

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO - OESTE – UNICENTRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA - PPGQ

MILENA SCHROEDER MALHERBI

**COMPÓSITOS PVDF-HIDROXIAPATITA PRODUZIDOS POR  
ELETROFIAÇÃO PARA APLICAÇÃO BIOMÉDICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

GUARAPUAVA - PR

2021

MILENA SCHROEDER MALHERBI

**COMPÓSITOS PVDF-HIDROXIAPATITA PRODUZIDOS POR  
ELETROFIAÇÃO PARA APLICAÇÃO BIOMÉDICA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Química, área de concentração em Química Aplicada, para obtenção do título de mestre.

**Orientadora:** Prof. Dra. Taiana Gabriela Moretti Bonadio

**Coorientadora:** Prof. Dra. Tânia Toyomi Tominaga

GUARAPUAVA - PR

2021

Catálogo na Publicação  
Rede de Bibliotecas da Unicentro

Malherbi, Milena Schroeder

M249c

Compósitos PVDF-Hidroxiapatita produzidos por eletrofição para aplicação biomédica / Milena Schroeder Malherbi. -- Guarapuava, 2021. xii, 92 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Química. Área de concentração: Química Aplicada, 2021.

Orientadora: Taiana Gabriela Moretti Bonadio

Coorientadora: Tânia Toyomi Tominaga

Banca examinadora: Gustavo Sanguino Dias, Rafael Marangoni

Bibliografia

1. Eletrofição. 2. Piezoelectricidade. 3. PVDF - Hidroxiapatita. 4. Compósito. 5. Bioatividade. 6. Citotoxicidade. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química.

CDD 540

**MILENA SCHROEDER MALHERBI**

**COMPÓSITOS PVDF-HIDROXIAPATITA PRODUZIDOS POR ELETROFIAÇÃO PARA  
APLICAÇÃO BIOMÉDICA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Aplicada, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovado em 21 de junho de 2021.

  
Prof. Dr. Gustavo Sanguino Dias - UEM

  
Prof. Dr. Rafael Marangoni - Unicentro

  
Prof. Dr. Taiana Gabriela Moretti Bonadio

Orientadora

Dedico esse trabalho aos meus pais, por todo apoio e amor incondicional.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Dra. Taiana Gabriela Moretti Bonadio, por me acolher no grupo de pesquisa e por me ensinar e motivar tanto. Com toda certeza sua paixão pela pesquisa, mesmo em cenários que muitas vezes eram desmotivadores, me serviu de grande inspiração. Obrigada por acreditar em mim.

À Lívia Liws Macková, pelas análises de DRX e de FTIR-PAS.

À Daniella Faria e à Professora Dra. Patrícia Bonfim, pela realização dos testes de citotoxicidade.

À minha coorientadora, Professora Dra. Tânia Toyomi Tominaga, pelo incentivo e pelos esclarecimentos sobre este trabalho.

A todos os professores e colegas do Grupo de Física Aplicada em Materiais (GFAMa).

Aos colegas Prof. Dr. Gabriel e Douglas do GFAMa, por me ensinarem a utilizar o equipamento de eletrofição.

À Professora Dra. Andresa da Costa Ribeiro, por me auxiliar nas análises de potencial zeta.

Ao Wesley Khalil, técnico do CCMN, pelo auxílio durante as análises de DSC e ATR-FTIR e também pela companhia, conversas e café.

Ao meu primo e amigo Daniel, pelo apoio e por me auxiliar na escrita em inglês.

Aos meus melhores amigos Patricia, Cheila e João Pedro pela amizade, incentivo e compreensão. Nos momentos difíceis vocês estavam lá por mim.

Aos demais amigos que a vida acadêmica me concedeu, com certeza cada um de vocês contribuiu para que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais, Cleusa e Amarildo, por todo apoio, por acreditarem em mim e por sempre estarem de braços abertos quando precisei de ajuda.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que possam ter colaborado com a realização deste trabalho, direta ou indiretamente.

*A vida não precisa ser fácil, desde que não  
seja vazia*

(Lise Meitner)

## RESUMO

Para que um biomaterial atue de maneira eficaz em sistemas biológicos, como auxiliador no tratamento e cura de tecidos danificados ou perdidos, é necessário que o mesmo seja capaz de mimetizar as propriedades dos tecidos naturais do corpo nos seus diversos aspectos (químicos, físicos, mecânicos e de superfície). Estas características influenciam a adesão e proliferação celular no local do implante e por isso são cruciais para o sucesso do tratamento para o qual o biomaterial será requerido. Com isso, cada vez mais novos materiais e técnicas têm sido empregados a fim de se obter biomateriais com propriedades específicas e que atendam as diferentes demandas dos tecidos biológicos. Nesse contexto, o processo de eletrofição tem ganhado destaque. Através deste método é possível obter fibras de tamanhos micro e nanométricos a partir de soluções poliméricas, nas quais outros materiais podem ser incorporados com o objetivo de se conceder determinadas propriedades a essas membranas eletrofiadas. Como resultado é possível obter-se compósitos capazes de atuar como suporte na regeneração de tecidos vivos. Sendo assim, neste trabalho, poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF), foi utilizado como matriz polimérica para a confecção de membranas piezoelétricas, explorando-se a formação de fase  $\beta$  do polímero (fase polar com propriedades piezoelétricas). Partículas micro e nanométricas de hidroxiapatita (HAp) foram incorporadas como fase dispersa nessa matriz, visando produzir membranas de compósitos multifuncionais (PVDF-HAp) também com propriedades bioativas. Os resultados obtidos demonstraram que foi possível a produção de membranas contendo micro e nanofibras do compósito por eletrofição. As partículas de HAp apresentaram boa dispersão na matriz polimérica e a fase predominante do PVDF presente nas membranas foi a fase polar  $\beta$ . O compósito demonstrou crescimento de apatita em sua superfície após 21 dias de imersão em fluido corporal simulado (SBF). Testes realizados em cultura de fibroblastos humano revelaram que as membranas eletrofiadas possuem baixa citotoxicidade. Portanto, o compósito desenvolvido nesse trabalho apresenta grande potencial para ser utilizado no futuro em aplicações biomédicas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Eletrofição, Piezoeletricidade, PVDF, Hidroxiapatita, Compósito, Bioatividade, Citotoxicidade.



## ABSTRACT

In order to a biomaterial act effectively in biological systems, as an aid in the treatment and healing of damaged or lost tissues, it is necessary that it be able to mimic the properties of the body's natural tissues in its various aspects (chemical, physical, mechanical and surface). These characteristics influence cell adhesion and proliferation at the implant site and are crucial to the success of the treatment for which the biomaterial will be required. With this, more and more new materials and techniques have been used in order to obtain biomaterials with specific properties which meet the different demands of biological tissues. In this context, the electrospinning process has gained prominence. Through this method it is possible to obtain micro and nanometric fibers from polymeric solutions, in which other materials can be incorporated with the objective of granting properties to these membranes. As a result, there is a possibility to obtain composites capable of acting as a support in the regeneration of living tissues. Thus, in this work, poly(vinylidene fluoride) (PVDF) was used as a polymeric matrix for making piezoelectric membranes, exploring the formation of the  $\beta$  phase of the polymer (polar phase with piezoelectric properties). Micro and nanometric hydroxyapatite (HAp) particles were incorporated as a dispersed phase in this polymeric matrix, to develop multifunctional composite membranes (PVDF-HAp) also with bioactive properties. The results obtained demonstrated that it was possible to produce membranes containing micro and nanofibers of the composite by electrospinning. The HAp particles have good dispersion in the polymeric matrix and a predominant phase of PVDF present in the membranes for a polar phase  $\beta$ . The composite growth of apatite on its surface after 21 days of immersion in simulated body fluid (SBF). Tests carried out in human fibroblast cultures revealed that the membranes do not have a cytotoxic character. Therefore, the composite developed in this work has great potential to be used in the future in biomedical applications.

**KEYWORDS:** Electrospinning, Piezoelectricity, PVDF, Hydroxyapatite, Composite, Bioactivity, Cytotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da estrutura cristalina da hidroxiapatita (HAp). .....	19
Figura 2 - Representação das fases $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ do PVDF. As esferas em cinza representam átomos de carbono (C), as em verde representam átomos de flúor (F) e as em branco representam átomos de hidrogênio (H). .....	22
Figura 3 - Representação esquemática de um equipamento de eletrofição. ....	24
Figura 4 - (a) Osso bovino utilizado para obtenção de hidroxiapatita. (b) Pó proveniente da moagem em almofariz do osso bovino calcinado a 900 °C por 4 horas.....	27
Figura 5 - Equipamento de eletrofição. (a) Fonte de alta tensão (1); bomba de seringa (2) e coletor (3). (b) Polo positivo (4) conectado à ponta da agulha (6) e polo negativo (5) conectado ao coletor. ....	28
Figura 6 - Representação esquemática de funcionamento de um microscópio eletrônico de varredura.....	35
Figura 7 - Esquema de funcionamento de um equipamento de ATR-FTIR.....	38
Figura 8 - Esquema de funcionamento de um equipamento de FTIR-PAS. ....	40
Figura 9 - Esquema de funcionamento de um equipamento de DRX. ....	41
Figura 10 - Micrografias das amostras eletrofiadas a partir das soluções (a) e (b) P18, (c) e (d) P16 e (e) e (f) P14. As setas amarelas indicam a presença de defeitos nas fibras. ....	45
Figura 11 - (a) Micrografia e (b) distribuição normal do diâmetro das fibras para a amostra P18.....	46
Figura 12 - (a) Micrografia e (b) distribuição normal do diâmetro das fibras para a amostra P16.....	47
Figura 13 - (a) Micrografia e (b) distribuição normal do diâmetro das fibras para a amostra P14.....	48
Figura 14 - Espectros de ATR-FTIR das amostras de PVDF em pó e em membranas eletrofiadas. (a) P18, (b) P16, (c) P14 e (d) PVDF em pó.....	50
Figure 15 - Difratogramas das amostras de PVDF em pó e membranas eletrofiadas com diferentes proporções de polímero e solventes. Destaca-se em azul os picos relativos à fase $\alpha$ do polímero, e em vermelho os picos relativos à fase $\beta$ eletroativa. ....	52
Figura 16 - Curvas DSC das amostras de PVDF. (a) PVDF em pó, (b) P18, (c) P16 e (d) P14. Os picos de fusão e cristalização estão indicados pelas siglas $T_F$ e $T_C$ , respectivamente. ....	54
Figura 17 - (a) Micrografia e (b) distribuição normal do diâmetro das partículas de hidroxiapatita obtidas por meio do processo descrito na seção 4.1.....	55
Figura 18 – (a) Micrografia e (b) distribuição normal do diâmetro das partículas de hidroxiapatita dispersas na membrana eletrofiada P14-H15. ....	56
Figura 19 - Micrografias das amostras eletrofiadas (a) e (b) P14-H10, (c) e (d) P14-H15 e (e) e (f) P14-H20. As setas amarelas indicam a presença de defeitos nas fibras.....	59
Figura 20 - (a) Micrografia e (b) distribuição normal do diâmetro das fibras para a amostra P14-H10.....	60
Figura 21 - (a) Micrografia e (b) distribuição normal do diâmetro das fibras para a amostra P14-H15.....	61
Figura 22 - (a) Micrografia e (b) distribuição normal do diâmetro das fibras para a amostra P14-H20.....	62

Figura 23 - Espectro de EDS de fibras eletrofiadas de PVDF-HAp para região com partícula de HAp incorporada.....	64
Figura 24 - Espectro de EDS de fibras eletrofiadas de PVDF-HAp para região sem partícula de HAp incorporada.....	65
Figura 25 - Espectros de ATR-FTIR das amostras de (a) HAp em pó e das membranas eletrofiadas (b) P14-H10, (c) P14-H15 e (d) P14-H20.....	66
Figura 26 - Difratoograma da amostra de hidroxiapatita em pó com os índices de Miller dos respectivos índices de difração. ....	68
Figura 27 - Difratoogramas das amostras (a) P14-H10, (b) P14-H15 e (c) P14-H20. ....	69
Figura 28 - Curvas DSC das amostras de (a) HAp em pó, (b) P14-H10, (c) P14-H15 e (d) P14-H20. Os picos de fusão e cristalização estão indicados pelas siglas $T_F$ e $T_C$ , respectivamente. ....	70
Figura 29 - Espectros de FTIR-PAS das amostras de PVDF em pó e em membranas eletrofiadas. (a) P14, (b) P16 e (c) P18 e (d) PVDF em pó. ....	72
Figura 30 - Espectros de FTIR-PAS das amostras de PVDF em pó e em malhas eletrofiadas. (a) P14-H20, (b) P14-H15, (c) P14-H10 e (d) HAp em pó.....	73
Figura 31 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de amostras controle de hidroxiapatita submetidas a teste de bioatividade in vitro em SBF por (a) 7 dias e (b) 21 dias.....	74
Figura 32 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de amostras padrão P14 submetidas a teste de bioatividade in vitro em SBF por (a) 7 dias e (b) 21 dias.....	75
Figura 33 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de amostras P14-H10 submetidas a teste de bioatividade in vitro em SBF por (a) e (b) 7 dias e (c) e (d) 21 dias.....	76
Figura 34 - Imagem de MEV e espectro de EDS de região de amostra P14-H10 imersa em SBF por 21 dias. ....	77
Figura 35 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de amostras P14-H15 submetidas a teste de bioatividade in vitro em SBF por (a) e (b) 7 dias e (c) e (d) 21 dias.....	78
Figura 36 - Imagem de MEV e espectro de EDS de região de amostra P14-H15 imersa em SBF por 21 dias. ....	79
Figura 37 - Viabilidade celular das amostras P14, P14-H10 e P14-H15, analisadas por método indireto por períodos de 24, 48 e 72h. ....	81
Figura 38 - Viabilidade celular das amostras P14, P14-H10 e P14-H15, analisadas por método direto por períodos de 24h a 7 dias.....	82

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	15
2.1	OBJETIVO GERAL .....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
2.1	BIOMATERIAIS .....	16
3.1.1	Primeira Geração de Biomateriais .....	16
3.1.2	Segunda Geração de Biomateriais .....	16
3.1.3	Terceira Geração de Biomateriais .....	17
3.1.4	Quarta Geração de Biomateriais .....	17
3.1.5	Biocerâmicas .....	18
3.1.5.1	Hidroxiapatita .....	18
3.2	BIOCOMPÓSITOS PIEZOELÉTRICOS .....	20
3.2.1	Poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF) .....	21
3.3	ELETROFIAÇÃO .....	23
3.3.1	Parâmetros da eletrofiação .....	24
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	26
4.1	OBTENÇÃO DOS MATERIAIS PRECURSORES .....	26
4.2	DISPOSITIVO DE ELETROFIAÇÃO .....	28
4.3	PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES .....	29
4.3.1	Soluções PVDF em DMF/acetona .....	29
4.3.2	Soluções PVDF em DMF/acetona com incorporação de HAp .....	29
4.4	PROCESSO DE ELETROFIAÇÃO .....	30
4.4.1	Soluções PVDF em DMF/acetona .....	30
4.4.2	Soluções PVDF em DMF/acetona com incorporação de HAp .....	31
4.5	TESTES DE BIOATIVIDADE <i>IN VITRO</i> COM FLUIDO CORPORAL SIMULADO (SBF) .....	31

4.5.1	Síntese do SBF .....	31
4.5.2	Preparação das amostras.....	32
4.5.3	Realização dos testes de bioatividade <i>in vitro</i> .....	33
4.6	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> .....	33
4.7	CARACTERIZAÇÕES .....	35
4.7.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	35
4.7.2	Espectroscopia de raios X por Dispersão de Energia (EDS).....	36
4.7.3	Espectroscopia no Infravermelho por Reflectância Total Atenuada (ATR-FTIR) .....	37
4.7.4	Espectroscopia Fotoacústica de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR-PAS) .....	39
4.7.5	Difratometria de Raios X (DRX) .....	40
4.7.6	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	42
4.7.7	Potencial zeta.....	43
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>44</b>
5.1	MEMBRANAS DE PVDF DISSOLVIDO EM DMF/ACETONA .....	44
5.1.1	Análise morfológica das fibras.....	44
5.1.2	Estudo das fases cristalinas por meio de análise de ATR-FTIR.....	49
5.1.3	Análise por difração de raio X (DRX) .....	52
5.1.4	Análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	53
5.2	MEMBRANAS DE PVDF COM INCORPORAÇÃO DE HAp .....	55
5.2.1	Análise morfológica das partículas de HAp .....	55
5.2.2	Análise do potencial zeta das partículas de HAp .....	57
5.2.3	Análise morfológica das fibras eletrofiadas .....	58
5.2.4	Análise por espectroscopia por dispersão de energia (EDS).....	63
5.2.5	Estudo das fases cristalinas por meio de análise de ATR-FTIR.....	65
5.2.6	Análise de difração de raio x (DRX).....	68
5.2.7	Análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	70

5.3	ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR-PAS) .....	71
5.4	TESTES DE BIOATIVIDADE <i>IN VITRO</i> EM FLUIDO CORPORAL SIMULADO (SBF) .....	74
5.5	TESTES DE CITOTOXICIDADE EM MEIO DE CULTURA CELULAR DE FIBROBLASTOS HUMANO.....	80
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>83</b>
6.1	PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS .....	84
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Impulsionado pelo desejo de longevidade e qualidade de vida, o ser humano tem buscado cada vez mais por meios que sejam capazes de auxiliar na cura de doenças e no reparo de fraturas e danos que podem vir a ocorrer nos tecidos do corpo (AGARWAL, 2020). Com o avanço da idade as pessoas ficam mais propensas a acidentes domésticos ou doenças, como a osteoporose, que podem resultar em fraturas ósseas de difícil recuperação e que representam um sério desafio para a ortopedia (BURR, 2019; CAO, 2020). Em geral, esse problema tem sido resolvido com a realização de enxertos ósseos, mas estes podem levar a uma série de complicações para o paciente, como, processo de recuperação lento e doloroso e possível rejeição imunológica (CAO, 2020). Feridas de pele muitas vezes também representam um grande desafio para a medicina. Com o aumento dos casos de pessoas com diabetes do tipo II o número de relatos de lesões cutâneas de difícil cicatrização tem aumentado significativamente. Uma ferida que não cicatriza pode levar o paciente a desenvolver outros problemas, como infecção grave do local, por exemplo (DAS e BAKER, 2016; FOSS 2005). Nesse sentido, há uma busca por materiais e técnicas que sejam capazes de promover a regeneração e cura de tecidos danificados como ossos e pele no menor tempo possível.

Pesquisas biomédicas, realizadas nos últimos anos, têm focado no desenvolvimento de biomateriais capazes de mimetizar as propriedades dos tecidos naturais do corpo nos seus diversos aspectos: mecânicos, físicos, químicos e de superfície, como rugosidade e porosidade (RAHMATI, 2020). Além disso, para que um biomaterial possa ser utilizado em implantes no corpo humano, é importante que o mesmo seja bioativo, não possua natureza cancerígena, seja compatível com o sangue e também que seja não-inflamatório. Deve-se levar em conta, também, que esse material poderá permanecer no corpo do paciente por longos períodos, não podendo, dessa forma, liberar agentes tóxicos no organismo (AGARWAL, 2020). Outro aspecto relevante para o sucesso de um implante é que o biomaterial seja capaz de induzir a proliferação e adesão celular no tecido hospedeiro. Nesse contexto, biomateriais porosos têm sido objeto de pesquisa. Uma porosidade adequada pode levar ao sucesso do implante, uma vez que a vascularização do material é promovida, bem como o crescimento de novo tecido através do material, melhorando a sua fixação (CHAUDHARI, 2016). Materiais piezoelétricos também têm chamado a atenção nas últimas décadas para atuar em meios biológicos, por conta da sua capacidade de formar cargas superficiais quando submetidos a um estresse mecânico. Essas cargas podem influenciar

trocas iônicas no tecido hospedeiro, o que pode afetar diretamente o crescimento e diferenciação das células no local do implante (TANDON, 2018). Alguns estudos mostraram que a aplicação de ultrassom em fraturas pode acelerar a cicatrização através da ativação do efeito piezoelétrico presente no próprio tecido ósseo (FARCIC, 2012; WANG, 2018) outros estudos sugerem que compósitos de materiais bioativos e piezoelétricos poderiam promover a regeneração óssea mais rapidamente (BONADIO, 2017; JIANQING, 1997). Além disso, a piezoelectricidade também está presente em tecidos moles do corpo, como a pele (RIBEIRO, 2015a). De fato, esse efeito auxilia na diferenciação celular desse tecido, uma vez que fibroblastos demonstraram maior adesão e otimização de processo de cura após expostos a estímulo piezoelétrico (GUO, 2012).

Além de materiais bioativos, a engenharia de tecidos busca por técnicas eficazes para a obtenção desses biomateriais. Nesse contexto, a eletrofiação têm ganhado destaque. Este método consiste na aplicação de uma diferença de potencial entre um condutor metálico e a agulha de uma seringa que contenha a solução polimérica, assim, fibras de tamanhos nano e micrométricos podem ser obtidas. Essas fibras formam membranas que mimetizam características importantes da matriz extracelular, como, a interconectividade entre os poros (que se formam nos espaços existentes entre as fibras) e grande área de contato na interface tecido-implante (GUO, 2012; AGARWAL, 2008). Por isso, membranas produzidas por eletrofiação têm sido utilizadas como arcabouço para o crescimento de células de diferentes tecidos do corpo, até mesmo de tecidos duros como os ossos (CHAUDHARI, 2016). Além disso, o processo de eletrofiação é versátil, permitindo que diferentes materiais possam ser combinados a fim de se criar compósitos capazes de atender a diferentes demandas.

Sendo assim, nesse trabalho foram desenvolvidas membranas eletrofiadas com matriz polimérica de poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF). Este é um polímero semicristalino que apresenta interessantes propriedades piezoelétricas quando suas cadeias estão conformadas em fase  $\beta$ . Nesse aspecto, o uso da técnica de eletrofiação mostrou-se vantajosa, uma vez que a mesma é responsável por induzir a formação dessa fase no polímero (GEE, 2018). Para conferir às membranas caráter bioativo, nano e micro partículas de hidroxiapatita (HAp) foram incorporadas na matriz de PVDF. A HAp é uma biocerâmica conhecida por suas propriedades bioativas, muito utilizada no desenvolvimento de biocompósitos para a engenharia de tecidos (SUGHANTHY, 2020). As membranas obtidas foram analisadas quanto a sua morfologia, propriedades piezoelétricas, de bioatividade e citotoxicidade. Os resultados demonstraram que esse biocompósito, na forma de fibras



eletrofiadas, é um candidato promissor para atuar como revestimento de próteses ósseas ou como curativos inteligentes para o reparo de tecidos mole, como a pele, por exemplo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Obter fibras eletrofiadas de PVDF-HAp em dimensões nano e micrométricas com a maior porcentagem possível de fase  $\beta$  do polímero e avaliar estas membranas quanto a sua bioatividade e citotoxicidade.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter fibras eletrofiadas de PVDF com dimensões de ordem nano e micrométricas;
- b) Caracterizar essas membranas por MEV, ATR-FTIR, FTIR-PAS, DRX e DSC;
- c) Avaliar o percentual de fase  $\beta$  do PVDF obtido por meio do processo de eletrofiação e comparar com o pó de PVDF comercial;
- d) Obter pó de hidroxiapatita com partículas com dimensões de ordem nano e micrométricas a partir de osso bovino;
- e) Obter fibras eletrofiadas de PVDF-HAp com dimensões de ordem nano e micrométricas;
- f) Caracterizar essas membranas por MEV, EDS, ATR-FTIR, FTIR-PAS, DRX e DSC;
- g) Escolher as membranas com as melhores propriedades (porcentagem de fase  $\beta$  e morfologia das fibras) para a realização de testes de bioatividade *in vitro*;
- h) Caracterizar as membranas, após os testes de bioatividade, por MEV e EDS.
- i) Caracterizar as membranas quanto à sua viabilidade celular em testes de citotoxicidade em cultura de fibroblastos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1 BIOMATERIAIS

Biomateriais podem ser definidos como dispositivos, de origem sintética ou natural, que entram em contato com sistemas biológicos a fim de tratar, suplementar ou substituir tecidos, funções ou órgãos do corpo. Podem ser citados como exemplo suturas, marca-passo, tubos de circulação sanguínea, material para restauração dentária, substitutos ósseos, órgãos artificiais, dentre outros (PIRES, 2015).

O estudo dos biomateriais vem sofrendo notáveis evoluções desde o século passado, sendo que estes podem ser classificados em quatro diferentes gerações.

##### 3.1.1 Primeira Geração de Biomateriais

Durante as décadas de 1960 e 1970 prezava-se pela mínima interação dos materiais implantados com o meio vivo, a fim de se minimizar respostas imunológicas. Assim os materiais bioinertes eram os mais utilizados para o reparo ósseo, por possuírem justamente a característica de não interagir com o meio vivo, sendo isolados do tecido hospedeiro por uma camada de tecido fibroso que forma-se ao seu redor (NING, 2015). Exemplos desse tipo de material são algumas classes de metais, como, aços inoxidáveis, ligas de titânio e ligas à base de cromo e cobalto. Esses materiais destacam-se pela sua elevada resistência mecânica, sendo esta a sua principal vantagem em aplicações como substitutos ósseos. Mas, com o passar do tempo podem vir a sofrer desgaste e corrosão no meio vivo, liberando íons metálicos responsáveis pela geração de reações inflamatórias (PIRES, 2015; OLIVEIRA, 2010).

##### 3.1.2 Segunda Geração de Biomateriais

A ênfase no desenvolvimento de biomateriais mudou de inertes para ativos, ou seja, materiais que interagissem com o meio vivo. Em meados da década de 1980 diversas cerâmicas, como a hidroxiapatita, e biovidros começaram a ser utilizados em aplicações ortopédicas e odontológicas. Esses materiais chamados de bioativos mostraram-se capazes de estabelecer uma ligação química com o tecido hospedeiro, formando uma interface

mecanicamente forte, esta propriedade é conhecida como osteocondução. Neste período também foram desenvolvidos materiais reabsorvíveis, os quais eram gradativamente substituídos pelo tecido em regeneração, exemplo desse tipo de material foram as suturas poliméricas que eram rotineiramente utilizadas. Mesmo com todos esses importantes avanços a taxa de falhas dos implantes continuava significativamente alta, principalmente entre 10 a 25 anos depois da realização dos procedimentos, sendo necessária nova cirurgia. Acontece que o tecido vivo está constantemente respondendo a modificações fisiológicas e bioquímicas do corpo, o que não é verdade para os materiais sintéticos implantados, o que acaba por prejudicar a vida útil destes (HENCH e POLAK, 2002).

### 3.1.3 Terceira Geração de Biomateriais

A partir dos anos 2000, a terceira geração de biomateriais surgiu pela busca de uma nova estratégia de engenharia e reparação tecidual. Através da combinação de materiais bioativos e reabsorvíveis, foram desenvolvidos materiais inteligentes capazes de se adaptar ao ambiente fisiológico estimulando a diferenciação celular e consequente regeneração tecidual por meio da ativação de respostas celulares específicas a nível molecular. Esta mostrou ser uma área muito promissora no aprimoramento dos biomateriais, pois agora, além da manipulação da bioatividade do material implantado, a terceira geração foi pensada para estimular a regeneração dos tecidos vivos (HENCH e POLAK, 2002; NING, 2015).

### 3.1.4 Quarta Geração de Biomateriais

Recentemente, a quarta geração de biomateriais está baseada no comportamento eletrofisiológico de células e tecidos, pois sabe-se hoje que sinais elétricos são gerados e recebidos por todas as células do corpo. Esses sinais bioelétricos têm sido associados ao controle de diferentes comportamentos celulares como, diferenciação, proliferação, apoptose (morte celular), migração, entre outros. Além disso, foi observado que a estimulação elétrica pode ter efeito sobre a cicatrização e regeneração de tecidos, como pele, ossos e nervos. Sendo assim no presente período biomateriais eletroativos como, materiais piezoelétricos, por exemplo, têm despertado grande interesse para atuarem na engenharia tecidual por causa da sua capacidade em fornecer estimulação elétrica (NING, 2015).

### 3.1.5 Biocerâmicas

Não é de hoje que cerâmicas têm sido utilizadas como biomateriais em diversas aplicações na engenharia de tecidos. No final do século XIX o gesso ( $\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ ) já era utilizado em implantes para reparo ósseo. Porém, suas características desfavoráveis, como baixa resistência mecânica e acelerada degradação quando implantado no organismo vivo, fizeram com que seu uso como biomaterial cessasse. Foi mais tarde, na década de 70, que outros materiais cerâmicos passaram a ser utilizados como biomateriais e, conseqüentemente, serem classificados como biocerâmicas. A alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) é um exemplo desse tipo de material. Por apresentar biocompatibilidade e alta resistência mecânica, ela foi muito empregada em implantes ortopédicos daquela época, e ainda o é até os dias de hoje (KAWACHI, 2000).

Atualmente as biocerâmicas têm sido utilizadas de muitas formas, podendo atuar de maneira isolada, no revestimento de materiais metálicos e também formando compósitos com outros materiais, como polímeros. Algumas biocerâmicas como a hidroxiapatita e o fosfato tricálcico são capazes de estabelecer uma ligação com o tecido vivo quando implantadas. Essa ligação ocorre, basicamente, por meio da mineralização de uma camada de apatita que se estabelece na interface tecido-implante. Por este motivo, estas biocerâmicas são chamadas de bioativas. Por outro lado, algumas biocerâmicas como a zircônia e a alumina são classificadas como bioinertes, pois quando implantadas no meio vivo acabam sendo encapsuladas por um tecido fibroso que as isola do tecido hospedeiro (KAWACHI, 2000; ANDRADE e DOMINGUES, 2006).

#### 3.1.5.1 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HAp) ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) é uma biocerâmica pertencente à família dos fosfatos de cálcio, apresenta composição química muito semelhante com a fase mineral dos ossos e dentes e possui razão molar Ca/P igual a 1,67, o que faz com que sua biodegradação *in vivo* ocorra de forma lenta. Além disso, a HAp apresenta importantes propriedades como, osteocondutividade, alta biocompatibilidade e bioatividade, e propriedades estruturais muito parecidas com as dos tecidos duros do corpo humano (PIRES, 2015; UYSAL, 2013; SIVARAJ, 2020).

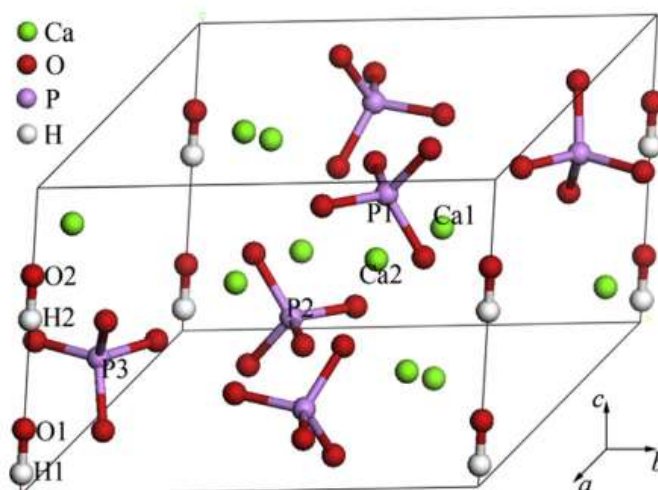
Os métodos de obtenção da hidroxiapatita podem ser sintéticos (método sol-gel, processos hidrotermais, precipitação e outros) ou naturais (osso de peixe, osso bovino, casca

de ovo, conchas). Estudos demonstraram que a hidroxiapatita obtida por meios naturais possui vantagens em comparação com aquela obtida por via sintética, apresentando maior resposta bioativa e melhor atividade metabólica (SHARIFIANJAZI, 2021). Além disso, a obtenção da HAp por meio de fontes naturais oferece um novo destino a materiais que antes seriam descartados, como ossos bovinos de açougues, por exemplo.

A hidroxiapatita cristaliza-se na forma hexagonal com grupo espacial  $P63/m$ . Possui parâmetros de rede correspondentes a: “a” = “b” = 0,9432 nm e “c” = 0,6881 nm. A rede cristalina da hidroxiapatita pode ser descrita como uma reunião compacta de grupos  $PO_4$  tetraédricos, onde os vértices são ocupados por quatro átomos de oxigênio com íons  $P^{5+}$  no centro (Figura 1). Esses tetraedros de fosfato recebem, então, o nome de ortofosfato. A forma como os tetraedros dos grupos  $PO_4$  estão arranjados permite a formação de dois tipos sítios não conectados. O primeiro deles possui diâmetro de aproximadamente 0,25 nm, sendo cercado por íons  $Ca^{2+}$ . Já o segundo canal tem diâmetro de aproximadamente 0,30 a 0,35 nm, possuindo seis outros íons  $Ca^{2+}$  (FIHRI, 2017; COSTA, A. 2009).

Em sua estrutura cristalina a hidroxiapatita pode comportar substituições para os grupos  $Ca^{2+}$ ,  $PO_4^{3-}$  e  $OH^-$  por outros íons. Estas substituições podem afetar os parâmetros de rede, a cristalinidade, solubilidade, morfologia e estabilidade térmica da hidroxiapatita. Há dois tipos de substituições, a do tipo A, onde o  $OH^-$  tem sua localização estrutural ocupada pelo grupo carbonato  $CO_3^{2-}$ , e a do tipo B, onde o íon  $PO_4^{3-}$  tem a sua posição ocupada pelo grupo carbonato  $CO_3^{2-}$ . A substituição do íon carbonato aumenta a taxa de deposição óssea em torno de implantes de HAp (BONADIO, 2011; COSTA, A. 2009; BEST, 2008).

Figura 1 - Representação da estrutura cristalina da hidroxiapatita (HAp).



Fonte: REN, 2013.

Por suas excelentes propriedades bioativas, a hidroxiapatita é amplamente empregada na confecção de biomateriais. Pesquisas têm demonstrado o uso dessa biocerâmica como revestimento de ligas metálicas, por exemplo, a fim de que a bioatividade desses materiais seja melhorada. WU, S.; et al. (2015) demonstraram que células mesenquimais da medula óssea apresentaram maior atividade osteogênica quando cultivadas em substrato de titânio (Ti) revestido com HA, em comparação com substrato sem revestimento. Recentemente, NUSWANTORO, N. F.; et al. (2021) realizaram testes com liga de titânio revestida com hidroxiapatita em tíbias de ratos de teste Wistar. Os implantes de liga de Ti com revestimento de HAp exibiram maior osseointegração em comparação com o implante de liga de Ti não revestido. Da mesma forma, cerâmicas a base de fosfato de cálcio também têm sido utilizadas como fase dispersa em matrizes poliméricas para a obtenção de compósitos bioativos com propriedades específicas. Nesse sentido, o processo de eletrofição tem sido largamente empregado. Por meio desse método é possível a obtenção de fibras poliméricas com incorporação de diferentes materiais. DELIORMANLI e KONYALI (2018) adicionaram partículas de hidroxiapatita em matriz de policaprolactona (PCL). Testes de bioatividade *in vitro* mostraram que as mantas com PCL/HAp apresentaram resposta bioativa mais alta do que mantas de PCL com incorporação de biovidro. Em outro trabalho, LAO et al. (2010) realizaram eletrofição de membranas nanofibrosas compostas por poli(lático-co-glicólico)ácido (PLGA), com adição de nanopartículas de hidroxiapatita. Essas membranas apresentaram alta resposta bioativa em testes realizados *in vitro*.

Entretanto, as aplicações da HAp podem ir além de substitutos para o tecido ósseo. SUGHANTHY et al. (2020), por exemplo, confeccionaram fibras eletrofiadas de polietileno tereftalato (PET) com adição de micro partículas de hidroxiapatita com o objetivo de se obter membranas capazes de atuar na reparação da pele.

### 3.2 BIOCAMPÓSITOS PIEZOELÉTRICOS

A piezoelectricidade é a propriedade que certos materiais possuem de gerar sinais elétricos quando expostos a uma contração ou extensão dimensional (piezoelectricidade direta). O inverso também ocorre, ou seja, no caso de um campo elétrico aplicado ao material o mesmo sofre contração (piezoelectricidade inversa) (HENCH e POLAK, 2002; HINCHET, 2018)

Sabe-se hoje que tecidos do corpo humano, como ossos, pele e cartilagem articular possuem caráter piezoelétrico. Por isso, atualmente, materiais com essas propriedades têm sido forte objeto de estudo para atuar na engenharia tecidual, pois são capazes de promover

maior reparo e regeneração dos tecidos nos quais são implantados (TANDON, 2018; MORE e KAPUSETTI, 2017).

Diversas pesquisas têm demonstrado que a união entre materiais bioativos, como biocerâmicas, e materiais piezoelétricos tem formado biocompósitos com melhor capacidade bioativa do que aqueles sem propriedades piezoelétricas. Em 1997, JIANQING et al. já haviam demonstrado que a hidroxiapatita associada ao titanato de bário (HABT), uma cerâmica piezoelétrica, foi capaz de promover o reparo de fratura óssea em maxilares de cães de forma mais efetiva quando comparada a hidroxiapatita pura. Um compósito à base de HA $\beta$  (cerâmica bifásica composta de hidroxiapatita e fosfato tricálcico) e poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF), um polímero com propriedades piezoelétrica e ferromagnética, foi testado por BONADIO et al. em 2017. Este compósito mostrou alta capacidade bioativa em testes realizados com fluido corpóreo simulado (SBF), quando comparado a uma amostra controle de HA $\beta$ . SWAIN, S. et al. (2020) demonstraram que um compósito a base de hidroxiapatita polarizada com carga positiva e titanato de bário apresentou ação bactericida, que foi atribuída a superfície positivamente polarizada desse material, a qual pode ter sido responsável por romper a membrana das bactérias. Recentemente, CAI, K.; et al. (2021) revestiram uma liga de titânio TC4 com titanato de bário e então utilizaram ultrassom pulsado de baixa intensidade para estimular a resposta piezoelétrica do material. Testes em cultura de células pré-osteoblásticas demonstraram aumento na osteogênese.

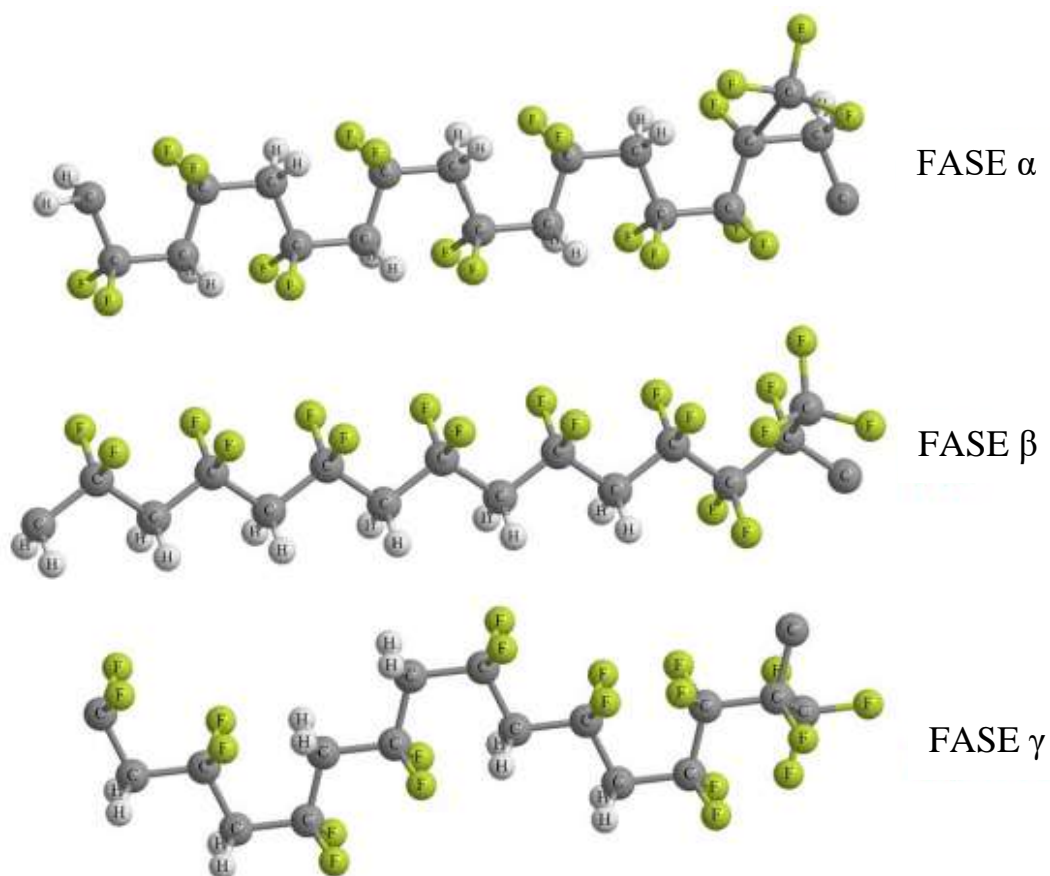
A influência do efeito piezoelétrico na diferenciação celular pode estar relacionada à formação de carga superficial na superfície das células, o que facilitaria trocas iônicas do meio intracelular com o meio extracelular (RAJABI, 2015). Além disso, é sabido que superfícies eletricamente carregadas são capazes de influenciar o crescimento e adesão das células osteoblásticas. Neste sentido pode-se entender porquê biocompósitos piezoelétricos podem possuir vantagem frente a outros tipos de materiais em implantes ósseos (RIBEIRO, 2015b)

### 3.2.1 Poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF)

O poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF) é um polímero semicristalino que apresenta estabilidade térmica, flexibilidade e resistência química (HE, 2021). Sua fórmula química é (-CH<sub>2</sub>-CF<sub>2</sub>-), podendo existir em diversas fases, sendo as três fases principais:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . A fase  $\alpha$  é a termodinamicamente mais estável, possuindo uma conformação de cadeia polimérica do tipo trans-gauche alternada (TGTG'). Já a fase  $\beta$  possui conformação de

cadeia polimérica toda trans (TTTT), com os átomos de flúor se opondo aos átomos de hidrogênio, conferindo ao monômero um momento de dipolo efetivo. Por esse motivo, a fase  $\beta$  é a que apresenta propriedades piezoelétricas e ferroelétricas de maneira mais acentuada em comparação com as demais fases do PVDF. Por fim, a fase  $\gamma$  apresenta conformação de cadeia polimérica do tipo trans-gauche tripla alternada ( $T_3GT_3G'$ ), apresentando, dessa forma momento de dipolo resultante do monômero, porém não tão intenso quanto aquele da fase  $\beta$  (TANDON, 2018; GEE, 2018). A Figura 2 mostra uma representação do PVDF conformado nessas três fases.

Figura 2 - Representação das fases  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  do PVDF. As esferas em cinza representam átomos de carbono (C), as em verde representam átomos de flúor (F) e as em branco representam átomos de hidrogênio (H).



Fonte: POLAT, 2020 com modificações.

Devido as interessantes propriedades da fase  $\beta$  do PVDF muitas técnicas são utilizadas para a obtenção dessa conformação polimérica. O uso de solvente com elevado momento de dipolo, como é o caso da dimetilformamida, pode favorecer a conformação do



polímero nessa fase piezoelétrica, por causa da lenta taxa de evaporação. Por outro lado, isso pode levar a formação de defeitos tipo contas (*beads*) nas fibras, então a adição de um solvente mais volátil na solução, como é o caso da acetona, poderia favorecer uma taxa de evaporação mais rápida e, conseqüentemente, menos formação de *beads* (TANDON, 2019). Há relatos ainda de que a adição de acetona à solução de PVDF/DMF favorece ainda mais a obtenção de fase  $\beta$  do polímero, por conta do maior estiramento da solução polimérica devido a diminuição da viscosidade da solução (COSTA, L. 2009b). A técnica de eletrofiação também é conhecida pelo seu favorecimento à formação de fase  $\beta$  do PVDF, por conta do estiramento das cadeias poliméricas associada a aplicação de elevada tensão elétrica (TANDON, 2018).

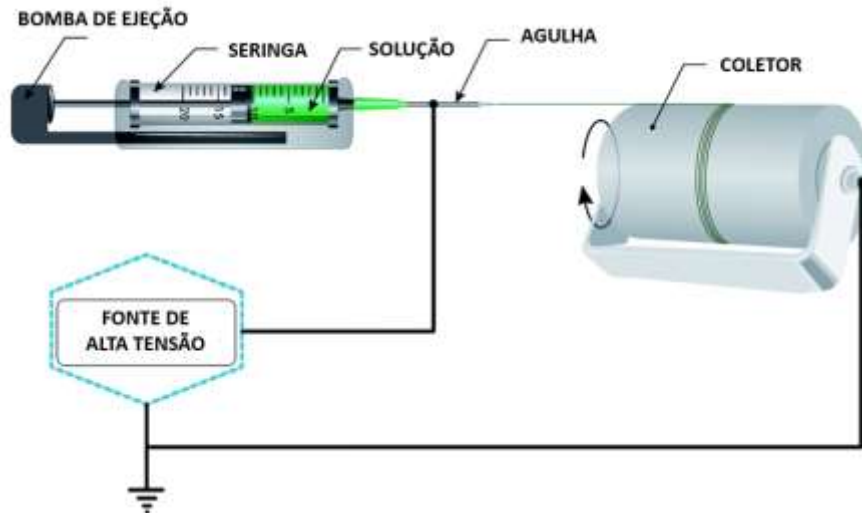
Por conta de suas propriedades piezoelétricas, o PVDF (fase  $\beta$ ) é visto como um excelente candidato para atuar na regeneração de tecidos danificados. Trabalhos da literatura relatam o uso do PVDF como matriz polimérica em compósitos para aplicações biomédicas. Em 2007, BRAGA, et al. produziram filmes de PVDF/HAp, testes em cultura de células NCTC clone 929 demonstraram que o compósito não apresenta toxicidade. Mais recentemente, pesquisa realizada por CHENG, Y.; et al. (2020) demonstrou que *scaffolds* porosos de PVDF/policaprolactona (PCL) estimularam a proliferação e diferenciação de células Schwann de rato, por conta das interações eletromecânicas.

Pesquisas também relatam a obtenção de compósitos a base de PVDF por meio do método de eletrofiação. COSTA, L. (2009a) incorporou nanopartículas de prata (Ag) e de prata/dióxido de titânio (Ag/TiO<sub>2</sub>) em matriz de PVDF, a fim de se obter membranas eletrofiadas com ação bactericida e fungicida. Em outra pesquisa, TANDON, B. et al. (2019) incorporaram nanopartículas de hidroxiapatita (HAp) em matriz de PVDF, a fim de conceder propriedades bioativas ao polímero. Vale ressaltar que em ambas as pesquisas, foram obtidos valores significativamente elevados para as porcentagens de fase  $\beta$  do PVDF, muito provavelmente por causa do processo de eletrofiação.

### 3.3 ELETROFIAÇÃO

No processo de eletrofiação é possível obter fibras da ordem de micro e nanômetros através do estiramento de uma solução polimérica que é submetida a uma diferença de potencial da ordem de kV. A Figura 3 mostra a representação esquemática de um equipamento de eletrofiação.

Figura 3 - Representação esquemática de um equipamento de eletrofição.



Fonte: NIKMARAM, 2017 com modificações.

O procedimento ocorre da seguinte forma: primeiramente o polímero é dissolvido com o auxílio de solventes apropriados, essa solução é então colocada em uma seringa onde é fixada uma agulha hipodérmica com abertura da ordem de  $\mu\text{m}$ . Uma diferença de potencial é aplicada entre a agulha hipodérmica (polo positivo) e um anteparo aterrado (polo negativo), que pode ser desde uma placa fixa até um cilindro rotativo, gerando um campo elétrico. A seringa é acoplada a um equipamento responsável por ejetar essa solução a uma velocidade controlada, assim, uma gota se forma na extremidade da agulha. Cargas elétricas se acumulam na gota, e conforme a tensão aplicada aumenta a gota alonga-se adquirindo uma forma cônica, denominada cone de Taylor. Quando a força eletrostática atinge um valor crítico, superando a tensão superficial e viscoelasticidade da solução, forma-se um jato, que é acelerado até o coletor. Nesse trajeto o solvente da solução evapora e as fibras formadas pelo polímero são coletadas. (MOKHTARI, 2015; COSTA, L. 2009b, GOMES, 2018). A Figura 3 mostra um esquema desse processo.

### 3.3.1 Parâmetros da eletrofição

Apesar de se apresentar como um processo versátil, a eletrofição possui uma série de parâmetros que, quando alterados, podem influenciar significativamente nas propriedades das fibras obtidas. Esses tópicos serão abordados a seguir:

- Velocidade de ejeção da solução: A velocidade de ejeção da solução polimérica pode ter influência na espessura das fibras obtidas. Normalmente, uma velocidade menor vai

favorecer o maior estiramento da solução, e conseqüentemente a obtenção de fibras mais finas (UNNITHAN, 2015). Nesse trabalho, porém, foi observado que velocidades muito baixas podem ocasionar o rompimento do jato durante o voo da solução, favorecendo a formação de fibras com defeitos. Mas é importante ressaltar que isso depende de outros parâmetros, pois um pode ter influência sobre os outros, como a tensão aplicada e distância agulha-coletor.

- Tensão aplicada: A tensão elétrica tem um papel fundamental no processo de eletrofição. Alguns trabalhos destacam que uma tensão muito elevada poderia favorecer a formação de fibras mais espessas, uma vez que a solução polimérica teria um tempo de voo até o coletor reduzido (por conta do intenso campo elétrico formado) e assim o solvente não evaporaria totalmente, causando a junção das fibras. Por outro lado, esse fator vai depender da distância agulha-coletor, pois se essa distância for aumentada poderá haver um maior estiramento da solução, resultando em fibras mais finas (UNNITHAN, 2015; COSTA, L. 2009b).
- Distância agulha-coletor: A distância da agulha de onde a solução polimérica é ejetada até o coletor é de suma importância para a evaporação do solvente durante o voo do jato da solução. Uma distância muito pequena pode induzir a fusão das fibras por conta da não completa evaporação do solvente, causada pelo baixo tempo de voo da solução, resultando em diâmetros mais elevados. Por outro lado, uma distância muito grande pode acarretar em uma diminuição da intensidade do campo elétrico (para uma mesma tensão aplicada), desfavorecendo o estiramento da solução (COSTA, L., 2009b). Sendo assim, a distância agulha-coletor deve obedecer a um valor ideal dependendo da tensão aplicada e também da velocidade de ejeção da solução polimérica.
- Velocidade de rotação do coletor: No caso do uso de coletores rotativos, velocidades mais elevadas de rotação tendem a favorecer o alinhamento das fibras, em comparação com velocidades mais baixas ou com coletores estáticos (COSTA, 2012). A orientação das fibras seria algo vantajoso na obtenção de biocompósitos eletrofiados, uma vez que, de acordo com AGARWAL, S.; et al. (2008), fibras orientadas favorecem a proliferação celular e influenciam o sentido do crescimento destas.
- Propriedades da solução polimérica: Não são apenas os parâmetros do equipamento de eletrofição que influenciam nas propriedades das fibras obtidas, nesse processo a solução polimérica também desempenha um importante papel. A escolha do solvente utilizado influencia na condutividade da solução, que por sua vez influencia no diâmetro das fibras. De acordo com COSTA, L. (2009b) uma alta condutividade implica em um

melhor transporte de cargas ao longo da fibra, o que proporciona maior estiramento e, conseqüentemente, formação de fibras mais finas e alongadas. Nesse sentido, o uso de solventes como a dimetilformamida (DMF) pode ser favorável, por se tratar de um solvente com alta constante dielétrica. A incorporação de sais iônicos também pode aumentar a condutividade da solução (GOMES, 2018). Outra propriedade importante da solução polimérica é a viscosidade, que é diretamente influenciada pela concentração de polímero (soluções mais concentradas são mais viscosas). Uma viscosidade muito elevada pode levar a formação de fibras espessas, por conta da dificuldade de estiramento da solução. Entretanto, se a solução for pouco viscosa, pode ocorrer o fenômeno de eletropulverização (electrospray), ou seja, formação de partículas poliméricas ao invés de fibras. Portanto faz-se necessário a obtenção de uma solução polimérica com concentração adequada, o que por sua vez resulta em viscosidade adequada, capaz de formar fibras o quanto mais lisas e homogêneas possível (UNNITHAN, 2015; COSTA, L., 2009b).

- Condições ambientais: A umidade relativa do ar também pode ter influência nas propriedades das fibras eletrofiadas. A taxa de evaporação do solvente pode ficar mais lenta caso a umidade relativa do ar esteja elevada, o que poderia levar a formação de defeitos nas fibras por conta da junção destas no coletor. Ao mesmo tempo, a umidade do ar muito baixa pode dificultar o estiramento do jato, por causa da rápida evaporação do solvente, resultando em fibras mais espessas (UNNITHAN, 2015; COSTA, L., 2009b).

## 4 METODOLOGIA

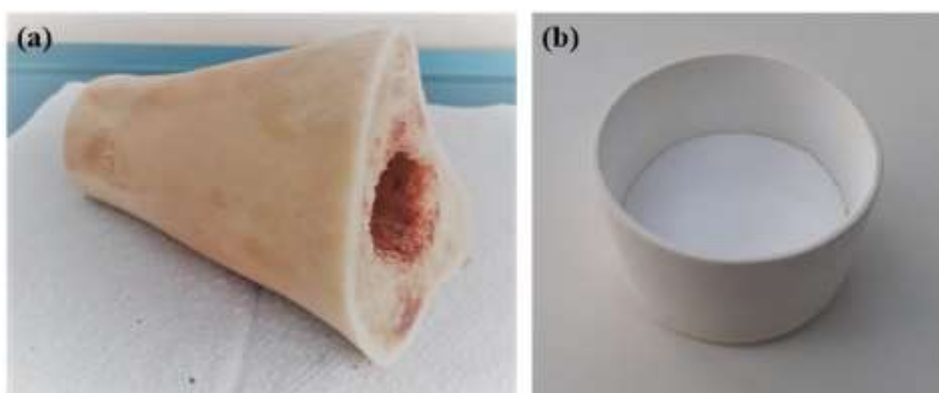
### 4.1 OBTENÇÃO DOS MATERIAIS PRECURSORES

Para a confecção das fibras utilizou-se o polímero PVDF (Alfa-Aesar 99,8%) na forma de pó, com massa molecular igual a  $6,4 \times 10^4$  g/mol, sendo considerado um polímero de baixo peso molecular. Para a dissolução do polímero foram utilizados os solventes dimetilformamida (DMF) ( $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$ ) (Dinâmica, 99,8%) e acetona ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ ) (Anidrol, 99,5%).

Para a fabricação de fibras bioativas foi utilizada a biocerâmica hidroxiapatita (HAp). A obtenção da HAp se deu por meio de osso bovino, oriundo de resíduos de açougue local

(Figura 4a). Como primeira etapa o osso foi fervido em água por, aproximadamente, 30 minutos e lavado com escova para remoção de matéria orgânica (carnes, cartilagens, etc.). Em seguida, foi calcinado em forno mufla à 900 °C durante 4 horas, restando, dessa forma, apenas a fase mineral do osso. Após isso, o mesmo foi moído em almofariz de ágata e então, o pó proveniente deste processo (Figura 4b), foi novamente submetido a calcinação em forno mufla à 900 °C durante 4 horas, para eliminação de quaisquer impurezas (pois haviam ainda algumas regiões amareladas no osso, o que poderia indicar presença de matéria orgânica).

Figura 4 - (a) Osso bovino utilizado para obtenção de hidroxiapatita. (b) Pó proveniente da moagem em almofariz do osso bovino calcinado a 900 °C por 4 horas.



Fonte: A autora (2021).

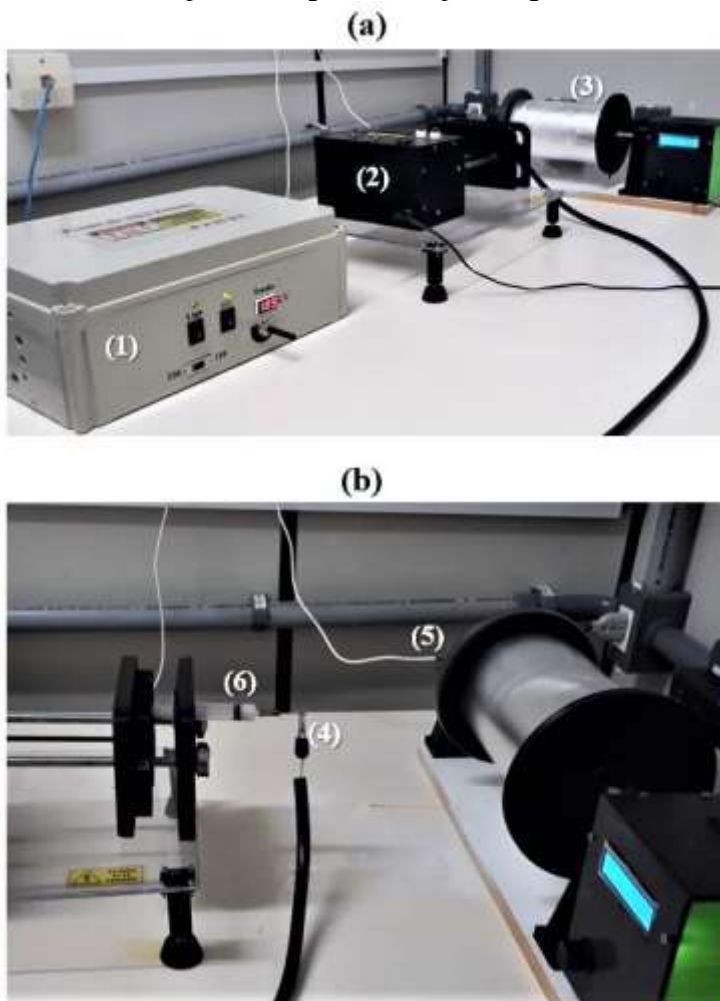
Por fim, com o objetivo de se obter partículas de tamanhos nano e micrométricos, o pó obtido através do osso bovino passou por processo de moagem em moinho de alta energia excêntrico, modelo CB2-T da BP engenharia, durante 16 horas. Foi utilizado um cadinho de aço inox de 50 ml e esferas de zircônia de 8 milímetros de diâmetro, com razão massa esfera: massa pó de 10:1. A obtenção de partículas dessa ordem de tamanho é importante para que as mesmas, quando incorporadas à solução polimérica, sejam dispersas da melhor forma possível, uma vez que aglomerações e a presença de partículas muito grandes poderia resultar no entupimento da agulha durante o processo de eletrofição.

O osso bovino foi escolhido com base em trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa. Já era conhecido que por meio do osso bovino é possível a obtenção de HAp monofásica. Ressalta-se ainda o fato de que esse material pode ser facilmente encontrado em açougues, colaborando para que seja dado um destino diferente a um resíduo que seria descartado. Também vale mencionar que com uma única peça desse osso (um pedaço de fêmur, por exemplo) pode-se obter uma quantidade considerável de HAp.

## 4.2 DISPOSITIVO DE ELETROFIAÇÃO

O aparato utilizado para eletrofiação está apresentado na Figura 5.

Figura 5 - Equipamento de eletrofiação. (a) Fonte de alta tensão (1); bomba de seringa (2) e coletor (3). (b) Polo positivo (4) conectado à ponta da agulha (6) e polo negativo (5) conectado ao coletor.



Fonte: A autora (2021).

O equipamento é constituído por uma fonte de alta tensão (1), que pode variar de 0 a 25 kV, uma bomba de seringa (2), com a qual é possível variar a velocidade de ejeção da solução e um coletor rotacional (3), onde as fibras são depositadas. Durante o processo os polos, positivo (4) e negativo (5) provenientes da fonte de alta tensão, são conectados na ponta de uma agulha hipodérmica com diâmetro de 0,7 mm (6) e no coletor, respectivamente. Assim, conforme a solução é ejetada a mesma é esticada pela diferença de potencial existente entre agulha e coletor formando um jato contínuo.

### 4.3 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

#### 4.3.1 Soluções PVDF em DMF/acetona

As soluções contendo apenas PVDF dissolvido em DMF/acetona, foram feitas em três diferentes proporções. A primeira teve 18% de PVDF em massa dissolvido em DMF/acetona na proporção de (80/20) em massa. A segunda teve 16% de PVDF em massa dissolvido em DMF/acetona na proporção de (70/30) em massa. Por fim, a terceira teve 14% de PVDF em massa dissolvido em DMF/acetona na proporção de (60/40) em massa. Para fins de simplificação essas amostras serão designadas ao longo de todo o trabalho pelas siglas P18, P16 e P14, respectivamente. As proporções foram feitas dessa forma apenas dividindo-se a primeira proporção em duas outras porções e fazendo, em seguida, a adição de mais acetona nestas, com o intuito de se obter soluções cada vez menos viscosas.

Para preparar cada uma das soluções, primeiramente, PVDF, DMF e acetona foram pesados em balança digital analítica de acordo com as quantidades necessárias para se fazer a proporção denominada P18. O DMF foi aquecido a 80 °C e mantido sob agitação constante com o auxílio de um agitador magnético. Em seguida, o PVDF foi adicionado aos poucos ao DMF, até que todo o pó fosse completamente dissolvido. Essa mistura foi mantida sob agitação e aquecimento por, aproximadamente, 1 hora. Após esse período desligou-se o aquecimento e aguardou-se até que a solução ficasse à temperatura ambiente. Depois disso a acetona foi adicionada a mistura que ficou sob agitação por mais 30 min, até que se obtivesse uma solução homogênea. Para as demais soluções apenas foi adicionada maior quantidade de acetona nessa solução já preparada. Todos os processos de agitação foram realizados em frascos fechados para evitar a evaporação dos solventes.

#### 4.3.2 Soluções PVDF em DMF/acetona com incorporação de HAp

Foram feitas soluções contendo 10, 15 e 20% de HAp em massa, incorporadas em soluções P14. As proporções de solvente e PVDF foram escolhidas conforme aquela que apresentou melhores resultados dentre as soluções feitas anteriormente (sem HAp), quanto a quantidade de fase  $\beta$  do PVDF e quanto aos diâmetros das fibras eletrofiadas. Ao longo do texto as amostras contendo 10, 15 e 20% de HAp serão designadas pelas siglas, P14-H10, P14-H15 e P14-H20, respectivamente.

Para preparar cada uma das soluções, primeiramente, HAp, PVDF, DMF e acetona foram pesados em balança digital analítica de acordo com as quantidades necessárias para se fazer as soluções. Primeiramente a HAp foi incorporada ao DMF e essa mistura foi mantida em agitação por 16 horas, para que houvesse uma boa dispersão das partículas. Na sequência, essa dispersão inicial, mantida sob agitação, foi aquecida a 80 °C e o PVDF foi adicionado aos poucos à mistura até que todo o pó fosse completamente dissolvido. Essa mistura foi mantida sob agitação e aquecimento por, aproximadamente, 4 horas para que houvesse boa incorporação das partículas de HAp no polímero dissolvido. Após esse período desligou-se o aquecimento e aguardou-se até que essa mistura atingisse a temperatura ambiente. Depois disso a acetona foi adicionada à mistura que ficou sob agitação por mais 30 min, até que se obtivesse uma boa dispersão das partículas de HAp. Todos os processos de agitação foram realizados em frascos fechados para evitar a evaporação dos solventes.

#### 4.4 PROCESSO DE ELETROFIAÇÃO

##### 4.4.1 Soluções PVDF em DMF/acetona

Cada uma das soluções foi colocada em seringa de 5 ml com agulha hipodérmica com diâmetro de 0,7 mm para serem eletrofiadas. Os parâmetros utilizados foram os mesmos para as três soluções, sendo, velocidade de ejeção da solução: 0,83 ml/h; velocidade de rotação do coletor: 270 cm/s; tensão aplicada:  $18 \pm 1$  kV e distância agulha-coletor: 15 cm.

Esses parâmetros foram escolhidos com base em testes realizados com as soluções, variando-se a velocidade de ejeção e tensão aplicada. Alguns trabalhos da literatura foram utilizados como referência nessa etapa (COSTA, L. M. M., 2009b e TANDON, B.; et al., 2019). Durante esse processo, um microscópio óptico foi utilizado para observar se as fibras continham muitos defeitos, e assim, os parâmetros para os quais as fibras apresentaram mais homogeneidade foram selecionados.

Em todos os casos a umidade relativa do ar ficou entre 45 e 53% e a temperatura ambiente entre 21 e 25 °C. O processo de eletrofiação foi mantido durante 2 a 3 horas, para todas as soluções, a fim de que fossem obtidas membranas com espessura suficiente para a realização das caracterizações.



#### 4.4.2 Soluções PVDF em DMF/acetona com incorporação de HAp

Cada uma das soluções foi colocada em seringa de 5 ml com agulha hipodérmica com diâmetro de 0,7 mm para serem eletrofiadas. Os parâmetros utilizados foram os mesmos para as três soluções, sendo, velocidade de ejeção da solução: 0,35 ml/h; velocidade de rotação do coletor: 270 cm/s; tensão aplicada: 15 ~ 17 kV e distância agulha-coletor: 15 cm. Em todos os casos a umidade relativa do ar ficou entre 50 e 53% e a temperatura ambiente entre 18 e 21 °C. O processo de eletrofiação foi mantido durante 2 a 3 horas, para todas as soluções, a fim de que fossem obtidas membranas com espessura suficiente para a realização das caracterizações.

#### 4.5 TESTES DE BIOATIVIDADE *IN VITRO* COM FLUIDO CORPORAL SIMULADO (SBF)

Testes de bioatividade *in vitro* foram conduzidos nas amostras P14 (controle), P14-H10 e P14-H15 e também em amostra padrão de HAp. As membranas foram escolhidas de acordo com aquelas que apresentaram os melhores resultados quanto a morfologia das fibras (homogeneidade e menor valor médio dos diâmetros). Fibras com tamanhos da ordem de nanômetros se assemelham a matriz extracelular, proporcionando melhor adesão e proliferação celular (JING, 2014).

##### 4.5.1 Síntese do SBF

A síntese do SBF foi obtida no Laboratório Didático de Biofísica do Departamento de Física da Universidade Estadual do Centro-Oeste seguindo o protocolo proposto por KOKUBO e TAKADAMA (2006). Para preparar o SBF, as massas dos reagentes foram medidas em uma balança analítica e dissolvidas vagarosamente, uma a uma, em um Becker de polipropileno contendo 700 ml água deionizada a 36,5 °C (temperatura média do corpo humano) de acordo com a ordem e a quantidade presentes na Tabela 1.

Tabela 1 - Ordem, fórmula química, quantidade, massa molar e concentração dos reagentes utilizados na síntese do SBF.

<b>Ordem</b>	<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Massa Molar (g/mol)</b>	<b>Concentração (mol/L)</b>
<b>1</b>	NaCl	8,035 g	58,4430	0,137
<b>2</b>	NaHCO <sub>3</sub>	0,355 g	84,0068	4,226 x 10 <sup>-3</sup>
<b>3</b>	KCl	0,255 g	74,5515	3,420 x 10 <sup>-3</sup>
<b>4</b>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	0,231 g	228,2220	1,012 x 10 <sup>-3</sup>
<b>5</b>	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,311 g	203,3034	1,628 x 10 <sup>-3</sup>
<b>6</b>	HCl – 1 M	39 ml	-	-
<b>7</b>	CaCl <sub>2</sub>	0,292 g	110,9848	2,631 x 10 <sup>-3</sup>
<b>8</b>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,072 g	142,0428	5,069 x 10 <sup>-3</sup>
<b>9</b>	Tris ((HOCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> (CNH <sub>2</sub> ))	6,118 g	121,1356	0,051
<b>10</b>	HCl – 1 M	0 – 5 mL	-	-

Fonte: KOKUBO e TAKADAMA (2006) com modificações.

Em seguida mais água deionizada foi adicionada à mistura até completar 900 ml, então dissolveu-se vagarosamente a quantidade de 6,118 g de Tris hidroximetil amino metano ((HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>(CNH<sub>2</sub>)), tomando-se o devido cuidado para que o pH não ultrapassasse o valor de 7,45 utilizando-se, para isso, até 5 ml de ácido clorídrico (HCl). Ao final do processo, o becker foi completado com água deionizada até atingir a quantidade 1000ml, o pH da solução permaneceu em 7,4 (pH do sangue) mantendo-se a temperatura em 36,5 ± 1,5 °C. Por fim, depois de preparado o SBF ficou conservado em refrigerador entre 5 e 10 °C por até 28 dias.

#### 4.5.2 Preparação das amostras

Para a realização do teste de bioatividade com SBF novas amostras foram eletrofiadas, seguindo os parâmetros descritos na seção 4.4. Após o procedimento todas foram cobertas com papel filme e guardadas em local protegido do ambiente, para evitar possíveis contaminações. Um dia antes da imersão no fluido corporal simulado, as amostras foram cortadas em retângulos de aproximadamente 2 cm de comprimento por 1 cm de

largura e lavadas em ultrassom com água deionizada por 10 minutos. Após este processo, as mesmas foram colocadas para secar em estufa a 40 °C, durante 8 horas.

#### 4.5.3 Realização dos testes de bioatividade *in vitro*

Os testes foram realizados no Laboratório Didático de Biofísica do Departamento de Física da Unicentro, em condições fisiológicas, ou seja, em temperatura de 36,5 °C e pH de aproximadamente 7,4. Para isso, utilizou-se o um banho térmico confeccionado com materiais de baixo custo. Cada amostra foi imersa em SBF em frascos de polipropileno de 15 mL, sendo a solução renovada todos os dias. O teste de bioatividade foi realizado com cada amostra em períodos de 7 e 21 dias.

Depois de retiradas do banho, as peças foram borrifadas suavemente com água deionizada e armazenadas em estufa a 40 °C durante, aproximadamente, 8 horas.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

Testes de citotoxicidade *in vitro* foram conduzidos nas amostras P14 (controle), P14-H10 e P14-H15 em meio de cultura celular de fibroblastos L929. Essas membranas foram escolhidas por apresentarem melhores resultados quanto à morfologia das fibras. Os testes foram conduzidos em parceria com o Laboratório de Cultura de Células e Tecidos da Universidade Estadual de Maringá.

Para a avaliação da citotoxicidade indireta, as amostras foram cortadas na forma de círculos com diâmetro de aproximadamente 16,25 mm, equivalente ao tamanho dos poços da placa de cultura, e esterilizadas por UV por 1 h (30 min de cada lado). Posteriormente, foi realizada a preparação do meio de extração por imersão das amostras em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM completo; 500 µL) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de Penicilina/estreptomicina em placa de poliestireno de cultura de tecidos de 24 poços e incubado por 24 h a 37 °C em ambiente com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. Ao mesmo tempo, as células fibroblastos foram semeadas em placa de poliestireno de cultura de tecidos de 96 poços na densidade de 2 x 10<sup>5</sup> células/mL e incubado por 24 hrs a 37 °C/5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico para permitir a fixação das células na placa. Após este período, o meio de cultura da placa de 96 poços foi removido, as células foram lavadas 1x com tampão fosfato salina (PBS; pH 7,2) e os extratos preparados das amostras foram transferidos (200 uL) para os poços contendo os fibroblastos pré-semeados.

Em seguida, as células com os extratos foram incubadas por 24, 48 e 72 h para a quantificação da viabilidade celular utilizando o ensaio de MTS ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2Htetrazolium]). 20% de dimetilsulfóxido (DMSO) foi usado como controle positivo e o meio DMEM puro foi empregado como controle negativo. Em cada ponto de tempo avaliado, o extrato de cada amostra em triplicata foi removido dos fibroblastos, em seguida as células foram lavadas 1x com PBS, e uma solução de MTS (1:100), preparado em DMEM sem fenol vermelho, foi adicionado aos poços (100 µL). Após 3 h de incubação no escuro, a densidade óptica foi medida a 492 nm em uma leitora de microplacas (SpectraMax® Plus 384). Os resultados quantitativos foram obtidos a partir da média e do desvio padrão da viabilidade celular. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada com a equação 1

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Absorbância\ da\ amostra}{Absorbância\ do\ controle\ negativo} \times 100 \quad (1)$$

Para a avaliação da citotoxicidade direta, as amostras foram cortadas na forma de círculos com diâmetro de aproximadamente 16,25 mm, equivalente ao tamanho dos poços da placa de cultura, e esterilizadas por UV por 1 h (30 min de cada lado). Em seguida, as amostras foram imersas em meio DMEM completo (500 µL) suplementado com 10% de SBF e 1% de Penicilina/estreptomicina em placa de poliestireno de cultura de tecidos de 24 poços e incubado durante a noite. Posteriormente, o meio de cultura foi descartado dos poços e 100 µL de suspensão de células de fibroblastos ( $2 \times 10^5$  células/mL) foram semeados em cima de cada amostra para permitir a adesão das células aos materiais testados. Após 3 horas de incubação, mais 400 µL de meio DMEM completo livre de células foram adicionados para atingir 500 µL do volume total. O controle negativo foi constituído de fibroblastos semeados em poços vazios sem adição de quaisquer materiais testados enquanto que o positivo constituiu da semeadura das células em poços vazios com 20% de DMSO. As amostras e controles com os fibroblastos foram mantidas a 37°C em ambiente de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico por períodos de 24 h, 72 h e 7 dias. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. O MTS ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2Htetrazolium]) foi usado para avaliar a viabilidade celular. Após os tempos de incubação, o meio de cultura foi descartado e os poços foram lavados 1x com PBS. Em seguida, uma solução de MTS (1:100), preparado em DMEM sem fenol vermelho, foi adicionado aos poços (500 µL). Após 3 h de incubação no escuro, 200 µL de de cada amostra

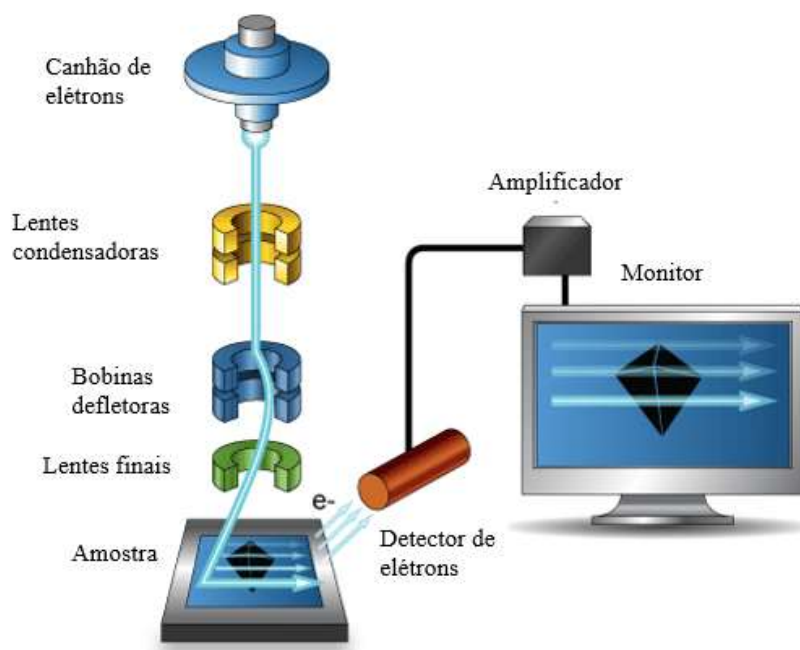
foram transferidos para uma placa de cultura de células de 96 poços e a densidade óptica foi medida a 492 nm em uma leitora de microplacas (SpectraMax ® Plus 384 ). Os resultados quantitativos foram obtidos a partir da média e desvio padrão para os poços em triplicata de cada amostra. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada com a equação 1.

## 4.7 CARACTERIZAÇÕES

### 4.7.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na microscopia eletrônica de varredura, um feixe de elétrons é gerado a partir de um filamento ou cristal e é acelerado para dentro de uma coluna devido a uma diferença de potencial. Dentro da coluna o feixe é então demagnificado por um conjunto de lentes e então incide sobre a superfície da amostra a ser analisada. A interação dos elétrons do feixe eletrônico (feixe primário) com os átomos da superfície da amostra ocasiona a liberação de outros tipos de elétrons, como os secundários e os retroespalhados, que são coletados por um detector que fará a leitura da imagem (Figura 6). Além disso, nesse processo também são gerados fótons e raios X característicos.

Figura 6 - Representação esquemática de funcionamento de um microscópio eletrônico de varredura.



Fonte: KANAKAMEDALA, 2019 com modificações.

Para a formação das imagens na microscopia eletrônica de varredura, os elétrons secundários são aqueles de maior relevância. Tratam-se de elétrons de baixa energia e que permitem a obtenção de imagens de alta resolução, bem como a observação dos diferentes relevos da amostra analisada. Os elétrons retroespalhados também desempenham um papel importante na formação das imagens, é por meio da detecção deles que é gerado o contraste na imagem, permitindo, por exemplo, a detecção de variações na composição da amostra (COSTA, 2016).

Neste trabalho, a superfície das membranas obtidas por eletrofição, o pó de PVDF obtido comercialmente e o pó da hidroxiapatita obtido de osso bovino, foram analisados por meio da microscopia eletrônica de varredura. Os dados foram obtidos através do microscópio modelo TM3000 XSTREAM2, da marca Hitachi. Este equipamento foi adquirido com recursos da Financiadora de Estudos e Projetos (Finep) e está alocado no Centro de Ciências Moleculares e Nanotecnologia (CCMN/UNICENTRO). Através das imagens obtidas foi possível obter a distribuição de diâmetro das nanofibras e das partículas de HAp, utilizando-se o processador de imagens *ImageJ*, desenvolvido pelo *National Institutes of Health (USA)*. Os diâmetros, tanto das fibras quanto das partículas, referem-se a um total de 100 medidas realizadas em uma imagem de cada amostra.

#### 4.7.2 Espectroscopia de raios X por Dispersão de Energia (EDS)

A espectroscopia de raios x por dispersão em energia (EDS) é uma técnica que permite a análise dos elementos químicos que compõem uma amostra (RODRIGUES, 2017). Quando o feixe de elétrons, com uma determinada energia, interage através de colisões inelásticas com os átomos da amostra, dois tipos de radiações podem ser gerados: Radiação contínua, através da interação coulombiana dos elétrons do feixe com os átomos da amostra, e radiação característica, proveniente da interação dos elétrons do feixe incidente com os elétrons de camadas mais internas dos átomos da amostra. Nessa interação o elétron é ejetado de sua camada, o que resulta em uma vacância, deixando o átomo em um estado excitado, cuja tendência é retornar ao estado fundamental através de transições permitidas dos elétrons de camadas externas para preencher o vazio. Nestas transições são emitidos fótons de raios X que são função dos níveis de energia do átomo, sendo assim, a energia do fóton de raios X é específica de cada elemento e contém as informações sobre a composição química de cada espécie. No equipamento um detector, geralmente feito de silício, recebe esse sinal de raios X e determina a energia desses fótons. Fica possível, portanto, traçar um espectro com

a abscissa sendo a energia dos fótons (keV) e a ordenada o número de fótons recebidos (contagens) (MALISKA, 2001; DEDAVID, 2007).

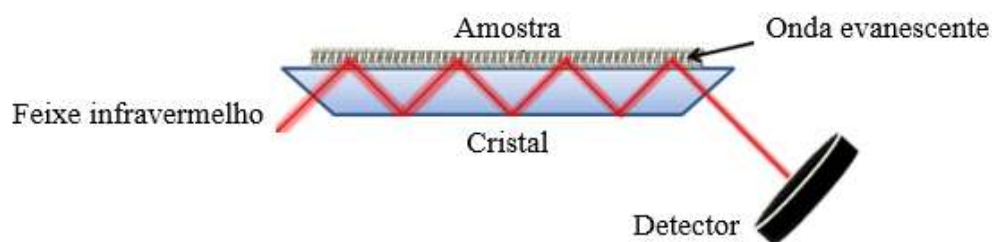
No presente trabalho, a técnica de espectroscopia por dispersão de energia foi utilizada para caracterizar membranas de PVDF/HAp eletrofiadas quanto a sua composição química, e também membranas eletrofiadas contendo HAp após imersão em SBF, para investigar se houve crescimento de apatita. Para isso, utilizou-se o espectrômetro acoplado ao equipamento de MEV já mencionado na seção 4.7.1.

#### 4.7.3 Espectroscopia no Infravermelho por Reflectância Total Atenuada (ATR-FTIR)

A espectroscopia de infravermelho fundamenta-se nas mudanças de estados energéticos vibracionais causados pela interação fóton-matéria na região do infravermelho. Todos os átomos e moléculas estão em constante vibração em relação uns aos outros. A absorção de radiação infravermelha permite obter informações sobre estas vibrações, as quais são intrínsecas de cada átomo e molécula. Dessa forma, esta técnica fornece evidências da presença de grupos funcionais presentes na estrutura de substâncias, podendo ser usada para investigar a composição e estrutura química das mesmas. Para realizar as medidas, a radiação no infravermelho passa através da amostra, onde parte dela é absorvida. O feixe incidente é, então, comparado com aquele detectado. O espectrofotômetro registra o resultado na forma de bandas de absorção (GONÇALVES, 2012).

Na técnica de reflexão total atenuada (ATR) a radiação no espectro do infravermelho (IV) atravessa um cristal, sobre o qual a amostra deve ser pressionada, e interage com esta. Nesse processo, o feixe de radiação IV penetra no material apenas como uma onda evanescente, pois passa de um meio com maior índice de refração (cristal que pode ser de diamante, germânio ou silício, por exemplo) para um meio com menor índice de refração (amostra a ser analisada). A partir disso, a onda evanescente será atenuada em regiões do espectro onde a amostra absorve energia. Esse feixe atenuado é, então, direcionado a um detector e um espectro contendo bandas vibracionais características da estrutura da amostra é obtido (LIMA, 2015).

Figura 7 - Esquema de funcionamento de um equipamento de ATR-FTIR.



Fonte: AUSILI, 2015 com modificações.

Nesse trabalho, os espectros de absorvância dos materiais na região do infravermelho foram obtidos em um espectrômetro Frontier da marca Perkin Elmer utilizando-se um acessório para medidas por Reflectância Total Atenuada. Os espectros foram coletados na região entre 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ . Este equipamento também foi adquirido com recursos da Finep e encontra-se instalado no Centro de Ciências Moleculares e Nanotecnologia (CCMN/UNICENTRO).

A partir dessa análise, foi possível identificar a presença de picos referentes às diversas fases do polímero ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) e fazer uma comparação entre os espectros de cada uma das amostras, bem como comparar estes resultados com aqueles obtidos para o DRX. Além disso, foi possível calcular a porcentagem de fase  $\beta$  presente nas amostras, por meio do método proposto por CAI (2017). Esse método utiliza os picos em 763  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente à fase  $\alpha$ , e 840  $\text{cm}^{-1}$ , que pode corresponder tanto à fase  $\beta$  quanto a fase  $\gamma$ . Se o espectro da amostra apresentar pico bem definido em 1275  $\text{cm}^{-1}$  (referente a fase  $\beta$ ) e ausência de pico em 1234  $\text{cm}^{-1}$  (referente a fase  $\gamma$ ), quer dizer que o pico em 840  $\text{cm}^{-1}$  certamente pertence a fase  $\beta$ , o contrário também pode ocorrer. Sendo assim, é possível calcular a porcentagem da fase predominante utilizando a equação 2

$$F_{EA} = \frac{I_{EA}}{\left(\frac{K_{840}}{K_{763}}\right) I_{763} + I_{EA}} \times 100\% \quad (2)$$

onde, nesse caso,  $F_{EA}$  será a porcentagem da fase correspondente ( $\beta$  ou  $\gamma$ ),  $K_{840}$  e  $K_{763}$  são os coeficientes de absorção dos respectivos números de onda, cujos valores são  $7,7 \times 10^4$  e  $6,1 \times 10^4 \text{ cm}^2/\text{mol}$ , respectivamente e  $I_{763}$  e  $I_{EA}$  são os valores das absorvâncias dos picos em 763 e 840  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Por outro lado, se houver no espectro pico bem definido



em 1275 e também em 1234  $\text{cm}^{-1}$ , quer dizer que o pico em 840  $\text{cm}^{-1}$  não pode ser atribuído a nenhuma das fases ( $\beta$  ou  $\gamma$ ), desse modo, deve-se utilizar as equações 3 ou 4,

$$F_{(\beta)} = F_{EA} \times \left( \frac{\Delta H_{\beta'}}{\Delta H_{\beta'} + \Delta H_{\gamma'}} \right) \times 100\% \quad (3)$$

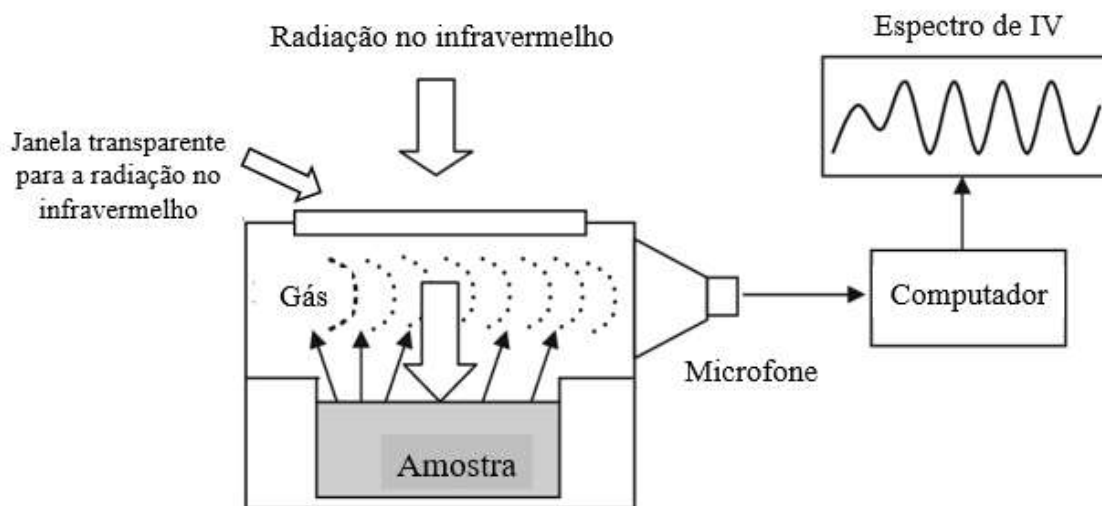
$$F_{(\gamma)} = F_{EA} \times \left( \frac{\Delta H_{\gamma'}}{\Delta H_{\beta'} + \Delta H_{\gamma'}} \right) \times 100\% \quad (4)$$

onde  $F_{(\beta)}$  e  $F_{(\gamma)}$  são as respectivas porcentagens de fase  $\beta$  e fase  $\gamma$  presentes na amostra e  $\Delta H_{\beta'}$  e  $\Delta H_{\gamma'}$  são a diferença nas absorvâncias entre o pico em 1275  $\text{cm}^{-1}$  e o vale mais próximo em 1260  $\text{cm}^{-1}$  e entre o pico em 1234  $\text{cm}^{-1}$  e o vale mais próximo em 1225  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Dessa forma, é possível obter a quantidade de fase  $\beta$  e/ou  $\gamma$  em uma amostra de PVDF através do espectro de FTIR.

#### 4.7.4 Espectroscopia Fotoacústica de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR-PAS)

Na técnica de espectroscopia fotoacústica a amostra a ser analisada é colocada em um recipiente dentro de uma câmara isolado do meio externo, contendo gás que pode ser o próprio ar, na qual é acoplado um microfone de alta sensibilidade. A amostra é então atingida por radiação modulada no espectro do infravermelho. Parte dessa radiação é absorvida e por consequência a temperatura da amostra se eleva. Depois de certo período a amostra começa a liberar calor, o que acaba por causar variações na pressão do gás presente dentro da câmara. Com isso, sinais sonoros são gerados e detectados pelo microfone. Esses sinais são então convertidos em um espectro semelhante ao de absorção por meio da aplicação da transformada de Fourier (MATTOS e VIGANÓ, 2002; CASTRO, 2015). A Figura 8 mostra um esquema simplificado de funcionamento de um equipamento de FTIR-PAS.

Figura 8 - Esquema de funcionamento de um equipamento de FTIR-PAS.



Fonte: DU e ZHOU, 2008 com modificações.

Neste trabalho, as medidas de FTIR-PAS foram realizadas em um espectrômetro Bruker (Vertex 70V) equipado com uma célula de detecção fotoacústica (Gasera, PA-301), na faixa de  $4000$  a  $450\text{ cm}^{-1}$ , com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  e com frequência de modulação do laser de He-Ne igual a  $1,6\text{ kHz}$ . A célula fotoacústica foi preenchida gás hélio durante 10 minutos antes do início de cada medida, que foram realizadas com a célula selada. Como espectro de referência foi utilizado o carvão ultrapuro. Cada espectro corresponde a 128 aquisições (varreduras).

#### 4.7.5 Difratometria de Raios X (DRX)

A difração de raios X é uma das técnicas mais utilizadas para se caracterizar amostras quanto a sua cristalinidade e composição. Isso só é possível por causa do espaçamento regular entre os planos cristalinos dos sólidos (cristais), que possuem a mesma ordem de grandeza do comprimento de onda dos raios X. Essas redes cristalinas, então, acabam agindo como redes de difração para um feixe de raios X, de um único comprimento de onda, que incide no material (ALBERS, 2002).

Nesse processo os raios X são espalhados em todas as direções. A maior parte da radiação espalhada por um átomo anula a radiação espalhada por outros átomos. Entretanto, raios X que incidem em certos planos cristalográficos, em ângulos específicos, são

reforçados ao invés de anulados, ou seja, há uma interferência construtiva de ondas espalhadas pelo arranjo periódico dos átomos do cristal. É isso que permite a caracterização do material (ALBERS, 2002; FILHO e LOPES, 2013).

A difração de raios X ocorre de acordo com a Lei de Bragg (equação 5), a qual relaciona o ângulo de difração do feixe de raios X com o espaçamento entre os planos cristalinos da amostra,

$$n\lambda = 2d \operatorname{sen} \theta \quad (5)$$

onde:

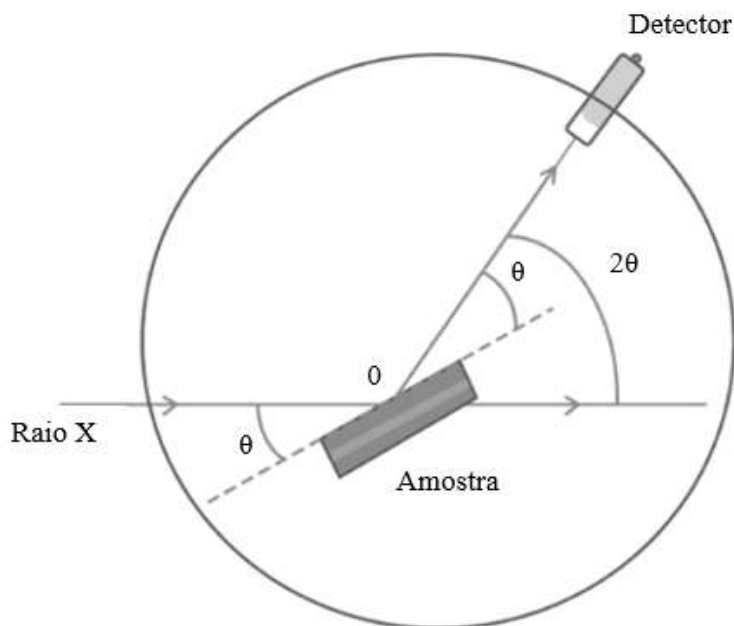
$n$  = número inteiro (1, 2, 3, ...);

$\lambda$  = comprimento de onda do feixe de raios X incidente;

$d$  = distância interplanar entre os planos cristalinos que causam interferência construtiva;

$\theta$  = ângulo de difração (ALBERS, 2002; FILHO e LOPES, 2013).

Figura 9 - Esquema de funcionamento de um equipamento de DRX.



Fonte: ALQAHEEM e ALOMAIR, 2020 com modificações.

No difratômetro, o feixe de raios X, gerado por uma fonte, passa por um colimador e incide na amostra, que pode rotacionar em torno de um eixo. O feixe difratado pela amostra passa por mais alguns colimadores até atingir o detector, que é capaz de girar em torno do material analisado, de modo que vários ângulos de difração sejam varridos. Para os ângulos nos quais os feixes refletidos interferem construtivamente, é detectado um máximo de

difração. Com isso é obtido um gráfico da intensidade do feixe de raios X detectado versus ângulo de incidência, chamado de difratograma. Para se fazer a identificação desses difratogramas é comum a utilização de programas computacionais, onde o padrão de difração obtido é comparado com padrões catalogados em um banco de dados (BONADIO, 2011; ALBERS, 2002; FILHO e LOPES, 2013).

No presente trabalho, para a análise de difratometria de raios X foi utilizado difratômetro da marca BRUKER modelo D8 Advance alocado no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP), da Universidade Estadual de Maringá. A radiação utilizada foi  $\text{CuK}\alpha$ , com comprimento de onda  $\lambda = 0,154$  nm, voltagem de 40 kV e correntes de 30 mA. As medidas foram realizadas com tempo de exposição das amostras de 2 a 5 horas.

Análises de difração de raio X foram conduzidas com o intuito de se fazer apenas uma análise qualitativa das fases presentes do polímero e da cerâmica nas amostras para fins de comparação com os resultados obtidos por ATR-FTIR. As fases cristalinas foram identificadas por meio de comparações com fichas cristalográficas obtidas na base de estruturas cristalinas (BDEC), disponível no site [www.bdec.dotlib.com.br](http://www.bdec.dotlib.com.br).

#### 4.7.6 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise de DSC permite avaliar a variação de entalpia de substâncias em função da temperatura quando estas são submetidas a uma taxa de aquecimento ou resfriamento. Essa técnica é bastante empregada para avaliar as transições térmicas de polímeros, como temperatura de fusão ( $T_F$ ) e temperatura de cristalização ( $T_C$ ).

Nesse processo, a amostra, acondicionada em um cadinho feito de um material que não sofre qualquer reação com a substância da amostra a ser analisada, é colocada em um forno juntamente com outra amostra, denominada amostra de referência, que nada mais é do que um cadinho, feito do mesmo material do primeiro, vazio. Os cadinhos recebem aquecimento a uma mesma taxa de variação da temperatura, sendo que o calor transferido para as amostras é controlado com o auxílio de termopares conectados a placa de aquecimento. Durante esse procedimento, se a amostra a ser analisada sofrer alguma mudança de estado físico, haverá a liberação ou absorção de calor por parte desta [ligia e outra]. Sendo assim, a análise de DSC mede essas variações de energia térmica que aparecem como picos endo ou exotérmicos na curva do fluxo de calor em função da temperatura.

Neste trabalho, as temperaturas de fusão e cristalização de todas as amostras foram analisadas. Para isso, as curvas de DSC foram obtidas por meio de equipamento de TG/DSC

da Perkin Elmer, modelo STA 6000 com DSC automático, de 25 a 1000° C com atmosfera de nitrogênio ou ar. No processo, as amostras, na forma sólida, foram acondicionadas em cadinho de platina. Foi realizado aquecimento de 40° C a 220° C e em seguida resfriamento de 220° C a 40° C, a uma taxa de 5° C/min para ambos os processos, em atmosfera de nitrogênio. O equipamento TG/DSC foi adquirido com recursos da Finep, e instalado no Centro de Ciências Moleculares e Nanotecnologia (CCMN-PPGQ/UNICENTRO).

#### 4.7.7 Potencial zeta

A análise do potencial de partículas nanométricas é importante para analisar a sua estabilidade. Para que não haja aglomeração, o potencial repulsivo deve ser maior do que o atrativo. Na análise de potencial zeta, uma diferença de potencial é aplicada entre os eletrodos de uma cela onde a solução é armazenada, fazendo com que surja uma movimentação nessas partículas. Então, a partir de espalhamento dinâmico de luz a velocidade dessas partículas é medida, e dessa forma o valor do seu potencial zeta pode ser estimado (ANDRADE, 2013).

Os dados de potencial zeta das micro e nano partículas de hidroxiapatita foram obtidos por meio do método de espalhamento de luz dinâmico utilizando um equipamento da Zetasizer da Malvern, modelo Nano-ZS90, equipado com laser de He-Ne ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) como fonte de radiação, a temperatura de 25° C. As medidas foram feitas em triplicata com 3 corridas em cada uma, aplicando o método de modo automático. Este equipamento foi adquirido com recursos da Finep, e instalado no Centro de Ciências Moleculares e Nanotecnologia (CCMN/UNICENTRO).

As suspensões foram preparadas na concentração de 2 mg/mL para cada amostra, utilizando-se água deionizada como dispersante. Estabeleceu-se como índice de refração do solvente valor de 1,33 e como índice de refração da hidroxiapatita o valor de 1,62, em acordo com especificações já presentes no equipamento.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

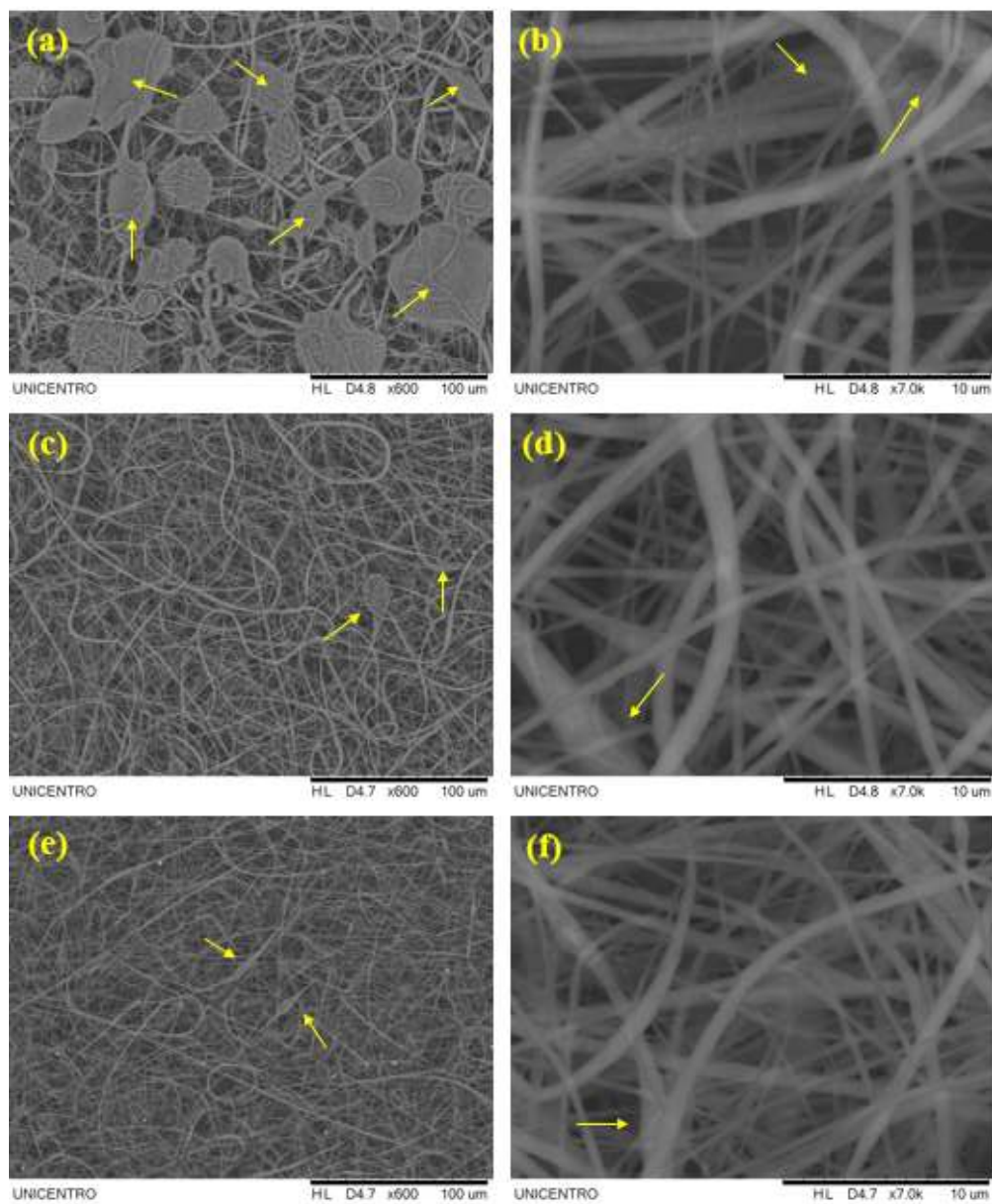
### 5.1 MEMBRANAS DE PVDF DISSOLVIDO EM DMF/ACETONA

#### 5.1.1 Análise morfológica das fibras

As fibras obtidas através do processo de eletrofição tiveram sua superfície analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). O objetivo foi investigar a espessura das fibras e qual a relação desta com as quantidades de solvente e polímero utilizadas. A Figura 9 mostra as micrografias das fibras eletrofiadas P18, P16 e P14.

Observando as Figuras 10a e 10b, que correspondem a amostra P18, nota-se a presença de defeitos nas fibras na forma de contas (*beads*) (alguns estão indicados por setas amarelas) e espessuras bastante variadas. Nas Figuras 10c e 10d, observa-se que as fibras obtidas através da solução P16, apresentaram significativa diminuição na formação de *beads*, embora ainda apareçam alguns. Apesar disso, percebe-se que as fibras continuam tendo espessuras bastante variadas. Por fim, as Figuras 10e e 10f mostra as fibras obtidas a partir da solução P14. Nelas, é possível notar que também houve diminuição na formação de *beads*, mas as fibras continuam apresentando espessuras bem distintas.

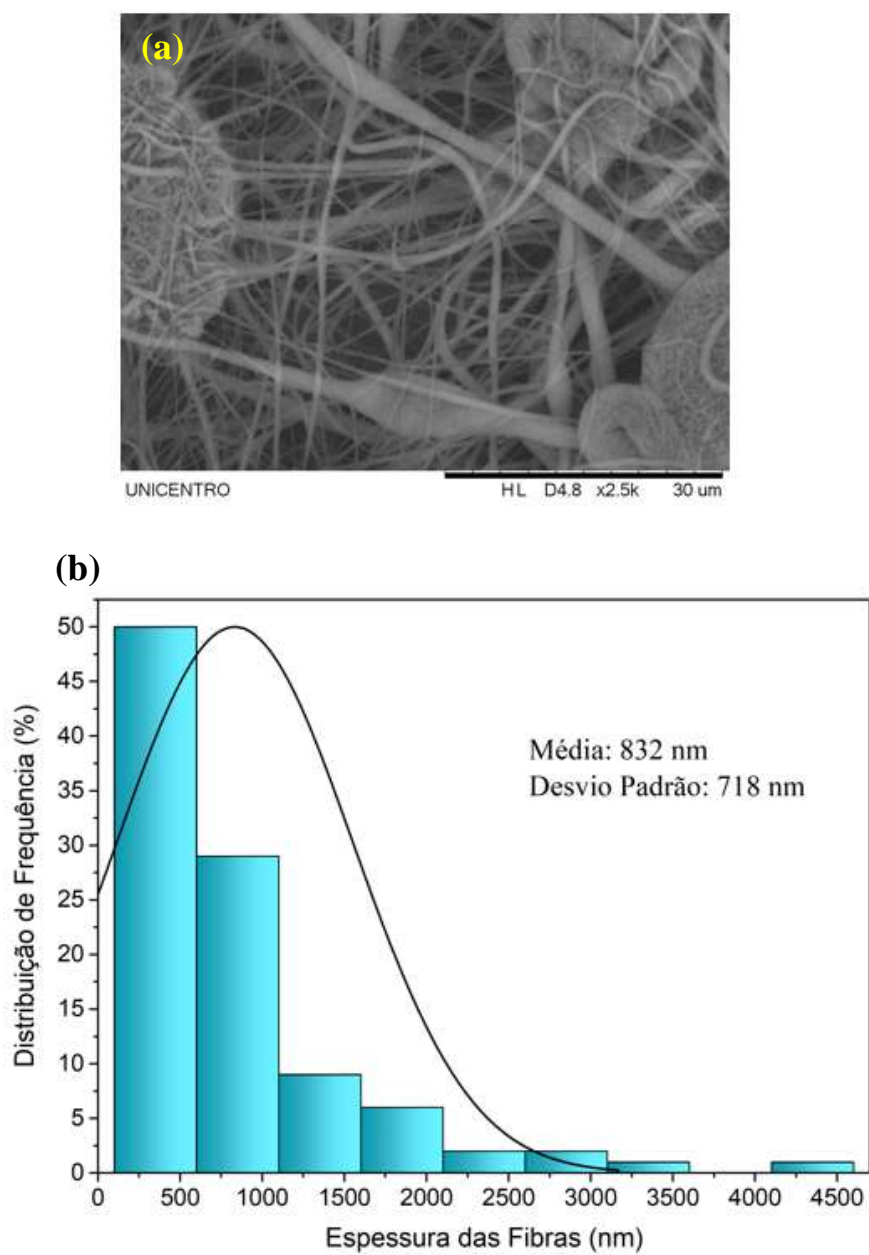
Figura 10 - Micrografias das amostras eletrofiadas a partir das soluções (a) e (b) P18, (c) e (d) P16 e (e) e (f) P14. As setas amarelas indicam a presença de defeitos nas fibras.



Fonte: A autora (2021)

Ainda, a partir das imagens de microscopia eletrônica de varredura, foram realizadas medidas do diâmetro de 100 fibras de cada amostra por meio do programa *ImageJ*. Assim, foi possível obter histograma e curva normal de distribuição dos diâmetros medidos. As Figuras 11, 12 e 13 mostram as imagens de micrografia a partir das quais o diâmetro das fibras foram medidos e a distribuição de frequência e curva normal obtidas para cada uma das amostras já mencionadas anteriormente.

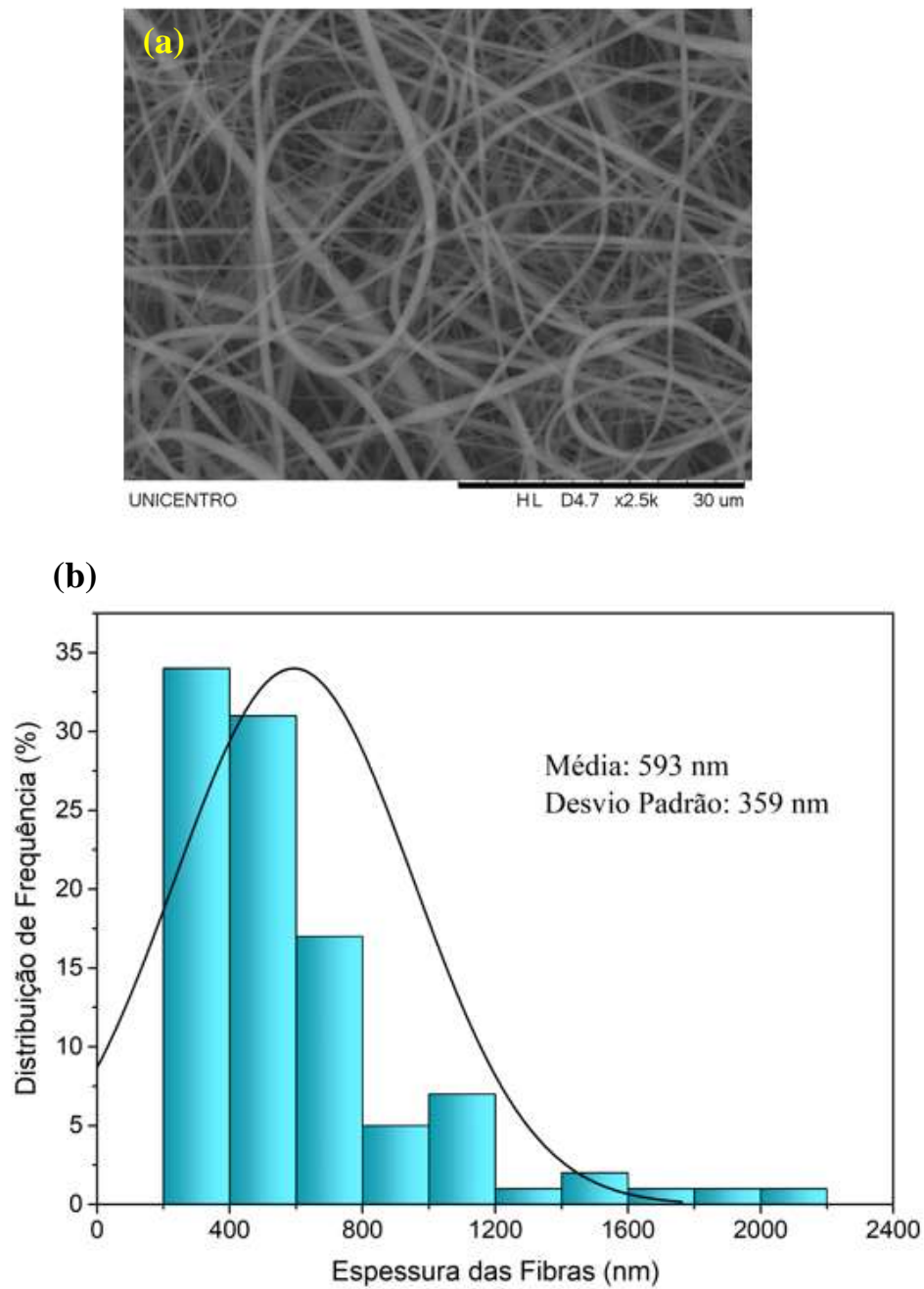
Figura 11 - (a) Micrografia e (b) distribuição normal do diâmetro das fibras para a amostra P18.



Fonte: A autora (2021)

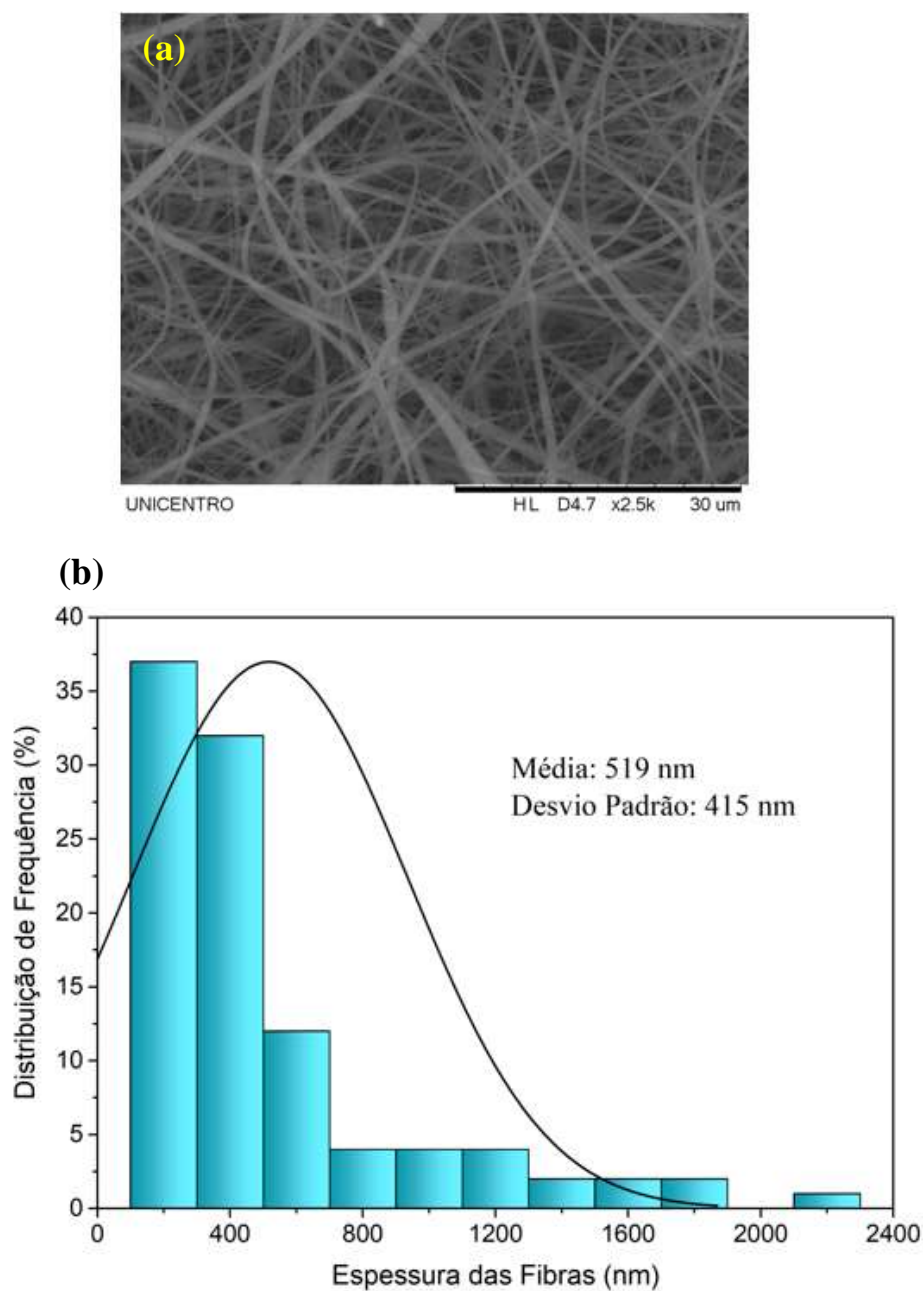


Figura 12 - (a) Micrografia e (b) distribuição normal do diâmetro das fibras para a amostra P16.



Fonte: A autora (2021)

Figura 13 - (a) Micrografia e (b) distribuição normal do diâmetro das fibras para a amostra P14.



Fonte: A autora (2021)

A Figura 11b mostra a distribuição de frequência e curva normal para as fibras obtidas através da solução P18. Nota-se que há grande variação no diâmetro dos fios, partindo de 100 até 4500 nm, aproximadamente. A média e o desvio padrão obtidos para a espessura das fibras foram de 832 e 718 nm, respectivamente. A Figura 12b apresenta a distribuição de frequência e curva normal referentes ao diâmetro das fibras obtidas através

da solução P16. Nota-se que os valores variam de 100 até 2200 nm, aproximadamente, sendo essa variação um pouco menor em relação as fibras da amostra P18. A média e desvio padrão obtidos foram de 593 e 359 nm, respectivamente. A Figura 13b, por fim, apresenta a distribuição de frequência e curva normal das fibras obtidas através da solução P14. A variação dos diâmetros ficou entre 100 e 2200 nm, mesmo valor do que aquele apresentado para a amostra anterior (Figura 12). Os valores da média e desvio padrão obtidos foram de 519 e 415 nm, respectivamente, sendo os menores valores entre as três amostras.

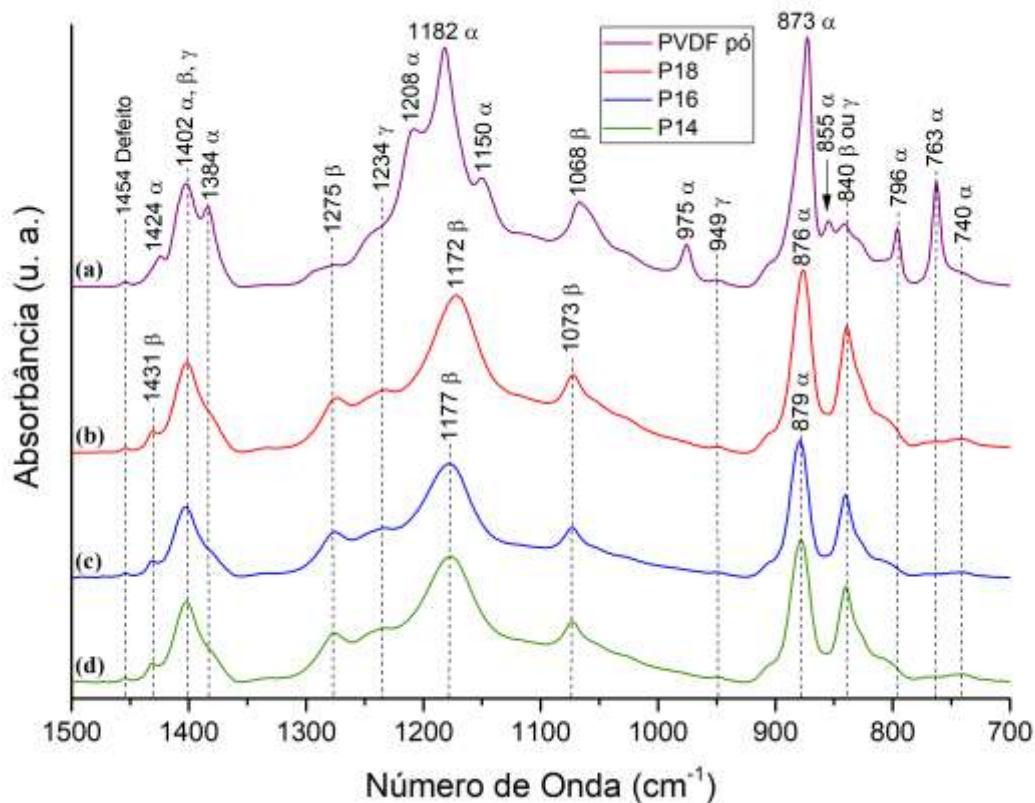
Com isso, constata-se que com a adição de acetona na solução, e consequente diminuição na concentração de polímero, foram obtidas fibras mais finas e com menor formação de *beads*. Esse resultado concorda com o que foi relatado por COSTA, L., (2009b), que em sua pesquisa observou que fibras de PVDF eletrofiadas apresentavam diâmetros maiores à medida em que se aumentava a concentração de polímero na solução. De fato, de acordo com ANDREW e CLARK (2008), no processo de eletrofiação, o jato da solução sofre com a ação de duas forças concorrentes durante seu trajeto da ponta da agulha até o coletor. Enquanto a força eletrostática age para alongar a fibra, a força viscoelástica age para restaurar a mesma. Assim, soluções com viscosidade mais baixa sofrem maior estiramento durante o voo do jato, resultando em fibras mais finas. Por outro lado, soluções muito viscosas acabam por ter maior resistência ao estiramento, resultando em fibras mais espessas e formação de defeitos tipo contas, processo que parece ter ocorrido para a solução P18 (Figuras 10a e 10b). Entretanto, vale ressaltar que soluções com viscosidade muito baixa também resultam em fibras com defeitos, podendo ocorrer o fenômeno de *electrospray* ao invés da eletrofiação (COSTA, L., 2009b; UNNITHAN, 2015). Sendo assim, é necessário encontrar a solução com parâmetros adequados, que seja capaz de formar as fibras mais uniformes possíveis, como foi o caso das soluções P16 e P14 utilizadas aqui.

### 5.1.2 Estudo das fases cristalinas por meio de análise de ATR-FTIR

A Figura 14 mostra os espectros de ATR-FTIR para o PVDF em pó e para as amostras eletrofiadas P18, P16 e P14. No espectro relativo ao PVDF em pó (14a) verifica-se maior presença de bandas relativas à fase  $\alpha$  (763, 796, 855, 873, 975, 1150, 1182, 1208 e 1384  $\text{cm}^{-1}$ ) do que aquelas relativas à fase  $\beta$  (840, 1068, 1275 e 1424  $\text{cm}^{-1}$ ) ou à fase  $\gamma$  (950 e 1234  $\text{cm}^{-1}$ ) (COSTA, L., 2009b; ANDREW e CLARK, 2008; BORMASHENKO, 2004; SILVA, 2018; INCE-GUNDUZ, 2010). Já os espectros relativos às amostras de PVDF eletrofiadas (14b, 14c e 14d), demonstraram comportamento semelhante entre si. Todos os

três apresentaram ausência de bandas em 855, 975, 1150, 1182, 1208 e 1384  $\text{cm}^{-1}$ , referentes à fase  $\alpha$  e acentuação da banda em 840  $\text{cm}^{-1}$ , relativa às bandas  $\beta$  ou  $\gamma$ , e da banda em 1275  $\text{cm}^{-1}$ , referente à fase  $\beta$ , quando comparados com o espectro do PVDF em pó. Algo importante a se destacar é o surgimento de uma banda intensa, em torno de 1175  $\text{cm}^{-1}$ , característica de fase  $\beta$  (CAI, 2017) nas amostras eletrofiadas, a qual não estava presente no espectro da amostra na forma de pó. Entretanto, a grande intensidade desta banda pode ter sido causada pela sobreposição com as bandas em 1150 e 1182  $\text{cm}^{-1}$ , referentes a fase  $\alpha$ . Também houve significativa diminuição da intensidade das bandas em 763 e 796  $\text{cm}^{-1}$ , referentes à fase  $\alpha$ , quando comparado o espectro do PVDF em pó (14a) com os espectros do PVDF eletrofiado (14b, 14c e 14d). Ademais, todos espectros apresentaram bandas em torno de 950 e 1234  $\text{cm}^{-1}$ , referentes à fase  $\gamma$ , em 1402  $\text{cm}^{-1}$ , banda essa que pode ser atribuída a qualquer uma das três fases mencionadas aqui ( $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ ) e em 1454  $\text{cm}^{-1}$ , relativa à existência de defeito na cadeia polimérica (SILVA, 2019).

Figura 14 - Espectros de ATR-FTIR das amostras de PVDF em pó e em membranas eletrofiadas. (a) P18, (b) P16, (c) P14 e (d) PVDF em pó.



Fonte: A autora (2021)

Através dos espectros de ATR-FTIR foi possível calcular a porcentagem de fase  $\beta$  para cada uma das amostras, utilizando o método descrito na seção 4.7.3. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Quantidades de fase  $\beta$  calculadas para diferentes amostras de PVDF utilizando-se o método descrito na seção 4.5.3.

<b>Amostra</b>	<b>Quantidade Fase <math>\beta</math> (%)</b>
PVDF em pó	32,6
P18	73,0
P16	83,3
P14	90,0

Fonte: A autora (2021)

Observando-se os resultados da Tabela 2 constata-se que a amostra P14, foi aquela que apresentou maior quantidade fase  $\beta$  quando comparada com as demais. Esse resultado faz sentido, uma vez que essa solução foi a que apresentou menor viscosidade dentre as três. Durante o processo de eletrofição, soluções com viscosidade mais baixa sofrem maior estiramento durante o voo do jato da solução, resultando em maior transição de fase  $\alpha \rightarrow \beta$  por conta da maior orientação dos cristalitos do polímero (ANDREW e CLARK, 2008). Assim sendo, a composição com 14% de PVDF em massa dissolvido em DMF/acetona na proporção de 60/40 também em massa, foi a escolhida como base para a síntese dos compósitos contendo HAp.

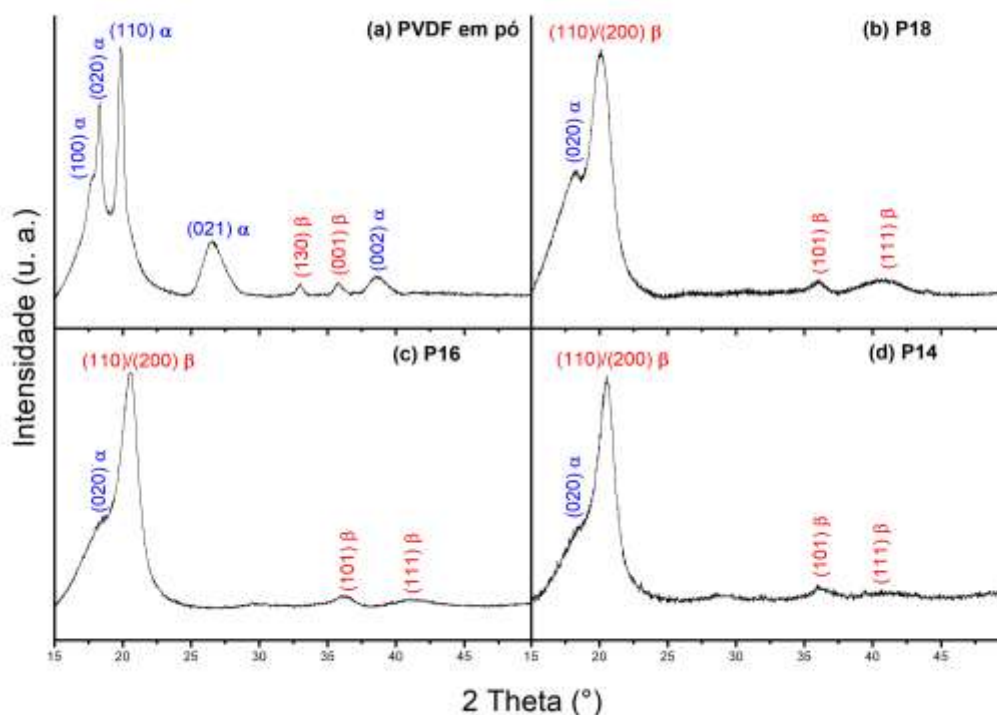
Os resultados aqui apresentados se mostraram satisfatórios quando comparados com resultados de trabalhos semelhantes da literatura. TANDON et al. (2019) também realizaram eletrofição com PVDF. Foi utilizado polímero de alto peso molecular ( $5,34 \times 10^5$  g/mol) e a solução foi feita com 16% de PVDF em massa/volume dissolvido em DMF/acetona com razão de volume de 1:1. Os parâmetros de eletrofição empregados foram: 1,5 ml/h para a velocidade de ejeção da solução; distância de trabalho de 17,5 cm; velocidade de rotação do coletor igual a 50 rpm e tensão aplicada de 17,5 kV. A porcentagem de fase  $\beta$  calculada para esta amostra foi de 88,02%. CAI et al. (2017) obtiveram membranas de PVDF por meio de eletrofição. Em sua pesquisa utilizaram PVDF de alto peso molecular ( $6,25 \times 10^5$  g/mol) na proporção de 12% em massa, dissolvido em N-metil-2-pirrolidona (NMP) e acetona na proporção 5/5 em volume. Os parâmetros de eletrofição empregados foram: 60  $\mu$ l/h para a velocidade de ejeção da solução; distância de trabalho de 10 cm e tensão aplicada de 7,5 kV. Ainda, de acordo com CAI et al. (2017), o PVDF utilizado continha maioria de fase  $\alpha$ , já a

membrana eletrofiada apresentou maioria de fase  $\beta$ , sendo de 94,3% o valor da porcentagem calculada para esta fase. Com isso, embora diversos fatores dessas pesquisas (peso molecular do polímero, concentração polimérica e de solventes e parâmetros de eletrofição) sejam bastante diferentes daqueles utilizados aqui, os resultados obtidos apresentaram muita semelhança.

### 5.1.3 Análise por difração de raio X (DRX)

O PVDF possui fórmula química  $(-\text{H}_2\text{C}-\text{CF}_2-)_n$ , onde  $n$  é o número de repetições do monômero. A fase  $\alpha$  do polímero pertence ao grupo espacial  $P2_1/c$  com simetria monoclinica e a fase  $\beta$  ao grupo espacial  $Cm2m$ , com simetria ortorrômbica (SILVA, 2019).

Figure 15 - Difratogramas das amostras de PVDF em pó e membranas eletrofiadas com diferentes proporções de polímero e solventes. Destaca-se em azul os picos relativos à fase  $\alpha$  do polímero, e em vermelho os picos relativos à fase  $\beta$  eletroativa.



Fonte: A autora (2021)

A Figura 15 mostra os difratogramas obtidos para as amostras de PVDF em pó e para as membranas eletrofiadas P18, P16 e P14. A amostra de PVDF em pó (16a) apresentou picos referentes à fase  $\alpha$  em  $2\theta = 17,8^\circ; 18,3^\circ; 19,8^\circ; 26,5^\circ$  e  $38,6^\circ$  que correspondem aos planos (100), (020), (110), (021) e (002), respectivamente (BRUNENGO, 2020; MOKHTARI, 2015; SILVA, 2020). Já para a fase  $\beta$  são observados apenas dois picos em  $2\theta = 33,0^\circ$  e  $35,8^\circ$ , correspondentes aos planos (130) e (001), respectivamente (CAI, 2017; BRUNENGO, 2020; MOKHTARI, 2015). Esse resultado concorda com o que foi visto para a análise de ATR-FTIR, demonstrando que o pó de PVDF possui maioria de fase  $\alpha$ . As membranas eletrofiadas (16b, 16c e 16d) apresentaram pico de fase  $\alpha$ , apenas em  $2\theta = 18,5^\circ$ , correspondente ao plano (020) (BRUNENGO, 2020; MOKHTARI, 2015). Nota-se que esse pico se torna menos evidente à medida que há a diminuição da viscosidade da solução (menor porcentagem de polímero). Junto a isso observa-se o aparecimento de picos relativos à fase  $\beta$  em  $2\theta = 20,5^\circ; 36,5^\circ$  e  $41,1^\circ$ , referentes a difração nos planos (110) / (200), (101) e (111), respectivamente (CAI, 2017; MOKHTARI, 2015; MERLINI, 2014). Mais uma vez esses resultados concordam com o observado para as análises de ATR-FTIR na seção 5.1.2, ficando evidente a transformação de fase  $\alpha$  em fase  $\beta$  a partir da eletrofiação de soluções de PVDF.

#### 5.1.4 Análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

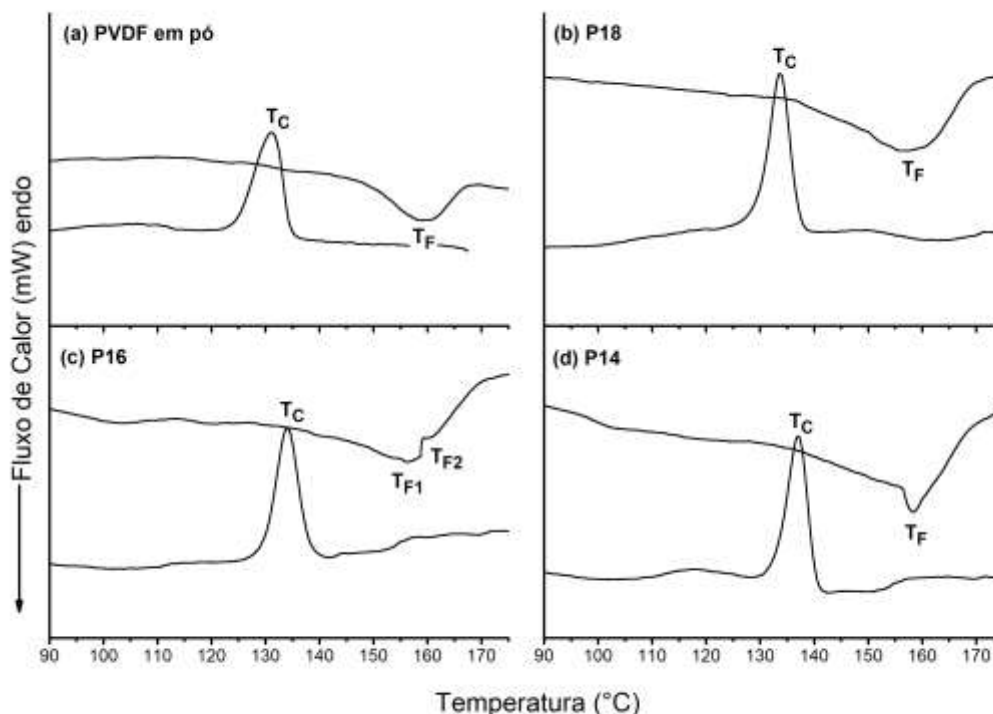
A Figura 16 mostra as curvas de DSC obtidas para as amostras de PVDF em pó e eletrofiadas. A partir destas foi possível encontrar as temperaturas de fusão ( $T_F$ ) e cristalização ( $T_C$ ) das amostras. Os valores estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Temperaturas de fusão ( $T_F$ ) e cristalização ( $T_C$ ) das amostras de PVDF em pó e membranas eletrofiadas com diferentes proporções de polímero e solventes.

<b>Amostra</b>	<b><math>T_F</math> (pico) (°C)</b>	<b><math>T_F</math> (onset) (°C)</b>	<b><math>T_C</math> (°C)</b>
PVDF em pó	159,4	151,1	131,1
P18	158,1	146,0	133,6
P16	156,4/161,0	148,3/155,5	134,0
P14	158,3	156,4	136,9

Fonte: A autora (2021).

Figura 16 - Curvas DSC das amostras de PVDF. (a) PVDF em pó, (b) P18, (c) P16 e (d) P14. Os picos de fusão e cristalização estão indicados pelas siglas  $T_F$  e  $T_C$ , respectivamente.



Fonte: A autora (2021)

De acordo com os dados da Tabela 3 e as curvas de DSC da Figura 16, o PVDF em pó apresentou temperatura de fusão de 159,4 °C, resultado que concorda com as informações fornecidas pelo fabricante Alfa-Aesar (temperatura de fusão de 155 a 160 °C). A amostra P18 (Figura 16b) apresentou diminuição na temperatura de fusão e alargamento do pico endotérmico. Isso se deve, provavelmente, pela superposição de dois picos de fusão referentes as fases  $\alpha$  e  $\beta$  do PVDF, já que essa amostra apresentou coexistência de ambas as fases, constatada por análise de FTIR. Esse fato fica mais evidente quando se analisa a curva de DSC da amostra P16 (Figura 16c). Nela é possível notar que houve o aparecimento de dois picos de fusão distintos em 156,1 e 161,0 °C. De acordo com SATAPATHY S. et al. (2011) a fase  $\alpha$  do PVDF possui temperatura de fusão superior a fase  $\beta$ , dessa forma é possível que os picos em 156,1 e 161,0 °C correspondam a fusão das fases  $\beta$  e  $\alpha$ , respectivamente. A amostra P14 demonstra um pico de fusão mais bem definido em comparação com as demais, em 158,3 °C. As análises de FTIR dessa amostra demonstraram predominância de fase  $\beta$  (90%), sendo assim esse pico deve ser exclusivo dessa fase.

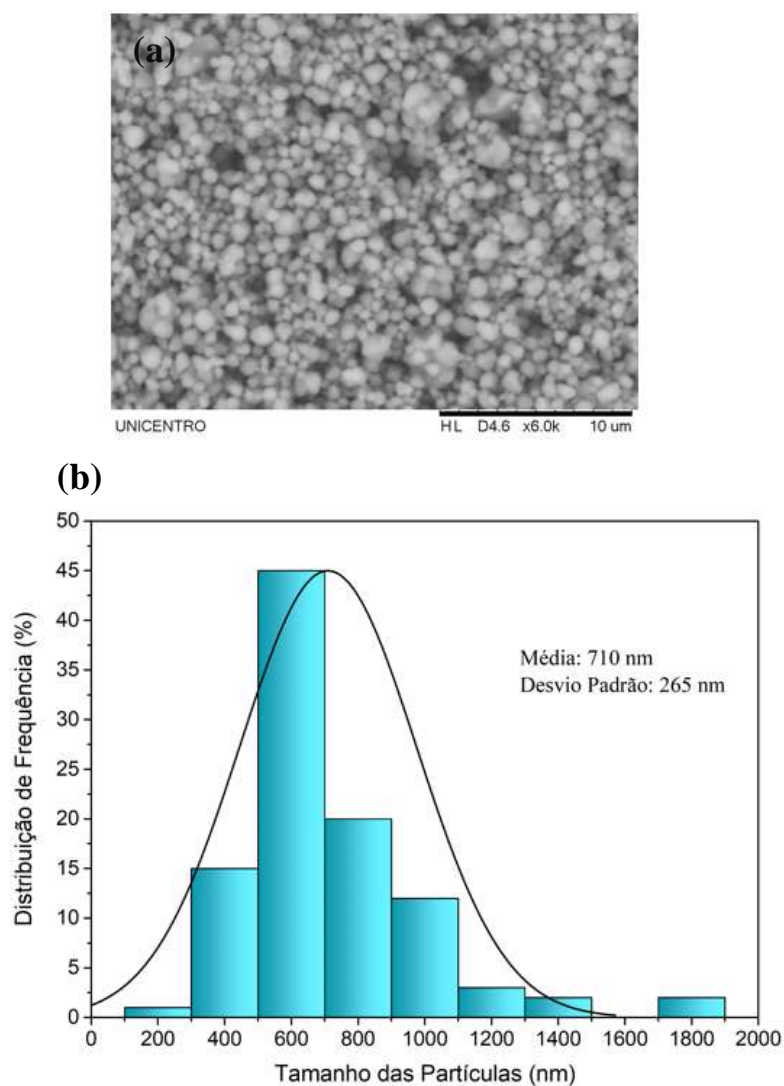


## 5.2 MEMBRANAS DE PVDF COM INCORPORAÇÃO DE HAp

### 5.2.1 Análise morfológica das partículas de HAp

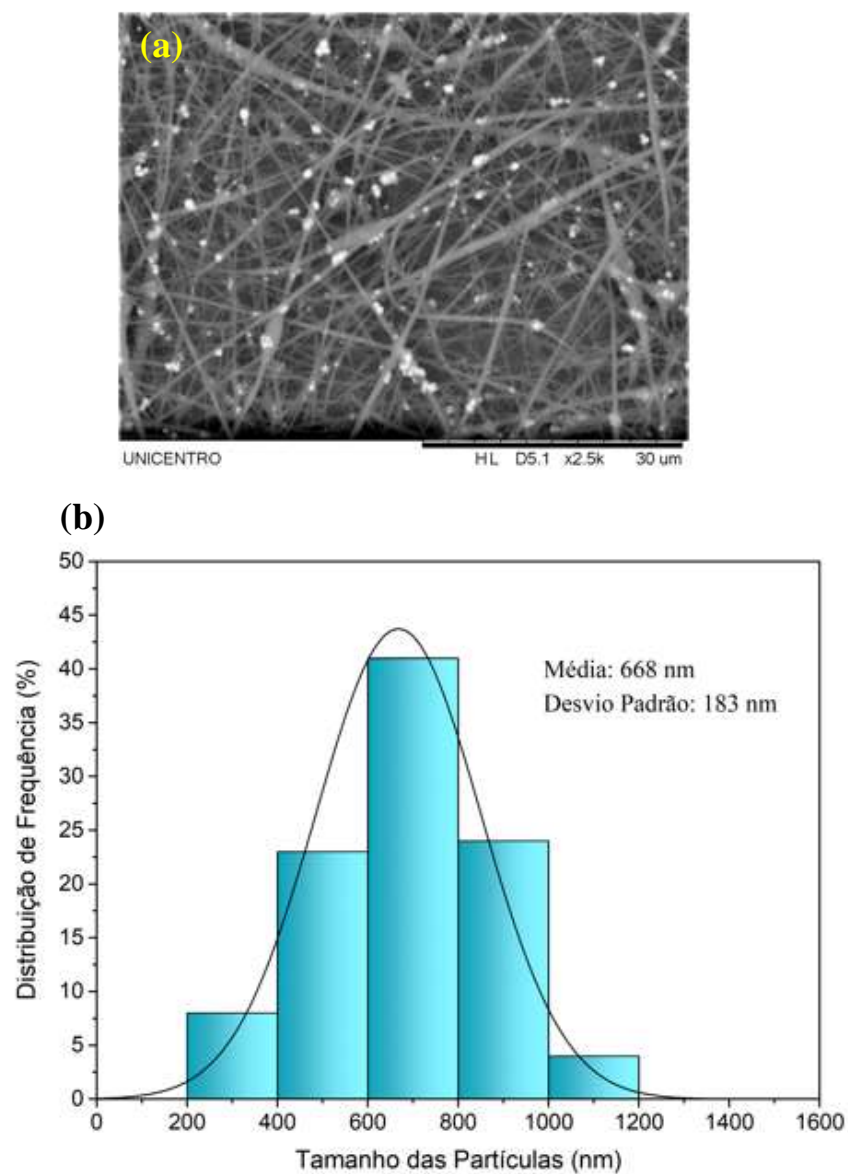
A Figura 17 mostra imagem de MEV e distribuição de frequência para as partículas de hidroxiapatita obtidas por meio do processo descrito na seção 4.1. O osso bovino foi calcinado a 900 °C por 8h e em seguida moído em moinho de alta energia por 16h. A Figura 18 mostra as partículas de hidroxiapatita dispersas nas fibras de P14-H15, com sua respectiva distribuição de frequência.

Figura 17 - (a) Micrografia e (b) distribuição normal do diâmetro das partículas de hidroxiapatita obtidas por meio do processo descrito na seção 4.1.



Fonte: A autora (2021).

Figura 18 – (a) Micrografia e (b) distribuição normal do diâmetro das partículas de hidroxiapatita dispersas na membrana eletrofiada P14-H15.



Fonte: A autora (2021).

Os resultados obtidos para a média e desvio padrão dos tamanhos das partículas em cada uma das amostras citadas se encontram na tabela 4.

Tabela 4 - Valores de média e desvio padrão obtidos para as nano e micro partículas de HAp em pó e dispersas na membrana eletrofiada PVDF14-HAp15.

<b>Amostra</b>	<b>Média (nm)</b>	<b>Desvio Padrão (nm)</b>
HAp em pó	710	265
P14-H15	668	183

Fonte: A autora (2021).

Os valores de média e desvio padrão não diferiram muito entre as amostras, demonstrando que o processo de eletrofição não deve ter selecionado partículas com tamanhos específicos.

De acordo com COELHO T. M.; et al. (2006), partículas de HAp da ordem de 300 nm foram obtidas por meio destes parâmetros de calcinação e moagem, porém, utilizou-se ossos de peixe como material precursor. Aqui, o tamanho das partículas ficou bastante variado, com diâmetros de 100 a 1900 nm. A média e desvio padrão obtidos através da curva normal foram de 710 e 265 nm, respectivamente. Essa diferença de tamanhos de partícula pode ter ocorrido devido a vários fatores, dentre os quais pode-se citar a mudança no material precursor, já que no presente trabalho utilizou-se osso bovino, o tipo de moinho utilizado, diferenças nos parâmetros de moagem (tamanho e material das esferas, volume do vaso de moagem, dentre outros). Mesmo assim, isso demonstra que com o método utilizado foi possível obter partículas nano e micrométricas de hidroxiapatita. Partículas com essas dimensões podem ser melhor incorporadas na solução de PVDF, já que os diâmetros das fibras geradas ficam nessa ordem de grandeza.

### 5.2.2 Análise do potencial zeta das partículas de HAp

Os resultados das medidas de potencial zeta, bem como os valores obtidos para média e desvio padrão, estão apresentados na tabela 5.

Partículas apresentam estabilidade quando o valor do potencial zeta for maior do que  $\pm 30$  mV, em módulo. Partículas com valor de potencial zeta menor do que esse valor em módulo tendem a formar aglomerados (ANDRADE, 2013; SANTOS, 2013). Com isso, é possível constatar que as nano e micro partículas de HAp obtidas através do método descrito na seção 3.1 deste trabalho, não são estáveis, podendo se aglomerar, uma vez que o valor médio obtido para o potencial Zeta foi de  $-16,0$  mV. Este resultado pode explicar porque

as imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras P14-H10, P14-H15 e P14-H20 apresentadas adiante (seção 5.2.3), parecem conter pequenos aglomerados da cerâmica.

Tabela 5 - Valores obtidos para análise de potencial zeta das nano e micro partículas de hidroxiapatita.

<b>Amostras de Hidroxiapatita</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>
Amostra 1	-17,7
	-16,9
	-18,2
Amostra 2	-16,9
	-17,3
	-17,1
Amostra 3	-13,7
	-13,9
	-12,7
<b>Média dos Valores</b>	<b>-16,0</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>2,0</b>

Fonte: A autora (2021).

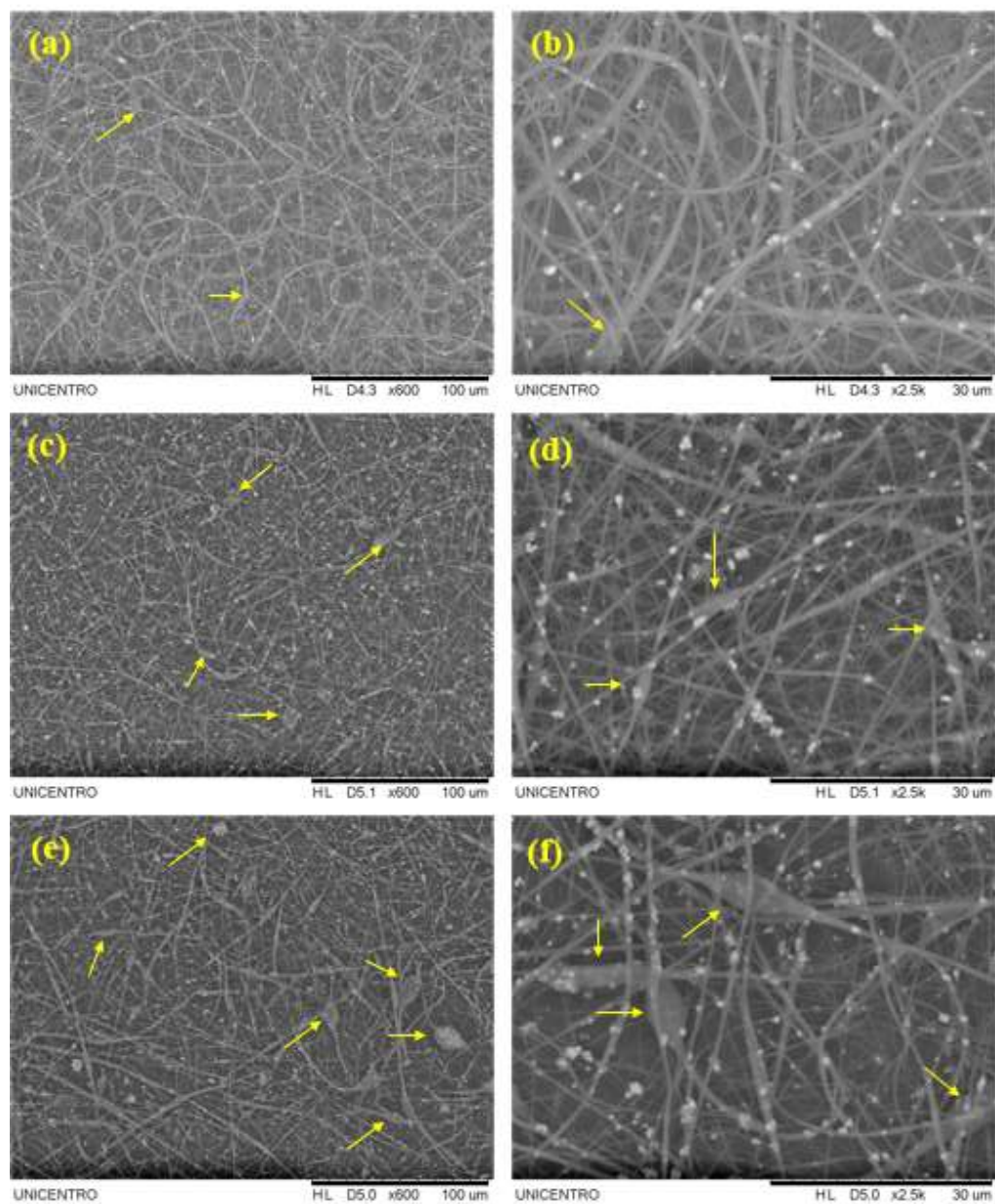
É importante destacar que o potencial negativo apresentado pelas nano e micro partículas de HAp mostra-se como uma característica vantajosa para aplicações como substitutos ósseos na engenharia de tecidos, pois acredita-se que um potencial negativo seja favorável para a fixação e diferenciação de células ósseas por favorecer a deposição de íons  $\text{Ca}^{2+}$  na interface tecido-implante (OHGAKI, 2001).

### 5.2.3 Análise morfológica das fibras eletrofiadas

As fibras eletrofiadas a partir da solução contendo hidroxiapatita incorporada ao PVDF tiveram sua superfície analisada por microscopia eletrônica de varredura, a fim de se observar como foi a adesão e distribuição das partículas de HAp nas fibras e se isso alterou a morfologia das mesmas. As Figuras 19a e 19b, 19c e 19d, e 19e e 19f mostram as imagens obtidas para as membranas eletrofiadas P14-H10, P14-H15 e P14-H20, respectivamente. Nota-se que a incorporação da HAp se deu de maneira satisfatória em todos os casos, havendo boa dispersão das partículas nas membranas. O que chama atenção é o fato de que,

com o aumento da porcentagem de hidroxiapatita incorporada nas amostras, mais defeitos parecem surgir nas fibras (indicados pelas flechas em amarelo). Ao comparar-se as Figuras 19a, 19d e 19f, é possível perceber esse fenômeno.

Figura 19 - Micrografias das amostras eletrofiadas (a) e (b) P14-H10, (c) e (d) P14-H15 e (e) e (f) P14-H20. As setas amarelas indicam a presença de defeitos nas fibras.

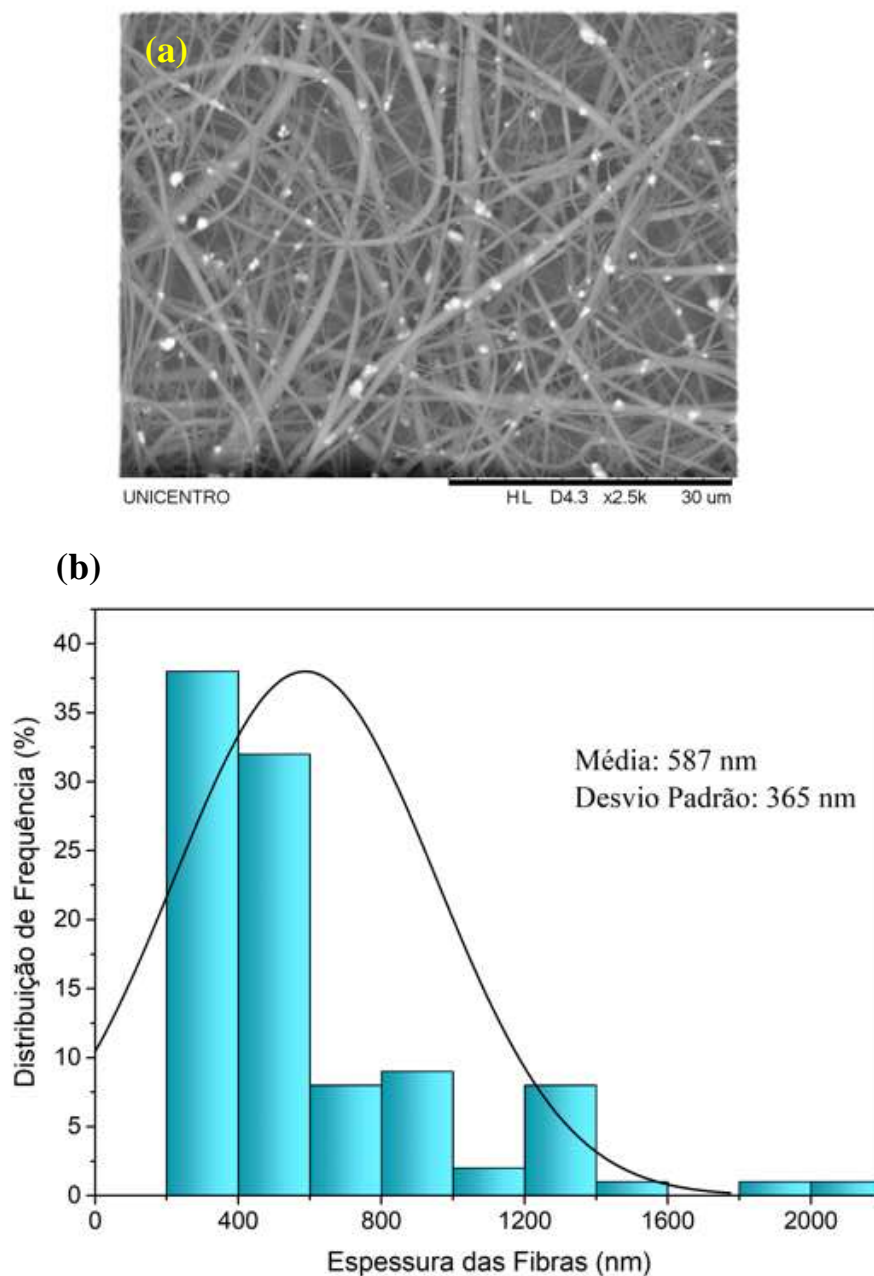


Fonte: A autora (2021).

Ainda, a partir das imagens de microscopia eletrônica de varredura, foram realizadas medidas do diâmetro de 100 fibras de cada amostra por meio do programa *ImageJ* e, a partir destas, obteve-se o histograma e curva normal de distribuição do diâmetro dos fios. As

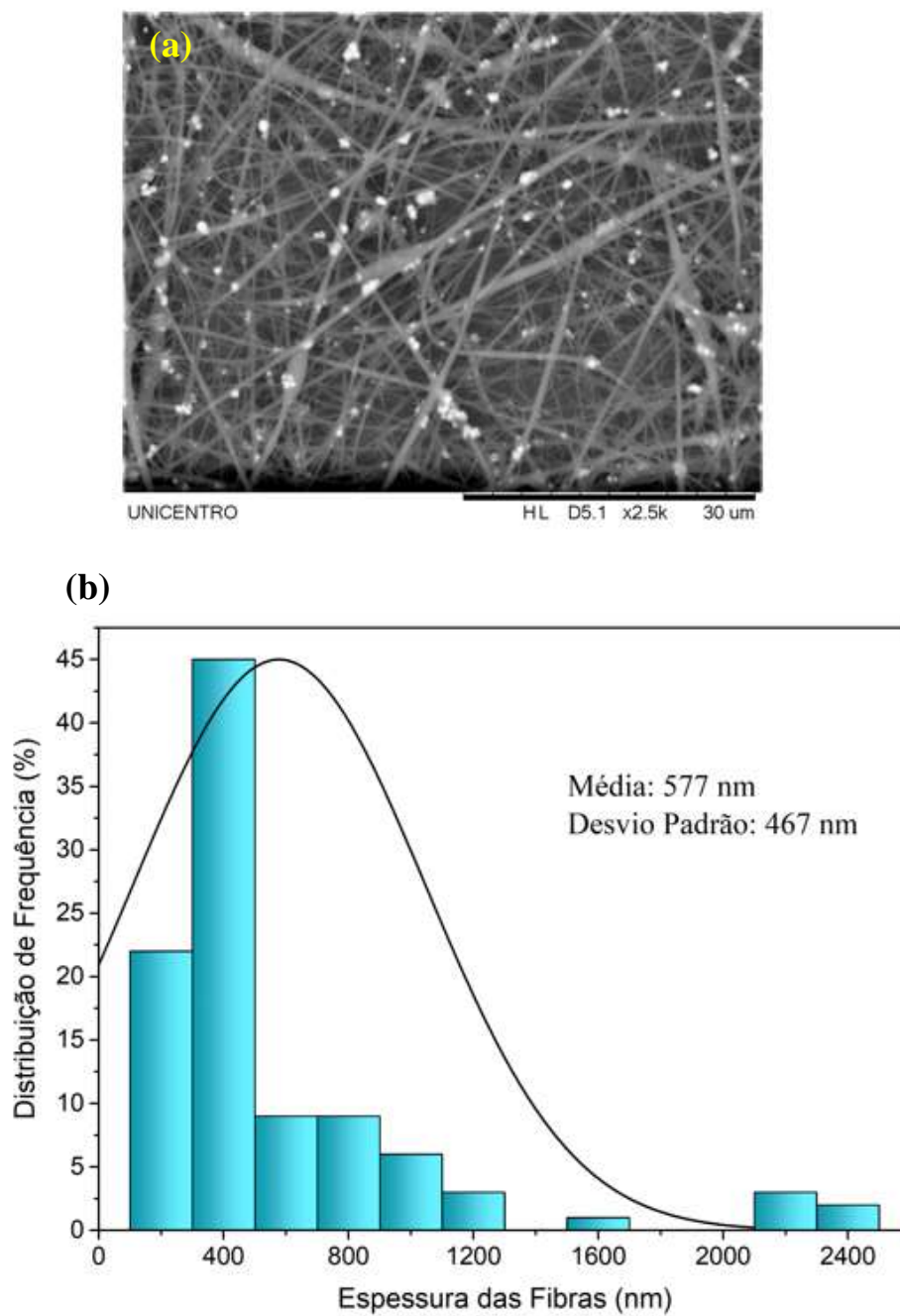
Figuras 20, 21 e 22 mostram as imagens de micrografia a partir das quais o diâmetro das fibras foram medidos e a distribuição de frequência e curva normal obtidas para cada uma das amostras.

Figura 20 - (a) Micrografia e (b) distribuição normal do diâmetro das fibras para a amostra P14-H10.



Fonte: A autora (2021)

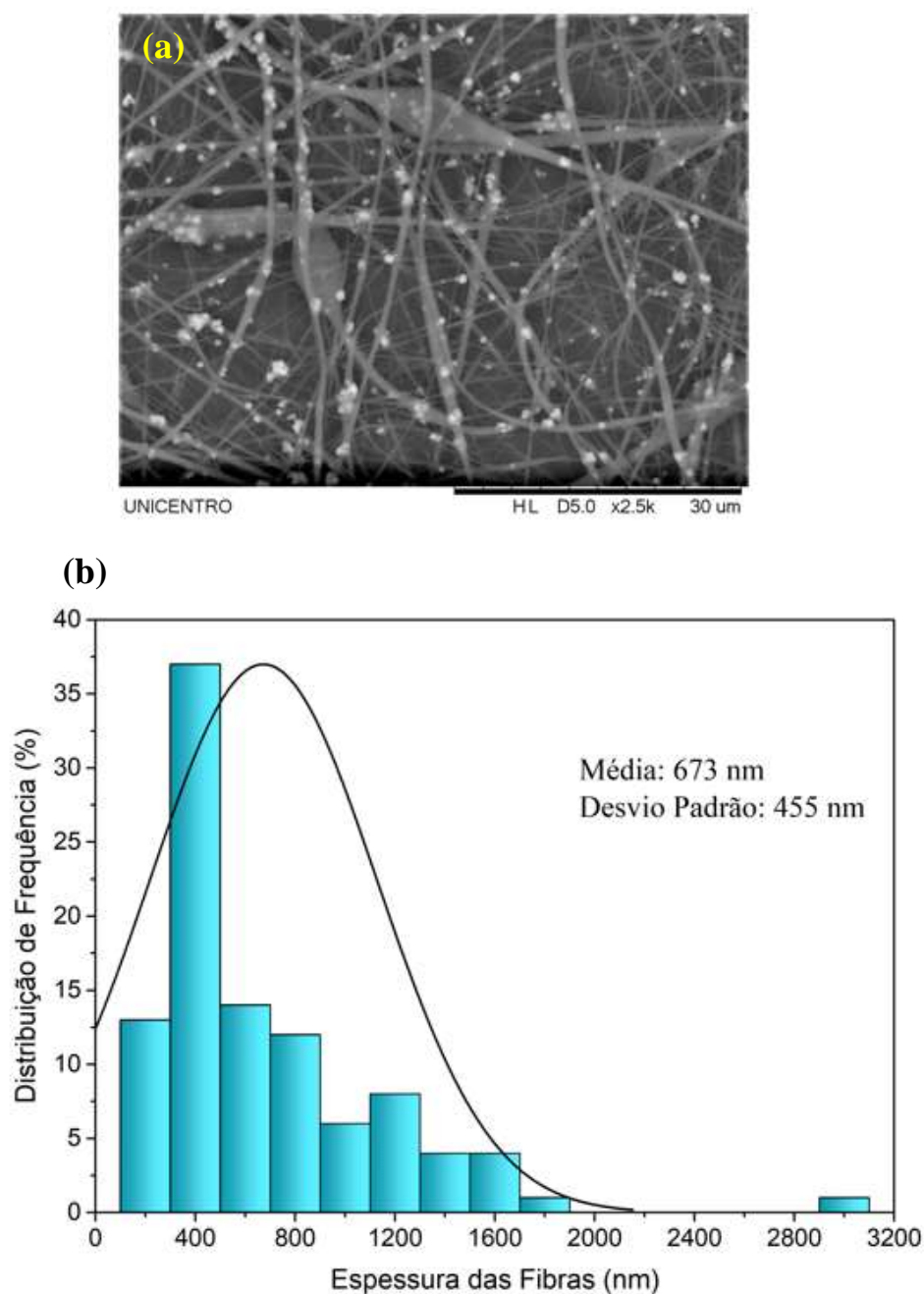
Figura 21 - (a) Micrografia e (b) distribuição normal do diâmetro das fibras para a amostra P14-H15.



Fonte: A autora (2021)



Figura 22 - (a) Micrografia e (b) distribuição normal do diâmetro das fibras para a amostra P14-H20.



Fonte: A autora (2021)

A Figura 20 é referente a amostra P14-H10. O diâmetro das fibras variou de 200 a 2200 nm, sendo que a média e desvio padrão obtidos através da curva normal foram de 587 e 365 nm, respectivamente. A Figura 21 apresenta imagem de microscopia e histograma com curva normal da amostra P14-H15. A variação do diâmetro das fibras foi de

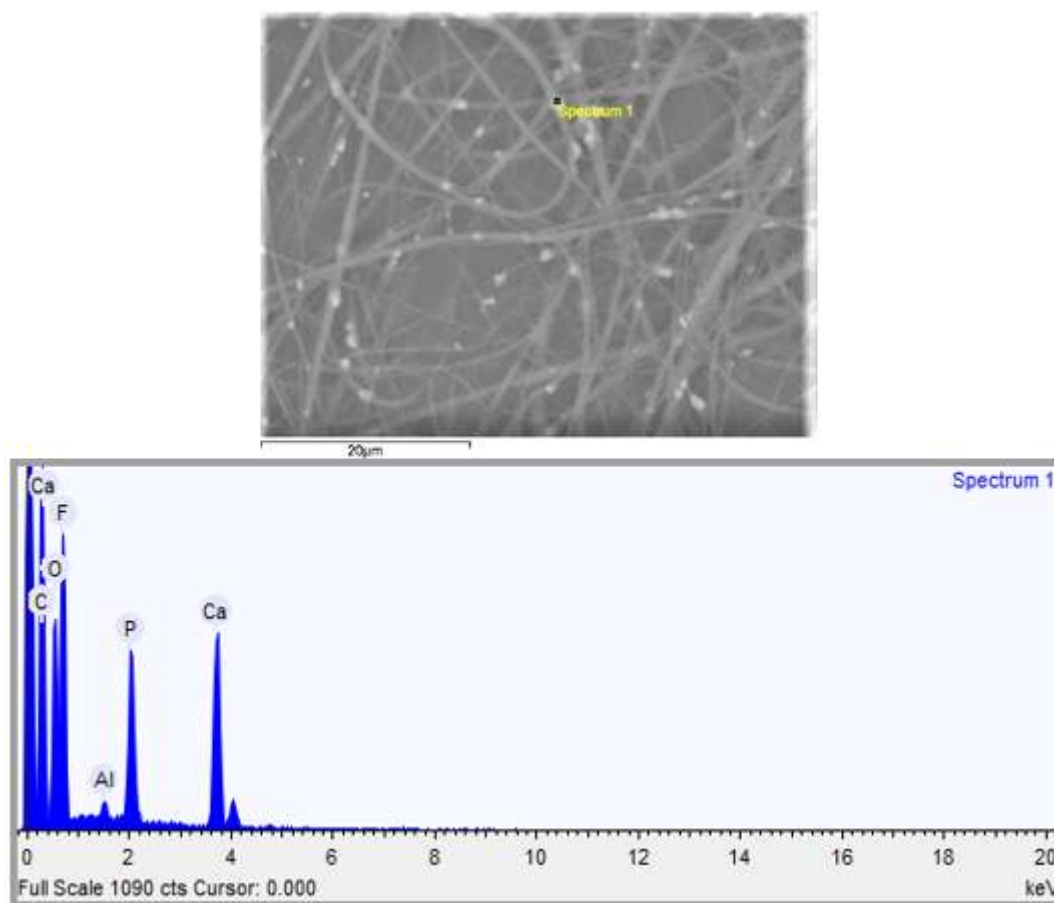


aproximadamente 100 até 2500 nm, sendo os valores de média e desvio iguais a 577 e 467 nm, respectivamente. Por fim, a Figura 22 refere-se a amostra P14-H20. O diâmetro das fibras variou de, aproximadamente, 100 a 3100 nm, sendo a maior variação dentre todas as amostras apresentadas nesta seção. Os valores de média e desvio padrão obtidos por meio da curva normal foram de 673 e 455 nm, respectivamente. Comparando-se esses resultados, percebe-se que as amostras P14-H10 e P14-H15, apresentaram tamanho médio de fibras muito próximos, sendo a maior diferença apenas para o desvio padrão. Já amostra P14-H20 obteve os maiores valores tanto para a média quanto para o desvio padrão e também foi a que mais apresentou formação de *beads*. Uma intensa formação de *beads* em fibras eletrofiadas pode ocasionar maior fragilidade nesta. Após o processo de eletrofição percebeu-se que a amostra P14-H20 ficou quebradiça, sendo difícil retirar a mesma do papel alumínio no qual a solução polimérica é coletada durante o processo de eletrofição. DELIORMANLI e KONYALI (2018), encontraram resultados semelhantes em sua pesquisa, onde a adição de HAp em solução de PCL levou a um aumento no diâmetro médio das fibras eletrofiadas, em comparação com fibras de PCL puro. Da mesma forma, TANDON B.; et al. (2019), observaram um aumento no tamanho médio de fibras de PVDF com incorporação de HAp, comparadas com as fibras do polímero puro. Nessa última pesquisa foi relatado que isso pode estar relacionado com mudanças nas propriedades da solução, causadas pela adição da cerâmica, como o aumento da viscosidade e possíveis alterações da condutividade e taxa de evaporação do solvente (TANDON, 2019). Assim, constata-se que, para a análise de MEV, as amostras P14-H10 P14-H15 apresentaram os resultados mais satisfatórios.

#### 5.2.4 Análise por espectroscopia por dispersão de energia (EDS)

A fim de se confirmar o caráter das partículas impregnadas ao longo das fibras poliméricas, foram conduzidas análises de EDS. As Figuras 23 e 24 mostram os principais elementos encontrados nas fibras eletrofiadas de PVDF-HAp para duas regiões selecionadas, sendo a Figura 23 referente a região com presença de partícula de HAp e Figura 24 referente a região sem partícula de HAp. A amostra utilizada para esta análise foi aquela com 10% de HAp incorporada em massa.

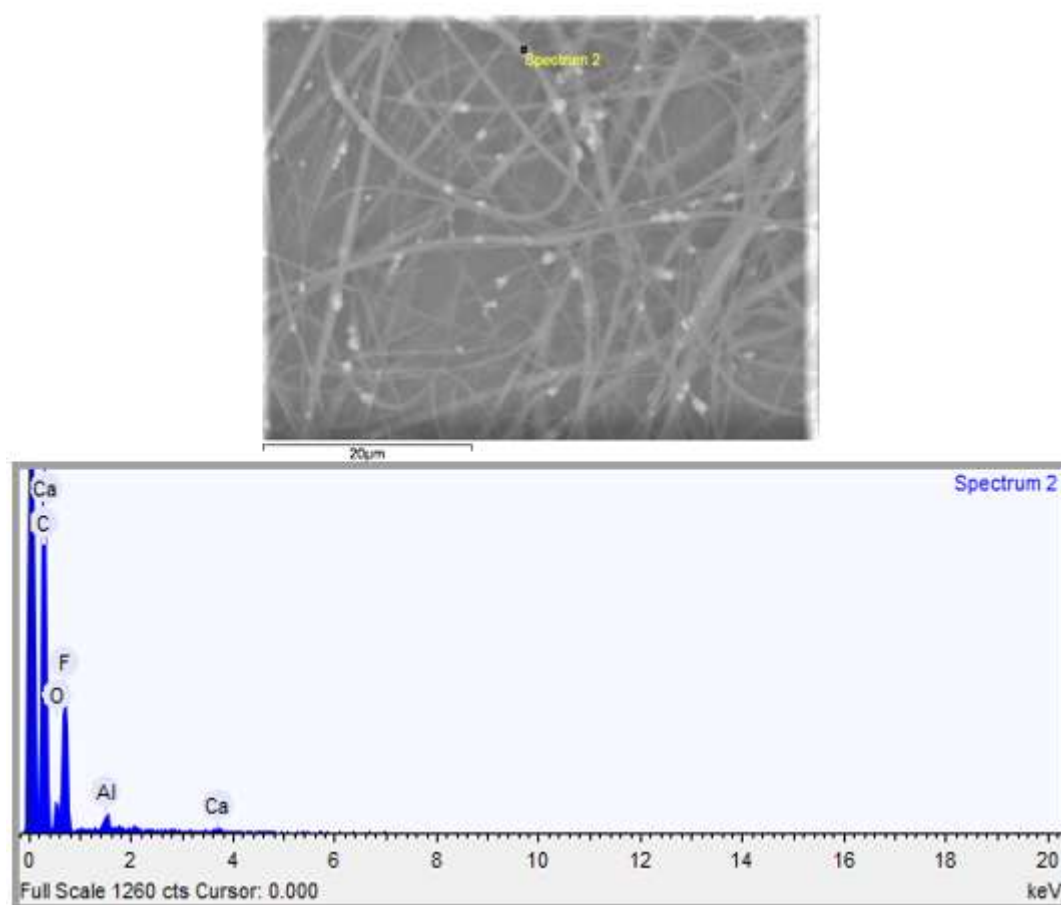
Figura 23 - Espectro de EDS de fibras eletrofiadas de PVDF-HAp para região com partícula de HAp incorporada.



Fonte: A autora (2020)

No espectro da Figura 23, são identificados os elementos cálcio (Ca) e fósforo (P), originários da hidroxiapatita incorporada. Também há a presença de carbono (C) e flúor (F), característicos da estrutura do PVDF (BRAGA, 2007), sendo importante destacar que a presença de carbono também pode ser devida a fita utilizada para fixar as amostras no suporte de análise. Observa-se ainda a presença de alumínio (Al), provavelmente por causa de algum resquício oriundo do coletor utilizado durante o processo de eletrofição ou proveniente do suporte de amostras utilizado durante a microscopia. Já no espectro da Figura 24 nota-se que não há pico de fósforo e que o pico de cálcio diminuiu drasticamente, indicando que ali não há presença de HAp. Observa-se também que os picos de carbono e flúor continuam presentes, bem como o pico de alumínio.

Figura 24 - Espectro de EDS de fibras eletrofiadas de PVDF-HAp para região sem partícula de HAp incorporada.



Fonte: A autora (2020)

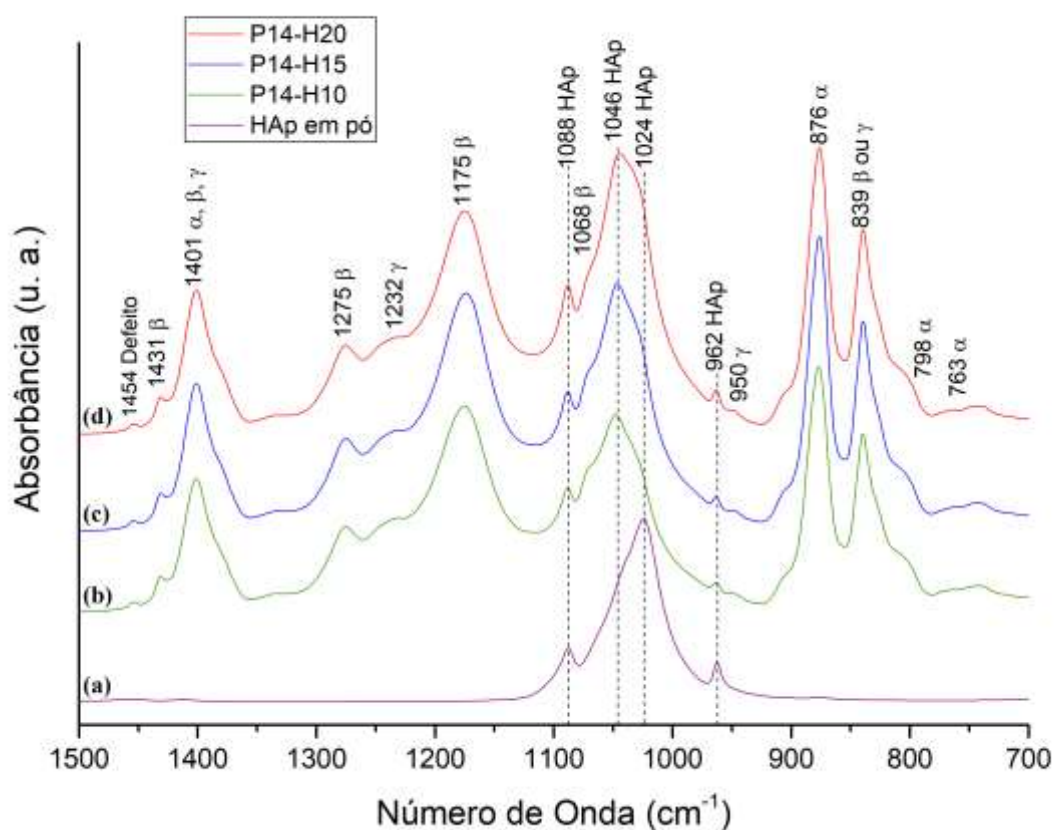
Sendo assim, fica constatado que as partículas dispersas ao longo das fibras poliméricas são de hidroxiapatita.

### 5.2.5 Estudo das fases cristalinas por meio de análise de ATR-FTIR

A Figura 25 mostra os espectros de ATR-FTIR para a hidroxiapatita em pó e para as amostras eletrofiadas P14-H10, P14-H15 e P14-H20. No espectro relativo à amostra de HAp em pó (25a) verifica-se a presença de bandas em 962, 1024 e 1088  $\text{cm}^{-1}$ , características de modos vibracionais do grupo funcional  $\text{PO}_4^{3-}$  da hidroxiapatita (ARAMI, 2009; SILVA, 2018). Já os espectros relativos as amostras eletrofiadas contendo PVDF-HAp (25b, 25c e 25d), demonstraram comportamento semelhante entre si. Os três espectros apresentaram as mesmas bandas características das fases  $\alpha$  (763, 798 e 876  $\text{cm}^{-1}$ ) (ANDREW e CLARK, 2008; BORMASHENKO, 2004),  $\beta$  (839, 1068, 1175, 1275 e 1431  $\text{cm}^{-1}$ ) e  $\gamma$  (839, 950 e 1232

$\text{cm}^{-1}$ ) (ANDREW e CLARK, 2008; BORMASHENKO, 2004; SILVA, 2018; SILVA, 2019) do PVDF, bem como as bandas em  $1401 \text{ cm}^{-1}$ , que pode ser atribuída a qualquer uma das três fases, e em  $1454 \text{ cm}^{-1}$ , relativa a existência de defeito na cadeia polimérica (SILVA, 2019). Quanto as bandas relativas à hidroxiapatita, é interessante notar que todos os três espectros, além de apresentarem os picos em  $962$  e  $1088 \text{ cm}^{-1}$ , também apresentaram surgimento de novo pico em  $1046 \text{ cm}^{-1}$ , relativo ao modo de vibração do grupo funcional  $\text{PO}_4^{3-}$  da HAp (SILVA 2018), e a banda em  $1024 \text{ cm}^{-1}$  apareceu apenas como um ombro. Isso pode ter ocorrido por conta da sobreposição de bandas ocorrida nessa região do espectro. Talvez a banda em  $1068 \text{ cm}^{-1}$  (fase  $\beta$  do PVDF) tenha colaborado para o aumento da intensidade da banda em  $1046 \text{ cm}^{-1}$ , que já devia estar presente no espectro da amostra da HAp em pó (Figura 24a), mas que estava invisível por conta da intensidade do pico em  $1024 \text{ cm}^{-1}$ . Por fim, observa-se que, conforme a proporção de HAp nas amostras aumenta, os picos relativos à cerâmica em  $1046$  e  $1088 \text{ cm}^{-1}$  também aumentam, quando comparados com os picos referentes ao PVDF, conforme esperado.

Figura 25 - Espectros de ATR-FTIR das amostras de (a) HAp em pó e das membranas eletrofiadas (b) P14-H10, (c) P14-H15 e (d) P14-H20.



Fonte: A autora (2021).

A porcentagem de fase  $\beta$  das amostras PVDF-HAp eletrofiadas, foi calculada por meio da análise de ATR, utilizando o método descrito na seção 4.7.3. Embora as bandas de HAp estejam presentes no compósito, o método pôde ser empregado, pois não há sobreposição das bandas da HAp com as bandas do PVDF nas regiões do espectro utilizadas para o cálculo (equações 2, 3 e 4). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Quantidades de fase  $\beta$  calculadas para diferentes amostras de PVDF-HAp utilizando-se o método descrito na seção 4.7.3.

<b>Amostra</b>	<b>Quantidade Fase <math>\beta</math> (%)</b>
P14-H10	83,7
P14-H15	86,2
P14-H20	85,8

Fonte: A autora (2021)

Todas as três amostras eletrofiadas apresentaram valores de porcentagem de fase  $\beta$  próximos, sendo que a amostras P14-H15 obteve o maior valor dentre elas. Apesar disso, os valores calculados foram menores do que aquele obtido anteriormente para a amostra P14 (vide Tabela 3). Isso pode ser devido ao fato de que, para as amostras com incorporação de cerâmica, foi utilizada uma tensão mais baixa do que para aquelas sem incorporação de HAp, durante o processo de eletrofição (vide seção 4.4.2). A tensão foi mantida mais baixa a fim de minimizar o rompimento da fibra, uma vez que a velocidade de ejeção da solução também foi diminuída de modo que não houvesse entupimento da agulha. De fato, tensões mais altas podem ser responsáveis por maior ocorrência de fase  $\beta$  em membranas de PVDF eletrofiadas (JIYONG, 2017). Ainda assim, considera-se o resultado apresentado na Tabela 6 bastante positivo, pois o processo de obtenção das fibras tornou a fase polar  $\beta$  majoritária ao contrário do que ocorria com o pó comercial cuja porcentagem dessa fase era de 32,6%.

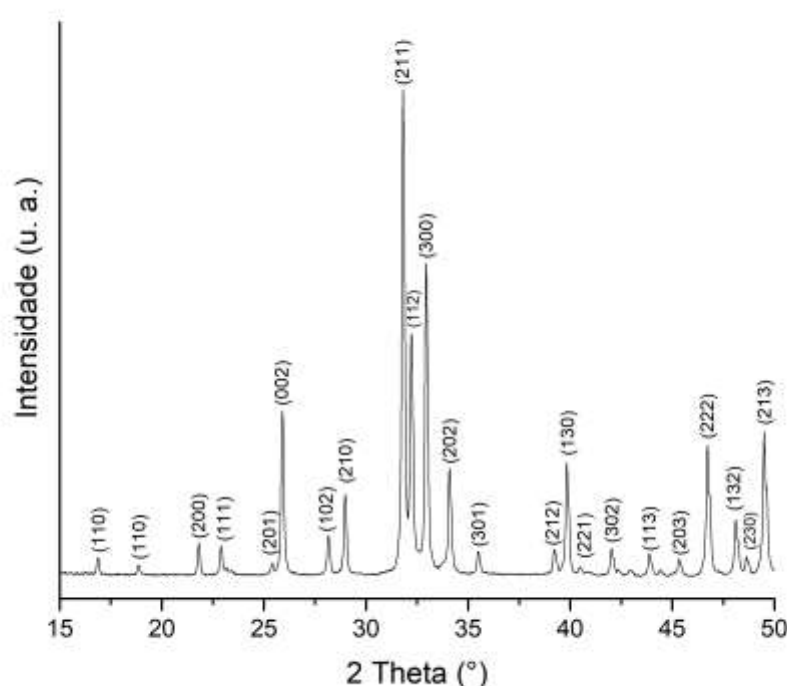
Pesquisa semelhante foi realizada por TANDON, B. et al. (2019), onde foram eletrofiadas fibras contendo 16% de PVDF em massa dissolvido em DMF/acetona (1:1), com incorporação de 5 e 10% de HAp. Os parâmetros de eletrofição empregados foram: 1,5 ml/h para a velocidade de ejeção da solução; distância de trabalho de 17,5 cm; velocidade de rotação do coletor igual a 50 rpm e tensão aplicada de 17,5 kV. A porcentagem de fase  $\beta$  calculada para essas fibras foi de 77 e 70%, respectivamente, valor menor do que aquele apresentado para as fibras eletrofiadas com a amostra sem incorporação de HAp, que foi de 88%. Sendo assim, observa-se que a queda nas porcentagens de fase  $\beta$  foram ainda maiores

do que para as amostras obtidas no presente trabalho, com isso pode-se constatar que os resultados apresentados aqui mostraram-se satisfatórios.

### 5.2.6 Análise de difração de raio x (DRX)

A hidroxiapatita, com fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , cristaliza-se na forma hexagonal com espaçamento do grupo espacial  $P6_3/m$  (SILVA, 2019). A Figura 26 mostra o difratograma obtido para amostra de HAp em pó. São destacados os índices de Miller para os respectivos padrões de difração. Esse resultado mostra que o processo utilizado para a produção da hidroxiapatita a partir dos ossos bovinos seguindo de moagem em altas energias permitiu a formação de um pó de hidroxiapatita monofásico, não sendo detectadas fases espúrias no difratograma.

Figura 26 - Difratograma da amostra de hidroxiapatita em pó com os índices de Miller dos respectivos índices de difração.

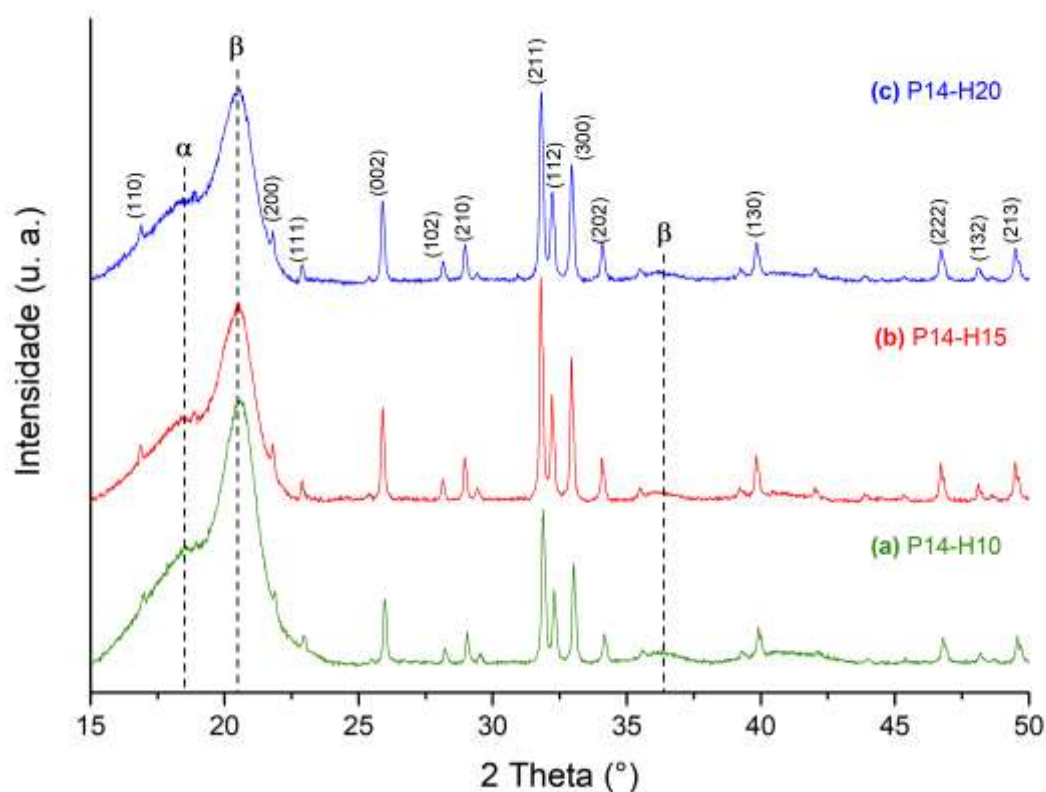


Fonte: A autora (2021).

A Figura 27 mostra os difratogramas obtidos para as membranas eletrofiadas P14-H10, P14-H15 e P14-H20 (27a, 27b e 27c, respectivamente). Nota-se a presença de picos

relativos às fases do PVDF em  $2\theta = 18,5^\circ$  e  $20,5^\circ$ , correspondentes aos planos (020) e (110)/(200) e às fases  $\alpha$  e  $\beta$  do polímero, respectivamente (CAI, 2017; BRUNENGO, 2020; MOKHTARI, 2015). O pico relativo à fase  $\alpha$  aparece apenas como um ombro para os três difratogramas, enquanto o pico relativo à fase  $\beta$  aparece bem definido. Isso concorda com os resultados descritos na seção 4.2.4, para as análises de ATR-FTIR, onde foi constatada maior ocorrência de fase  $\beta$  para as amostras. Além dos picos do polímero, picos correspondentes a HAp continuam evidentes para as três amostras. Ademais, não foi observada a formação de novas fases cristalinas após a eletrofiação.

Figura 27 - Difratogramas das amostras (a) P14-H10, (b) P14-H15 e (c) P14-H20.

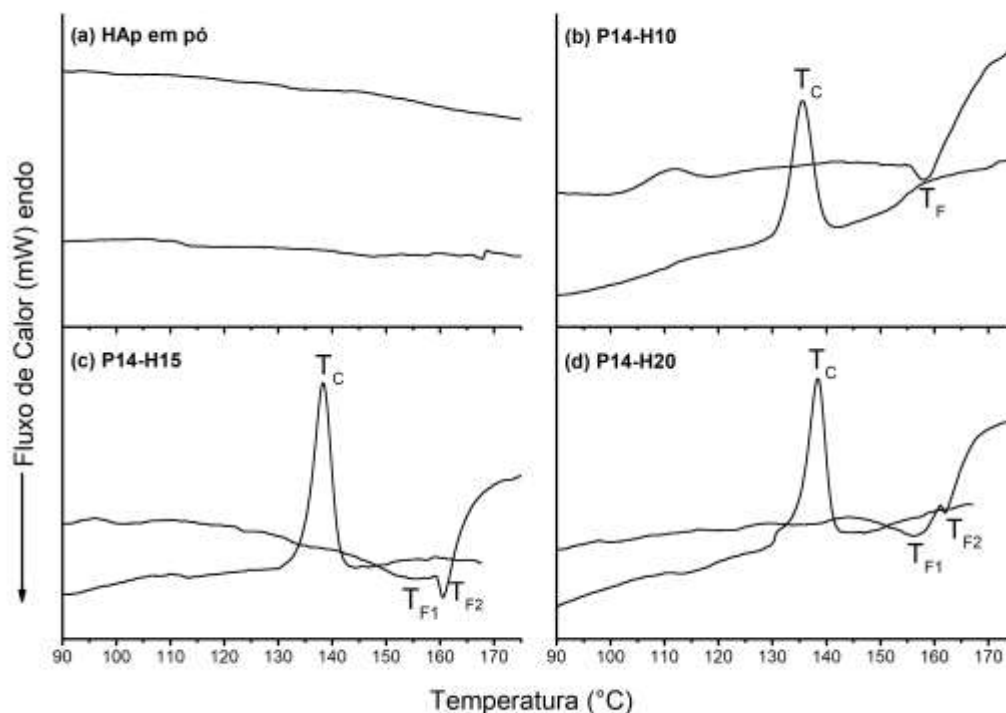


Fonte: A autora (2021).

### 5.2.7 Análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A Figura 28 mostra as curvas de DSC obtidas para as amostras de HAp em pó e para as membranas eletrofiadas com incorporação de partículas de HAp. A curva referente a cerâmica em pó (28a) não conta com a presença de nenhum pico, o que mostra que a HAp não possui ponto de fusão na faixa de temperatura utilizada para esta análise, sendo assim, é esperado que mesmo com a incorporação de partículas dessa cerâmica nas mantas de PVDF, os picos relativos ao polímero não sofram qualquer alteração.

Figura 28 - Curvas DSC das amostras de (a) HAp em pó, (b) P14-H10, (c) P14-H15 e (d) P14-H20. Os picos de fusão e cristalização estão indicados pelas siglas  $T_F$  e  $T_C$ , respectivamente.



Fonte: A autora (2021).

A Tabela 7 mostra os valores referentes aos picos de fusão de cristalização das amostras P14-H10, P14-H15 e P14-H20. É interessante observar que as duas últimas amostras apresentaram formação de dois picos de fusão, semelhante ao que ocorreu para amostra P16 (vide seção 5.1.4). Da mesma forma, isso pode ser devido ao fato da presença significativa das duas fases do polímero,  $\alpha$  e  $\beta$ , que possuem valores diferentes para a fusão.



Tabela 7 - Temperaturas de fusão ( $T_F$ ) e cristalização ( $T_C$ ) das membranas eletrofiadas de PVDF-HAp com diferentes proporções da cerâmica.

Amostra	$T_F$ (pico) (°C)	$T_F$ (onset) (°C)	$T_C$ (°C)
P14-H10	158,1	155,5	135,5
P14-H15	156,0/160,6	147,3/157,2	138,3
P14-H20	156,3/161,9	147,4/160,3	138,3

Fonte: A autora (2021).

Em suma, pode-se dizer que o processo de eletrofiação e adição de partículas de HAp nas soluções de P14 não foi responsável por alterar características da estrutura do polímero. Nem alterou significativamente  $T_F$  e  $T_C$ .

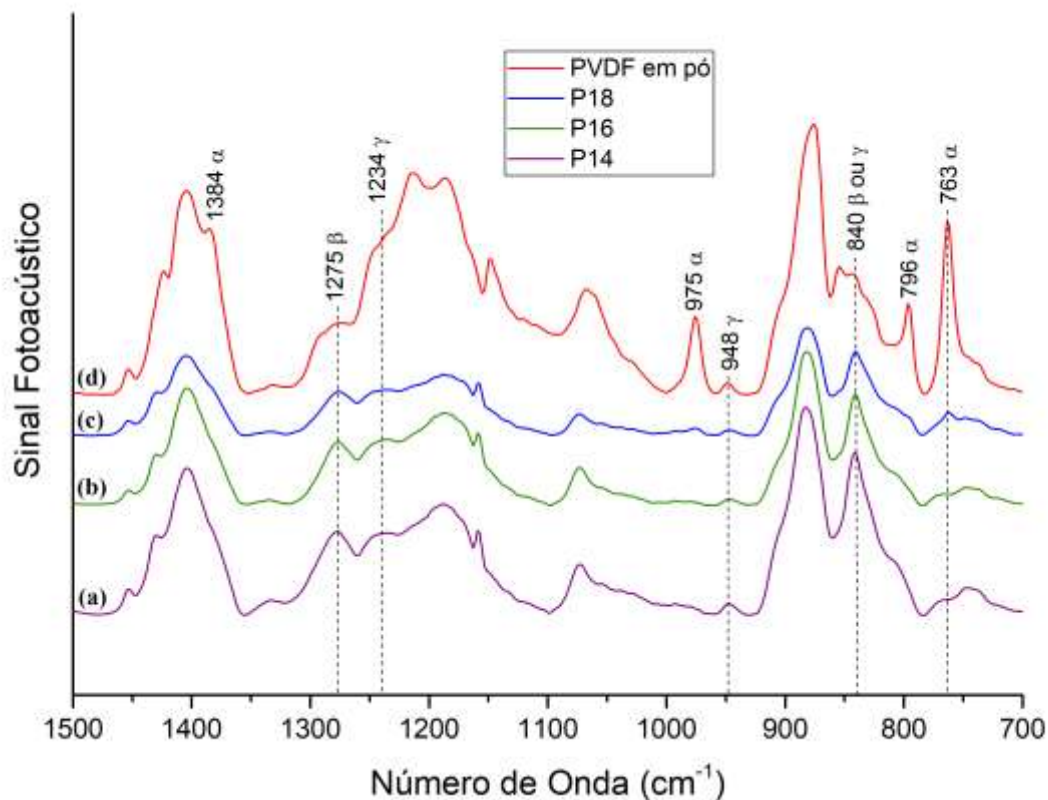
### 5.3 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR-PAS)

Nesta seção são apresentados os resultados da análise de FTIR-PAS para todas as amostras eletrofiadas e também para amostra de PVDF em pó. A finalidade desta análise é investigar qual a influência da análise de ATR na conformação  $\beta$  do polímero.

No processo de análise de ATR um pedaço de amostra é pressionado sobre um cristal com o auxílio de um pistão. Especula-se que esse procedimento poderia conduzir a uma leitura errônea de picos referentes à fase  $\beta$  do PVDF, pelo fato deste ser um material piezoelétrico e, como bem se sabe, essa propriedade ser ativada no material quando o mesmo é submetido a uma compressão mecânica. Diferentemente da análise de ATR, a FTIR-PAS é menos invasiva, uma vez que a amostra não precisa ser pressionada. Sendo assim, a piezoelectricidade do PVDF não seria induzida durante o processo, e os picos obtidos para as fases do polímero estariam mais próximos da realidade.

A Figura 29 apresenta os espectros de FTIR-PAS obtidos para as amostras de P14 (29a), P16 (29b), P18 (29c) e para o PVDF em pó (29d). Semelhante ao que foi observado na 5.1.2 para as análises de ATR dessas mesmas amostras é possível observar que houve diminuição de picos relativos da fase  $\alpha$  (como aqueles em 763, 796, 975 e 1384  $\text{cm}^{-1}$ ) do polímero e aumento/menor definição de alguns picos característicos de fase  $\beta$  (840 e 1275  $\text{cm}^{-1}$ ) e também de fase  $\gamma$  (840 e 1234  $\text{cm}^{-1}$ ), quando comparadas as amostras eletrofiadas com a amostra em pó.

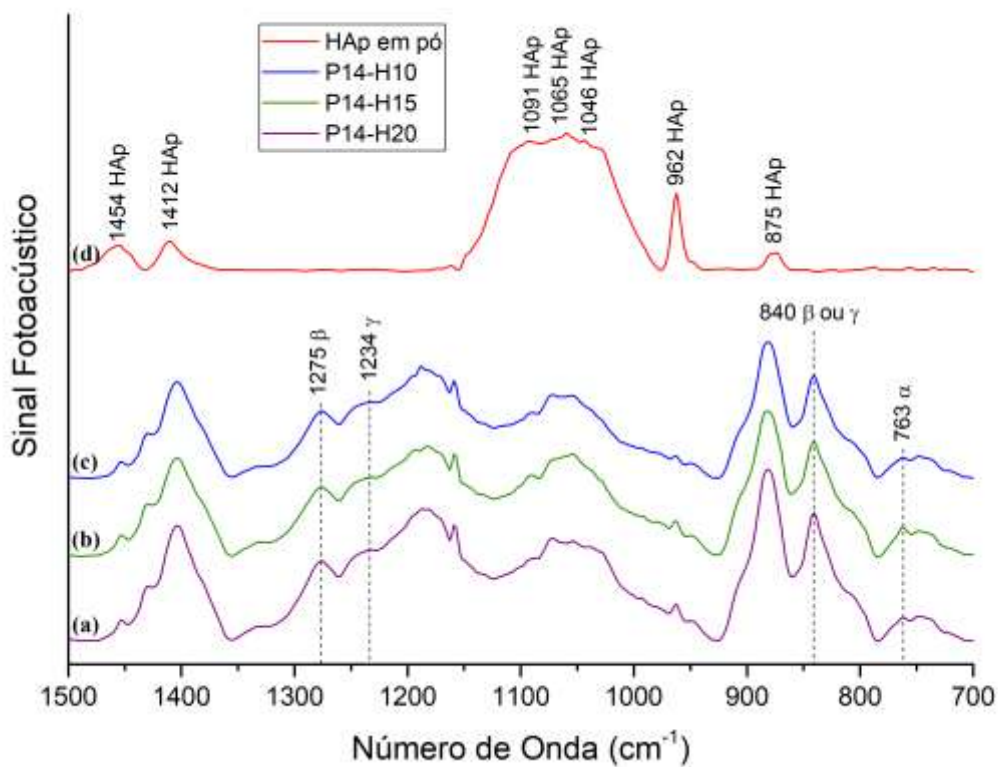
Figura 29 - Espectros de FTIR-PAS das amostras de PVDF em pó e em membranas eletrofiadas. (a) P14, (b) P16 e (c) P18 e (d) PVDF em pó.



Fonte: A autora (2021).

Já a Figura 30 mostra os espectros de FTIR-PAS das amostras de HAp em pó (30a), P14-H10 (30b), P14-H15 (30c) e P14-H20 (30d). Comparando-se com o espectro de ATR-FTIR apresentado na 5.1.2 nota-se que houve o aparecimento de mais picos característicos da HAp no espectro dessa amostra na forma de pó, em 875, 1065, 1412 e 1454  $\text{cm}^{-1}$  (SROKA-BARTNICKA, 2017; COSTA, A. 2009). Isso pode ter ocorrido por conta da não utilização da mesma amostra de cerâmica para esta análise. Enquanto isso, os espectros das membranas eletrofiadas não mostraram grande diferença quando comparados com aqueles mostrados na seção 5.1.2, obtidos por análise de ATR. Sendo assim, na Figura 30 foram destacados apenas os picos utilizados para o cálculo da porcentagem de fase  $\beta$  (763, 840, 1275 e 1234  $\text{cm}^{-1}$ ).

Figura 30 - Espectros de FTIR-PAS das amostras de PVDF em pó e em malhas eletrofiadas. (a) P14-H20, (b) P14-H15, (c) P14-H10 e (d) HAp em pó.



Fonte: A autora (2021).

Na Tabela 8 são mostradas as porcentagens de fase  $\beta$  obtidas para cada uma das amostras por meio das análises de ATR-FTIR e FTIR-PAS, utilizando-se o método descrito na seção 4.7.3.

Tabela 8 - Quantidades de fase  $\beta$  calculadas para diferentes amostras de PVDF a partir de análises de ATR-FTIR e FTIR-PAS, utilizando-se o método descrito na seção 4.7.3.

Amostra	Fase $\beta$ (ATR-FTIR) (%)	Fase $\beta$ (FTIR-PAS) (%)
PVDF em pó	32,6	35,5
P18	73,0	69,8
P16	83,3	83,0
P14	90,0	88,5
P14-H10	83,7	77,0
P14-H15	86,2	74,5
P14-H20	85,8	79,2

Fonte: A autora (2021).

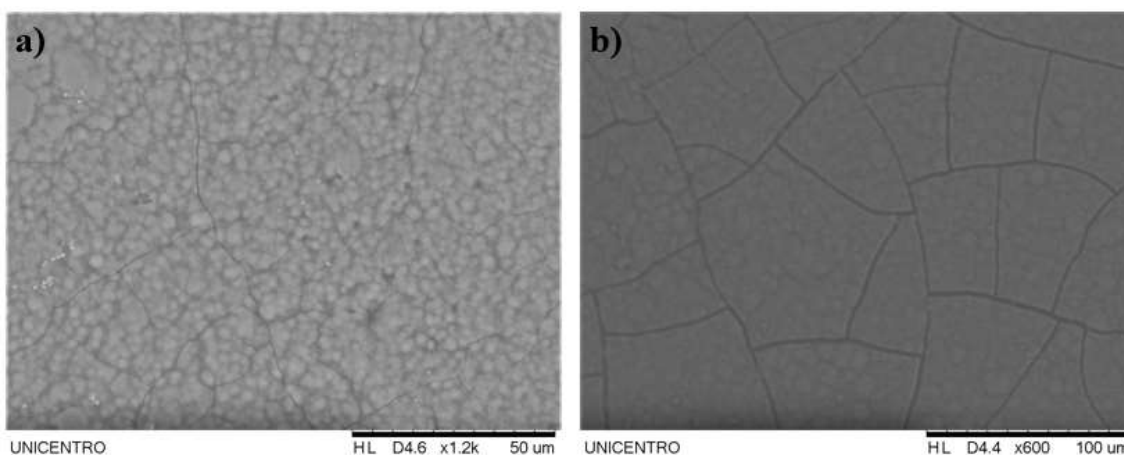
Os valores de fase  $\beta$  apresentados na Tabela 8 podem ser um indicativo de que a análise de ATR-FTIR não é capaz de alterar a resposta da fase do PVDF, levando a uma leitura errônea dos picos relativos à fase eletroativa. Entretanto, vale ressaltar que uma análise mais aprofundada é requerida para que essa hipótese seja de fato esclarecida.

#### 5.4 TESTES DE BIOATIVIDADE *IN VITRO* EM FLUIDO CORPORAL SIMULADO (SBF)

O teste de bioatividade em fluido corporal simulado (SBF) é um importante método para avaliar a capacidade que um material tem de se ligar ao osso vivo. Materiais bioativos, quando imersos em SBF, mineralizam uma camada de apatita em sua superfície (ANDRADE e DOMINGUES, 2006).

A Figura 31 mostra as imagens de microscopia eletrônica de varredura obtidas para amostras controle de hidroxiapatita, que ficaram em imersão em fluido corporal simulado (SBF) por 7 (Figura 31a) e 21 dias (Figura 31b). Essas amostras servem para investigar a qualidade do SBF utilizado.

Figura 31 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de amostras controle de hidroxiapatita submetidas a teste de bioatividade in vitro em SBF por (a) 7 dias e (b) 21 dias.



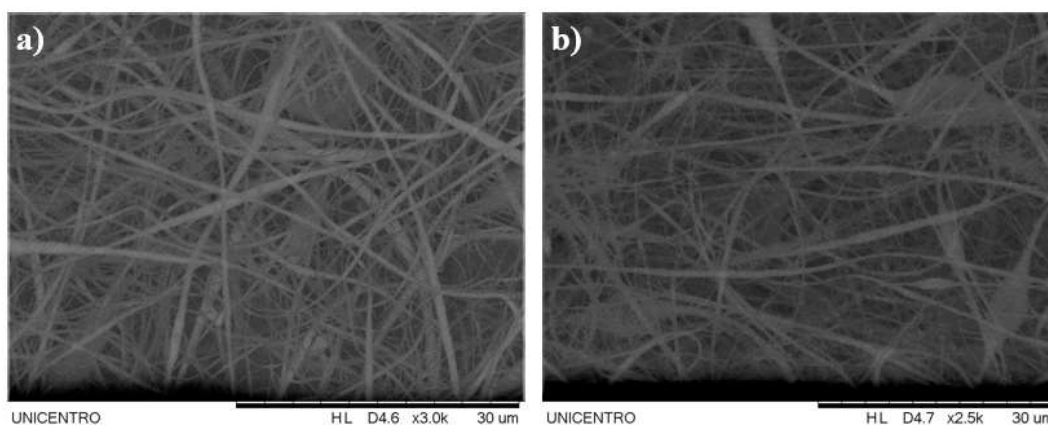
Fonte: A autora (2021).

É possível notar que em ambas as amostras houve recobrimento por camada de apatita, caracterizada pela presença de glóbulos e também de rachaduras (causadas pelo processo de secagem da amostra em estufa). Na Figura 31b a presença de rachaduras é mais evidente, o que pode ser devido a sobreposição de várias camadas de apatita por conta do

maior tempo de imersão dessa amostra. Com isso, ficou constatada a boa qualidade do SBF utilizado para testar a bioatividade das demais amostras deste trabalho.

A Figura 32 mostra imagens de microscopia eletrônica de varredura obtidas para as amostras eletrofiadas P14, imersas em SBF por 7 (Figura 32a) e 21 dias (Figura 32b). Não foi possível localizar nenhuma região com crescimento de apatita nas fibras, resultado que já era esperado, uma vez que o PVDF é um material que não apresenta bioatividade.

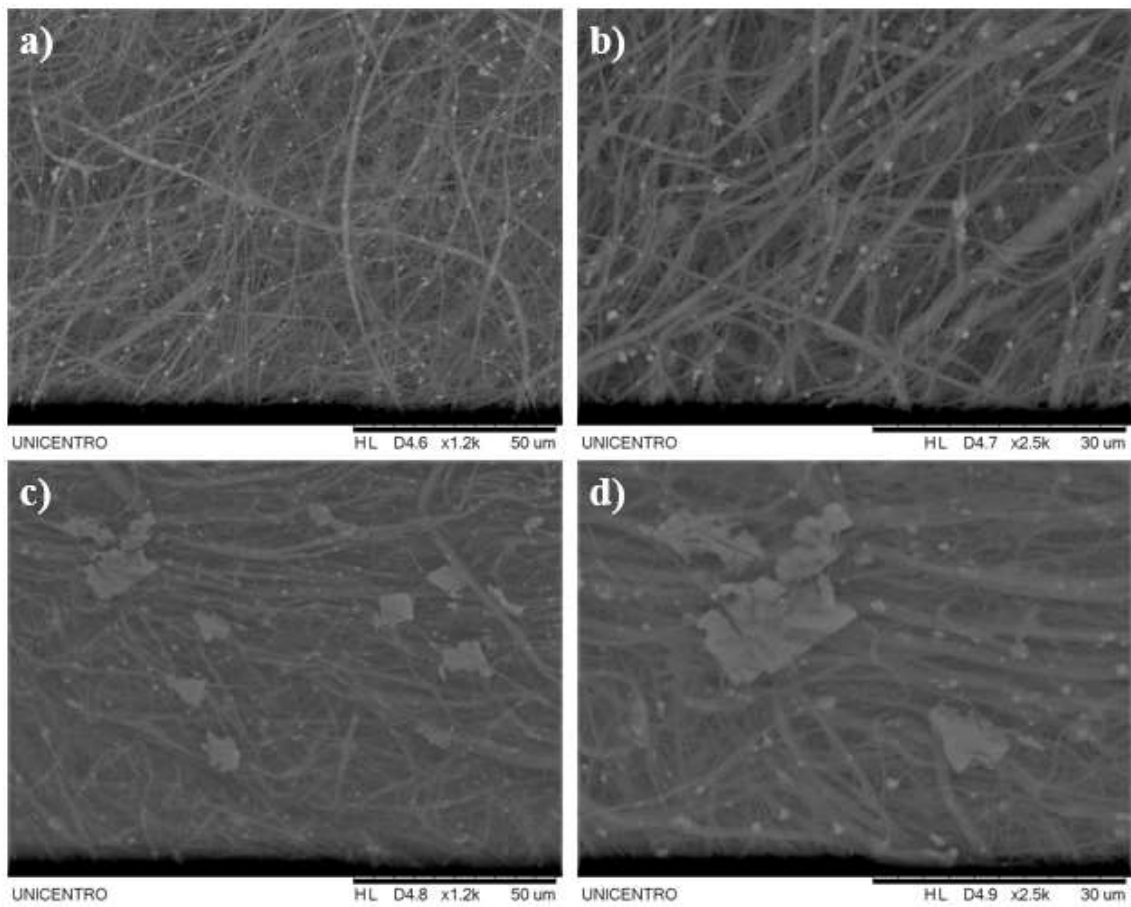
Figura 32 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de amostras padrão P14 submetidas a teste de bioatividade in vitro em SBF por (a) 7 dias e (b) 21 dias.



Fonte: A autora (2021).

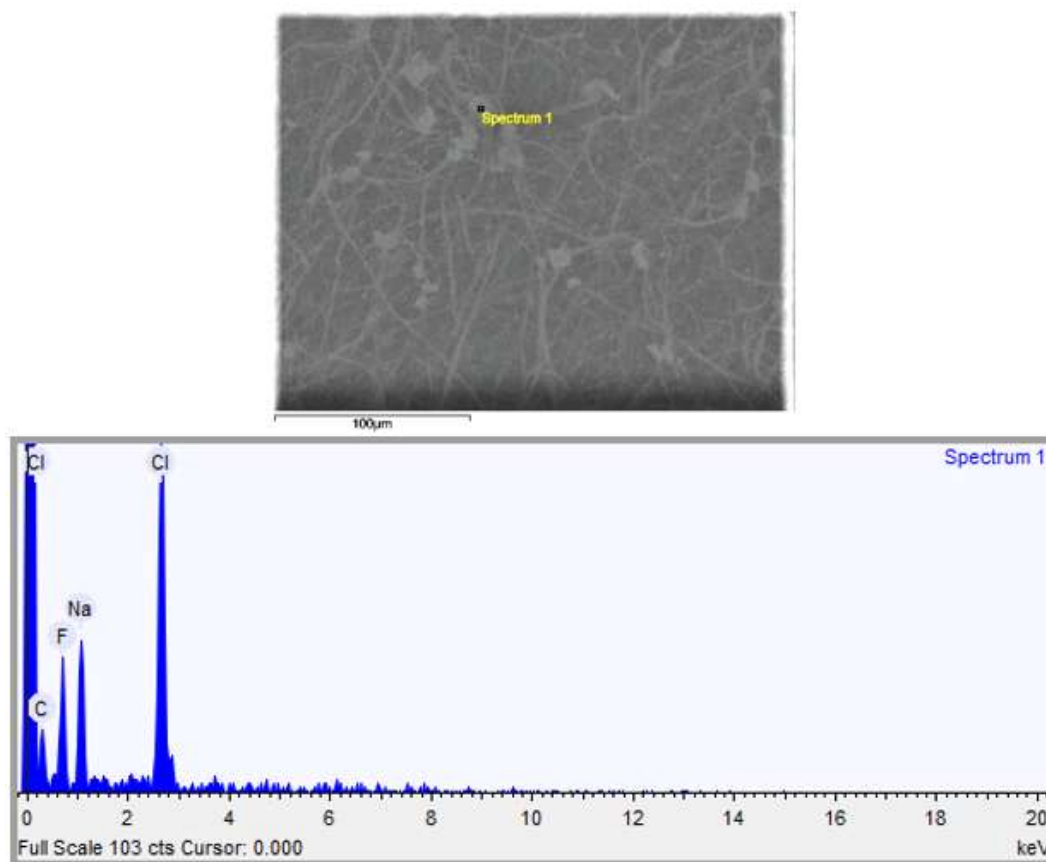
Na Figura 33 são apresentadas imagens de MEV das amostras P14-H10 imersas em SBF por 7 (Figura 33a e 33b) e 21 dias (Figura 33c e 33d). Nas amostras imersas por 7 dias não foi possível notar regiões com crescimento de apatita. Já nas amostras imersas por 21 dias, verificou-se o aparecimento de algumas regiões esbranquiçadas. A fim de se investigar a natureza de tais regiões foi conduzida análise de EDS e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 34. No espectro são identificados os elementos cloro (Cl) e sódio (Na), o que indica que houve deposição de cloreto de sódio nas fibras eletrofiadas. Os elementos carbono (C) e flúor (F) também estão presentes e são oriundos do PVDF. Além disso, não foram localizadas regiões com aglomerados globulares que indicassem o crescimento de apatita nas amostras.

Figura 33 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de amostras P14-H10 submetidas a teste de bioatividade *in vitro* em SBF por (a) e (b) 7 dias e (c) e (d) 21 dias.



Fonte: A autora (2021).

Figura 34 - Imagem de MEV e espectro de EDS de região de amostra P14-H10 imersa em SBF por 21 dias.

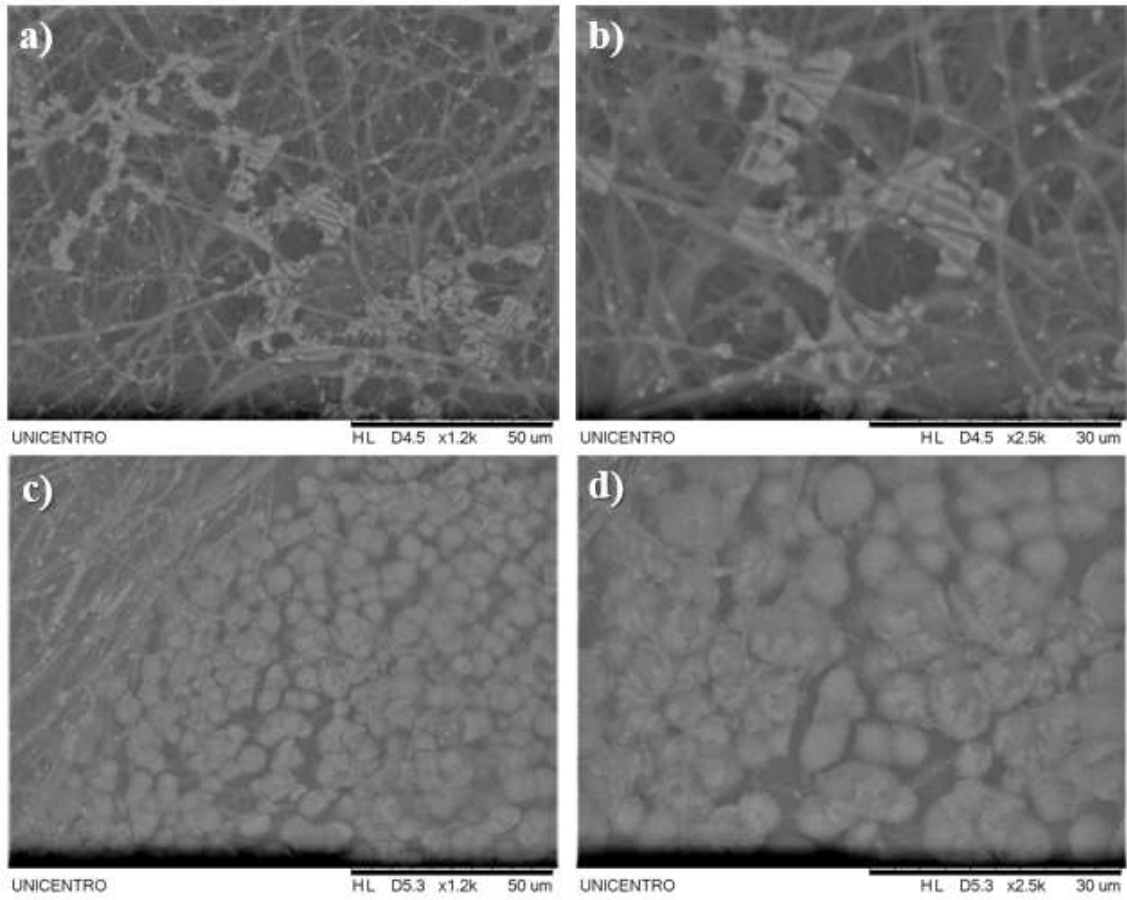


Fonte: A autora (2021).

A Figura 35 mostra as amostras P14-H15 que ficaram em imersão em SBF por 7 (Figuras 35a e 35b) e 21 dias (Figuras 35c e 35d). É possível notar que em 7 dias houve deposição de cristais de sal nas fibras, semelhante ao que ocorreu com as amostras P14-H10 mostrado na Figura 33 e no espectro da Figura 34. Já para a amostra que ficou imersa em fluido corporal simulado por 21 dias, foram encontradas regiões com presença de aglomerados globulares que parecem se tratar de apatita. A análise de EDS confirmou essa hipótese (Figura 36). No espectro, apesar de haver picos referentes ao cloro (Cl), vê-se picos de fósforo (P) e cálcio (Ca), típicos do crescimento de apatita em amostras bioativas.

Sendo assim, constata-se que a amostra P14-H10 não apresentou caráter bioativo para os tempos de imersão em SBF utilizados aqui, e que a amostra P14-H15 apresentou resposta bioativa após 21 dias de imersão em SBF.

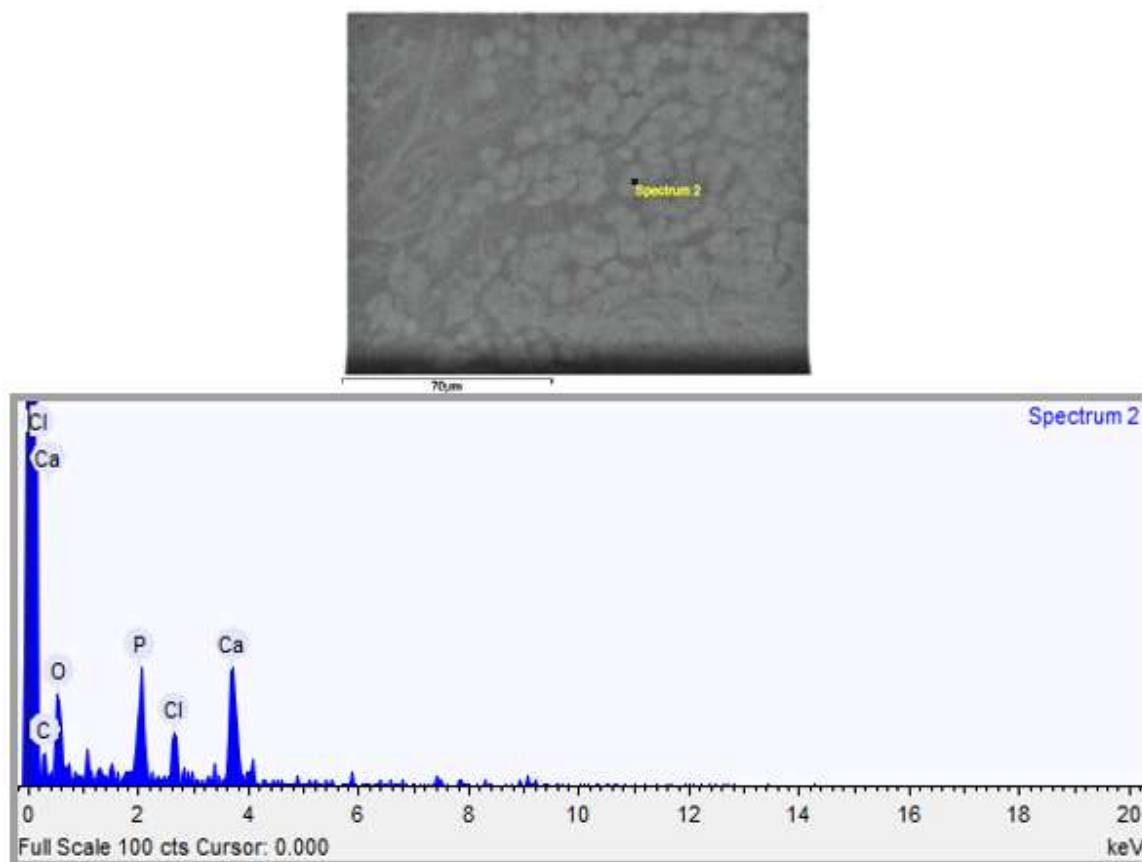
Figura 35 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de amostras P14-H15 submetidas a teste de bioatividade *in vitro* em SBF por (a) e (b) 7 dias e (c) e (d) 21 dias.



Fonte: A autora (2021).



Figura 36 - Imagem de MEV e espectro de EDS de região de amostra P14-H15 imersa em SBF por 21 dias.



Fonte: A autora (2021).

O caráter bioativo do compósito PVDF/HAp já é conhecido. SILVA, et al. (2019) realizaram testes de bioatividade *in vitro* com fluido corporal simulado (SBF) em amostras confeccionadas a partir da mistura e prensagem de pós de PVDF e BCP (90% hidroxiapatita e 10%  $\beta$ -TCP) na proporção de 40% PVDF e 60% BCP. O compósito demonstrou crescimento de camada de apatita após 7 dias de imersão. O tempo de resposta bioativa foi menor que aquele obtido aqui para as membranas eletrofiadas do compósito. Isso pode ser devido as diferentes proporções utilizadas para o polímero e a cerâmica, bem como ao método de preparação das amostras.

Na literatura também são encontrados trabalhos onde membranas eletrofiadas compostas de matriz polimérica com dispersão de partículas de hidroxiapatita tiveram sua bioatividade avaliada através de testes *in vitro* com SBF. ABDAL-HAY (2013) obtiveram fibras eletrofiadas de nylon-6 (policaprolactama) com incorporação de partículas de hidroxiapatita nas proporções de 10 e 15% em massa. Testes de bioatividade *in vitro* com SBF mostraram que o compósito com 15% de HAp apresentou maior formação de apatita

do que aquele com 10%. Resultado semelhante ao apresentado no presente trabalho, onde apenas as membranas com incorporação de 15% de HAp apresentaram resposta bioativa, em comparação com as membranas contendo 10% de HAp.

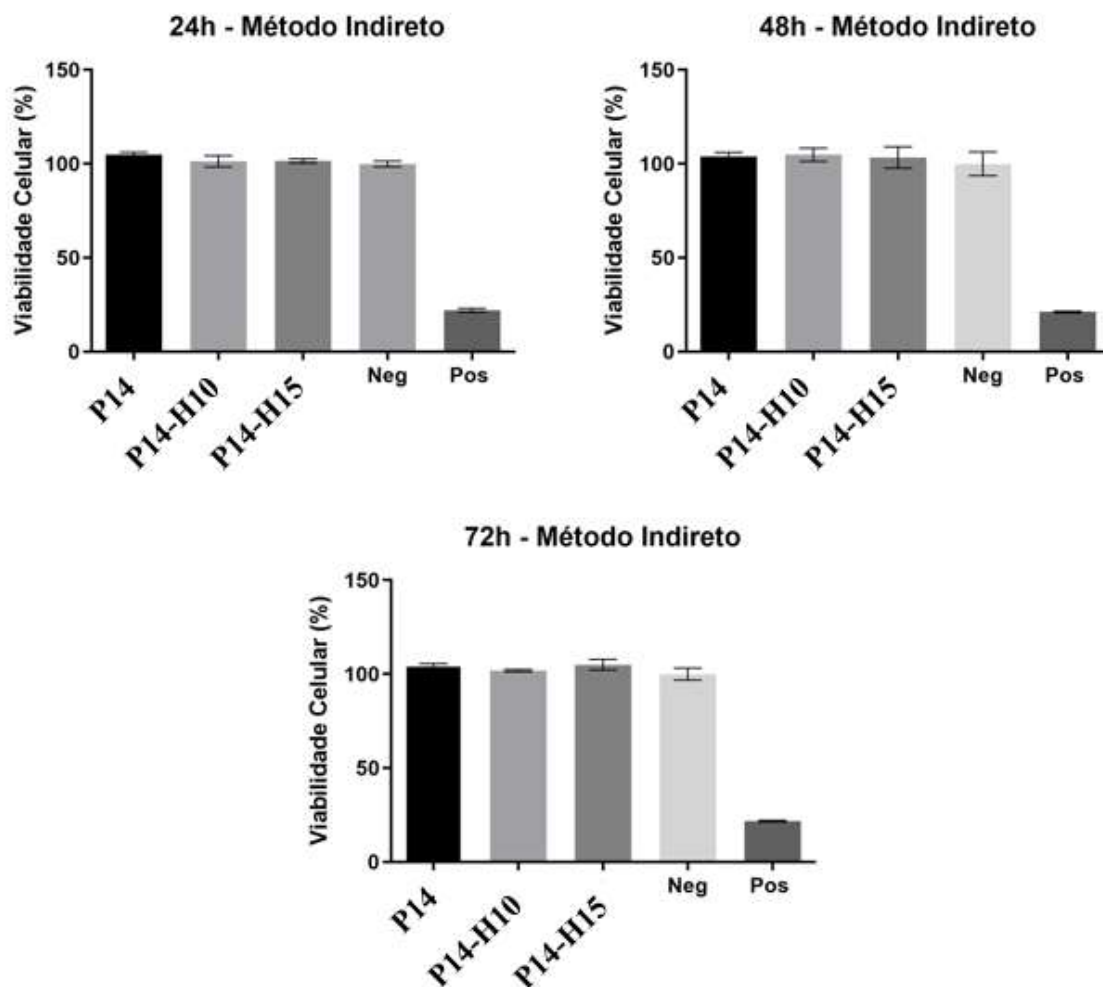
Por tudo isso, a membrana P14-H15 demonstrou ser uma possível candidata para futuras aplicações em ortopedia. Testes de citotoxicidade em cultura de osteoblastos, bem como análises mecânicas devem ser realizadas nessa amostra, a fim de investigar se a mesma seria apropriada para tais aplicações.

## 5.5 TESTES DE CITOTOXICIDADE EM MEIO DE CULTURA CELULAR DE FIBROBLASTOS HUMANO

As amostras P14, P14-H10 e P14-H15 foram submetidas a teste de citotoxicidade indireta e direta, em meio de cultura celular de fibroblastos humanos. A realização desta etapa é de suma importância para avaliar a capacidade dessas membranas como curativos inteligentes, capazes de auxiliar na reparação de lesões na pele.

A Figura 37 mostra os resultados da análise de citotoxicidade indireta para períodos de 24, 48 e 72h de exposição das células aos extratos das amostras. Os resultados obtidos aqui são promissores, uma vez que nenhuma das amostras analisadas demonstrou toxicidade nos períodos de tempo avaliados. É possível notar que todas as amostras obtiveram porcentagem de viabilidade celular semelhante ao controle negativo (material que não causa danos às células), mesmo após exposição por período de 72 horas.

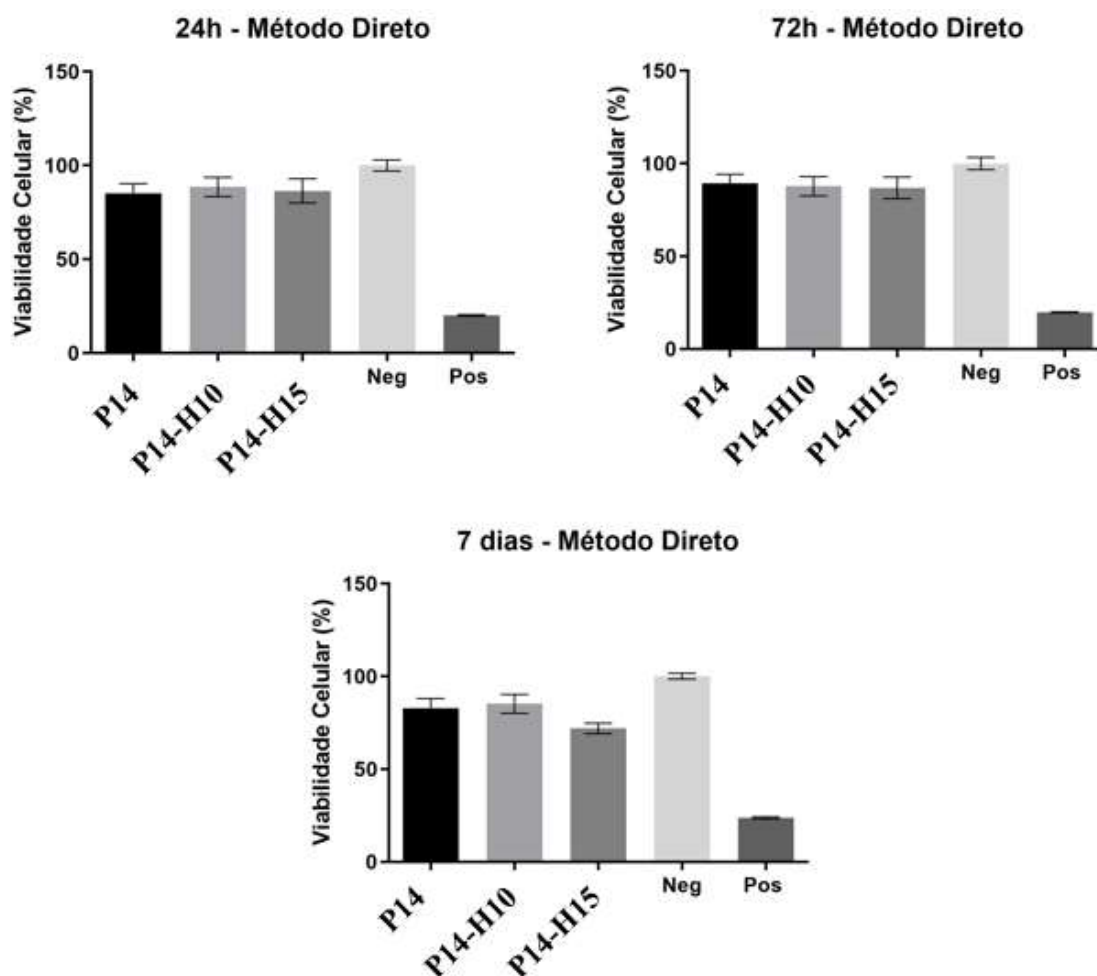
Figura 37 - Viabilidade celular das amostras P14, P14-H10 e P14-H15, analisadas por método indireto por períodos de 24, 48 e 72h.



Fonte: A autora (2021).

A Figura 38 mostra os resultados da análise de citotoxicidade direta para períodos de 24h, 72h e 7 dias de exposição das células às membranas eletrofiadas. Os resultados mostram que as amostras não demonstraram toxicidade e que as células foram capazes de crescer e se multiplicar na superfície das membranas mesmo após 7 dias de incubação. Para os períodos de 24 e 72 horas, a viabilidade celular permaneceu acima de 85% para todas as membranas eletrofiadas. Já para o período de 7 dias, as amostras P14 e P14-H10 obtiveram porcentagem de viabilidade celular acima de 82%, e apenas a amostra P14-H15 obteve porcentagem de viabilidade celular de aproximadamente 72%, o que ainda é um excelente resultado, visto que este é um período considerado longo em testes de viabilidade celular.

Figura 38 - Viabilidade celular das amostras P14, P14-H10 e P14-H15, analisadas por método direto por períodos de 24h a 7 dias.



Fonte: A autora (2021).

Com isso, ficou constatado que todas as amostras analisadas aqui demonstraram baixa citotoxicidade mesmo após 7 dias de exposição pelo método direto. Esse período é considerado longo em testes com cultura celular. Isso mostra o potencial desse compósito, na forma de membranas eletrofiadas, para atuar em meio biológico.

De fato, o PVDF vem sendo explorado para a confecção de biomateriais compósitos que sejam capazes de estimular o crescimento e diferenciação celular. Isso porque o efeito piezoelétrico é capaz de estimular determinados comportamentos celulares, como proliferação e adesão (GUO, 2012). Em 2007, BRAGA et al. já haviam demonstrado que filmes de PVDF/HAp obtiveram bom desempenho em testes de citotoxicidade indireta realizados em meio de cultura de células NCTC clone 929, não demonstrando caráter citotóxico. Em 2010, WEBER; et al. realizaram testes de citotoxicidade direta em

fibroblastos de pele humana para membranas eletrofiadas de poli(fluoreto de vinilideno – trifluoroetileno) (PVDF-TrFE), um copolímero do PVDF que também apresenta propriedades piezoelétricas.

## 6 CONCLUSÃO

Esse trabalho foi composto por duas etapas principais. Na primeira delas foram obtidas membranas eletrofiadas utilizando-se diferentes proporções de poli(fluoreto de vinilideno), dissolvidas em diferentes proporções de dimetilformamida e acetona. Imagens de microscopia eletrônica de varredura revelaram que o diâmetro das fibras variou com a viscosidade da solução e com a relação mássica dos solventes. A solução com menor viscosidade conteve 14% de PVDF em massa dissolvido em DMF/acetona na proporção 60/40 em massa (P14), e apresentou as fibras com menor diâmetro e com maior uniformidade. Análises de ATR também mostraram que a partir desta solução obteve-se fibras com 90% de fase  $\beta$ , a maior dentre as três. Esse resultado ficou em concordância com aquilo que foi encontrado na literatura, de que a conversão de fase  $\alpha \rightarrow \beta$  está relacionada, dentre outras coisas, com o estiramento da solução durante o processo de eletrofição, que por sua vez se relaciona com a concentração de polímero utilizada. A partir disso, então, a solução P14 foi escolhida para a realização da segunda etapa dessa pesquisa.

Na segunda etapa, partículas nano e micrométricas de hidroxiapatita foram incorporadas na solução de P14 nas proporções de 10, 15 e 20% em massa (amostras P14-H10, P14-H15 e P14-H20, respectivamente). Imagens de microscopia eletrônica de varredura revelaram que houve um aumento nos diâmetros das fibras, quando comparadas com aquelas obtidas para o polímero puro. A amostra com P14-H20 foi a que apresentou os maiores diâmetros de fibras e maior formação de defeitos (*beads*). Já as amostras P14-H10 e P14-H15, apresentaram bons resultados, com fibras mais finas e uniformes. A fim de se caracterizar as fases cristalinas do polímero e da HAp, análises de ATR foram conduzidas em todas as amostras. Os resultados mostraram que houve boa incorporação da cerâmica nas membranas eletrofiadas, sendo observado aumento das bandas características da HAp conforme se aumentava a concentração da mesma nas membranas. Além disso, a porcentagem de fase  $\beta$  do PVDF foi calculada, sendo de 83,7 e 86,2% os valores obtidos para as amostras P14-H10 e P14-H15, respectivamente.

Além disso, as amostras P14, P14-H10 e P14-H15 foram submetidas a testes de bioatividade *in vitro* em fluido corporal simulado (SBF) por períodos de 7 a 21 dias. Após

21 dias de imersão, a amostra P14-H15 demonstrou crescimento de apatita, provando seu caráter bioativo, sendo uma promissora candidata para atuar na regeneração do tecido ósseo.

Essas amostras também foram testadas quanto a sua citotoxicidade. Esses testes foram realizados em meio de cultura celular de fibroblastos humanos pelos métodos indireto e direto. O primeiro teve duração máxima de 72 horas, e as células demonstraram índice de sobrevivência muito próximo daqueles obtidos para o reforço negativo. No segundo, o tempo de duração máximo foi de 7 dias, e mesmo após esse período que é considerado um período longo em testes com cultura de células, as membranas não demonstraram qualquer característica de citotoxicidade. Esse resultado é muito promissor e indica que essas membranas podem vir a ser utilizadas no futuro como curativos inteligentes para a regeneração do tecido epitelial.

Com isso, os métodos utilizados aqui, tanto para a síntese das soluções, quanto para os parâmetros de eletrofição, se mostraram satisfatórios para a obtenção de membranas poliméricas compostas por fibras micro e nanométricas e com fase cristalina majoritariamente composta por fase  $\beta$ . Também mostrou-se satisfatório o método utilizado para a incorporação de partículas de HAp nas membranas eletrofiadas, sendo mantida a alta concentração de fase  $\beta$  do polímero. Além disso, os testes de bioatividade e citotoxicidade realizados demonstraram que as membranas apresentam grande potencial para futuras aplicações na engenharia de tecidos.

## 6.1 PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

Durante a realização deste mestrado acontecimentos inesperados mudaram o rumo da pesquisa. A pandemia de coronavírus, que acometeu todo o mundo em 2020, com toda a certeza também deixou sua marca aqui. Ainda assim, diante das dificuldades a pesquisa prosseguiu na medida do possível e sempre priorizando a segurança das pessoas envolvidas. Algumas análises importantes não puderam ser realizadas, como testes mecânicos nas fibras, análise de molhabilidade e também novas análises de DSC para determinar a cristalinidade do polímero eletrofiado.

Futuramente, estas membranas eletrofiadas podem ser submetidas a testes de bioatividade *in vitro* com aplicação de campo elétrico, visando otimizar a resposta piezoelétrica do material. As soluções utilizadas também podem servir para a confecção de filmes finos, a fim de se comparar as propriedades destes com as das membranas eletrofiadas.

Além disso, testes em cultura celular de osteoblastos podem ser realizados, a fim de melhor avaliar o potencial desse compósito para aplicações como auxiliador na cura do tecido ósseo.

É certo que há muito ainda a se fazer, mesmo assim, os resultados obtidos aqui são motivo de orgulho e dão a certeza de que este trabalho pode gerar ainda muitos frutos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDAL-HAY, A.; PANT, H. R.; LIM, J. K. Super-hydrophilic electrospun nylon-6/hydroxyapatite membrane for bone tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 49, p. 1314-1321, 2013.
- AGARWAL, S.; WENDORFF, J. H.; GREINER, A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. **Polymer**, v. 49, p. 5603-5621, 2008.
- ALBERS, A. P. F., et al. Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X. **Cerâmica**, v. 48, n. 305, p. 34-37, 2002.
- ALQAHEEM, Y.; ALOMAIR, A. A. Microscopy and Spectroscopy Techniques for Characterization of Polymeric Membranes. **Membranes**, v. 10, n. 02, 2020.
- ANDRADE, A. L.; DOMINGUES, R. Z. Cerâmicas Bioativas – Estado da Arte. **Química Nova**, Vol. 29, 2006.
- ANDRADE, F. A. C. **Desenvolvimento de hidroxiapatita contendo nanopartículas de prata com propriedades antibacterianas**. 119f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade de São Paulo (USP), São Carlos – SP, 2013.
- ANDREW, J. S.; CLARK, D. R. Effect of Electrospinning on the Ferroelectric Phase Content of Polyvinylidene Difluoride Fibers. **American Chemical Society**, v. 24, p. 670-672, 2008.
- ARAMI, H.; et al. Rapid formation of hydroxyapatite nanostrips via microwave irradiation. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 469, p. 391-394, 2009.
- AUSILI, A.; SÁNCHEZ, M.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C. Attenuated total reflectance infrared spectroscopy: A powerful method for the simultaneous study of structure and spatial orientation of lipids and membrane proteins. **Biomedical Spectroscopy and Imaging**, v. 04, p. 159-170, 2015.
- BEST, S. M.; et al. Bioceramics: Past, present and for the future. **Journal of the European Ceramic Society**, v.28, p. 1319-1327, 2008.
- BONADIO, T. G. M. **Estudos dos Compósitos TiO<sub>2</sub>-Hidroxiapatita e Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Hidroxiapatita: Comportamento Físico, Mecânico, Estrutural e de Bioatividade**. 134f. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.
- BONADIO, T. G. M.; et al. Polyvinylidene fluoride/hydroxyapatite/b tricalcium phosphate multifunctional biocomposite: Potentialities for bone tissue engineering. **Current Applied Physics**, v. 17, n. 5, p. 767-773, 2017.
- BORMASHENKO, Y.; et al. Vibrational spectrum of PVDF and its interpretation. **Polymer Testing**, v. 23, p. 791-796, 2004.



- BRAGA, F. J. C.; et al. Characterization of PVDF/HAP composites for medical applications. **Materials Research**, v. 10, p. 247-251, 2007.
- BRUNENGO, E.; et al. Double-step moulding: An effective method to induce the formation of  $\beta$ -phase in PVDF. **Polymer**, v. 193, 2020.
- BURR, D. B. Changes in bone matrix properties with aging. **Bone**, v. 120, p. 85-93, 2019.
- CAI, K.; et al. Improved activity of MC3T3-E1 cells by the exciting piezoelectric BaTiO<sub>3</sub>/TC4 using low-intensity pulsed ultrasound. **Bioactive Materials**, v. 06, n. 11, p. 4073-4082, 2021.
- CAO, S.; et al. New perspectives: *In-situ* tissue engineering for bone repair scaffold. **Composites Part B: Engineering**, v. 202, 2020.
- CASTRO, L. V. **Estudo de lesão de cárie experimental via espectroscopia fotoacústica e Raman**. 80f. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR, 2015.
- CHAUDHARI, A. A.; et al. Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, 2016.
- CHENG, Y.; et al. 3D structured self-powered PVDF/PCL scaffolds for peripheral nerve regeneration. **Nano Energy**, v. 69, 2020.
- COELHO, T. M.; et al. Characterization of natural nanostructured hydroxyapatite obtained from bones of Brazilian river fish. **Journal of Applied Physics**, v. 100, 2006.
- COSTA, A. C. F. M. et al. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.4, n.3, p.29-38, 2009.
- COSTA, F. R. T. **Microscopia Eletrônica de Varredura: potencialidades e aplicações**. 51f. Monografia (Bacharelado em Química) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís – MA, 2016.
- COSTA, L. M. M.; et al. Eletrofiação de nanofibras de PVDF com nanopartículas de prata e de prata/dióxido de titânio para aplicações antimicrobiais. In: **10º Congresso Brasileiro de Polímeros**, Anais, Foz do Iguaçu-PR, 2009a.
- COSTA, L. M. M. **Processamento e Caracterização de Mantas de Nanofibras Eletrofiadas e Orientadas de Poli(Fluoreto de Vinilideno)**. 159f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2009b.
- COSTA, R. G. F; et al. Eletrofiação de Polímeros em Solução. Parte I: Fundamentação Teórica. **Polímeros**, v. 22, n. 02, 2012.
- DAS, S.; BAKER, A. B. Biomaterials and Nanotherapeutics for Enhancing Skin Wound Healing. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 04, n. 82, 2016.

- DEDAVID, B. A.; et al. **Microscopia Eletrônica de Varredura: Aplicações e preparação de amostras**. Centro de Microscopia Eletrônica e de Microanálise (CEMM) do IDEIA- PUCRS. Porto Alegre, 2007.
- DELIORMANLI, A. M.; KONYALI, R. Preparation and characterization of electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone)-bioactive glass/HA biocomposite nanofibers. **Journal of the Australian Ceramic Society**, v. 55, p. 247-256, 2018.
- DOOSTMOHAMMADI, A.; et al. Preparation, chemistry and physical properties of bone-derived hydroxyapatite particles having a negative zeta potential. **Materials Chemistry and Physics**, v. 132, p. 446-452, 2012.
- FARCIC, T. S., et al. Aplicação do ultrassom terapêutico no reparo tecidual do sistema musculoesquelético. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v.37, n. 3, p. 149-153, 2012.
- FIHRI, A. et al. Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis. **Coordination Chemistry Reviews**, v.347, p.48-76, 2017.
- FILHO, H. D. F., LOPES, G. A. C. Avanços em caracterização de amostras sólidas cristalinas através de Difractometria de Raios-X. **Macapá**, v. 3, n. 1, p. 31-45, 2013.
- FOSS, N. T.; et al. Dermatoses em pacientes com diabetes mellitus. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 04, p. 677-682, 2005.
- GEE, S.; JOHNSON, B.; SMITH, A. L. Optimizing electrospinning parameters for piezoelectric PVDF nanofiber membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 563, p. 804-812, 2018.
- GOMES, D. S. **Eletrofiação de Nanofibras Poliméricas de Poliacrilonitrila e Polifluoreto de Vinilideno, Incorporadas com Negro de Fumo e Ftalocianina de Cobre, Visando Aplicações em Dispositivos Sensores**. 124f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, 2018.
- GONÇALVES, M. T. **Caracterização de filmes finos obtidos por deposição de vapor químico assistido a plasma (PECVD) e deposição e implantação iônica por imersão em plasma (PIID)**. 174f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais) – Universidade Estadual Paulista, Sorocaba - SP, 2012.
- GUO, H-F.; et al. Piezoelectric PU/PVDF electrospun scaffolds for wound healing applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 96, p. 29-36, 2012.
- HE, Z.; et al. Electrospun PVDF Nanofibers for Piezoelectric Applications: A Review of the Influence of Electrospinning Parameters on the  $\beta$  Phase and Crystallinity Enhancement. **Polymers**, v. 13, n. 02, 2021.
- HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Third-Generation Biomedical Materials, **Science**, v. 295, p. 1014-1017, 2002.

HINCHET, R.; et al. Piezoelectric properties in two-dimensional materials: Simulations and experiments. **Materials Today**, v. 21, p. 611-630, 2018.

INCE-GUNDUZ, R. A. D.; et al. Impact of nanosilicates on poly(vinylidene fluoride) crystal polymorphism: Part 1. Melt-crystallization at high supercooling. **Polymer**, v. 52, p. 1485-1493, 2010.

JIANQING, F.; et al. Promotion of osteogenesis by a piezoelectric biological ceramic, **Biomaterials**, v. 18, p. 1531-1534, 1997.

JING, X.; et al. Fabrication of Porous Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Scaffolds Containing Chitosan Nanofibers by combining Extrusion Foaming, Leaching and Freeze-Drying Methods. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 46, p. 17909-17918, 2014.

JIYONG, H.; et al. Effect of electrospinning parameters on piezoelectric properties of electrospun PVDF nanofibrous mats under cyclic compression. **The Journal of the Textile Institute**, v. 109, p. 843-850, 2017.

KANAKAMEDALA, K. Characterization of Tin-Oxide (SnO<sub>2</sub>-Ni) Based Sensors. **International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering**, v. 09, n. 06, 2019.

KAWACHI, E. Y.; et al. Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de uma Área Interdisciplinar, **Química Nova**, v. 23, n. 04, p. 518-522, 2000.

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

LAO, L.; et al. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for bone tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, p. 1873-1884, 2011.

LIMA, C. A. **Caracterização Bioquímica de Lesões Neoplásicas Via Espectroscopia de Absorção no Infravermelho por Transformada de Fourier**. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) – São Paulo – SP, 2015.

MORE, N.; KAPUSETTI, G. Piezoelectric Material – A Promising Approach for Bone and Cartilage Regeneration. **Medical Hypotheses**, v. 108, p. 10-16, 2017.

MALISKA, A. M. **Microscopia Eletrônica de Varredura e Microanálise**. Curso de Engenharia de Materiais. Apostila. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 2001.

MERLINI, C. **Desenvolvimento de Membranas Eletrofiadas de Poli (Fluoreto de Vinilideno) com Polipirrol para Aplicação em Sensores de Compressão**. 171f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2014.

MATTOS, E. C.; VIGANÓ, I. Aplicação de metodologias FTIR de transmissão e fotoacústica à caracterização de materiais altamente energéticos – parte II. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 722-728, 2002.

MOKHTARI, F.; LATIFI, M.; SHAMSHIRSAZ, M. Electrospinnig/electrospray of polyvinylidene fluoride (PVDF): piezoelectric nanofibers. **The Journal of The Textile Institute**, v. 107, p. 1037-1055, 2015.

NIKMARAM, N.; et al. Emulsion-based systems for fabrication of electrospun nanofibers: food, pharmaceutical and biomedical applications. **RSC Advances**, v. 7, p. 28951-28964, 2017.

NING, C.; et al. Fourth-generation biomedical materials, **Mater. Today**, v. 19, n. 1, p. 1-2, dez. 2015.

NUSWANTORO, N. F. Hydroxyapatite coating on titanium alloy TNTZ for increasing osseointegration and reducing inflammatory response *in vivo* on *Rattus norvegicus* Wistar rats. **Ceramics International**, v. 47, n. 11, p. 16094-16100, 2021.

OHGAKI, M.; et al. Manipulation of selective cell adhesion and growth by surface charges of electrically polarized hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 57, n. 3, 2001.

OLIVEIRA, L. S. A. F.; et al. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, p. 37-44, 2010.

PIRES, A. L. R.; et al. Biomateriais: Tipo, aplicações e mercado. **Química Nova**, v.38, n.7, p.957-971, 2015.

POLAT, K. Energy harvesting from a thin polymeric film based on PVDF-HFP and PMMA blend. **Applied Physics A**, v. 126, n. 497, 2020.

RAHMATI, M.; et al. Electrospinning for Tissue Engineering Applications. **Progress in Materials Science**, 2020.

RAJABI, A. H.; et al. Piezoelectric Materials for Tissue Regeneration: A Review. **Acta Biomaterialia**, v. 24, p. 12-23, 2015.

REN, F.; et al. *Ab initio* simulation on the crystal structure and elastic properties of carbonated apatite. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v.26, p.59-67, 2013.

RIBEIRO, C.; et al. Piezoelectric Polymers as Biomaterials for Tissue Engineering Applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 46-55, 2015a.

RIBEIRO C.; et al. Dynamic piezoelectric stimulation enhances osteogenic differentiation of human adipose stem cells. **J. Biomed. Mater. Res.: Part A**, v. 103, n. 9, p. 2172-2175, jun. 2015b.

RODRIGUES, A. C., et al. Análise química por espectroscopia de raio-x por dispersão energia (eds): adaptação aplicada à raízes de dendezeiro (*Eleais guineensis* JACQ). In: **21º Seminário de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Oriental**, Belém/PA, 2017.

SANTOS, M. F. **Sistemas baseados em amido termoplástico: pectina contendo hidroxiapatita nanoestruturada visando liberação de fósforo em meio aquoso**. 79f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, 2013.

SATAPATHY, S.; et al. Effect of annealing on phase transition in poly(vinylidene fluoride) films prepared using polar solvent. **Bulletin of Materials Science**, v. 34, n. 04, p. 727-733, 2011.

SILVA, A. J. J.; Kinetics of thermal degradation and lifetime study of poly(vinylidene fluoride) (PVDF) subjected to bioethanol fuel accelerated aging. **Heliyon**, v. 6, 2020.

SILVA, L. M.; et al. On the synthesis and characterization of (bio)ferroelectrically active PVDF-BCP composites. **Ferroelectrics**, v. 533, p. 63-71, 2018.

SILVA, L. M. **Biocompósitos Piezoelétricos a Base de Poli(Fluoreto de Vinilideno) e Fosfato de Cálcio sob Estímulos de Campo Elétrico e Campo Magnético: Uma Proposta para Acelerar a Regeneração Óssea**. 113f. Tese (Doutorado em Física) Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, 2019.

SIVARAJ, D.; et al. Tailoring Cu substituted hydroxyapatite/functionalized multiwalled carbon nanotube composite coating on 316L SS implant for enhanced corrosion resistance, antibacterial and bioactive properties, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 590, 2020.

SHARIFIANJAZI, F.; et al. Biocompatibility and mechanical properties of pigeon bone waste extracted natural nano-hydroxyapatite for bone tissue engineering, **Materials Science and Engineering: B**, v. 264, 2021.

SROKA-BARTNICKA, A.; et al. Structural transformation of synthetic hydroxyapatite under simulated in vivo conditions studied with ATR-FTIR spectroscopic imaging. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 171, p. 155-161, 2017.

SUGHANTHY, S. A. P.; ANSARI, M. N. M.; ATIQA, A. Dynamic mechanical analysis of polyethylene terephthalate/hydroxyapatite biocomposite for tissue engineering applications. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 9, p. 2350-2356, 2020.

SWAIN, S; PADHY, R. N.; RAUTRAY, T. R. Polarized piezoelectric bioceramic composite exhibit antibacterial activity. **Materials Chemistry and Physics**, v. 239, 2020.

TANDON, B; et al. Piezoelectric materials as stimulatory biomedical materials and scaffolds for bone repair. **Acta Biomaterialia**, v. 73, p. 1-20, 2018.

TANDON, B.; et al. Fabrication and Characterization of Stimuli Responsive Piezoelectric PVDF and Hydroxyapatite-Filled PVDF Fibrous Membranes. **Molecules**, v. 24, 2019.

UNNITHAN, A. R.; ARATHYRAM, R. S.; KIM, C. S. Electrospinning of Polymers for Tissue Engineering. In: THOMAS, Sabu; NINAN, Neethu; GROHENS, Yves. **Nanotechnology Applications for Tissue Engineering**. Elsevier Inc., 2015. p. 45-55.

UYSAL, I.; SEVERCAN, F.; EVIS, Z. Characterization by Fourier transform infrared spectroscopy of hydroxyapatite co-doped with zinc and fluoride, **Ceramics International**, v. 39, p. 7727-7733, 2013.

WANG, Y. et al. Low-intensity pulsed ultrasound promotes alveolar bone regeneration in a periodontal injury model. **Ultrasonics**, v. 90, p. 166-172, 2018.

WEBER, N. et al. Characterization and in vitro cytocompatibility of piezoelectric electrospun scaffolds. **Acta Biomaterialia**, v. 06, p. 3550-3556, 2010.

WU, S.; LIU, X.; GAO, C. Role of adsorbed proteins on hydroxyapatite-coated titanium in osteoblast adhesion and osteogenic differentiation. **Science Bulletin**, v. 60, n. 07, p.691-700, 2015.