



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**TABATA PRADO SATO**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE  
NANOFIBRAS ELETROFIADAS VIA SOLUÇÃO DE  
QUITOSANA COM E SEM INCLUSÃO DE  
HIDROXIAPATITA**

2015

**TABATA PRADO SATO**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOFIBRAS  
ELETROFIADAS VIA SOLUÇÃO DE QUITOSANA COM E  
SEM INCLUSÃO DE HIDROXIAPATITA**

Dissertação apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade em Prótese dentária

Orientador: Prof. Adj. Alexandre Luiz Souto Borges

Coorientador: Prof. Dr. Anderson de Oliveira Lobo

São José dos Campos

2015

## **BANCAEXAMINADORA**

**Prof. Adj. Alexandre Luiz Souto Borges** (Orientador)

Instituto de Ciência e Tecnologia

UNESP – Univ Estadual Paulista

Campus de São José dos Campos

**Prof. Dr. Alberto Noriyuki Kojima**

Instituto de Ciência e Tecnologia

UNESP – Univ Estadual Paulista

Campus de São José dos Campos

**Prof. Dr. João Paulo Barros Machado**

Laboratório Associado de Sensores e Materiais

Centro de Tecnologias Especiais

INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais

São José dos Campos, 11 de dezembro de 2015.

## **AGRADECIMENTOS**

À primeira origem de força vital, agradeço a **Deus** a oportunidade da vida, a chance de vivê-la em seus aspectos mais diversos, desfrutando da felicidade e aprendendo com os momentos mais ásperos.

Aos meus pais **Marli e Ricardo**, minha profunda e eterna gratidão pela formação pessoal, pela estrutura e pelo amor.

Ao meu irmão **Christopher**, meu amor fraterno, sem limites, pela irmandade e parceria que me fizeram uma pessoa rica.

Aos meus **avós**, minha admiração, respeito e amor, e do **Vô Paulino**, também a saudade, de onde quer que esteja, que possa me dar a honra de assistir o crescimento da menina para quem ele fazia balanços de madeira.

À **UNESP – Univ Estadual Paulista, Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos**, meu respeito a essa casa que me formou Cirurgiã-dentista, que me proporcionou experiências altamente construtivas e que despertou minha paixão de lecionar.

Ao **Prevest Unesp**, um enorme conjunto de sentimentos bons, de sucesso e satisfação, pois me proporcionou um crescimento pessoal inigualável, inicialmente com o ingresso no Ensino Superior e posteriormente, enraizou-se

em meu cotidiano pela oportunidade de lecionar.

A **todos meus alunos**, desses sete anos de Prevest, o meu “Muito Obrigada” pela oportunidade de ensinar e de aprender na bela sinfonia, da mais bela profissão, a do professor.

Aos **amigos e colegas da UNESP**, meu sincero carinho, pela companhia na trajetória que me trouxe até aqui.

À **UNIVAP**, especificamente ao **Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**, meu agradecimento pela estrutura fornecida para composição de importante parte de meu trabalho.

Aos colegas **Fernanda Santos, Geisa Salles** e Dr. **Bruno Manzolli** discentes da UNIVAP, meu agradecimento pelo auxílio constante e pela atenção frequente.

Ao Dr. **João Paulo Barros Machado**, do INPE - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, Laboratório Associado de Sensores e Materiais, LAS, obrigada pela disponibilidade, pelo carinho e atenção.

Ao **Prof. Dr. Anderson de Oliveira Lobo**, meu coorientador, agradeço a disponibilidade de trabalho conjunto e de importantíssimo aprendizado

Ao **Prof. Adj. Alexandre Borges**, meu orientador, agradeço a oportunidade única de trabalho, à atenção desprendida, às conversas diversas, às risadas e aos ensinamentos. Além da contagiante motivação diária, que muitas vezes foi decisiva para minha própria motivação.

Ao **Prof. Dr. Nelson Macedo**, agradeço à amizade única e à inspiração inicial deste trabalho. Agradeço também aos conselhos sempre baseados em muita experiência e

sabedoria.

À amiga, mais irmã que se pode ter, **Patricia Helena**, minha dívida eterna perante sua cumplicidade, dedicação e amor. Quisera eu, que todos pudessem ter a honra de amizades como essa.

Já, ao melhor amigo, mais cúmplice e companheiro, **Hamilton**, obrigada pelas vezes que não foi leve, que foi firme perante meus erros e falhas, pelas vezes que me socorreu, pela presença constante, por falar, ouvir e sempre agir em minha defesa. Obrigada pelas longas conversas sobre o mundo e suas direções, que me tornaram alguém muito melhor e mais sã. Obrigada por ser você e por estar sempre aqui.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	09
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
<b>2.1 Desenvolvimento de biomateriais e nanotecnologia</b> .....	16
<b>2.2 Eletrofiação</b> .....	17
<b>2.3 Quitosana</b> .....	22
<b>2.4 Hidroxiapatita</b> .....	27
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	29
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
<b>4.1 Produção das soluções poliméricas</b> .....	30
4.1.1 Solução pura de quitosana (Ch) .....	30
4.1.2 Análise da densidade e tensão superficial da solução .....	31
4.1.3 Obtenção de cristais de nanohidroxiapatita (nHAp) .....	31
4.1.4 Solução de quitosana com adição de nHAp (ChHa) .....	32
<b>4.2 Eletrofiação</b> .....	33
4.2.1 Eletrofiação de Ch.....	33
4.2.2 Eletrofiação de ChHa .....	34
<b>4.3 Caracterização das mantas de nanofibras</b> .....	35
4.3.1 Caracterização morfológica e topográfica.....	36
4.3.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura .....	36

4.3.1.2	Análise do diâmetro médio de fibras .....	37
4.3.1.3	Análise perfilométrica .....	39
4.3.1.4	Microscopia de Força Atômica.....	40
4.3.2	Caracterização físico-química .....	41
4.3.2.1	Espectroscopias: EDS e FTIR .....	41
4.3.2.2	Análise de difratometria de Raios-X .....	43
4.3.2.3	Análise da molhabilidade utilizando a técnica de ângulo de contato .....	44
4.3.2.4	Análise da taxa de degradação .....	45
4.3.2.5	Análises térmicas.....	46
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	48
<b>5.1</b>	<b>Caracterização morfológica e topográfica</b> .....	48
5.1.1	Microscopia Eletrônica de Varredura .....	48
5.1.2	Análise diâmetro médio de fibras .....	51
5.1.3	Análise perfilométrica .....	55
5.1.4	Microscopia de Força Atômica .....	57
<b>5.2</b>	<b>Caracterização físico-química</b> .....	58
5.2.1	Espectroscopias: EDS e FTIR .....	58
5.2.2	Análise por difratometria de Raios-X .....	62
5.2.3	Análise da molhabilidade utilizando a técnica de ângulo de contato .....	63
5.2.4	Análise da taxa de degradação .....	64
5.2.5	Análises térmicas .....	64
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	67
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	74
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	75

Sato TP. Obtenção e caracterização de nanofibras eletrofiadas via solução de quitosana com e sem inclusão de hidroxiapatita [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2015.

## RESUMO

A eletrofiação é um método para a síntese de fibras poliméricas. Neste sentido, a quitosana é um polímero que por meio deste processo origina biomateriais com boas propriedades biológicas. Já a hidroxiapatita é a principal de reserva de cálcio dos vertebrados. Assim, o presente estudo fabricou mantas de nanofibras a partir de solução de quitosana pura 7% (m/v)(Ch) e de solução de quitosana com adição de cristais de nanohidroxiapatita 0,5% (m/v)(ChHa), na tentativa de unir, sob diferentes parâmetros de eletrofiação (distância, tensão elétrica e fluxo da solução), as propriedades do biopolímero e do complexo de fosfato de cálcio. Ambas soluções foram eletrofiadas e, as mantas obtidas, caracterizadas de acordo com a morfologia (diâmetro médio das fibras), topografia superficial (perfilometria e AFM) e características físicas, químicas, estruturais e térmicas (EDS, FTIR, DRX, ângulo de contato, taxa de degradação, termogravimetria). As amostras Ch, quanto à análise morfológica, apresentaram maior diâmetro de fibras ( $690,3 \pm 102,5 \text{ nm}$ ) em relação às ChHa ( $358,7 \pm 49,2 \text{ nm}$ ) e quanto à topografia, Ch mostrou maior homogeneidade, lisura superficial do que ChHa. O EDS foi capaz de identificar presença de Cálcio nas amostras de ChHa. A partir do FTIR, verificou-se bandas características de formação de sal de TFA, respaldando a instabilidade de todas as amostras em meio aquoso, sofrendo imediata dissolução sob os testes de molhabilidade e taxa de degradação. As análises térmicas mostraram que, tanto em Ch como em ChHa, três principais estágios de degradação, sendo a primeira, representação de uma grande perda de água.

Palavras-chave: Eletroquímica. Quitosana. Hidroxiapatita.

*Sato TP. Obtaining and characterization of electrospun nanofibers with and without hydroxyapatite inclusion. [dissertation]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2015.*

## **ABSTRACT**

*The electrospinning is a method used to synthesize polymeric fibers. Chitosan polymer was the one used by this process that originates a biomaterial with good biological properties. The hydroxyapatite is an important calcium reserve of vertebrates. The synthesis process to create nanofibers were made using pure chitosan solution 7% (w/v) (Ch) and chitosan solution added with nanohydroxyapatite (0,5%, w/v) (ChHa), as an attempt to unite, under different electrospinning parameters (distance, electric tension and flow rate), the properties of the biopolymer and calcium phosphate complex. Both solutions were electrospun and the specimens obtained were characterized according to the superficial morphology (mean diameter) topography (profilometry and atomic force microscopy) and physico-chemical characteristics (EDS, FTIR, DRX, contact angle and thermogravimetry). The Ch samples showed from the morphology analysis, a higher mean diameter ( $690,3 \pm 102,5 \text{ nm}$ ) in comparison to ChHa ( $358,7 \pm 49,2 \text{ nm}$ ) and the topography analysis indicated a greater homogeneity and surface smoothness. The EDS was able to identify the presence of calcium in samples of ChHa. From the FTIR, it was verified characteristic peaks of TFA salt formation, which explains the instability of all samples in aqueous solution, with immediate dissolution under the contact angle and degradation rates tests. The thermal analysis presented three main stages of degradation in Ch and ChHa nanofibers with a higher water loss.*

*Keywords: Electrochemistry. Chitosan. Hydroxyapatite*

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de materiais, em escala nanométrica associado à composições poliméricas, apresenta várias características interessantes que respaldam as novas pesquisas na área de biomateriais.

Estes materiais compostos por nanofibras apresentam, por exemplo, a vantagem do aumento da superfície de contato em relação ao volume total do material e maior flexibilidade, quando comparadas a outros tipos de material, compondo uma gama de aplicações em diversas áreas (Huang et al., 2003; Mehrasa et al., 2015; Wu et al., 2015).

As nanofibras podem ser produzidas por meio de diferentes técnicas, como a separação de fases (Ma, Zhang, 1999), a extrusão (Joachim, 1998; Xing et al., 2008), síntese template (Feng et al., 2002; Martin, 1996). Dentre eles, a eletrofiação aparece como uma técnica simples, confiável e relativamente barata, oferecendo síntese de nanofibras de morfologia controlável a partir de uma variedade de polímeros (Frenot, Chronakis, 2003; Lin et al., 2012; Reneker, Chun, 1996).

Este processo consiste basicamente em uma alta tensão aplicada à um sistema constituído por uma solução polimérica e um

anteparo coletor metálico, gerando um campo elétrico. Esta solução é bombeada através de uma bomba de infusão ou mesmo pela força gravitacional e caminha por um capilar e o campo elétrico supera a tensão superficial da solução, ejetando fibras poliméricas em direção ao coletor metálico (Ahmed et al., 2015; Lyons et al., 2004).

O filme de fibras eletrofiadas possui alta aplicabilidade na interação com fármacos e reparação tecidual (Bhattarai et al., 2005; Greiner, Wendorff, 2007; Murugan, Ramakrishna, 2006) podendo-se controlar, por exemplo, a sua morfologia, tornando-a similar a de tecidos vivos, sendo efetiva como arcabouço para células. Da mesma forma, o controle de sua porosidade e maleabilidade, constitui possibilidades de se variar tamanhos, formas e texturas (Burger et al., 2006).

Para tanto, utilizou-se, neste trabalho, uma substância com expressivas qualidades e alta aplicabilidade biomédica, para base de estudos de síntese de nanofibras, a quitosana.

Esta substância é obtida a partir da desacetilação da quitina, que é o segundo biopolímero mais abundante na natureza, encontrado em exoesqueletos de crustáceos, insetos, moluscos e parede celular de fungos, e é amplamente desperdiçado pela indústria, devido à sua relativa dificuldade de manuseio e limitada solubilidade (Gopalan Nair, Dufresne, 2003; Ifuku, 2014).

Já a quitosana, caracteriza-se a partir de 60% de desacetilação da quitina, onde este grau de desacetilação apresenta

influências mecânicas (Chatelet et al., 2001), biológicas (Freier et al., 2005) e físico-químicas (Taşkın et al., 2014), como a relação diretamente proporcional com a biocompatibilidade (Foster et al., 2015).

Os produtos da degradação enzimática da quitosana são oligômeros de N-acetil-D-glicosamina, os quais, além de apresentarem propriedades cicatrizante e antimicrobiana, são totalmente absorvíveis pelo organismo (Fan et al., 2008).

Estudos recentes com este biopolímero demonstram que suas características podem ser aproveitadas de maneira multifuncional desde a efetiva a promoção de estabilidade em insulina oral (Chen et al., 2015), ou até mesmo nanocomplexos microbicidas para proteção de infecções com o vírus HIV (Boyapalle et al., 2015).

Na biomedicina, por exemplo, este material é reportado na Regeneração Óssea Guiada (Li et al., 2015; Ma et al., 2014; Shin et al., 2005), terapia desenvolvida para reparar defeitos ósseos mandibulares e alveolares (Bottino et al., 2012; Hammerle, Jung, 2003; Simion et al., 1996), como aglutinante de células (Malette et al., 1983), ou ainda, na regeneração de tecidos nervosos (McCormick et al., 2015; Wang et al., 2010).

Bavariya e colaboradores (2014) mostraram que a quitosana sob a forma de membranas de nanofibras sintetizadas por meio da eletrofiação, não desenvolvem inflamações significativas,

refletindo suas baixas características inflamatórias (Bavariya et al., 2014).

Dessa maneira, a demanda pela otimização da produção destas mantas de nanofibras de quitosana cresce a cada dia e os outros processos de síntese, quando comparados à eletrofiação, podem não ser tão vantajosos por apresentarem maior complexidade, desprendendo mais etapas e tempo de preparo, como filtração, repouso em placas de vidro, limpeza sob água, estiramento e secagem(Lima, 2006).

Também nesse contexto, muitos estudos avaliam a eletrofiação da quitosana associada a outras substâncias, como nanopartículas de prata (Hadipour-Goudarzi et al., 2014; Liu et al., 2015), colágeno (Chen et al., 2007; Chen et al., 2010) e extratos naturais (Charernsriwilaiwat et al., 2013).

Nesse sentido, a hidroxiapatita (HAp), importante componente da fase mineral dos ossos, aparece como uma interessante substância a ser incorporada em mantas de nanofibras de quitosana.

Alguns estudos relatam que as membranas de quitosana e nanohidroxiapatita (nHAp) mostram melhor atividade de regeneração óssea, pois as partículas nHAp fornecem núcleos ao processo de mineralização (Kong et al., 2006).

Assim como a quitosana, a nHAp possui alta aplicabilidade e é utilizada desde dentifrícios anti-erosivos (Aykut-Yetkiner et al., 2014) até engenharia de tecidos (Nga et al., 2014;

Zhou, Lee, 2011).

Por este motivo, o presente estudo propôs caracterizar mantas de nanofibras eletrofiadas de quitosana com e sem inclusão de nHAp, avaliando as possíveis influências morfológicas e físico-químicas.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

Um biomaterial se diferencia de qualquer outro material pela sua capacidade de estar em contato com os tecidos do corpo humano sem causar danos (Galler et al., 2010; Hwang et al., 2015). Essa co-existência é utilizada na medicina há anos e, ainda hoje, desperta grande interesse para cientistas das áreas de biomedicina (Galler et al., 2010; Velasco et al., 2015; Williams, 2008).

### **2.1 Desenvolvimento de biomateriais e nanotecnologia**

Atualmente, ganha espaço na pesquisa e desenvolvimento de biomateriais, aqueles de maior complexidade estrutural, como os materiais originados de processos nanotecnológicos, sob as novas perspectivas do ramo da nanociência (Williams, 2009).

Nesse sentido, a Engenharia de Tecidos, através das técnicas de nanofabricação e de texturização nanométrica, têm sintetizado microambientes propícios para o desenvolvimento celular,

através de substratos para sua adesão e proliferação (Kingsley et al., 2013). Além disso, nanofibras e nanopartículas de liberação controlada de fármacos são desenvolvidas, mimetizando tecidos e interagindo com fluidos extracelulares e células especializadas (Chung et al., 2007).

Dessa forma, a nanotecnologia biomédica traz, a cada dia, materiais utilizados em situações cada vez mais complexas, sob aplicações diversas como na engenharia de tecidos e em sistemas de transporte de fármacos (Williams, 2008).

## 2.2 Eletrofição

Inúmeras técnicas de síntese, tais como *drawing* (Joachim, 1998; Xing et al., 2008), síntese *template* (Feng et al., 2002; Martin, 1996), separação de fase (Ma, Zhang, 1999), automontagem (*self-assembly*) (Hiraoka, 2015; Sun et al., 2015) e eletrofição são utilizadas para preparar nanofibras poliméricas.

A técnica *drawing* se caracteriza como uma extrusão por meio de uma secagem giratória que se limita à síntese de materiais altamente viscoelásticos, por causa da necessidade de coesão do material para que o mesmo possa suportar as pressões desenvolvidas durante processo de estiramento (Angamma, 2011; Joachim, 1998; Xing et al., 2008).

O *template*, por sua vez, utiliza uma membrana nanoporosa como um molde de fibras, e apresenta vantagem sobre o

*drawing* pelo seu poder de síntese de matérias-primas diversas. Em contrapartida, apresenta a desvantagem de não sintetizar nanofibras contínuas (Feng et al., 2002; Martin, 1996).

Por este mesmo método, através da deposição química de vapores (*Chemical Vapor Deposition* - CVD) também se é capaz de sintetizar nanotubos funcionalizados e nanofibras de carbono (Baranauskas et al., 2001; Che et al., 1998).

Já a separação de fase consiste numa dissolução que gera uma espuma porosa em nanoescala, por consistir num processo de várias etapas, desprende um tempo longo de trabalho (Ma, Zhang, 1999).

A automontagem (*self-assembly*), por sua vez, aparece como uma construção molécula por molécula, de baixo para cima, de estruturas bem definidas, desprendendo, assim como métodos anteriores, muito tempo para seu desenvolvimento (Juarez et al., 2008; Saga et al., 2002).

Enquanto isso, a eletrofiação surge como um processo efetivo para a produção, em larga escala, de nanofibras a partir de diversas soluções poliméricas, sob baixo tempo de trabalho e baixa complexidade de confecção (Greiner, Wendorff, 2007; Huang et al., 2003), obtendo-se fibras a partir da aplicação de uma tensão elétrica a uma solução polimérica.

Já no início de 1990, vários grupos de pesquisa utilizavam a eletrofiação para sintetizar nanofibras (Tucker et al., 2012).

Este processo baseia-se na criação de um campo eletromagnético, sob uma dada tensão crítica, fazendo com que a tensão superficial da solução, contida numa seringa, seja ultrapassada e um cone seja formado na ponta de um capilar metálico, a partir do qual nanofibras são expelidas em direção a um coletor, como pode ser observado na figura 1.

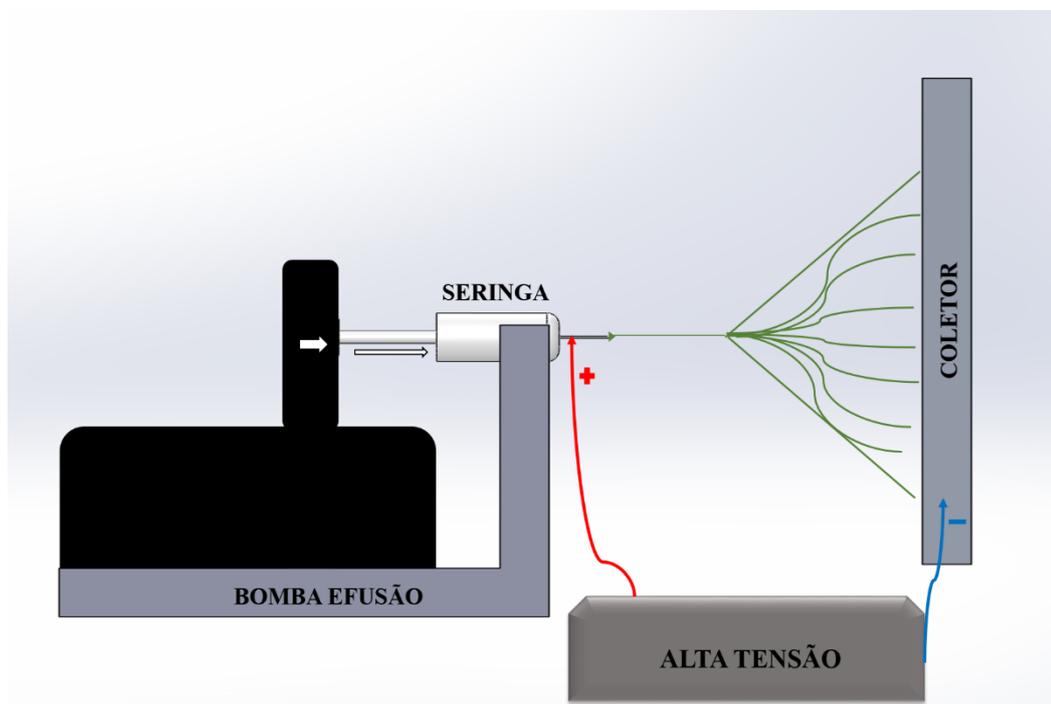


Figura 1 – Modelo ilustrativo do processo de eletrofição confeccionado para o presente trabalho

Estudos precursores da eletrofição foram descritos desde 1600, quando o primeiro registro de atração eletrostática de um líquido foi observado por William Gilbert. Já dentre os anos 30 e 40, Anton Formhals foi responsável por 22 patentes ligadas ao processo.

Entre 1964 e 1969, Sir Geoffrey Ingram Taylor produziu o início de uma base teórica, por meio de um modelo matemático, da conformação do cone formado pela gotícula do fluido no capilar metálico da seringa, utilizado neste processo, sob o efeito de um campo elétrico (Melcher, Taylor, 1969).

Dessa forma, o chamado Cone de Taylor perfaz a distorção do menisco de um líquido a partir de um capilar na presença de um campo elétrico, e uma vez que a viscosidade da solução é superada, o vértice do cone forma um jato contínuo de fluido, no sentido de uma zona de potencial inferior (Greiner, Wendorff, 2007), observado na figura 2. Esta região de potencial inferior representa, no processo, um anteparo coletor de fibras.

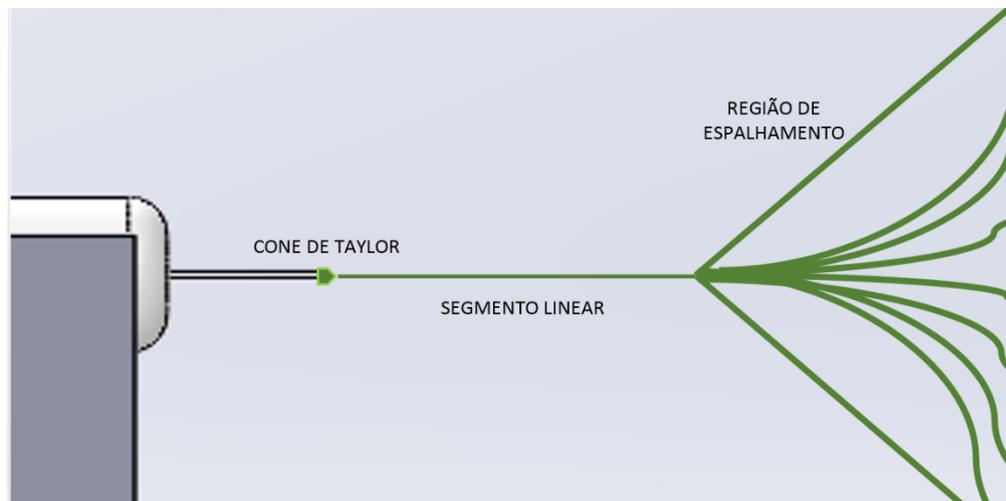


Figura 2 – Modelo ilustrativo da formação de nanofibras confeccionado para o presente trabalho

E com relação ao comportamento do polímero sob a eletrofição, entende-se que o processo está submetido a três principais grupos de fatores de interferência, como pode ser visto na figura 3: as propriedades da solução, tensão superficial e viscosidade; os parâmetros do processo, distância entre secção do capilar metálico e coletor, tensão elétrica e razão de fluxo e os parâmetros ambientais, temperatura e umidade relativa do ar.

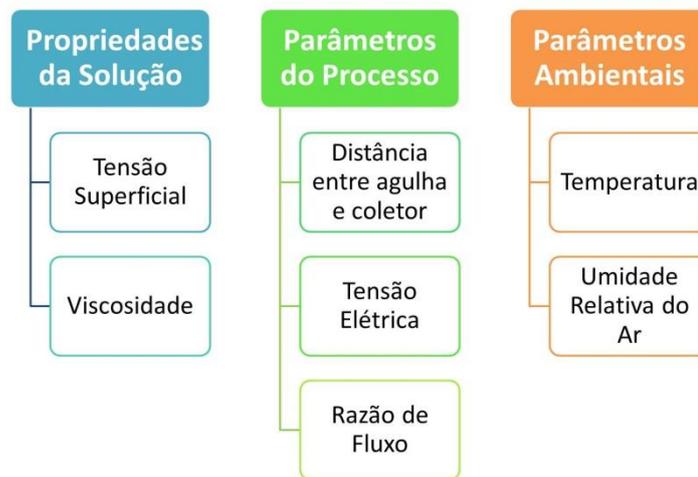


Figura 3 – Fatores de interferência ao processo de eletrofição

A exemplo disso, sabendo-se que o grau de extensão das moléculas poliméricas depende de fatores como a temperatura, e que uma fibra polimérica de 50nm de diâmetro tem cerca de 10000 moléculas poliméricas atravessando toda sua secção, onde 3% dessas localizam-se em sua superfície (Reneker, Chun, 1996), entende-se a influência que os fatores de interferência podem ter na conformação estrutural das nanofibras.

## 2.3 Quitosana

A quitosana é um biopolímero natural, resultado da desacetilação da quitina, um polissacarídeo (Figura 4) sintetizado em larga escala por organismos vivos, sendo o polímero mais abundante na natureza, depois da celulose, e é encontrada em componentes estruturais do exoesqueleto de artrópodes ou nas paredes celulares de fungos.

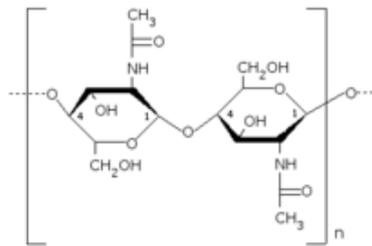


Figura 4 – Estrutura química de uma molécula de Quitina.

Nesse mesmo contexto, a quitosana apresenta-se também como um polissacarídeo cristalino (Figura 5) (Madihally, Matthew, 1999; Rogovina et al., 2001), com alta aplicabilidade em diversas áreas e é obtida através da desacetilação de sua precursora.

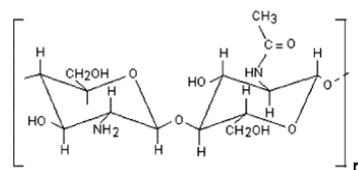


Figura 5 – Estrutura química de uma molécula de Quitosana

Com propriedades únicas de biodegradação, biocompatibilidade, potencial antimicrobiano e de cicatrização, esse polímero é amplamente utilizado na produção de biomateriais (Kim et al., 2005; Rogovina et al., 2001; Shahzad et al., 2015), respaldando assim, aplicações médicas e farmacêuticas sob uma segura interação com organismo humano (Kumar et al., 2004).

Quanto a sua atividade antimicrobiana, dois mecanismos principais têm sido relatados na literatura para explicá-la. No primeiro, a quitosana carregada positivamente interagiria com grupos carregados negativamente na superfície das células, alterando a sua permeabilidade. O segundo mecanismo envolve a ligação da quitosana com o DNA celular (através de grupos amina protonados), o que conduziria à inibição da síntese de RNA microbiano (Chung, Chen, 2008; Sudarshan et al., 1992).

Outra característica importante é a sua capacidade de ser moldada, tais como em estruturas porosas, adequadas para o crescimento celular, atribuindo à quitosana o poder de aplicações biomédicas (Sionkowska, 2011).

O processo de obtenção dessa substância se inicia pela extração de proteínas de crustáceos (carapaças de caranguejo, cascas de camarão) ou membranas celulares de fungos. Em seguida, são removidos componentes de cálcio, originando a quitina, que é então desacetilada, resultando numa poli-glucosamina, com um grupo amina ativo (Malette et al., 1983).

Já para ser considerada quitosana, a quitina desacetilada deve conter pelo menos 60% de resíduos de glucosamina

- correspondendo a um grau de desacetilação de 60% (Acosta et al., 1993; Croisier, Jérôme, 2013; Madihally, Matthew, 1999).

A influência desse grau de desacetilação fica evidente em estudos que observaram sua relação diretamente proporcional com a fragilidade de seus filmes (Chatelet et al., 2001) e sua biocompatibilidade (Foster et al., 2015), além de sua relação inversamente proporcional à sua resistência mecânica (Wenling et al., 2005).

Quanto ao próprio processo de desacetilação, entende-se que a reação gera um polímero com distribuição dos grupos acetil determinada pela fonte da quitina e pelas condições do próprio processo, conduzido por hidrólise química, sob ambientes alcalinos ou por hidrólise enzimática (Brugnerotto et al., 2001; Madihally, Matthew, 1999).

Já sob o contexto de hidrólise, o estudo de Homayoni e colaboradores (2009), que expôs a quitosana a uma mistura de NaOH por até 48h, concluiu que a redução do peso molecular e a viscosidade em função do tempo apresentaram-se de forma linear, tendência que pode ser explicada pelo papel do NaOH numa maior desacetilação e despolimerização, conduzindo a um aumento da carga positiva das cadeias do polímero.

A quitosana é normalmente insolúvel em soluções aquosas com pH acima de 7, mas, em ácidos diluídos ( $\text{pH} < 6$ ), os grupos amina livres são protonados e a molécula se torna solúvel (Madihally, Matthew, 1999).

Essa solubilidade também depende de outros fatores como grau de desacetilação, por causa da maior quantidade dos grupos amina, gerando maior repulsão eletrostática entre as cadeias e conseqüentemente maior solvatação de água, distribuição dos grupos acetil ao longo da cadeia polimérica e grau de polimerização (Brugnerotto et al., 2001; Fan et al., 2009).

Também é sob soluções ácidas, que a quitosana se caracteriza como um polícatión, por causa da protonação de seus grupos amina, formando complexos iônicos (Madihally, Matthew, 1999), interagindo com uma ampla variedade de espécies aniônicas, tais como lípidos e proteínas (Kim et al., 2007; Madihally, Matthew, 1999; Pavinatto et al., 2010; Takahashi et al., 1990).

Já sob o contexto da eletrofiação de quitosana, são relatados na literatura alguns exemplos de nanofibras de quitosana pura, sintetizadas a partir de soluções de ácido trifluoroacético (TFA) e diclorometano (DCM) (Ohkawa et al., 2004; Sangsanoh, Supaphol, 2006).

Foi sugerido (Ohkawa et al., 2004) que os grupos amina da quitosana formam sais com o TFA (Hasegawa et al., 1992), que destroem as interações entre as suas moléculas e facilitam o processo de eletrofiação. Além disso, empregando-se um solvente orgânico volátil ao sistema, como o DCM (Ohkawa et al., 2004), constata-se maior homogeneidade nas fibras, do que sob o uso único do TFA (Croisier, Jérôme, 2013).

Entende-se que uma maior uniformidade estrutural pode ser inserida quando utiliza-se dois solventes, um polar e um

apolar (Bhattacharai et al., 2005). Abordagens semelhantes foram relatadas ao se utilizar co-solventes polares ou não polares para melhorar a capacidade de eletrofição de soluções poliméricas (Bhattacharai et al., 2004; Jayaraman et al., 2004; Jiang et al., 2004).

Entende-se que o TFA puro contribui para evaporação incompleta do solvente durante o trajeto do capilar ao anteparo coletor, formando discontinuidades nas fibras, os chamados “*beads*” (Fong et al., 1999), e o DCM, mais volátil aumenta a volatilidade geral da solução, otimizando a eletrofição, diminuindo essas falhas (Andrade, 2012; Moore, Roberts, 1980).

Considerando-se que a viscosidade dessa solução é característica das interações intermoleculares entre as cadeias do polímero, a elevada viscosidade da solução de quitosana é devido à forte ligação hidrogênio entre grupos  $\text{NH}_2$  e  $\text{OH}$  dessas cadeias (Bhattacharai et al., 2005).

E desse modo, também entende-se que as concentrações do polímero podem influenciar o processo, sendo que sob concentrações baixas, as soluções não contem material suficiente para produzir fibras sólidas estáveis e com concentrações muito altas, o número de associações entre cadeias de moléculas de quitosana na solução formam uma estrutura altamente viscosa, tornando a solução não eletrofiável (Bhattacharai et al., 2005).

Também durante esse processo de eletrofição, admiti-se que a natureza carregada da quitosana faz com que as nanofibras sejam atraídas para o anteparo coletor primordialmente na região central (Li, Hsieh, 2006).

## 2.4 Hidroxiapatita

A fase mineral do osso pode ser caracterizada, principalmente, por um fosfato de cálcio, a hidroxiapatita (HAp), apresentada sob a forma de nanocristais que variam de 25 a 50nm (Velasco et al., 2015; Weiner, Wagner, 1998).

Os cristais de nanohidroxiapatita (nHAp) -  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  - apresenta semelhança química e cristalográfica com tecido ósseo natural, respaldando o crescente interesse nas pesquisas de nHAp sintética para aplicações biomédicas, como um biomaterial direcionado à regeneração de tecido ósseo (Habraken et al., 2007; Hutmacher et al., 2007; Sanosh et al., 2009).

Os controles do tamanho de poro e da densidade são importantes, uma vez que matrizes porosas permitem crescimento ósseo, o que leva à maior resistência do conjunto implante e osso. A nHAp sintética

A nHAp sintética é biocompatível, não produzindo toxicidade local ou sistêmica (Piecuch et al., 1984), não apresenta características carcinogênica ou alergênica e promove crescimento fibro-vascular e ósseo em seus locais de implante (Arakaki et al., 1995; Cook et al., 1988; Frame et al., 1987; Jarcho, 1992; Najjar et al., 1991; Piecuch et al., 1984).

Muitas nHAp sintéticas são utilizadas em animais e no homem para preencher defeitos ósseos, oriundos de processos traumáticos (Wijs et al., 1993a; Wijs et al., 1993b; Yamaguchi et al.,

1995).

No contexto de síntese de nHAp, a literatura relata diversos métodos, como as técnicas de plasma (Paschalis et al., 1995), de condições hidrotérmicas (Yamasaki et al., 1990), de cristalização de sol-gel (Tanahashi et al., 1992), mecano-químicas (Toriyama et al., 1996) e sono-químicas (Kim, Saito, 2001).

Utilizou-se no presente estudo, o método químico de precipitação aquosa, envolvendo solubilização dos sais reagentes em água, sob o ultrassom, otimizando as reações de precipitação em meio líquido (Barbosa et al., 2013; Capote, de Castro, 2007).

### 3 PROPOSIÇÃO

Objetivou-se, com o presente estudo, a síntese e, posteriormente, a análise da influência da inclusão de nHAp nas nanofibras de quitosana sob os aspectos morfológico/topográfico e físico-químico, dentre específicas combinações de parâmetros de eletrofiação.

Sob este contexto as hipóteses de pesquisa desse trabalho são:

- a) a adição de nHAp influencia os aspectos morfológicos (diâmetro médio) e topográficos (perfilometria e AFM) das mantas de nanofibras de quitosana;
- b) a adição de nHAp influencia o aspecto físico-químico (espectroscopias, DRX, ângulo de contato, taxa de degradação, termogravimetria) das mantas de nanofibras de quitosana.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Produção das soluções poliméricas**

#### **4.1.1 Solução de quitosana Pura (Ch)**

Solução de quitosana a 7% (m/v) foi preparada dissolvendo-se 0,7g de quitosana de peso molecular médio (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) (Lote#SLBH2747V), respectivamente, em 7ml de Ácido Trifluoracético (TFA) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA/ Lote#SHBF6609V) e 3mL de Diclorometano (DCM) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA/ Lot#STBF0286V).

Inicialmente dissolveu-se a quitosana gradativamente ao TFA, posicionando o conjunto num agitador (IKA RH Basic, Staufen, Alemanha) sob a temperatura de 30° C e velocidade de 300rpm. Posteriormente adicionou-se o DCM gradativamente. O conjunto foi mantido sob agitação constante por 12h.

#### 4.1.2 Análise da densidade e tensão superficial da solução

Para esta análises utilizou-se o tensiômetro digital Easydyne (K20, Kruss, Hamburg, Alemanha), que analisou, respectivamente, a densidade e a tensão superficial de 20 mL de solução Ch.

O método do anel foi utilizado para a medição da tensão superficial, onde um anel esférico é suspenso num dinamômetro, paralelo à superfície da solução presente num copo do tipo “*becker*” apoiado numa base de altura ajustável. Após a imersão completa do aparato (aproximadamente 1mm) este é suspenso, mensurando-se a força ( $\Delta F$ ) exercida sobre o anel no momento em que uma lâmina de solução, delimitada pelo perímetro do anel, se rompe.

A análise de 20mL de solução apresentou uma densidade de 3,782 g/mL e tensão superficial de  $13,9 \pm 0,07$  mN/m.

#### 4.1.3 Obtenção de nanopartículas de Hidroxiapatita (nHAp)

A obtenção de cristais de nHAp, no presente estudo, utilizou o método de precipitação aquosa (Barbosa et al., 2013) e foi realizada no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Univap de São José dos Campos.

Neste processo, preparou-se 100mLde  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,167M, e 100mLde  $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ , 0,1M, acrescentando-se  $\text{NH}_4\text{OH}$  às duas soluções para manutenção do pH 10. Pelas proporções iniciais do rendimento teórico, razão Cálcio/Fósforo igual a 1,67.

A partir disso, o precipitado foi submetido à irradiação ultrassônica por 30min (Ultrasonic Processor 500 W;20 kHz; 13 mm probe; model: SO-VCX-500, SONICS), dando manutenção a cada 10min o pH 10. As suspensões resultantes foram envelhecidas por 120h. Posteriormente foram filtradas, lavadas com água e secas a  $60^\circ\text{C}$  durante 4 h.

#### 4.1.4 Solução de quitosana com adição de nHAp (ChHa)

Para a confecção da solução de quitosana com nHAp, dissolveu-se 0,7g de quitosana em 7mL de TFA, sob constante agitação e temperatura de  $30^\circ\text{C}$ .

Preparou-se 04 diferentes soluções, dispersando-se, separadamente, 0,05g; 0,1g; 0,15 e 0,2g de nHAp em 3mL de DCM, juntando-se, posteriormente, à solução de 0,7g de quitosana em

7mL de TFA e foi verificado que a concentração de 0,5% (m/v) de nHAp foi a única que produziu fibras.

## 4.2 Eletrofiação

### 4.2.1 Eletrofiação de Ch

Após 12h sob agitação, a solução Ch foi colocada numa seringa de plástico de 5mL (BD, Juiz de Fora, MG, Brasil) com uma agulha metálica sem bisel de 0,7 mm (INJEX, São Paulo, SP, Brasil) e submetida ao processo de eletrofiação, sob diferentes combinações de três diferentes parâmetros: distância (10-20cm), tensão (10-25kV) e fluxo (0,1-1mL/h) como pode ser visto no Quadro 1.

Quadro 1 – Parâmetros utilizados para tentativa eletrofiação de Ch

Distância	10cm	12cm	15cm	18cm	20cm
Tensão	10kV	12kV	15kV	17kV	25kV
Razão de fluxo	0,1mL/h	0,3mL/h	0,5mL/h	0,8mL/h	1mL/h

As nanofibras foram coletadas em temperatura ambiente, 25°C, e umidade relativa de 30%, em um anteparo coberto por uma folha de alumínio, como visto na figura 6.

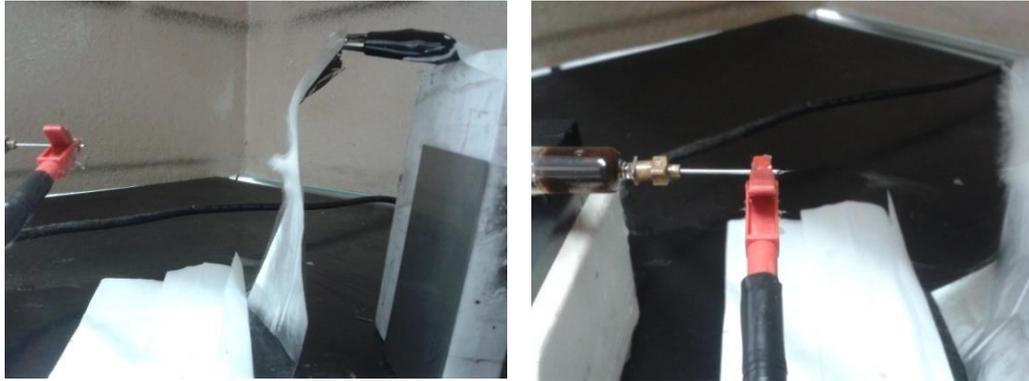


Figura 6 – Procedimento de eletrofiação de solução Ch.

#### 4.2.2 Eletrofiação de ChHa

Após 24h de agitação, a solução ChHa foi colocada numa seringa com uma agulha de 0,7mm e submetida ao processo de eletrofiação (Figura 7), sob as mesmas variáveis dos três diferentes parâmetros às quais a solução Ch foi submetida.

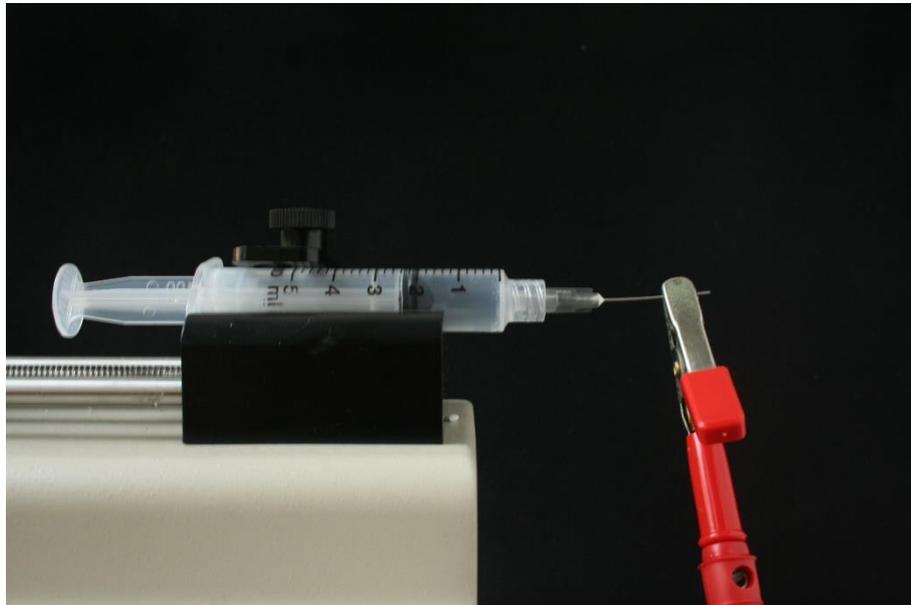


Figura 7 – Procedimento de eletrofição de solução ChHa.

### 4.3 Caracterização das mantas de nanofibras

Para caracterização das mantas de nanofibras de quitosana, dois blocos diferentes de análises, um de caracterização morfológica e topográfica e um de caracterização físico-química, foram realizados.

### 4.3.1 Caracterização morfológica e topográfica

As análises de caracterização morfológica e topográfica foram realizadas com o intuito de se conhecer e caracterizar a conformação superficial das mantas de nanofibras, já que este aspecto influencia sua interação com o meio. Pois determinando-se a conformação interface superficial, limitam-se os parâmetros de comportamento do material para com o substrato ao qual será exposto.

#### 4.3.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras obtidas a partir da eletrofiação, que proporcionaram aparente formação de nanofibras, tanto da solução Ch quanto da solução ChHa foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura (MEV) para a averiguação da qualidade da fibra gerada, presença ou ausência de defeitos.

Dessa forma, as amostras que macroscopicamente não apresentaram um precipitado mínimo no coletor de folha de alumínio foram descartadas.

Para isto, a superfície das amostras selecionadas foram fixadas num suporte e revestidas com uma fina camada de ouro sob baixa pressão atmosférica (SC7620 'Mini' Sputter Coater/Glow Discharge System, Emitech, East Sussex, RU).

Após foram realizadas micrografias (Inspect S 50, FEI Company, Brno, República Tcheca) operando sob alto vácuo, 15-25 kV, e spot de 5,0 (Figura 8).

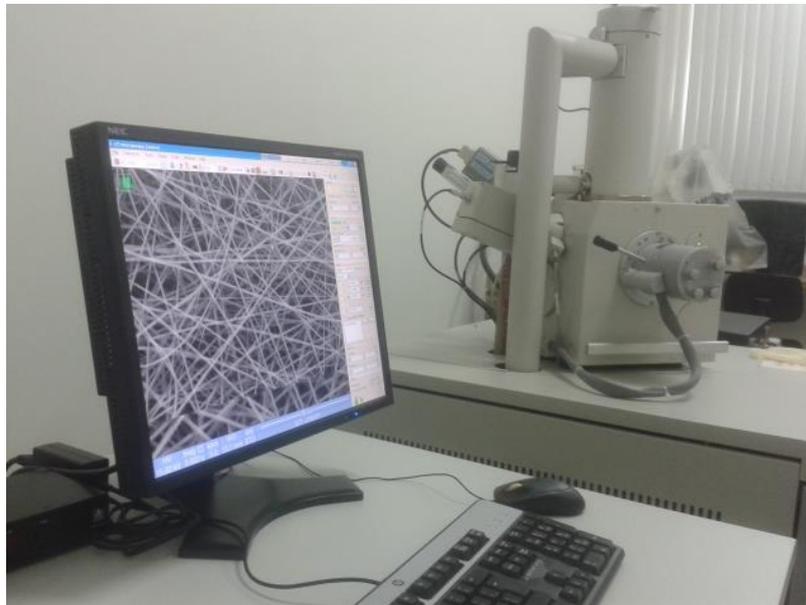


Figura 8 – Microscópio Eletrônico de Varredura.

#### 4.3.1.2 Análise do diâmetro médio das fibras

O diâmetro médio das fibras foi analisado por meio do software de análise de imagem, ImageJ (Versão 1.44o, National Public of Health) com as imagens obtidas a partir do MEV.

Para tanto, foram selecionados quatro amostras que apresentaram efetiva formação de fibras, duas do grupo Ch e duas do grupo ChHa, cada qual originada a partir de uma combinação específica de parâmetros de síntese.

Optou-se pelas amostras com maior coincidência de parâmetros de síntese entre si, no caso, o de fluxo e a tensão aplicada, além de uma entre os grupos, no caso, a distância.

O Quadro 2 apresenta os espécimes finais, sob as determinadas combinações de parâmetros, analisados.

Quadro 2 – Espécimes obtidos para análise de diâmetro das fibras: A-Ch, B-Ch, C-ChHa e D-ChHa.

<b>Grupo</b>	<b>Combinação efetiva de parâmetros</b>	<b>Espécime</b>
(Ch)	0,3mL/h-12cm-10kV(A)	A-Ch
(Ch)	0,3mL/h-15cm-10kV(B)	B-Ch
(ChHa)	0,5mL/h-12cm-17kV(C)	C-ChHa
ChHa)	0,5mL/h-15cm-17kV(D)	D-ChHa

A partir de 02 micrografias de cada espécime realizou-se 05 mensurações de diâmetro em 02 diferentes regiões, sendo portanto, 25 análises de cada imagem e 50 análises de cada espécime. Totalizando, ao final, 200 mensurações.

As médias das variáveis avaliadas foram comparadas pela Análise de Variância (ANOVA) 1-fator, seguida pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

#### 4.3.1.3 Análise perfilométrica

O perfilômetro fornece em suas análises, imagens tridimensionais da superfície do material estudado, sendo sensível à escala micrométrica, possibilitando assim, uma análise de rugosidade superficial.

Este aparato funciona a partir do princípio de interferência óptica, onde um feixe de luz é gerado e dividido em duas partes, uma incide sobre uma superfície plana (referencial) e a outra é direcionada à superfície da amostra, posteriormente ambas são refletidas ao detector. O padrão de interferência gerado pela diferença entre os caminhos ópticos dos feixes é analisado pelo detector, gerando informações sobre a morfologia da superfície da amostra (Grove et al., 1989).

As informações relativas aos eixos x-y são obtidas por um microscópio óptico enquanto as relativas à altura são captadas por interferência óptica.

Para as análises deste estudo foi utilizado o Perfilômetro Óptico (Wyko NT 1100, Veeco, Plainview, NY, EUA), do Laboratório Associado de Sensores e Materiais Instituto de Pesquisas Aeroespaciais (LAS/INPE).

#### 4.3.1.4 Microscopia de Força Atômica

A Microscopia de Força Atômica (*AFM – Atomic Force Microscopy*) permite uma análise tridimensional da topografia da superfície das amostras, baseando-se na incidência de um laser sobre uma ponta de alguns angstroms acoplada a um *cantilever* flexível e refletor. Desse modo, durante uma varredura horizontal da superfície do material, uma imagem é formada, a partir da variação da luz refletida pelo *cantilever* devido à rugosidade da amostra (Brundle et al., 1992).

Para este estudo foi utilizado o AFM (Veeco Multimode V, Veeco Instruments, Plainview, NY, EUA), no LAS/INPE sob no modo de contato intermitente, com uma ponta de silício dopado com antimônio, em todas as amostras. Neste modo, a ponta

não toca a superfície do material, sendo atraída e movida por forças de Van der Waals.

#### 4.3.2 Caracterização físico-química

##### 4.3.2.1 Espectroscopias: EDS e FTIR

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, podendo determinar os níveis de energia de átomos ou moléculas e obter informações sobre a estrutura molecular e as ligações químicas. Nas moléculas, a região espectral onde as transições são observadas depende do tipo de níveis envolvidos: eletrônicos, vibracionais ou rotacionais (Guimarães, 2011).

A energia total de uma molécula é a soma das energias eletrônica, que aparecem nas regiões do ultravioleta; vibracional, que aparecem na região do infravermelho e rotacional, que aparecem na região das micro-ondas (Sala, 1996).

Os níveis energéticos de uma molécula, quando comparados entre si, mostram valores bem diferentes. Isto faz com

que cada espectro possa ser estudado separadamente (Guimarães, 2011).

Para isso, utilizou-se para análises das amostras as técnicas de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) e espectroscopia no infravermelho com acessório de de refletância total atenuada (ATR-FTIR).

O EDS foi utilizado para uma análise qualitativa da composição química das amostras com um detector instalado na câmara de vácuo do MEV.

Nesta análise, um feixe de elétrons incide sobre um material e os elétrons mais externos dos átomos e os íons constituintes são excitados, mudando de níveis energéticos. Ao retornarem para sua posição inicial, liberam a energia adquirida a qual é emitida em comprimento de onda no espectro de raios-x. Como os elétrons de um determinado átomo possuem energias distintas, é possível, no ponto de incidência do feixe, determinar quais os elementos químicos estão presentes naquele local e assim identificar em instantes que mineral está sendo observado.

Já o FTIR permite análise de fenômenos físicos e químicos, cujas energias estão relacionadas com longos comprimentos de onda. Esses efeitos, de energias compreendidas na região do infravermelho, influem diretamente nas condutividades elétrica e térmica, além de propiciarem informações sobre estrutura e composição do material (Rodrigues, Galzerani, 2012).

A partir da passagem de uma radiação infravermelha através de um material o espectro infravermelho é obtido, determinando qual a fração da radiação incidente é absorvida ou transmitida, sendo que essa interação representa mudanças nos dipolos moleculares, associados a vibrações e rotações (Guimarães, 2011).

Também podem ocorrer as vibrações, correspondentes aos movimentos de alongamento e de flexão que os átomos de uma molécula podem sofrer a partir da variação de seus próprios comprimentos de ligação uns com os outros. Para uma molécula diatômica, por exemplo, apenas são possíveis vibrações correspondentes ao alongamento ou à compressão. Isto representa um grau de liberdade vibracional (Guimarães, 2011).

A referida análise foi realizada no IP&D da Univap utilizando o equipamento de FT-IR (Spotlight 400 – Perkin-Elmer) no modo ATR na região de  $4000 - 500\text{cm}^{-1}$ , 32 varreduras e resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.3.2.2 Análise de difratometria de Raios-X

A Difração por raios-X é uma técnica não destrutiva utilizada para identificar a cristalinidade das fases presentes nos materiais e medir propriedades estruturais, como estados de tensão,

tamanho de grãos, composição de fases, defeitos estruturais e orientações preferenciais dessas fases (Brundle et al., 1992).

Neste trabalho, esta técnica foi utilizada para determinação da cristalinidade, baseando-se na interação dos raios-X com os átomos da rede cristalina dos materiais.

Quando um feixe de raios-X é incidido sobre uma superfície, este é difratado pela trama cristalina presente, de acordo com cada tipo de material, sob um padrão de difração, permitindo identificação de fases cristalinas.

Para o presente estudo, foi utilizado um Difratorômetro de Raios-X de Alta Resolução (GIXRD; Philips X'pert PRO MRD, Almelo, Holanda) no LAS/INPE. O sistema utilizado foi equipado com um raio-x CuK $\alpha$  ( $\lambda = 0,154$  nm), onde o ângulo de incidência ( $\omega$ ) foi fixada em  $2^\circ$ , enquanto o ângulo de detecção de  $2\theta$  foi variada de  $20^\circ$  a  $90^\circ$ .

#### 4.3.2.3 Análise da molhabilidade utilizando a técnica de ângulo de contato

Quanto ao ângulo de contato da superfície de um material, entende-se que sua característica de molhabilidade integra-se ao comportamento de uma gota de água sobre a qual, para ( $\theta = 0$ )

entende-se como uma superfície hidrofílica, para ( $90^\circ < \theta < 0^\circ$ ) superfície é predominantemente hidrofílica, para ( $90^\circ < \theta < 180^\circ$ ) a superfície é predominantemente hidrofóbica e para ( $\theta = 180^\circ$ ) a superfície é totalmente hidrofóbica (Kwok, Neumann, 1999).

O ângulo de contato das superfícies foi analisado por meio de um Goniômetro óptico (TL 1000 – Invoiced freight, Theta Lite, Attension, Lichfield, Staffordshire, RU), onde uma seringa de vidro do sistema (Gastight Syringes #1001 – 1mL, Hamilton, Reno, Nevada, EUA) deposita uma gota de água destilada sobre a superfície da amostra. Foram utilizadas oito amostras: duas A-Ch, duas B-Ch, duas C-ChHa e duas D-ChHa. Uma série de imagens (30 imagens por segundo) é gravada pela câmara do equipamento por 15seg. O software OneAttension (Biolin Scientific, Lichfield, Staffordshire, RU) calcula os valores médios para cada amostra a partir das imagens obtidas.

#### 4.3.2.4 Taxa de degradação

Quatro pedaços de mantas (1cm x 1cm) foram imersas em solução tampão fosfato salina (PBS) estéril (pH = 7,4), dentro de tubos de ensaio fechados, sob agitação, à 37°C e seriam removidas semanalmente por 2 meses.

Ao final de cada período de incubação, as membranas foram removidas da solução tampão e lavadas com água deionizada (DI) a 40°C e mantidas em DI por 1 hora para remover a maior quantidade possível de solução tampão.

#### 4.3.2.5 Análises térmicas

As técnicas de análises térmicas, tais como Termogravimetria (TGA) e Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC), apresentam-se como técnicas analíticas de monitoramento de alterações físicas e químicas de materiais, quando estes são submetidos à variações de temperatura (Appelqvist et al., 1993; Ratto et al., 1995). Estes métodos são passíveis de serem ilustrados graficamente, com curvas que podem auxiliar na avaliação de mudanças de composição, estrutura química e arquitetura molecular (Neto et al., 2005).

A técnica do DSC permite a análise de eventos térmicos, avaliando-se a variação do fluxo de calor em função da temperatura, a qual é diretamente proporcional à mudança de energia interna da amostra (E. F. Lucas et al., 2001). Algumas destas modificações podem envolver perda de massa do material, como por exemplo, a perda de umidade e decomposição, as qual pode ser

mensurada quantitativamente via TG (Morgado, 2009; Neto et al., 2005).

Para as análises das amostras deste trabalho, foi utilizado equipamento DSC (Q20-TA Instruments, New Castle, DE, EUA). Foram preparadas amostras de 5mg, previamente prensadas em cadinho de alumínio e que, juntamente com uma amostra de referência, foram submetidas a ciclos de aquecimento térmico na faixa de -10 a 200°C, a uma taxa de 10°C/min.

Sob esse contexto, avaliou-se as propriedades térmicas da quitosana pura, quitosana eletrofiada (Ch eletrofiada) e Ch eletrofiada acrescida de nHAp (ChHa eletrofiada), sabendo-se que as propriedades desse polímero dependem de características como origem, grau de acetilação, cristalinidade e massa molar média (Morgado, 2009).

A técnica de Termogravimetria analisa a variação da massa de uma amostra em função da temperatura, sob uma programação controlada, permitindo compreender as alterações que o aquecimento e/ou resfriamento podem provocar na massa do material. As curvas termogravimétricas fornecem informações quanto à estabilidade térmica das amostras (Morgado, 2009).

No presente estudo, utilizou-se o equipamento Shimadzu modelo TGA-50TA. As amostras (6-8 mg) foram acondicionadas em uma panela de platina e aquecidas de 25 °C a 900 °C (10 °C min<sup>-1</sup>), em atmosfera de N<sub>2</sub> (fluxo de 50 mL<sup>-1</sup>).

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Caracterização morfológica e topográfica**

#### **5.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura**

Sob a análise em MEV pôde-se verificar que a melhor qualidade de síntese de nanofibras ocorreu sob uma umidade relativa do ar de 30%, como pode ser observado na figura 9 das amostras Ch e na figura 10 das amostrasChHa.

A figura 9 evidencia tanto em A-Ch quanto em B-Ch, formação de fibras sem significativas descontinuidades ou defeitos.

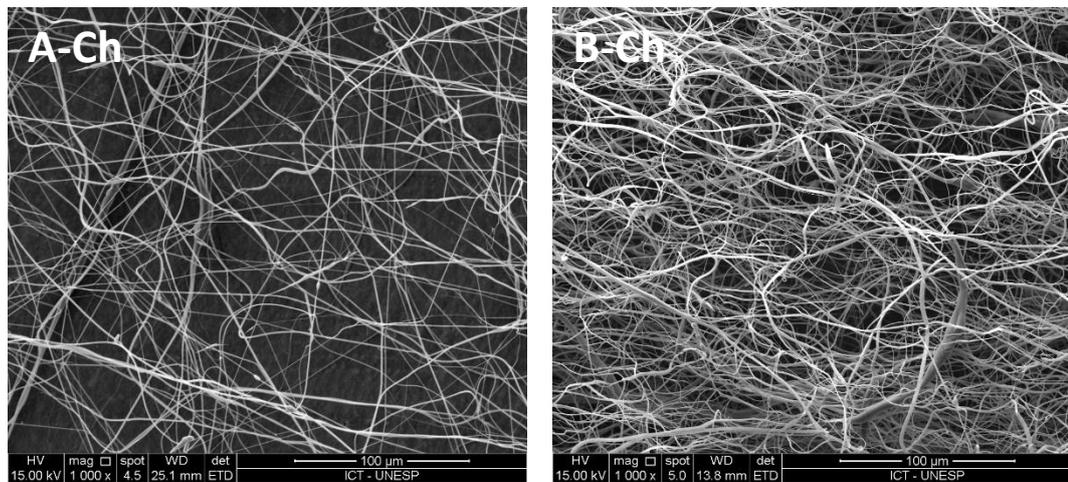


Figura 9– Micrografias (1000x aumento) de nanofibras sintetizadas a partir de solução Ch, sob umidade relativa do ar 30%, onde A-Ch) 0,3mL/h, 12cm, 10kVeB-Ch)0,3mL/h, 15cm, 10kV.

Na fircura 10 é possível observar que as amostras sintetizadas a partir da solução ChHa apresentam, independentemente dos parâmetros de eletrofiação, formação de discontinuidades como beads.

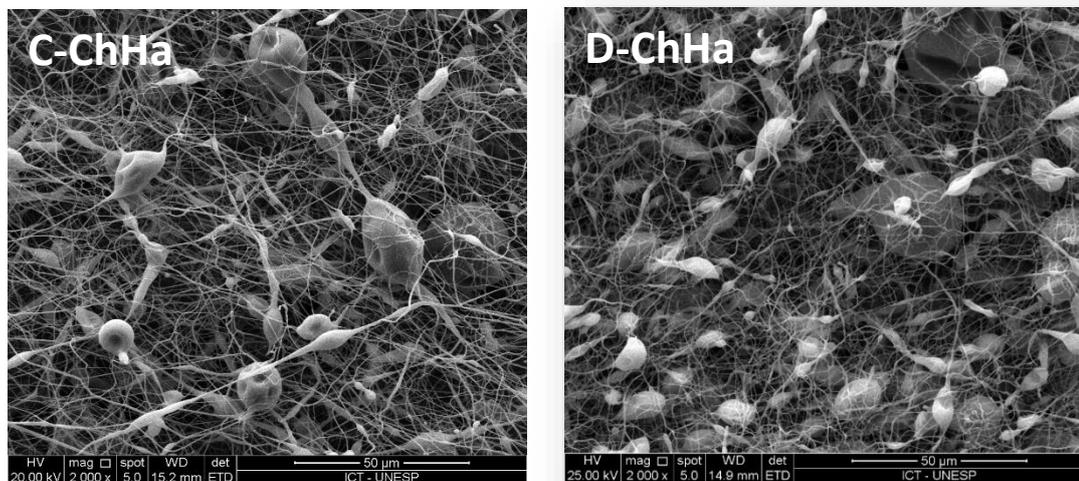


Figura 10– Micrografias de nanofibras (2000x aumento) sintetizadas a partir de solução ChHa, sob umidade relativa do ar 30%, onde C-ChHa) 0,5mL/h, 12cm, 17kV e D-ChHa) 0,5mL/h, 15cm, 17kV.

Já sob condições muito úmidas (60%) o processo de síntese não foi efetivo, como mostra a Figura 11, evidenciando que tanto para Ch, quanto para ChHa a umidade relativa do ar deveria ser menor.

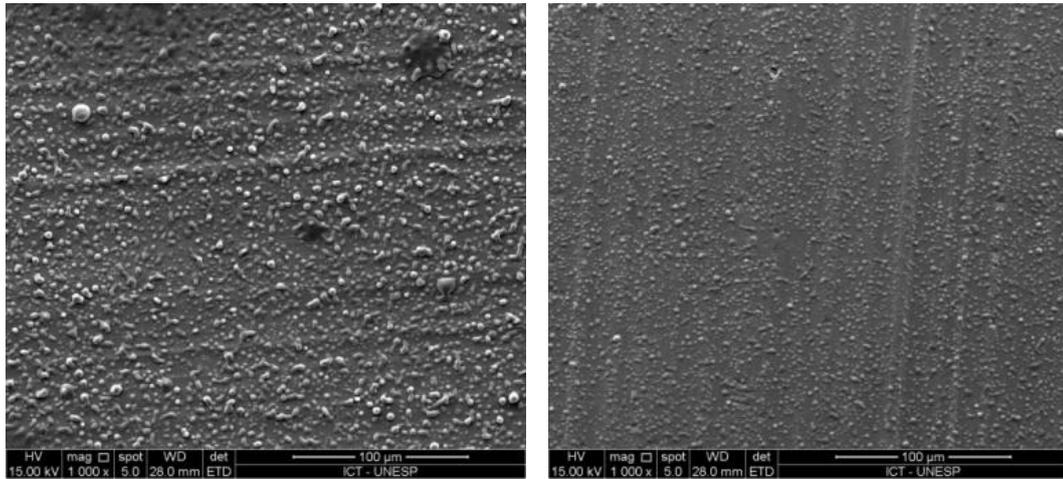


Figura 11 –Micrografias obtidas a partir de eletrofiação de soluções Ch e ChHa respectivamente, sob umidade relativa do ar 60%.

### 5.1.2 Análise diâmetro médio de fibras

A estatística descritiva dos valores de diâmetro de fibras segundo os parâmetros de síntese são apresentados na tabela 1 e tiveram representação gráfica, figura 12 e 13.

Tabela 1 – Medida de tendência central (média) e de dispersão (desvio padrão) dos valores de diâmetro médio de fibras (nm), segundo as condições experimentais

	<b>A-Ch</b>	<b>B-Ch</b>	<b>C-ChHa</b>	<b>D-ChHa</b>
<b>N</b>	50	50	50	50
<b>Média</b>	618	763	394	324
<b>DP<sup>(1)</sup></b>	162	190	86,3	103
<b>CV (%)<sup>(2)</sup></b>	26,30	24,94	21,94	31,88

<sup>(1)</sup>DP - Desvio Padrão; <sup>(2)</sup>CV – Coeficiente de variação

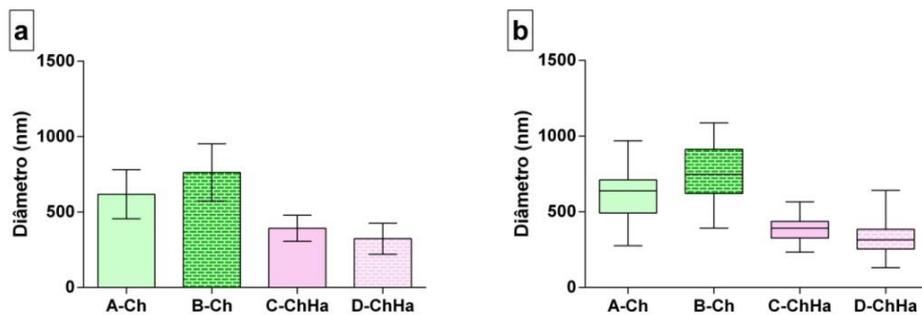
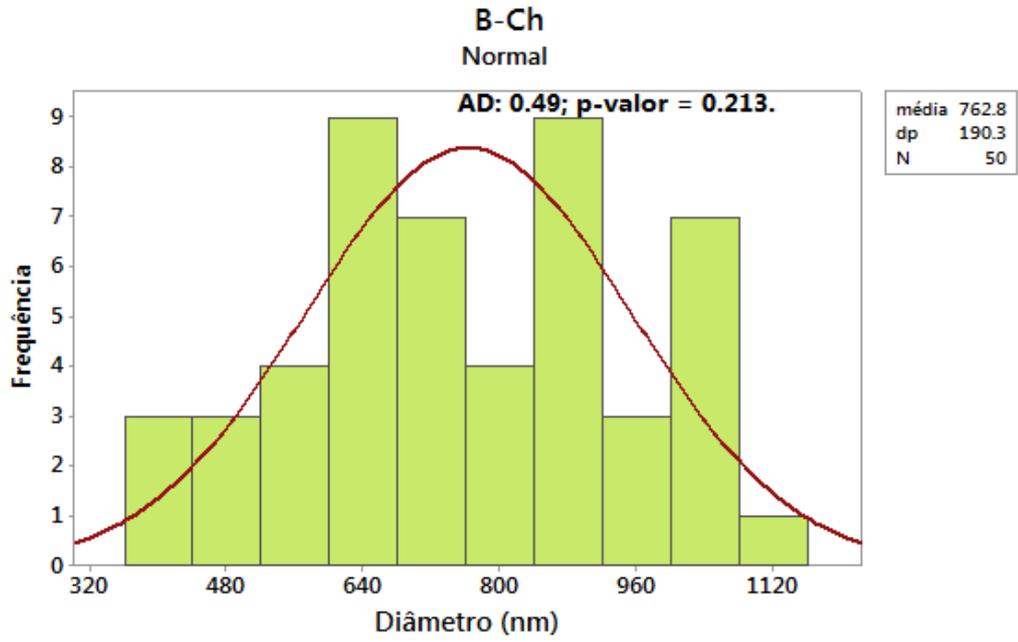
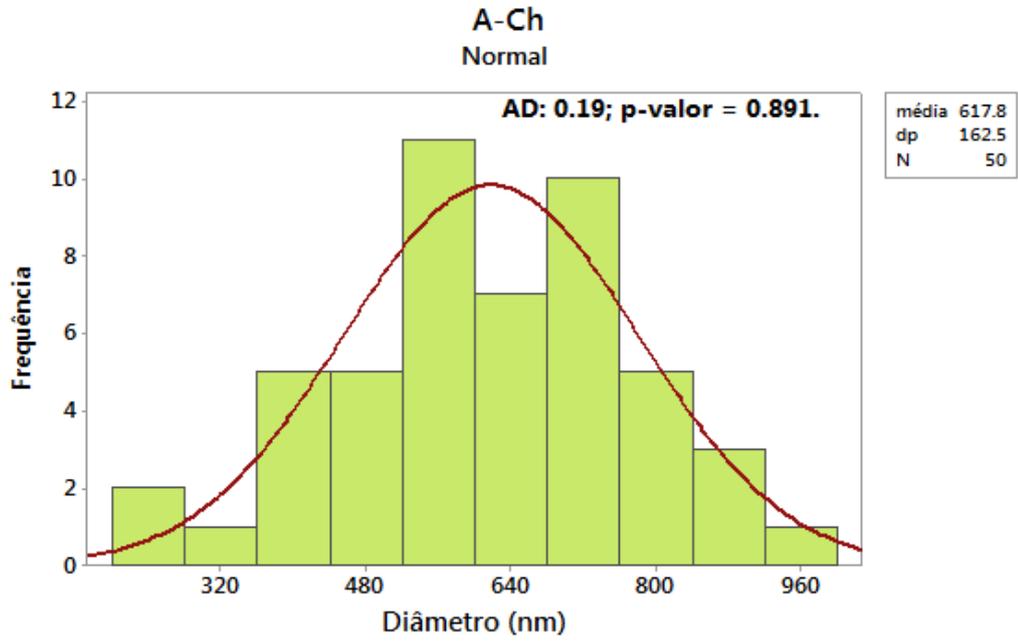


Figura 12 –a) Gráfico de colunas (média±desvio padrão) e correspondente b) Diagrama de caixa (box plot) dos valores de diâmetro das fibras.

Pode-se verificar que as médias de diâmetro de fibras variaram de 324 (D-ChHa) a 763nm (B-Ch); tiveram dispersão relativa (CV%) de 25 a 30%, e, ainda que não houve sobreposição de faixa interquartil entre A-Ch e B-Ch em relação à C-ChHa e D-ChHa.

Já na Figura 13 a distribuição dos valores medidos é apresentado na forma de histogramas.



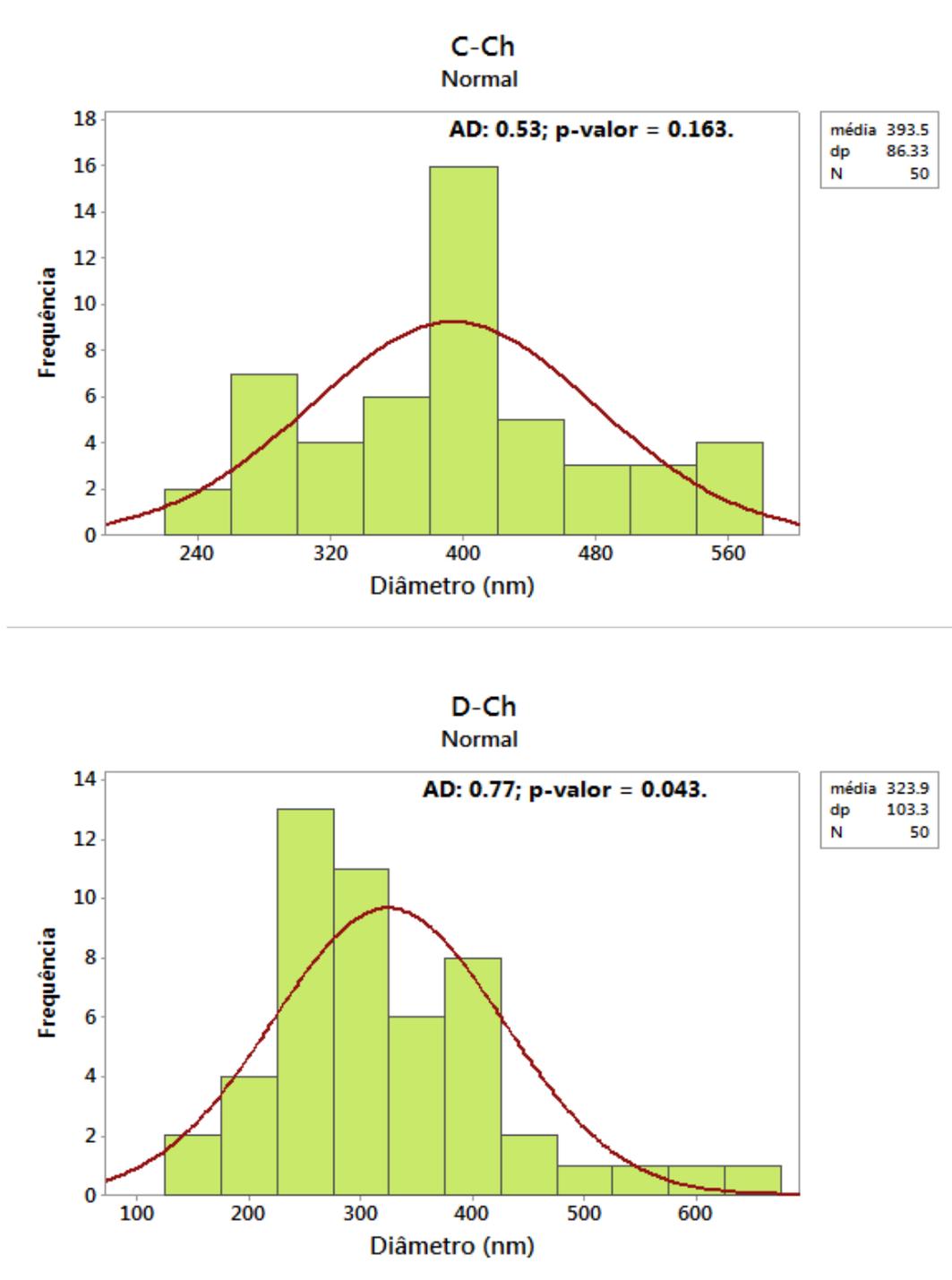


Figura 13 – Histogramas referentes à análise de diâmetro médio de fibras de A-Ch, BCh, C-ChHa e D-ChHa.

### 5.1.3 Análise perfilométrica

A partir da análise perfilométrica verificou-se média Ra de  $9,22\mu\text{m}\pm 1,94$  para Ch e  $2,92\mu\text{m}\pm 0,29$  para ChHa, apresentando diferença estatística significativa entre elas ( $p = 0,0052$ ).

A figura 14 apresenta as imagens obtidas de uma amostra A-Ch e B-Ch, onde se faz possível analisar imagens em 2D (à direita) e em 3D (à esquerda).

As imagens A-Ch apresentam picos de até  $35,3\mu\text{m}$  e vales de  $58\mu\text{m}$ , enquanto B-Ch picos de até  $36\mu\text{m}$  e vales de  $69\mu\text{m}$ .

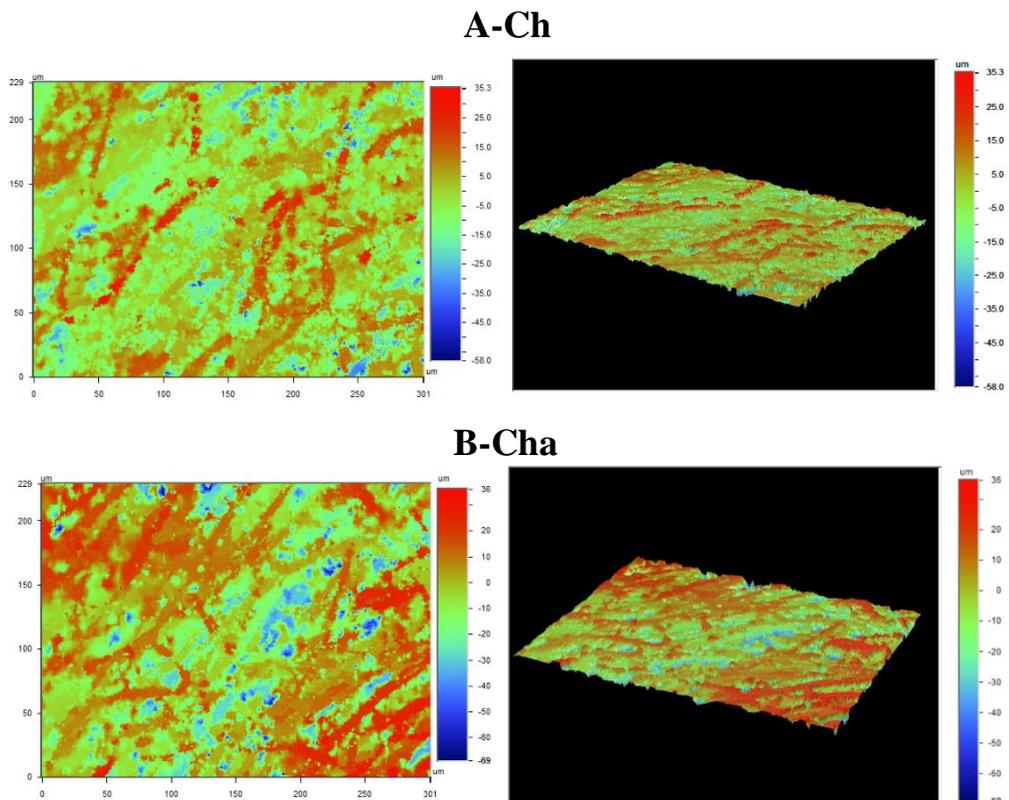
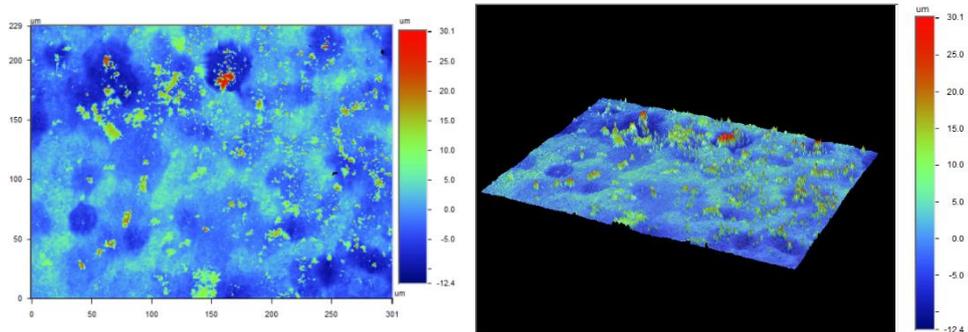


Figura 14 - Análise perfilométrica de A-Ch e B-Ch, à direita, imagens em 2D e à esquerda imagens em 3D.

Já figura 15 apresenta as imagens obtidas a partir de amostras C-ChHa e D-ChHa, onde C-ChHa apresenta picos de até  $30.1\mu\text{m}$  e vales de  $12.4\mu\text{m}$  e D-ChHa apresenta picos de até  $37.6\mu\text{m}$  e vales de  $13.2\mu\text{m}$ .

### C-ChHa



### D-ChHa

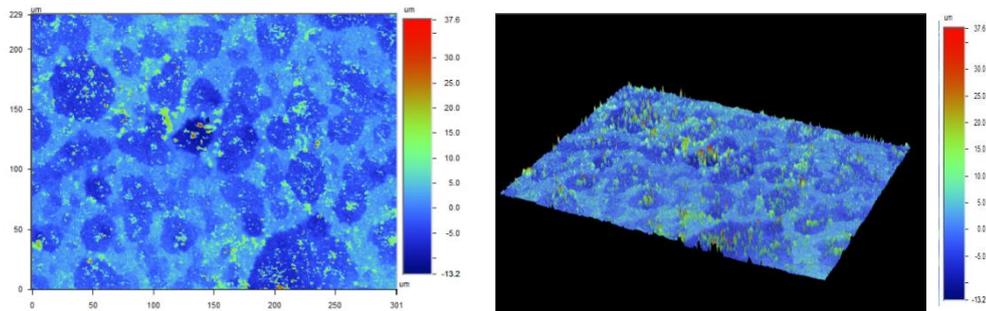


Figura 15 - Análise perfilométrica de C-ChHa e D-ChHa, à direita, imagens em 2D e à esquerda imagens em.

### 5.1.4 Microscopia de Força Atômica

As amostras de quitosana pura eletrofiadas e com adição de nHAp revelaram diferenças significativas em sua topografia.

A figura 16 evidencia uma superfície mais homogênea e de clara evidenciação de nanofibras com cerca de aproximadamente  $0.6\mu\text{m}$ .

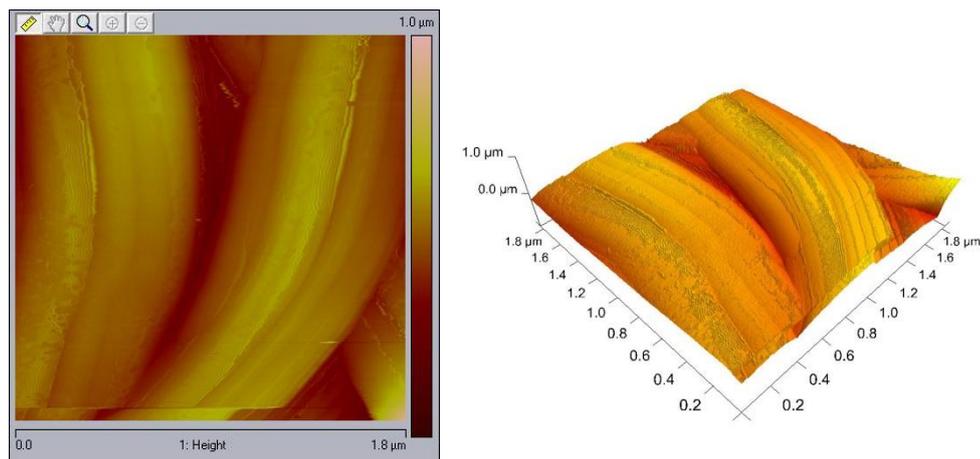


Figura 16 - Análise topográfica em AFM de amostra CH eletrofiada.

Em contrapartida, a figura 17 apresenta uma superfície irregular e rugosa, sem uma definida apresentação de fibras.

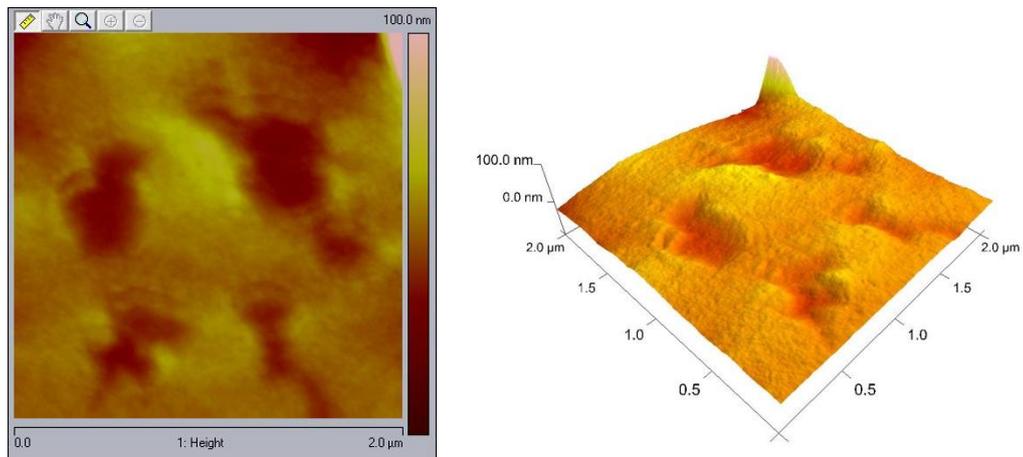


Figura 17 - Análise topográfica em AFM de amostra ChHa.

## 5.2 Caracterização físico-química

### 5.2.1 Espectroscopias: EDS e FTIR

Com o EDS foi possível verificar a presença de nHAp nas amostras ChHa por causa da presença de Cálcio em sua composição, diferentemente da amostra de Ch, como pode ser visto na figura 18 e 19.

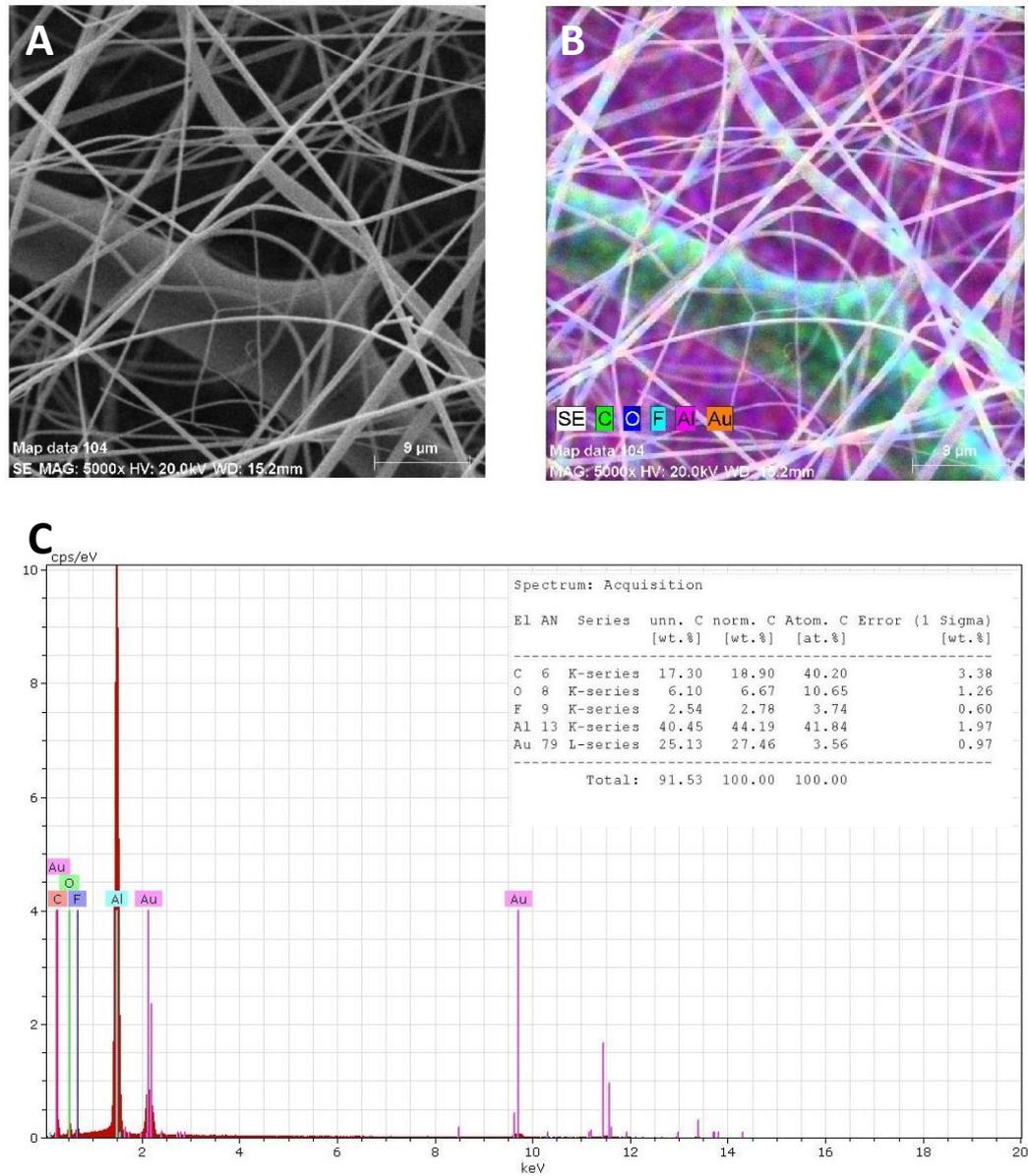


Figura 18 - Resultados comprovando ausência de Ca em Ch, onde A) Micrografia; B) Mapeamento por EDS e C) Espectro obtido e composição química por EDS.

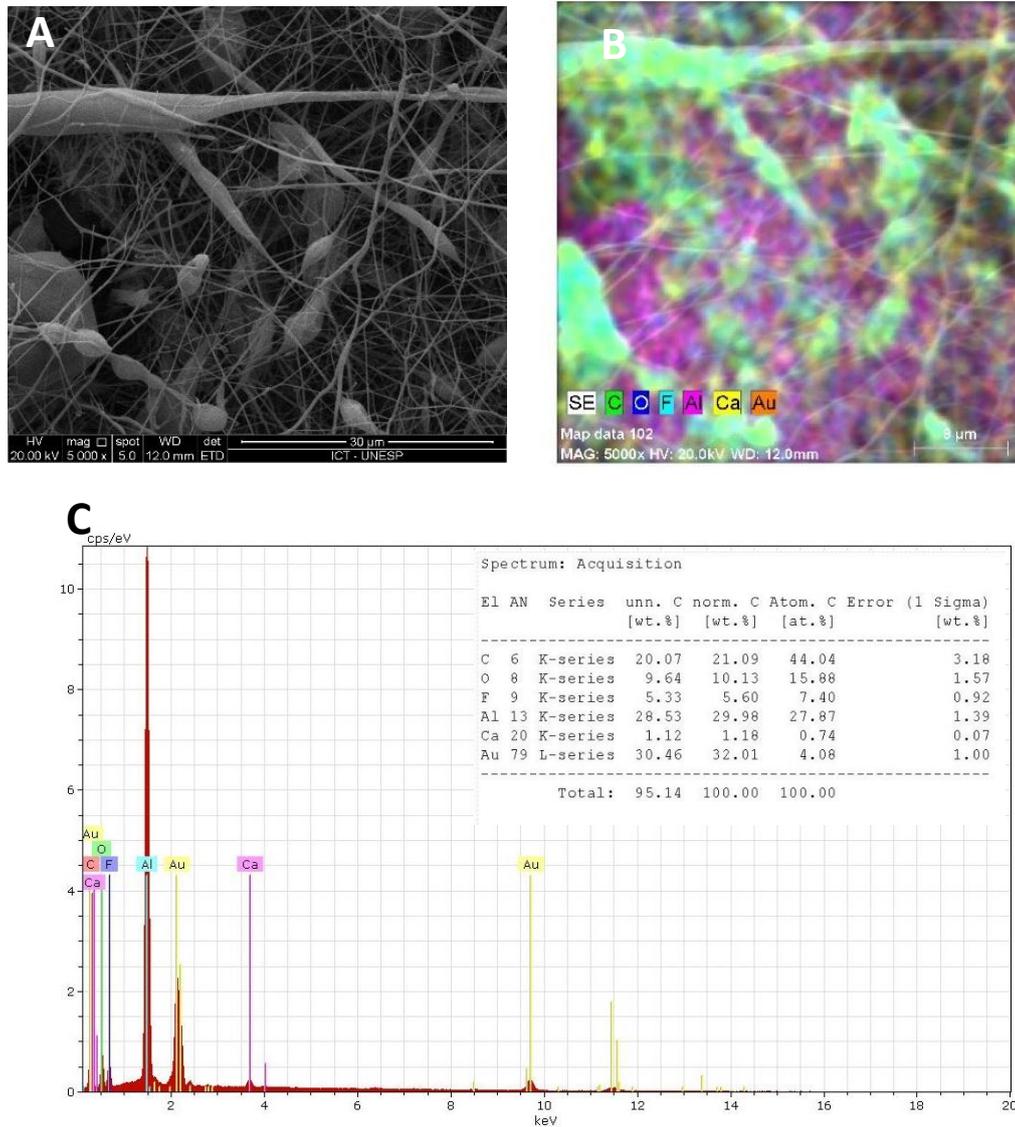


Figura 19 – Resultados comprovando presença de Ca, componente da nHAP na amostra ChHa, onde A) Micrografia; B) Mapeamento por EDS e C) Espectro obtido e composição química por EDS.

Quanto as análises do FTIR a figura 20 apresenta o gráfico com os resultados obtidos.

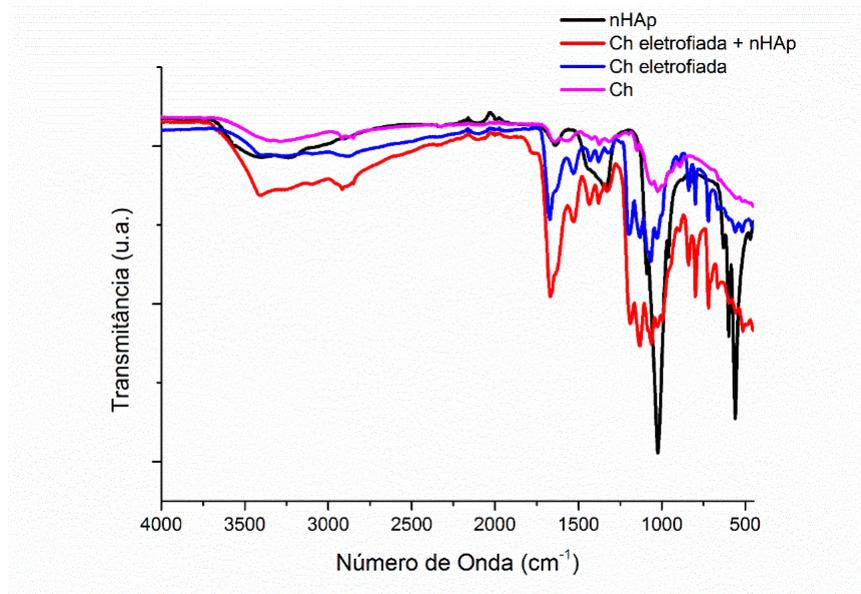


Figura 20 – Espectros de absorção no infravermelho para amostras de nHAp, quitosana pura e fibras Ch e ChHa eletrofiadas.

Já na figura 21 pode-se identificar três bandas de transmitância características de Ch e ChHa eletrofiadas, 720, 800 e 840 $\text{cm}^{-1}$ .

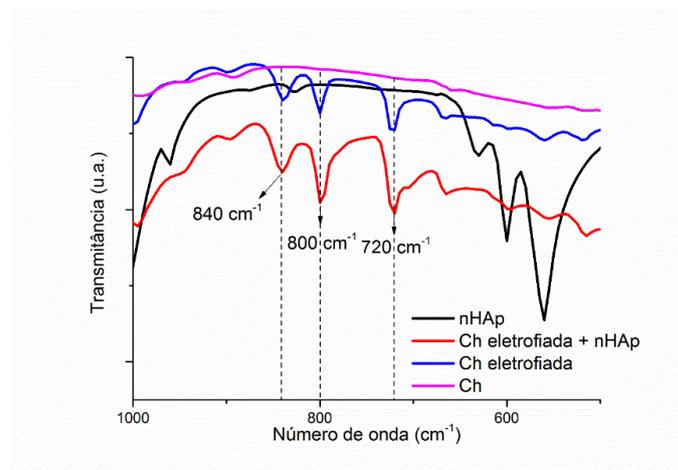


Figura 21 – Região de bandas características ChHa sob análise FTIR.

Quanto à análise de nHAp, verificou-se uma banda em  $550\text{ cm}^{-1}$ . Já em  $1644\text{ cm}^{-1}$  e  $1552\text{ cm}^{-1}$  verifica-se absorbância, como visto na figura 22.

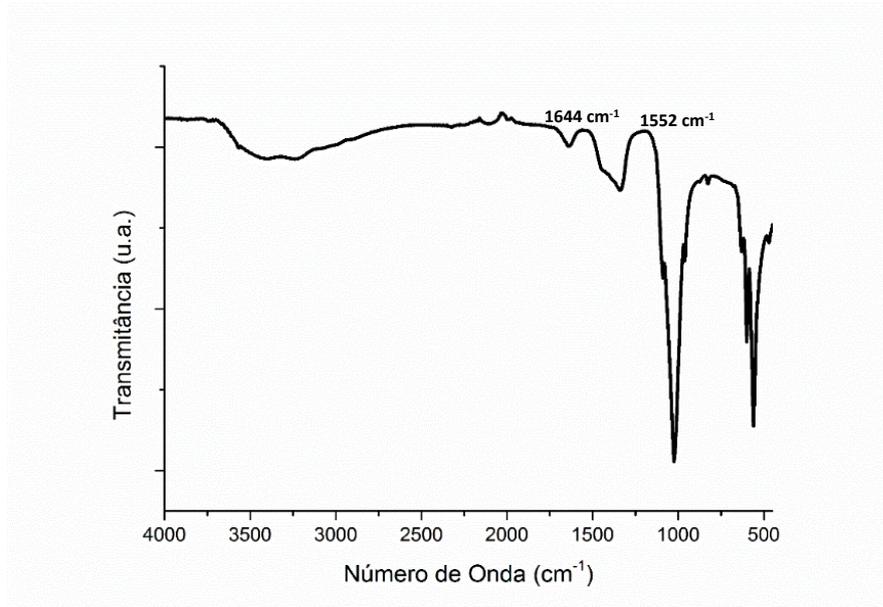


Figura 22 – Análise isolada da amostra de nHAp em FTIR.

### 5.2.2 Análise difração de raios-X

Os resultados da análise de difração de Raios-X, representada na Figura 23, apresentou picos característicos para cada material analisado: Ch ( $2\theta \sim 20^\circ$ ), Ch eletrofiada ( $2\theta \sim 20^\circ$ ), nHAp ( $2\theta \sim 28^\circ, 31^\circ, 50^\circ$ ), ChHa eletrofiada ( $2\theta \sim 45^\circ, 65^\circ, 79^\circ$ ).

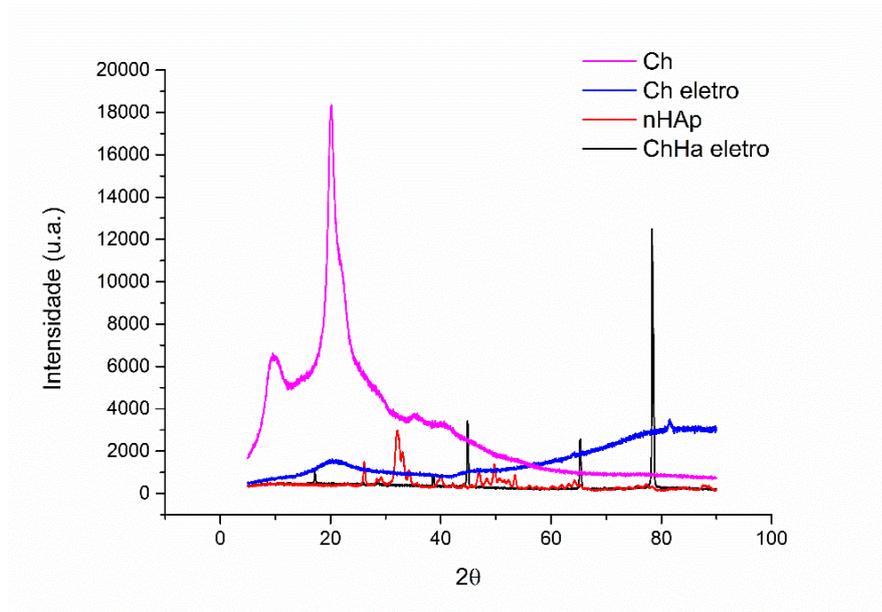


Figura 23 – Gráfico representativo das análises de DRX.

O difratograma da manta de quitosana apresentou picos típicos de material semicristalinos, com pico largo em torno de  $2\theta = 10^\circ$  e  $2\theta = 20^\circ$ , assim como também pode ser observado em Ch.

A nHAp apresentou pico significativo em  $30^\circ$ , assim como ChHa em  $80^\circ$ .

### 5.2.3 Análise da molhabilidade utilizando a técnica de ângulo de contato

O ângulo de contato da água destilada, para se testar a hidrofobicidade das mantas não foi passível de ser mensurável por

causa da decorrente dissolução das mantas Ch e ChHa perante a presença da água, como pode ser visto na figura 24.



Figura 24 – Fotos representativas do comportamento da gota de água destilada sobre a manta de nanofibras de quitosana.

#### 5.2.4 Análise da taxa de degradação

As amostras submetidas à imersão em solução PBS sofreram imediata dissolução.

#### 5.2.5 Análises térmicas

A figura 25 apresenta as análises termogravimétricas realizadas numa amostra de Quitosana em pó de peso molecular médio, Quitosana eletrofiada e Quitosana eletrofiada com adição de nHAp. Enquanto que a Tabela 2 apresenta os estágios de perda de massa das amostras.

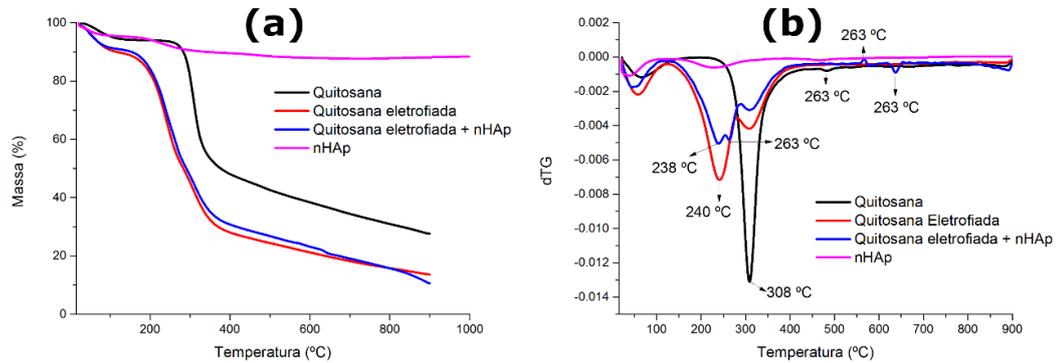


Figura 25 - (a) Curvas TG e (b) dTGs das amostras de quitosana, quitosana eletrofiada e quitosana eletrofiada + NPs (taxa de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$  e atmosfera de  $\text{N}_2$  a  $50 \text{ mL}^{-1}$ ).

Os resultados foram compreendidos em diferentes estágios, o primeiro correspondente à perda de água absorvida/adsorvida, o segundo a decomposições térmicas, até alcançar a degradação máxima, sob uma temperatura máxima de decomposição.

Tabela 2 - Estágios de perda de massa associados à evaporação de água absorvida/adsorvida e decomposição obtidos pela análise das curvas TG e dTG das amostras.

<b>Amostra</b>	<b>1º Estágio (perda de água)</b>	<b>2º Estágio (decomposição)</b>	<b>3º Estágio (decomposição)</b>
<b>Quitosana</b>	25-168 °C →5,04%	202-433 °C →35,99%	-
<b>Ch eletrofiada</b>	25-118 °C→9,04%	126-280 °C →40,06%	280-431°C →24,03%
<b>ChHa eletrofiada</b>	25-120 °C →10,90%	125-288 °C →40,15%	288-435 °C →21,47%

## 6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de novos biomateriais assumiu grande importância na ciência atual e, nesse sentido, o presente trabalho procurou caracterizar mantas de nanofibras de um polímero antimicrobiano, a quitosana, obtidas através do processo de eletrofição com e sem a inclusão de hidróxiapatita qualificando-se suas propriedades morfológicas, topográficas e físico-químicas.

Inicialmente, constatou-se a influência dos parâmetros ambientais à eletrofição (Homayoni et al., 2009; Tripatanasuwan et al., 2007), sendo que a padronização da temperatura e da umidade relativa do ar foi de extrema importância para a efetividade do processo.

A temperatura foi efetiva ao processo quando acima de 23°C. Já em relação à umidade relativa do ar, apenas quando mantida abaixo de 40% permitia o mesmo resultado.

De Vrieze e colaboradores (2009) assumem em seu estudo, que a umidade pode modificar o diâmetro das nanofibras, dependendo da natureza química do polímero utilizado. E a variação de temperatura também pode provocar este tipo de alteração, pois associa-se à taxa de evaporação do solvente e à viscosidade da solução.

A eletrofição também demonstra-se sensível às variáveis intrínsecas do próprio sistema. Fong e colaboradores (1999),

em 1999, observaram que quanto menor a tensão superficial da solução, menor é a formação de *beads*, estruturas poliméricas que provocam descontinuidades nas nanofibras.

Deitzel e colaboradores (2001) também constataram o mesmo em relação a sistemas de solução água/PEO. Isso porque, com o aumento da tensão aplicada há uma alteração da superfície a partir da qual o jato da eletrofiação se origina, alterando a morfologia das nanofibras. Além disso, também foi observado que sob baixas tensões as fibras eletrofiadas possuíam menos defeitos.

Quanto ao presente estudo, as soluções Ch e ChHa também apresentaram-se sensíveis aos parâmetros de eletrofiação, já que constituições efetivas de fibras foram encontradas sob combinações específicas de parâmetros (para Ch 0,3mL/h-12 ou 15cm-10kv e para ChHa 0,5mL/h-12 ou 15 cm-17kv).

Quanto à formação de *beads*, neste estudo, as micrografias de MEV mostraram que todas as amostras obtidas a partir de ChHa possuíam essas descontinuidades.

Também foi possível verificar que o diâmetro médio das fibras mostrou-se sensível à adição de nHAp, já que houve um decréscimo significativo entre Ch e ChHa.

Característica essa que pode decorrer pelo fato dos cristais de nHAp estabelecerem-se nos espaços intersticiais da nanofibra, diminuindo seu volume, e pelo fato do diâmetro e a cristalinidade dessas estruturas serem influenciados pelo momento da cristalização das cadeias poliméricas (Lim et al., 2008).

Já quanto a diferença significativa entre A-Ch e B-Ch pode dever-se ao fato de que com a diminuição da distância entre a agulha e o coletor aumenta-se a intensidade do campo elétrico, que é responsável por alongar as nanofibras durante o processo de deposição, ocasionando a diminuição do diâmetro médio das fibras.

No que se diz respeito à topografia superficial das mantas, a análise perfilométrica forneceu imagens que mostraram fibras de Ch melhor identificáveis do que ChHa. Já pelo AFM foi possível constatar melhor homogeneidade e lisura de fibras de Ch em comparação com a alta rugosidade de ChHa, possivelmente explicada pela aglomeração dos cristais de nHAp.

A partir das análises de espectroscopia, confirmou-se via EDS a incorporação efetiva de hidroxiapatita na ChHa e conseqüentemente em suas nanofibras.

E a partir do FTIR foi possível identificar bandas de transmitância características de Ch e ChHa eletrofiadas, revelando a formação de sal TFA por 03 bandas  $720$ ,  $800$  e  $840\text{cm}^{-1}$ , estas que, segundo Chen e colaboradores (2012), desaparecem após tratamento alcalino.

Dessa forma, também verificou-se a presença de grupos amina ( $-\text{NH}_3^+$ ), verificado entre  $1675$  e  $1540\text{cm}^{-1}$  (Chen et al., 2012).

No que diz respeito à nHAp, a vibração de flexão  $\text{OH}^-$  apareceu como um pico fraco de baixa frequência na faixa dos  $660\text{cm}^{-1}$  assim como Jevtić e colaboradores encontraram em  $669\text{cm}^{-1}$

(Jevtić et al., 2009; Mendes et al., 2012). Já em  $1644\text{ cm}^{-1}$  verifica-se absorvância que pode ser atribuída a dois tipos de variações, flexão H-O-H (água) e alongamento carbonila (C=O) (Mendes et al., 2012; Tavakol et al., 2012).

A análise DRX demonstrou a similaridade dos picos característicos entre Ch e Ch eletrofiada e nHAp e ChHa eletrofiada, comprovando neste caso a incorporação da hidroxiapatita no material, como visto em trabalhos como de Kong e colaboradores (Kong et al., 2006) que encontraram, da mesma forma, picos de quitosana ( $20.305^\circ$ ,  $29.96^\circ$ ) e de carbonato de hidroxiapatita ( $25.8^\circ$ ,  $31.7^\circ$ ,  $48.5^\circ$ ).

Essa presença de cristais de nanohidroxiapatita pode influenciar a topografia, e aumentar a proliferação e diferenciação de células (Kong et al., 2006).

Sob a análise do ângulo de contato superficial das amostras de membranas de Ch e ChHa, não foi possível obter ângulos estáveis, por causa de uma imediata embebição sofrida pelas membranas na presença de água.

Bierbrauer e colaboradores (2014) também constataram que a gota de água utilizada nesta análise em filmes à base de quitosana e TFA desencadeavam uma dissolução do espécime, diferentemente dos filmes à base de quitosana e PFOA (Ácido perfluorooctanóico) que apresentaram maior estabilidade de superfície, atribuída ao fato dos grupos hidroxila quitosana, neste caso, não sofrerem modificações após adição de PFOA (Bierbrauer et al., 2014).

Assim sendo, entende-se que quando a quitosana é dissolvida em TFA puro, um ácido muito forte, a dissolução se dá não somente por uma protonação dos grupos aminos como também por esterificação, sendo que este produto esterificado é mais solúvel que a quitosana por si só, além de que, através do FTIR comprovou-se a presença de sais de TFA, justificando-se a imediata embebição e dissolução das mantas de Ch e ChHa.

Assim, o teste de degradação também acabou confirmando este fenômeno, sob a constatação de que as mantas sofreram rápida dissolução sob solução aquosa.

Por este motivo, entende-se que a escolha do TFA como solvente da quitosana deve atentar-se para a estabilidade – neutralização e eliminação de TFA residual (Chen et al., 2012; Sangsanoh, Supaphol, 2006) – de suas nanofibras eletrofiadas em soluções aquosas, característica importante para uma futura aplicabilidade no contexto de proliferação celular.

Já quanto ao comportamento térmico, segundo Morgado (2009), o primeiro estágio da perda de massa da quitosana ocorre entre 25 °C e 110 °C, com uma perda de 6,4%; o segundo estágio ocorre entre 228°C e 417,6°C, com uma massiva perda de massa de 47,2% e temperatura de decomposição máxima de 306°C (Morgado, 2009). Estes resultados corroboram com os resultados observados no presente trabalho, no qual o primeiro estágio de perda de massa apresentou-se entre 25°C e 168°C, com uma perda de massa de 5,04% e o segundo estágio entre 202°C e 433°C, com perda de massa de 36% e temperatura de decomposição máxima de 308°C.

Em relação à Ch eletrofiada, esta apresentou o primeiro estágio de perda de massa no intervalo de 25°C a 118°C, com uma perda de massa de 9,0%; um segundo estágio no intervalo de 126°C a 280°C, com perda de massa de 40,1%; e um terceiro e último estágio, entre 280-431°C, com perda de massa de 24,0%.

Ao analisar a amostra de ChHa eletrofiada, observou-se o primeiro estágio entre 25°C e 120°C, com perda de massa de 10,9%; o segundo estágio, entre 125°C e 288°C, com perda de massa de 40,1%; e um terceiro e último estágio, entre 288-435°C, com perda de massa de 21,5%.

Já a nHAp isolada apresentou 03 estágios de perda de massa, nos intervalos de 25-120°C (perda de 4,58%), 120-390°C (perda de 5,78%) e 390-500°C (perda de 1,1%), todos relacionados à perda química e física de água. Já entre 500-1000°C, a massa de nHAp variou muito pouco (perda de 0,11%). Meejoo e colaboradores (2006) observaram um estreitamento da banda de OH<sup>-</sup> (3500 cm<sup>-1</sup>, FTIR) quando nHAp foi submetida a altas temperaturas (> 800 °C). Além disso, em altas temperaturas (> 600 °C), essa perda de massa pode ser atribuída a decarboxilação da nHAp, liberando CO<sub>2(g)</sub> e condensação de HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> liberando água (Meejoo et al., 2006).

Para Neto e colaboradores (2005), analisando uma quitosana com 85% de grau de desacetilação, a característica hidrofílica desse polímero é parcialmente influenciada pela presença de grupos amina, os quais são de vital interesse no contexto da dissolução desse

material em meio ácido e de resistência à degradação química e biológica (Neto et al., 2005).

De fato, os grupos amina da quitosana são relatados como resíduos de D-glucosamina passíveis de serem protonados fornecendo solubilidade em soluções aquosas ácidas diluídas, diferenciando-a da quitina que apresenta pouca solubilidade (Leedy et al., 2011; Pavinatto et al., 2010).

Estes mesmos grupos amina são reportados na formação de sal quando associados ao TFA, destruindo as interações intermoleculares entre as cadeias da quitosana e facilitando o processo de eletrofiação (Hasegawa et al., 1992).

## 7 CONCLUSÃO

Dessa maneira, conclui-se que a adição de nHAp influencia os aspectos morfológicos e topográficos das nanofibras de quitosana, pois diminui o seu diâmetro médio e aumenta sua rugosidade superficial, o que pode alterar seu comportamento perante aos tecidos, modificando o desenvolvimento e a proliferação celular.

Em contrapartida, os mesmos cristais de nHAp não influenciam de maneira significativa as características físico-químicas das mantas de nanofibras de quitosana.

## 8 REFERÊNCIAS\*

Acosta N, Jiménez C, Borau V, Heras A. Extraction and characterization of chitin from crustaceans. *Biomass Bioenergy*. 1993 Dec;5(2):145-53. doi: 10.1016/0961-9534(93)90096-M.

Ahmed FE, Lalia BS, Hashaikeh R. A review on electrospinning for membrane fabrication: challenges and applications. *Desalination*. 2015 Jan;356:15-30. doi: 10.1016/j.desal.2014.09.033.

Andrade SMB. Eletrofição e caracterização de membranas biopoliméricas a base de quitosana extraídas dos exoesqueletos de crustáceos [tese]. Natal (RN): Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2012.

Angamma CJ. A study of the effects of solution and process parameters on the electrospinning process and nanofibre morphology [thesis]. Waterloo [ON]: University of Waterloo; 2011.

Appelqvist IAM, Cooke D, Gidley MJ, Lane SJ. Thermal properties of polysaccharides at low moisture: 1- an endothermic melting process and water-carbohydrate interactions. *Carbohydr Polym*. 1993 Jan;20(4):291-9. doi: 10.1016/0144-8617(93)90102-A.

---

\* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 20 ago 2013; acesso em 25 out 2014]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Arakaki M, Yamashita S, Mutaf M, Naito S, Fujii T. Onlay silicone and hydroxyapatite-tricalciumphosphate composite (HAP-TCP) blocks interfere with nasal bone growth in rabbits. *Cleft Palate Craniofac J*. 1995 Jul;32(4):282-9. doi: 10.1597/1545-1569(1995)032<0282:OSAHTC>2.3.CO;2.

Aykut-Yetkiner A, Attin T, Wiegand A. Prevention of dentine erosion by brushing with anti-erosive toothpastes. *J Dent*. 2014 Jul;42(7):856-61. doi: 10.1016/j.jdent.2014.03.011.

Baranauskas V, Peterlevitz AC, Ceragioli HJ, Durrant SF. Microcrystalline diamond and nano-carbon structures produced using a high argon concentration in hot-filament chemical vapor deposition. *J Vac Sci Technol, A* 2001 Feb 19(4):1057-62. doi: 10.1116/1.1366701.

Barbosa MC, Messmer NR, Brazil TR, Marciano FR, Lobo AO. The effect of ultrasonic irradiation on the crystallinity of nano-hydroxyapatite produced via the wet chemical method. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013 Jul;33(5):2620-5. doi: 10.1016/j.msec.2013.02.027.

Bavariya AJ, Andrew Norowski P, Jr., Mark Anderson K, Adatrow PC, Garcia-Godoy F, Stein SH, et al. Evaluation of biocompatibility and degradation of chitosan nanofiber membrane crosslinked with genipin. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*. 2014 Jul;102(5):1084-92. doi: 10.1002/jbm.b.33090.

Bhattacharai N, Edmondson D, Veisheh O, Matsen FA, Zhang M. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. *Biomaterials*. 2005 Nov;26(31):6176-84. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.03.027.

Bhattacharai SR, Bhattacharai N, Yi HK, Hwang PH, Cha DI, Kim HY. Novel biodegradable electrospun membrane: Scaffold for tissue engineering. *Biomaterials*. 2004 Jun;25(13):2595-602. doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.09.043.

Bierbrauer KL, Alasino RV, Munoz A, Beltramo DM, Strumia MC. Characterization and bacterial adhesion of chitosan-perfluorinated

acid films. *Colloids Surf, B*. 2014 Feb;114:201-8. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.10.013.

Bottino MC, Thomas V, Schmidt G, Vohra YK, Chu TM, Kowolik MJ, et al. Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration--a materials perspective. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*. 2012 Jul;28(7):703-21. doi: 10.1016/j.dental.2012.04.022

Boyapalle S, Xu W, Raulji P, Mohapatra S, Mohapatra SS. A multiple siRNA-based anti-HIV/SHIV microbicide shows protection in both in vitro and in vivo models. *PLoS One*. 2015 Sep;10(9):e0135288. doi: 10.1371/journal.pone.0135288.

Brugnerotto J, Desbrières J, Roberts G, Rinaudo M. Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography. *Polymer*. 2001 Dec;42(25):09921-7. doi: 10.1016/S0032-3861(01)00557-2.

Brundle CR, Evans CA, Wilson S. *Encyclopedia of materials characterization*. Boston: Butterworth-Heinemann. 1992. [Materials Characterization: Surfaces I, Thin Films].

Burger C, Hsiao BS, Chu B. Nanofibrous materials and their applications. *Annu Rev Mater Res*. 2006 Aug;36(1):333-68. doi: 10.1146/annurev.matsci.36.011205.123537.

Capote FP, de Castro MDL. *Analytical applications of ultrasound*. Amsterdam: Elsevier Science; 2007.

Charernsriwilaiwat N, Rojanarata T, Ngawhirunpat T, Sukma M, Opanasopit P. Electrospun chitosan-based nanofiber mats loaded with garcinia mangostana extracts. *Int J Pharm*. 2013 Aug;452(1-2):333-43. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.05.012.

Chatelet C, Damour O, Domard A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*. 2001 Feb;22(3):261-8. doi: 10.1016/S0142-9612(00)00183-6.

Che G, Lakshmi BB, Martin CR, Fisher ER, Ruoff RS. Chemical vapor deposition based synthesis of carbon nanotubes and nanofibers

using a template method. *Chem Mater.* 1998 Jan;10(1):260-7. doi: 10.1021/cm970412f.

Chen J, Liu C, Shan W, Xiao Z, Guo H, Huang Y. Enhanced stability of oral insulin in targeted peptide ligand trimethyl chitosan nanoparticles against trypsin. *J Microencapsul.* 2015 Sep:1-10. doi: 10.3109/02652048.2015.1065920.

Chen JP, Chen SH, Lai GJ. Preparation and characterization of biomimetic silk fibroin/chitosan composite nanofibers by electrospinning for osteoblasts culture. *Nanoscale Res Lett.* 2012 Mar;7(1):170. doi: 10.1186/1556-276X-7-170.

Chen Z, Mo X, Qing F. Electrospinning of collagen–chitosan complex. *Mater Lett.* 2007 Jun;61(16):3490-4. doi: 10.1016/j.matlet.2006.11.104.

Chen ZG, Wang PW, Wei B, Mo XM, Cui FZ. Electrospun collagen–chitosan nanofiber: A biomimetic extracellular matrix for endothelial cell and smooth muscle cell. *Acta Biomater.* 2009 Jul;6(2):372-82. doi: 10.1016/j.actbio.2009.07.024.

Chung BG, Kang L, Khademhosseini A. Micro and nanoscale technologies for tissue engineering and drug discovery applications. *Exp Op Drug Disc.* 2007 Dec;2(12):1653-68. doi: 10.1517/17460441.2.12.1653.

Chung YC, Chen CY. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource technology.* 2008 May;99(8):2806-14. doi: 10.1016/j.biortech.2007.06.044.

Cook SD, Thomas KA, Kay JF, Jarcho M. Hydroxyapatite-coated porous titanium for use as an orthopedic biologic attachment system. *Clin Orthop Relat Res.* 1988 May(230):303-12. doi.

Croisier F, Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *Eur Polym J.* 2013 Apr;49(4):780-92. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009.

Deitzel JM, Kleinmeyer J, Harris D, Beck Tan NC. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and

textiles. *Polymer*. 2001 Jan;42(1):261-72. doi: 10.1016/S0032-3861(00)00250-0.

De Vrieze S, Van Camp T, Nelvig A, Hagström B, Westbroek P, De Clerck K. The effect of temperature and humidity on electrospinning. *J Mater Sci*. 2009 Mar;44(5):1357-62. doi: 10.1007/s10853-008-3010-6.

E. F. Lucas, B. G. Soares, Monteiro E. Caracterização de polímeros: Determinação de peso molecular e análise térmica: E-Papers; 2001.

Fan M, Hu Q, Shen K. Preparation and structure of chitosan soluble in wide pH range. *Carbohydr Polym*. 2009 Aug;78(1):66-71. doi: 10.1016/j.carbpol.2009.03.031.

Fan Y, Xiu K, Duan H, Zhang M. Biomechanical and histological evaluation of the application of biodegradable poly-L-lactic cushion to the plate internal fixation for bone fracture healing. *Clinical biomechanics*. 2008 Mar;23 Suppl 1:S7-S16. doi: 10.1016/j.clinbiomech.2008.01.005.

Feng L, Li S, Li H, Zhai J, Song Y, Jiang L, et al. Super-hydrophobic surface of aligned polyacrylonitrile nanofibers. *Angew Chem Int Ed*. 2002 April;41(7):1221-3. doi: 10.1002/1521-3773(20020402)41:7<1221::AID-ANIE1221>3.0.CO;2-G.

Fong H, Chun I, Reneker DH. Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer*. 1999 Jul;40(16):4585-92. doi: 10.1016/S0032-3861(99)00068-3.

Foster LJR, Ho S, Hook J, Basuki M, Marçal H. Chitosan as a biomaterial: Influence of degree of deacetylation on its physiochemical, material and biological properties. *PLoS ONE*. 2015 Aug;10(8):e0135153. doi: 10.1371/journal.pone.0135153.

Frame JW, Rout PGJ, Browne RM. Ridge augmentation using solid and porous hydroxylapatite particles with and without autogenous bone or plaster. *J Oral Maxillofac Surg*. 1987 Sep;45(9):771-7. doi: 10.1016/0278-2391(87)90200-X.

Freier T, Koh HS, Kazazian K, Shoichet MS. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by n-acetylation. *Biomaterials*. 2005 Oct;26(29):5872-8. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.033.

Frenot A, Chronakis IS. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 2003 March;8(1):64-75. doi: 10.1016/S1359-0294(03)00004-9.

Galler KM, D'Souza RN, Hartgerink JD. Biomaterials and their potential applications for dental tissue engineering. *J Mater Chem*. 2010 Sep;20(40):8730-46. doi: 10.1039/C0JM01207F.

Gopalan Nair K, Dufresne A. Crab shell chitin whisker reinforced natural rubber nanocomposites. 1. Processing and swelling behavior. *Biomacromolecules*. 2003 May;4(3):657-65. doi: 10.1021/bm020127b.

Greiner A, Wendorff JH. Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angewandte Chemie*. 2007 Jun;46(30):5670-703. doi: 10.1002/anie.200604646.

Grove GL, Grove MJ, Leyden JJ. Optical profilometry: An objective method for quantification of facial wrinkles. *J Am Acad Dermatol*. 1989 Sep;21(3 Pt 2):631-7. doi: 10.1016/S0190-9622(89)70230-9.

Guimarães C. Espectroscopia raman e infravermelho na molécula (4E)-4(E)-3-fenilalilidenomanino)-1,2-dihidro-2,3-dimetil-1-5-ona. [dissertação]. Cuiabá (MT): Universidade Federal de Mato Grosso; 2011.

Habraken WJEM, Wolke JGC, Jansen JA. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007 May;59(4-5):234-48. doi: 10.1016/j.addr.2007.03.011.

Hadipour-Goudarzi E, Montazer M, Latifi M, Aghaji AAG. Electrospinning of chitosan/sericin/PVA nanofibers incorporated with in situ synthesis of nano silver. *Carbohydr Polym*. 2014 Nov;113:231-9. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.06.082.

Hammerle CH, Jung RE. Bone augmentation by means of barrier membranes [review]. *Periodontol* 2000. 2003 Aug;33:36-53. doi: 10.1046/j.0906-6713.2003.03304.x.

Hasegawa M, Isogai A, Onabe F, Usuda M, Atalla RH. Characterization of cellulose–chitosan blend films. *J Appl Polym Sci*. 1992 Aug;45(11):1873-9. doi: 10.1002/app.1992.070451101.

Hiraoka S. What do we learn from the molecular self-assembly process? *Chemical record*. 2015 Aug. doi: 10.1002/tcr.201510005.

Homayoni H, Ravandi SAH, Valizadeh M. Electrospinning of chitosan nanofibers: processing optimization. *Carbohydr Polym*. 2009 Jul;77(3):656-61. doi: 10.1016/j.carbpol.2009.02.008.

Huang Z-M, Zhang Y-Z, Kotaki M, Ramakrishna S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos Sci Technol*. 2003 Nov;63(15):2223-53. doi: 10.1016/S0266-3538(03)00178-7.

Hutmacher DW, Schantz JT, Lam CX, Tan KC, Lim TC. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007 Jun;1(4):245-60. doi: 10.1002/term.24.

Hwang J, Jeong Y, Park JM, Lee KH, Hong JW, Choi J. Biomimetics: Forecasting the future of science, engineering, and medicine. *International Journal of Nanomedicine*. 2015 Sep;10:5701-13. doi: 10.2147/IJN.S83642.

Ifuku S. Chitin and chitosan nanofibers: Preparation and chemical modifications. *Molecules*. 2014 Nov;19(11):18367. doi: 10.3390/molecules191118367.

Jarcho M. Retrospective analysis of hydroxyapatite development for oral implant applications. *Dent Clin North Am*. 1992 Jan;36(1):19-26. doi.

Jayaraman K, Kotaki M, Zhang Y, Mo X, Ramakrishna S. Recent advances in polymer nanofibers. *J Nanosci Nanotechnol*. 2004 Jan;4(1-2):52-65. doi: 10.1166/jnn.2004.078.

Jevtić M, Radulović A, Ignjatović N, Mitrić M, Uskoković D. Controlled assembly of poly(D,L-lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite core-shell nanospheres under ultrasonic irradiation. *Acta Biomater.* 2009 Jan;5(1):208-18. doi: 10.1016/j.actbio.2008.07.026.

Jiang H, Fang D, Hsiao BS, Chu B, Chen W. Optimization and characterization of dextran membranes prepared by electrospinning. *Biomacromolecules.* 2004 Jan;5(2):326-33. doi: 10.1021/bm034345w.

Joachim C. Drawing a single nanofibre over hundreds of microns. *Europhys Lett.* 1998 Feb;42(2):215. doi: 10.1209/epl/11998-00233-9.

Juárez J, Taboada P, Valdez MA, Mosquera V. Self-assembly process of different poly(oxystyrene)-poly(oxyethylene) block copolymers: spontaneous formation of vesicular structures and elongated micelles. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids.* 2008 Jul;24(14):7107-16. doi: 10.1021/la8004568.

Kim SJ, Shin SR, Kim NG, Kim SI. Swelling behavior of semi-interpenetrating polymer network hydrogels based on chitosan and poly (acryl amide). *J Macromol Sci, Pure Appl Chem.* 2005 Feb;42(8):1073-83. doi: 10.1081/MA-200065934.

Kim T-H, Jiang H-L, Jere D, Park I-K, Cho M-H, Nah J-W, et al. Chemical modification of chitosan as a gene carrier in vitro and in vivo. *Prog Polym Sci.* 2007 Jul;32(7):726-53. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.001.

Kim W, Saito F. Sonochemical synthesis of hydroxyapatite from H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> solution with Ca(OH)<sub>2</sub>. *Ultrasonics Sonochemistry.* 2001 April;8(2):85-8. doi: 10.1016/S1350-4177(00)00034-1.

Kingsley DJ, Shivendu R, Nandita D, Proud S. Nanotechnology for tissue engineering: Need, techniques and applications. *Journal of Pharmacy Research.* 2013 Feb;7(2):200-4. doi: 10.1016/j.jopr.2013.02.021.

Kong L, Gao Y, Lu G, Gong Y, Zhao N, Zhang X. A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Eur Polym J.* 2006 Dec;42(12):3171-9. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2006.08.009.

Kumar MN, Muzzarelli RA, Muzzarelli C, Sashiwa H, Domb AJ. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem Rev.* 2004 Dec;104(12):6017-84. doi: 10.1021/cr030441b.

Kwok DY, Neumann AW. Contact angle measurement and contact angle interpretation. *Adv Colloid Interface Sci.* 1999 Sep;81(3):167-249. doi: 10.1016/S0001-8686(98)00087-6.

Leedy M, Martin H, Norowski PA, Jennings JA, Haggard W, Bumgardner J. Use of chitosan as a bioactive implant coating for bone-implant applications. In: Jayakumar R, Prabakaran M, Muzzarelli RAA, editors. *Chitosan for biomaterials II*. [Advances in Polymer Science. 244]. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 2011. p. 129-65.

Li L, Hsieh YL. Chitosan bicomponent nanofibers and nanoporous fibers. *Carbohydr Res.* 2006 Feb;341(3):374-81. doi: 10.1016/j.carres.2005.11.028.

Li W, Ding Y, Yu S, Yao Q, Boccaccini AR. Multifunctional chitosan-45s5 bioactive Glass-Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) microsphere composite membranes for guided tissue/bone regeneration. *ACS Applied Materials & Interfaces.* 2015 Sep;7(37):20845-54. doi: 10.1021/acsami.5b06128.

Lim C, Tan E, Ng S. Effects of crystalline morphology on the tensile properties of electrospun polymer nanofibers. *Appl Phys Lett.* 2008 Apr;92(14):141908. doi: 10.1063/1.2857478.

Lima MSP. Preparo e caracterização de membranas de quitosana modificadas com poli(ácido acrílico) [dissertação]. Natal (RN): Universidade do Rio Grande do Norte; 2006.

Lin J, Wang X, Ding B, Yu J, Sun G, Wang M. Biomimicry via electrospinning. *Crit Rev Solid State Mater Sci.* 2012 Jun;37(2):94-114. doi: 10.1080/10408436.2011.627096.

Liu Y, Liu Y, Liao N, Cui F, Park M, Kim H-Y. Fabrication and durable antibacterial properties of electrospun chitosan nanofibers with silver nanoparticles. *Int J Biol Macromol.* 2015 Jun;79:638-43. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.05.058.

Lyons J, Li C, Ko F. Melt-electrospinning part i: Processing parameters and geometric properties. *Polymer*. 2004 Oct;45(22):7597-603. doi: 10.1016/j.polymer.2004.08.071.

Ma PX, Zhang R. Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix. *J Biomed Mater Res*. 1999 Jul;46(1):60-72. doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(199907)46:1<60::AID-JBM7>3.0.CO;2-H.

Ma S, Chen Z, Qiao F, Sun Y, Yang X, Deng X, et al. Guided bone regeneration with tripolyphosphate cross-linked asymmetric chitosan membrane. *J Dent*. 2014 Dec;42(12):1603-12. doi: 10.1016/j.jdent.2014.08.015.

Madhally SV, Matthew HW. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 1999 Jun;20(12):1133-42. doi: 10.1016/S0142-9612(99)00011-3.

Malette WG, Quigley HJ, Gaines RD, Johnson ND, Rainer WG. Chitosan: A new hemostatic. *Ann Thorac Surg*. 1983 Jul;36(1):55-8. doi: 10.1016/S0003-4975(10)60649-2.

Martin CR. Membrane-based synthesis of nanomaterials. *Chem Mater*. 1996 Aug;8(8):1739-46. doi: 10.1021/cm960166s.

McCormick AM, Jarmusik NA, Leipzig ND. Co-immobilization of semaphorin3A and nerve growth factor to guide and pattern axons. *Acta Biomater*. 2015 Dec. doi: 10.1016/j.actbio.2015.09.022.

Meejoo S, Maneeprakorn W, Winotai P. Phase and thermal stability of nanocrystalline hydroxyapatite prepared via microwave heating. *Thermochim Acta*. 2006 Aug;447(1):115-20. doi: 10.1016/j.tca.2006.04.013.

Mehrasa M, Asadollahi MA, Ghaedi K, Salehi H, Arpanaei A. Electrospun aligned plga and plga/gelatin nanofibers embedded with silica nanoparticles for tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2015 Aug;79:687-95. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.05.050.

Melcher J, Taylor G. Electrohydrodynamics: A review of the role of interfacial shear stresses. *Annu Rev Fluid Mech*. 1969 Jan;1(1):111-46. doi: 10.1146/annurev.fl.01.010169.000551.

Mendes LC, Ribeiro GL, Marques RC. In situ hydroxyapatite synthesis: Influence of collagen on its structural and morphological characteristic. *Mater Sci Appl.* 2012 Aug;3(8):580-6. doi: 10.4236/msa.2012.38083.

Moore GK, Roberts GA. Determination of the degree of n-acetylation of chitosan. *Int J Biol Macromol.*2(2):115-6. doi.

Morgado DL. Biocompósitos a partir de celulose de linter: Filmes de acetatos de celulose/celulose e quitosana/celulose [tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2009.

Murugan R, Ramakrishna S. Nano-featured scaffolds for tissue engineering: a review of spinning methodologies. *Tissue engineering.* 2006 Mar;12(3):435-47. doi: 10.1089/ten.2006.12.435.

Najjar TA, Lerdrin W, Parsons JR. Enhanced osseointegration of hydroxylapatite implant material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991 Jan;71(1):9-15. doi.

Neto CGT, Giacometti JA, Job AE, Ferreira FC, Fonseca JLC, Pereira MR. Thermal analysis of chitosan based networks. *Carbohydrate Polymers.* 2005 Nov;62(2):97-103. doi: 10.1016/j.carbpol.2005.02.022.

Nga NK, Giang LT, Huy TQ, Viet PH, Migliaresi C. Surfactant-assisted size control of hydroxyapatite nanorods for bone tissue engineering. *Colloids Surf., B.* 2014 Apr;116:666-73. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.11.001.

Ohkawa K, Cha D, Kim H, Nishida A, Yamamoto H. Electrospinning of chitosan. *Macromol Rapid Commun.* 2004 Sep;25(18):1600-5. doi: 10.1002/marc.200400253.

Paschalis E, Zhao Q, Tucker B, Mukhopadhyay S, Bearcroft J, Beals N, et al. Degradation potential of plasma-sprayed hydroxyapatite-coated titanium implants. *J Biomed Mater Res.* 1995 Dec;29(12):1499-505. doi: 10.1002/jbm.820291206.

Pavinatto FJ, Caseli L, Oliveira ON. Chitosan in nanostructured thin films [review]. *Biomacromolecules*. 2010 Jun;11(8):1897-908. doi: 10.1021/bm1004838.

Piecuch JF, Goldberg AJ, Shastry CV, Chrzanowski RB. Compressive strength of implanted porous replamineform hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res*. 1984 Jan;18(1):39-45. doi: 10.1002/jbm.820180106.

Ratto J, Hatakeyama T, Blumstein RB. Differential scanning calorimetry investigation of phase transitions in water/ chitosan systems. *Polymer*. 1995;36(15):2915-9. doi: 10.1016/0032-3861(95)94340-Y.

Reneker DH, Chun I. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology*. 1996 Sep;7(3):216-23. doi: 10.1088/0957-4484/7/3/009.

Rodrigues ADG, Galzerani JC. Espectroscopias de infravermelho, raman e de fotoluminescência: Potencialidades e complementaridades. *Rev Bras Ens Fis*. 2012 Dez;34:1-9. doi: 10.1590/S1806-11172012000400009.

Rogovina S, Akopova T, Vikhoreva G, Gorbacheva I. Solid state production of cellulose–chitosan blends and their modification with the diglycidyl ether of oligo (ethylene oxide). *Polym Degrad Stab*. 2001 Jan;73(3):557-60. doi: 10.1016/S0141-3910(01)00141-0.

Saga Y, Miyatake T, Tamiaki H. Self-assembly of synthetic zinc chlorins in a silicate micelle prepared by sol-gel process. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. Apr 22;12(8):1229-31. doi: 10.1016/S0960-894X(02)00108-7.

Sala O. Fundamentos da espectroscopia raman e no infravermelho: UNESP; 1996. 223 p.

Sangsanoh P, Supaphol P. Stability improvement of electrospun chitosan nanofibrous membranes in neutral or weak basic aqueous solutions. *Biomacromolecules*. 2006 Sep;7(10):2710-4. doi: 10.1021/bm060286l.

Sanosh K, Chu M-C, Balakrishnan A, Lee Y-J, Kim T, Cho S-J. Synthesis of nano hydroxyapatite powder that simulate teeth particle morphology and composition. *Curr Appl Phys*. 2009 Nov;9(6):1459-62. doi: 10.1016/j.cap.2009.03.024.

Shahzad S, Yar M, Siddiqi SA, Mahmood N, Rauf A, Qureshi ZU, et al. Chitosan-based electrospun nanofibrous mats, hydrogels and cast films: Novel anti-bacterial wound dressing matrices. *J Mater Sci Mater Med*. 2015 Mar;26(3):136. doi: 10.1007/s10856-015-5462-y.

Shin SY, Park HN, Kim KH, Lee MH, Choi YS, Park YJ, et al. Biological evaluation of chitosan nanofiber membrane for guided bone regeneration. *Journal of periodontology*. 2015 Oct;76(10):1778-84. doi: 10.1902/jop.2005.76.10.1778.

Simion M, Scarano A, Gionso L, Piattelli A. Guided bone regeneration using resorbable and nonresorbable membranes: a comparative histologic study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996 Jun;11(6):735-42.

Sionkowska A. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. *Prog Polym Sci*. 2011 Sep;36(9):1254-76. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.05.003.

Sudarshan NR, Hoover DG, Knorr D. Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnol*. 2009 Dec;6(3):257-72. doi: 10.1080/08905439209549838.

Sun Y, Scarabelli L, Kotov N, Tebbe M, Lin XM, Brullot W, et al. Field-assisted self-assembly process: general discussion. *Faraday discussions*. 2015 Jul;181:463-79. doi: 10.1039/C5FD90041G.

Takahashi T, Takayama K, Machida Y, Nagai T. Characteristics of polyion complexes of chitosan with sodium alginate and sodium polyacrylate. *Int J Pharm*. 1990 Jun;61(1-2):35-41. doi: 10.1016/0378-5173(90)90041-2.

Tanahashi M, Kamiya K, Suzuki T, Nasu H. Fibrous hydroxyapatite grown in the gel system: Effects of ph of the solution on the growth rate and morphology. *J Mater Sci Mater Med*. 1992 Jan;3(1):48-53. doi: 10.1007/BF00702944.

Taşkın P, Canısağ H, Şen M. The effect of degree of deacetylation on the radiation induced degradation of chitosan. *Radiat Phys Chem.* 2014 Jan;94:236-9. doi: 10.1016/j.radphyschem.2013.04.007.

Tavakol S, Nikpour MR, Amani A, Soltani M, Rabiee SM, Rezayat SM, et al. Bone regeneration based on nano-hydroxyapatite and hydroxyapatite/chitosan nanocomposites: An in vitro and in vivo comparative study. *J Nanopart Res.* 2012 Dec;15(1):1-16. doi: 10.1007/s11051-012-1373-8.

Toriyama M, Ravaglioli A, Krajewski A, Celotti G, Piancastelli A. Synthesis of hydroxyapatite-based powders by mechano-chemical method and their sintering. *J Eur Ceram Soc.* 1996 Aug;16(4):429-36. doi: 10.1016/0955-2219(95)00123-9.

Tripatanasuwan S, Zhong Z, Reneker DH. Effect of evaporation and solidification of the charged jet in electrospinning of poly(ethylene oxide) aqueous solution. *Polymer.* 2007 Sep;48(19):5742-6. doi: 10.1016/j.polymer.2007.07.045.

Tucker N, Stanger JJ, Staiger MP, Razzaq H, Kathleen H. The history of the science and technology of electrospinning from 1600 to 1995. *J Eng Fiber Fabr.* 2012 Jul;7(2):63-73. doi.

Velasco MA, Narvaez-Tovar CA, Garzon-Alvarado DA. Design, materials, and mechanobiology of biodegradable scaffolds for bone tissue engineering. *Biomed Res Int.* 2015 Mar;2015:21. doi: 10.1155/2015/729076.

Wang W, Itoh S, Yamamoto N, Okawa A, Nagai A, Yamashita K. Enhancement of nerve regeneration along a chitosan nanofiber mesh tube on which electrically polarized  $\beta$ -tricalcium phosphate particles are immobilized. *Acta Biomater.* 2010 Oct;6(10):4027-33. doi: 10.1016/j.actbio.2010.04.027.

Weiner S, Wagner HD. The material bone: Structure-mechanical function relations. *Annu Rev Mater Sci.* 1998 Aug;28(1):271-98. doi: 10.1146/annurev.matsci.28.1.271.

Wenling C, Duohui J, Jiamou L, Yandao G, Nanming Z, Xiufang Z. Effects of the degree of deacetylation on the physicochemical

properties and schwann cell affinity of chitosan films. *J Biomater Appl.* 2005 Oct;20(2):157-77. doi: 10.1177/0885328205049897.

Wijs FL, de Putter C, de Lange GL, de Groot K. Local residual ridge augmentation with solid hydroxyapatite blocks: Part ii - correction of local resorption defects in 50 patients. *The Journal of prosthetic dentistry.* 1993 May;69(5):514-9. doi: 10.1016/0022-3913(93)90162-H.

Wijs FL, de Putter C, de Lange GL, de Groot K. Local residual ridge augmentation with solid hydroxyapatite blocks: Part i- an animal experiment. *The Journal of prosthetic dentistry.* 1993 May;69(5):510-3. doi: 10.1016/0022-3913(93)90161-G.

Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials.* 2008 Jul;29(20):2941-53. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.023.

Williams DF. On the nature of biomaterials. *Biomaterials.* 2009 Oct;30(30):5897-909. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.07.027.

Wu Y, Feng S, Zan X, Lin Y, Wang Q. Aligned electroactive tmv nanofibers as enabling scaffold for neural tissue engineering. *Biomacromolecules.* 2015 Nov;16(11):3466-72. doi: 10.1021/acs.biomac.5b00884.

Xing X, Wang Y, Li B. Nanofibers drawing and nanodevices assembly in poly (trimethylene terephthalate). *Opt Express.* 2008 Jul;16(14):10815-22. doi: 10.1364/OE.16.010815.

Yamaguchi K, Hirano T, Yoshida G, Iwasaki K. Degradation-resistant character of synthetic hydroxyapatite blocks filled in bone defects. *Biomaterials.* 1995 Sep;16(13):983-5. doi: 10.1016/0142-9612(95)94905-Z.

Yamasaki N, Kai T, Nishioka M, Yanagisawa K, Ioku K. Porous hydroxyapatite ceramics prepared by hydrothermal hot-pressing. *J Mater Sci Lett.* 1990 Oct;9(10):1150-1. doi: 10.1007/BF00721872.

Zhou H, Lee J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 2011 July;7(7):2769-81. doi: 10.1016/j.actbio.2011.03.019.