas sob as mesmas condições com a variação apenas da vazão externa (PLA), (CE-2 $\phi = 0,6$ mL/h e CE-3 $\phi = 1,0$ mL/h). Ambas as amostras apresentaram o mesmo padrão de difração, indicando que ambos os polímeros assumiram as mesmas características estruturais durante o processo. No entanto, a amostra de maior vazão externa, apresenta um halo amorfo de maior intensidade relativa quando comparada a amostra de menor vazão, ou seja, com menor quantidade de PLA. Esse resultado indica que a casca de PLA nas fibras da amostra CE-3 é mais espessa, devido ao maior fluxo de material durante o processo corroborando a medida obtida na análise do MEV descrita anteriormente.

O estudo realizado por Lim e colaboradores (2016) demonstra que o aumento na cristalinidade do material pode ser obtido por alinhamento das fibras. No entanto, as fibras deste estudo não foram orientadas a partir de um coletor rotacional, por isso sua morfologia não orientada pode também ter contribuído para redução da cristalinidade. A influência da orientação das fibras na cristalinidade não é sempre observada, ainda assim, a cristalinidade do material pode ser correlacionada a redução na proliferação celular (AREIAS et al., 2012).

Figura 39- Curvas de difração de raios-X das fibras *core-shell* com diferentes vazões externas CE-2 (0,6 mL/h) e CE-3 (1,0 mL/h).



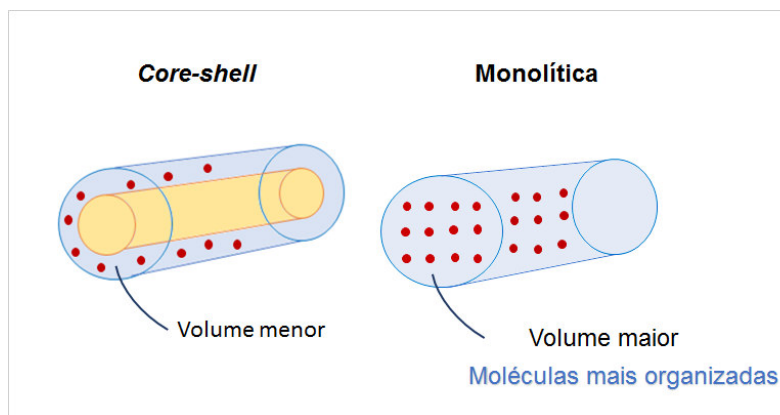
Fonte: Elaborado pela autora

A partir dos resultados do XRD, foi também realizada comparação das temperaturas de transição vítrea (T_g), cristalização a frio (T_{cc}) e fusão (T_m) obtidas por DSC dos polímeros matéria-prima e da forma farmacêutica final utilizada nos ensaios biológicos (fibras núcleo-casca). A Tabela 9 apresenta os resultados encontrados tanto para os polímeros comerciais quanto para as fibras monolíticas e núcleo-casca.

Para o PLA utilizado, tanto T_g quanto T_m encontram-se próximos a faixa de T_g (50 a 80°C) e T_m (130 a 180°C) do PLA puro e não processado (PEREIRA; MORALES, 2014). O PVA comercial apresentou valor de T_g igual a 70,4°C, próximo ao valor citado na literatura, 70°C aproximadamente (STRAWHERCKER; MANIAS, 2000). O PVA utilizado possui alto grau de hidrólise (99%) o que permite maior introdução de grupos laterais menos volumosos como OH, e assim maior organização cristalina (LEE; HONG, 1997). Desta forma, o PVA apresentou temperatura de fusão (155°C) mais alta que a sua fibra monolítica correspondente e as fibras núcleo-casca.

Ao comparar os valores dos respectivos eventos térmicos das fibras eletrofiadas entre si, a técnica coaxial fez com que os arcabouços núcleo-casca apresentassem menor volume disponível para que as moléculas pudessem se organizar como representado na Figura 40. Isto resulta, na menor cristalinidade das fibras coaxiais quando comparadas as monolíticas como também visto anteriormente no XRD, levando a uma menor temperatura de fusão. Os perfis térmicos de DSC das amostras eletrofiadas podem ser encontrados no anexo 1

Figura 40- Esquema representativo do volume disponível nas fibras eletrofiadas.



Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 9- Temperaturas de transição vítrea (Tg), cristalização a frio (Tcc) e fusão (Tm) das fibras *core-shell*, monolíticas e polímeros comerciais (PVA e PLA).

Material		Tg (°C)	Tcc (°C)	Tm (°C)
Polímero comercial	PLA	54,29	115,89	154,09
	PVA	70,41	121,80	155,45
Fibra monolítica	PLA	64,0	88,22	157,38
	PVA	55,73	119,61	142,46
Fibra <i>core-shell</i>	CT-1	52,53	107,28	135,97
	CT-2	42,29	105,13	135,10
	CT-3	54,42	109,91	146,46
	CI-1	53,18	108,87	145,59
	CI-2	53,73	108,58	145,54
	CI-3	52,55	108,54	144,78
	CE-2	54,15	114,01	147,23
	CE-3	56,54	120,21	142,01

Fonte: Elaborado pela autora

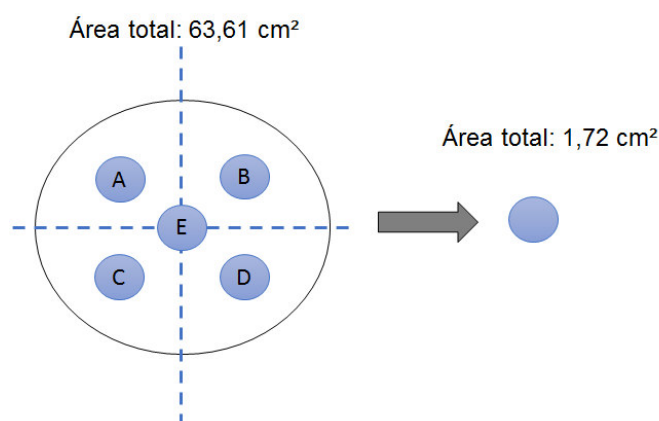
5.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Para os ensaios biológicos foram escolhidas as fibras CT-2 e CE-3 devido os seguintes critérios: morfologia mais uniforme das fibras confirmadas no MEV, ausência de esferas na superfície das fibras, morfologia *core-shell* presente na microscopia de fluorescência e confirmada no TEM. Além disso, essas fibras não apresentaram superhidrofobicidade ($>150^\circ$) nos testes de ângulo de contato e demonstraram baixa cristalinidade por DSC e XRD, esses dois fatores podem influenciar diretamente na adesão e proliferação celular.

5.6.1 Taxa de encapsulação dos arcabouços

Taxa de encapsulação realizada com $n=5$ das amostras monolíticas (PVA e albumina) e *core-shell* (CT-2 e CE-3). As amostras utilizadas de cada fibra medindo $1,76 \text{ cm}^2$ foram escolhidas de acordo com a disposição demonstrada na Figura 41. Neste ensaio, as fibras foram produzidas contendo $5,0 \text{ mg/mL}$ de albumina e para medir a quantidade de proteína incorporada de forma mais exata, os arcabouços foram desestruturados com auxílio do Ultraturrax. Uma vez desestruturado o arcabouço, os resultados para as fibras analisadas no UV podem ser vistos na Tabela 9.

Figura 41- Disposição das amostras para encapsulação nos arcabouços CT-2 e CE-3.



Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 9- Taxa de encapsulamento da Albumina nas fibras monolíticas, e núcleo-casca CT-2 e CE-3

Amostra	Concentração ug (média de 5h de eletrofiação)	Eficiência de encapsulação (%)	Vazão interna/ externa (mL/h)
CT-2	787,7	15,75	0,06/0,5
CE-3	653,8	13,06	0,06/1,0
Monolítica PVA e albumina	1302,98	26,05	0,3 mL/h

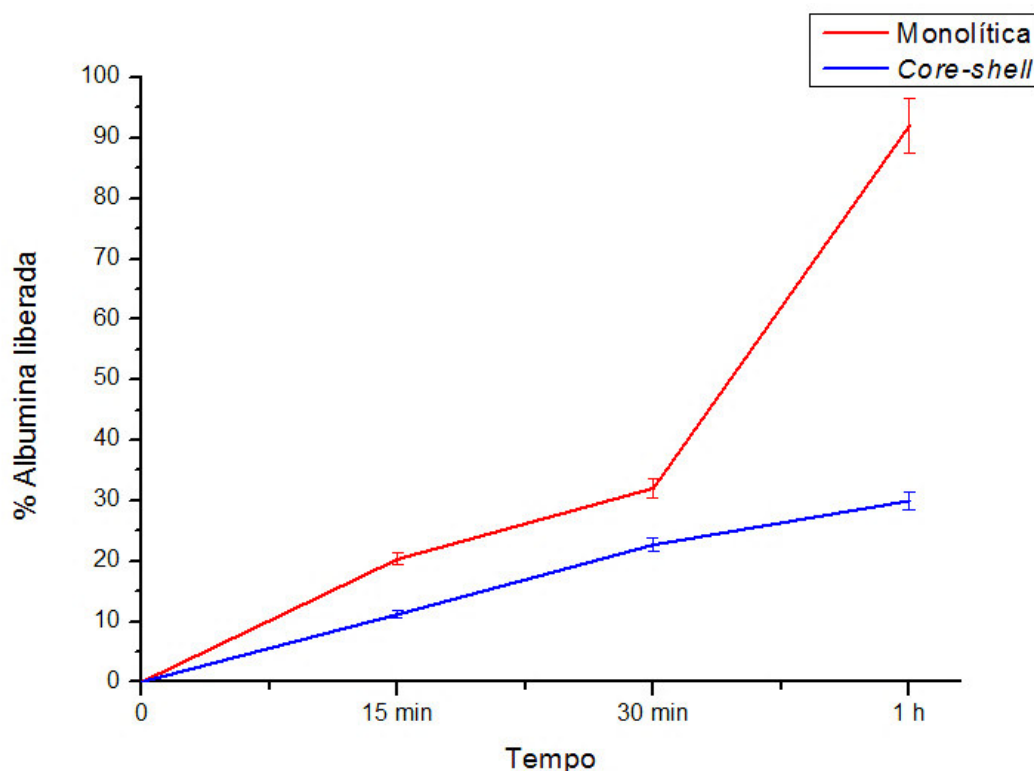
Fonte: Elaborado pela autora

Como pode ser observado na Tabela 9, a fibra monolítica apresentou a maior eficiência de encapsulação (26%) da albumina, a qual pode estar relacionada a maior vazão (0,3 mL/h) quando comparada as fibras CT-2 e CE-3 (0,06/0,5 e 0,06/1,0h, respectivamente). As fibras núcleo-casca por precisarem ser trabalhadas com vazões mais baixas, espera-se um tempo maior para que apresentem alta incorporação do fármaco. No caso destas fibras com 0,06 mL/h, seria necessárias aproximadamente 40 horas para encapsular 100% da proteína ou fármaco a ser utilizado. Outro fator a ser destacado entre os arcabouços núcleo-casca é que mesmo com o aumento da vazão externa, não foi observado maior incorporação da albumina.

5.6.2 Perfil de liberação

As fibras monolíticas de PVA contendo albumina quando em contato com o tampão, tiveram sua estrutura desfeita em poucos minutos. Este fato está relacionado à solubilidade do polímero em água, levando a completa dissolução do substrato. As fibras monolíticas apresentam limitação quanto ao uso de substratos, pois este tipo de arcabouço não possui liberação controlada, expondo o fármaco/proteína à ação enzimática *in vivo* (SPERLING et al., 2016). Como a proteína de aplicação deste estudo é a BMP-2 e esta apesar de ser um potente fator de crescimento, possui curta vida biológica com rápida depuração local, requerendo assim uma liberação local sustentada (KEMPEN et al., 2008; JUN et al., 2013). Para prevenir esta limitação da fibra monolítica, a técnica de eletrofiação coaxial é aplicada, gerando uma estrutura que protege o substrato, evitando o efeito *burst* (SON; KIM; YOO, 2014). A Figura 42 exibe os resultados de liberação entre a fibra monolítica e casca núcleo.

Figura 42- Gráfico da liberação das fibras monolítica e *core-shell*.



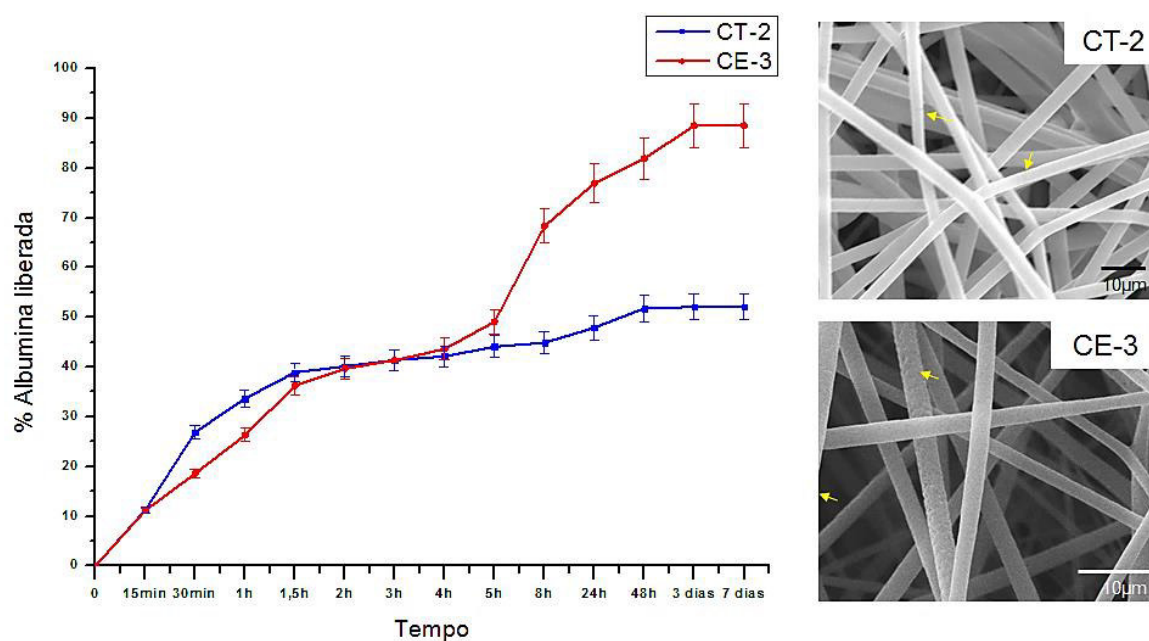
Fonte: Elaborado pela autora

A taxa de liberação para as fibras monolíticas foi de 92% da concentração da albumina encapsulada no tempo de 1h. Ressalta-se que neste tempo as fibras foram completamente solubilizadas. Já as fibras coaxiais liberaram apenas 30% do material encapsulado no mesmo tempo. Desta forma, a fibra monolítica de PVA configura uma desvantagem, já que o uso de um polímero hidrofílico como matriz resulta no intumescimento do arcabouço em meio aquoso, acelerando a liberação sem evitar o efeito *burst* (KUMAR et al., 2010). Os resultados para liberação das fibras CT-2 e CE-3 estão representadas na Figura 43. Apesar de ambas as fibras terem mesma vazão interna, é observado maior taxa de liberação das fibras CE-3, isto ocorre devido a morfologia da fibra.

A fibra CT-2 apresenta rachaduras na superfície da fibra externa, enquanto a fibra CE-3 apresenta porosidade superficial em suas fibras o que permite maior contato da solução receptora com a fibra interna e consequentemente, a albumina é liberada em maior taxa. A espessura da fibra-casca também é responsável por

manter a liberação controlada como visto por Wang e colaboradores (2010), mas neste estudo a fibra de maior espessura (CE-3) também apresentou maior porosidade o que expôs mais a albumina à solução receptora. Enquanto a baixa porosidade da fibra CT-2 fez com que a fibra interna estivesse mais protegida e com menor contato com a solução receptora, com isto, o extravasamento da albumina é mais contido conforme passar do tempo.

Figura 43- Gráfico da liberação das fibras CT-2 e CE-3 correlacionado a morfologia das fibras obtidas por MEV. Destaque para superfície das fibras.



Fonte: Elaborado pela autora

A amostra CE-3 por ter maior vazão e maior superfície de contato, permitiu a evaporação lenta do solvente, levando a formação de cristais na fibra externa. A partir de 5 horas, é visto um aumento considerável na taxa de liberação o que pode ser correspondente a desestruturação desta fase cristalina na fibra-casca. A eletrofiação por proporcionar evaporação rápida do solvente causa um tempo pequeno para recristalização do substrato e assim, há dispersão amorfa deste na fibra polimérica (MEINEL et al, 2012). Este fator juntamente a alta porosidade da

fibra CE-3 podem ter colaborado na alta taxa de liberação (90%) no período de 7 dias.

A liberação de fármacos a partir de sistemas poliméricos resulta da interação complexa de diferentes mecanismos sendo a dissolução, a difusão e erosão os mais frequentes. Dentre os fatores que influenciam na liberação de fármacos destacam-se: porosidade, tamanho dos poros, taxa de degradação do polímero, concentração, interação fármaco-polímero, composição polimérica, cristalinidade e outras (YANG et al., 2015).

Os estudos de liberação dos fármacos *in vitro* utilizam modelos matemáticos com o objetivo de interpretar o tipo de liberação. Dentre os perfis existentes, os mais utilizados são: Cinética de Ordem Zero, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Peppas-Sahlin e Hopfenberg. Na avaliação do software DDSolver[®], o programa fornece uma série de critérios necessários para avaliar qual modelo de liberação se ajusta melhor, dentre eles estão: como coeficiente de determinação (R^2) e o erro médio quadrático (MSE) (ZHANG et al., 2010).

A Tabela 11 apresenta os demais parâmetros de acordo com cada modelo: K_0 (constante de liberação de ordem zero), K_1 (constante relacionada à cinética Fickiana), K_2 (constante relacionada à cinética de relaxamento caso II), m (expoente difusional para qualquer dispositivo de forma geométrica que inibe a liberação controlada), K (constante de taxa de liberação) e n (expoente de liberação). Nesta mesma tabela encontram-se destacados os fatores R^2 e MSE para as diferentes formulações de arcabouços eletrofiados.

A partir dos dados obtidos considerando os valores de MSE e R^2 , verifica-se que para a fibra CT-2, a liberação da albumina obedece ao modelo Korsmeyer-Peppas. A equação deste modelo é baseada na quantidade de substrato liberado (M_t) por tempo (t), sendo M_∞ a quantidade de fármaco liberada em tempo infinito e n expoente relacionado diretamente ao mecanismo de liberação (SASA et al., 2005).

Tabela 11- Parâmetros, Coeficiente de Correlação e MSE dos Modelos de Ordem Zero e Modelo Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Peppas-Sahlin e Hopfenberg para as fibras CE-3 e CT-2. Destaque para os modelos de cada formulação.

Modelo	Parâmetros	Formulações	
		CE-3	CT-2
Ordem Zero	K ₀	0,78	0,47
	R ²	0,71	0,53
	MSE	-1,06	-2,40
Higuchi	K ₀	10,23	6,68
	R ²	0,86	0,68
	MSE	-0,06	-1,76
Korsmeyer-Peppas	K	39,95	29,15
	n	0,15	0,8
	R ²	0,96	0,83
	MSE	1,32	0,53
Hopfenberg	K ₀	0,01	0,0020
	n	3,00	4,50
	R ²	0,87	0,60
	MSE	-0,66	-2,41
Peppas-Sahlin	K ₁	26,57	28,77
	K ₂	-1,83	-2,33
	m	0,45	0,23
	R ²	0,98	0,83
	MSE	2,42	0,15

Fonte: Elaborado pela autora

O modelo de liberação do tipo Korsmeyer-Peppas se encontra descrito na Equação 2.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n$$

(equação 2)

Korsmeyer-Peppas é um modelo mais geral e considera vários processos simultâneos: difusão do tampão pela fibra, intumescimento da fibra conforme o tampão penetra no arcabouço, dissolução da matriz e coeficiente de difusão

(SINGHVI; SINGH, 2011). Neste modelo para avaliar com precisão o mecanismo de liberação, valor de n é utilizado. A Tabela 13 corresponde os mecanismos existentes aos valores do parâmetro n .

Tabela 13- Correlação do parâmetro n do modelo Korsmeyer-Peppas com o mecanismo de liberação

Parâmetro	Valor	Mecanismo
n	0,5	Difusão pura (difusão de Fick)
	1,0	Cinética de ordem zero com mecanismo de transporte caso II
	$0,5 < n < 0,9$	Cinética de transporte anômalo (combinação de difusão e transporte caso II)

Fonte: Elaborado pela autora

Analisando os dados da Tabela, verifica-se que o valor de n para a fibra CT-2 é igual a 0,8, sugerindo que a liberação da albumina ocorre através da cinética de transporte anômalo. Neste mecanismo o sistema de liberação de um ativo ocorreu através da combinação de dois processos aparentemente independentes, sendo um a Lei de Fick e o outro Transporte Caso II (DASH et al., 2010). Assim, a fibra CT-2 por ser menos porosa, libera o ativo através do fenômeno anômalo de intumescimento, levando ao inchaço das fibras quando em contato com o tampão, seguido do relaxamento, formando uma camada gelificada através da qual a albumina foi transportada do meio mais para o menos concentrado. Esta transição de um estado semirrígido para outro mais flexível está diretamente relacionada ao caso II.

Já na fibra CE-3, a liberação da albumina obedeceu ao modelo Peppas-Sahlin o qual se origina da equação de Korsmeyer-Peppas, como pode ser visto na equação 3. No entanto, o Peppas-Sahlin considera a competição dos fenômenos de difusão fickiana (K_1) com transporte caso II (K_2) de acordo com a forma

geométrica do dispositivo (m) (PEPPAS; SAHLIN, 1989). O modelo de liberação do tipo Peppas-Sahlin se encontra descrito na Equação 3,

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_1 t^m + K_2 t^{2m}$$

(equação 3)

Para avaliar qual mecanismo prevalece na fibra CE-3 foi considerado que os arcabouços formados inteiramente por fibras, apresentassem o mecanismo de liberação da forma geométrica de um cilindro. Desta forma, o parâmetro m foi analisado de acordo os valores descritos na Tabela 14.

Tabela 14- Correlação do parâmetro m do modelo Peppas-Sahlin com o mecanismo de liberação.

Parâmetro	Valor	Mecanismo
m	0,45	Difusão pura (difusão de Fick)
	0,89	Transporte caso II
	0,45 < n < 0,89	Cinética de transporte anômalo (combinação de difusão e transporte caso II)

Fonte: Elaborado pela autora

Analisando os dados da Tabela 14, verifica-se que o valor de (nome de m) m para a fibra CE-3 é igual a 0,45, sugerindo que a liberação da albumina ocorreu através do processo de difusão de Fick. Assim, com o tempo o ativo passou do meio mais concentrado (fibra casca-núcleo) para menos concentrado (solução receptora). A amostra CE-3, apesar de ter apresentado uma taxa de encapsulação um pouco mais baixa (13,06%) que a fibra CT-2 (15,75%), teve até 40% a mais da albumina liberada. Isto ocorreu, pois, a fibra apresentou maior porosidade tendo uma liberação menos controlada, e sendo dependente apenas do mecanismo da difusão de Fick.

Considerando os ensaios apresentados acima e considerando a aplicação desses estruturas em regeneração óssea, a fibra CE-3 seria a menos indicada por ter apresentado liberação menos controlada após 5 horas. O uso de BMP-2 como substrato implica na sua degradação rápida por enzimas quando não veiculado a sistema de liberação bem controlado (JUN et al., 2013; CARREIRA et al., 2014).

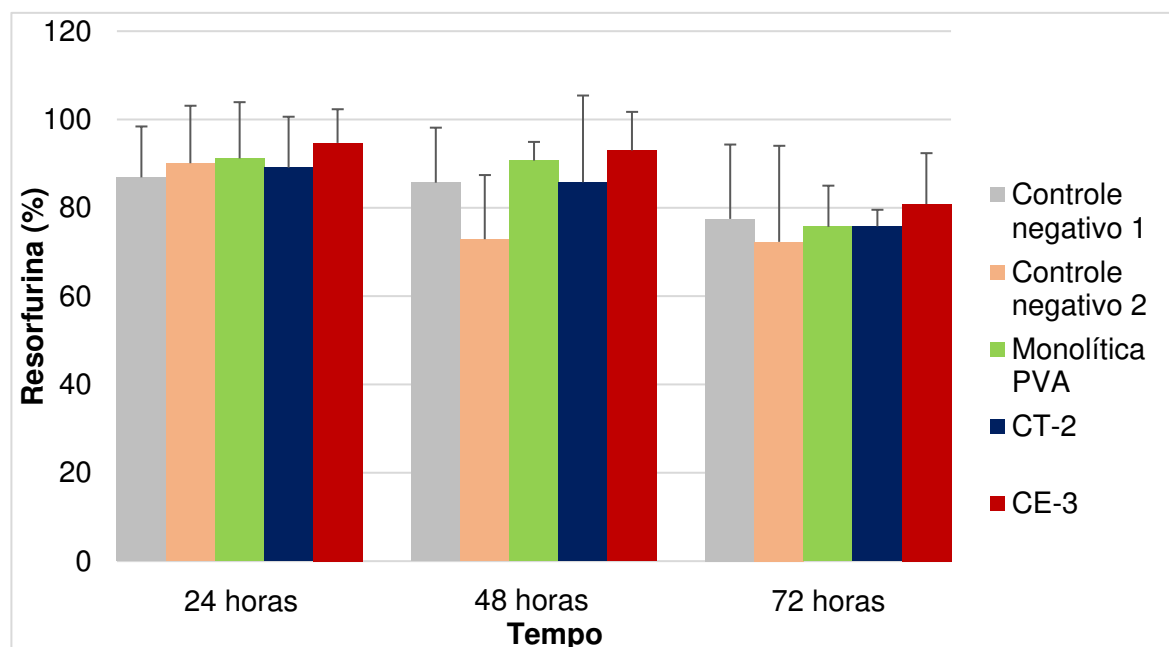
5.6.3 Ensaios biológicos

Nos ensaios biológicos, foram utilizadas as mesmas fibras núcleo-casca aplicadas no estudo de liberação (CT-2 e CE-3), mas contendo o BMP-2 como substrato. Amostras de fibras monolíticas de PVA com BMP-2 foram testadas afim de compará-las às núcleo-casca, enquanto os arcabouços *core-shell* foram utilizadas como controle negativo. Nestes ensaios, foram avaliados os critérios da influência da morfologia da fibra e do modelo de liberação na proliferação e diferenciação de células pré-osteoblásticas.

5.6.3.1 Viabilidade celular, proliferação e diferenciação de pré osteoblasto aplicados em fibras eletrofiadas

No ensaio de viabilidade celular foi aplicado o teste Alamar que consiste na redução da resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido), um corante azul fracamente fluorescente, em resorufina, um corante rosa com altíssima fluorescência em vermelho. O método tem como uma das vantagens o fato da resofurina não precipitar após ser reduzida, facilitando o estudo da proliferação celular nas fibras. Assim, quanto maior a redução do meio, maior a quantidade de resorufina. O resultado pode ser visto na Figura 44, que contém os resultados de fibras contendo BMP-2 (monolítica PVA, CT-2 e CE-3) e também sem a proteína (*core-shell*). O objetivo deste teste foi avaliar atividade metabólica das células MC3T3-E1 quando em contato com as fibras. No entanto, como apresentado no gráfico, não houve diferença significativa entre os grupos nos intervalos de 72 horas ($p > 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis) e da mesma forma não houve para viabilidade no grupo ao longo do experimento ($p > 0,05$; Teste de Mann-Whitney).

Figura 44- Resultados do ensaio Alamar com controles negativos (*core-shell* sem BMP-2) e com a proteína (monolítica, *core-shell* CT-2 e CE-3).



Fonte: Elaborado pela autora

No teste ALAMAR, foi possível observar uma pequena redução da resorfurina, ou seja, do número de células após 48 horas o que pode ser referente a alta proliferação celular e, conseqüentemente, alto consumo do meio. Desta forma, as células começaram a reduzir. Além disso, o material que possui BMP-2 (CT-2, CE-3 e monolítica) que estimula a diferenciação celular, por isso a célula por entrar em uma via de diferenciação termina interrompendo a sua proliferação.

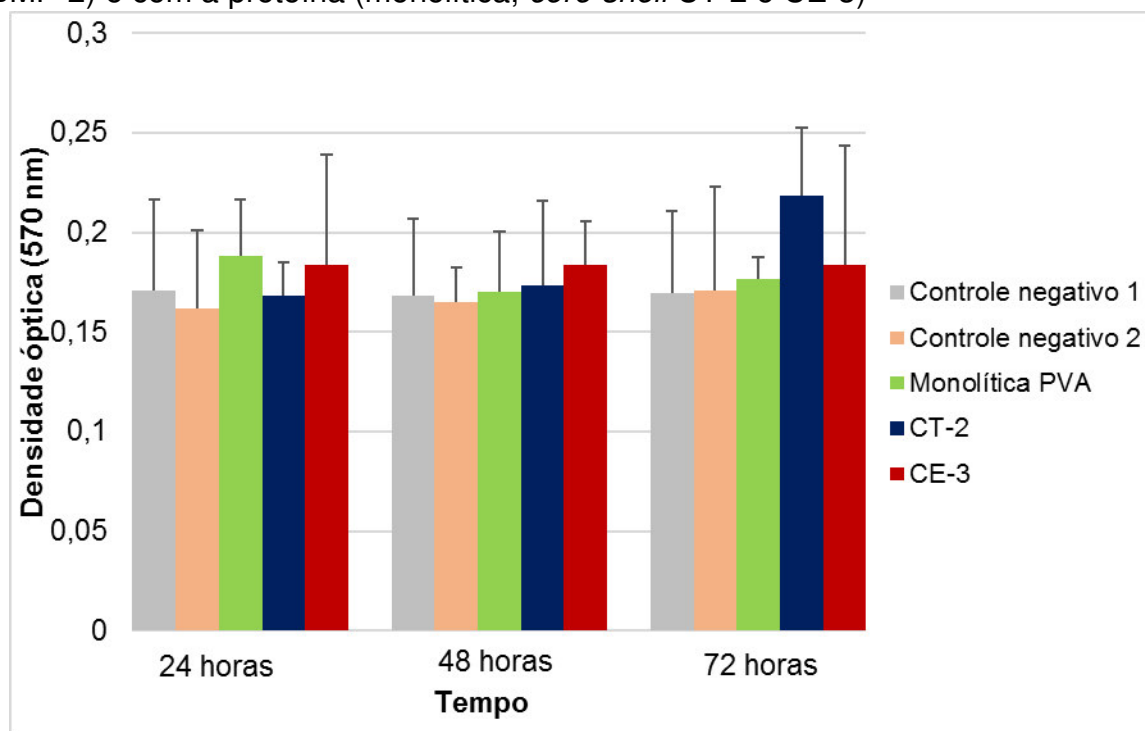
Os ensaios de proliferação foram baseados no teste MTT que corresponde a redução metabólica do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] em cristais de formazano pela atividade das desidrogenases mitocondriais. Desta forma, quando as células estão vivas e proliferando há maior atividade mitocondrial e conseqüentemente maior densidade óptica do formazano observada no espectrofotômetro. A Figura 45 apresenta os resultados do ensaio de MTT para as estruturas consideradas.

No ensaio do MTT, não houve diferença significativa entre os grupos dentro de cada intervalo ($p > 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis), mesmo com as fibras de controle negativo. Este resultado é correspondente à superfície das nanofibras a

qual apresenta porosidade, otimizando as propriedades da superfície o que facilita a adesão, migração, proliferação e o transporte de nutrientes (SHIN et al., 2012; HAN et al., 2014; SKODJE et al., 2016).

Com isso, a Figura 45 apresenta densidade óptica considerável e corresponde a proliferação celular. Isto é decorrente da capacidade do material eletrofiado em apresentar baixa cristalinidade a qual influencia pode influenciar reduzindo a proliferação celular (AREIAS et al., 2012). A alta cristalinidade torna as superfícies superhidrofóbicas, dificultando adesão e proliferação, pois, a função do arcabouço é mimetizar a matriz extracelular permitindo a difusão sanguínea responsável por nutrir as células (BALLESTER-BELTRAN et al., 2011). No entanto, como confirmado pelo teste de ângulo de contato, as amostras eletrofiadas não apresentaram superhidrofobicidade.

Figura 45- Resultados do ensaio MTT com controles negativos (*core-shell* sem BMP-2) e com a proteína (monolítica, *core-shell* CT-2 e CE-3)



Fonte: Elaborado pela autora

Nos testes de MTT, os arcabouços apresentaram proliferação independente da presença do BMP-2, devido a capacidade das fibras em assumir a estrutura da matriz extracelular, servindo de suporte físico, e auxiliando na adesão e migração

(SROUJI et al., 2011). É necessário destacar que considerando a proliferação no grupo ao longo do experimento, houve diferença somente na fibra CT-2 com uma densidade óptica significativamente maior em 72h quando comparado aos intervalos de 24 e 48h ($p < 0,05$; Teste de Mann-Whitney). Este resultado é pode ser relacionado a espessura da fibra CT-2 (149 nm) que foi mais ideal para maior número de células por arcabouço. O diâmetro menor da fibra pode aproximar as células MC3T3-E1 com dimensão aproximada de $80 \mu\text{m}^2$, diferente da amostra com maior diâmetro, levando ao aumento da distância entre as fibras, diminuindo a densidade destas (LÜ et al., 2012).

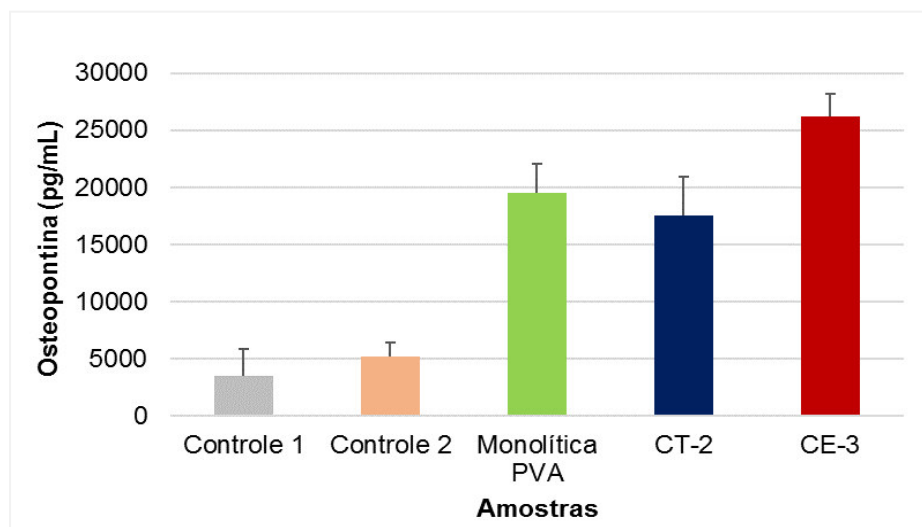
As fibras contendo BMP-2 não apresentaram alta proliferação quando comparadas ao grupo controle, pois já se encontravam em diferenciação e nesta etapa ocorre interrupção da proliferação celular. Ao longo deste teste, não foi observada redução na proliferação celular, logo neste intervalo, o material não apresentou toxicidade às células. A falta de toxicidade do material é correspondente a biocompatibilidade do PLA e PVA que degradam em componentes não tóxicos, sendo aplicados em suturas cirúrgicas com aprovação da FDA para uso clínico (OKAMOTO; JOHN, 2013).

Já os testes de diferenciação celular, basearam-se na medida dos níveis de marcadores de diferenciação osteogênica. Os marcadores utilizados foram osteopontina e fosfatase alcalina. A osteopontina é uma proteína osteóide marcadora do fenótipo Ob maduro que está envolvido na deposição mineral óssea no osso lamelar, ou seja, tecido ósseo maduro (FLORCZYK et al., 2013). Enquanto a fosfatase alcalina é induzida durante a osteogênese, também sendo usada como marcador para diferenciação (HORII et al., 2007).

As Figuras 46 e 47 representam os resultados para a marcação com osteopontina e fosfatase alcalina, respectivamente. Os grupos controle apresentaram diferenciação em ambos gráficos, pois a própria estrutura do arcabouço tridimensional é responsável por facilitar a adesão permitindo que em alguns casos haja também diferenciação no caso espontânea. Este resultado indica que o microambiente em nanoescala dos arcabouços controla a diferenciação por interação entre osteoblastos e osteoclastos via contato celular (ILIE et al., 2012).

No entanto a presença da BMP-2 induziu um aumento significativo do processo de diferenciação. Assim, na Figura 46 foi visto níveis maiores de osteopontina nos grupos com fibra monolítica CT-2 ($p < 0.05$; teste de Mann-Whitney) e CE-3 ($**p < 0.01$; Mann-Whitney) quando comparados aos grupos controle. O mesmo efeito aconteceu para a expressão da fosfatase alcalina significativamente maior nos grupos contendo BMP-2 ($*p < 0,05$; Teste Mann-Whitney) quando comparados ao grupo controle.

Figura 46- Resultados da diferenciação celular segundo níveis de osteopontina.



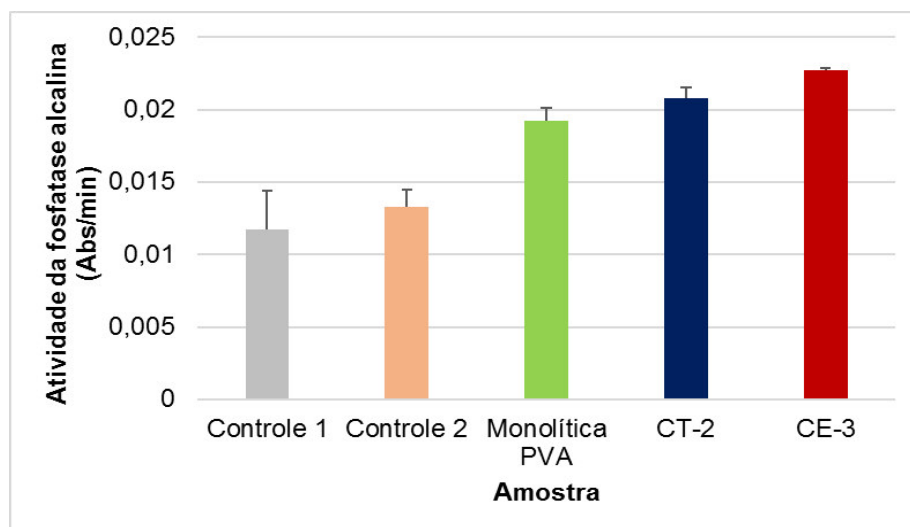
Fonte: Elaborado pela autora

Nos dois gráficos, a fibra CE-3 apresentou maiores níveis dos marcadores, pois, esta amostra obteve maior liberação da BMP-2, indicando assim, maior proliferação celular que as demais amostras. A fibra CT-2 por ter exibido liberação mais contida da proteína influenciou menos a diferenciação que a fibra CE-3. Enquanto que a fibra de PVA por ser solúvel no meio, com o tempo teve sua estrutura desfeita, havendo menos superfície disponível para manter as células.

Os gráficos mostram a alta diferenciação dos pré-osteoblastos quando em contato com os arcabouços contendo BMP-2. Assim, essas fibras foram capazes de liberar o substrato mantendo o principal que é a interação do fator de crescimento com as células. Como visto em outros trabalhos, as fibras promoveram liberação da proteína sem comprometer as células e a BMP-2 induziu os pré-osteoblastos à diferenciação necessária para formação óssea em locais de futura implantação (SROUJI et al., 2011; KIM; KIM; SHIN, 2014).

Diferente de alguns estudos (YANG et al., 2009; BOTTINO; THOMAS; JANOWSKI, 2011; ZHU et al., 2013), o perfil de liberação da BMP-2 foi estipulado pelo modelo com albumina e confirmado com os resultados das células, sendo assim, com base nos testes *in vitro*, a eletrofiação foi um método eficiente para regeneração óssea guiada

Figura 47- Resultados da diferenciação celular segundo atividade da fosfatase alcalina



Fonte: Elaborado pela autora

6 CONCLUSÕES

Nesta dissertação, foi demonstrado que a técnica de eletrofiação coaxial aplicada foi eficiente para obter fibras core-shell, sendo estas fibras capazes de encapsular substâncias bio ativas tais como albumina e BMP-2. A liberação realizada a partir da albumina auxiliou no estudo dos modelos de liberação e como a porosidade pode influenciar neste resultado. A fibra com vazão externa menor (CT-2) apresentou menor porosidade e assim liberação controlada, proliferação celular considerável e alta diferenciação o que refletiu na capacidade do material em liberar o substrato incorporado. Por fim, ao variar os parâmetros da eletrofiação e com os testes in vitro com as células MC3T3, foi possível constatar que foi desenvolvido um arcabouço com capacidade de apresentar uma regeneração óssea guiada (GBR) e ser aplicado no tratamento de perda óssea por periodontite.

REFERÊNCIAS

ARCHANA, D.; SRIKANTH, V.; SASIREKA; KURIEN, B.; EBENEZER. Fibroblast Heterogeneity in Periodontium – a Review. **International Journal of Dental Sciences and Research**, [S.l.], v. 2, n. 3, p. 50–54, 2014. DOI: 10.12691/ijdsr-2-3-1. Disponível em: <<http://pubs.sciepub.com/ijdsr/2/3/1/>>. Acesso em: 11 fev. 2017.

ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **European Spine Journal**, [S.l.], v. 10, p. S96–S101, 2001. DOI: 10.1007/s005860100282. Disponível em: <<https://link-springer-com.ez29.capes.proxy.ufrj.br/article/10.1007%2Fs005860100282?LI=true>>. Acesso em: 6 fev. 2017.

AREIAS, A. C.; RIBEIRO, C.; SENCADAS, V.; GARCIA-GIRALT, N.; DIEZ-PEREZ, A.; GOMEZ RIBELLES, J.L.; LANCEROS-MENDEZ, S. Influence of crystallinity and fiber orientation on hydrophobicity and biological response of poly (L -lactide) electrospun mats. **Soft Matter**, [S.l.], v.8, p.5818–5825, 2012. DOI: 10.1039/c2sm25557j. Disponível em: <<http://pubs-rsc-org.ez29.capes.proxy.ufrj.br/en/content/articlehtml/2012/sm/c2sm25557>>. Acesso em: 1 jul. 2017.

ARVIDSON, S. A.; WONG KA C.; GORGA, R. E.; KHANA, S. A. Structure, molecular orientation, and resultant mechanical properties in core/ sheath poly(lactic acid)/polypropylene composites. **Polymer**, [S.l.], v. 53, n. 3, p. 791–800, 2012. DOI: 10.1016/j.polymer.2011.12.042. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez29.capes.proxy.ufrj.br/science/article/pii/S0032386111010627>>. Acesso em: 2 fev. 2017.

ATABEY, E.; WEI, S.; ZHANG, X.; GU, H.; YAN, X.; HUANG, Y.; SHAO, L.; HE, Q.; ZHU, J.; SUN, L.; KUCKNOOR, A. S.; WANG, A.; GUO, Z. Fluorescent electrospun polyvinyl alcohol/CdSe@ZnS nanocomposite fibers. **Journal of Composite Materials**, EUA, v. 47, n. 25, p. 3175–3185, 2012. DOI: 10.1177/0021998312463107. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com.ez29.capes.proxy.ufrj.br/doi/abs/10.1177/0021998312463107>>. Acesso em: 6 fev. 2017.

BALLESTER-BELTRAN, J.; RICO, P.; MORATAL, D.; SONG, W.; MANO, J.F.; SALMERON-SANCHEZ, M. Role of superhydrophobicity in the biological activity of fibronectin at the cell– material interface. **Soft Matter**, Espanha, v. 7, p. 10803–10811, 2011. DOI: 10.1039/c2sm25557j. Disponível em: < <http://pubs-rsc-org.ez29.capes.proxy.ufrj.br/em/content/articlehtml/2011/sm/c1sm06102j>>. Acesso em: 10 jul. 2017.

BONADIES, I.; MAGLIONE, L.; AMBROGI, V.; PACCEZ, J. D.; ZERBINI, L. F.; SILVA, L. F. R.; PICANÇO, N. S.; TADEI, W. P.; GRAFOVA, I.; GRAFOV, A.; CARFAGNA, C. Electrospun core/shell nanofibers as designed devices for efficient Artemisinin delivery. **European Polymer Journal**, [S.l.], v. 89, n. January, p. 211–220, 2017. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2017.02.015. Disponível em: <<http://pubs-rsc-org.ez29.capes.proxy.ufrj.br/en/content/articlehtml/2011/sm/c1sm06102j>>. Acesso em: 10 jul. 2017.

BOSE, S.; ROY, M.; BANDYOPADHYAY, A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. **Trends in Biotechnology**, EUA, v. 30, n. 10, p. 546–554, 2012. DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.07.005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez29.capes.proxy.ufrj.br/science/article/pii/S0167779912001151>>. Acesso em: 17 mar. 2016.

BOTTINO, M. C.; THOMAS, V.; JANOWSKI, G. M. Acta Biomaterialia. A novel spatially designed and functionally graded electrospun membrane for periodontal regeneration. **Acta Biomaterialia**, EUA, v. 7, n. 1, p. 216–224, 2011. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.08.019. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez29.capes.proxy.ufrj.br/science/article/pii/S1742706110003892>>. Acesso em: 09 jul. 2017.

BRAGDON, B.; MOSEYCHUK, O.; SALDANHA, S.; KING, D.; JULIAN, J.; NOHE, A. Bone Morphogenetic Proteins: A critical review. **Cellular Signalling**, [S.l.], v. 23, n. 4, p. 609–620, 2011. DOI: 10.1016/j.cellsig.2010.10.003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez29.capes.proxy.ufrj.br/science/article/pii/S0898656810002901>>. Acesso em: 07 fev. 2017.

CARRASCO, F.; PAGÈS, P.; GÁMEZ-PÉREZ, J.; SANTANA, O. O.; MASPOCH, M. L. Processing of poly (lactic acid): Characterization of chemical structure, thermal stability and mechanical properties. **Polymer Degradation and Stability**, Espanha, v. 95, p. 116–125, 2010. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2009.11.045. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014139100900408X>>. Acesso em: 09 jan. 2017.

DASH, S.; MURTHY, P. N.; NATH, L.; CHOWDHURY, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta poloniae pharmaceutica**, India, v. 67, n. 3, p. 217–23, 2010. DOI: 10.1016/S0928-0987(01)00095-1. Disponível: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20524422>>. Acesso em: 17 jun. 2017.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K; MUELLER, I; SLAPER-CORTENBACH, I; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, [S.l.], v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006. DOI: 10.1080/14653240600855905. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez29.capes.proxy.ufrj.br/science/article/pii/S1465324906708817>>. Acesso em: 05 mai. 2017.

DONGARGAONKAR, A. A.; BOWLIN, G. L.; YANG, H. Electrospun Blends of Gelatin and Gelatin – Dendrimer Conjugates as a Wound-Dressing and Drug-Delivery Platform. **Biomacromolecules**, [S.l.], v. 14, p. 4038-4045, 2013. DOI: 10.1021/bm401143p. Disponível em: <<http://pubs-acrs-org.ez29.capes.proxy.ufrj.br/doi/abs/10.1021/bm401143p>>. Acesso em: 05 mai. 2017.

ELAHI, F.; LU, W.; GUOPING, G.; KHAN, F. Core-shell Fibers for Biomedical Applications-A Review. **Bioengineering & Biomedical Sciences Core-shell Fibers for Biomedical Applications**, [S.l.], v. 3, n. 1, p. 1–14, 2013. DOI: 10.4172/2155-9538.1000121. Disponível em: <<http://www.openaccessjournals.com/scholarly-articles/core-shell-fibers-for-biomedical-applications-a-review-2155-9538.1000121.pdf>>. Acesso em: 06 fev. 2017.

FAHMY, R. A.; MAHMOUD, N.; SOLIMAN, S.; NOUH, S.; CUNNINGHAM, L. Acceleration of Alveolar Ridge Augmentation Using a Low Dose of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Loaded on a Resorbable Bioactive Ceramic. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, [S.l.], v. 73, n. 12, p. 2257–2272, 2015. DOI: 10.1016/j.joms.2015.07.004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez29.capes.proxy.ufrj.br/science/article/pii/S0278239115009192>>. Acesso em: 07 fev. 2017.

FARDIN, A. C.; JARDIM, E. C. G.; PEREIRA, F. C.; GUSKUMA, M. H.; ARANEGA, A. M.; JÚNIOR, I. R. G. Enxerto ósseo em odontologia: revisão de literatura. **Innovations Implant Journal**, São Paulo, v. 5, n. 3, p. 48–52, 2010. DOI: 10.4248/BR201303002. Disponível em: <http://revodontobvvsalud.org/scielo.php?pid=S198459602010000300010&script=sci_arttext&lng=en>. Acesso em: 11 fev. 2017.

FENG, L. ZHANG, Y.; XI, J.; ZHU, Y.; XIA, F.; JIANG, L. Petal Effect : A Superhydrophobic State with High Adhesive Force. **Langmuir**, [S.l.], v.24, n. 18, p. 4114–4119, 2008. DOI: 10.1021/la703821h. Disponível em: <<http://pubs-acsc-org.ez29.capes.proxy.ufrj.br/doi/abs/10.1021/la703821h>>. Acesso em: 07 jun. 2017.

FLORCZYK, S. J.; LEUNG, M.; LI, Z.; HUANG, J. I.; HOPPER, R. A.; ZHANG, M. Evaluation of three-dimensional porous chitosan – alginate scaffolds in rat calvarial defects for bone regeneration applications. **Society for Biomaterials**, EUA, v. 00 A, p. 1–10, 2013. DOI: 10.1002/jbm.a.34593. Disponível em: <<http://onlinelibrary-wiley.ez29.capes.proxy.ufrj.br/doi/10.1002/jbm.a.34593/full>>. Acesso em: 10 jul. 2017.

FU, X.; FU, X.; JIN, L.; MA, P.; FAN, Z.; WANG, S. Allogeneic stem cells from deciduous teeth in treatment for periodontitis in miniature swine. **Journal of periodontology**, EUA, v. 85, n. 6, p. 845–51, 2014. DOI:10.1902/jop.2013.130254. Disponível em: <<http://www.joponlineorg.ez29.capes.proxy.ufrj.br/doi/abs/10.1902/jop.2013.130254>>. Acesso em: 04 mai. 2017.

U, Y.; FU, Y. C.; NIE, H.; HO, M. L.; WANG, C. K.; WANG, C. H. Optimized Bone Regeneration Based on Sustained Release From Three-Dimensional Fibrous PLGA/HAp Composite Scaffolds Loaded with BMP-2. **Biotechnology and Bioengineering**, [S.l.] v. 99, n. 4, p. 996–1006, 2008. DOI: 10.1002/bit.21648. Disponível em: <<http://onlinelibrary-iley.ez29.capes.proxy.ufrj.br/doi/10.1002/bit.21648/full>>. Acesso em: 06 fev. 2017.

GINANI, F.; SOARES, D. M.; RABÊLO, L. M.; ROCHA, H. A. O S.; BARBOZA, L. B.; GALVÃO, C. A. Effect of a cryopreservation protocol on the proliferation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Acta Odontologica Scandinavica**, [S.l.], v. 6357, p. 1–7, 2016. DOI: 10.1080/00016357.2016.1224919. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00016357.2016.1224919>>. Acesso em: 05 mai. 2017.

GONÇALVES, R. P. **Avaliação morfológica de nanofibras poliméricas com estrutura núcleo-casca obtidas por eletrofiação coaxial para aplicações biomédicas**. 2015. 146 f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Polímeros, Instituto De Macromoléculas. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015.

GREINER, A.; WENDORFF, J. H. Electrospinning : A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. **Angewandte Chemie International Edition**, [S.l.], v. 46, n. 30, p. 5670–5703, 2007. DOI: 10.1002/anie.200604646. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.200604646/full>>. Acesso em: 06 fev. 2017.

GUZMAN, R. C.; SAUL, J. M.; ELLENBURG, M. D.; MERRILL, M. R.; COAN, H. B.; SMITH, T. L.; VAN DYKE, M. E. Bone regeneration with BMP-2 delivered from keratose scaffolds. **Biomaterials**, EUA, v. 34, n. 6, p. 1644–1656, 2013. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.11.002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014296121201246X>>. Acesso em: 11 mar. 2017.

HAMMERLE, C. H. F.; KARRING, T. Guided bone regeneration at oral implant sites. **Periodontology**, Dinamarca, v. 17, p. 151–175, 2000. DOI: 10.1111/j.1600-0757.1998.tb00132.x. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0757.1998.tb00132.x/full>>. Acesso em: 06 mar. 2017.

HAN, J. MENICANIN, D.; GRONTHOS, S.; BARTOLD, P. M. Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. **Australian Dental Journal**, Austrália, v. 59, p. 117–130, 2014. DOI: 10.1111/adj.12100. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/adj.12100/full>>. Acesso em: 30 abr. 2017.

HENKEL, J.; WOODRUFF, M. A.; EPARI, D. R.; STECK, R.; GLATT, V.; DICKINSON, I. C.; CHOONG, F. M.; SCHUETZ, M. A.; HUTMACHER, D. W. Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions – A 21st Century Perspective. **Nature Publishing Group**, [S.l.], v. 1, n. 3, p. 216–248, 2013. DOI: 10.4248/BR201303002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4472104/>>. Acesso em: 06 fev. 2017.

HONG, P.; BOYD, D.; BEYEA, S. D.; BEZUHLY, M. Enhancement of bone consolidation in mandibular distraction osteogenesis: A contemporary review of experimental studies involving adjuvant therapies. **Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery**, [S.l.], v. 66, n. 7, p. 883–895, 2013. DOI: 10.1016/j.bjps.2013.03.030. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1748681513001666>. Acesso em: 29 abr. 2017.

HORII, A.; WANG, X.; GELAIN, F.; ZHANG, S. Biological Designer Self-Assembling Peptide Nanofiber Scaffolds Significantly Enhance Osteoblast Proliferation, Differentiation and 3-D Migration. **Peptide Scaffold for Bone Cell**, [S.l.], n. 2, p. 1–9, 2007. DOI: 10.1371/journal.pone.0000190. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0000190>>. Acesso em 10 jun. 2017.

HU, X.; LIU, S.; ZHOU, G.; HUANG, Y.; XIE, Z.; JING, X. Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. **Journal of Controlled Release**, China, v. 185, p. 12–21, 2014. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.04.018. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365914002363>. Acesso em: 14 abr. 2016.

IQBAL, M.; XIAOXUE, S.; LI, L. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. **Journal of Materials Science**, China, v. 44, n. 21, p. 5713–5724, 2009. DOI: 10.1007/s10853-009-3770-7. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10853-009-3770-7>>. Acesso em: 06 fev. 2017.

ILIE, I.; ILIE, R.; MOCAN, T.; BARTOS, D.; MOCAN, L. Influence of nanomaterials on stem cell differentiation: designing an appropriate nanobiointerface. **International Journal of Nanomedicine**, [S.l.], p. 2211-2225, 2012. DOI: 10.2147/IJN.S29975. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3356220/>>. Acesso em: 10 jul. 2017.

INKINEN, S.; HAKKARAINEN, M.; ALBERTSSON, A.; SODERGARD, A. From Lactic Acid to Poly (lactic acid)(PLA): Characterization and Analysis of PLA and Its Precursors. **Biomacromolecules**, [S.l.], v. 12, n. 3, p. 523–32, 2011. DOI: 10.1021/bm101302t. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm101302t>>. Acesso em: 26 jun. 2017.

JIANG, T.; CARBONE, E. J.; LO, K. W.; LAURENCIN, C.T. Progress in Polymer Science Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration. **Progress in Polymer Science**, [S.l.], v. 46, p. 1–24, 2015. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2014.12.00. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670014001397>>. Acesso em: 14 abr. 2016.

JIMI, E.; HIRATA, S.; KENJI OSAWA, K.; TERASHITA, M.; KITAMURA, C.; FUKUSHIMA, H. The current and future therapies of bone regeneration to repair bone defects. **International Journal of Dentistry**, [S.l.], v. 2012, p. 1–8, 2012. DOI: 10.1002/jor.23287. Disponível em: <[https://www.hindawi.com/journals/ijd/2012/14 8261/abs/](https://www.hindawi.com/journals/ijd/2012/14%20261/abs/)>. Acesso em: 14 abr. 2017.

JUNG, R. E.; FENNER, N.; HÄMMERLE, C. H. F.; ZITZMANN, N. U. Long-term outcome of implants placed with guided bone regeneration (GBR) using resorbable and non-resorbable membranes after 12-14 years. **Clinical Oral Implants Research**, Zurique, v. 24, n. 10, p. 1065–1073, 2013. DOI: 10.1111/j.1600-0501.2012.02522.x. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0501.2012.02522.x/full>>. Acesso em: 6 mar. 2017.

JUN, S.; LEE, E. J.; JANG, T. S.; KIM, H. E.; JANG, J. H.; KOH, Y. H. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) loaded hybrid coating on porous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, EUA, v. 2, p. 773–782, 2013. DOI: 10.14402/jkamprs.2014.36.2.37. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10856-012-4822-0>>. Acesso em: 7 fev. 2017.

KAMIYA, N.; MISHINA, Y. New insights on the roles of BMP signaling in bone-A review of recent mouse genetic studies. **BioFactors**, Michigan, v. 37, n. 2, p. 75–82, 2011. DOI: 10.1002/biof.139. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/biof.139/full>>. Acesso em: 29 abr. 2017.

KAYACI, F.; UYAR, T. Encapsulation of vanillin/cyclodextrin inclusion complex in electrospun polyvinyl alcohol (PVA) nanowebs: Prolonged shelf-life and high temperature stability of vanillin. **Food Chemistry**, Turquia, v. 133, n. 3, p. 641–649, 2012. DOI:10.1016/j.foodchem.2012.01.040. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612000738>>. Acesso em: 01 jul. 2017

KEMPEN, D. H. R.; LU, L.; HEFFERAN, T. E.; CREEMERS, L. B.; MARAN, A.; CLASSIC, K. L.; DHERT, W. J. A.; YASZEMSKI, M. J. Biomaterials Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivities in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering. **Biomaterials**, [S.l.], v. 29, n. 22, p. 3245–3252, 2008. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.031. Disponível em: [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S01429612080028 58](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961208002858). Acesso em: 06 fev. 2017.

KIM, J.; KIM, C.; SHIN, S. Bone Healing in Ovariectomized-rabbit Calvarial Defect with Tricalcium Phosphate Coated with Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Genetically Engineered in Escherichia coli. **Maxillofacial plastic and reconstructive surgery**, [S.l.], v. 36, n. 2, p. 37–49, 2014. DOI: 10.14402/jkamprs.2014. 36.2.37. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4281909/>>. Acesso em: 11 mar. 2017.

KIM, S. E.; YUN, Y.; HANB, Y.; LEEB, D.; OHEB, J.; LEEB, B.; SONGA, H.; PARKC, K.; CHOIB, B. Osteogenesis induction of periodontal ligament cells onto bone morphogenic protein-2 immobilized PCL fibers. **Carbohydrate Polymers**, Seoul, v. 99, p. 700–709, 2014. DOI: 10.1016/j.msec.2014.10.076. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861713008370>>. Acesso em: 04 mai. 2017.

KUMAR, S.; TZEZANA, R.; ZUSSMAN, E.; VENKATRAMAN, S. S. Optimizing partition-controlled drug release from electrospun core–shell fibers. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 392, n. 1–2, p. 209–217, 2010. DOI: 10.1002/bit.20858. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037851731000195X>. Acesso em: 06 fev. 2017.

LAURENCIN, D.; MCCALLUM, S. A.; GUNDBERG, C. M.; VASHISHTH, D. NMR Investigation of the Role of Osteocalcin and Osteopontin at the Organic–Inorganic Interface in Bone. **Langmuir**, [S.l.], v. 29, p. 13873–13882, 2013. DOI: 10.1021/la403203w. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la403203w>>. Acesso em: 10 jul. 2017.

LEE, C. H.; HONG, W. H. Influence of different degrees of hydrolysis of poly (vinyl alcohol) membrane on transport properties in pervaporation of IPA/water mixture. **Journal of Membrane Science**, Coreia do Sul, v. 135, p. 187–193, 1997. DOI: 10.1016/S0376-7388(97)00146-4. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738897001464>>. Acesso em: 11 mar. 2017.

LEE, J. S.; CHOI, K. H.; GHIM, H. D.; KIM, S. S.; CHUN, D. H.; KIM, H. Y.; LYOO, W. S. Role of molecular weight of atactic poly(vinyl alcohol) (PVA) in the structure and properties of PVA nanofabric prepared by electrospinning. **Journal of Applied Polymer Science**, [S.l.], v. 93, n. 4, p. 1638–1646, 2004. DOI: 10.1002/app.20602. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/app.20602/full>>. Acesso em: 11 mar. 2017.

LEE, S. J.; ATALA, A. et al. Scaffold technologies for controlling cell behavior in tissue engineering. **Biomedical materials**, EUA, v. 8, n.1, p. 1–3, 2013. DOI: 10.1088/1748-6041/8/1/010201. Disponível em: <<http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1748-6041/8/1/010201/meta>>. Acesso em: 17 mar. 2017.

LEE, S. S.; HUANG, B. J.; KALTZ, S. R.; SUR, S.; NEWCOMB, C. J.; STOCK, S. R.; SHAH, R. N.; STUPP, S. I. Bone regeneration with low dose BMP-2 amplified by biomimetic supramolecular nanofibers within collagen scaffolds. **Biomaterials**, EUA, v. 34, n. 2, p. 452–459, 2013. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014296121201126>>. Acesso em: 17 mar. 2016.

LEE, Y. J.; LEE, J. H.; CHO, H. J.; KIM, H. K.; YOON, T. R.; SHIN, H. Electrospun fibers immobilized with bone forming peptide-1 derived from BMP7 for guided bone regeneration. **Biomaterials**, Seoul, v. 34, n. 21, p. 5059–5069, 2013. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.03.051. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014296121300361X>. Acesso em: 06 mar. 2017.

LI, X.; WANG, L.; FAN, Y.; FENG, Q.; CUI, F. Z.; WATARI, F. Review Article Nanostructured scaffolds for bone tissue engineering. **Society of Biomaterials**, [S.I.], p. 2424–2435, 2013. DOI: 10.1002/jbm.a.34539. Disponível em: <<http://online.library.wiley.com/doi/10.1002/jbm.a.34539/full>>. Acesso em: 06 fev. 2017.

LIAO, Y.; WANG, R.; TIAN, M.; QIU, C.; FANE, A. G. Fabrication of polyvinylidene fluoride (PVDF) nanofiber membranes by electro-spinning for direct contact membrane distillation. **Journal of Membrane Science**, [S.I.], v. 425–426, p. 30–39, 2013. DOI: 10.1016/j.memsci.2012.09.023. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037673881006941>>. Acesso em: 27 jun. 2017.

LIM, C. T.; TAN, E. P. S.; NG, S. Y. Effects of crystalline morphology on the tensile properties of electrospun polymer nanofibers Effects of crystalline morphology on the tensile properties of electrospun polymer nanofibers. **Applied Physics Letters**, [S.I.], v. 141908, n. 2008, p. 2006–2009, 2016. DOI: 10.1063/1.2857478. Disponível em: <<http://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.2857478>>. Acesso em: 01 jun. 2017.

LIN, G.; CHAN, H.; GIANNOBILE, W. V.; WANG, H. Recombinant human bone morphogenetic protein 2 outcomes for maxillary sinus floor augmentation : a systematic review and meta-analysis. **Clinical Oral Implant Research**, [S.l.], p. 1349–1359, 2015. DOI: 10.1111/clr.12737. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/clr.12737/full>>. Acesso em: 06 fev. 2017.

LIU, J.; KERNS, D. G. Mechanism of Guided Bone Regeneration : A Review. **The Open Dentistry Journal**, EUA, v. 8, p. 56–65, 2014. DOI: 10.2174/1874210601408010056. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4040931/>>. Acesso em: 01 jul. 2017.

LIU, T.; WU, G.; ZHENG, Y.; WISMEIJER, D.; EVERTS, V.; LIU, Y. Cell-mediated BMP-2 release from a novel dual-drug delivery system promotes bone formation. **Clinical Oral Implant Research**, [S.l.], v. 25, n. 12, p. 1412–1421, 2013. DOI: 10.1111/clr.12283. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/clr.12283/full>>. Acesso em: 06 fev. 2017.

LOBO, M. S.; COSTA, P. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal Of science**, Porto, v. 13, p. 123–133, 2001. DOI: 10.1016/S0928-0987(01)00095-1. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098701000951>>. Acesso em: 03 jul. 2017.

LU, Y.; HUANG, J.; YU, G.; CARDENAS, R.; WEI, S.; WUJCIK, E. K.; GUO, Z. Coaxial electrospun fibers: applications in drug delivery and tissue engineering. **Nanomedicine and Nanobiotechnology**, [S.l.], v. 8, n. 5, p. 654–677, 2016. DOI: 10.1002/wnan.1391. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/wnan.1391/full>>. Acesso em: 14 mar. 2017.

LÜ, L.; WANG, Y.; MAO, X.; XIAO, Z.; HUANG, N. The effects of PHBV electrospun fibers with different diameters and orientations on growth behavior of bone-marrow- derived mesenchymal stem cells. **Biomedical Materials**, China, v.1, n.1, p. 1-10, 2012. DOI: 10.1088/1748-6041/7/1/015002. Disponível: <<http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1748-6041/7/1/015002/meta>>. Acesso em: 10 jun. 2017.

LUO, T.; ZHANG, W.; SHI, B.; CHENG, X.; ZHANG, Y. Enhanced bone regeneration around dental implant with bone morphogenetic protein 2 gene and vascular endothelial growth factor protein delivery. **Clinical Oral Implants Research**, China, v. 23, n. 4, p. 467–473, 2012. DOI: 10.1111/j.1600-0501.2011.02164.x. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0501.2011.02164.x/full>>. Acesso em: 06 mar. 2017.

MAO, X.; LIU, Y.; CHEN, C.; SHI, S. Mesenchymal Stem Cells and Their Role in Dental Medicine. **Dental Clinics of NA**, [S.l.], v. 61, n. 1, p. 161–172, 2017. DOI: 10.1016/j.cden.2016.08.006. Disponível em: <[www.dental.theclinics.com/article/S0011-8532\(16\)30078-7/abstract](http://www.dental.theclinics.com/article/S0011-8532(16)30078-7/abstract)>. Acesso em: 04 mai. 2017.

MATABOLA, K. P.; MOUTLOALI, R. M. The influence of electrospinning parameters on the morphology and diameter of poly(vinylidene fluoride) nanofibers- Effect of sodium chloride. **Journal of Materials Science**, EUA, v. 48, n. 16, p. 5475–5482, 2013. DOI: 10.1007/s10853-013-7341-6. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10853-013-7341-6>>. Acesso em: 27 jun. 2017.

MCDERMOTT, A. M.; MASON, D. E.; LIN, A. S. P.; GULDBERG, R. E.; BOERCKEL, J. D. Influence of structural load-bearing scaffolds on mechanical load- and BMP-2-mediated bone regeneration. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, EUA, v. 62, p. 169–181, 2016. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2016.05.010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1751616116301291>>. Acesso em: 27 jun. 2017.

MEECHASUE, C.; DUBIN, R.; SUPAPHOL, P.; HOVEN, V. P.; KOHN, J. Electrospun mat of tyrosine-derived polycarbonate fibers for potential use as tissue scaffolding material. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 17, n. 9, p. 1039–1056, 2006. DOI: 10.1163/156856206778365988. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1163/156856206778365988>>. Acesso em: 03 jul. 2017.

MEGELSKI, S.; STEPHENS, J. S.; CHASE, D.; RABOLT, J. F. Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. **Macromolecules**, [S.l.], v. 35, n. 22, p. 8456–8466, 2002. DOI: 10.1021/ma020444a. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma020444a>>. Acesso em: 24 jun. 2016.

MEINEL, A. J.; GERMERSHAUS, O.; LUHMANN, T.; MERKLE, H. P.; MEINEL, L. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Electrospun matrices for localized drug delivery : Current technologies and selected biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S.I.], v. 81, n. 1, p. 1–13, 2012. DOI: 10.1016/j.ejpb.2012.01.01. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641112000379>>. Acesso em: 06 fev. 2017.

MEINEL, L.; KARAGEORGIU, K.; FAJARDO, R.; SNYDER, B.; SHINDE-PATIL, V.; ZICHNER, L.; KAPLAN, D.; LANGER, R.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: Effects of scaffold material and medium flow. **Annals of Biomedical Engineering**, [S.I.], v. 32, n. 1, p. 112–122, 2004. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1023/B:ABME.00000007796.48329.b4>>. Acesso em: 06 fev. 2017.

MERKLE, V. M.; TRAN, P. L.; HUTCHINSON, M.; AMMANN, K. R.; DECOOK, K.; WU, X.; SLEPIAN, M. J. Acta Biomaterialia Core – shell PVA / gelatin electrospun nanofibers promote human umbilical vein endothelial cell and smooth muscle cell proliferation and migration. **Acta Biomaterialia**, [S.I.], v. 27, p. 77–87, 2015. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.08.044. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S174270611530088X>>. Acesso em: 10 fev. 2017.

MOSHAVERINIA, A.; XU, X.; CHEN, C.; ANSARI, S.; ZADEH, H. H.; SNEAD, M. L.; SHI, S. Application of stem cells derived from the periodontal ligament or gingival tissue sources for tendon tissue regeneration. **Biomaterials**, EUA, v. 35, n. 9, p. 2642–2650, 2014. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.12.053. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961213015378>>. Acesso em: 30 abr. 2017.

NAKAMURA, S.; YAMADA, Y.; KATAGIRI, W.; SUGITO, T.; ITO, K.; UEDA, M. Stem Cell Proliferation Pathways Comparison between Human Exfoliated Deciduous Teeth and Dental Pulp Stem Cells by Gene Expression Profile from Promising Dental Pulp. **Journal of Endodontics**, Japão, v. 35, n. 11, p. 1536–1542, 2009. DOI: 10.1016/j.joen.2009.07.024. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0099239909006542>>. Acesso em: 04 mai. 2017.

OBATA, A.; HOTTA, T.; WAKITA, T.; OTA, Y.; KASUGA, T. Acta Biomaterialia Electrospun microfiber meshes of silicon-doped vaterite/poly (lactic acid) hybrid for guided bone regeneration. **Acta Biomaterialia**, [S.l.], v. 6, n. 4, p. 1248–1257, 2010. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.11.013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706109005091>>. Acesso em: 07 jul. 2017.

OKAMOTO, M.; JOHN, B. Progress in Polymer Science Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds. **Progress in Polymer Science**, Japão, v. 38, n. 10–11, p. 1487–1503, 2013. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2013.06.001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670013000646>>. Acesso em: 10 jul. 2017.

PEPPAS, N. A.; NARASIMHAN, B. Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, EUA, v. 190, p. 75–81, 2014. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.06.041. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365914004507>>. Acesso em: 26 jun. 2017.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **International Journal of Pharmaceutics**, EUA, v. 57, p.169-172, 1989. DOI: 10.1016/0378-5173(89)90306-2. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378517389903062?via%3Dihub>>. Acesso em: 03 jul. 2017.

PEPPO, G. M.; MARCOS-CAMPOS, I.; KAHLER, D. J.; ALSALMAN, D.; SHANG, L.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; MAROLT, D. Engineering bone tissue substitutes from human induced pluripotent stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, EUA, v. 110, n. 21, p. 8680–5, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1301190110. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/110/21/8680.short>>. Acesso em: 30 abr. 2017.

PERESIN, M. S.; HABIBI, Y.; ZOPPE, J. O.; PAWLAK, J. J.; ROJAS, O. J. Nanofiber Composites of Polyvinyl Alcohol and Cellulose Nanocrystals: Manufacture and Characterisation. **Biomacromolecules**, [S.l.], v. 11, n. 3, p. 674–681, 2010. DOI: 10.1021/bm901254n. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20088572>>. Acesso em: 24 mar. 2017.

PEREZ, R. A.; KIM, H. W. Core-shell designed scaffolds for drug delivery and tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, República da Coréia, v. 21, p. 2–19, 2015. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.03.013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706115001233>>. Acesso em: 26 jun. 2017.

PICCIANI, P. H. S.; MEDEIROS, E. S.; PAN, Z.; WOOD, D. F.; ORTS, W. J.; MATTOSO, L. H. C.; SOARES, B. G. Structural , Electrical , Mechanical , and Thermal Properties of Electrospun Poly(lactic acid)/ Polyaniline Blend Fibers. **Macromolecular Materials and Engineering**, São Paulo, p. 618–627, 2010. DOI: 10.1002/mame.201000019. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mame.201000019/full>>. Acesso em: 01 jul. 2017.

PILLAY, V.; DOTT, C.; CHOONARA, Y. E.; TYAGI, C.; TOMAR, L.; KUMAR, P.; TOIT, L. C.; NDESENDO, V. M. K. A Review of the Effect of Processing Variables on the Fabrication of Electrospun Nanofibers for Drug Delivery Applications. **Journal of Nanomaterials**, [S.l.], v. 2013, p. 1- 22, 2013. DOI: 10.1155/2013/789289. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/jnm/2013/789289/abs/>>. Acesso em: 14 mar. 2017.

PINA, S.; OLIVEIRA, J. M.; REIS, R. L. Natural-Based Nanocomposites for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine: A Review. **Advanced Materials**, [S.l.], v. 27, p. 1143–1169, 2015. DOI: 10.1002/adma.201403354. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adma.201403354/full>>. Acesso em: 06 fev. 2017.

QU, H.; WEI, S.; GUO, Z. Coaxial electrospun nanostructures and their applications. **Journal of Materials Chemistry A**, [S.l.], v. 1, n. 38, p. 11513, 2013. DOI: 10.1039/c3ta12390a. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/ta/c3ta12390a/unauth#ldivAbstract>>. Acesso em: 06 fev. 2017.

RAKHMATIA, Y.; AYUKAWA, Y.; FURUHASHI, A.; KOYANO, K. Current barrier membranes: Titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. **Journal of Prosthodontic Research**, Japão, v. 57, n. 1, p. 3–14, 2013. DOI: 10.1016/j.jpor.2012.12.001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1883195813000029>>. Acesso em: 06 mar. 2017.

RAMSEIER, C. A. RASPERINI, G.; BATIA, S.; GIANNOBILE, W. V. Advanced regenerative technologies for periodontal tissue repair. **Periodontology** 2000, [S.l.], v. 59, n. 1, p. 1–19, 2012. DOI: 10.1111/j.1600-0757.2011.00432.x. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0757.2011.00432.x/full>>. Acesso em: 11 fev. 2017.

ROSLINDO, E. R.; ROSLINDO, N. C.; CERRI, P. S.; HETEM, S.; BARBOSA, J. B. Estudo histomorfológico do periodonto de sustentação de molares de rato submetidos à hipofunção. **Revista de Odontologia da UNESP**, São Paulo, v. 24, p. 221-233, 1995.

SABIR, M. I.; XU, X.; LI, L. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. **Journal of Materials Science**, China, v. 44, n. 21, p. 5713–5724, 2009. DOI: 10.1007/s10853-009-3770-7. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10853-009-3770-7>>. Acesso em: 06 fev. 2017.

SASA, B.; ODO, P.; STANE, S.; JULIJANA, K. Analysis of surface properties of cellulose ethers and drug release from their matrix tablets. **European Journal Of Pharmaceutical Science**, [S.l.], v. 27, p. 375-383, 2006. DOI: 10.1016/j.ejps.2005.11.009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098705003404>>. Acesso em: 03 jul. 2017.

SCHOFER, M. D.; VELTUM, A.; THEISEN, C.; CHEN, F.; AGARWAL, S.; FUCHS-WINKELMANN, S.; PALETTA, J. R. J. Functionalisation of PLLA nanofiber scaffolds using a possible cooperative effect between collagen type I and BMP-2: Impact on colonization and bone formation in vivo. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, Alemanha, v. 23, n. 9, p. 2227–2233, 2012. DOI: 10.1007/s10856-012-4697-0. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10856-012-4697-0>>. Acesso em: 14 mar. 2017.

SEEHERMAN, H.; WOZNEY, J.; LI, R. Bone Morphogenetic Protein Delivery Systems. **Spine**, [S.l.], v. 27, n. 16, p. 16–23, 2002. DOI: 10.1097/01.BRS.0000020728.34131.03. Disponível em: <http://journals.lww.com/spinejournal/Abstract/2002/08151/Bone_Morphogenetic_Protein_Delivery_Systems.5.aspx>. Acesso em: 06 fev. 2017.

SEONG, J. M.; KIM, B.; PARK, J.; KWON, I.; MANTALARIS, A.; HWANG, Y. Stem cells in bone tissue engineering. **Biomedical materials**, [S.l.], v. 5, n. 6, p. 1-14, 2010. DOI: 10.1088/1748-6041/5/6/062001. Disponível em: <<http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1748-6041/5/6/062001/meta>>. Acesso em: 30 abr. 2017.

SHIN, S.; PUREVDORJ, O.; CASTANO, O.; PLANELL, J. A.; KIM, H. W. A short review : Recent advances in electrospinning for bone tissue regeneration. **Journal of Tissue Engineering**, [S.l.], v. 1, n. 3, p. 1-11, 2012. DOI: 10.1177/2041731412443530. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/2041731412443530>>. Acesso em: 07 fev. 2017.

SINGHVI, G.; SINGH, M. REVIEW : IN-VITRO DRUG RELEASE CHARACTERIZATION MODELS. **International Journal of Pharmaceutical Studies and Research**, [S.l.], v. 2, n. 1, 2011. Disponível: <<http://technicaljournalsonline.com/ijpsr/VOL%20II/IJPSR%20VOL%20II%20ISSUE%20I%20JANUARY%20MARCH%202011/IJPSR%20VOL%20II%20ISSUE%20I%20Article%2013.pdf>>. Acesso em: 14 fev. 2017.

SILVA, E. C.; OLIVEIRA, L. J. E.; ALENCAR, P. S. Membranas de colágeno em Implantodontia. **Arquivo Brasileiro de Odontologia**, Belo Horizonte, v. 10, n. 1, p. 26–31, 2014. Disponível em: <<http://periodicos.pucminas.br/index.php/arquivo-brasileiroodontologia/article/viewFile/14907/11527>>. Acesso em: 04 mai. 2017.

SKODJE, A.; IDRIS, S. B. M.; SUN, Y.; BARTLAU, S.; MUSTAFA, K.; FINNE-WISTRAND, A.; WIKESJ, U.; LEKNES, K. N. Biodegradable polymer scaffolds loaded with low-dose BMP-2 stimulate periodontal ligament cell differentiation. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, [S.l.], v. 103, n. 6, p. 1991–1998, 2015. DOI: 10.1002/jbm.a.35334. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.a.35334/full>>. Acesso em: 11 mar. 2017.

SON, Y. J.; KIM, W. J.; YOO, H. S. Therapeutic applications of electrospun nanofibers for drug delivery systems. **Archives of Pharmacal Research**, República da Coréia, v. 37, n. 1, p. 69–78, 2014. DOI: 10.1007/s12272-013-0284-2. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12272-013-0284-2>>. Acesso em: 26 jun. 2017.

SPERLING, L. E.; REIS, K. P.; PRANKE, P.; WENDORFF, J. H. Advantages and challenges offered by biofunctional *core-shell* fiber systems for tissue engineering and drug delivery. **Drug Discovery Today**, [S.l.], v. 21, n. 8, p. 1243–1256, 2016. DOI: 10.1016/j.drudis.2016.04.024. Disponível: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644616301507>>. Acesso em: 08 jun. 2017.

SROUJI, S.; BEN-DAVID, D.; LOTAN, R.; LIVNE, E.; AVRAHAMI, R.; ZUSSMAN, E. Protein-2 Embedded Within Electrospun Scaffolds for Regeneration of Bone Defect : In Vitro and In Vivo Evaluation. **Tissue Engineering Part A**, [S.l.], v. 17, n. 3, p. 269-277, 2011. DOI:10.1089/ten.tea.2010.0250. Disponível: <<http://online.liebert pub.com/doi/abs/10.1089/ten.tea.2010.0250>>. Acesso em: 06 fev. 2017.

STACHEWICZ, U.; BAILEY, R. J.; WANG, W.; BARBER, A. H. Size dependent mechanical properties of electrospun polymer fibers from a composite structure. **Polymer**, Reino Unido v. 53, n. 22, p. 5132–5137, 2012. DOI: 10.1089/ten.tea.2010.0250. Disponível: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386112007525>>. Acesso em: 11 jun. 2017.

STRAWHECKER, K. E.; MANIAS, E. Structure and Properties of Poly (vinyl alcohol)/Na Montmorillonite Nanocomposites. **Chemical Material**, EUA, v. 12, p. 2943–2949, 2000. DOI: 10.1021/cm000506g. Disponível: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cm000506g>>. Acesso em: 10 mar.2017.

SU, W. T.; WU, P. S.; HUANG, T. Y. Osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth on poly(caprolactone) nanofibers containing strontium phosphate. **Materials Science and Engineering C**, [S.l.], v. 46, p. 427–434, 2015. DOI: 10.1016/j.msec.2014.10.076. Disponível: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493114006961>>. Acesso em: 07 mar. 2017.

SUN, B.; DUAN, B.; YUAN, X. Preparation of Core / Shell PVP / PLA Ultrafine Fibers by Coaxial Electrospinning. **Journal of Applied Polymer Science**, China, v. 102, n. 1, p. 39-45, 2006. DOI:10.1002/app.24297. Disponível: <<http://online.library.wiley.com/doi/10.1002/app.24297/full>>. Acesso em: 07 jun. 2017.

TANG, C.; TIAN, Y.; HSU, S. Poly(vinyl alcohol) Nanocomposites Reinforced with Bamboo Charcoal Nanoparticles: Mineralization Behavior and Characterization. **Materials**, Taiwan, v. 8, p. 4895–4911, 2015. DOI: 10.3390/ma8084895. Disponível: <<http://www.mdpi.com/1996-1944/8/8/4895/htm>>. Acesso em: 18 mar. 2017.

TIWARI, S. K.; VENKATRAMAN, S. S. Importance of viscosity parameters in electrospinning of monolithic and *core-shell* fibers. **Materials Science & Engineering C**, [S.l.], v. 32, n. 5, p. 1037–1042, 2012. DOI: 10.1016/j.msec.2012.02.019. Disponível: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493112000719>>. Acesso em: 03 jul. 2017.

VASCONCELOS, R. G.; RIBEIRO, R. A.; VASCONCELOS, M. G.; LIMA, K. C.; BARBOZA, C. A. G. In vitro comparative analysis of cryopreservation of undifferentiated mesenchymal cells derived from human periodontal ligament. **Cell and Tissue Banking**, Rio Grande do Norte, v. 13, n. 3, p. 461–469, 2012. DOI: 10.1007/s10561-011-9271-3. Disponível: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10561-011-9271-3>>. Acesso em: 12 jul. 2017.

VELLAYAPPAN, M. V.; VENUGOPAL, J. R.; RAMAKRISHNA, S.; RAY, S.; ISMAIL, A. F.; MANDAL, M.; MANIKANDAN, A.; SEALG, S.; JAGANATHAN, S. K. Electrospinning applications from diagnosis to treatment of diabetes. **Royal Society of Chemistry**, India, v. 6, n. 87, p. 83638–83655, 2016. DOI: 10.1039/C6RA15252J. Disponível: <<http://pubs.rsc.org/-/content/articlehtml/2016/ra/c6ra15252j>>. Acesso em: 14 jul. 2017.

WANG, C.; YAN, K. W.; LIN, Y. D.; HSIEH, P. C. H. Biodegradable core/shell fibers by coaxial electrospinning: Processing, fiber characterization, and its application in sustained drug release. **Macromolecules**, Taiwan, v. 43, n. 15, p. 6389–6397, 2010. DOI: 10.1021/ma100423x. Disponível: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma100423x>>. Acesso em: 10 jun. 2017.

WANG, Z.; FENG, Z.; WU, G.; BAI, S.; DONG, Y. The use of platelet-rich fibrin combined with periodontal ligament and jaw bone mesenchymal stem cell sheets for periodontal tissue engineering. **Nature Publishing Group**, [S.l.], n.6, p. 1–15, 2016. DOI:10.1038/srep28126. Disponível: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4914939>>. Acesso em: 03 jun. 2017.

WOZNEY, J. M. Overview of Bone Morphogenetic Proteins. **Spine**, [S.l.], v. 27, n. 16, p. 2–8, 2002. DOI: 10.1097/01.BRS.0000020725.01916.7E. Disponível: <http://journals.lww.com/spinejournal/Abstract/2002/08151/Overview_of_Bone_Morphogenetic_Proteins.2.aspx>. Acesso em: 07 abr. 2017.

WU, S.; LIU, X.; YEUNG, K.; LIU, C.; YANG, X. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering R: Reports**, China, v. 80, n. 1, p. 1–36, 2014. DOI: 10.1016/j.mser.2014.04.001. Disponível: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927796X14000503>>. Acesso em: 09 abr. 2017.

XIE, Q.; JIA, L.; XU, H. Y.; HU, X. G.; WANG, W.; JIA, J. Fabrication of *Core-shell* PEI / pBMP2-PLGA Electrospun Scaffold for Gene Delivery to Periodontal Ligament Stem Cells. **Stem Cells**, [S.l.], v. 2016, p. 1-11, 2016. DOI: 10.1155/2016/5385137. Disponível: <<https://www.hindawi.com/journals/sci/2016/5385137/abs/>>. Acesso em: 07 abr. 2017.

YANG, W.; HE, N.; FU, J.; LI, Z.; JI, X. Preparation of Porous Core–Shell Poly L-Lactic Containing Drug. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, [S.l.], v. 15, n. 12, p. 9911–9917, 2015. DOI: 10.1166/jnn.2015.10884. Disponível: <<http://www.ingentaconnect.com/content/asp/jnn/2015/00000015/00000012/art00082>>. Acesso em: 10 mai. 2017.

YU, D.; CHIAN, W.; WANG, X.; LI, X.; LI, Y.; LIAO, Y. Linear drug release membrane prepared by a modified coaxial electrospinning process. **Journal of Membrane Science**, [S.l.], v. 428, p. 150–156, 2013. DOI: 10.1016/j.memsci.2012.09.062. Disponível: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738812007995>>. Acesso em: 13 mai. 2017.

ZHAI, W. KO, Y.; ZHU, W.; WONG, A.; PARK, C. B. A Study of the Crystallization , Melting and Foaming Behaviors of Polylactic Acid in Compressed CO₂. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 10, p. 5381–5397, 2009. DOI: 10.3390/ijms10125381. Disponível: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/10/12/5381/htm>>. Acesso em: 15 mai. 2017.

ZHANG, Y.; ZHOU, J.; ZOU, A.; LI, W.; YAO, C.; XIE, S. DDSolver : An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. **American Association of Pharmaceutical Journal**, EUA, v. 12, n. 3, 2010. DOI: 10.1208/s12248-010-9185-1. Disponível: <<https://link.springer.com/article/10.1208/s12248-010-9185-1>>. Acesso em: 20 mai. 2017.

ZHU, H.; ZHOU, Y.; WANG, C.; GAO, M.; JIANG, H.; WANG, H. Biological activity of a nanofibrous barrier membrane containing bone morphogenetic protein formed by *core-shell* electrospinning as a sustained delivery vehicle. **Journal of Biomedical Materials**, China, v. 101, n. 4, p. 541–552, 2012. DOI: 10.1002/jbm.b.32854. Disponível: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.b.32854/full>>. Acesso em: 30 mar. 2017.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. Disponível em: <<https://www.nist.gov/>>. Acesso em 06 jun. 2015.

THE ALLIANCE FOR REGENERATIVE MEDICINE. Disponível em: <<https://alliancerm.org/press/alliance-regenerative-medicine-releases-2016-annual-data-report%2C-highlighting-sector-trends>>. Acesso em 06 jun. 2015.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. Disponível em: <<https://www.astm.org/>>. Acesso em 07 jun. 2015.

MODERN DENTISTRY. Disponível: <http://www.moderndentistry.com.au/periodontal_disease.php>. Acesso em 07 out. 2015

PUBMED. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em 07 out. 2015

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ODONTOLOGIA. Disponível em: <<http://www.abo.org.br/site/>>. Acesso em 10 out. 2015

APÊNDICE A- TRABALHO APRESENTADO EM CONGRESSO



Brazilian Materials
Research Society
Excellence in the union of science and research
in materials technology in Brazil

Certificate

(R.P.3.164)

Hereby we certify that the work
PLA fibers application obtained by electrospinning in tissue engineering,
submitted by
Talita Nascimento Da Silva, Paulo Henrique de Sousa Picciani, Haroldo Gurgel Mota Filho
and **Carlos Augusto Galvão Barboza**
was presented in Poster form by **Talita Nascimento Da Silva** at
the XV Brazilian MRS Meeting, in Campinas-SP, from 25th to 29th of September 2016.

Ana Flávia Nogueira
Conference Chair

Mônica Alonzo Cotta
Conference Chair

Osvaldo Novais de Oliveira Junior
Brazil MRS President

APÊNDICE B- TRABALHO APRESENTADO EM CONGRESSO



**Fifth International Conference on
Natural Polymers and Biomaterials
ICNP 2017 Rio**

CERTIFICATE

This is to certify that [] Prof. / [] Dr. / ☒ Ms. / [] Mrs. / [] Mr

Talita Nascimento da Silva

has presented a paper Code: ICNP2017Rio#048 ([] Plenary / [] Invited Talk / [] Short

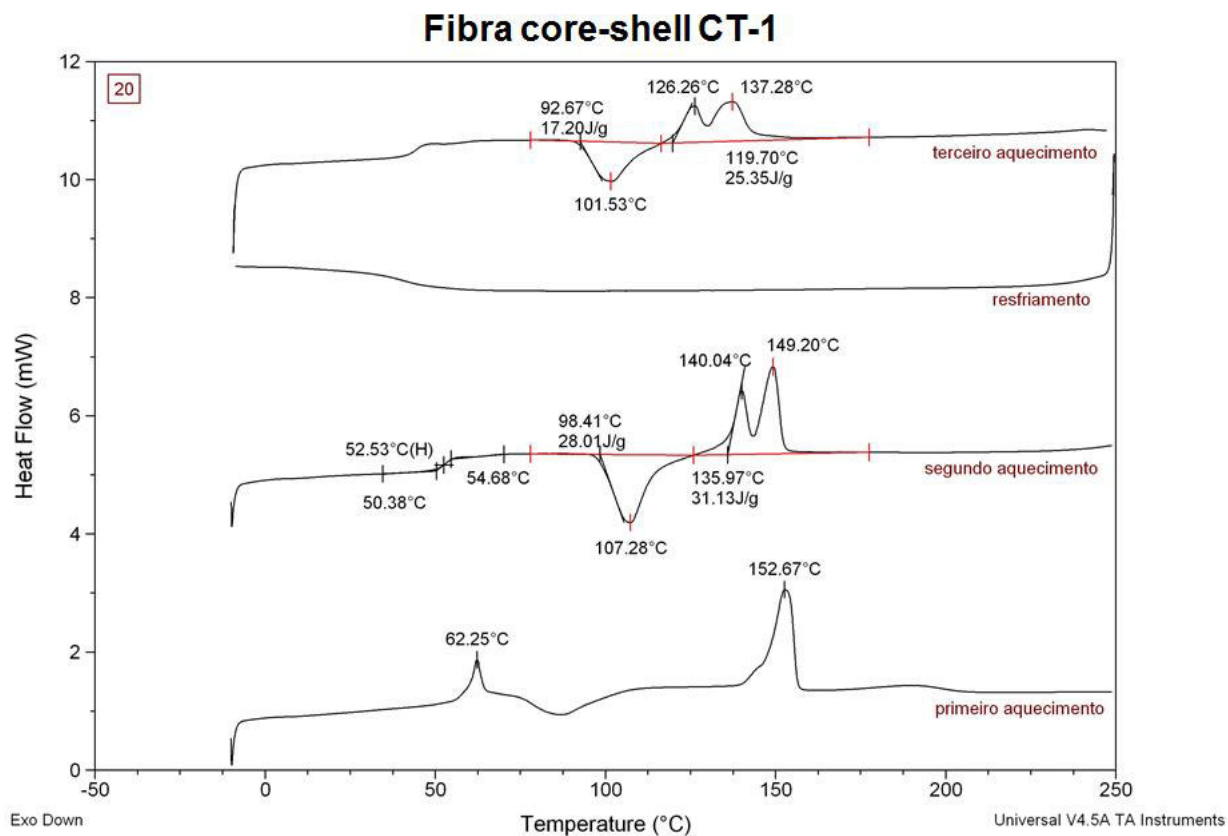
Invited Talk / [] Poster) entitled "ELECTROSPUN SCAFFOLDS PVAPLA CORE-SHELL TYPE CONTAINING BMP-2 FOR PERIODONTAL REGENERATION" of **T. N.**

Silva; P. H. S. Picciani; R. P. Gonçalves; F. Ginani; C. A. G. Barboza at the
ICNP2017Rio held at Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
from 07-09 June 2017.

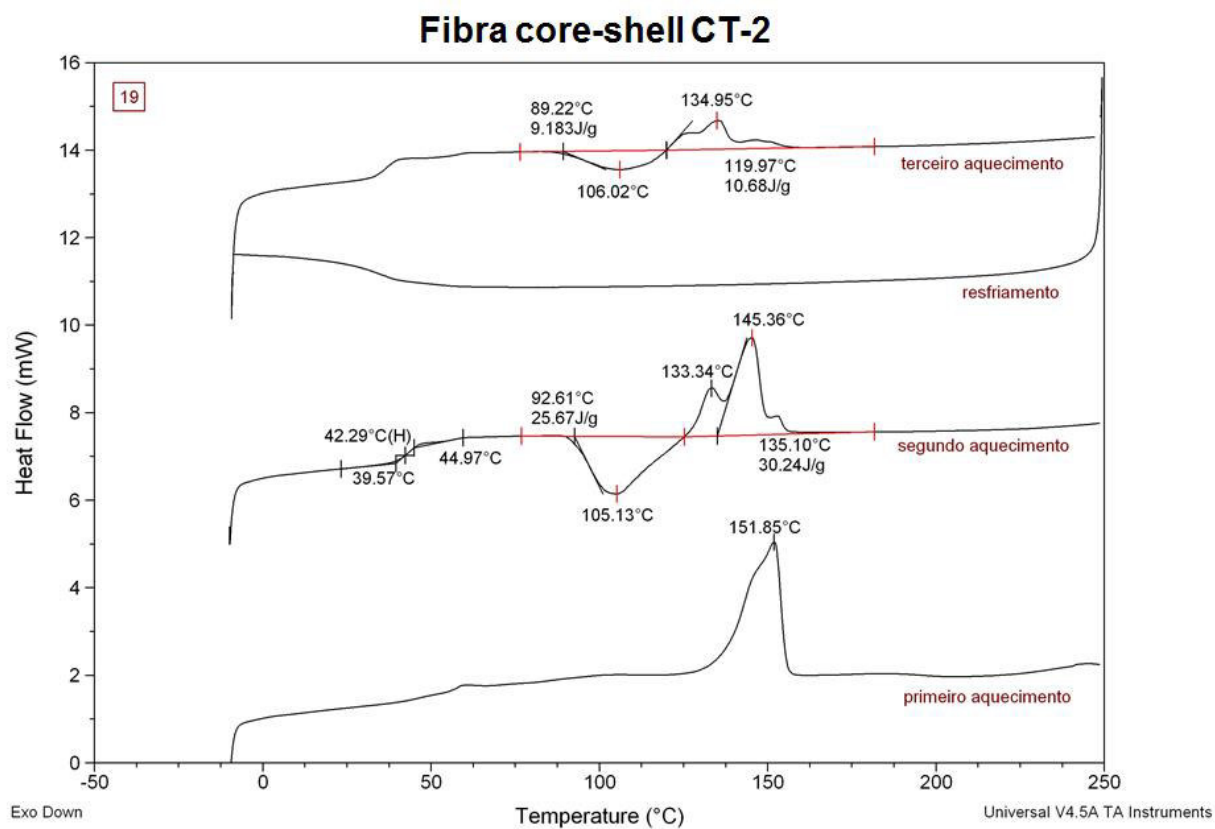
Fernando Gomes.

Prof. Dr. Fernando Gomes,
ICNP2017Rio Chairman
fgsj@ufrj.br

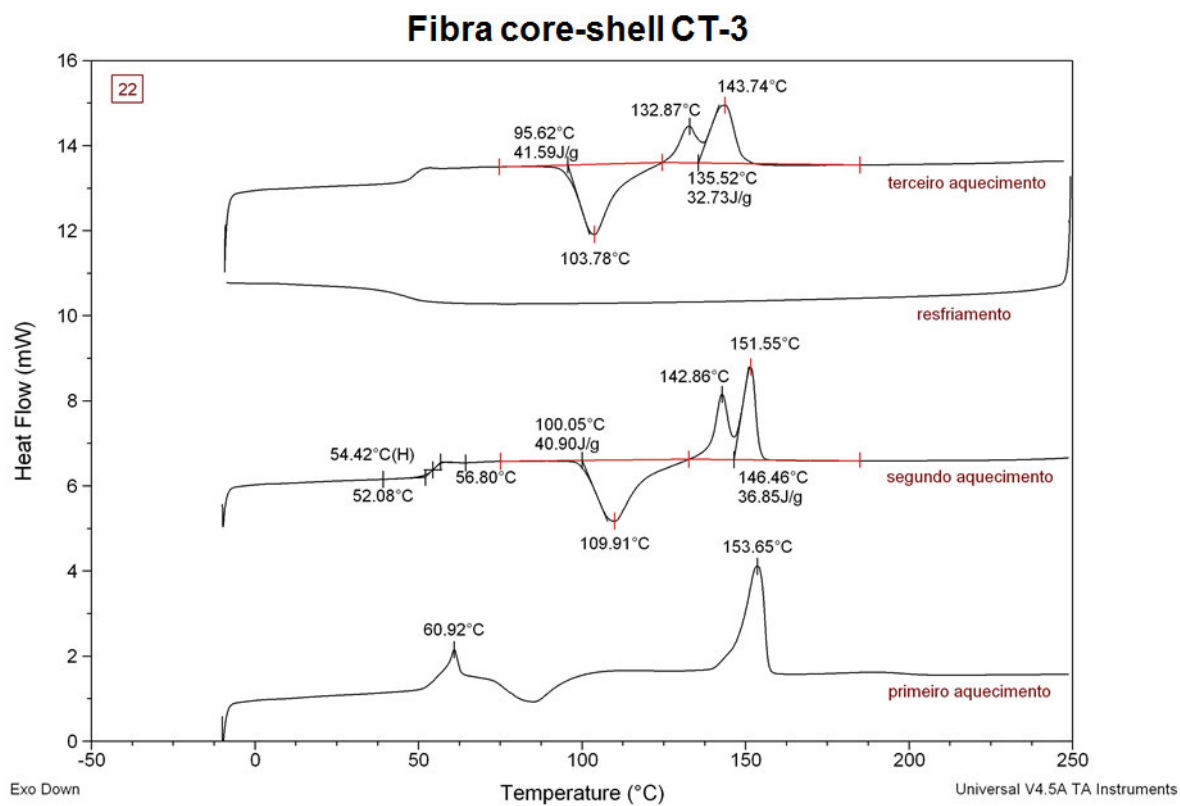
ANEXO A- REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS OBTIDAS PELA CALORIMETRIA DE EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL DA FIBRA *CORE-SHELL* CT-1



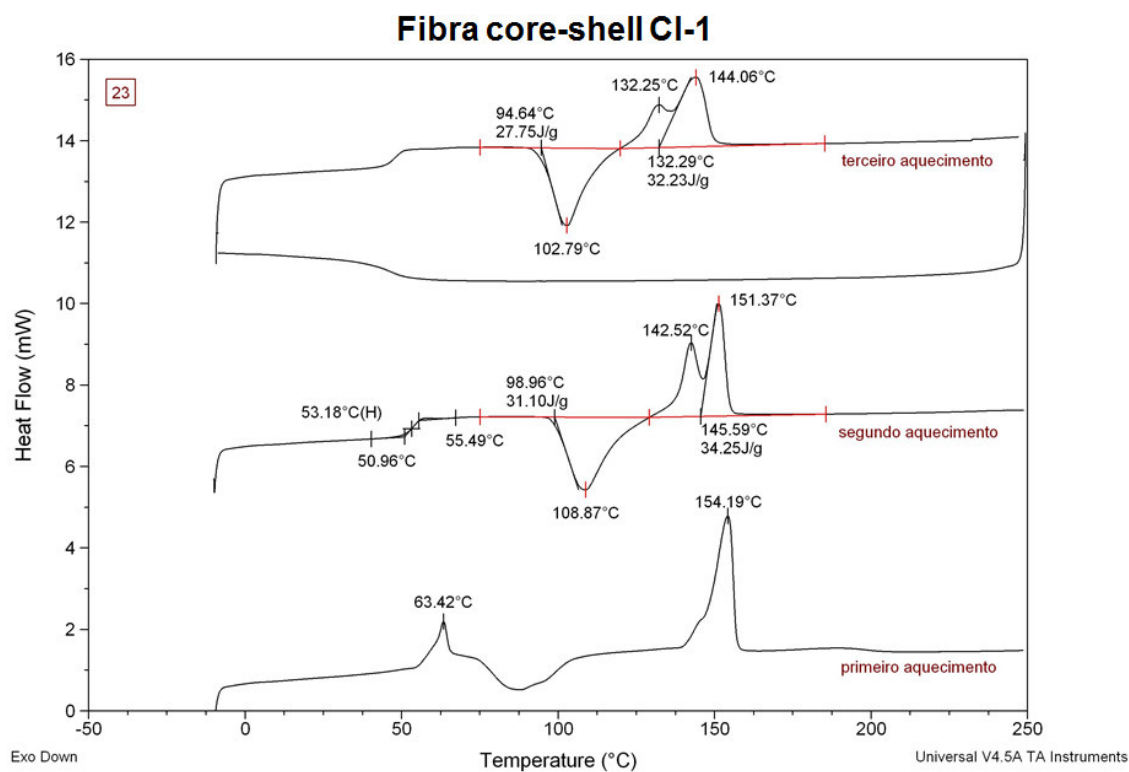
ANEXO B- REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS OBTIDAS PELA CALORIMETRIA DE EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL DA FIBRA *CORE-SHELL* CT-2



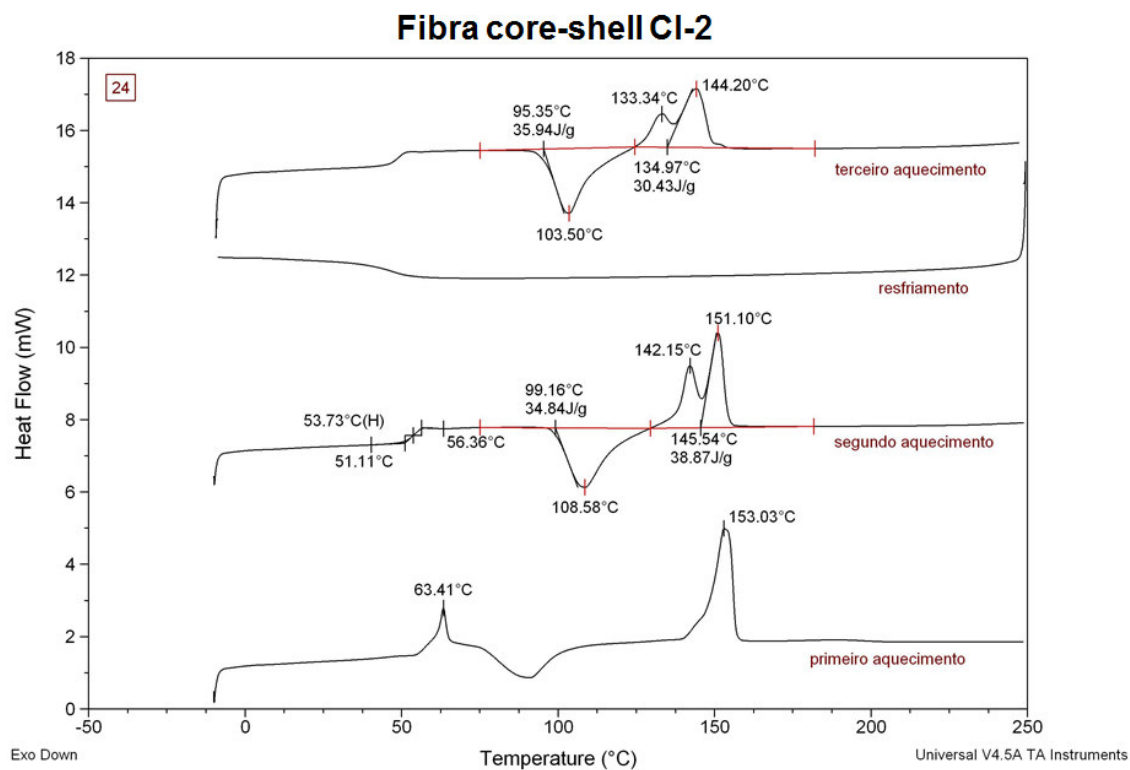
ANEXO C- REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS OBTIDAS PELA CALORIMETRIA DE EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL DA FIBRA *CORE-SHELL* CT-3



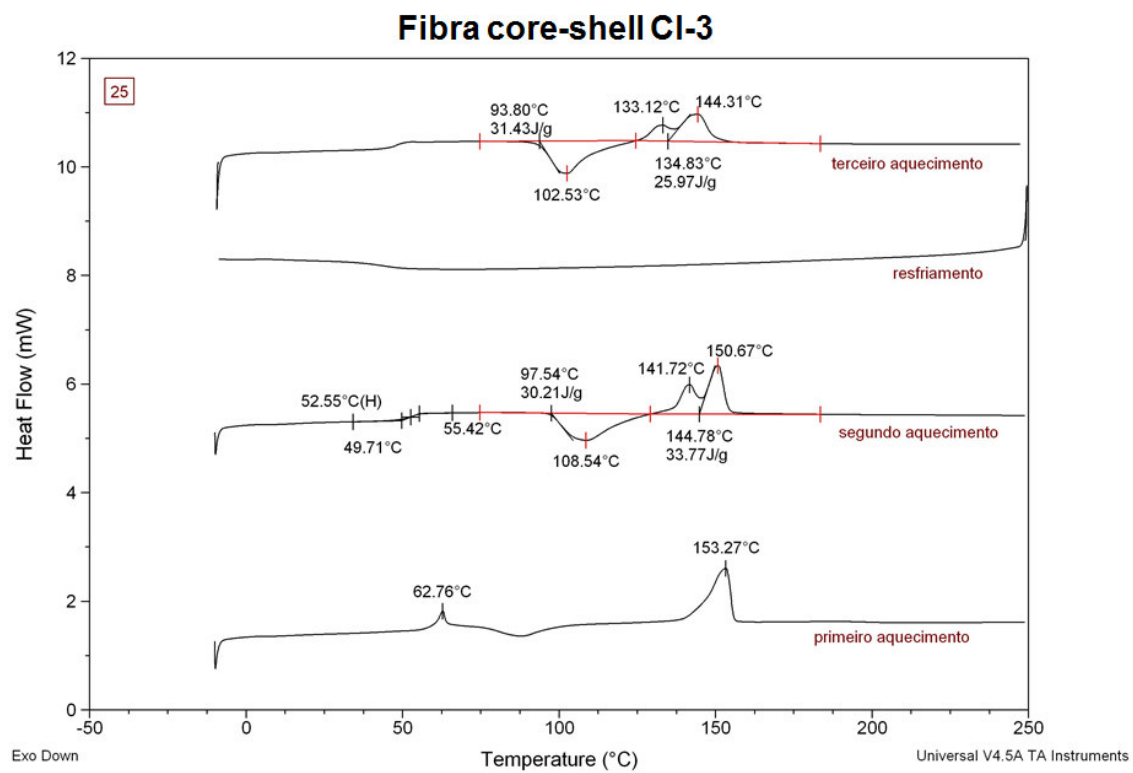
**ANEXO D- REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS OBTIDAS PELA CALORIMETRIA
DE EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL DA FIBRA *CORE-SHELL* CI-1**



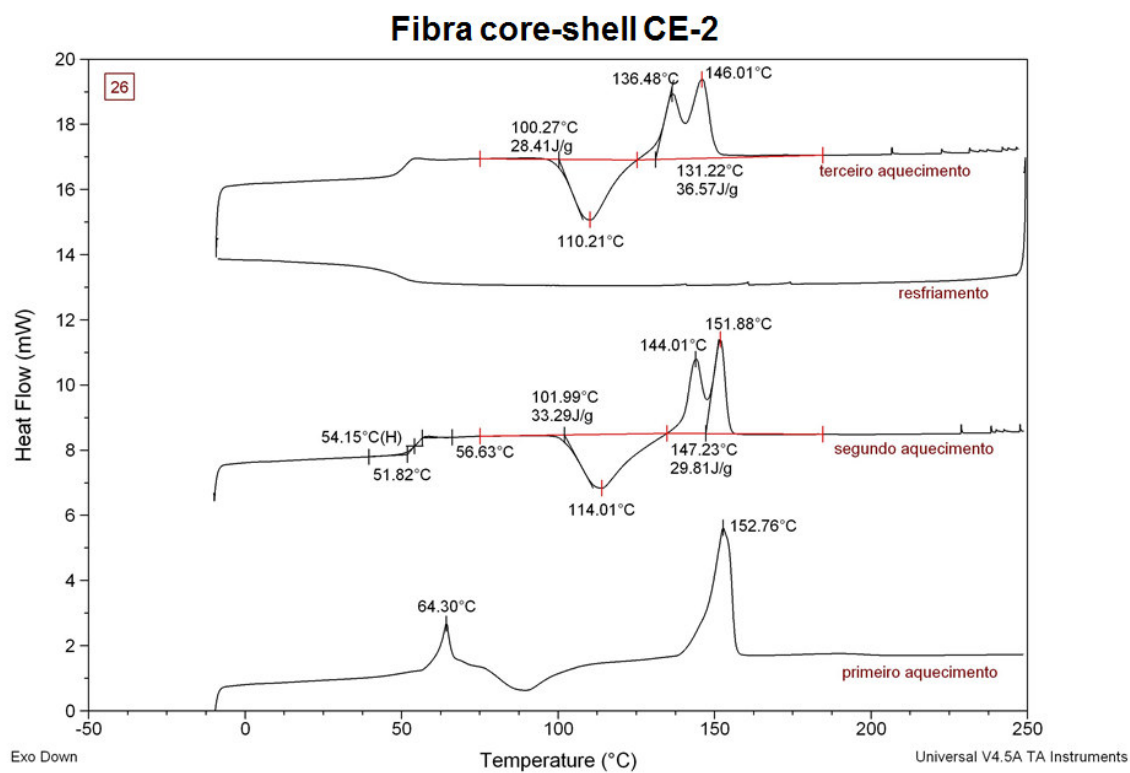
**ANEXO E- REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS OBTIDAS PELA CALORIMETRIA
DE EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL DA FIBRA *CORE-SHELL* CI-2**



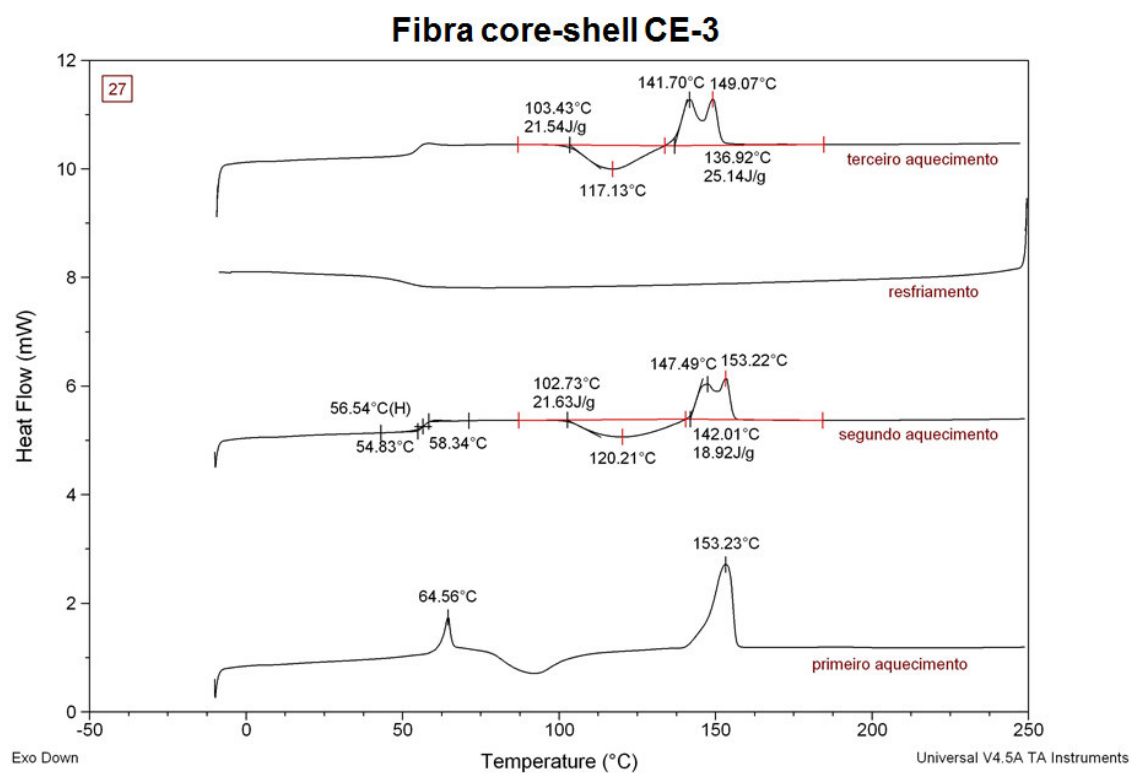
**ANEXO F- REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS OBTIDAS PELA CALORIMETRIA
DE EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL DA FIBRA *CORE-SHELL* CI-3**



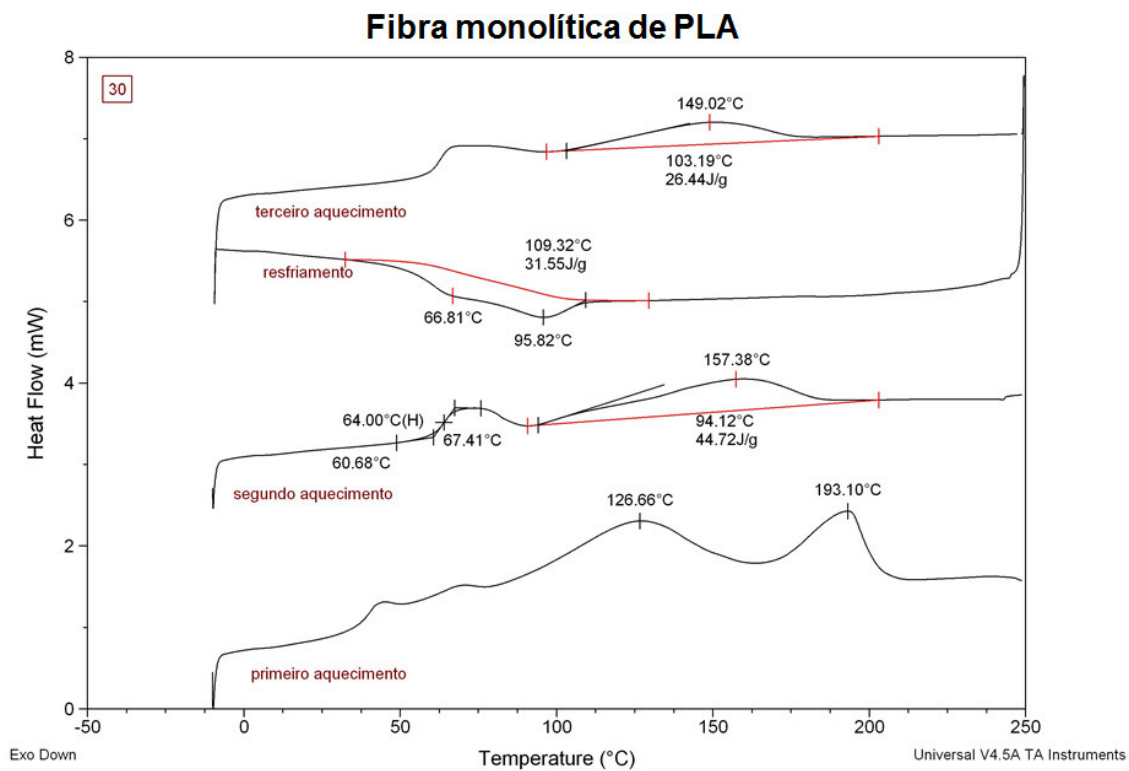
**ANEXO G- REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS OBTIDAS PELA
CALORIMETRIA DE EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL DA FIBRA CORE-SHELL
CE-2**



ANEXO H- REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS OBTIDAS PELA CALORIMETRIA DE EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL DA FIBRA *CORE-SHELL* CE-3



ANEXO I- REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS OBTIDAS PELA CALORIMETRIA DE EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL DA FIBRA MONOLÍTICA DE PLA



ANEXO J- REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS OBTIDAS PELA CALORIMETRIA DE EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL DA FIBRA MONOLÍTICA DE PVA

