

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA POR *Geraldine Nancy*
Rodriguez Perea..... E APROVADA
PELA COMISSÃO JULGADORA EM *26.07.2011*
Beulah Zanglia
ORIENTADOR

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

Geraldine Nancy Rodríguez Perea

Eletrofiação de Nanocompósito de Poli(L-Ácido Lático) com Hidroxiapatita para Regeneração Óssea

Campinas, 2011.

Geraldine Nancy Rodríguez Perea

Eletrofiação de Nanocompósito de Poli(L-Ácido Lático) com Hidroxiapatita para Regeneração Óssea

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado da Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica.

Área de Concentração: Materiais e Processo de Fabricação.

Orientador: Cecília Amélia Zavaglia de Carvalho.

Co-orientador: Marcos Akira d'Ávila.

Campinas
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

R618e Rodríguez Perea, Geraldine Nancy
 Eletrofição de nanocompósito de poli(L-ácido láctico)
 com hidroxiapatita para regeneração óssea / Geraldine
 Nancy Rodríguez Perea. --Campinas, SP: [s.n.], 2011.

 Orientadores: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia,
 Marcos Akira d'Ávila.

 Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
 Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

 1. Nanopartículas. 2. Poli (ácido láctico). 3.
 Hidroxiapatita. 4. Nanocompósitos. 5. Biomateriais. I.
 Zavaglia, Cecília Amélia de Carvalho. II. Akira d'Ávila,
 Marcos. III. Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Engenharia Mecânica. IV. Título.

Título em Inglês: Electrospinning of nanocomposites of poly (L-lactic acid) with
 hydroxyapatite for bone regeneration

Palavras-chave em Inglês: Nanoparticles, Poly (L-lactide acid), Hydroxyapatite,
 Nanocomposite, Biomaterials

Área de concentração: Materiais e Processo de Fabricação

Titulação: Mestre em Engenharia Mecânica

Banca examinadora: Carmen Gilda Barroso Tavares Dias, Maria Clara Filippini
 Ierardi

Data da defesa: 26-07-2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Mecânica

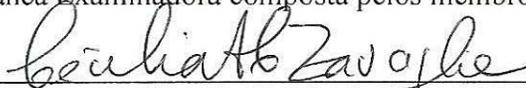
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO

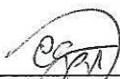
Eletrofição de Nanocompósito de Poli(L-Ácido Lático) com Hidroxiapatita para Regeneração Óssea

Autor: Geraldine Nancy Rodríguez Perea
Orientador: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia
Co-orientador: Marcos Akira d'Ávila

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:



Profa. Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, Presidente
Faculdade de Engenharia Mecânica – Universidade Estadual de Campinas



Profa. Dra. Carmen Gilda Barroso Tavares Dias
Faculdade de Engenharia Mecânica – Universidade Federal de Pará



Profa. Dra. Maria Clara Filippini Ierardi.
Faculdade de Engenharia Mecânica – Universidade Estadual de Campinas

Campinas, 26 de Julho de 2011.

Aos meus avôs, Flora Manrique e Julio Perea,
que foram, e serão sempre, o melhor exemplo de força e amor.

Agradecimentos

Quero agradecer em primeiro lugar a Deus por que cada dia é um presente dado por ele.

Expresso meus sinceros agradecimentos a minha orientadora, Profa. Dra. Cecília Carvalho, que me deu a oportunidade de desenvolver este trabalho, assim como me aconselhou, estimulou e apoiou durante esse período. Estou de igual forma agradecida ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marcos Akira, pelo apoio em cada momento do desenvolvimento desta dissertação.

Aos membros da Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas, incluindo professores, técnicos e funcionários pela disponibilidade em auxiliar-me durante todo esse período. A Faculdade de Engenharia Mecânica pela possibilidade de obter o título de mestre nesta instituição. Expresso igualmente a minha gratidão, a Profa. Eliana Duek por gentilmente ter doado parte do material utilizado neste trabalho.

Ao CNPQ pela bolsa de estudos.

Quero agradecer aos membros do grupo do Laboratório de biomateriais LABIOMEK pelas suas singulares discussões, apoio e companheirismo. Ao Leonardo, Sérgio, Erick, Danielle, Lonetá, Guinea e Rosemeire. Aos meus amigos peruanos que sempre me apoiaram, especialmente, Ana, José Luis, Omar, Richard, David e José Antonio. As minhas companheiras de república Patrícia, Letícia e Dijanira. Um especial agradecimento a todos os que direta ou indiretamente, contribuíram para o progresso do projeto.

Agradeço à minha família, tios, primos, irmãos, Nataly e Fabrizio, que acreditaram em mim. E para finalizar, um agradecimento gigante aos meus pais, Susana e Arturo, pelo amor e apoio incondicional, por nunca desistirem de me incentivar a continuar e porque é graças a eles que pude chegar até aqui.

Tal como a chuva e a neve caem do céu e para lá não voltam sem ter regado a terra, sem a ter fecundado, e feito germinar as plantas, sem dar o grão a semear e o pão a comer, assim acontece à palavra que minha boca profere: não volta sem ter produzido seu efeito, sem ter executado minha vontade e cumprido sua missão.
Isaías 55,10-11.

Resumo

Este trabalho consiste na obtenção pelo método de eletrofiação, de microfibras poliméricas e microfibras reforçadas com nanopartículas de hidroxiapatita. Este método foi utilizado, pois propicia a produção de membranas microporosas que possuem um grande potencial de aplicação na área de engenharia tecidual, especificamente em aplicações para regeneração óssea. Este trabalho teve como objetivo principal produzir fibras poliméricas com a intenção de comparar suas características com o nanocompósito de fibras poliméricas e nanopartículas de hidroxiapatita como reforço. Trabalhou-se com o poli(L-ácido lático) (PLLA) e nanopartículas de hidroxiapatita (HA) produzidas pelo processo sol-gel. As fibras e os nanocompósitos foram caracterizados pelos seguintes métodos: microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise termogravimétrica (TGA), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). As fibras obtidas apresentaram diâmetros na faixa de 1 a 10 micrômetros. O objetivo de produzir membranas a partir de soluções de PLLA e nanocompósito PLLA/HA por eletrofiação foi atingido.

Palavras Chave: Eletrofiação, poli (L-ácido lático), hidroxiapatita, nanocompósito.

Abstract

This work consists in obtaining polymeric microfibers and microfibers reinforced with nanoparticles of hydroxyapatite by the method of electrospinning. This method was used because it allows the production of microporous membranes that have great potential like application in tissue engineering, specifically in applications for bone regeneration. This work aimed to produce polymer fibers with the intention to compare their characteristics with the nanocomposite fibers with hydroxyapatite nanoparticles as reinforcement. The polymer used was poly (L-lactic acid) (PLLA) and nanoparticles of hydroxyapatite (HA) produced by the sol-gel process. The fibers and nanocomposites were characterized by the following methods: scanning electron microscopy (SEM), thermogravimetric analysis (TGA), differential scanning calorimetry (DSC), spectroscopy in the region of Fourier transform infrared (FTIR). The fibers obtained presented diameters in the range 1 to 10 micrometers. The goal of producing membranes from solutions of PLLA and nanocomposite PLLA / HA by electrospinning was reached.

Key words: Electrospinning poly (L-lactic acid), hydroxyapatite, nanocomposite.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Estereoisômeros do ácido lático.....	9
Figura 2 Estructura química do Poli(ácido L-lático), PLLA.....	9
Figura 3. Esquema de um equipamento de eletrofição. (A) seringa esta preenchida da solução polimérica, (B) agulha metálica, (C) fonte de alta voltagem, (D) produção de jato fino de material polimérico, (E) é evaporado o solvente da solução, resultando em fibras finas que são coletadas em um alvo terra.	11
Figura 4. Fluxograma da síntese de hidroxiapatita utilizando o método sol-gel com sacarose. ...	16
Figura 5. Fluxogramas representando os estágios da preparação de três soluções poliméricas....	18
Figura 6. Fluxogramas representando os estágios da preparação das três segundas soluções poliméricas.	18
Figura 7. Fluxogramas representando os estágios da preparação das três segundas soluções poliméricas.	19
Figura 8 Sistema de Eletrofição. A) Seringa preenchida da solução polimérica com agulha metálica carregada electricamente, B) Fonte de alta tensão (30 kV-Testtech), C) Bomba de infusão (KD-100,Scientific), D) Alvo onde é depositado o filme feito com as fibras.	20
Figura 9. (a) Difratoograma de raios-X da hidroxiapatita padrão, e (b) Difratoograma de raios-X das nanopartículas de hidroxiapatita, calcinada a 700°C por 4h. RODRIGUES, L.R.	25
Figura 10 Nanopartículas de hidroxiapatita, calcinadas a 700°C por 4h. RODRIGUES, L. R. ...	27
Figura 11. (a) Microfibras da solução A (PLLA dissolvidas em solução de clorofórmio), (b) microfibras da solução B (PLLA dissolvidas em solução de clorofórmio e acetona) e (c) nanocompósito da solução C (PLLA/HA dissolvidas em solução de clorofórmio e acetona).....	28
Figura 12. (a) Microfibras da solução B1 (PLLA 15%), (b) microfibras da solução B2 (PLLA 20%) e (C) microfibras da solução B3 (PLLA 25%).	29
Figura 13. (a) Nanocompósito da solução C1 (PLLA/HA 1.96%), (b) nanocompósito da solução C2 (PLLA/HA 4.76%), e (C) nanocompósito da solução C3 (PLLA/HA 9%).	30
Figura 14. TGA do compósito de PLLA/ HA e PLLA eletrofiado.	31
Figura 15. Curvas de DSC do segundo ciclo de aquecimento para as amostras de PLLA puro, PLLA e PLLA/HA.	33
Figura 16 Espectroscopias do infravermelho das amostras de PLLA grão, HA particula, PLLA eletrofiado e nanocomposito de PLLA/HA eletrofiado.....	34

Lista de Tabelas

Tabela 1. Parâmetros utilizados no processo de eletrofição.	21
Tabela 2. Impurezas presentes nas nanopartículas da HA.....	26

Lista de Abreviaturas e Siglas

Abreviações

- Tg** - Temperatura de transição vítrea
- Tm** - Temperatura de fusão
- PLLA** - Poli(L-ácido láctico)
- PLA** - Poli (ácido láctico)
- HA** - Hidroxiapatita
- PMMA** - Polimetilmetacrilato
- TCP** - Fosfato tricálcico
- MEV** - Microscópio Eletrônica de Varredura;
- TGA** - Análise Termogravimétrica
- DSC** - Calorimetria exploratória diferencial
- FTIR** - Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos.....	3
2.1 Biomateriais.....	4
2.2 Engenharia tecidual	5
2.3 Suporte celular ou Scaffolds.....	6
2.4 Nanotecnologia.....	8
2.5 Poli(L-ácido lático) PLLA.....	9
2.6 Hidroxiapatita (HA).....	10
2.7 Processo de eletrofiação	10
3.1 Materiais	15
3.2 Processo sol-gel com sacarose.....	15
3.3 Preparação das soluções	17
3.4 Sistema de Eletrofiação	20
3.4.1. Parâmetros	20
3.5 Caracterizações.....	21
3.5.1 Difração de raios X.....	21
3.5.2. Equação de Scherrer	21
3.5.3 Fluorescência de raios X.....	22
3.5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	23
3.5.5 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (SEM-FEG).....	23
3.5.6 Análise termogravimétrica	23
3.5.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	23
3.5.8 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	25
4.1 Caracterizações da Hidroxiapatita.....	25
4.2 Eletrofiação de PLLA e nanocompósito de PLLA/HA	27
4.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	27
4.2.2 Análise Termogravimétrico.....	31
4.2.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	32
4.2.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	33
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS	35
Referências	37

1 INTRODUÇÃO

Fibras nanoestruturadas são fibras que possuem em sua estrutura componentes na ordem nanométrica, que por definição são as estruturas com formação de elementos de até 100nm. Neste trabalho, foram preparadas fibras poliméricas nanoestruturadas onde a matriz polimérica é composta de poli(L-ácido láctico) e as nanopartículas cerâmicas são constituídas de hidroxiapatita. Esses materiais possuem grande potencial de aplicações em diferentes áreas tecnológicas como em sensores, sistemas de filtração e, principalmente, em engenharia tecidual e liberação controlada de fármacos (DZNEIS – 2004), (ANDRADY – 2008).

O crescente interesse na produção de fibras nanoestruturadas deve-se, principalmente, ao desenvolvimento do processo de eletrofiação (ou *electrospinning*). Este processo consiste em forçar um fluido polimérico em solução ou fundido através de um capilar, onde uma voltagem da ordem de 10 a 30 kV é aplicada entre a saída do capilar e o sistema coletor, que estão separados a uma distância de 5 a 15 cm. A tensão eletrostática imposta na superfície da gota polimérica na saída do capilar supera a tensão superficial desta, acarretando no estiramento do polímero e, conseqüentemente, na formação de fibras de diâmetros de dimensões nanométricas. No entanto, a formação dessas fibras ocorre somente em condições específicas que dependem das condições de processamento e das propriedades físicas do fluido polimérico (THERON *et. al.* – 2004), (RAMAKRISHNA – 2005), (ANDRADY – 2008).

Durante o estiramento do jato polimérico, são observadas duas regiões distintas de escoamento: i) região de jato estável e ii) região de jato instável (RUTLEDGE *et. al.* – 2007).

i) Esta região ocorre desde a saída do capilar até uma determinada distância deste e caracteriza-se pela formação de um jato estável, que estira o polímero devido às tensões exercidas no material pelo campo elétrico (FENG – 2002), (FENG – 2003).

ii) Esta região caracteriza-se pela ocorrência de uma instabilidade de escoamento caracterizado por um movimento caótico do fio, similar a um movimento de “chicoteamento”, conhecida como instabilidade do tipo “*whipping*” (HOHMAN *et. al.* – 2001), (YARIN *et. al.* – 2001).

No caso da eletrofiação de soluções poliméricas pode-se dizer que as propriedades do solvente, a estrutura química dos polímeros e a concentração da solução. Deve-se também levar

em consideração que os fluidos poliméricos são não-Newtonianos e viscoelásticos, o que aumenta a complexidade do escoamento durante o processo, onde as propriedades viscoelásticas podem ser significativas. No caso de polímeros semicristalinos, a formação de domínios cristalinos durante a evaporação do solvente pode afetar as propriedades mecânicas, térmicas, elétricas e o diâmetro final da fibra (ANDRADY – 2008). Assim, há diversas variáveis que afetam o escoamento do fluido durante o processo de fiação e, conseqüentemente, as propriedades finais da fibra. As principais variáveis de processamento são: vazão do fluido polimérico na saída do capilar, diâmetro do capilar, voltagem aplicada e a distância entre a saída do capilar e o sistema de coleta. Quanto ao material, os principais parâmetros são: condutividade elétrica, tensão superficial e propriedades reológicas, tais como a viscosidade e o tempo de relaxação.

A eletrofiação de polímeros biocompatíveis e reabsorvíveis é considerada promissora para aplicações em engenharia tecidual (*tissue engineering*), pois, devido à capacidade de formar estruturas porosas nas escalas micro e nanométricas, faz com que as fibras adquiram características únicas para serem aplicadas como *scaffolds* em implantes biocompatíveis e em tecnologias de liberação controlada de fármacos (CHUA *et. al.* – 2006), (XU *et. al.* – 2006).

1.1 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi obter por eletrofição e caracterizar membranas constituídas de fibras de poli(L-ácido lático) (PLLA) e nanocompósitos de PLLA com nanopartículas de hidroxiapatita (HA) visando aplicações como *scaffolds* em engenharia tecidual.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Determinar os parâmetros ótimos do processo de eletrofição para o sistema estudado.
- Avaliar a influência dos solventes utilizados na preparação da solução polimérica nas características das fibras obtidas.
- Avaliar a influência das nanopartículas de HA na morfologia das membranas com a utilização do MEV.
- Avaliar a influência da HA nas propriedades térmicas dos sistemas estudados.
- Avaliar a presença das nanopartículas nas fibras por análise termogravimétrica.
- Avaliar o efeito do processo de eletrofição na estrutura e conformação molecular utilizando FTIR.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomateriais

Não existe um consenso sobre a definição de um biomaterial, diferentes definições foram propostas no transcurso dos anos. Na década dos 70, conceituou-se biomaterial como uma substância inerte desenhada para incorporação ou implantação dentro de um tecido vivo (6° Annual International Convention in Biomaterials - 1974). Posteriormente, afirmou-se que um biomaterial é considerado qualquer material inerte farmacologicamente, viável ou não viável, natural ou sintético, que faz parte ou é capaz de interagir de forma benéfica com um organismo vivo.

Segundo Williams (1976) biomaterial é qualquer material não vivo usado em dispositivos médicos com a intenção de interagir com sistemas biológicos (WILLIAMS – 1976). Já em 1987, Williams reformulou sua própria definição estabelecendo que biomaterial é qualquer substância ou combinação de substâncias que não são consideradas drogas ou fármacos e nem alimentos, utilizados para tratamento por tempo indeterminado como parte ou como um todo de sistemas que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo os quais estão em contato com os fluidos biológicos e com os tecidos (WILLIAMS – 1987). Podem ser substâncias de origem sintética (inorgânica) ou natural (orgânica).

A biocompatibilidade e funcionabilidade são as principais características que o biomaterial deve ter para desempenhar as funções para o qual foi projetado. Biocompatibilidade é um termo que vem sendo usado há muitos anos, e pode ser definido como a habilidade de um material ter um desempenho satisfatório, com resposta adequada do tecido hospedeiro, para uma dada aplicação e esta relacionada com as características mecânicas do material (WILLIAMS – 1987). O conceito de biofuncionalidade é relativamente recente, definido como a capacidade que têm o material para desempenhar apropriadamente a função para o qual foi projetado, pelo tempo necessário, que pode ser longo nos casos de implantes permanentes, ou curto no caso de implantes temporários.

Segundo Hench (1993), os biomateriais podem ser classificados de acordo com o seu comportamento fisiológico em: biotoleráveis, bioinertes, bioativos e bioreabsorvíveis (HENCH - 1993).

Os biomateriais biotoleráveis são materiais moderadamente tolerados pelo tecido receptor, sendo geralmente isolados dos tecidos adjacentes através de uma camada fibrosa. Quanto maior a espessura da camada de tecido fibroso, menor é a tolerância dos tecidos naturais ao material. Os materiais biotoleráveis mais conhecidos são os polímeros sintéticos e uma minoria dos metais. Como exemplos destaca-se o aço inoxidável as ligas Cr-Co e o polimetilmetacrilato (PMMA).

Os biomateriais bioinertes são materiais tolerados pelo organismo, estão em contato direto com o tecido receptor e a formação da camada fibrosa é mínima. Como exemplos têm-se a alumina a zircônia o titânio e suas ligas e materiais carbonosos.

Os biomateriais bioativos são materiais que em sua superfície ocorrem ligações químicas com o tecido ósseo, fato conhecido como osteointegração. Exemplos desses biomateriais são os biovidros a base de fosfato de cálcio e a hidroxiapatita (HA).

Os biomateriais reabsorvíveis ou bioreabsorvíveis são materiais que atuam por um determinado período junto aos tecidos biológicos, e depois são gradualmente substituídos pelo tecido receptor (degradados) e solubilizado ou absorvido pelo organismo sem necessidade de uma intervenção cirúrgica. Como exemplos têm-se o fosfato tricálcico (TCP) e poli (ácido láctico) (PLA).

2.2 Engenharia tecidual

Foi com a cirurgia inovadora que surge a intenção de procurar novos materiais para reconstruir uma parte do corpo a partir dos tecidos próprios do paciente. O que antes era chamado de cirurgia reconstrutiva veio a ser chamado de engenharia tecidual, quando o foco da atenção tornou-se a fabricação de peças de reposição ao longo da vida para o corpo em laboratório. A tecnologia representa uma mudança dramática para o uso dos componentes biológicos de tecidos substitutos reais para reconstruir (LANGER – 1993).

Segundo Oréfice (2006) a engenharia tecidual pode ser definida como “a aplicação dos princípios e métodos da engenharia e ciências da vida visando o entendimento fundamental das correlações envolvendo estrutura e função em tecidos de mamíferos normais ou patologicamente afetados e desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar as funções tissulares” (ORÉFICE, 2006).

2.3 Suporte celular ou Scaffolds

Os *scaffolds*, na engenharia tecidual, são destinados a ser colonizados por células e devem fornecer condições químicas e físicas necessárias para garantir o crescimento adequado do tecido. Para serem adequadamente aplicados, os *scaffolds* devem cumprir uma série de requisitos (WILLIAMS - 1986):

- Deve ter uma estrutura microscópica e macroscópica reprodutível com uma alta proporção de superfície/volume adequado para adesão celular.
- O material feito deve ser biocompatível. Os *scaffolds* devem desempenhar sua função com uma resposta adequada do hospedeiro e não devem levar às respostas negativas (GRIFFITH – 2002).
- Devem ter uma porosidade adequada, incluindo a magnitude da porosidade, distribuição de tamanho dos poros e interconectividade. Isso permitirá o crescimento celular e vascularização além de promover o transporte metabólico.
- Devem dispor de propriedades mecânicas e de apoio para resistir às forças fisiológicas no local de implantação e flexibilidade semelhante para os tecidos circundantes. Idealmente, deve suportar a carga mecânica sobre o tecido lesado enquanto se regenera.
- O material deve ser biodegradável. Produtos de degradação não devem ser tóxicos e deve ser facilmente removidos do local de implantação do corpo.
- A taxa de degradação dos deve ser ajustada para corresponder ao tipo de regeneração dos tecidos, de modo que desapareça completamente uma vez que o tecido seja reparado.

A forma e a composição dos *scaffolds* determinam a capacidade das células penetrarem em sua estrutura. O tamanho, a interconectividade e a superfície das paredes dos poros ajudam durante o processo de proliferação e diferenciação celular, assim como o fornecimento de nutrientes e eliminação de resíduos. Em um nível microscópico, a textura da superfície e porosidade do material, afetarão a adsorção de proteínas locais e adesão celular (WAKE *et al* – 1994). Assim, uma caracterização adequada em cada nível da forma do *scaffold* é fundamental para entender seu comportamento como suporte na engenharia de tecido.

A porosidade ideal, a interconectividade dos poros e as propriedades mecânicas do *scaffold* para engenharia tecidual ainda não foram determinadas. Estes requisitos variam dependendo do tipo de célula, local de implantação e as condições de cultivo celular

(THOMSON *et al.* – 1998). A maioria dos *scaffolds* poliméricos utilizados para aplicações em engenharia tecidual músculo-esquelético apresentam variação na porosidade entre 30% a 98%, e o módulo de Young entre 100 KPa a 100 MPa (SLIRKA *et al.* – 2001), (LIU *et al.* – 2004).

Muitos métodos de fabricação foram desenvolvidos para atingir esses requisitos. Alguns são: vazamento de solvente e lixiviação de partículas, separação de fase termicamente induzida, gás espuma, ligação fibra, e impressão tridimensional (NAVARRO *et al.* – 2006), (HUTMACHER *et al.* -2000).

A separação de fase termicamente induzida foi aplicada pela primeira vez ao PLA por Schugens e diversos autores têm aplicado esta técnica para compósitos (SCHUNGENS *et al.* – 1996), (ROETHER *et al.* – 2002), (ZHANG e MA – 1999). Esta técnica consiste em induzir uma separação de fases sólido-líquido ou líquido-líquido, que é feito através da dissolução do polímero em um solvente refrigerado, sendo necessário utilizar a solução em uma determinada temperatura. O resfriamento induz a uma separação de fases: uma rica em polímero e uma pobre em polímero. O solvente deve ser removido da fase da solução separada, quer por liofilização ou por meio de solventes. A principal vantagem do método de separação de fases é que a morfologia dos poros e orientação pode ser ajustada alterando os parâmetros termodinâmicos e cinéticos da transformação. Suas desvantagens incluem o uso de solventes tóxicos e potencialmente um alto grau de anisotropia da porosidade. Na verdade, pode ser benéfico para certas aplicações biomédicas e industriais, tais como a regeneração nervosa, filtração por membranas, mecânico de materiais de amortecimento, embalagem, entre outros (MA e ZHANG – 2001), (BOCCACCINI *et al.* – 2003).

No processo de fabricação de espuma altamente porosa é utilizado um gás. O processo consiste em saturar a mistura de polímeros com o gás a altas temperaturas e pressões não sendo necessário a utilização de solventes orgânicos (MOONEY *et al.* – 1996), (DI *et al.* – 2005). Solventes orgânicos normalmente deixam resíduos que podem provocar efeitos tóxicos *in vitro* e ocasionar inflamação *in vivo*. Então, a instabilidade termodinâmica é criada pela rápida diminuição da temperatura e da pressão que estimula a nucleação e crescimento do gás nos poros do polímero. A espuma tem alta porosidade (até 93%), podendo no processo variar alguns parâmetros como: a temperatura, a taxa de pressão, entre outros, gerando mudanças no tamanho dos poros. A principal desvantagem é a pequena interconectividade dos poros, pelo fato de que a superfície em geral é não-porosa.

O método de ligação de fibra foi desenvolvido por Cima, que produz *scaffolds* feitos de ácido poliglicólico (PGA) (MIKOS et. al. - 1993). Segundo Mikos a estabilidade estrutural dos suportes foi melhorada, utilizando uma técnica de ligação de fibra, em que as fibras de PGA são unidas em seus pontos de intersecção e se "aglomeram" quando a temperatura está acima do seu ponto de fusão. A principal vantagem da técnica de colagem de fibra é que a área de superfície é muito alta. A proporção de volume a torna ideal para aplicações em engenharia de tecidos. (CHEAH et. al. - 2004).

A técnica de prototipagem rápida permite a produção de *scaffolds* com formas complexas através de programas CAD, o que é realmente um dos principais desafios das técnicas convencionais de produção de *scaffolds*. Sua principal vantagem é a capacidade de criar formas complexas tridimensionais e assegurar interconectividade dos poros. Nestas técnicas, a fabricação é feita camada por camada, até a completa formação do *scaffold*. Uma das técnicas de prototipagem rápida mais tradicional, e provavelmente a mais antiga, é a impressão 3D. Neste caso, os protótipos são construídos sobre uma plataforma situada num recipiente preenchido com pó a base de gesso ou amido. Um cabeçote de impressão por jato de tinta imprime seletivamente um líquido aglomerante que liga o pó nas áreas desejadas. O pó que continua solto permanece na plataforma para dar suporte ao protótipo que vai sendo formado. A plataforma é ligeiramente abaixada, adiciona-se uma nova camada de pó e o processo é repetido até que a peça tridimensional esteja finalizada.

2.4 Nanotecnologia

O termo "nano" utilizado nos dias de hoje refere-se a quantidades físicas dentro da escala de um bilionésimo de a unidade de referência, como nanômetro, nanossegundo, nanograma e nanofarad para descrever um bilionésimo de um metro (comprimento), segundo (tempo), grama (peso) e farad (carga), respectivamente. Assim, a nanotecnologia se refere à ciência e engenharia relativa aos materiais, estruturas e dispositivos quais pelo menos uma das dimensões é da ordem de 100 nm ou menos. Este termo também se refere a uma tecnologia de fabricação em que os objetos são projetados e construídos pela especificação e colocação de átomos ou moléculas individuais, onde pelo menos uma dimensão está em uma escala de nanométrica (RAMAKRISHNA - 2005).

2.5 Poli(L-ácido láctico) PLLA

O PLA pode existir como dois estereoisômeros, designados como D e L, ou como uma mistura racêmica, designado como DL. Na Fig 1.se mostram as formas D e L, que são opticamente ativas enquanto a forma DL é opticamente inativo. Poli(ácido L-láctico), PLLA, poli(ácido D-láctico), PDLA, e poli(ácido D,L-Láctico), PDLLA, são obtidos, respectivamente, a partir de ácido L-láctico, ácido D-láctico e uma mistura racêmica de L-e ácido D-láctico (URAYAMA *et. al.* - 2001).

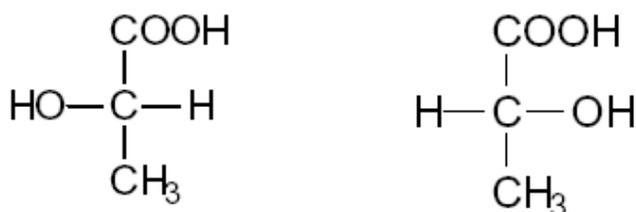


Figura 1. Estereoisômeros do ácido láctico

O PLA tem uma temperatura de transição vítrea (Tg) de cerca de 60 °C e temperatura de fusão (Tm) no intervalo de 130-180° C. A Tg e a Tm dependem da composição óptica, a história térmica e peso molecular. Embora PDLLA seja um polímero amorfo, o PLLA e PDLA são polímeros semicristalinos, apresentando uma temperatura de fusão (Tm) em torno de 180 °C (URAYAMA *et. al.* - 2001) . O PLLA, representado na Fig 2. é também superior a outros poliésteres biodegradáveis em termos de propriedades mecânicas, térmicas e apresenta em comparação aos demais polímeros da família PLA, maior resistência à tração e menor alongamento (URAYAMA *et. al.* - 2001).

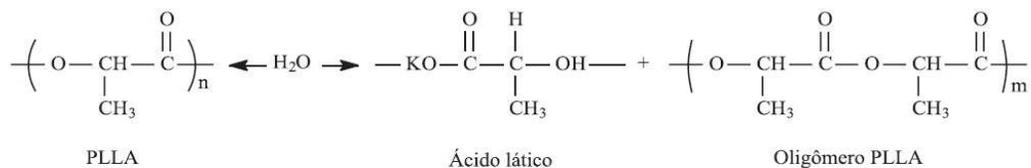


Figura 2 Estructura química do Poli(ácido L-láctico), PLLA.

2.6 Hidroxiapatita (HA)

A HA é uma cerâmica bioativa com fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e é fabricada para uso clínico na forma de blocos ou grânulos, porosa ou densa. Pesquisadores criticam a implantação do tipo denso, pela impossibilidade de promover crescimento ósseo para seu interior e, na forma de blocos, devido à dificuldade de ser modelada e pela fragilidade quando submetida à carga mecânica. Grânulos porosos são estudados, por ser bem tolerados pelo tecido ósseo, além de facilitar a infiltração de osteoblastos e proliferação de vasos sanguíneos essenciais ao processo regenerativo. A hidroxiapatita em forma de grânulos facilita a adaptação ao contorno dos defeitos ósseos, é quimicamente estável, não tem restrição quanto à quantidade disponível e não está sujeita à rejeição imunológica.

A HA tem sido utilizada para procedimentos clínicos por mais de 25 anos (WHITE *et. al.* – 2007). Entretanto, sua baixa resistência mecânica quando comparada com o tecido ósseo, tem levado os pesquisadores a procurar novas alternativas, surgindo assim novas possibilidades para sínteses de HA nanoestruturada.

O mecanismo de união da HA ao tecido ósseo é muito diferente do que apresentam os vidros ou as vitrocerâmicas bioativas (DUCHEYNE *et. al.* – 1992).

2.7 Processo de eletrofição

Este processo foi patenteado por Formhals em 1934, intitulada “*Process and apparatus for preparing artificial threads*” onde foi construída uma instalação experimental para a produção de filamentos de polímero usando a força eletrostática. (NANDANA e SUBHAS – 2010).

O processo de eletrofição ou *electrospinning* utiliza um campo elétrico de alta intensidade para controlar a formação e deposição de fibras de polímero em um substrato. Membranas e corpos cilíndricos podem ser fabricados com essa técnica (FORMHALS – 1934).

A eletrofição é uma técnica simples e versátil técnica para produzir fibras de diâmetro nanométrico a partir de uma solução polimérica (IGNOTOVA *et. al.* – 2009). A solução flui através de um capilar e, sob a influência da tensão superficial, forma-se uma gota na ponta do

capilar. Se uma tensão elétrica elevada (10-30 kV) é aplicada à solução, cargas elétricas são acumuladas na gota. Quando a força de repulsão eletrostática entre as cargas se sobrepõe à tensão superficial e às forças viscosas da gota, esta adquire a forma de um cone. Se a força exercida pelo campo elétrico, formado entre a gota e um anteparo aterrado, superar a tensão superficial da gota, um fino jato é formado. O jato gerado a partir da ponta do capilar é acelerado em direção ao coletor sob a ação do campo, provocando um grande estiramento do polímero e a rápida evaporação do solvente. No coletor é formada uma manta constituída por uma rede de fibras ultrafinas aleatoriamente orientadas. A descrição detalhada do processo de eletrofiação pode ser encontrada nos trabalhos desenvolvidos por (LI, XIA e WANG – 2004), e no artigo de revisão de Reneker (RENEKER e YARIN – 2008). A manipulação apropriada das variáveis envolvidas no processo (tensão, distância agulha-coletor, viscosidade da solução, tipo de solvente, forma e movimento do anteparo, etc.), permite o controle da espessura, homogeneidade e orientação das fibras. A Fig 3. Mostra um esquema de um sistema de eletrofiação.

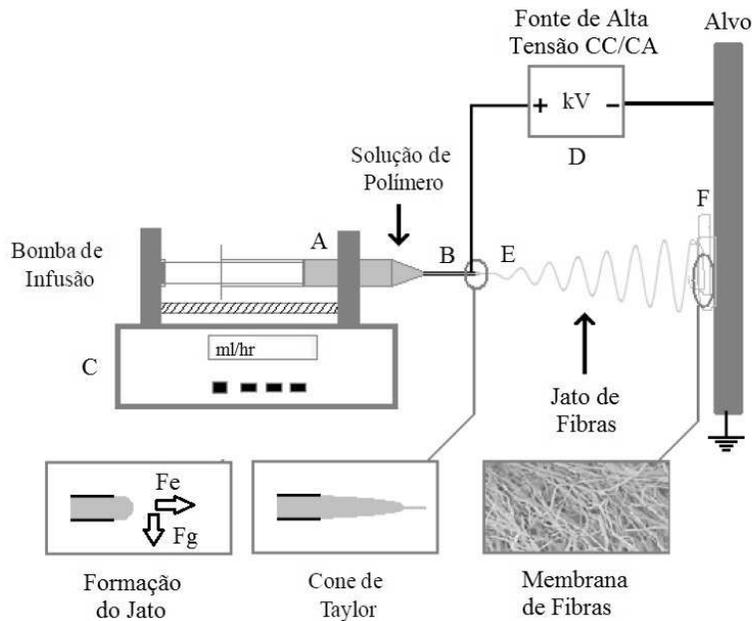


Figura 3. Esquema de um equipamento de eletrofiação. (A) seringa esta preenchida da solução polimérica, (B) agulha metálica, (C) fonte de infusão, (D) fonte de alta voltagem, (E) produção de jato fino de material polimérico, (F) é evaporado o solvente da solução, resultando em fibras finas que são coletadas em um alvo terra.

As desvantagens do processo são: (i) baixa taxa de deposição das fibras, (ii) dificuldade de produção de fibras com diâmetros controlados e consistentes, e (iii) produção isenta de defeitos inerentes ao controle dos parâmetros do processo e complexidade dos fenômenos

fluidodinâmicos envolvidos. Em função destes pontos é importante a investigação deste método para a correta identificação dos fatores e variáveis que permitam determinar o conjunto ideal de parâmetros para a aplicação do processo para um dado sistema polimérico.

2.7.1 Parâmetros

A qualidade da deposição resultante da eletrofição depende dos parâmetros que afetam o processo. Podem-se considerar três tipos de parâmetros (BHARDWAJ e KUNDU – 2010), (WANG *et. al.* – 2010):

- Parâmetros do processo - tensão aplicada, vazão da solução e distância entre a agulha e o coletor (FRENOT e CHRONAKIS – 2003), (HEIKKILA e HARLIN – 2008), (MA *et. al.* – 2010).
- Parâmetros da solução - dependem da composição da solução e das propriedades de cada um dos seus constituintes (tais como, concentração polimérica e peso molecular) e compreendem as propriedades das soluções que diretamente influenciam o processo (viscosidade, tensão superficial e condutividade) (DEMIR *et. al.* – 2002), (BEACHLEY e WEN – 2009), (MA *et. al.* – 2010).

Tensão elétrica aplicada

A tensão ou voltagem aplicada determina a carga fornecida ao polímero e, quanto maior a carga, maior a repulsão responsável pelo estiramento do jato (HENRIQUES *et. al.* – 2008). A tensão aplicada, conjuntamente com a distância entre o capilar e o coletor, determina também a intensidade do campo eletrostático. Quanto maior a diferença de potencial entre agulha e o prato coletor, maior o campo elétrico e, conseqüentemente, maior é a velocidade do jato. Isso contribui para a redução do estiramento efetivo das fibras. Dependendo do balanço entre os efeitos descritos, o diâmetro das fibras pode ou não ser reduzido pelo aumento de potencial. Além disso, o aumento da carga associado a um aumento de tensão pode contribuir para se formarem feixes múltiplos (HENRIQUES *et. al.* – 2008), ou seja, para que sejam ejetados vários feixes, ou jatos, de polímero, a partir da gota na ponta da capilar. O aumento excessivo da voltagem geralmente resulta em uma espécie de jato de spray, em que não se formam fios no coletor, formam-se gotas muito pequenas. Apesar disso, deve-se

controlar bem a voltagem a ponto que se obtenha a saída de um único filamento da ponta da gotícula, formando um cone de Taylor ideal. Obtendo um único filamento de saída no processo, é mais provável se obtenha uma menor variação de diâmetros de fios no alvo coletor, tornando o processo mais estável.

Taxa de infusão ou vazão do material

A taxa de infusão determina a disponibilidade de solução que chega à ponta da agulha. Com uma vazão mais elevada, o diâmetro das fibras aumenta (BHARDWAJ e KUNDU – 2010) e, se for demasiado elevado, isto é, se o campo elétrico não for suficiente para retirar da solução que chega à saída do capilar, a solução ia acumular-se no capilar. Por outro lado, se a vazão for demasiadamente baixa, podem ocorrer interrupções no jato. Pode então dizer-se que, “para um dado fluido existe um intervalo de voltagem e fluxo em que o processo de electrofiação é estável” (RUTLEDGE – 2007).

Distancia do alvo coletor

A influência da distância no campo eletrostático é inversa à influência da tensão, pois, quando a distância aumenta, o campo elétrico diminui. Este não é, no entanto, o efeito mais relevante. Efetivamente, ao diminuir a distância, o tempo de voo de um elemento de fluido diminui e o solvente pode não evaporar-se totalmente. Assim, é necessário um mínimo de distância para que haja evaporação adequada durante o processo (BHARDWAJ e KUNDU – 2010).

Concentração e composição de solução

Este é um parâmetro que deve ser levado em consideração, pois modifica de forma significativa a morfologia dos fios e alguns aspectos do sistema apenas por alterar as propriedades reológicas do material. Fixando os outros parâmetros de sistema, o aumento ou redução da porção polimérica na solução promove, na maior parte das vezes, aumento e redução de diâmetro dos fios, respectivamente. Isto se deve, em grande parte, devido à alteração das tensões de superfície que a força elétrica deve romper e à maior ou menor “oferta” de material polimérico (em massa) para uma mesma secção transversal do capilar. Além disso, pode-se alterar a composição da solução a fim de produzir efeitos como mudança

da tensão superficial da solução e taxa de evaporação de solvente ao longo da trajetória do fio (adicionando dois solventes com volatilidades diferentes).

Tipo de alvo

O “design” do alvo também é um fator que influencia diretamente na estrutura final obtida. Formas planas, como chapas metálicas, fazem com que os fios apenas sejam depositados sobre a placa subsequentemente de forma a preencher a totalidade da área com o material. Caso ocorra uma mudança de alvo, como uso de placas paralelas, os fios irão se depositar tanto nas placas, como também por entre as placas, fazendo uma espécie de “ponte”. Alvos rotatórios, onde um eixo cilíndrico metálico serve de alvo para os fios, geram deposições mais ordenadas, formando uma estrutura final totalmente anisotrópica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

O polímero PLLA foi produzido e cedido pelo laboratório de biomateriais da PUC/SP-Sorocaba. Os solventes utilizados foram clorofórmio [CHCl_3 , 99%] (Merck-Alemanha-lote K41162745) e acetona [$(\text{CH}_3)_2\text{CO}$, 99.5%] (Synth-Brasil-lote 122513). Ácido oléico [$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$] (Synth-Brasil-lote 121338), utilizado como dispersante. Foi produzida a HA por alunos de nosso laboratório LABIOMECC/DEMA/FEM à 5 anos, e para sua obtenção se utilizou os reagentes: ácido fosfórico [H_3PO_4 , 85%] (LAFAN-Brasil-lote 8004), nitrato de cálcio tetra hidratado [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 99%] (Synth –Brasil-lote 83856) e sacarose [$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$] (MERCK-Alemanha-lote 604036).

3.2 Processo sol-gel com sacarose

As nanopartículas de hidroxiapatita foram sintetizadas utilizando-se o método de sol-gel, tendo como precursores o cálcio neste caso nitrato de cálcio [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] e o fósforo neste caso ácido fosfórico (H_3PO_4), também adicionou-se sacarose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) no processo. A Fig.4 mostra um esquema deste processo. (RODRIGUES – 2008).

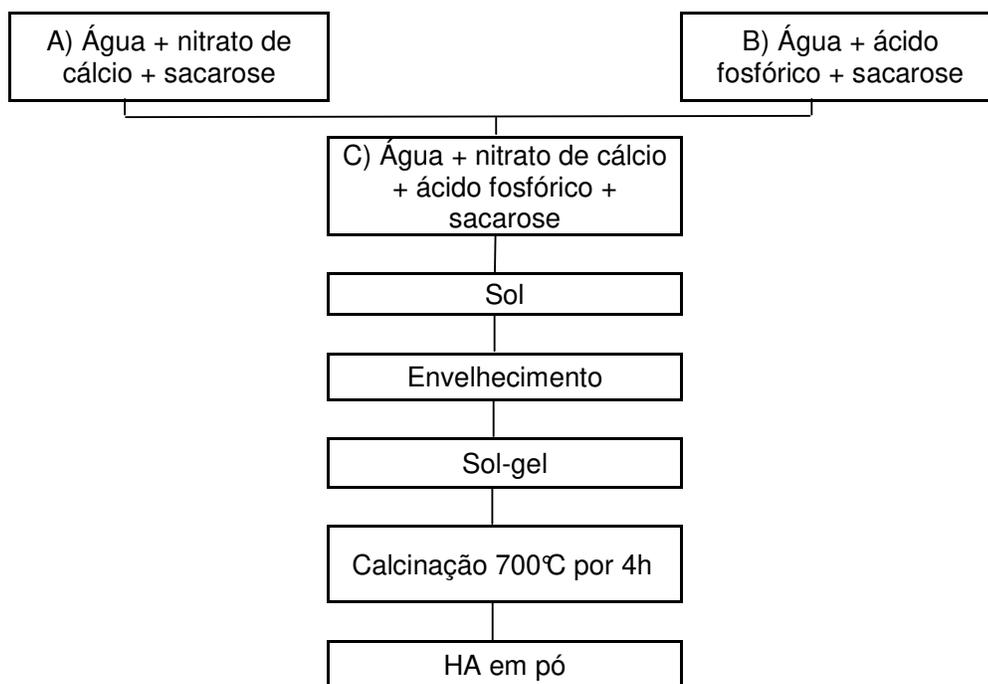


Figura 4. Fluxograma da síntese de hidroxiapatita utilizando o método sol-gel com sacarose.

O processo iniciou preparando duas soluções A e B, sendo que para a solução A foram misturadas água, sacarose 1,77% em volume e nitrato de cálcio tetrahidratado 18,83% em volume, colocada em agitação por 30 minutos. Na solução B foram misturadas água, sacarose 1,77% em volume e ácido fosfórico 8,94% em volume, colocada em agitação por 30 minutos. As soluções são unidas em uma solução C formando uma suspensão coloidal, onde a solução é chamada de sol e é colocada em agitação por mais 30 minutos. O sol deve ser translúcido, pois para o método ser coerente não pode apresentar sinais de precipitação, o sistema deve se manter coloidal até a gelatinização. Para a formação do gel foi necessário um aquecimento da amostra em agitação constante, onde a temperatura de aquecimento se manteve em aproximadamente 70°C. O gel depois de seco foi triturado em um almofariz para garantir a uniformidade do pó. Depois de seco e triturado o material foi calcinado a 700°C por 4h. A taxa de aquecimento se manteve entre 8° e 9°C por minuto.

3.3 Preparação das soluções

O compósito polimérico e cerâmico foi preparado utilizando como matriz polimérica o Poli (L-ácido láctico) e como reforço a hidroxiapatita. Foram preparadas três soluções para o PLLA; A) solução de clorofórmio com PLLA (20% em massa); B) solução de clorofórmio e acetona, numa relação de 1:1 com PLLA (20% em massa); C) mistura da solução de clorofórmio e acetona, numa relação de 1:1 com PLLA (20% em massa), também foi adicionada a HA com dispersante das partículas de HA.

A solução “A” foi preparada dissolvendo o PLLA numa percentagem de 20% em massa, o solvente utilizado foi clorofórmio e para uma dissolução uniforme foi colocado no agitador magnético por um tempo de 60 minutos.

A solução “B” foi preparada misturando os solventes clorofórmio e acetona numa relação de 1:1, após foi adicionado o PLLA numa percentagem de 20% em massa, e para uma dissolução uniforme foi colocado no agitador magnético por um tempo de 60 minutos.

O problema crítico no processamento do nanocompósito é a mistura e dispersão adequada das nanopartículas na matriz polimérica. As nanopartículas (HA) foram dispersas com um tensoativo adicionado na matriz solubilizada, gerando uma dispersão uniforme na solução para poder ser eletrofiada.

A solução “C” foi preparada misturando o clorofórmio com o tensoativo, neste caso foi utilizado o ácido oléico numa percentagem de 0,75 % em massa. A acetona foi misturada com a hidroxiapatita uma percentagem de 1,5 % em massa, as partículas foram dispersas por ultra-som num tempo de 30 minutos. Todos os componentes da solução foram misturados no agitador magnético por 60 minutos, e por ultimo colocado em ultra-som por um tempo de 30 minutos para uma melhor dispersão.

A Fig.5 mostra um esquema do procedimento de preparação das diferentes soluções nesse trabalho.

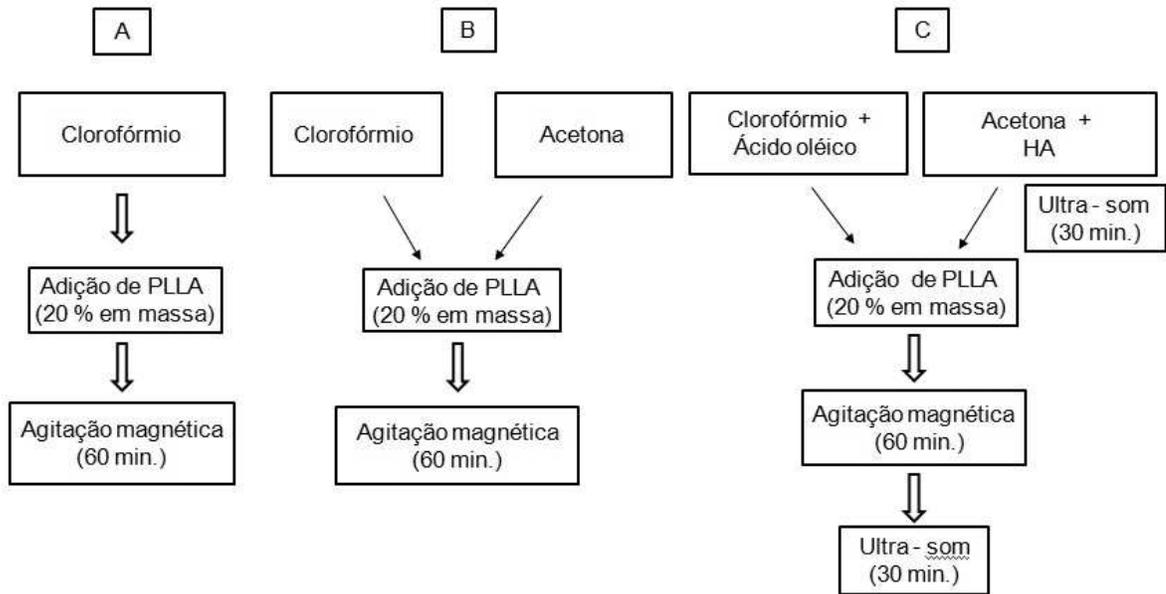


Figura 5. Fluxogramas representando os estágios da preparação de três soluções poliméricas.

As soluções A, B e C foram preparadas para testar o tipo de solvente a utilizar como padrão nos testes subsequentes. Procurando obter fibras de tamanho micrométrico utilizamos a solução “B” como padrão e se prepararam três soluções modificando as concentrações do polímero como se mostra na Fig 6.

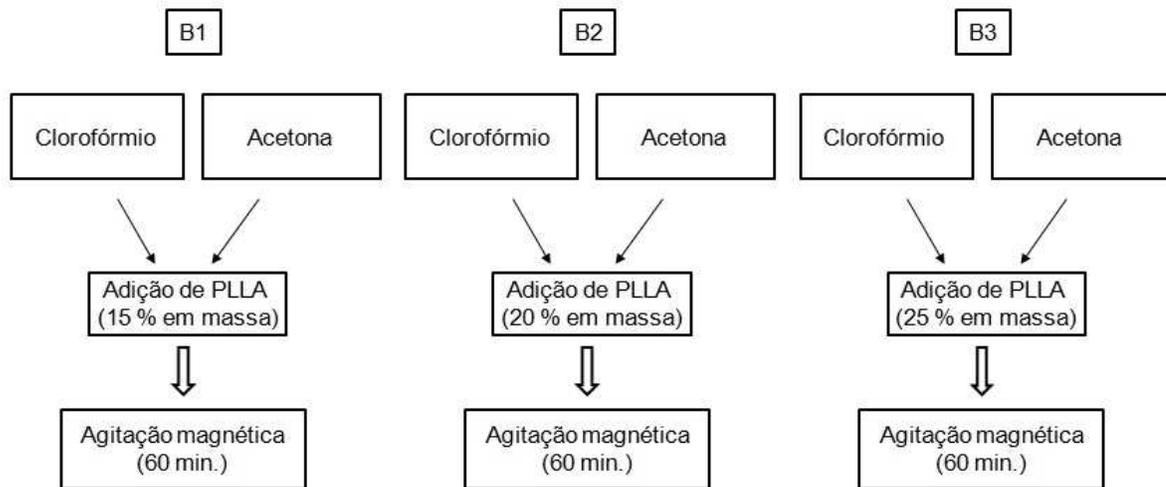


Figura 6. Fluxogramas representando os estágios da preparação das três segundas soluções poliméricas.

Nestas três soluções B1, B2 e B3 modificaram-se a concentração de polímero em 15%, 20% e 25%, procurando obter um tamanho de fibra homogêneo. Parâmetros importantes como viscosidade e tensão superficial são influenciados com as variações de concentração do polímero nas soluções.

Para preparação de outras três soluções utilizou-se a solução “C” como padrão e modificaram-se as concentrações da hidroxiapatita como se mostra na Fig 7.

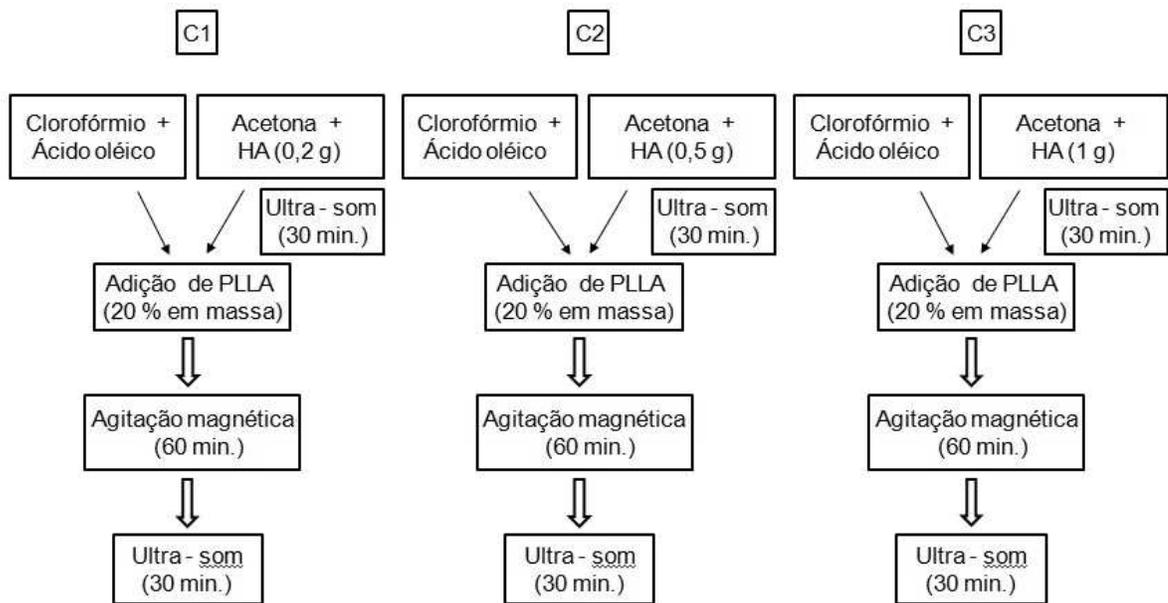


Figura 7. Fluxogramas representando os estágios da preparação das três segundas soluções poliméricas.

Estas três soluções C1, C2 e C3 foram preparadas variando-se as concentrações 0,2/0,5/1 gramas de hidroxiapatita. Quanto maior a concentração de hidroxiapatita é maior a dificuldade de manter as partículas dispersas, devido aos efeitos de agregação entre as nanopartículas.

3.4 Sistema de Eletrofiação

Foi utilizado um equipamento em escala de laboratório para eletrofiação de soluções poliméricas a temperatura ambiente e foi construído pelo nosso grupo de pesquisa. Uma fonte de alta tensão de 0 a 30 kV (Testtech) foi utilizada para gerar o campo elétrico. A solução foi bombeada através de uma seringa utilizando uma bomba de infusão (KD-100, KD-Scientific). O alvo consistiu numa placa metálica aterrada ao pólo negativo e a fonte. A ponta da seringa foi conectada ao pólo positivo, formando uma diferença de potencial entre a ponta da seringa e o alvo. Uma fotografia do sistema de eletrofiação utilizado está mostrada na Fig 8.

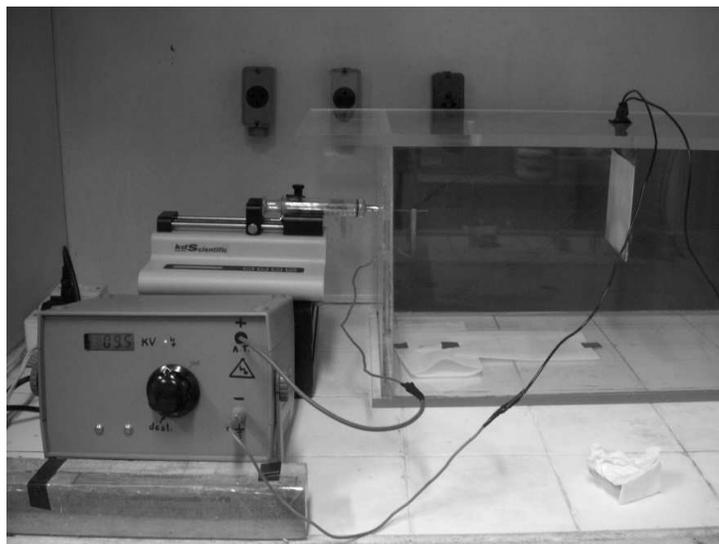


Figura 8 Fotografia do equipamento de Eletrofiação.

3.4.1. Parâmetros

Os parâmetros utilizados para o processo de eletrofiação estão esquematizados na tabela 1. Diferentes soluções foram variando até conseguir padronizá-los, as soluções A, B e C Fig 5 foram eletrofiadas mudando os parâmetros, estas mudanças foram feitas como teste. Nas soluções B1, B2 e B3 como Fig 6 se procurou padronizar os parâmetros de eletrofiação, conseguindo padronizá-los em uma taxa de infusão de 0,5 ml/h, voltagem de 13 kV e distância da ponta da seringa à placa coletora de aproximadamente 15 cm. Como se mostra na

tabela 1. Para as soluções C1, C2 e C3 Fig 7. utilizou-se os mesmos parâmetros das soluções feitas com o padrão de B.

Soluções	Vazão [mL/h]	Voltagem [kV]	Distância [cm]	Solventes e dispersante			PLLA	HA	Diâmetro
							%m	%m	
A	4,5	15	15	C			20		9,5µm
B	1,0	13	15	C	A		20		0,75µm
C	0,4	12	15	C	A	O	20	1,96	300nm
B1	0,5	16	15	C	A		15		µm e nm
B2	0,5	13	15	C	A		20		1 e 0,5 µm
B3	0,5	13	15	C	A		25		~1 µm
C1	0,5	13	15	C	A	O	20	1,96	~1 µm
C2	0,5	13	15	C	A	O	20	4,76	0,5 - 2µm
C3	0,5	13	15	C	A	O	20	9,00	1-3 µm

Tabela 1. Parâmetros utilizados no processo de eletrofição. Onde C, A e O são clorofórmio, acetona e Acido Oléico respectivamente.

3.5 Caracterizações

3.5.1 Difração de raios X

O equipamento utilizado foi um difratômetro de raios-X Rigaku modelo DMAX2200, que pertence ao DEMA-FEM-UNICAMP, com radiação Cu-K α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), com filtro de Ni, e foi ajustado com 40kV e 30mA. Os difratogramas foram obtidos no passo de $0,02^\circ$ a cada 2 segundos, em $2\theta / \theta$, e no modo de varredura contínua no intervalo de 20° até 50° .

3.5.2. Equação de Scherrer

Utilizando os picos identificados pela difração de raios X, foi calculado o tamanho do cristalito aplicando a equação de Scherrer (SOUZA, E.A. *et. al.* – 2007), (NAG, M., *et. al.* –

2007), denominada “t” expressa na Eq. (1):

$$t = 0,9\lambda / \beta \cos\theta \quad \text{Eq.(1)}$$

Onde “t” é o tamanho médio do cristalito, “β” é a largura a meia altura do pico principal apresentado pela amostra e “θ” é o ângulo de Bragg. Para eliminar possíveis erros advindos do equipamento utilizou-se uma equação de correção que fez uso da medida de um monocristal de tamanho conhecido para efetuar a correção. As correções foram realizadas por meio da Eq. (2):

$$\beta_{\text{real}} = \beta_{\text{exp}}^2 - \beta_{\text{inst}}^2 \quad \text{Eq.(2)}$$

Onde “β_{real}” é a largura a meia altura corrigida, “β_{exp}” é a largura a meia altura medida e “β_{inst}” é a largura a meia altura do padrão. O “padrão” é um monocristal com o tamanho do cristalito já conhecido. Neste tipo de análise é considerado que o perfil dos picos de difração de raios X apresenta uma distribuição gaussiana.

3.5.3 Fluorescência de raios X

A espectroscopia por fluorescência de raios X (X-ray fluorescence – XRF) é uma técnica de análise qualitativa e quantitativa da composição química de amostras. Consiste na exposição de amostras sólidas ou líquidas a um feixe de radiação para a excitação e detecção da radiação fluorescente resultante da interação da radiação com o material da amostra (BELMONTE, E.P. - 2005).

Neste trabalho o espectrômetro de fluorescência de raios X do DEMA-FEM-UNICAMP da marca Rigaku RIX 3100, foi utilizado para realizar a quantificação em porcentagem dos elementos químicos presentes na amostra, apresentando resultados da análise semi quantitativa.

3.5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para analisar as fibras obtidas por eletrofoação foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura (MEV) JEOL JXA-840A e pertence ao DEMA-FEM-UNICAMP. As amostras com uma tensão de 10kV foram metalizadas no equipamento Sputler Coater Bal-TEC SCD 050 pertencente ao DEMA-FEM-UNICAMP.

3.5.5 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (SEM-FEG)

O microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo JEOL (SEM-FEG) modelo JSM-6330F do LNLS-LME foi utilizado para caracterizar as nanopartículas. Este microscópio é de alta resolução, possui um canhão de elétrons com emissão por efeito de campo, trabalhando em baixa temperatura, com voltagem de aceleração de 0,1 a 25 kV. Também possui detectores de elétrons secundários e retro-espalhados, a resolução deste microscópio fica em torno de 1,5nm em 25kV para elétrons secundários.

3.5.6 Análise termogravimétrica

Para o análise termogravimétrico (TGA) foi utilizado o equipamento STA409C da NETZSCH, as medidas determinam a temperatura de degradação térmica do PLLA e também identificam a presença de HA na nanofibra. A taxa de aquecimento utilizada foi de 10° C/min e fluxo de 60 ml/min numa atmosfera de nitrogênio.

3.5.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As propriedades térmicas das amostras de PLLA puro, PLLA eletrofiado e PLLA/HA eletrofiado estudadas foram determinadas utilizando o equipamento METTLER TOLEDO

DSC 823e. As amostras em solução foram pesadas numa porta amostra de alumínio de formato cilíndrico e fechadas hermeticamente. O ensaio para o método dinâmico foi realizado sob atmosfera de nitrogênio líquido a 45ml/min e com duas varreduras de temperatura na faixa de:

- Primeira varredura de 25 °C a 220 °C com taxa de 10 °C/min;
- Segunda varredura de -50°C a 220 °C, intercaladas por um resfriamento com taxa de 10°C/min.

3.5.8 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização quanto às alterações estruturais da blenda PLLA/HA foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho médio (4000 a 500 cm^{-1}) via FTIR. Foram obtidos espectros de transmissão das amostras, utilizando o espectrômetro THERMO SCIENTIFIC NOCOLET IR100.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterizações da Hidroxiapatita

A Fig 9. Mostra os resultados da difração de Raios X das nanopartículas de HA utilizadas no trabalho. Os picos apresentados na Fig 9b. são largos e de pouca intensidade, típico de partículas nanométricas. No difratograma de raios-X do material preparado pode-se observar que a HA foi sintetizada, devido às posições dos picos da difração de raios-X estarem na mesma posição que os picos do banco de dados JCPDS.

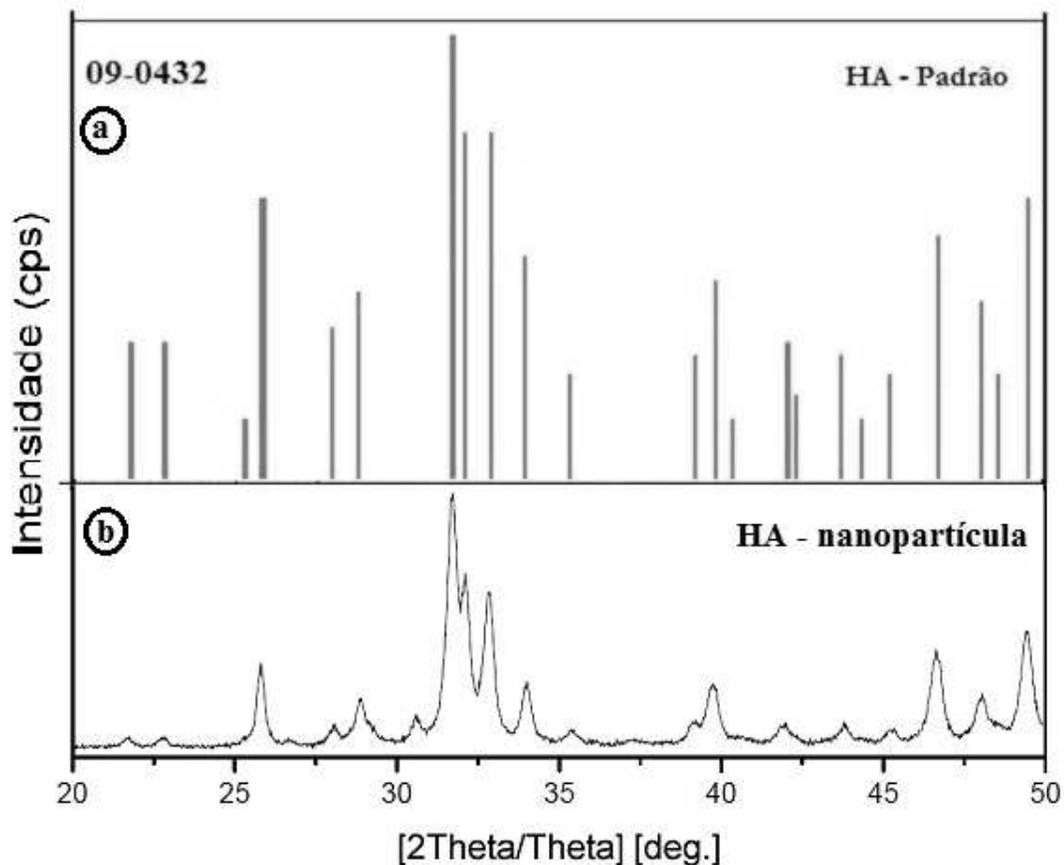


Figura 9. (a) Difratograma de raios-X da hidroxiapatita padrão, e (b) Difratograma de raios-X das nanopartículas de hidroxiapatita, calcinada a 700°C por 4h. (RODRIGUES – 2008).

Através da equação de *Scherrer* Eq.(1) calculou-se o tamanho médio dos cristalitos, resultando em aproximadamente 61nm.

A análise semiquantitativa pela técnica de fluorescência de raios-X foi utilizada para determinar porcentagem dos elementos químicos e impurezas existentes na HA e no compósito feito de fibras poliméricas reforçadas com HA. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 1. A quantidade de impurezas encontradas não representa problemas para sua utilização como biomaterial de acordo com a norma ASTM F 1185-03, devido à porcentagem em massa ser muito pequena. Isto demonstra que o processo sol-gel com sacarose utilizado para obter as nanopartículas de HA é eficiente.

<u>Impurezas</u>	<u>HA</u> (% massa)
Ni	0,0023
Si	0,0027
Fe	0,0038
Cl	0,0039
S	0,0070
Na	0,0157
Sr	0,0261
Al	<i>n.d.e</i>
Mg	<i>n.d.e</i>
K	<i>n.d.e</i>
Cu	<i>n.d.e</i>
Zn	<i>n.d.e</i>

n.d.e: não detectado pelo equipamento

Tabela 2. Impurezas presentes nas nanopartículas da HA.

A Fig. 10 foi obtida por SEM-FEG e apresenta a nanoestrutura das partículas de hidroxiapatita. Essa imagem reforça o resultado obtido com o cálculo do tamanho de partícula (equação de *Scherrer*) com cristalitos de aproximadamente 61nm.

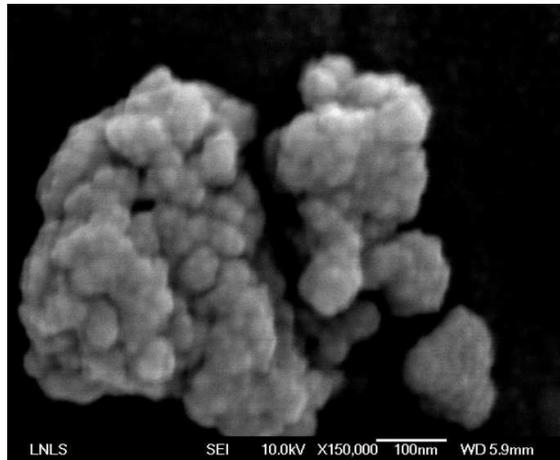


Figura 10 Nanopartículas de hidroxiapatita, calcinadas a 700°C por 4h. (RODRIGUES – 2008).

4.2 Eletrofição de PLLA e nanocompósito de PLLA/HA

4.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Fig 11. apresenta imagens de MEV para as fibras preparadas por eletrofição em diferentes condições. Na Fig 11 a. está apresentado o resultado obtido para a solução A (PLLA em clorofórmio). Pode-se observar que foi formado um emaranhado de fibras de diâmetro médio de 9,5µm.

A Fig 11 b. mostra as fibras obtidas para solução B (PLLA em mistura de clorofórmio e acetona). Pode-se observar o efeito do solvente na formação das fibras. Neste caso, as fibras formadas com a solução B apresentaram um diâmetro médio de 0,75µm, resultando em uma redução de aproximadamente uma ordem de grandeza, comparado com a solução A onde foi utilizado apenas clorofórmio.

Os resultados de obtidos pelo MEV da eletrofição da solução de C (PLLA/HA em mistura de clorofórmio e acetona) estão mostrados na Fig 11 c. Pode-se observar a formação de estrutura perolada (*beads*) estes estão conectados por segmentos fibrosos de diâmetro médio de 300nm. A presença desses (*beads*) na estrutura pode ser devido às partículas de HA e também devido a instabilidades no jato durante o processo de eletrofição ocasionando alterações nas propriedades físicas da solução como: viscosidade e tensão superficial. Foi observado que não houve segregação das nanopartículas de HA, mas sim incorporação delas na matriz polimérica.

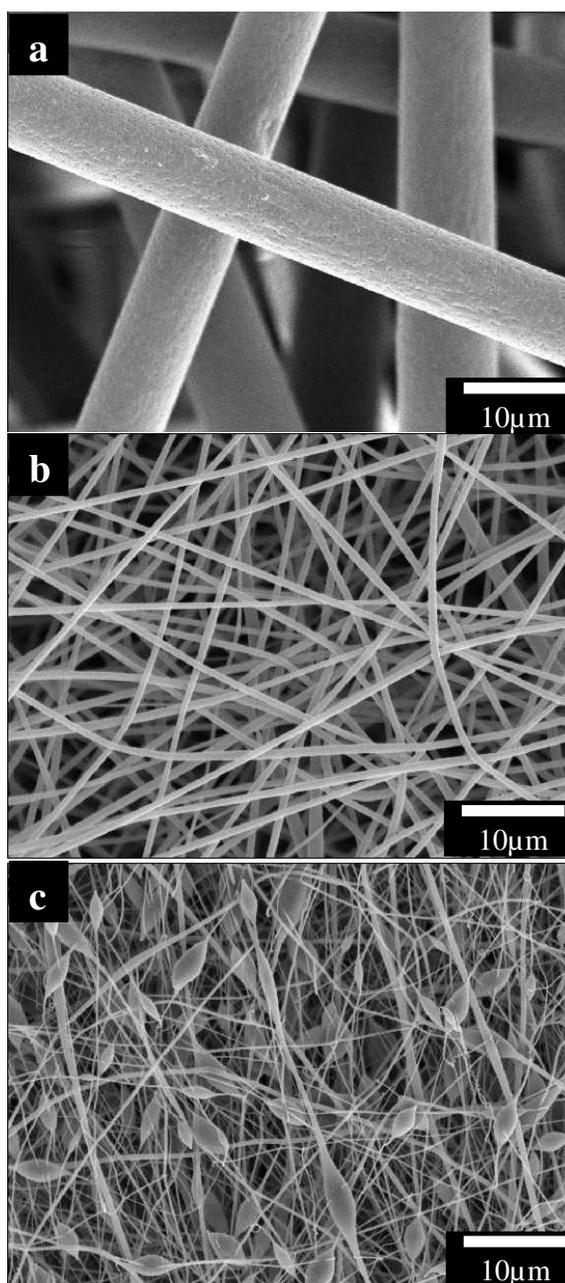


Figura 11. (a) Microfibras da solução A (PLLA dissolvidas em solução de clorofórmio), (b) microfibras da solução B (PLLA dissolvidas em solução de clorofórmio e acetona) e (c) nanocompósito da solução C (PLLA/HA dissolvidas em solução de clorofórmio e acetona).

Foram preparadas três soluções com diferentes porcentagens de PLLA. Tendo os parâmetros do processo ajustados, as soluções foram eletrofiadas B1, B2, B3 (PLLA 15%, PLLA 20% e PLLA 25 % em massa, respectivamente). Na imagem obtida da micrografia nos

podemos observar que da Fig 12 a. apresentou variação nos diâmetros das fibras, devido à menor quantidade de porcentagem em massa de polímero. Já nas Fig 12 b e c. foi observada uma boa distribuição das fibras e com diâmetros uniformes.

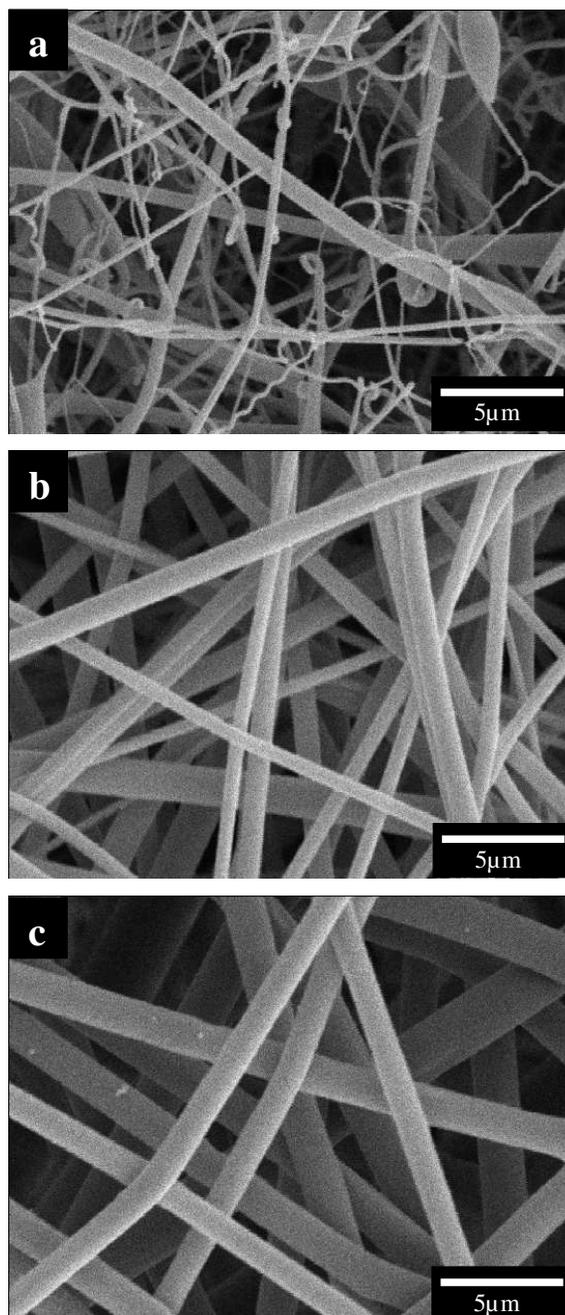


Figura 12. (a) Microfibras da solução B1 (PLLA 15%), (b) microfibras da solução B2 (PLLA 20%) e (C) microfibras da solução B3 (PLLA 25%).

Foram preparadas três soluções de PLLA/HA com diferentes porcentagens de HA. Os parâmetros para a electrofiação foram padronizados utilizando as mesmas condições descritas anteriormente.

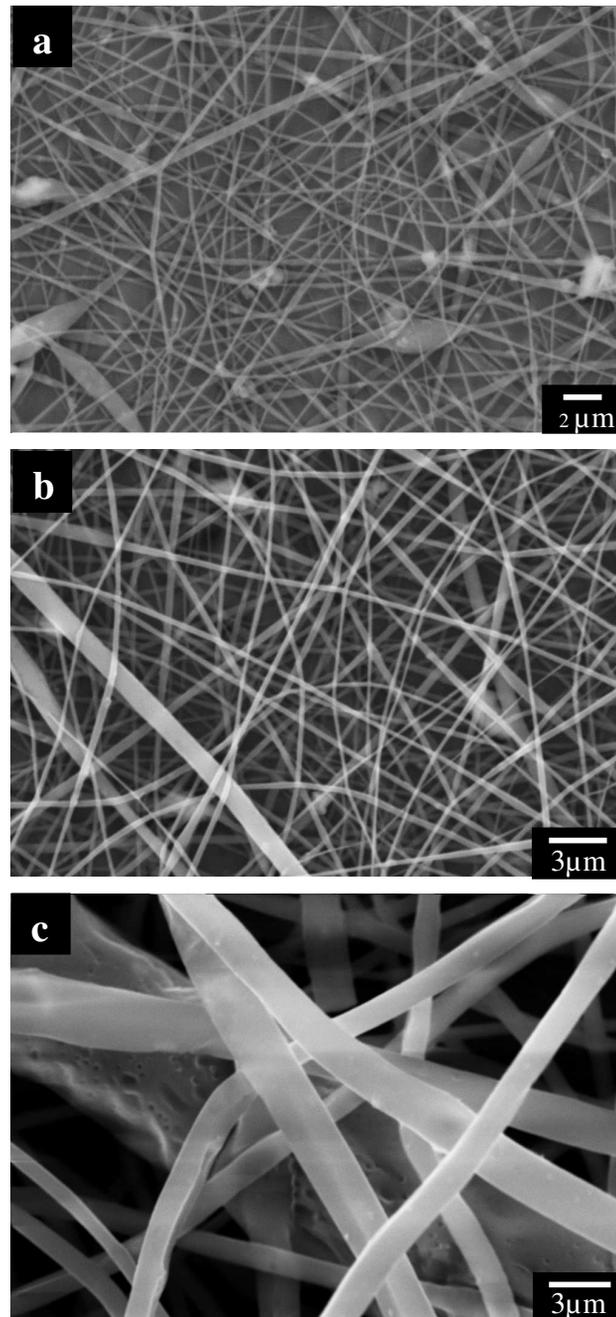


Figura 13. (a) Nanocompósito da solução C1 (PLLA/HA 1.96%), (b) nanocompósito da solução C2 (PLLA/HA 4.76%), e (C) nanocompósito da solução C3 (PLLA/HA 9%).

4.2.2 Análise Termogravimétrico

A Fig. 14 apresenta a curva resultante da TGA das fibras de PLLA obtidas em solução de clorofórmio/acetona e das fibras de nanocompósito (preparado da solução “C”). Pode-se observar que a degradação é de 97,5% para as fibras de PLLA, enquanto que o compósito teve uma degradação de 81%. O fato de ter ocorrido maior degradação no material sem reforço deve-se ao fato de a hidroxiapatita não sofrer mudanças significativas a 600°C, ou seja, eliminou-se o polímero e ficou apenas a HA. Com os resultados da TGA Fig.14 também é possível afirmar que a hidroxiapatita desencadeou um aumento na temperatura de degradação de aproximadamente 11°C, pois a temperatura de início de degradação do nanocompósito foi de 321,3°C em relação às fibras de PLLA que foi de 310,1°C . Assim, este resultado demonstra a presença de HA nas fibras, conforme aumenta a estabilidade térmica do PLLA. Apesar delas não serem identificadas nas micrografias, o aumento da temperatura de degradação do nanocompósito, evidencia a presença da hidroxiapatita. Portanto, pode-se afirmar que houve a incorporação das nanopartículas de HA na matriz polimérica.

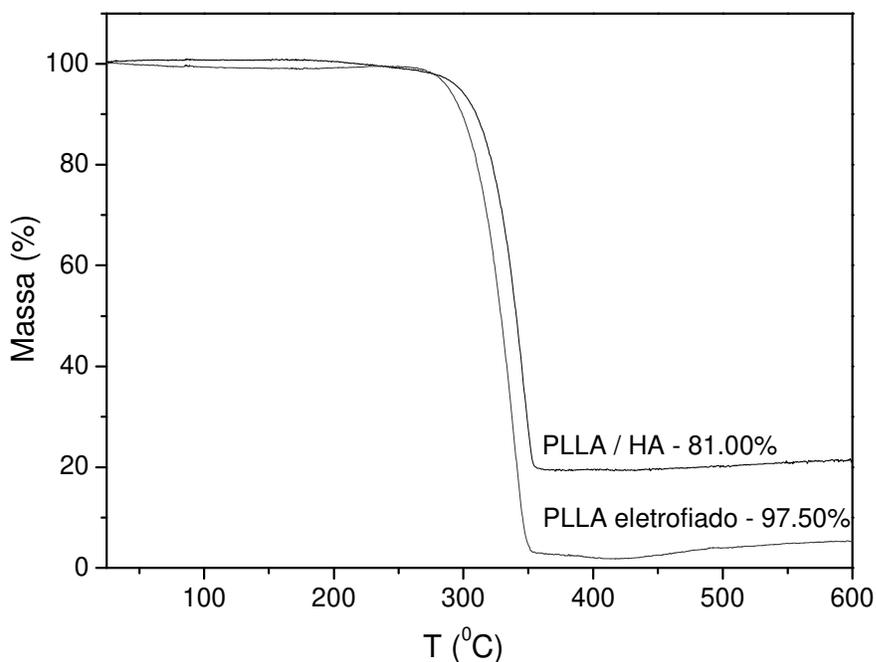


Figura 14. TGA do compósito de PLLA/ HA e PLLA eletrofiado.

4.2.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas resultantes das medidas através de DSC apresentadas na Fig. 15 são referentes ao segundo ciclo de aquecimento das amostras de PLLA na forma de grãos (PLLA puro), PLLA eletrofiado (PLLA) e o nanocompósito eletrofiado de PLLA e hidroxiapatita (PLLA/HA), (preparado da solução “C”). Nessas curvas podem ser observados dois tipos de transições. A primeira, que ocorre na faixa de 50-60°C e está presente em todas as três curvas, pode ser atribuída à transição vítrea (T_g). Esse tipo de transição está associado ao ganho de mobilidade das cadeias poliméricas na fase amorfa. A presença da hidroxiapatita em amostras de PLLA (PLLA/HA) promoveu maior mobilidade das cadeias poliméricas, o que isso pode explicar a diminuição da T_g para o nanocompósito.

O segundo tipo de transição que apenas foi observado para a amostra de PLLA/HA, em aproximadamente 180 °C, está próximo a temperatura de fusão (T_m) atribuída as cadeias do polímero PLLA no estado semi-cristalino por (MOTTA - 2006). O processo de eletrofiação do PLLA não induziu a formação de estruturas semi-cristalinas, isso pode ser verificado pela comparação das curvas de DSC obtidas para o PLLA puro e PLLA eletrofiado. Sugere-se que a formação do PLLA semi-cristalino no nanocompósito PLLA/HA seja induzida pela presença da hidroxiapatita.

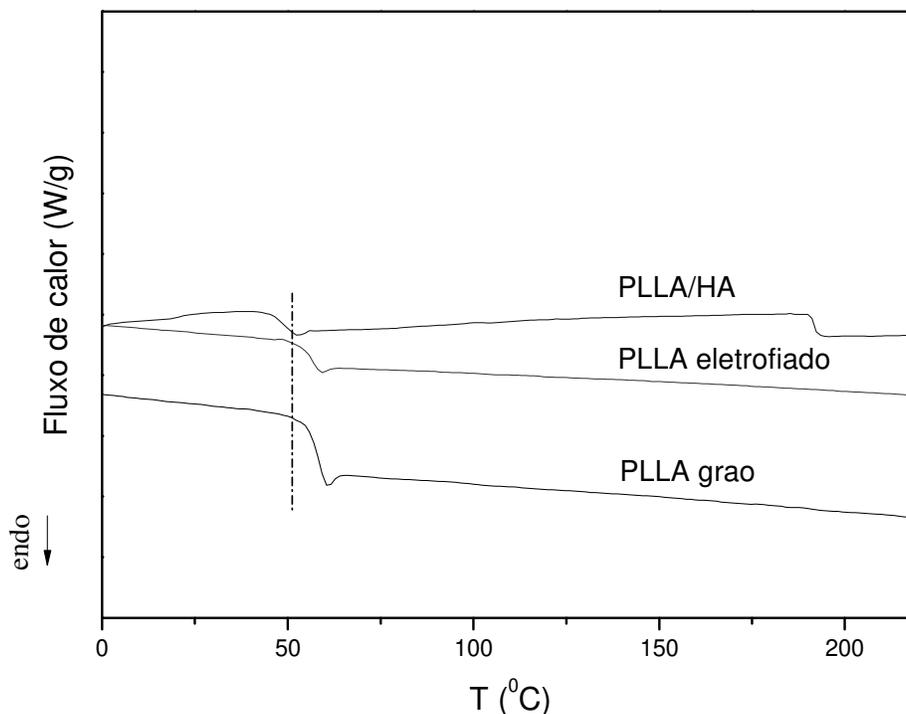


Figura 15. Curvas de DSC do segundo ciclo de aquecimento para as amostras de PLLA puro, PLLA e PLLA/HA.

4.2.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A Fig 16. representa alguns espectros resultantes dos análises através da técnica de FTIR das amostras de PLLA em grãos, PLLA eletroafiado, nanopartículas HA e PLLA/HA (preparado da solução “C”). O PLLA em grãos apresentou bandas de absorção em: 3355 cm^{-1} (ν OH), 1770 cm^{-1} (estiramento do C=O e COO), 1459 cm^{-1} (δ CH₃) e 1158 cm^{-1} (estiramento simétrico do C-O e COO). Comparando o espectro de PLLA em grãos com o PLLA eletroafiado, observa-se a ausência da banda da hidroxila, que pode está associado ao processo de eletrofiação, para demais bandas não ocorreu mudanças significativas. A formação do nanocompósito PLLA/HA foi evidenciada pela mudança da banda da carbonila em 1770 cm^{-1} do PLLA, devido à interação da mesma com a hidroxila da HA, por meio da ligação de hidrogênio.

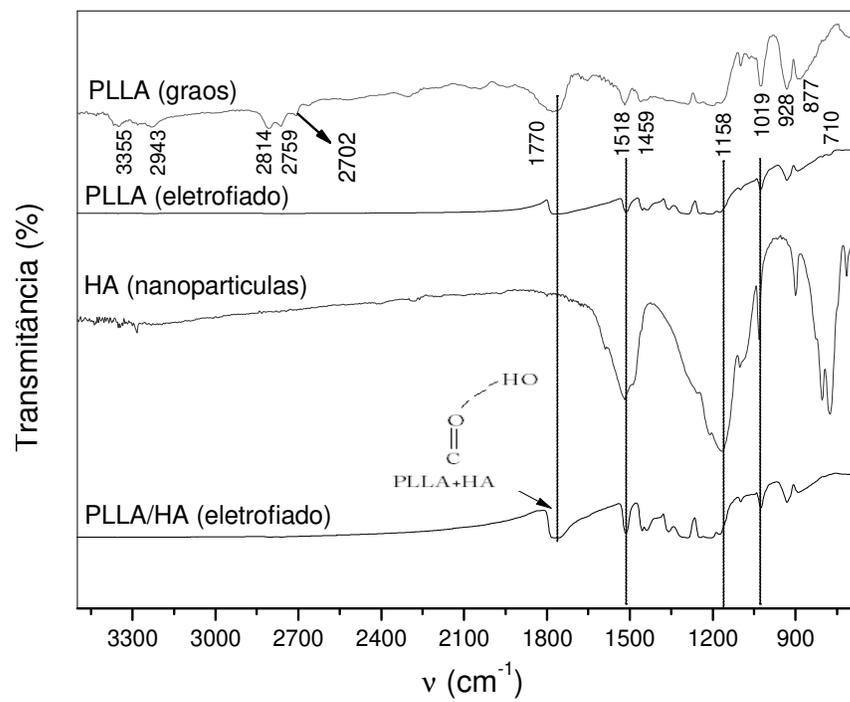


Figura 16 Espectroscopias do infravermelho das amostras de PLLA grão, HA partícula, PLLA eletrofiado e nanocomposito de PLLA/HA eletrofiado.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

A partir do trabalho desenvolvido, foi possível fazer as seguintes conclusões:

- Foram obtidas fibras a partir de soluções de PLLA e dispersões de PLLA/HA por eletrofiação.
- Foi observado que o sistema de solventes influencia no diâmetro das fibras apresentando dimensões micrométricas e nanométricas, obtidas após a eletrofiação.
- Pela análise de FTIR, se pode constatar que os solventes evaporaram durante o processo de eletrofiação.
- As nanopartículas de hidroxiapatita foram incorporadas na matriz polimérica de PLLA e induz à formação de morfologia perolada em algumas condições de eletrofiação estudadas neste trabalho.
- Os resultados apresentados são promissores para aplicações desse sistema em engenharia tecidual. Com base nos resultados de fluorescência de raios X da hidroxiapatita, pode-se considerar que o biomaterial esta apto a ser submetido a testes de crescimento celular para a avaliação da biocompatibilidade.

5.1 Trabalhos futuros

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

- Realizar testes de citotoxicidade e crescimento celular nas membranas obtidas por eletrofiação.
- Selecionar uma metodologia para a determinação da porosidade e caracterização de poros de membranas obtidas por eletrofiação.
- Avaliação das propriedades mecânicas das membranas obtidas por eletrofiação através de ensaios de tração.

- Estudar a influência das propriedades da solução como, viscosidade, tensão superficial e condutividade elétrica nas propriedades finais das fibras.

Referências

ADRIANA C.M., ELIANA A.R. DUEK, Síntese, caracterização e degradação “In Vitro” do Poli(L-ácido láctico). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. Vol 16: número 001,pp. 26-32.(2006).

ANDRADY, A. L. **Science and Technology of Polymer Nanofibers**, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ. (2008).

B.D. LI, Y. WANG, AND Y. XIA, Electrospinning Nanofibers as Uniaxially Aligned Arrays and Layer-by-Layer Stacked Films, 2004, pp. 361-366.

BEACHLEY V. AND WEN X. Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length. **Materials Science and Engineering C**, 29:663–668, 2009.

BELMONTE, E.P. Espectrometria por fluorescência de raios-X por reflexão total: um estudo simulado utilizando o método de Monte Carlo. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005, 156p. Dissertação (Mestrado).

BHARDWAJ N. AND KUNDU S.C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique.**Biotechnology Advance**, 28:325–347, 2010.

BOCCACCINI AR, NOTINGHER I, MAQUET V, JEROME R. Bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams filled with and coated by Bioglass particles for tissue engineering application. Journal of Materials Science: **Materials in Medicine** 2003; 14:443-450.

CHEAH CM, CHUE C.K., LEONG KF, CHUE SW. Development of a Tissue Engineering Scaffold Structure Library for Rapid Prototyping. Part 1: Investigation and Classification. **Computer Science and Engineering** 2004;21(4):291-301.

CHUA KN, CHAI C, LEE PC, TANG YN, RAMAKRISHNA S, LEONG KW, MAO HQ. Surface-aminated electrospun nanofibers enhance adhesion and expansion of human umbilical cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. **Biomaterials** 2006;27:6043–6051.

DEMIR M.M., YILGOR I, YILGOR E., AND ERMAN B. Electrospinning of polyurethane fibers. **Polymer**, 43:3303–3309, 2002.

D.H. RENEKER, A.L. YARIN. Electrospinning jets and polymer nanofibers. **Polymer**, v. 49, 2387-2425 (2008).

DI YW, IANNACE S, DI MAIO E, NICOLAIS L. Poly(lactic acid)/organoclay nanocomposites: Thermal, rheological properties and foam processing. **Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics** 2005; 43(6):689-698.

DUCHEYNE, P., BIANCO, P., RADIN, S., SHEPERS, E. **Bioactive materials: mechanisms and bioengineering considerations. Bone-Bonding Materials.** Edited by Ducheyne, P., Kokubo ,T., Van Blitterswijk, C. A., Reed Healthcare Communications, Leiderdop, The Netherlands,1-12, 1992.

DZENIS, Y. **Material science. Spinning continuous fibers for nanotechnology,** Science, 304, 1917-9. (2004).

FENG, J. J. The stretching of an electrified non-Newtonian” jet: a model for electrospinning, **Phys. Fluids** 14, 3912-3926. (2002).

FENG, J. J. Stretching of an electrically charged viscoelastic Jet. **J. Non-Newtonian Fluid Mech.**, 116, 55-70. (2003).

FORMHALS, **Process and Apparatus for Preparing Artificial Threads,** 1934.

GRIFFITH LG. Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering. **Ann N Y Acad Sci** 2002; 961:83-95.

HEIKKILÄ P. AND HARLIN A. Parameter study of electrospinning of polyamide-6. **European Polymer Journal**, 44:3067–3079, 2008.

HENCH, L.L.; ANDERSSON. **Bioactive Glasses. In: Hench LL, Wilson J, editors. Advanced Series in Ceramics**, v. 1: p. 41-62. World Scientific, Singapore, 1993.

HENRIQUES C., VIDINHA R., BOTEQUIM D., BORGES J.P., AND SILVA J.A.M.C. A systematic study of solution and processing parameters on nanofiber morphology using a new electrospinning apparatus. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 8:1–11, 2008.

HOHMAN, M.M., SHIN, M., RUTLEDGE, G.C., BRENNER, M.P., Electrospinning and Electrically Forced jets. I. Stability theory, **Physics of Fluids**, 13, 8, 2201-2220. (2001).

HUTMACHER DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials** 2000; 21:2529-2543.

IGNATOVA M., STOILOVA O., MANOLOVA N., MITA D.G., DIANO N., NICOLUCCI C., RASHKOV I. ,Electrospun microfibrillar poly(styrene-alt-maleic anhydride)/poly(styrene-co-maleic anhydride) mats tailored for enzymatic remediation of waters polluted by endocrine disruptors, **Euro. Polym. J.** 2009, 45(9), 2494–2504.

LANGER, R. AND VACANTI, P. Tissue engineering, **Science** 260:920-925, (1993).

LIU X, MA PX. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. **Ann Biomed Eng** 2004; 32(3):477-486.

MA G. et al. Preparation and characterization of composite fibers from organic-soluble chitosan and poly-vinylpyrrolidone by electrospinning. **Front. Mater. Sci. China**, 4(1): 64–69, 2010.

MA PX, ZHANG R. Microtubular architecture of biodegradable polymer scaffolds. **J Biomed Mater Res** 2001; 56(4):469-477.

MIKOS AG, BAO Y, CIMA LG, INGBER DE, VACANTI JP, LANGER R. Preparation of poly(glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation. **J Biomed Mater Res** 1993; 27(2):183-189.

MOONEY DJ, BALDWIN DF, SUH NP, VACANTI JP, LANGER R. Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. **Biomaterials** 1996; 17(14):1417-1422.

BHARDWAJ N. AND KUNDU S.C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advance*, 28:325–347, 2010.

NAVARRO M, APARICIO C, CHARLES-HARRIS M, GINEBRA MP, ENGEL E, PLANELL JA. Development of a biodegradable composite scaffold for bone tissue engineering: physico-chemical, topographical, mechanical, degradation and biological properties. **Advances in Polymer Science** 2006; 200:209-231.

ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. Biomateriais: Fundamentos e Aplicações. **Rio de Janeiro: Cultura médica**, (2006).

Preparation of macroporous polylactide supports by solid-liquid phase separation. **Polymer** 1996; 37(6):1027-1038.

RAMAKRISHNA, S., FUJIHARA, K., TEO, W-E; LIM, T.-C., MA, Z. (2005), **An Introduction to Electrospinning and Nanofibers**, World Scientific Publ. Co., Singapore.

RODRIGUES, L. R. Síntese e caracterização de hidroxiapatita e titânia nanoestruturadas para a fabricação de compósitos (2008). Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ROETHER JA, BOCCACCINI AR, HENCH LL, MAQUET V, GAUTIER S, JÉRÔME R. Development and in vitro characterisation of novel bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams and Bioglass for tissue engineering applications. **Biomaterials** 2002; 23:3871-3878.

RUTLEDGE G.C., FRIDRIKH S.V. Formation of Fibers by Electrospinning, **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 59 (14), 1384-1391. (2007).

SCHUGENS C, MAQUET V, GRANDFILS C, JEROME R, TEYSSIE P. Polylactide macroporous biodegradable implants for cell transplantation. II. Preparation of polylactide foams by liquid-liquid phase separation. **J Biomed Mater Res** 1996; 30(4):449-461.

SLIVKA MA, LEATHERBURY NC, KIESWETTER K, NIEDERAUER GG. Porous, resorbable, fiber-reinforced scaffolds tailored for articular cartilage repair. **Tissue Eng** 2001; 7(6):767-780.

THERON S.A., YARIN A.L., ZUSSMAN E., KROLL E. Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polymer solutions, **Polymer**, 45(6), 2017-2030. (2004).

THOMSON RC, YASZEMSKI MJ, POWERS JM, MIKOS AG. Hydroxyapatite fiber reinforced poly(α -hydroxy ester) foams for bone regeneration. **Biomaterials** 1998; 19:1935-1943.

URAYAMA H, KANAMORI K, KIMURA Y. Controlled crystal nucleation in the melt-crystallization of poly(L-lactide) and poly(L lactide)/poly(D-lactide) stereocomplex. **Macromol Mater Eng** 2001;286:705.

WAKE MC, PATRICK CW, JR., MIKOS AG. Pore morphology effects on the fibrovascular tissue growth in porous polymer substrates. **Cell Transplant** 1994;3(4):339-343.

WANG B., WANG Y., YIN T., AND YU Q. Applications of electrospinning technique in drug delivery. **Chemical Engineering Communications**, 197(10):1315–1338, 2010.

WHITE, A.A.; BEST, S.M.; KINLOCH, I.A. Hydroxyapatite-Carbon Nanotube Composites for Biomedical Applications: A Review. **Int. J. Appl. Ceram. Technol.**, 4 [1] 1-13, 2007.

WILLIAMS, D.F. **Definitions in Biomaterials, Progress in Biomedical Engineering**, Vol. 4, Elsevier, 1987.

WILLIAMS, D.F. **Compatibility of Implant Materials, Sector Pub. Ltd.**, Ed. 1976, London, 1976.

XU X, CHEN X, XU X, LU T, WANG X, YANG L, JING X. BCNUloaded PEG-PLLA ultrafine fibers and their in vitro antitumor activity against Glioma C6 cells. **J Contr Release** 2006;114:307–316.

YARIN, A. L.; KOOMBHONGSE, S. AND RENEKER, D. H. Bending instability in electrospinning of nanofibres **J. Appl. Phys.**, 89, 3018-3026. (2001).

ZHANG R, MA PX. Poly(α -hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone tissue engineering. I. Preparation and morphology. **Journal of Biomedical Materials Research** 1999; 44:446-455.