CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS





Dissertação de Mestrado

Carolina Righi Araújo

NANOFIBRAS DE ACETATO DE CELULOSE COM MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO PARA POTENCIAL APLICAÇÃO COMO SCAFFOLDS NA ENGENHARIA DE TECIDOS

Belo Horizonte JUNHO de 2021 Carolina Righi Araújo

NANOFIBRAS DE ACETATO DE CELULOSE COM MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO PARA POTENCIAL APLICAÇÃO COMO *SCAFFOLDS* NA ENGENHARIA DE TECIDOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais do CEFET-MG, na Linha de Pesquisa em Seleção, Processamento e Caracterização, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais.

Orientadora: Profa. Dra. Aline Bruna da Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Danielle Marra de Freitas Silva Azevedo

Belo Horizonte JUNHO de 2021

A663n	Araújo, Carolina Righi. Nanofibras de acetato de celulose com micropartículas de alginato para potencial aplicação como scaffolds na engenharia de tecidos / Carolina Righi Araújo. – 2021. 135 f. : il.
	Orientadora: Aline Bruna da Silva Coorientadora: Danielle Marra de Freitas Silva Azevedo
	Dissertação (Mestrado) – Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais, Belo Horizonte, 2021. Bibliografia.
	1. Acetato de celulose. 2. Alginatos. 3. Eletrofiação. 4. Materiais nanoestruturados. I. Da Silva, Aline Bruna. II. Azevedo, Danielle Marra de Freitas Silva. III. Título
	CDD: 620.5

Ficha elaborada pela Biblioteca - Campus I – CEFET-MG Bibliotecário: Wagner Oliveira Braga CRB6 - 3261



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MATERIAIS - NS



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 12/2021 - POSMAT (11.52.07)

Nº do Protocolo: 23062.029147/2021-95

Belo Horizonte-MG, 24 de junho de 2021.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

"NANOFIBRAS DE ACETATO DE CELULOSE COM MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO PARA POTENCIAL APLICAÇÃO COMO SCAFFOLDS NA ENGENHARIA DE TECIDOS"

Autora: Carolina Righi Araújo

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Aline Bruna da Silva

Coorientadora: Prof.ª Dr.ª Danielle Marra de Freitas Silva Azevedo

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:

Prof.^a Dr.^a Aline Bruna da Silva (ORIENTADORA) Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET/MG

Prof.^a Dr.^a Danielle Marra de Freitas Azevedo (COORIENTADORA) Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET/MG

Prof. Dr. João Paulo Ferreira Santos (EXAMINDOR INTERNO) Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET-MG

Prof.^a Dr.^a Patrícia Santiago de Oliveira Patrício (EXAMINADORA EXTERNA) Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET-MG

(Assinado digitalmente em 25/06/2021 16:20) ALINE BRUNA DA SILVA PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO DEMAT (11.55.06) Maricula: 2144062 (Assinado digitalmente em 25/06/2021 16:37) DANIELLE MARRA DE FREITAS SILVA AZEVEDO DIRETOR - TITULAR DIRGAD (11.31) Maricula: 1877239

(Assinado digitalmente em 28/06/2021 07:49) JOAO PAULO FERREIRA SANTOS PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO DEMAT (11.55.06) Maricula: 3057920 (Assinado digitalmente em 30/06/2021 15:59) PATRICIA SANTIAGO DE OLIVEIRA PATRICIO PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO DEQUI(1.55.09) Marricula: 2659830

Para verificar a autenticidade deste documento entre em https://sig.cefetmg.br/public/documentos/index.jsp informando seu número: 12, ano: 2021, tipo: ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO, data de emissão: 24/06/2021 e o código de verificação: caee983ef2

Aos meus pais

e a minha madrinha Ariete.

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora Aparecida por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Agradeço aos meus pais Ariadna e Júlio, com imensa gratidão, pelo carinho, incentivo e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

Agradeço toda minha família, minhas madrinhas Lúcia, Ariene e Ariete, meu padrinho Ronald, meus primos Igor e Arthur e ao João e ao Moizes pelo carinho, torcida e força transmitidas durante essa fase.

Eu gostaria de agradecer, em especial, a Prof. Dra. Ariete Righi, pelo incentivo durante o mestrado, me orientando, corrigindo e transmitindo um grande conhecimento e experiência profissional. Obrigada pelo suporte nesse trabalho.

Agradeço aos Profs. Roberto Luiz Moreira e Rodrigo Gribel Lacerda, do Departamento de Física da UFMG, pelo suporte e auxílio nas análises de FTIR e TGA.

Agradeço ao meu amigo e técnico Jorge W. Barbosa pelas excelentes imagens obtidas pelo MEV e pela paciência em verificar minhas amostras e as filhas das minhas amostras.

Agradeço aos profissionais da saúde Dra. Cybele G. Chaves, Dra. Daniela A. Machado, Júlia S. Machado, Hugo Fábio Souza e Dr. Rafael A. Carvalho por me ajudarem a manter o equilíbrio e a calma nesse momento.

Agradeço aos meus amigos pela torcida e carinho.

Eu gostaria de agradecer às companheiras de laboratório Ludimilla Barbosa, Rafaela Dueles e Raíssa R. L. Machado por trocarem conhecimentos durante essa jornada.

Agradeço às professoras Aline Bruna da Silva e Danielle Marra F.S. Azevedo pela oportunidade em vivenciar um curso de pós-graduação do DEMAT.

Agradeço a secretária do programa de pós-graduação em Engenharia de Materiais, Caroline Fernandes, pela ajuda nas atividades burocráticas.

Agradeço às agências de fomento CNPq, FAPEMIG e CAPES.

Agradeço ao CEFET-MG, ao corpo docente, direção e administração do DEMAT que oportunizam a janela para que hoje eu vislumbre um título de mestre.

"Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De qualquer maneira você chega lá."

Ayrton Senna

RESUMO

Mantas de nanofibras de acetato de celulose (AC) possuem grande potencial para aplicação como scaffold, na Engenharia de Tecidos. Entretanto, algumas limitações precisam ser superadas, dentre elas, a baixa infiltração celular no interior de mantas de nanofibras eletrofiadas e a composição química que favoreça a interação biomaterial/células para geração do tecido vivo. Dessa forma, esse trabalho propôs a modificação da superfície das nanofibras poliméricas de AC com partículas de alginato, por meio da combinação das técnicas de eletrofiação e electrospray, com objetivo de criar uma superfície com características químicas mais similares à matriz extracelular (MEC). Os parâmetros de processo e as características das soluções para obtenção de nanofibras de AC e partículas de alginato foram estudados separadamente. Posteriormente, foram realizadas adaptações no equipamento de eletrofiação, para a produção de nanofibras e nanopartículas em um único processo, produzindo um material híbrido. A caracterização morfológica das nanoestruturas obtidas foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura, a caracterização química por Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier, a propriedade térmica foi avaliada por Análise Termogravimétrica e a hidrofilicidade foi avaliada a partir do teste de intumescimento em meio líquido. As nanofibras de AC produzidas pela técnica de eletrofiação apresentaram morfologia cilíndrica e alongada com diâmetros no valor em torno de 181 nm. As partículas de alginato reticuladas apresentaram dimensões variadas. Para a vazão de 7,2 mL/h e para as distâncias de 6 e 8 cm, observou-se que as faixas de diâmetro das partículas foram, respectivamente, de 171 ± 29 a 234 ± 48 nm e 146 ± 27 a 253 ± 54 nm. As mantas de NFAC recobertas com partículas de alginato reticuladas apresentam diâmetros em torno de 218 nm, variando o diâmetro médio de 143 a 291 nm. Verificou-se que as mantas de nanofibras de acetato de celulose recobertas com partículas de alginato reticuladas (NFAC/ALG-R) apresentaram maior intumescimento em comparação com as NFAC puras, apresentando uma porcentagem de absorção de água na faixa de 250 a 450%. Esse efeito da adição de alginato nas NFAC é interessante para o cultivo *in vitro* de alguns tipos celulares que necessitam de um material hidrofílico para melhor adesão e proliferação celular.

Palavras-chaves: Acetato de celulose, alginato, eletrofiação, *electrospray*, modificação de nanofibras.

ABSTRACT

Cellulose acetate (CA) nanofiber blankets have great potential for application as scaffolding in Tissue Engineering. However, some needs need to be overcome, among them, the low cellular infiltration inside the electrospun nanofiber mats and a chemical composition that favors an interaction of biomaterial / cells for the generation of living tissue. Thus, this work proposed the modification of the surface of polymeric AC nanofibers with alginate particles, through the combination of electrospinning and electrospray techniques, to create a surface with characteristics similar to the extracellular matrix (ECM). The process parameters and characteristics of the solutions for obtaining CA nanofibers and alginate particles were studied. Later, adaptations were carried out in the electrospinning equipment to produce nanofibers and nanoparticles in a single process, producing a hybrid material. The morphological characterization of the basic nanostructures was performed by Scanning Electron Microscopy, the chemical characterization by Infrared Spectroscopy with Fourier transform, a thermal property was evaluated by Thermogravimetric Analysis and a hydrophilicity was evaluated by the liquid swelling test. CA nanofibers produced by electrospinning technique, cylindrical and elongated morphology with diameters around 181 nm. The crosslinked alginate particles variable dimensions of dimensions. For the flow rate of 7.2 mL / he for the distances of 6 and 8 cm, it was observed that the particle diameter ranges were, respectively, from 171 ± 29 to 234 ± 48 nm and 146 \pm 27 to 253 \pm 54 nm. The NFCA blankets covered with crosslinked alginate particles have diameters around 218 nm, with the average diameter varying from 143 to 291 nm. It was found that cellulose acetate nanofiber mats coated with cross-linked alginate particles (NFCA / ALG-R) dissipate greater swelling compared to pure NFCA, a percentage of water range in the range of 250 to 450%. This effect of adding alginate to NFCA is interesting for the in vitro culture of some cell types that are part of a hydrophilic material for better cell adhesion and proliferation.

Keyword: Cellulose acetate, alginate, eletrospinning, electrospray, modification of nanofibers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema ilustrativo das aplicações para Engenharia de Músculo
Esquelético
Figura 2 - Estrutura química da celulose33
Figura 3 - Estrutura química do acetato de celulose (AC)34
Figura 4 - Representação da configuração do aparato de eletrofiação37
Figura 5 - Ilustração esquemática da estrutura química do alginato
Figura 6 - Modelo "egg-box" proposto por Grant47
Figura 7 - Mecanismo de gelificação externa do alginato de sódio48
Figura 8 - Mecanismo de gelificação interna do alginato de sódio
Figura 9 - Técnica de extrusão-gotejamento para produção de partículas de alginato
reticuladas53
Figura 10 – Esquema do Processo de Electrospray
Figura 11 – Técnicas para coletar partículas no processo de <i>electrospray</i> 57
Figura 12 - Processos de Eletrofiação e Electrospray em placa (simultâneos)60
Figura 13 - Modelo de recobrimento das nanofibras de AC com micro/nanopartículas
de alginato reticuladas61
Figura 14 - Fluxogramas das caracterizações63
Figura 15 – Espectro de FTIR do acetato de celulose70
Figura 16 – Espectro de FTIR do alginato de sódio71
Figura 17 - Comparação entre os espectros de FTIR das matérias-primas AC e ALG
na faixa espectral de 2000 a 650 cm ⁻¹ 73
Figura 18 - Curvas de TGA e DTGA do acetato de celulose74
Figura 19 - Curvas de TGA e DTGA do alginato de sódio75
Figura 20 – Imagens de MEV e distribuições de diâmetros das NFAC produzidas na
distância de trabalho de 10 cm77
Figura 21 - Imagens de MEV e distribuições de diâmetro das NFAC produzidas na
distância de trabalho de 12 cm78
Figura 22 - Imagens de MEV e distribuições de diâmetro das NFAC produzidas na
distância de trabalho de 14 cm79
Figura 23 - Espectros de FTIR do acetato de celulose (AC) e das nanofibras de acetato
de celulose (NFAC)83
Figura 24 - Curvas de TGA e DTGA das NFAC84

Figura 25 – Imagens de MEV e distribuições de diâmetro para ALG-R produzidas com Figura 26 – Imagens de MEV e distribuições de diâmetro para ALG-R produzidas com Figura 27 – Imagens de MEV e distribuições de diâmetro para ALG-R produzidas com Figura 28 – Imagens de MEV e distribuições de diâmetro para ALG-R produzidas com Figura 29 – Imagens de MEV e distribuições de diâmetro para ALG-R produzidas com distância de trabalho de 6 cm e vazão da bomba de 7,2 mL/h.92 Figura 30 – Imagens de MEV e distribuições de diâmetro para ALG-R produzidas com Figura 32 – Imagens de MEV e distribuições de diâmetro para NFAC/ALG-R produzidas na tensão de 14 kV, vazão de 9,2 mL/h e distância de trabalho de ALG-R Figura 33 - Imagens de MEV e distribuições de diâmetro para NFAC/ALG-R produzidas na tensão de 15 kV, vazão de 9,2 mL/h e distância de trabalho de ALG-R Figura 34 - Imagens de MEV e distribuições de diâmetro para NFAC/ALG-R produzidas na tensão de 16 kV, vazão de 9,2 mL/h e distância de trabalho de ALG-R Figura 35 - Imagens de MEV e distribuições de diâmetro para NFAC/ALG-R produzidas na tensão de 16 kV, vazão de 9,2 mL/h e distância de trabalho de ALG-R Figura 36 - Imagens de MEV e distribuições de diâmetro para NFAC/ALG-R produzidas na tensão de 16 kV, vazão de 9,2 mL/h e distância de trabalho de ALG-R Figura 37 - Comparação dos diâmetros médios das mantas de NFAC/ALG-R em relação a distância de trabalho do ALG-R para os 3 valores de distância de trabalho do AC na tensão de 16 kV......104 Figura 38 - Imagens de MEV e distribuições de diâmetro para NFAC/ALG-R produzidas na tensão de 16 kV, vazão de 7,2 mL/h e distância de trabalho de ALG-R

Figura 39 - Imagens de MEV e distribuições de diâmetro para NFAC/ALG-R produzidas na tensão de 16 kV, vazão de 7,2 mL/h e distância de trabalho de ALG-R Figura 40 - Imagens de MEV e distribuições de diâmetro para NFAC/ALG-R produzidas na tensão de 16 kV, vazão de 7,2 mL/h e distância de trabalho de ALG-R Figura 41 - Imagens de MEV e distribuições de diâmetro para NFAC/ALG-R produzidas na tensão de 16 kV, vazão de 7,2 mL/h e distância de trabalho de ALG-R Figura 42 – Diagramas dos diâmetros médios das NFAC e das mantas de NFAC/ALG-R para as vazões de 9,2 e 7,2 mL/h, variando as distâncias de trabalho de AC (a-c) e ALG-R (d-f)......112 Figura 43 – Espectros de FTIR das NFAC, das ALG-R e das NFAC/ALG-R......113 Figura 44 - Curvas de TGA e DTGA das NFAC/ALG-R no intervalo de temperatura de Figura 45 - Teste de intumescimento referentes às NFAC, às partículas de ALG-R e

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros de distância de trabalho e tensão para a produção de NFAC.
64
Tabela 2 – Parâmetros variados para a produção de partículas de ALG-R66
Tabela 3 - Parâmetros de vazão da bomba, tensão e distâncias de trabalho para a
produção de NFAC recobertas com partículas de ALG-R68
Tabela 4 - Diâmetro médio das mantas de nanofibras, umidade relativa do ar,
temperatura e número de contas para variações de distância de trabalho e de tensão
analisadas80
Tabela 5 - Diâmetro médio das partículas de ALG-R para a vazão da bomba de 9,2
mL/h, variando a distância de trabalho e a tensão91
Tabela 6 - Diâmetro médio das partículas de ALG-R para a vazão da bomba de 7,2
mL/h, variando a distância de trabalho e a tensão94
Tabela 7 - Diâmetro médio das mantas de NFAC/ALG-R e número de contas para a
vazão de 9,2 mL/h e diferentes de distâncias de trabalho de AC e de ALG-R103
Tabela 8 - Diâmetro médio das mantas de NFAC/ALG-R e número de contas para a
vazão de 7,2 mL/h, tensão de 16 kV e diferentes distâncias de trabalho de AC e de
ALG-R

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AC Acetato de celulose
- ALG Alginato de sódio
- ALG-R Alginato de sódio reticulado com cloreto de cálcio
- CEFET-MG Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais
- CTNano Centro de Tecnologia em Nanomateriais e Grafeno
- DSC Calorimetria Diferencial de Varredura
- DTGA Derivada da Análise Termogravimétrica
- DMF N,N-Dimetilformamida
- ELP polipeptídeo do tipo elastina
- FTIR Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier
- GP grau de polimerização
- GS grau de substituição
- MEV Microscopia Eletrônica de Varredura
- NFAC Nanofibras de acetato de celulose
- NFAC/ALG-R Nanofibras de acetato de celulose recobertas com partículas de

alginato reticuladas

- ONU Organização das Nações Unidas
- PBS phosphate buffered saline (tampão fosfato-salino)
- PCL poli(ε -caprolactona)
- PEG poli(etilenoglicol)
- PEUU poli(ester-uretano)-co-ureia
- PLA poli(ácido láctico)
- PLLA poli(ácido L-láctico)
- PGA poli(ácido glicólico)
- PLGA poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
- PS poliestireno
- PU poliuretano
- TGA Análise Termogravimétrica
- UFMG Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1.	INT	RODUÇÃO	17
2.	ΟВ	JETIVOS	20
3.	FU	NDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3	.1.	SCAFFOLDS PARA A ENGENHARIA DE TECIDO MUSCULAR	21
		3.1.1. Engenharia de Tecidos e Scaffolds	21
		3.1.2. Engenharia de Tecido Muscular Esquelético	28
		3.1.3. Scaffolds baseados em mantas de nanofibras poliméricas	30
3	.2.	NANOFIBRAS DE ACETATO DE CELULOSE	33
		3.2.1. Processo de eletrofiação	36
		3.2.1.1. Processos para modificação da superfície de nanofibras polimério	as
		40	
3	.3.	ALGINATO	44
		3.3.1. Micro/nanopartículas de alginato reticuladas	46
		3.3.1.1. Técnicas para produção de partículas de alginato reticuladas	51
		3.3.1.1.1. Electrospray	54
		3.3.1.2. Aplicações das micro/nanopartículas de alginato reticuladas	na
		Engenharia de Tecidos	59
3	.4.	PROCESSOS PARA PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS DE ACETATO I	ЭE
С	ELU	JLOSE RECOBERTAS COM MICRO/NANOPARTÍCULAS DE ALGINA	ГО
R	ETI	CULADAS	60
3	.5.	SÍNTESE DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	61
4.	MA	TERIAIS E MÉTODOS	62
4	.1.	MATERIAIS	62
4	.2.	METODOLOGIA	62
		4.2.1. Caracterização físico-química das matérias-primas	63
		4.2.2. Produção e caracterização das nanofibras de acetato de celulo	se
		(NFAC)	64
		4.2.3. Produção e caracterização das partículas ALG-R	65
		4.2.4. Produção e caracterização das NFAC recobertas com partículas	de
		ALG-R produzidas pelas técnicas de eletrofiação e electrospray acopladas	67

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES70			
5.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MATÉRIAS-PRIMAS70			
5.2. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DAS NFAC76			
5.3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DAS MICRO/NANO			
PARTÍCULAS DE ALGINATO RETICULADAS (ALG-R)85			
5.3.1. Produção de partículas de alginato na vazão de 9,2 mL/h85			
5.3.2. Produção de partículas de alginato na vazão de 7,2 mL/h91			
5.4. CARACTERIZAÇÃO MORFOLOGÍCA E FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOFIBRAS			
DE AC COM PARTÍCULAS DE ALGINATO RETICULADAS (NFAC/ALG-R)96			
5.4.1. Produção de NFAC/ALG-R para a vazão de 9,2 mL/h96			
5.4.2. Produção de NFAC/ALG-R para a vazão de 7,2 mL/h105			
5.4.3. Comparação das mantas de NFAC/ALG-R com vazão de 9,2 mL e 7,2			
mL/h com as NFAC puras111			
5.4.3.1. Análise de FTIR113			
5.4.3.2. Análise térmica (TGA)114			
5.4.3.3. Teste de intumescimento115			
6. CONCLUSÃO117			
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA119			

1. INTRODUÇÃO

A Engenharia de Tecidos é um campo multidisciplinar que envolve engenharia de materiais, biologia e medicina, para criar tecidos e órgãos funcionais artificiais em laboratório (LANGER; VACANTI, 1993, TAN; SALTZMAN, 2004 DUTTA *et al.*, 2017). Um dos princípios da Engenharia de Tecidos é a utilização de uma estrutura tridimensional, que mimetiza fisicamente a matriz extracelular (MEC), denominada s*caffold* e fornece uma matriz temporária para interação e proliferação celular, permitindo a formação de um tecido vivo (TAN; SALTZMAN, 2004).

A MEC não só fornece um suporte mecânico para as células, mas também está envolvida na interação célula-célula e na proliferação, migração e diferenciação celular (LANGER; VACANTI, 1993; TAN; SALTZMAN, 2004). Assim é necessário produzir um *scaffold* a partir de biomateriais capazes de mimetizar, não apenas a morfologia da MEC, mas também sua composição química. A superfície do *scaffold* também desempenha um papel importante na cultura de células musculares. Em especial, materiais com superfície porosa e/ou com cargas positivas ou negativas têm mostrado boa adesão celular. Produtos naturais como quitosana, fibroína de seda e alginato têm sido amplamente aplicados na Engenharia de Tecidos Muscular, pois apresentam propriedades bioativas endógenas que são capazes de conectar as células e propiciar o crescimento celular (MIN *et al.*, 2004).

As células musculares para sua proliferação *in vitro* necessitam da presença de um *scaffold*, pois as células miosatélites somente se diferenciam e se maturam quando aderidas a uma superfície (CASSIDAY, 2018). Dessa forma, é indispensável para a evolução da área desenvolver *scaffolds* que adaptem de acordo com a finalidade da sua utilização e que proporcionem um ambiente favorável ao crescimento celular para grupos celulares específicos, como o caso das células musculares (WOO; CHEN; MA, 2011, GUPTA *et al.*, 2014; OSTROWSKA *et al.*, 2014, SUN *et al.*, 2014).

Os *scaffolds* baseados em mantas de nanofibras poliméricas apresentam características importantes, como área superficial e porosidade elevadas, interligação entre os poros, possibilidade de funcionalização e/ou modificação da superfície (KENRY; LIM, 2017), por exemplo, nanofibras de quitosana com alginato (LI *et al.*, 2005) e de acetato de celulose com quitosana (MUZZARELLI *et al.*, 1994). Por essas características, as nanofibras vêm sendo utilizadas com sucesso na área biomédica,

como materiais para liberação controlada de fármacos, curativos e estruturas mais promissoras para cultura de células e geração de tecidos vivos (LANGELAAN *et al.*, 2010).

Para a produção de mantas de nanofibras poliméricas pode-se utilizar diversos tipos de polímeros tanto naturais, quanto sintéticos. Nesse cenário, o acetato de celulose (AC) pode ser destacado por se tratar de um polímero semissintético, de origem natural e abundante. (PULS; WILSON; HÖLTER, 2011). Além disso, pode variar consideravelmente em termos de reatividade química e propriedades físicas, massa molecular e grau de polimerização (GP) proporcionando uma ampla gama de aplicação em fibras e plásticos (EDGAR, 2004). O AC é facilmente processado pela técnica de eletrofiação para obtenção de mantas de nanofibras (KONWARH; KARAK; MISRA, 2013).

A técnica de eletrofiação é simples e versátil, permite a obtenção de fibras de escala micro e nanométrica e a possibilidade do controle da morfologia da estrutura obtida (HAIDER; HAIDER; KANG, 2018). Entretanto, a utilização das mantas de nanofibras poliméricas, como suportes de crescimento celular, apresenta algumas limitações que precisam ser superadas. Dentre elas, destacam-se a baixa infiltração das células no interior dos scaffolds e a composição química que favoreça a interação biomaterial/células para geração do tecido in vitro ou in vivo (MIN et al., 2004; MO et al., 2004; VENUGOPAL et al., 2006; JIAO; CUI, 2007; EKAPUTRA et al., 2008). Embora os poros das estruturas de mantas de nanofibras sejam interconectados e a densidade de poros por unidade de volume seja alta, o tamanho real dos poros para as células infiltrarem e migrarem, em geral, é inferior ao tamanho da célula. (EKAPUTRA et al., 2008). Para melhorar o desempenho das mantas de nanofibras poliméricas na aplicação como scaffolds, também pode-se modificar suas superfícies, a fim de otimizar o desempenho durante a cultura celular. Essas modificações podem ser realizadas através de modificações química, biológica ou morfológica das mantas de nanofibras (GOPAL et al., 2007; JIAO; CUI, 2007).

As modificações nas mantas de nanofibras podem ser realizadas com polímeros naturais, como o alginato de sódio. O alginato (ALG) é um heteropolímero linear, formado pela repetição de duas unidades monoméricas de ácidos distintos: α-L-gulurônico (G) e β-D-manurônico (M) e classificado como um polímero mucoadesivo aniônico (GOMBOTZ; WEE, 2012). A técnica de *electrospray*, uma variação da técnica

de eletrofiação, permite a fabricação das partículas de alginato reticuladas de escala micro e nanométrica, também de forma simples.

Desta forma, neste trabalho propõe-se a produção de nanofibras poliméricas de acetato de celulose recobertas com partículas de alginato reticuladas por meio da combinação das técnicas de eletrofiação e *electrospray* para possível aplicação desse material como *scaffold* na Engenharia de Tecido Muscular.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi a produção e caracterização de nanofibras de acetato de celulose (AC) com superfície recoberta com micropartículas de alginato para potencial uso como *scaffold* na Engenharia de Tecido Muscular Esquelético. Os objetivos específicos do trabalho foram:

 Determinação das condições de processamento para obtenção de nanofibras de acetato de celulose pela técnica de eletrofiação;

 ✓ Determinação das condições de processamento para obtenção de partículas micro e nanométricas de alginato reticuladas pela técnica de *electrospray* em placa;

 ✓ Modificação do equipamento de eletrofiação para produção simultânea de fibras e partículas (técnica de eletrofiação e *electrospray* combinadas);

✓ Determinação das condições de processamento para obtenção das nanofibras de acetato de celulose com micropartículas de alginato reticuladas pela combinação das duas técnicas eletrofiação e *electrospray*;

 Caracterização das matérias-primas pelas seguintes técnicas: Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Análise Termogravimétrica (TGA);

 ✓ Caracterização das nanofibras de acetato de celulose e das micropartículas de alginato pelas seguintes técnicas: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Análise Termogravimétrica (TGA), Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Teste de Intumescimento;

 Comparação das propriedades físico-químicas e térmicas das nanofibras de AC puras com as nanofibras de AC com micropartículas de alginato.

3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. SCAFFOLDS PARA A ENGENHARIA DE TECIDO MUSCULAR

3.1.1. Engenharia de Tecidos e Scaffolds

A Engenharia de Tecidos é uma área interdisciplinar que surgiu no final da década de 1980 e tem como princípios a reparação e/ou regeneração de tecidos e órgãos danificados, assim como a produção de novos órgãos e tecidos em laboratórios (LANGER; VACANTI, 1993 e ZHAO *et al.*, 2018). Segundo a abordagem de Langer e Vacanti, a Engenharia de Tecidos tem como pilares o isolamento de células, a produção de novas moléculas e/ou substâncias indutoras de tecidos e obtenção de estruturas tridimensionais capazes de mimetizar a matriz extracelular (MEC), denominadas *scaffolds*. De maneira geral, os s*caffolds* são biomateriais sólidos, porosos, tridimensionais, projetados para desempenhar as seguintes funções:

- (i) promover interações célula/biomaterial, adesão celular e deposição da MEC;
- (ii) permitir o transporte de gases, nutrientes e fatores para a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular;
- (iii) biodegradar a uma taxa controlável, próxima à taxa de regeneração tecidual, sob as condições de cultura de interesse;
- (iv) provocar um grau mínimo de inflamação ou toxicidade *in vivo*.

Em resumo, a função dos s*caffolds* é mimetizar a MEC para permitir crescimento, diferenciação e proliferação das células. Eles devem apresentar uma boa adesão celular, um bom suporte de vascularização e uma boa perfusão do meio de cultura em seu interior, além de guiarem a diferenciação celular através das suas propriedades biomecânicas ou físicas (SPECHT *et al.*, 2018).

A adesão celular ocorre por meio das glicoproteínas integrais transmembranas (uma extremidade da molécula é exposta à superfície celular e a outra na área citoplasmática da célula). Essas moléculas são receptoras da superfície especializadas para reconhecer outras células e a elas aderirem, para construir os tecidos e órgãos. Além das glicoproteínas, as células possuem três grupos de estruturas conectivas: (1) estruturas que tem como objetivo de unir fortemente as células a outras células ou à matriz extracelular, como desmossomos e junções aderentes; (2) estruturas que promovem a vedação entre as células, como zônula oclusiva e (3) estruturas que estabelecem comunicação entre uma célula e outra, como nexos, junção comunicante ou *gap junction* (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2005).

A MEC é constituída por um complexo de inúmeras proteínas fibrosas embebidas em um gel hidrofílico de polissacarídeos associadas ou não a proteínas que se organizam formando uma rede. A matriz forma um substrato que fornece condições adequadas para o crescimento e diferenciação das células de vários tecidos. A matriz é composta por moléculas produzidas pelas células e que apresentam dois tipos: (a) moléculas proteicas alongadas que se agregam formando estruturas fibrosas, como colágeno e elastina e (b) os constituintes que se agregam mais não formam fibras, como as glicoproteínas alongadas (fibronectina e lamina) cuja função é realizar adesão entre a matriz, as células e as glicosaminoglicanas e proteoglicanas que formam um gel hidratado no qual estão imersos os outros componentes (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2005).

Vale ressaltar os diversos estudos da aplicação de *scaffolds* que apresentam a mesma função da MEC, por exemplo, na produção de vasos (SHINOKA T, IMAI Y, 2001), bexiga (ATALA *et al.*, 2006), vias aéreas (BAIGUERA; BIRCHALL; MACCHIARINI, 2010), uretra (RAYA-RIVERA *et al.*, 2011), válvulas cardíacas (CEBOTARI *et al.*, 2006), fígado (ORLANDO *et al.*, 2013), pele, cartilagens, ossos (WEINSTEIN-OPPENHEIMER *et al.*, 2010; SHEIKH *et al.*, 2015; BEDDOES *et al.*, 2016), dentre outros.

Entre os materiais aplicados na produção dos s*caffolds*, os mais usados são os polímeros sintéticos ou naturais, degradáveis ou não, dependendo da finalidade da aplicação (BOLDRIN *et al.*, 2008). Dentre os polímeros utilizados na fabricação de *scaffolds*, destacam-se os polímeros biodegradáveis que provêm de origem vegetal ou animal, como acetato de celulose, ácido hialurônico, alginato, colágeno, proteína da seda, fibrinogênio, quitosana e amido. Podem ser usados, também, os polímeros sintéticos, como poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), polietileno glicol (PEG), poli(ácido lático) (PLA) (PAVLOV *et al.*, 2004; ALMANY; SELIKTAR, 2005; YOO *et al.*, 2005; PRABHAKARAN; VATANKHAH; RAMAKRISHNA, 2013).

Alguns desses polímeros são aprovados pela *Food and Drug Administration* -FDA, Administração de Comidas e Remédios, para aplicações biomédicas, como é o caso do PLA e do PLGA. Além disso, existem polímeros que são comestíveis, como celulose, alginato, amido, quitosana, pectina, colágeno, gelatina e cera natural (SHIT; SHAH, 2014). Por serem comestíveis, esses polímeros são importantes para a produção de *scaffolds* na indústria de *clean meat,* uma das áreas em ascensão na Engenharia de Tecido Muscular (WASCHULIN; SPECHT, 2018; WILKS, 2018; BRYANT *et al.*, 2019; BRYANT; BARNETT, 2019). Os *scaffolds* podem ser produzidos por diversas técnicas e apresentam diferentes características físico-químicas e morfológicas. Algumas características são fundamentais para que eles desempenhem seu papel da Engenharia de Tecidos e serão apresentadas a seguir.

a) Propriedades de superfície

As propriedades de superfície do *scaffold* estão relacionadas à tensão superficial, a presença de carga, a composição química, a molhabilidade (relação de hidrofilicidade e hidrofobicidade), a rugosidade (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011) e a área de contato superficial. Essas características podem influenciar a adesão, a proliferação e a migração celular (BOYAN *et al.*, 1996), uma vez que a superfície do *scaffold* é o primeiro local de interação com as células e os tecidos circundantes. Dessa forma, é necessário que o *scaffold* facilite essa interação, apresentando uma grande área superficial para dar suporte ao maior número de células.

Os polímeros com baixa tensão superficial, tais como: poli(tetrafluoretileno) (PTFE), poliestireno (PS) e poliuretano (PU) repelem as células devido à pouca adsorção de proteínas na MEC, dificultando a adesão celular (LIH et al., 2015). Os polímeros hidrofílicos neutros, como poli(etilenoglicol) e polímeros que contêm grupos hidroxilas ou grupos oxietil, proporcionam uma elevada hidratação. Entretanto, essa hidratação impede a adsorção de proteínas impedindo uma boa aderência celular (CHEN; YAN; ZHENG, 2018). Em contraste, os polímeros com densidade de carga (positiva ou negativa) podem servir como bons agentes mucoadesivos, visto que as cargas favorecem a adesão da matriz (GOMBOTZ; WEE, 2012). Estudos comprovam que a membrana celular das células dos mamíferos apresentam moléculas com carga negativa, assim esses polímeros iônicos apresentam maior semelhança com a MEC (LI et al., 2005; CHEN; YAN; ZHENG, 2018). Estudos como os de Chen, Yan e Zheng (2018), sobre uso de polímeros carregados, mostram que os polianidridos são mais eficientes como agentes bioadesivos do que polímeros catiônicos ou até mesmo não iônicos. O alginato é um polímero natural aniônico hidrofílico, de origem vegetal, amplamente usado como hidrogel na Engenharia de Tecido Osseo. No estudo de Li e seus colaboradores (2005), osteoblastos foram cultivados na presença de um scaffold híbrido de quitosana com alginato. Esses pesquisadores observaram que as células

tiveram melhor proliferação em relação ao *scaffold* de quitosana pura, além de ocorrer a deposição de uma matriz calcificada para a produção do tecido ósseo e alto grau de biocompatibilidade (LI *et al.*, 2005).

A literatura também mostra a molhabilidade (relação de hidrofilicidade e hidrofobicidade) como um fator importante que influência a interação célula-material, pois controla a adsorção de proteínas essenciais na superfície do polímero. A molhabilidade pode ser afetada por grupos funcionais de superfície ou rugosidade do material, entre outros. Normalmente, a maioria das células animais preferem superfícies de hidrofilia moderada para adesão e crescimento celular (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011). Alves e seus colaboradores (2010) determinaram uma máxima aderência com ângulos de contato entre 40° e 60°. Outro estudo recente conduzido por Chen e seus colaboradores (2018), confirma que quando a superfície do material apresenta um caráter hidrofílico, maior será a quantidade de fibroblastos aderidos e espalhados pela superfície. As superfícies poliméricas superhidrofílicas (ângulo de contato abaixo de 5°) e superhidrofóbicas (ângulo de contato acima de 150°) não são favoráveis à fixação e ao crescimento celular.

Outra característica importante de superfície é a rugosidade da mesma, por exemplo, ranhuras ordenadas na superfície polimérica favorecem a proliferação e a migração celular. Além disso, o grau de alinhamento depende da profundidade e da largura das ranhuras, bem como da diversidade das células em estudo (ALVES *et al.*, 2010). A pesquisa de Wan e seus colaboradores (2005) aponta que fibroblastos não se alinham em superfícies com profundidade de ranhuras ou larguras abaixo de 35 e 100 nm, respectivamente.

Assim, vale ressaltar a importância de tratamentos na superfície dos *scaffolds*, a fim de adequá-los às condições necessárias para adesão, crescimento e diferenciação celular. As superfícies dos *scaffolds* podem ser alteradas usando a deposição de um filme fino ou de substâncias que modificam as suas propriedades físicas e químicas (SODHI, 1996). A modificação superficial está se tornando um método cada vez mais comum para melhorar a multifuncionalidade dos materiais. Por exemplo, a adição de biomoléculas, como peptídeos, insulina, quitosana, alginato (LI *et al.*, 2005), podem contribuir para melhorar a biocompatibilidade de *scaffolds* poliméricos, como demonstrado nos trabalhos de Almany e Seliktar (2005), Boldrin *et al.* (2006) e Konwarh *et al.* (2013). As biomoléculas podem ser adsorvidas

quimicamente por ligação covalente ou fisicamente por interações eletrostáticas (ELBERT; HUBBELL, 1996).

Nos últimos anos a estratégia de utilizar *scaffolds* híbridos vêm sendo estudada por permitir a melhoria das propriedades mecânicas sem afetar a biocompatibilidade (KONWARH; KARAK; MISRA, 2013). Segundo relatos de Boldrin e seus colaboradores (2006), os *scaffolds* de AC podem ser produzidos combinando outros polímeros, como a quitosana por exemplo, com o objetivo de aumentar a rigidez do *scaffold* e o fibrinogênio para permitir uma maior conexão com as células. A quitosana, além de melhorar a rigidez, apresenta uma superfície hidrofílica que melhora a adesão, a proliferação e a diferenciação celular. Outros estudos comprovaram também que a quitosana melhora a formação óssea tanto *in vitro* quanto *in vivo* (MUZZARELLI *et al.*, 1994; LI *et al.*, 2005).

Segundo Almany e Seliktar (2005), o polímero de PEG com fragmentos de fibrinogênio foi produzido com o objetivo de desenvolver um *scaffold* híbrido. O PEG foi selecionado em virtude de sua elevada biocompatibilidade e transição líquido-sólido controlada (gelificação) e o fibrinogênio por se tratar de um substrato natural para remodelação de tecidos e conter moléculas que aumentam a adesão celular. Esses autores mostraram que células musculares lisas da aorta bovina, em contato com o *scaffold* híbrido, apresentam a capacidade de penetrar proteoliticamente através do material e formar interconexões de redes celulares, aumentando a adesão celular em comparação ao *scaffold* apenas de PEG.

b) Porosidade e tamanho de poros

Os *scaffolds* devem apresentar alta porosidade e interconectividade entre os poros para permitir o crescimento celular, a migração uniforme das células, bem como facilitar a neovascularização do tecido (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011). Pavlov e seus colaboradores (2004) comprovaram que uma elevada porosidade é mais favorável à adesão celular. A eficiência de um *scaffold* está relacionada com a forma, a distribuição e o tamanho dos poros. Caso o tamanho dos poros seja inferior ao tamanho das células, poderá causar oclusão dos poros pelas células, impedindo a penetração celular e a produção de matriz extracelular. A falta de interconectividade dos poros afeta a transferência de nutrientes e oxigênio para o crescimento celular. Para garantir essa troca é ideal que a distância entre os poros seja em média de 200 µm (YANG *et al.*, 2001; SALGADO; COUTINHO; REIS, 2004;). O tamanho ideal de

poros para uma neovascularização eficaz é em torno de 5 μ m, para o crescimento de fibroblastos de 5 a 15 μ m, para o crescimento de hepatócitos de 20 μ m, para osteocondução de 200 a 350 μ m e para a regeneração da pele de mamíferos adultos de 20 a 125 μ m, conforme descrito no artigo de Dhandayuthapani e seus colaboradores (2011).

Na literatura há relatos de que o *scaffold* híbrido (com duas ou mais substâncias) pode apresentar um aumento no tamanho de poros, bem como uma alta porosidade em comparação ao *scaffold* puro. É o caso do trabalho realizado por Li e seus colaboradores (2005), que produziram um *scaffold* híbrido, a partir de uma solução de quitosana com alginato, que apresentou tamanho de poro entre 100-300 µm, sendo uma estrutura favorável para fixação celular e crescimento de tecido ósseo. Nesse estudo foi observado que a porosidade do *scaffold* híbrido aumentou em comparação ao *scaffold* de quitosana pura.

Um outro exemplo é o trabalho realizado por Pavlov e seus colaboradores (2004) que produziram uma blenda de amido de milho com o PLA, com o objetivo de equilibrar propriedades entre esses materiais, como biocompatibilidade, processabilidade e porosidade. A porosidade das blendas obtidas pelos autores foi cerca de 68%, dos quais 38% referiam-se aos poros interconectados. O procedimento utilizado para produção da blenda foi semelhante ao processo de extrusão, que foi adaptado para a produção de fibras por fiação por fusão.

c) <u>Biocompatibilidade do material</u>

A biocompatibilidade de um *scaffold* está relacionada sua capacidade de interagir com o substrato para apoiar a atividade celular, como os sistemas de sinalização molecular e mecânico (WILLIAMS, 2008), sem provocar efeitos indesejáveis locais ou sistêmicos (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011). Os fatores que determinam a biocompatibilidade do *scaffold* são a composição química e a área superficial. Essas características são definidas pela escolha do polímero, bem como pelo processo de síntese.

Diversos polímeros biodegradáveis, como PLA, PGA, PLGA, são amplamente utilizados para aplicações médicas, devido à sua biocompatibilidade. Além da escolha de um polímero com composição química compatível, é possível realizar tratamentos (físicos ou químicos) em sua superfície, a fim de otimizar a biocompatibilidade do biomaterial e suas propriedades mecânicas (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011). Min *et al.* (2015) produziram um *scaffold* de acetato de celulose para o cultivo de astrócitos. As células nervosas aderiram ao *scaffold* e as nanofibras não apresentaram toxicidade. Além disso, observou-se que a cultura com o AC não só manteve a viabilidade celular, como permitiu o aumento da densidade dos astrócitos. Estudos *in vivo* realizados por Li et al. (2005) mostraram que o *scaffold* híbrido de quitosana com alginato promoveu uma rápida vascularização e deposição de tecido conjuntivo e de MEC dentro da estrutura do *scaffold*, comprovando que houve uma boa compatibilidade do material com o meio biológico.

d) Propriedades mecânicas

A bioestabilidade dos *scaffolds* depende das propriedades mecânicas do material, tais como elasticidade e resistência à tração e à compreensão. Dessa forma, os *scaffolds* devem apresentar adequadas propriedades mecânicas que promovam a regeneração dos tecidos (NAIR; LAURENCIN, 2007).

Amruthwar e Janorkar (2013) investigaram as propriedades mecânicas do scaffold de colágeno puro e do scaffold híbrido de colágeno com polipeptídio do tipo elastina (ELP). Observou-se um aumento significativo da resistência à tração e do Módulo de Young para o scaffold o híbrido (AMRUTHWAR; JANORKAR, 2013) Li e colaboradores (2005) também observaram que o scaffold híbrido de quitosana com alginato apresentou valores significativamente maiores de resistência à compressão e Módulo de Young em relação scaffold puro de quitosana. Nesse trabalho propôs-se que o aumento observado pode estar relacionado à força de interação iônica entre o grupo amina da quitosana e ao grupo carboxila do alginato na formação do complexo quitosana-alginato.

Outro fator que altera a propriedade mecânica é a massa molecular média do polímero. Conforme Kumbar e seus colaboradores (2011), *scaffolds* de AC, com massa de 30.000 g.mol⁻¹, apresentam um módulo de compressão em torno de 227 \pm 59 MPa, enquanto *scaffolds* de AC, com massa média de 50.000 g.mol⁻¹, apresentam um valor de 292 \pm 40 MPa. Assim, observou-se que o aumento da massa molecular melhora a propriedade mecânica devido à maior densidade da cadeia polimérica (KUMBAR *et al.*, 2011).

Vale ressaltar, as propriedades mecânicas do tecido muscular esquelético, tais como tração e compressão, variam drasticamente em relação à sua localização, estrutura e função do tecido. Em relação à tração, o valor obtido na região dos ossos corticais de humanos foi entre 14-20 x 10^9 Pa (RHO; KUHN-SPEARING; ZIOUPOS, 1998) e para o músculo extensor dos dedos de coelhos foi 350-475 x 10^3 Pa (MORROW *et al.*, 2010). Em relação à compressão, o valor obtido para o tendão de Aquiles em humanos foi 2-90 x 10^7 Pa (ATHANASIOU *et al.*, 2002) e para a cartilagem articular do joelho humano é entre 5,5-11,8 x 10^6 Pa (SHEPHERD; SEEDHOM, 1999).

e) Comportamento de degradação

Os mecanismos e tempos de degradação devem ser investigados para o uso de polímeros na produção de *scaffolds*. A degradação desses materiais pode ocorrer por meio de processos físicos, químicos e/ou biológicos e envolve a clivagem de ligações das cadeias poliméricas. A taxa de degradação depende das propriedades físico-químicas do polímero, tais como a estrutura química, a presença de ligações hidroliticamente instáveis, o nível de hidrofilia ou hidrofobicidade, a morfologia cristalina ou amorfa, a temperatura de transição vítrea (Tg), dentre outras (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011).

Em um estudo de degradação, o *scaffold* de AC foi analisado em um tampão fosfato-salino (PBS) pH 7, por 24 semanas. O biomaterial analisado, tanto na presença quanto na ausência da enzima celulase, perdeu cerca de 10-15% do seu peso original. Após a degradação, não houve mudanças significativas nas dimensões e na morfologia da superfície (KUMBAR *et al.*, 2011).

Em síntese, um *scaffold* ideal deve apresentar uma grande área superficial para o crescimento celular, ser flexível para permitir a contração celular e ter maior porosidade para maximizar a difusão e a adesão. Vale ressaltar que os *scaffolds* de nanofibras poliméricas apresentam melhores características em comparação aos outros tipos de *scaffolds* para a aplicação na Engenharia de Tecidos, visto que sua morfologia espacial se assemelha à MEC (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011).

3.1.2. Engenharia de Tecido Muscular Esquelético

Dentro da área de Engenharia de Tecidos, pode-se destacar a Engenharia de Tecido Muscular Esquelético (BACH *et al.*, 2003), que consiste no cultivo de células musculares lisas, estriadas esqueléticas e estriadas cardíacas, para a produção de tecidos musculares com a finalidade de reparação de danos ou perdas resultante de trauma, cirurgia ou doenças (NARAYANAN *et al.*, 2016).

O Tecido Muscular é constituído por células alongadas, que contêm grande quantidade de filamentos citoplasmáticos de proteínas contráteis. As células musculares variam de acordo com suas características morfológicas e funcionais e constituem três tipos de tecido muscular: (1) músculo estriado esquelético, formado por células cilíndricas muito longas e multinucleadas com estriações transversais, que apresentam contração rápida e vigorosa, sujeitas ao controle voluntário; (2) músculo estriado cardíaco, formado por células alongadas e ramificadas com estrias transversais, em que a contração é involuntária, vigorosa e rítmica; e (3) músculo liso, constituído por células fusiformes que não possuem estrias transversais, em que a contração é lenta e involuntária (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

Especificamente, a Engenharia de Tecido Muscular Esquelético apresenta diversas possibilidades de aplicação, como na medicina regenerativa, em sistemas de modelos in vitro para testes de novos fármacos (VANDENBURGH et al., 2008), em tratamentos de feridas (GAWLITTA et al., 2007) e implantação in vivo para tratar distrofia e defeitos musculares (BOLDRIN et al., 2008), dentre outros. Recentemente, uma nova área de pesquisa denominada de Clean Meat ou carne limpa vem despontando como importante técnica para a produção de carne em laboratório, com cultivo *in vitro* e em biorreatores, sendo um dos grandes potenciais ramos de uso da Engenharia de Tecido (SPECHT, 2018). A Figura 1 resume as principais áreas de aplicações da Engenharia de Tecido Muscular Esquelético.



Figura 1 – Esquema ilustrativo das aplicações para Engenharia de Músculo



Para a produção do tecido muscular esquelético em laboratório são utilizados diversos tipos de células tronco, tais como células embrionárias, totipotentes, pluripotentes induzidas, adultas, multipotentes e miosatélites (KADIM *et al.*, 2015). Os pesquisadores têm explorado o uso destes tipos de células tronco em vários estágios de diferenciação, com o objetivo de determinar quais exibem um melhor desempenho para proliferação. A maioria dos pesquisadores vem utilizando as células tronco miosatélites, pois elas proliferam numa taxa aceitável, apesar de se diferenciarem somente em células musculares esqueléticas (SPECHT, 2018).

O processo de produção de tecido muscular consiste na proliferação desse tipo de células *in vitro*, inseridas em meio de cultura, que, por sua vez, tem a função de fornecer os nutrientes, sais e fatores de crescimento necessários para a proliferação celular. Além do meio de cultura, as células miosatélites necessitam também de um *scaffold* que mimetize a MEC para que ocorra a adesão, migração e diferenciação celular, com o objetivo de gerar um tecido muscular vivo. Isso quer dizer que elas somente se diferenciam quando aderidas à superfície e não quando estão em suspensão (CASSIDAY, 2018). Desse modo, o *scaffold* é crucial na proliferação de células musculares esqueléticas.

3.1.3. Scaffolds baseados em mantas de nanofibras poliméricas

Nos últimos anos, as nanofibras poliméricas têm sido bastante investigadas para a regeneração do tecido muscular esquelético devido às suas características de elevada área superficial, porosidade, flexibilidade e similaridade com a MEC (NARAYANAN *et al.*, 2016) Dessa forma, esse material pode ajudar na proliferação e na diferenciação dos mioblastos, devido à elevada área de contato, bem como na difusão dos nutrientes devido aos poros existentes. Além disso, de acordo com Riboldi e colaboradores (2008), a orientação das fibras contribui para o crescimento muscular, pois a organização se assemelha a estrutura *in vivo* do tecido muscular.

Existem estudos que comprovam que nanofibras híbridas aumentam a eficiência da proliferação celular. De acordo com Pham e colaboradores (2006), *scaffolds* híbridos de nanofibras de PLA/PCL (1:1) com diâmetro de 300 nm exibem melhor proliferação de células endoteliais humanas. Resultados semelhantes foram relatados em células musculares e endotelias utilizando o *scaffold* de PLA/PCL (3:1).

Outros exemplos de nanofibras com *scaffolds* híbridos são as nanofibras de PLGA funcionalizadas com peptídeos adesivos aplicadas em células cardíacas, para melhorar a adesão e a contração dos cardiomiócitos. *Scaffolds* baseados em nanofibras de PCL foram revestidos com plasma para aumentar a adesão e a proliferação de células-tronco mesenquimais (KENRY; LIM, 2017).

A vantagem de produzir um *scaffold* baseado em nanofibras de PLGA está relacionada a dois fatores: primeiro, pela composição química do material ser semelhante à MEC e, segundo, por ser um polímero biodegradável, pemitindo que as células proliferem, enquanto o *scaffold* é degradado. *Scaffolds* de PLGA apresentam mais de 90% de porosidade, o que permite que as células migrem para o interior do material e que haja elevada troca de nutrientes (LI *et al.*, 2002).

Existem diversas técnicas aplicadas para produção de nanofibras, como síntese assistida por molde, automontagem, fundição por solvente, separação de fases e técnicas de eletrofiação (ZHANG; LIM; RAMAKRISHNA, 2005). Diferentes nanofibras poliméricas podem ser obtidas pelo processo de eletrofiação devido à facilidade de produção em grande escala e melhor controle das variáveis de processo (LANGELAAN *et al.*, 2010).

Apesar da elevada porosidade, o uso de nanofibras poliméricas eletrofiadas apresentam ainda desafios para a aplicação na área de Engenharia de Tecidos, como infiltração celular no interior da estrutura e a composição química que favoreça a interação célula/biomaterial para geração de tecido in vitro ou in vivo. Durante o processo de eletrofiação, as nanofibras tendem a compactar a estrutura tridimensional e, consequentemente, gerar poros inferiores ao tamanho necessário para a migração celular (BEIER et al., 2009). Uma das possiveis soluções é controlar os parâmetros da eletrofiação que influenciam no tamanho dos poros, no alinhamento e nas propridades físicas e químicas (LANGELAAN et al., 2010). Outra solução seria utilizar outros processamentos para a produção das nanofibras. Segundo Wu e Hong (2016), existem diversos processos que permitem aumentar o tamanho dos poros e, consequentemente, a infiltração celular, como combinação de nano e microfibras, eletrofiação com lixiviação de sal, eletrofiação criogênica e eletrofiação combinada com electrospray. Também é possível modificar a superfície das nanofibras poliméricas através do processo de *electrospray*, com soluções poliméricas ou com biomoléculas, que permitem aumentar a adesão celular e a proliferação das células musculares (LANGELAAN et al., 2010).

Segundo Cooper e colaboradores (2010), nanofibras de quitosana com poli(caprolactona) (PCL) foram produzidas pela técnica de eletrofiação para reconstrução de tecido muscular esquelético. Os autores investigaram o efeito do alinhamento de fibras na organização e na diferenciação celular comparado às fibras orientadas aleatoriamente. O estudo confirmou que nanofibras de quitosana com PCL ordenadas aumentam o desenvolvimento das células musculares, sendo um potencial suporte para a miogênese esquelética.

3.2. NANOFIBRAS DE ACETATO DE CELULOSE

A celulose é um dos materiais mais abundantes na natureza e é o principal constituinte da parede celular das plantas. Para fins industriais, a celulose é derivada de duas fontes primárias: línter de algodão e polpa de madeira. O línter de algodão, contém cerca de 98% de celulose, e é obtido por meio do processo de deslintamento, onde a fibra é separada do caroço de algodão e, posteriormente, enfardada, ficando pronta para a comercialização. A celulose obtida do línter possui larga aplicabilidade, como na fabricação de papel moeda, produção de algodão hidrófilo e tecidos cirúrgicos. Por outro lado, a madeira, contém cerca de 40 a 60% de celulose em sua composição química, e é extraída por degradação química da estrutura da madeira. A fórmula molecular do monômero da celulose é $C_6H_{12}O_6$ e a estrutura da celulose está representada na Figura 2.





Fonte: (EDGAR, 2004).

O termo celulose não designa um produto químico específico, pois existem diferentes isômeros. Entretanto, o termo celulose é utilizado para caracterizar os compostos que apresentam especialmente a ligação $(1 \rightarrow 4) \beta$ (diequatorial) entre cada monômero. Dessa forma, duas amostras de celulose contêm as mesmas quantidades relativas de carbono, hidrogênio e oxigênio, mas podem variar consideravelmente em reatividade química e propriedades físicas, massa molecular e grau de polimerização (GP) (EDGAR, 2004).

Os ésteres de celulose são comumente derivados de celulose natural por reações com ácidos orgânicos, anidridos ou cloretos ácidos. O acetato de celulose (AC) é o éster orgânico mais importante, devido à ampla gama de propriedades e aplicação em fibras e plásticos (EDGAR, 2004). O AC foi produzido pela primeira vez

em 1865, aquecendo um algodão com anidrido acético a 180 °C. Posteriormente, adicionou-se ácido sulfúrico para realizar a reação em temperaturas mais baixas. Em 1906, Miles patenteou a hidrólise parcial do triacetato que gerou um acetato de celulose solúvel em acetona. Essa solubilidade em solventes mais baratos e menos tóxicos, como a acetona, auxiliou o desenvolvimento comercial do AC.

O AC tem sido um material de grande escolha para pesquisas, pois apresenta um grande espectro de aplicação, como imobilização de biomoléculas, biorreatores enzimáticos, liberação controlada de fármacos e Engenharia de Tecidos (KONWARH; KARAK; MISRA, 2013). Além disso, AC é um polímero biodegradável, pois os microrganismos conseguem produzir enzimas acetilesterases que são importantes para a desacetilação do material.

O acetato de celulose, apresentado na Figura 3, pode ser produzido com diferentes graus de substituição (GS), podendo variar de zero (para celulose) a 3 (para um material triacetato). O AC é produzido pela substituição dos grupos hidroxila das unidades de glicose por grupos acetila. Assim, o GS é definido como o número médio de grupos hidroxilas esterificadas com grupos acetilas, por unidade de anidro glucose da celulose. (CERQUEIRA; CARVALHO, 2010) Esse parâmetro é importante, pois afeta a cristalinidade do polímero e a solubilidade em diferentes solventes. O acetato de celulose mais comum é o de grau de substituição 2,5, devido à boa solubilidade em solventes polares comuns, como acetona e ácido acético (PULS; WILSON; HÖLTER, 2011).





Fonte: Adaptado de (CERQUEIRA; CARVALHO, 2010).

Na Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), as bandas de absorção em 1750 cm⁻¹ são características do estiramento da ligação C=O e as bandas de baixa intensidade em 3700 cm⁻¹ a 3100 cm⁻¹ são relacionadas aos grupos hidroxilas (DA CRUZ *et al.*, 2011). No trabalho de Brum e colaboradores (2012), o AC obtido da palha de feijão apresentou banda de absorção em torno de 1750 cm⁻¹ relacionada aos grupos carboxilas, bem como as bandas em 1374 cm⁻¹ e 1249 cm⁻¹ relativa às ligações C-H do grupo acetil e a ligação do grupo O-(C=O)-CH₃.

O acetato de celulose produzido na forma de nanofibras eletrofiadas têm grande potencial para ser aplicado na área de Engenharia de Tecidos, devido às propriedades de elevada área superficial, alta rugosidade superficial e mimetização da MEC (KONWARH; KARAK; MISRA, 2013). Dessa forma, é possível utilizar o AC em materiais biomédicos, devido à modulação de fatores (distância da interface ou alinhamento), que afetam o padrão de migração celular, a funcionalização da superfície, a taxa de biodegradabilidade, as propriedades biomecânicas, a biocompatibilidade e a estabilidade na esterilização com raios gama (DRAGULESCU-ANDRASI A, MA Z, AYERS DC, WIXTED JJ, 2008).

Nanofibras de AC eletrofiadas vem sendo investigadas nos últimos anos com o intuito de aumentar sua aplicação na área de Engenharia de Tecidos. Assim, as nanofibras de AC estão sendo incorporadas ou tratadas com outros materiais para melhorar as propriedades de adesão, proliferação e diferenciação celular (KONWARH; KARAK; MISRA, 2013). Soares e colaboradores (2020) produziram nanofibras de AC carregadas com o hormônio progesterona com cinética de liberação em dois estágios. Além disso, observaram que a incorporação da progesterona aumentou o diâmetro médio das nanofibras de 340 a 892 nm e alterou a estrutura cristalina de 67,23% da manta de AC de para uma forma amorfa (SOARES et al., 2020).

No estudo de Santos e colaboradores (2021), relatou-se a produção de *scaffolds* de nanofibras de AC com extrato de urucum para potencial aplicação na cicatrização de feridas. As nanofibras puras apresentaram um diâmetro médio de 468 ± 173 nm e as nanofibras com urucum apresentaram diâmetro médio de 269 ± 101 nm. Os *scaffolds* não apresentaram citotoxidade nos ensaios da membrana corioalantóide de ovos de galinha embrionados e na cultura *in vitro* de fibroblastos. Rodríguez e colaboradores (2011) produziram nanofibras de AC, com diâmetro entre 200 nm e 1,5 µm, com o intuito de aplicar em curativos ósseos para auxiliar a

nucleação de fosfato de cálcio bioativo (RODRÍGUEZ; RENNECKAR; GATENHOLM, 2011).

No trabalho de Dragulescu-Andrasi e colaboradores (2008) nanofibras de AC foram modificadas quimicamente por meio de reações de desacetilação e oxidação, com o intuito de produzir um material com propriedade físico-química semelhante ao sulfato de condroitina. Essa substância estimula a proliferação e a diferenciação de células primárias do estroma da medula humana para a produção de colágeno tipo II, permitindo maior adesão celular. As modificações químicas realizadas melhoraram a propriedade de adesão das nanofibras de AC. Em outro estudo demonstrou-se que o recobrimento de nanofibras de AC com nanopartículas de hidroxiapatita induz um aumento na fixação, disseminação e proliferação de osteoblastos humanos (GOUMA *et al.*, 2010).

3.2.1. Processo de eletrofiação

O processo de eletrofiação é uma técnica que foi criada por Cooley e Morton em 1902. Esse processo foi patenteado por Anton Formhals, em 1934, com o título de "Processo e Aparelho para preparar fios artificiais". Nos anos de 1938 e 1939, Formhals registrou diversas patentes com o aprimoramento da técnica (FORMHALS, 1938a, 1938b, 1938c, 1939a, 1939b). Com o passar do tempo, melhorias no design do instrumento, na qualidade do material produzido, bem como na diversidade de materiais utilizados para produzir as nanofibras tem sido desenvolvidas (HAIDER; HAIDER; KANG, 2018). Diversos estudos sobre a formação do jato e de fibras eletrofiadas para materiais de filtração, a formação do cone de Taylor e os parâmetros de trabalho no processo de eletrofiação tem sido realizados (THENMOZHI *et al.*, 2017).

O processo de eletrofiação utiliza três elementos básicos para a montagem experimental: uma fonte de energia de alta tensão (da ordem de kV), uma fieira (seringa e agulha) e um coletor. A Figura 4 representa o aparato de eletrofiação. A solução a ser fiada é colocada na seringa que, por sua vez, está conectada à agulha. O coletor é aterrado e colocado a certa distância da agulha para receber as fibras ejetadas (distância de trabalho) (PATIL *et al.*, 2017). A alta tensão é aplicada entre o coletor e a agulha. Com isso a solução polimérica na ponta da agulha fica eletrostaticamente carregada. À medida que a solução polimérica é carregada, a
superfície do líquido se expande, dando origem a uma forma cônica, conhecida como cone de Taylor.



Figura 4 - Representação da configuração do aparato de eletrofiação.

Fonte: adaptado de (THENMOZHI et al., 2017).

A tensão aplicada é um dos parâmetros críticos para a formação de nanofibras. Quando as forças eletrostáticas superam a força de tensão superficial da solução, o cone de Taylor é distorcido, ejetando um jato de polímero (LIU *et al.*, 2017). O jato é acelerado pelo campo elétrico e se torna cada vez mais fino até se aproximar do coletor. Durante esta aproximação, o solvente evapora e as cadeias poliméricas tendem ao estiramento e à organização. Finalmente, o jato se solidifica em uma nanofibra e se deposita sobre o coletor (LIU *et al.*, 2017; THAKKAR; MISRA, 2017; THENMOZHI *et al.*, 2017).

As propriedades das nanofibras, como diâmetro, estrutura, porosidade, área superficial e resistência mecânica, são essenciais na sua aplicação. Há diversos parâmetros que afetam a qualidade das nanofibras durante o processo de eletrofiação. Os parâmetros são classificados em parâmetros de processo (campo elétrico, distância de trabalho, velocidade de injeção da solução e velocidade de rotação do coletor), parâmetros de solução (viscosidade, concentração do polímero, tensão superficial, condutividade elétrica e massa molecular) e parâmetros de ambiente (temperatura e umidade).

a) Parâmetros de processo

Os parâmetros de processo influenciam diretamente a morfologia e o diâmetro médio das nanofibras. Com a aplicação de um alto valor de campo elétrico, as forças eletrostáticas aumentam, bem como a densidade de carga, acelerando o jato de

polímero, resultando em um maior estiramento das nanofibras e, consequentemente, a redução do seu diâmetro. Quanto maiores as forças coulombianas, maiores serão a probabilidade de geração de pequenas contas e a distribuição de diâmetro das nanofibras, pois haverá mais formação de grânulos e contas (KI *et al.*, 2005). No entanto, estudos apontam que, em baixas tensões, pode haver diminuição do diâmetro, devido à velocidade de voo reduzida, como observado por Liu e colaboradores (2017).

A distância de trabalho, que é a medida entre a agulha (eletrodo) e o coletor, deve ter um valor mínimo que garanta a total evaporação do solvente utilizado e um valor máximo, para que o campo elétrico seja efetivo na estabilização do cone de Taylor (GOMES *et al.*, 2007). Se a distância for menor do que o valor mínimo, a solução polimérica não terá tempo suficiente para se estirar e, com isso, haverá a formação de nanofibras com maiores diâmetros (LIU *et al.*, 2017).

O aumento da velocidade de injeção da solução polimérica pode ocasionar um tempo insuficiente para o solvente evaporar, gerando nanofibras em forma de fitas ou achatadas, em vez de uma seção transversal circular. Além disso, quanto maior o fluxo da solução, maior a probabilidade de gerar um aumento de diâmetro das nanofibras (SILL; RECUM, 2008). Já a velocidade de rotação do coletor interfere na orientação das nanofibras. À medida que a velocidade aumenta, mais orientadas ficam as nanofibras e a distribuição de diâmetros das nanofibras apresenta menor valor (MEDEIROS *et al.*, 2008).

b) Parâmetros de solução

Os parâmetros de solução afetam diretamente a morfologia e a geometria das nanofibras, pois esses estão relacionados com as propriedades físico-químicas dos polímeros e dos solventes, assim como as interações entre eles (COSTA *et al.*, 2012).

A viscosidade da solução polimérica depende da concentração do polímero, bem como do tipo de solvente utilizado. Está é uma característica importante, pois afeta o emaranhamento das moléculas do polímero, que é um fator crítico para a formação do jato contínuo da solução em vez de gotículas.

Para se obter nanofibras uniformes, sem a formação de contas, é necessário que se tenha um grau mínimo de emaranhamento de cadeias correspondente a uma concentração (viscoelasticidade) do polímero (BRANCIFORTI *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2010). À medida que se aumenta a viscoelasticidade da

solução (aumentado a concentração do polímero), considerando os outros parâmetros fixos, maior a tendência de se obter nanofibras com maior diâmetro. Entretanto, se a concentração for inferior à concentração mínima, o grau de emaranhamento entre as cadeias poliméricas é menor e, com isso, haverá uma instabilidade capilar na extremidade do jato, ocasionando um espalhamento eletrostático, gerando partículas esféricas ou nanofibras com contas (COSTA *et al.*, 2012).

Além disso, o solvente precisa ser volátil o suficiente para que a evaporação ocorra quando o jato polimérico se move em direção ao coletor aterrado. A alta volatilidade da solução influencia na formação de nanofibras com maior porosidade e maior área superficial (LIU *et al.*, 2017).

A tensão superficial é uma variável que está diretamente relacionada à formação do cone de Taylor. O cone é formado quando a voltagem aplicada é alta o suficiente para permitir que as forças eletrostáticas superem a tensão superficial da gota. Diversos estudos relatam que, quanto menor a tensão superficial, maior a probabilidade da formação de fibras sem contas (FONG; CHUN; RENEKER, 1999; LEE *et al.*, 2002, 2003).

A condutividade elétrica da solução também influencia a morfologia das nanofibras. Alguns trabalhos observaram que, quanto maior a condutividade da solução, devido ao acréscimo de um sal, maior será o alongamento e o estiramento. Resultando, assim, em segmentos menos espessos, com menor diâmetro e menor formação de cordão (KIM; LEE; KIM, 2005; GUERRINI *et al.*, 2007; CENGIZ; JIRSAK, 2009; JACOBS; ANANDJIWALA; MAAZA, 2009; MOGHE *et al.*, 2009).

A massa molecular afeta diretamente a morfologia das nanofibras, pois influencia nas propriedades reológicas, principalmente a viscosidade e nas propriedades elétricas como tensão superficial, condutividade e força dielétrica da solução. Polímeros com alta massa molecular são os mais utilizados, pois apresentam alta viscosidade em sua solução devido ao número de emaranhados da cadeia polimérica, características que facilitam a formação de fibras durante o processo. Além disso, as nanofibras formadas a partir dos polímeros com alta massa molecular apresentam maior diâmetro médio e menor número de defeitos em sua estrutura. Por outro lado, polímeros com baixa massa molecular tendem a formar contas por sua baixa viscosidade, devido ao menor número de emaranhados presentes na sua estrutura. A concentração e a massa molecular são propriedades associadas porém independentes, pois, quando se produz uma solução de um polímero de alta massa

molecular com baixa concentração, o número de emaranhados se manterá, não alterando a morfologia das nanofibras (TAN *et al.*, 2005; HAGHI; AKBARI, 2007).

Vale ressaltar que existe uma forte dependência da ordem de grandeza dos diâmetros das nanofibras de AC com a massa molecular do polímero, a viscosidade, a condutividade e a temperatura de ebulição do solvente (LIU; HSIEH, 2002; TUNGPRAPA *et al.*, 2007; CHRISTOFOROU; DOUMANIDIS, 2010; UM-I-ZAHRA; LI; ZHU, 2017; ANGEL *et al.*, 2020). Tungprapa e colaboradores (2007) investigaram os efeitos da mistura de solventes, da concentração de AC e da tensão aplicada no comportamento morfológico de fibras de acetato de celulose. Eles observam maiores diâmetros médios das nanofibras de AC com a diminuição da viscosidade, mesmo em proporções de solventes diferentes. Para uma solução de 16% m/v de AC (30.000 Da) em acetona/DMAc (3:1 (v/v)), eles obtiveram um diâmetro médio de 320 ± 330 nm e uma viscosidade de 384 mPa.s. Entretanto, Angel e colaboradores (2020) obtiveram nanofibras de AC (100.000 Da) com diâmetro médio de 1149 ± 523 nm para uma concentração de 15%m/v de AC em acetona (326 mPa.s). Comparando os dois trabalhos, verifica-se que um aumento da massa molecular proporciona um aumento substancial do diâmetro das fibras.

c) Parâmetros de ambiente

Como os outros parâmetros, a temperatura e a umidade também afetam a formação e a morfologia das nanofibras produzidas. Dependendo da natureza química do polímero, o diâmetro médio da fibra pode aumentar ou diminuir com o aumento da umidade (DE VRIEZE *et al.*, 2009). Em relação à temperatura, estudos mostram maior probabilidade de se obter nanofibras com menores diâmetros com o aumento da temperatura (LIU *et al.*, 2017).

3.2.1.1. Processos para modificação da superfície de nanofibras poliméricas

As nanofibras apresentam grandes vantagens para aplicação como scaffolds para a Engenharia de Tecidos, entretanto, existem limitações que devem ser superadas para melhorar seu desempenho, dentre elas a pobre infiltração celular no interior da estrutura das mantas e a composição química que favoreça a interação célula/biomaterial para geração de tecido *in vitro* ou *in vivo*. Para superar esses problemas e melhorar o desempenho das mantas de nanofibras poliméricas na aplicação como *scaffolds*, pode-se modificar sua superfície, a fim de otimizar o desempenho durante a cultura celular. Essas modificações podem ser realizadas por meio de modificações químicas, biológicas ou morfológicas das mantas de nanofibras.

Os métodos para modificar a superfície de nanofibras estão relacionados à inserção de uma biomolécula ou um grupo funcional, seja por interação eletrostática ou ligação química, através de tratamentos por mistura, revestimento, reações químicas, radiação de ondas eletromagnéticas, tratamento com plasma, grafitização e sistema de eletrofiação com *electrospray* (GOPAL *et al.*, 2007; JIAO; CUI, 2007).

A modificação de superfície é eficaz de alterar as interações biológicas, pois altera a composição química superficial mais externa do *scaffold*, sem alterar as propriedades físico-químicas da região interna. As modificações também podem fornecer grupos químicos que permitam a mobilidade de fármacos, enzimas, anticorpos ou outras espécies biologicamente ativas.

a) Modificação por processos químicos:

A modificação química caracteriza-se pela introdução de uma ou mais espécies químicas, por meio de uma ligação química, por exemplo, a inserção de um monômero (GOPAL *et al.*, 2007). Existem dois métodos para a modificação química da superfície de um polímero: acoplamento e polimerização. O primeiro é utilizado quando já existem grupos reativos na superfície do polímero estudado e o segundo quando não existem grupos reativos, sendo necessário um pré-tratamento da superfície para incorporação de moléculas ao polímero (ZHU *et al.*, 2002). Os principais pré-tratamentos são apresentados a seguir.

Os tratamentos de oxidação com produtos químicos úmidos, geralmente ácidos ou bases, são empregados para grupos funcionais contendo oxigênio (carbonila, hidroxila e carboxila) na superfície do polímero. Entretanto, a superexposição aos reagentes químicos ocasiona danos na superfície do polímero, produzindo poços microscópicos. Além disso, os polímeros que apresentam locais vulneráveis, como estruturas de anéis benzênicos, ligações duplas e halogêneos, tendem a sofrer reações eletrofílicas ou ataques nucleófilos na superfície, danificando o material (PENN; WANG, 1994).

O método de polimerização de grafitização apresenta várias vantagens como: (1) capacidade de modificar a superfície do polímero com diversos monômeros; (2) facilidade e introdução controlável de cadeias com alta densidade para grafitização e (3) ligações covalentes, aumentando a estabilidade química das cadeias introduzidas (UYAMA; KATO; IKADA, 1998). Nesse método, é necessário tratar a superfície para gerar pontos reativos, a fim de que ocorra a polimerização. Isso é possível por meio de reação química, radiação gama, radiação UV e plasma.

O processo de radiação apresenta dois graus de energia: a alta que está relacionada com a indução de formação de íons, e a baixa que é responsável pela excitação dos átomos e moléculas. A energia até cerca de 50 eV é usada para irradiação de nanofibras. Quando aplicada uma alta energia, as nanofibras apresentam alterações em suas propriedades, especialmente se o polímero for biodegradável (GOPAL *et al.*, 2007).

Não obstante, o processo por plasma apresenta algumas vantagens: (a) modificação com profundidade de centenas de angstroms; (b) quase todos os polímeros podem ser modificados por plasma, independe da composição da superfície; (c) é possível escolher o tipo de modificação química para o polímero, a partir da escolha do gás (argônio, oxigênio, nitrogênio, flúor, dióxido de carbono e água) e (d) uniformidade do tratamento em toda superfície. Entretanto, esse tratamento é realizado em um sistema a vácuo, o que encarece o custo de operação (GOPAL *et al.*, 2007).

b) Modificação por processos físicos

Os tratamentos por mistura e revestimento superficial são os métodos mais simples e fáceis para funcionalizar as nanofibras. Ambos possuem abordagens de adsorção física, o que significa que não há formação de uma ligação química entre o material polimérico e a espécie funcionalizada, mas apenas uma interação eletrostática.

A mistura consiste em homogeneizar o polímero com dois ou mais materiais, com objetivo de conseguir as propriedades desejadas e o revestimento consiste em cobrir a superfície do polímero com um material que tenha as características desejadas (GOPAL *et al.*, 2007). Um exemplo de método por mistura é a incorporação de β-ciclodextrina na superfície de nanofibras de poli(metil metacrilato) (PMMA) eletrofiadas, para aplicação de remoção de resíduos orgânicos na purificação da água. As nanofibras funcionalizadas são capazes de capturar a fenolftaleína, uma pequena molécula orgânica, similar aos resíduos orgânicos (KAUR *et al.*, 2006). Em outro trabalho, o colágeno foi incorporado à blenda de poli(ácido L-láctico) (PLLA) com poli(caprolactona) (PCL) numa solução que posteriormente foi eletrofiada. Os testes

do trabalho permitiram afirmar que as nanofibras PLLA-co-PCL com colágeno preservaram o fenótipo das células endoteliais e mostraram maior viabilidade celular, espalhamento e adesão, indicando ser um potencial material para enxerto vascular na Engenharia de Tecidos (HE *et al.*, 2005a).

O método de revestimento físico é predominantemente usado para modificar os *scaffolds* poliméricos, a fim de melhorar sua adesão celular (GOPAL *et al.*, 2007), geralmente utilizando colágeno (HE *et al.*, 2005b), fibronectina, laminina, quitosana e seus derivados (ZHU *et al.*, 2002; CUI *et al.*, 2003), seda fibrosa (CAI *et al.*, 2002), gelatina (CUI *et al.*, 2003b), heparina (ZHU *et al.*, 2002) e alginato (ZHU; JI; SHEN, 2002).

c) Modificação por processos biológicos

A técnica de modificação biológica consiste em adicionar biomacromoléculas bioativas (proteínas e polissacarídeos) à superfície das nanofibras para aumentar a adesão celular, como fibronectina, gelatina e colágeno (CHEN; YAN; ZHENG, 2018). O processo pode ser químico (grafitização) ou físico (revestimento ou aprisionamento) (JIAO; CUI, 2007).

3.3. ALGINATO

O alginato (ALG) é um polissacarídeo natural solúvel em água, à temperatura ambiente, descoberto em 1883, por Standford, a partir da maceração de algas (STANDFORD, 1883). Ele é proveniente do ácido algínico extraído das paredes celulares e dos espaços intercelulares de algas marrons das espécies *Laminaria hyperborean*, *L. digitata*, *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum* e dos gêneros *Sargassum* e *Turbinarias* (PÉREZ; MATOS, 2001). O alginato foi isolado a partir de bactérias dos gêneros *Pseudomonas* (*P. florences*, *P. mendocina* e *P. putida*) e *Azotobacter* (*A. vinelandii*), em 1964 e 1966, respectivamente (MAURSTAD *et al.*, 2008).

O alginato é um heteropolímero linear, formado pela repetição de duas unidades monoméricas de ácidos distintos: α-L-gulurônico (G) e β-D-manurônico (M). Eles estão organizados de maneira alternada ou sequenciados em blocos, ao longo da cadeia e unidos por ligações 1,4 glicosídicas, como apresentado na Figura 5.

Figura 5 - Ilustração esquemática da estrutura química do alginato.



Legenda: (a) β -D-manurônico (M); (b) α -L-gulurônico (G) e (c) alginato de maneira alternada.

Fonte: (KAWAGUTI; SATO, 2008).

Existem diferentes alginatos, devido à quantidade relativa de cada monômero na estrutura. E essa proporção de monômeros depende da fonte, localização, idade, estação de coleta e técnica de extração da alga (PESTOVSKY; MARTÍNEZ-ANTONIO, 2019). A razão entre as unidades G e M do alginato contribui para várias características em termos de estrutura e biocompatibilidade. Dessa forma, as propriedades físico-químicas do alginato dependem da composição e da sequência dos monômeros na cadeia polimérica (DRAGET *et al.*, 2006). O alginato de maneira

alternada (MG)_n apresenta maior solubilidade em pH ácido, maior flexibilidade das cadeias e gera géis mais flexíveis quando se ligam aos cátions polivalentes. Os alginatos que contêm maior quantidade do monômero G apresentam cadeias mais rígidas, alta porosidade, baixo encolhimento, maiores taxas de difusão de proteínas (GOMBOTZ; WEE, 2012) e podem-se ligar aos cátions polivalentes formando géis mais rígidos. Os alginatos com maior proporção do monômero M apresentam estruturas mais flexíveis, além de poros menores (KAWAGUTI; SATO, 2008).

O alginato é comercialmente vendido na forma de alginato de sódio em pó proveniente de algas, por meio de maceração e extração alcalina. Posteriormente, ele é filtrado e precipitado com cloreto de sódio, acrescido de carbonato de sódio para se obter uma pasta de alginato de sódio que depois é encaminhada para os processos de secagem e moagem (MCHUGH; HERN; ARVIZU-HIGUERA, 2001).

O alginato apresenta propriedade mucoadesiva, pois é constituído de grupos terminais carboxílicos, sendo classificado como um polímero mucoadesivo aniônico (GOMBOTZ; WEE, 2012). Dessa forma, diversos estudos comprovam que o alginato tem maior força mucoadesiva se comparado a outros polímeros, como poliestireno, quitosana e carboximetilcelulose (CHICKERING; MATHIOWITZ, 1995).

A origem natural, a sustentabilidade e a biodegradabilidade do alginato são características vantajosas para sua utilização. Além de ser uma matéria-prima bem caracterizada quimicamente, seu comportamento físico-químico tanto em soluções líquidas quanto na fase gel é bem conhecido. Estudos comprovam que o alginato produz géis estáveis ao longo da faixa de temperatura de 0 a 100 °C e que podem ser preparados tanto em água quente quanto fria. Entretanto, o módulo de rigidez do gel diminuí com o aumento da temperatura (GACESA, 1988). Todas essas características fazem com que esse biopolímero seja um polissacarídeo de grande interesse científico e econômico (SANTANA, 2010).

O biopolímero alginato é utilizado na engenharia tecidual como suporte tridimensional para células, pois suas características físicas, ligação e liberação de moléculas bioativas e dissolução podem ser controladas, a partir de modificações físico-químicas do biopolímero ou mesmo dos hidrogéis. Além disso, o alginato apresenta boas características para a formação de nanocápsulas com tamanho entre 2 a 100 mm para liberação controlada de materiais (DHAMECHA *et al.*, 2019). As microesferas de alginato são amplamente exploradas devido à capacidade de encapsularem pequenas ou grandes moléculas com propriedades químicas diversas.

Essas estruturas consistem em um núcleo central que contém o agente terapêutico e uma casca polimérica (WONG; AL-SALAMI; DASS, 2017).

3.3.1. Micro/nanopartículas de alginato reticuladas

A adição de metais polivantentes pode tornar o alginato de sódio insolúvel em água. A interação com metais catiônicos, como cálcio (Ca2+), bário (Ba2+), cobre (Cu²⁺), cádmio (Cd²⁺), zinco (Zn²⁺), níquel (Ni²⁺), chumbo (Pb²⁺), estrôncio (Sr²⁺), alumínio (Al³⁺), ferro (Fe³⁺), magnésio (Mg²⁺) altera as propriedades físico-químicas do alginato e induz o processo de reticulação ou gelificação por meio de interação eletrostática, troca iônica e reações redox (BRESSEL, 2007 CATHELL; SCHAUER, 2007 e PAPAGEORGIOU et al., 2010). O grau de afinidade do alginato de sódio em relação aos cátions, em ordem decrescente, é Pb2+ > Cu2+ > Cd2+ > Ba2+ > Sr2+ > Ca2+ > Co²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺ > Mn²⁺ (MØRCH et al., 2006). Os cátions Ba²⁺ e Sr²⁺ produzem géis de alginato com interações intermoleculares mais fortes em comparação aos de Ca²⁺. Outros cátions, como Pb²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Ni²⁺ e Zn²⁺, também produzem géis de alginato reticulado, mas apresentam um uso limitado, devido à toxicidade (GOMBOTZ; WEE, 2012). A alteração das propriedades depende da seguência dos monômeros na cadeia polimérica do alginato. Estudos reológicos e de dispersão de luz com alginatos sugerem que a organização dos blocos diminui a rigidez do gel na seguência G > M > MG (SMIDSRØD; GLOVER; WHITTINGTON, 1973; SMIDSRØD, 1974).

O cálcio possuí baixa toxicidade em comparação aos outros cátions (LEONG *et al.*, 2016). Além disso, promove uma interação iônica com os blocos G do alginato formando uma rede tridimensional estável composta por fibras de alginato ligadas ionicamente aos íons cálcio (BRESSEL, 2007). A estrutura da rede tridimensional foi proposta por Grant, em 1973, através de um modelo denominado *egg-box*, em tradução livre "caixa de ovos" (GRANT, G. T.; MORRIS, E. R.; REES, D. A.; SMITH, P. J. C.; THOM, 1973), que está mostrado na Figura 6. Essa reticulação do alginato de sódio com cálcio torna o material insolúvel em água, além de aumentar a resistência mecânica (DONG; WANG; DU, 2006).



Figura 6 - Modelo "egg-box" proposto por Grant.

Legenda: (a) ligação entre os íons de cálcio e as cadeias homopolímeros de blocos G; (b) representação das cadeias homopoliméricas unidas através dos íons cálcio. Fonte: adaptado de (KAWAGUTI; SATO, 2008).

Estudos sugerem diversas técnicas para a reticulação do alginato de sódio com os íons cálcio (RHIM, 2004; ZACTITI, 2004). Existem diversos tipos de sais de cálcio para reticular as partículas de alginato e podem ser divididos em três categorias: solúveis, parcialmente solúveis e insolúveis. Os sais solúveis, como o cloreto de cálcio (CaCl₂) podem causar a gelificação espontaneamente. Entretanto, os sais parcialmente solúveis, como, por exemplo, o sulfato de cálcio (CaSO₄), permitem a lenta dissociação do cátion Ca²⁺, e consequentemente uma reticulação mais lenta. Os sais insolúveis, como o carbonato de cálcio (CaCO₃), primeiramente, são emulsificados para depois serem gradualmente solubilizados com alteração de pH ou temperatura para reticularem com o alginato (LEONG *et al.*, 2016).

Os cátions cálcio, provenientes do sal de cloro (cloreto de cálcio), são os agentes reticulantes mais efetivos, pois o sal é facilmente solúvel em água e os íons Ca²⁺ estabelecem ligações entre os blocos G do alginato (na qual existe uma distância adequada para sua acomodação), a partir de interações iônicas e ligações de hidrogênio (SANTANA, 2010). Segundo Zactiti (2004), a concentração de CaCl₂, em

diferentes valores, altera a solubilidade em água do alginato de sódio reticulado. De acordo com George e Abraham (2006), quanto menor a quantidade de íons Ca²⁺, menor será a intensidade das ligações intermoleculares, gerando um gel que se liquefaz com aplicação de calor ou tensão mecânica. À medida que aumenta a quantidade de íons na rede, também aumenta o número de pontos de reticulação entre as cadeias poliméricas, diminuindo a mobilidade das cadeias e a solubilidade do material em água.

Dessa forma, a gelificação consiste nas ligações intermoleculares do alginato de sódio com o cátion Ca²⁺ para formar um produto insolúvel em água. A gelificação pode ser externa ou interna:

 Gelificação externa: é o mecanismo clássico e simples para formar hidrogéis de alginato. Nesse processo, os íons Ca²⁺ são introduzidos externamente nas gotículas de alginato. Os cátions difundem-se para os espaços intersticiais entre as cadeias poliméricas de alginato para iniciar a reticulação. Isso resulta na formação de uma membrana semi-sólida envolvendo a gota de alginato com um núcleo líquido, conforme apresentando na Figura 7. Quando maior o tempo de imersão, maior é a difusão de Ca²⁺ pela membrana e consequentemente a solidificação do núcleo das gotículas de alginato (SCHOUBBEN *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2006).



Figura 7 - Mecanismo de gelificação externa do alginato de sódio.

Legenda: (a) gotículas de alginato em contato com uma solução de cálcio, (b) difusão interna dos íons cálcio, (c) gelificação interna das gotículas e (d) gelificação completa. Fonte: adaptado de (LEONG *et al.*, 2016). A gelificação externa é um método que não precisa utilizar solventes orgânicos e ácidos. Além disso, apresenta um grande potencial para aplicação nas áreas farmacêuticas, biomédicas e alimentícia (PATIL *et al.*, 2010). Analisando do ponto de vista biotecnológico e industrial, pela facilidade de obtenção, é o mecanismo mais relevante para o alginato de sódio (LI *et al.*, 2015).

2. Gelificação interna: é um mecanismo que permite controlar a liberação de Ca²⁺ para o processo de reticulação e só é usado quando o alginato se dispersa com um líquido imiscível (LENCKI, NEUFELD e SPINNEY, 1989). Assim, uma solução de alginato de sódio contendo partículas de um sal insolúvel é emulsificada em uma fase oleosa, como mostrado na Figura 8. Posteriormente, adiciona-se um ácido orgânico, com a finalidade de diminuir o pH, que por sua vez, irá induzir a dissociação do sal e liberar os cátions Ca²⁺. Os íons cálcio liberados cruzam as cadeias poliméricas do alginato, iniciando a ligação cruzada de dentro para fora da gotícula (HELGERUD *et al.*, 2009).



Figura 8 - Mecanismo de gelificação interna do alginato de sódio.

Legenda: (a) dispersão de gotículas de alginato em óleo, (b) adição de ácido para dissolver o sal insolúvel de cálcio e (c) gelificação da partícula. Fonte: adaptado de (LEONG *et al.*, 2016).

O processo de gelificação interna permite maior controle da morfologia das partículas e maior homogeneidade em comparação ao processo de gelificação externa. Estudos anteriores comprovam a produção de micropartículas de alginato com tamanhos de 20 a 1000 µm (PONCELET *et al.*, 1995; RIBEIRO *et al.*, 2005; LIU

et al., 2015). Entretanto, com a utilização de solventes orgânicos e ácidos aumentase a chance de uma possível toxicidade devido à presença de traços dessas substâncias no material produzido (PATIL *et al.*, 2010).

O processo de gelificação altera algumas propriedades físicas do alginato de sódio, gerando um hidrogel de alginato de cálcio que apresenta características distintas. Uma dessas características é a força de ligação do material. A força do hidrogel de alginato de cálcio é influenciada pela quantidade de monômeros G presente na cadeia polimérica e pelo nível de interação dos cátions com o alginato (SMIDSRØD, 1974). Considerando a concentração de cátions constante, a grande quantidade de blocos G fornece alta resistência ao hidrogel de alginato em comparação com o hidrogel de alginato que contêm maior quantidade de blocos M, entretanto, o último apresenta maior elasticidade (CHING; BANSAL; BHANDARI, 2017). A concentração de íons reticulantes ou gelificantes também influencia a força do hidrogel. Segundo Draget e colaboradores (1993), hidrogéis produzidos com excesso de íons Ca²⁺ apresentaram uma maior força de interação, à medida que aumenta a massa molecular do alginato até 150 kDa. A partir de 150 kDa, observouse um pequeno aumento da força dos hidrogéis quando os locais de ligação ao cátion cálcio estavam saturados. Contudo, quando se aumenta a concentração de 8 para 15mM, a força do gel de alginato aumenta exponencialmente (DRAGET et al., 1993).

Outra característica que alterada no processo de gelificação do alginato de sódio é o intumescimento. O comportamento do intumescimento de hidrogéis de alginato tem sido estudado por diversos grupos de pesquisa. Segundo Pillay e Fassihi (1999), o tamanho das partículas de alginato diminui em pH ácido e aumenta em pH básico (PILLAY; FASSIHI, 1999). O estudo de Darrbie e colaboradores (2006) relata que o intumescimento dos hidrogéis de alginato é reduzido com o aumento da quantidade de blocos G na cadeia polimérica. A capacidade de dilatação dos hidrógeis de alginato também reduz com o aumento da concentração de cátions cálcio (MOE *et al.*, 1993).

Os hidrogéis de alginato podem permitir a difusão de pequenas moléculas solúveis, como glicose e insulina. No entanto, a difusão de moléculas maiores, como proteínas, é restrita devido ao tamanho molecular (LANZA *et al.*, 1995; CHING; BANSAL; BHANDARI, 2017). O tamanho dos poros dos hidrogéis de alginato está na faixa de 5 a 200 nm (ANDRESEN *et al.*, 1977). O tipo de mecanismo de gelificação (externo ou interno) influencia o tamanho dos poros do hidrogel. Os hidrogéis de

alginato provenientes da gelificação externa apresentam uma rede mais contraída na superfície e tamanho de poros de 12-16 nm na superfície do gel. Os hidrogéis de alginato, produzidos a partir do mecanismo de gelificação interna, apresentam maior tamanho de poros (THU; SMIDSRØD; SKJAK-BRÆK, 1996). O tamanho dos poros também é influenciado pela composição monomérica de alginato. A porosidade do hidrogel aumenta à medida que aumenta o teor de blocos G na cadeia polimérica de alginato. Isso ocorre devido ao bloco G apresentar uma configuração mais aberta, propiciando maior porosidade e menor suscetibilidade ao encolhimento (MARTINSEN *et al.*, 1991; THU *et al.*, 1996).

Outro fator que altera o tamanho dos poros é o pH. Em pH abaixo de 7, os hidrogéis apresentam redução do tamanho dos poros e podem sofrer hidrólise catalisada por prótons. Nessa condição, a elevada concentração de íons de hidrogênio suprime a dissociação do grupo carboxila presente nas moléculas de alginato (WU *et al.*, 2010). Entretanto, em pH acima de 7, as partículas de alginato aumentam, bem como o tamanho dos poros. Caso ocorra exposição prolongada ao pH básico, inicia-se a dissolução do hidrogel (GOMBOTZ; WEE, 1998).

Os hidrogéis de alginato apresentam características térmicas estáveis no intervalo de 0 a 100 °C. A estabilidade é influenciada pela composição dos monômeros do alginato. Segundo Oates e Ledward (1990), os hidrogéis ricos em blocos M são menos estáveis sob aquecimento em comparação aos hidrogéis com maior proporção de blocos G. Acima de 100-120 °C, os hidrogéis de alginato sofrem despolimerização. Assim, eles tendem a ser menos rígidos à medida que a temperatura aumenta (GACESA, 1988). Acima da temperatura de transição do gel, em torno de 180 °C, é observada a decomposição térmica do hidrogel de alginato (OATES; LEDWARD, 1990). A decomposição corre em três etapas: (1) liberação de moléculas de água até 200 °C; (2) formação de oxalatos metálicos acima de 200 °C e (3) formação de óxido metálico acima de 350 °C (OATES; LEDWARD, 1990; SAID; HASSAN, 1993).

3.3.1.1. Técnicas para produção de partículas de alginato reticuladas

A produção de partículas de alginato reticuladas pode ser realizada mediante diversas técnicas, levando em consideração fatores como aplicação, tamanho das partículas, propriedades biológicas e físico-químicas. As principais técnicas são: atomização, emulsificação e extrusão-gotejamento (PESTOVSKY; MARTÍNEZ-ANTONIO, 2019).

A técnica de atomização consiste em dispersar uma solução de alginato de sódio como aerossóis que podem ser gelificados para formar micropartículas. As partículas formadas podem apresentar uma ampla faixa de tamanho entre 10 a 100 μ m. No caso de atomização usando ultrassom, as partículas podem apresentar tamanhos médios de 50 a 110 μ m. Apesar de apresentar elevado interesse industrial, devido à alta produtividade, é importante ressaltar que essa técnica é adequada para aplicações que não exigem um controle rigoroso da distribuição de tamanho das partículas (LEONG *et al.*, 2016).

A técnica de emulsificação consiste na dispersão de alginato de sódio em um líquido imiscível, que produza uma emulsão água/óleo antes da gelificação. Os óleos vegetais ou minerais são os mais utilizados nessa produção. O tamanho médio das partículas de alginato reticuladas varia de 1 a 1000 μm (PONCELET *et al.*, 1999a; LEONG *et al.*, 2016). O tamanho das partículas nessa técnica pode ser controlado por alteração de temperatura, de concentração do alginato de sódio, do solvente orgânico ou da fase oleosa, da concentração do surfactante e da taxa de agitação aplicada na formulação (PATIL; SAWANT, 2009; PIORNOS *et al.*, 2016). Apesar de ser uma técnica econômica, pode gerar fusão de partículas e apresenta uma etapa extra, que é separar as partículas de alginato reticuladas do óleo residual (SULTANA *et al.*, 2000).

A técnica de extrusão-gotejamento é a maneira mais simples de produzir partículas de alginato reticuladas e consiste em gotejar uma solução de alginato de sódio numa solução de reticulante (geralmente CaCl₂) ou vice-versa (PESTOVSKY; MARTÍNEZ-ANTONIO, 2019), como representando na Figura 9.



Figura 9 - Técnica de extrusão-gotejamento para produção de partículas de alginato reticuladas.

Fonte: adaptado de (CHING; BANSAL; BHANDARI, 2017).

O gotejamento pode produzir um pré-gel aglomerado dependendo dos parâmetros utilizados. Para evitar essa aglomeração, adiciona-se quitosana ou outros estabilizadores, como Tween 20, Tween 80, PEG-1500, PEG-6000, acetonitrila ou brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (SCHOUBBEN et al., 2010; LEE; RAVINDRA; CHAN, 2013; MASALOVA et al., 2013; PESTOVSKY; MARTÍNEZ-ANTONIO, 2019). No entanto, ao se otimizar o tempo de reação e as concentrações das soluções de cloreto de cálcio e alginato de sódio, é possível sintetizar nanopartículas sem adição de estabilizadores. No trabalho de Masalova e colaboradores (2013) foram produzidas nanopartículas com diâmetros entre 210 a 540 nm, sem adição de estabilizadores e que foram dispersadas utilizando ultrassom. No mesmo estudo, os pesquisadores ressaltam que na presença de estabilizadores, as nanopartículas apresentavam dimensões menores (entre 200 a 300 nm) e maior estabilidade (MASALOVA et al., 2013). Saraei e colaboradores (2013) ao otimizarem as concentrações das soluções de alginato de sódio (0,3% m/v) e cloreto de cálcio (0,1% m/v) e o tempo de homogeneização (45 minutos) obtiveram nanopartículas esféricas com diâmetro de 80 nm, sem utilização de ultrassom e estabilizadores.

A técnica de extrusão-gotejamento pode ser aprimorada, com a finalidade de controlar o tamanho das partículas e aumentar a taxa de produção, usando campo elétrico (AL-HAJRY *et al.*, 1999; PONCELET *et al.*, 1999a, 1999b; NEDOVIC *et al.*, 2001; KLOKK; MELVIK, 2002; LEWINSKA; ROSINSKI; WERYNSKI, 2004), agitação

mecânica ou corte a jato. Zhao e colaboradores (2016) demonstraram que utilizando o campo elétrico as partículas de alginato reticuladas apresentam formas esféricas e diâmetro na faixa de 500-2000 μ m. Por outro lado, ao se utilizar agitação mecânica, as partículas de alginato reticuladas apresentaram diâmetros entre 300 μ m e 5 mm (PRÜSSE *et al.*, 2008) e utilizando o corte a jato, as partículas produzidas foram uniformes e com diâmetros de 200 μ m a 5 mm (KOCHT *et al.*, 2003).

Em suma, existem diversos métodos para a produção de partículas de alginato reticuladas. E no presente trabalho utilizou-se a técnica de extrusãogotejamento com campo elétrico, também denominada de *electrospray*.

3.3.1.1.1. Electrospray

O processo de *electrospray* é uma das técnicas mais eficientes para a produção de micro/nanopartículas e micro/nanoesferas a partir de uma solução polimérica condutora (SRIDHAR; RAMAKRISHNA, 2013), como esquematizado na Figura 10. O equipamento é composto de uma fonte de tensão, um capilar com a solução (geralmente uma agulha metálica) e um coletor aterrado.



Figura 10 – Esquema do Processo de *Electrospray*.

Fonte: adaptada de (WU et al., 2012).

A técnica de *electrospray* é baseada nos princípios da técnica de eletrofiação. Entretanto, as duas técnicas se distinguem em relação às propriedades da solução (concentração do polímero, solvente e viscosidade) e aos parâmetros do processo (distância de trabalho, tensão e velocidade de injeção) (SOARES *et al.*, 2018).

O princípio da técnica de *electrospray* é baseado na capacidade de um campo elétrico deformar a interface da gota e obter gotículas com diâmetros que podem variar da ordem de nanômetros a micrômetros, dependendo dos parâmetros utilizados. Quando um campo elétrico é aplicado em uma solução, a carga elétrica gera uma força eletrostática na gotícula que compete com a força de coesão da gotícula eletrizada. Quando a força coulombiana aplicada supera a força coesiva da gota, existe a formação de spray de gotículas (TAPIA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2015).

A produção controlada e a morfologia uniforme das partículas dependem da evaporação do solvente e da difusão do polímero. A rápida evaporação do solvente ocasiona o surgimento de poros e cavidades na estrutura das partículas. Por outro lado, uma rápida difusão de polímeros leva à produção de nanopartículas densas (ALMERÍA; FAHMY; GOMEZ, 2011).

O spray pode ser liberado de várias formas a partir da ponta do capilar, sendo o modo jato cônico único, o mais desejado, por conferir estabilidade ao jato quando se associa ao campo elétrico aplicado, à condutividade e à vazão da solução polimérica. As partículas podem ser sintetizadas em três formatos diferentes – esferas, irregulares ou complexas – sendo a primeira mais comum e mais fácil de se obter durante o processo. O formato esférico é obtido por meio da evaporação do solvente, em que as gotículas antes de atingir o limite de Rayleight (L_R), não sofre interferência ou deformação pela fissão de Coulomb. Quando ocorre a fissão, a gotícula é deformada em formatos irregulares. Por outro lado, quando o solvente evapora em sua totalidade, as partículas congelam no momento da fissão, ocasionando um formato complexo, que pode ser a mistura entre os formatos esférico e irregular (ALMERÍA *et al.*, 2010).

Dentre as vantagens da utilização da técnica de *electrospray* pode-se destacar o tamanho reduzido das partículas (80 a 1000 nm) (TAPIA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2015), possibilidade de obtenção de partículas com distribuição uniforme de diâmetro, facilidade para controlar os parâmetros de operação, possibilidade de produção em larga escala, além de ser um método simples e de baixo custo (SRIDHAR; RAMAKRISHNA, 2013; TAPIA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2015).

A evaporação do solvente e a difusão do polímero são parâmetros de grande importância para o processo de *electrospray*. Eles estão associados às cadeias

poliméricas emaranhadas que estão presentes na solução e são responsáveis pela morfologia das gotículas. Outro parâmetro a ser levado em consideração, é a concentração da solução, pois determina o emaranhamento das macromoléculas no polímero e interfere diretamente na morfologia da partícula formada. É necessário um valor de concentração crítica para determinar a morfologia. Em concentrações abaixo do valor crítico, são obtidas soluções fluidas sem a presença de emaranhados. Por outro lado, acima do valor crítico, a concentração é grande, o que por sua vez, não favorece a formação de gotículas. A concentração ideal para o processo de *electrospray* é aquela que forma uma solução semifluida, em que cadeias não muito emaranhadas são formadas facilitando a produção de nanopartículas (SHENOY *et al.*, 2005; ALMERÍA; FAHMY; GOMEZ, 2011).

Os parâmetros de processos devem ser controlados e influenciam o modo que o spray é pulverizado. A pulverização depende da intensidade e força do campo e da taxa de fluxo da solução e pode ser de duas maneiras: jato cônico único e jato cônico múltiplo. Se a intensidade do campo elétrico for elevada, resultará em um jato cônico múltiplo que é muito instável, tornando-se indesejável para a obtenção das partículas (ENAYATI *et al.*, 2010). Por outro lado, para se obter um formato jato cônico único, que é o ideal do processo, pois confere estabilidade ao jato, é necessário que seja aplicado uma baixa tensão à solução (DING; LEE; WANG, 2005).

A condutividade elétrica da solução é um parâmetro que auxilia na otimização do processo e é responsável pelo controle do tamanho de partículas. Quanto maior a condutividade, maior a densidade de carga transportada e a decomposição e por último, menor o tamanho das partículas produzidas. Isso se deve a forças de repulsão que competem com forças viscoelásticas que desemaranham a rede polimérica (GHORANI; TUCKER, 2015). Por outro lado, é possível produzir nanofibras com alta condutividade de solução se a concentração do polímero for alta até o valor crítico. Quando se associa esse parâmetro com alta velocidade de fluxo, o diâmetro das partículas também poderá ser menor.

Outro parâmetro importante é a vazão, pois influencia o grau de emaranhamento das cadeias poliméricas e a morfologia e o diâmetro das partículas formadas. A tensão também é muito uma variável a ser considerada ne técnica de *electrospray*, pois está ligada diretamente à morfologia das partículas produzidas. Quando o campo elétrico é elevado, as partículas esféricas se alongam formando gotas alongadas e até fibras com defeitos como produto. Isso se deve à presença de

mais cargas atuando nas gotículas (SHENOY et al., 2005; HONG et al., 2008).

Existem duas formas para coletar as partículas: (a) *electrospray* em placas ou (b) *electrospray* em solução, conforme mostrado na Figura 11. O *electrospray* em placas consiste em coletar as nanogotas ou as microgotas em uma placa aterrada. O *electrospray* em solução é baseado na coleta de gotículas em uma solução de reticulante, para facilitar a formação de micro e nanoesferas (TAPIA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2015). Esses métodos são utilizados não apenas para a produção de nanopartículas poliméricas sintéticas, mas também para polímeros naturais, proteína ou carboidrato sem perda de sua bioatividade (SRIDHAR; RAMAKRISHNA, 2013).

Figura 11 – Técnicas para coletar partículas no processo de *electrospray*.



Legenda: (a) em uma placa aterrada e (b) em uma solução de reticulante. Fonte: adaptada de (TAPIA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2015).

O limite de ruptura para a formação da gota, denominado limite de Rayleight (L_R) , pode ser obtido pela Equação 01. Esse limite ocorre quando a tensão superficial da gota supera a força eletrostática. Para que as gotas sejam formadas, é necessário que esse limite seja atingido ao menos pela metade. Além da tensão superficial, a quebra do jato também vai depender da viscosidade e da carga superficial da solução e da velocidade de ejeção do jato (BOCK; DARGAVILLE; WOODRUFF, 2012).

$$L_R = (8\pi\sqrt{\varepsilon_o \gamma R^3})(64\pi^2 \varepsilon \gamma R^3), \qquad \qquad \mathsf{Eq.} \ (01)$$

em que q é a carga na superfície da gotícula, ε é a permissividade do meio circundante, γ é a tensão superficial do fluido e R é o raio da gota.

Electrospray em placa

Os parâmetros do processo de *electrospray* em placa para a produção de micro/nanopartículas de alginatos foram estabelecidos no estudo do Ghayempour e Mortazavi (2013). Os principais parâmetros de interesse observados nesse estudo foram: tensão aplicada, concentração de alginato, concentração de reticulante $(CaCl_2)$, distância de trabalho e diâmetro da agulha. Para compreender como um parâmetro influencia no processo é necessário manter os demais parâmetros fixos. Nesse estudo, os parâmetros mantidos constantes, quando a variável de interesse era modificada, foram 12 kV para a tensão aplicada, 2% para a concentração de alginato, 2% para a concentração do reticulante e 0,60 mm para o diâmetro da agulha.

De acordo com esses pesquisadores, o aumento do campo elétrico entre 5 a 30 kV, contribui para a diminuição do tamanho das partículas de 800 para 110 μ m e o aumento da frequência de gotejamento. Com o aumento da concentração de alginato entre 1,5 a 3,0 %m/v, houve aumento do tamanho das micropartículas de 210 para 420 μ m. À medida que a concentração de reticulante (*CaCl*₂) aumentou (entre 1 a 10 %m/v), observou-se diminuição no diâmetro das gotículas de alginato reticuladas de 360 para 260 μ m. Em relação à distância de trabalho, quando maior a distância (de 4 a 35 cm), maior o tamanho da partícula de alginato (de 160 para 420 μ m). Por fim, quanto maior o tamanho da agulha (de 0,38 mm a 1,20 mm), maior foi o tamanho da gotícula de alginato produzida (GHAYEMPOUR; MORTAZAVI, 2013).

A técnica de *electrospray* pode ser utilizada para produzir materiais para liberação controlada de fármacos (ALMERÍA *et al.*, 2010; BOCK; DARGAVILLE; WOODRUFF, 2012), encapsulamento de partículas para Engenharia de Tecidos e revestimento de nanofibras (FUKUI *et al.*, 2010; LEE; BAI; CHEN, 2011; GHAYEMPOUR; MORTAZAVI, 2013), além da produção de alimentos (BHUSHANI, 2014). Fuoco e colaboradores (2016) utilizaram o método de *electrospray* para produzir micro e nanopartículas de alginato com o objetivo de melhorar a proliferação e a diferenciação de mioblastos, além de promover a liberação de fatores de crescimento essenciais para a regeneração do músculo esquelético (FUOCO et al., 2016).

3.3.1.2. Aplicações das micro/nanopartículas de alginato reticuladas na Engenharia de Tecidos

Na área de encapsulamento de medicamentos, as microesferas de alginato auxiliam na liberação prolongada ou controlada de fármacos em locais específicos do corpo, o que consequentemente diminui a frequência de dosagem, os efeitos colaterais e melhora o bem estar do paciente (CHEN *et al.*, 2015). Nagpal e colaboradores (2012) produziram microesferas de alginato com ibuprofeno e o aumento da concentração do polímero ocasionou maior taxa de liberação do medicamento (NAGPAL et al., 2012). Nistatina, fármaco utilizado para o tratamento de candidíase foi encapsulado por alginato (MARTÍN *et al.*, 2015). Nesse trabalho verificou-se que as características mucoadesivas do alginato ajudaram a melhorar o direcionamento e a absorção do fármaco. A utilização de microesferas de alginato com isoniazida, um medicamento para o tratamento de tuberculose (RASTOGI et al., 2007) e microesferas de alginato com polifenol para tratamento de osteomielite (CHEN *et al.*, 2018) mostraram que a administração de medicamento.

Na área de cultivo celular, estudos do alginato complexado com peptídeos tem demostrado aumento da proliferação e adesão de osteoblastos (CHEN *et al.*, 2015), mioblastos (SANDVIG *et al.*, 2014) e células da medula óssea (GUO *et al.*, 2017). Embora já existam muitos estudos sobre hidrogéis de alginato como *scaffolds*, estudos sobre o uso das microesferas para essa aplicação ainda são escassos (DHAMECHA *et al.*, 2019). Em resumo, as partículas de alginato apresentam uma ampla aplicação médica, incluindo encapsulamento, administração terapêutica, Engenharia de Tecidos, bem como cultivo celular.

3.4. PROCESSOS PARA PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS DE ACETATO DE CELULOSE RECOBERTAS COM MICRO/NANOPARTÍCULAS DE ALGINATO RETICULADAS

Para o revestimento de mantas de nanofibras é possível utilizar o processo de eletrofiação simultaneamente com o processo de *electrospray*. O esquema apresentado na Figura 12 mostra como as duas técnicas associadas podem ser utilizadas para o recobrimento das nanofibras.

Figura 12 - Processos de Eletrofiação e Electrospray em placa (simultâneos).



Fonte: Adaptado de (WU; HONG, 2016).

Além de permitir o revestimento, essa metodologia pode ser usada para aumentar o tamanho dos poros entre as nanofibras e, consequentemente, aumentar a infiltração de materiais para o interior do *scaffold*, uma característica importante para a produção de tecidos vivos tridimensionais (EKAPUTRA *et al.*, 2008; WU; HONG, 2016). Essas técnicas combinadas foram utilizadas para fabricar *scaffolds* híbridos de PEUU com dispersão de solução com meio de cultura. Esse biomaterial suportou a infiltração de células musculares lisas com forte produção de MEC (HASHIZUME *et al.*, 2010). Segundo o estudo de Ekaputra e colaboradores (2008), o *scaffold* híbrido de PCL com colágeno apresentou uma infiltração de osteoblastos em 200 µm de profundidade. Não obstante, Stankus e outros pesquisadores (2006), demonstraram que o *scaffold* de poli(ester-uretano)-co-ureia (PEUU) permitiu a infiltração das células musculares lisas em toda sua profundidade.

Por fim, é importante pontuar que a separação dos fluxos de eletrofiação e *electrospray* evita o contato direto de materiais bioativos com solventes orgânicos utilizados no processo de eletrofiação, estratégia que evita a perda da bioatividade (WU; HONG, 2016).

3.5. SÍNTESE DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A partir da revisão bibliográfica realizada, pode-se concluir que são necessários mais estudos sobre a produção de *scaffolds* baseados em nanofibras de acetato de celulose (NFAC), com a finalidade de melhorar a adesão, proliferação e diferenciação de células musculares. Uma das estratégias para alcançar esse objetivo é a incorporação nas nanofibras de uma substância que tenha características similares à MEC. Sendo assim, no presente trabalho, nanofibras de AC foram recobertas com micro/nanopartículas de alginato reticuladas (ALG-R), conforme apresentado na Figura 13. Por hipótese, a síntese desse material poderá apresentar propriedades físico-químicas mais semelhantes à MEC e, consequentemente, apresentar melhor desempenho na adesão e na proliferação de células musculares, permitindo sua aplicação como *scaffold* na Engenharia de Tecidos Musculares.

Figura 13 - Modelo de recobrimento das nanofibras de AC com micro/nanopartículas de alginato reticuladas.



Fonte: Elaborada pela autora.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais utilizados e a descrição da metodologia adotada para obtenção e caracterização das nanofibras de acetato de celulose (NFAC), das micro/nanopartículas de alginato reticuladas (ALG-R) e das nanofibras de AC com superfície modificada com alginato (NFAC/ALG-R).

4.1. MATERIAIS

As matérias-primas utilizadas foram o acetato de celulose (massa molar média de 30.000 g.mol⁻¹), o alginato de sódio originado de algas marrons (baixa viscosidade) e o cloreto de cálcio (CaCl₂, >93% – massa molar 110,98 g.mol⁻¹) ambos adquiridos da Sigma-Aldrich. Os solventes foram acetona PA ACS (C₆H₆O – massa molar 58,08 g.mol⁻¹, T_{ebulição} = 56,2°C, constante dielétrica = 20,7) e N,N-Dimetilformamida (DMF) PA (HCON(CH₃)₂ – massa molar 73,09 g.mol⁻¹, T_{ebulição} = 153,5°C, constante dielétrica = 37) adquiridos da Dinâmica Química Contemporânea Ltda.

4.2. METODOLOGIA

A metodologia de caracterização adotada foi dividida em quatro partes, sendo elas: (i) a caracterização das propriedades físico-químicas das matérias-primas; (ii) a caracterização morfológica e físico-química das mantas de nanofibras de AC obtidas por eletrofiação, (iii) a caracterização das partículas de ALG-R produzidas pela técnica de e*lectrospray* em placa e (iv) a caracterização das nanofibras de acetato de celulose recobertas com partículas de alginato reticuladas (NFAC/ALG-R) obtidas pela combinação das técnicas de eletrofiação e e*lectrospray*. A análise morfológica dos materiais produzidos foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e as propriedades físico-químicas e térmicas por Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e Análise Termogravimétrica (TGA). Além dessas técnicas, as amostras de NFAC/ALG-R foram avaliadas em relação à absorção de umidade pelo teste de intumescimento com água destilada por um período de 6 horas. As etapas realizadas estão sintetizadas nos fluxogramas (a), (b) e (c) da Figura 14.



Figura 14 - Fluxogramas das caracterizações



4.2.1. Caracterização físico-química das matérias-primas

As matérias-primas, acetato de celulose e alginato de sódio, ambos em pó, foram caracterizados pela técnica de FTIR para identificar os grupos funcionais químicos presentes nas amostras. O equipamento utilizado para essa análise foi o Thermo Nicolet NEXUS 470 FTIR. Os espectros de infravermelho foram obtidos com 256 varreduras entre 4000 a 400 cm⁻¹, com resolução espectral de 4 cm⁻¹.

As propriedades térmicas das matérias-primas foram analisadas pela técnica de TGA no equipamento DTG 60 H, marca Shimadzu. Para as duas amostras, a massa utilizada foi em torno de 5 a 8 mg. As análises foram realizadas com uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ e no intervalo de temperatura de 25 °C a 900 °C. O fluxo de gás nitrogênio foi de 50 cm³.min⁻¹ para o acetato de celulose e 90 cm³.min⁻¹ para o alginato de sódio. As curvas de TGA foram construídas com auxílio do *software* Origin 9.0®, para avaliar a variação de massa em função da temperatura devido à volatilidade de materiais degradados.

4.2.2. Produção e caracterização das nanofibras de acetato de celulose (NFAC)

As mantas de nanofibras de acetato de celulose foram produzidas pela técnica de eletrofiação, utilizando o equipamento Nano E-Spinning Unit, da marca NaBond Technologies Co. Alguns parâmetros foram previamente definidos com base em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa, tais como a concentração de AC, os solventes utilizados e a proporção dos mesmos (SOARES *et al.*, 2020). As soluções foram preparadas com 12% m/v de acetato de celulose com a mistura de solventes acetona e DMF, na proporção de 3:1 (v/v). As soluções foram homogeneizadas até a completa solubilização do polímero sob uma agitação magnética durante duas horas, à temperatura de 25°C. As soluções foram eletrofiadas utilizando uma seringa plástica de 10 mL contendo uma agulha de diâmetro interno de 0,70 mm, que serviu como eletrodo. As nanofibras foram colhidas durante 60 minutos em um substrato metálico de alumínio posicionado sobre um coletor rotativo (substrato) aterrado. As condições de distância de trabalho (10,12 e 14 cm) e de tensão (12, 14, 15 e 16 kV) para a produção das NFAC são apresentadas na Tabela 1.

Distância de trabalho (cm)	Tensão (kV)
10	12
	14
	15
	16
12	12
	14
	15
	16
14	12
	14
	15
	16

Tabela 1 – Parâmetros de distância de trabalho e tensão para a produção de NFAC.

Fonte: Elaborada pela autora.

A morfologia das amostras foi analisada utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura modelo SSX-550 da marca SHIMASZU. As mantas de NFAC foram cortadas em quadrados de aproximadamente 1,5 cm², posicionadas sobre fita de

carbono adesivo e metalizadas com uma fina camada de ouro no equipamento QUICK COATER, utilizando uma corrente de 1,0 mA por 60 segundos.

Os diâmetros médios das nanofibras foram medidos com auxílio do *software* ImageJ. Foram realizadas 100 medidas de diâmetros para cada amostra. Os dados obtidos foram tratados no *software* Origin 9.0® para se obter o diâmetro médio das nanofibras de acetato de celulose, bem como a distribuição de diâmetros. As análises estatísticas do diâmetro médio das nanofibras foram realizadas usando o teste ANOVA pelo *software* Minitab®18, com um intervalo de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$). A quantidade de contas em cada amostra foi contabilizada numa área de 1,85x10³ µm² nas imagens de MEV.

As caracterizações físico-químicas e térmicas das NFAC foram realizadas utilizando os mesmos parâmetros experimentais definidos para o AC e descritos na seção 4.2.1.

4.2.3. Produção e caracterização das partículas ALG-R

As partículas de alginato reticuladas foram obtidas pela técnica de electrospray, utilizando o mesmo equipamento Nano E-Spinning Unit, da marca NaBond Technologies Co. Soluções poliméricas de 0,1% m/v de alginato de sódio solubilizadas em água destilada foram preparadas sob agitação magnética, por 1 hora e meia, à temperatura de 25°C, até completa solubilização do material. Em seguida, 0,40 mL do agente reticulante (cloreto de cálcio), dissolvido em água destilada, na concentração de 1% m/v foi adicionado na solução polimérica de alginato, sob agitação magnética durante 10 minutos (GHAYEMPOUR; MORTAZAVI, 2013; GOMES, 2016 e PACHECO, 2016).

Para controlar o fluxo da solução polimérica foi usada uma bomba de infusão, da marca IRK *Guangxi Weili Ark Technology Co.*, modelo W-J-B-10041498. Nessa bomba foi acoplada uma seringa plástica de 10 mL contendo uma agulha de diâmetro interno de 0,80 mm, que serviu como eletrodo. A vazão da bomba utilizada para todas as distâncias de trabalho foi 9,2 mL/h. Entretanto, para as distâncias 6 e 8 cm, também foram produzidas partículas com a vazão de 7,2 mL/h. As distâncias de trabalho de 2, 4, 6 e 8 cm, bem como as tensões aplicadas de 12, 14, 15 e 16 kV foram analisadas durante o processo de *electrospray* e estão sintetizados na Tabela 2. As partículas foram colhidas durante 30 minutos em um substrato metálico de alumínio posicionado sobre o coletor rotativo aterrado.

Vazão da bomba (mL/h)	Distância de trabalho (cm)	Tensão (kV)
9,2		12
	n	14
	2	15
		16
		12
	Λ	14
	4	15
		16
		12
	6	14
		15
		16
		12
	Q	14
	0	15
		16
7,2		12
	C	14
	Ю	15
		16
		12
	0	14
	ð	15
		16

Tabela 2 – Parâmetros variados para a produção de partículas de ALG-R.

Fonte: Elaborada pela autora.

Posteriormente, as partículas ALG-R foram caracterizadas morfologicamente utilizando o mesmo equipamento de microscopia e procedimento descritos na seção 4.2.2. Os diâmetros médios das partículas foram determinados com auxílio do *software* ImageJ. Foram feitas 100 medidas de diâmetros para cada amostra contendo as partículas ALG-R. Os dados obtidos foram tratados no *software* Origin 9.0®, para se obter a distribuição e o diâmetro médio das partículas de alginato reticuladas. Além disso, foram realizadas as caracterizações físico-químicas e térmicas das amostras com os mesmos parâmetros utilizados para o alginato de sódio, descritos na seção 4.2.1. A técnica de FTIR foi utilizada para avaliar a reticulação do alginato na solução.

4.2.4. Produção e caracterização das NFAC recobertas com partículas de ALG-R produzidas pelas técnicas de eletrofiação e *electrospray* acopladas

As mantas de NFAC recobertas com partículas de ALG-R foram produzidas utilizando a combinação das técnicas de eletrofiação e *electrospray* simultaneamente. A tensão no processo de *electrospray* foi a mesma que a do processo de eletrofiação, pois o aparato experimental utilizado dispõe de apenas uma fonte de alta tensão. Para isso, foi realizada uma modificação na fiação do equipamento Nano E-Spinning Unit: ligação em paralelo da fonte de alta tensão, a fim de que fosse aplicada a mesma tensão em cada solução polimérica. Com a realização dessa modificação, o equipamento ficou com dois fios para ligação de aplicação de alta tensão: um fio conectado à agulha que parte da solução polimérica de AC e o outro fio conectado na agulha que deriva da solução polimérica de alginato reticulado. A vazão da solução polimérica de AC foi controlada pela ação da gravidade, enquanto a solução de ALG-R foi controlada pela bomba de vazão. Os parâmetros utilizados, bem como as diferentes distâncias de trabalho da solução de AC e distâncias de trabalho da solução de ALG-R são apresentados na Tabela 3.

Vazão da bomba (mL/h)	Tensão (kV)	Distância de ALG-R (cm)	Distância de AC (cm)
	14	8	10
			12
			14
	15	8	10
			12
			14
	16	6	10
9,2			12
			14
		8	10
			12
			14
		10	10
			12
			14
	16	2	10
			12
7,2			14
		6	10
			12
			14
		8	10
			12
			14
		10	10
			12
			14

Tabela 3 – Parâmetros de vazão da bomba, tensão e distâncias de trabalho para a produção de NFAC recobertas com partículas de ALG-R.

Fonte: Elaborada pela autora.

A morfologia das mantas NFAC/ALG-R foi analisada por meio da técnica de MEV. A quantidade de contas em cada amostra foi contabilizada numa área de 1,85x10³ µm² nas imagens de MEV. As amostras também foram caracterizadas empregando as técnicas de FTIR, TGA e teste de intumescimento. O equipamento de FTIR, bem como os parâmetros, foram os mesmos utilizados nas caracterizações das matérias-primas. As análises de TGA foram conduzidas em atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL.min⁻¹ e com uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ até que a temperatura varie de 25 °C a 900 °C (BARBOZA, 2015).

A hidrofilicidade das amostras foi avaliada por meio do teste de intumescimento em meio líquido. Para realizar esse teste, as duas mantas selecionadas foram secas numa estufa, a 60°C, por 24 horas. Após a secagem, as amostras foram cortadas no formato quadriculado (1 cm²) e pesadas numa balança analítica da marca Denver Instrument Company, modelo A-250. A seguir, as mantas foram imersas em água destilada, em períodos de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas (HUANGA; YANGA, 2010) e novamente pesadas após a retirada do excesso de água, nos tempos especificados. O teste foi realizado em triplicata. A taxa de intumescimento (Q) foi definida utilizando a equação (02):

$$Q = \frac{W_s - W_d}{W_d},$$
 Eq. (02)

em que W_s é a massa do material inchado e W_d é a massa do material seco. Os dados obtidos foram dispostos graficamente, utilizando o *software* Origin 9.0 ®.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesse capítulo são apresentados e discutidos os dados referentes a produção de nanofibras de acetato de celulose com partículas de alginato reticuladas para potencial aplicação como *scaffolds* na Engenharia de Tecidos. A título de comparação, primeiramente são apresentados e discutidos os dados referentes à caracterização físico-química das matérias-primas. Em seguida, são apresentados os resultados das caracterizações morfológicas e físico-químicas das nanofibras de acetato de celulose sintetizadas pela técnica de eletrofiação, bem como das partículas de alginato reticuladas fabricadas pela técnica de *electrospray*. Finalmente, são mostrados os resultados e as análises morfológicas e físico-químicas das nanofibras de acetato de celulose de celulose recobertas com partículas de alginato reticuladas sintetizadas pelas técnicas de eletrofiação e *electrospray* acopladas.

5.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MATÉRIAS-PRIMAS

Nessa sessão, as análises físico-químicas das matérias-primas de acetato de celulose e alginato de sódio, materiais bases para produção das nanofibras de acetato de celulose e partículas de alginato reticuladas são apresentadas. O espectro FTIR do acetato de celulose é mostrado na Figura 15.



Figura 15 – Espectro de FTIR do acetato de celulose.

Fonte: Elaborada pela autora.

O espectro de FTIR do acetato de celulose apresenta uma banda larga referente ao estiramento do OH aproximadamente em 3480 cm⁻¹ e uma banda referente a deformação do OH por volta de 1640 cm⁻¹. Uma banda intensa, correspondente ao estiramento carbonila de éster atribuída à ligação C=O, característica do acetato de celulose foi observada em torno de 1736 cm⁻¹ (MAJUMDER *et al.*, 2019). Além dessa banda, observa-se os modos de estiramentos simétrico e assimétrico da ligação C-H da celulose por volta de 2944 cm⁻¹, bem como sua deformação simétrica em 1368 cm⁻¹. Em 1220 cm⁻¹, observa-se a banda correspondente ao estiramento da ligação acetila (C-O), responsável pela ligação entre o grupo celulósico e acetil (CAO *et al.*, 2007). A banda em 1032 cm⁻¹ corresponde ao estiramento do grupo C-O e a banda em 902 cm⁻¹ a ligação (1 \rightarrow 4) β (diequatorial) entre cada monômero. Esses modos vibracionais observados são característicos do AC, como visto previamente na literatura (CERQUEIRA, 2009; SILVA, 2014; BRITES, 2015; CANDIDO; GODOY; GONC, 2017; FEI; LIAO; CHENG, 2017; (SOARES et al., 2020).

O espectro de FTIR do alginato de sódio, utilizado como matéria-prima para produção das micro/nanopartículas de alginato reticuladas, é apresentado na Figura 16.



Figura 16 – Espectro de FTIR do alginato de sódio.

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise de FTIR para o alginato de sódio mostra uma banda larga por volta de 3268 cm⁻¹ corresponde ao estiramento do grupamento hidroxila (SARTORI; FINCH; RALPH, 1997) e duas bandas menos acentuadas em torno de 2927 cm⁻¹ corresponde ao estiramento do dupleto simétrico e assimétrico do C-H (OSTROWSKA-CZUBENKO; GIERSZEWSKA-DRU, 2009). Segundo a literatura, os estiramentos simétrico e assimétrico do grupo carboxilato (COO⁻) estão posicionados, respectivamente, nos intervalos espectrais de 1614-1431 cm⁻¹ e 1591-1406 cm⁻¹. (SOARES et al., 2004; OSTROWSKA-CZUBENKO; GIERSZEWSKA-DRU, 2009). Esses modos vibracionais foram encontrados em 1595 cm⁻¹ e 1406 cm⁻¹, respectivamente. Observa-se, também, o estiramento de C-O em 1296 cm⁻¹, o estiramento de C-C em 1124 cm⁻¹, a deformação angular dos C-O-C dos anéis presentes na estrutura química do alginato e dos grupos laterais C-OH e C-H em 1026 cm⁻¹. As bandas correspondentes aos ácidos manurônico (815 cm⁻¹) e gulurônico (777 cm⁻¹) também foram observadas (SOARES et al., 2004), mas apresentam uma transmitância fraca. Isso pode ser explicado pela pequena diferença nas frequências dos monômeros, em concordância com o trabalho de Dupuay e seus colaboradores (1994). O espectro do ALG obtido está em concordância com a literatura (DUPUY, B., ARIEN, A., & MINNOT, 1994; SOARES et al., 2004; FAN et al., 2006; OSTROWSKA-CZUBENKO; GIERSZEWSKA-DRU, 2009).

Os espectros FTIR do acetato de celulose e do alginato de sódio foram detalhadamente analisados na faixa espectral de 2000 a 650 cm⁻¹, a fim de distinguir as bandas características de cada matéria-prima e orientar as análises das seções seguintes. Os espectros são apresentados em conjunto na Figura 17.
Figura 17 - Comparação entre os espectros de FTIR das matérias-primas AC e ALG na faixa espectral de 2000 a 650 cm⁻¹.



Fonte: Elaborada pela autora.

Comparando os espectros das matérias-primas, observa-se três bandas distintas, sendo os números de onda 815, 1406 e 1595 cm⁻¹ para o alginato de sódio e 902, 1220 e 1736 cm⁻¹ para o acetato de celulose. As bandas em 1406 e 1026 cm⁻¹ do alginato de sódio e 1368 e 1032 cm⁻¹ do acetato de celulose apresentam modos que sobrepõem, não permitindo claramente a diferenciação entre os materiais. Dessa forma, os modos vibracionais que foram utilizados para identificar os dois materiais são 815 e 1595 cm⁻¹ para o ALG e 902 e 1736 cm⁻¹ para o AC.

As curvas de TGA e DTGA do acetato de celulose estão representadas na Figura 18.



Figura 18 - Curvas de TGA e DTGA do acetato de celulose.

Fonte: Elaborada pela autora.

O resultado obtido na análise de TGA mostra uma perda de massa de 8% entre o intervalo de temperatura de 25 a 90 °C, que corresponde a evaporação de água residual adsorvida na amostra (SOARES *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2021). A principal faixa de degradação térmica das cadeias poliméricas do AC ocorre no intervalo de temperatura de 280 e 400 °C, com pico máximo em torno de 363 °C (BONZANINI; GONÇALVES, 2005). Nessa faixa, ocorre uma perda de massa de 78%, que está associada à cisão da cadeia polimérica, bem como à decomposição dos grupos acetila (ARTHANAREESWARAN *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2008). O restante da perda de massa pode ser atribuído a carbonização dos produtos degradados a cinzas, que ocorre a partir de 400 °C (HANNA *et al.*, 1999; LUCENA *et al.*, 2003).

As curvas de TGA e DTGA do alginato de sódio são apresentadas na Figura 19.



Figura 19 - Curvas de TGA e DTGA do alginato de sódio.

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise do resultado mostra quatro faixas de degradação térmica. A primeira deterioração ocorre com a perda de 19% em massa entre as temperaturas de 35 e 110 °C. Essa perda está relacionada a perda de água adsorvida na amostra com pico máximo por volta de 57 °C. A principal degradação térmica do alginato de sódio ocorre entre 217 e 290 °C com pico máximo em 242 °C, correspondendo uma perda de 31% em massa. Essa decomposição está associada à degradação do alginato de sódio anidro em carbonato de sódio e ao realinhamento da cadeia (DAEMI; BARIKANI, 2012). A terceira anomalia encontra-se na faixa de temperatura de 550 a 630 °C, com pico máximo em 575 °C. Essa variação de massa de 14% está associada à decomposição do carbonato de sódio com liberação de dióxido de carbono. E a última perda de massa observada, por volta de 849 °C, pode estar associada a carbonização, mantendo um resíduo de 16% da massa inicial (PARHI; RAMANAN; RAY, 2006; SARMENTO *et al.*, 2006).

5.2. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DAS NFAC

Para a produção das nanofibras de acetato de celulose, dois parâmetros do processo foram variados: a distância de trabalho e a tensão aplicada. Alguns parâmetros foram pré-estabelecidos em trabalhos publicados do grupo de pesquisa, tais como a concentração polimérica e a proporção dos solventes (ONILLA *et al.*, 2018 e SOARES *et al.*, 2020).

As imagens obtidas por MEV das NFAC produzidas nas distâncias de trabalho 10, 12 e 14 cm são apresentadas nas Figuras 20, 21 e 22, respectivamente. Também estão inseridas as respectivas distribuições de diâmetro para cada condição analisada. O diâmetro médio, os valores dos parâmetros ambientais assim como o número médio de contas numa área de 1,85x10³ μ m² para cada condição experimental estão sintetizados na Tabela 4.



Figura 20 – Imagens de MEV e distribuições de diâmetros das NFAC produzidas na distância de trabalho de 10 cm.

Legenda: Valores de tensão de (a) 12 kV, (b) 14 kV, (c) 15 kV e (d) 16 kV.



Figura 21 – Imagens de MEV e distribuições de diâmetro das NFAC produzidas na distância de trabalho de 12 cm.

Legenda: Valores de tensão de (a) 12 kV, (b) 14 kV, (c) 15 kV e (d) 16 kV.



Figura 22 – Imagens de MEV e distribuições de diâmetro das NFAC produzidas na distância de trabalho de 14 cm.

Legenda: Valores de tensão de (a) 12 kV, (b) 14 kV, (c) 15 kV e (d) 16 kV.

A umidade relativa do ar variou entre 50 e 63% e a temperatura do ambiente entre 21,5 e 23,2 °C em todos os procedimentos, conforme mostrado na Tabela 4. Os parâmetros ambientais utilizados nesse trabalho, de temperatura e de umidade relativa, não afetaram significativamente a morfologia das nanofibras. Esses resultados estão em concordância com o trabalho De Vrieze e colaboradores (2009) que relataram que para alterar os diâmetros médios das fibras é necessária uma variação de temperatura acima de 10 °C. Esses autores observaram que uma variação da umidade relativa entre 45 e 60% não altera fortemente o diâmetro das fibras de AC. Por isso, esses parâmetros ambientais não foram levados em consideração nas análises da morfologia das nanofibras produzidas no presente trabalho.

Tabela 4 - Diâmetro médio das mantas de nanofibras, umidade relativa do ar, temperatura e número de contas para variações de distância de trabalho e de tensão analisadas.

Distância de trabalho (cm)	Tensão (kV)	Umidade relativa do ar ± 2 (%) / Temperatura ± 0,5 (°C)	Diâmetro médio das nanofibras (nm)	Número médio de contas (± 1)
10	12	57 / 22,1	175 ± 43	128
	14	58 / 22,5	173 ± 38	66
	15	55 / 23,0	166 ± 44	79
	16	55 / 22,9	184 ± 45	61
12	12	50 / 22,5	198 ± 43*	24
	14	61 / 21,5	156 ± 31*	62
	15	50 / 22,7	186 ± 32*	22
	16	50 / 22,9	179 ± 41*	50
14	12	50 / 23,2	181 ± 33	13
	14	62 / 21,5	186 ± 41	34
	15	63 / 21,5	189 ± 45	54
	16	62/21,5	193 ± 50	46
Legenda: *diferença significativa – p<0,05				

Fonte: Elaborada pela autora.

As NFAC apresentam uma morfologia cilíndrica e alongada com diâmetros variados contendo poucas ou muitas contas, dependendo dos parâmetros utilizados. Observa-se a presença de contas pequenas com dimensões da ordem de 0,5 nm e grandes com 4 nm. Todas as amostras para a distância de 10 cm (Figura 20) apresentaram nanofibras com maior quantidade de contas, com o número médio de 83 \pm 30 contas para a área analisada. Para a distância de trabalho de 12 cm (Figura 21), observa-se que as NFAC nas tensões de 12 e 15 kV apresentam uma maior uniformidade e pequena quantidade contas, com média igual de 23 \pm 1 contas por área. Entretanto, as amostras de 14 kV e 16 kV apresentam médias de 62 \pm 1 e 50 \pm 3 contas/área, respectivamente. Finalmente, para maior distância de trabalho - 14 cm - (Figura 22), as nanofibras obtidas nas tensões de 14, 15 e 16 kV apresentam valores intermediários entre 34 a 54 contas/área. Exceto a amostra de tensão 12 kV contém nanofibras como menor número de contas (13 \pm 1 contas/área). Em síntese, as nanofibras com menor quantidade de contas são as obtidas na distância de trabalho de 12 cm.

Ao se manter a mesma tensão aplicada e variar as distâncias de trabalho, observa-se uma tendência de que, à medida que a distância aumenta, a frequência de contas diminuí, como visto na Tabela 4. Outro efeito observado foi a menor deposição de fibras com o aumento da distância de trabalho para a tensão de 14 kV. Para a tensão de 16 kV, a condição de 12 cm foi a que apresentou NFAC com maior deposição e 50 contas por área. Esse comportamento pode ser atribuído à elevada tensão aplicada. Sabe-se que para uma elevada tensão, maiores serão as forças coulombianas, bem como a densidade de carga e, consequentemente, mais acelerado estará o jato da solução polimérica propiciando maior formação de grânulos ou contas (LIU *et al.*, 2017).

O diâmetro médio obtido para as mantas de NFAC no presente trabalho foi em torno de 181 nm. Resultado similares foram observados por Tungprapa e colaboradores (2007) ao produzirem mantas de nanofibras com diâmetro médio de 160 ± 140 nm para a proporção de acetona/DMAc 1:1 (v/v) com solução de 16% m/v de AC - 30.000 Da. Entretanto, a ordem de grandeza obtida no trabalho de Soares e colaboradores (2020) foi de 345 ± 141 nm. Apesar desses últimos autores utilizarem os mesmos parâmetros de produção do presente trabalho, o diâmetro interno da agulha por eles usada foi de 0,80 mm, e com diâmetro maior, o fluxo da solução polimérica também é maior, resultando em um diâmetro médio superior das nanofibras (SILL; RECUM, 2008).

Analisando a ordem de grandeza do diâmetro das mantas de NFAC para uma distância de trabalho fixa e diferentes valores de tensões, as distâncias de trabalho de 10 e 12 cm resultaram em nanofibras com o mesmo intervalo de diâmetros, isto é,

entre 50 e 600 nm. Enquanto para a distância de 14 cm, a faixa de diâmetro foi de 10 a 600 nm. Essas distribuições de diâmetros das mantas de NFAC podem ser vistas nas Figuras 20-22. À medida que a tensão aumenta (de 12 para 16 kV) para as distâncias de 10 e 14 cm não observa-se uma diferença significativa do diâmetro médio das nanofibras (p>0,05). Dessa forma, não pode-se concluir que o aumento da tensão, aumenta o diâmetro médio das mantas de NFAC. Soares e colaboradores (2020) também confirmaram, para a distância de 10 cm, que o aumento de tensão aplicada (15 para 18 kV), não propicia uma mudança significativa no diâmetro médio (p>0,05). Entretanto, para a distância de 12 cm, observa-se uma mudança significativa no diâmetro médio (p<0,05). Assim, pode-se concluir que para essa distância de trabalho, o aumento da tensão, diminui o diâmetro médio das NFAC. Angel e colaboradores (2019) também observaram dois fenômenos opostos: aumento e diminuição do diâmetro médio, com o aumento da tensão para uma concentração fixa de AC independente da distância. A literatura também relata esse comportamento para outros polímeros como PVA (ZHANG et al., 2005; RODOPLU; MUTLU, 2012) e PVDF (MATABOLA; MOUTLOALI, 2013; SADAT et al., 2017).

A irregularidade do comportamento do diâmetro médio das nanofibras ocorre devido aos parâmetros de processo, de solução ou ambientais que influenciam a produção de nanofibras pela técnica de eletrofiação (LIU *et al.*, 2017). A escolha de cada parâmetro possibilita diversas combinações de processamento. Além disso, para cada combinação, uma variável pode contribuir mais ou menos para a morfologia das nanofibras. Caso a distância de trabalho for menor do que o valor mínimo necessário para a solução polimérica se estirar, haverá uma maior predominância de nanofibras com diâmetro médio elevado. Por outro lado, caso a tensão aplicada seja baixa, isso é, a velocidade de voo da solução polimérica seja pequena, maior será a chance de produzir nanofibras com menores diâmetros.

Para realizar uma análise da variação da distância de trabalho no diâmetro médio das nanofibras produzidas, utilizou-se as distâncias de 10 e 14 cm e os diâmetros médios nessa condição foram de 175 ± 7 nm e 187 ± 5 nm, respectivamente. Dessa forma, um acréscimo de 6,8% no valor dos diâmetros médios das mantas de NFAC foi observado à medida que a distância de trabalho aumentou. Christoforou e Doumanidis (2010) observaram um comportamento contrário, ou seja, o diâmetro das nanofibras diminui levemente com o aumento da distância de trabalho. Isso pode ser explicado pelo fato de que quanto maior a distância, maior é o tempo

para a evaporação do solvente, permitindo um maior alongamento das cadeias poliméricas e consequentemente menores diâmetros. Entretanto, o solvente utilizado nesse estudo foi apenas acetona, parâmetro que influencia fortemente na morfologia das nanofibras (LIU; HSIEH, 2002; TUNGPRAPA *et al.*, 2007; CELEBIOGLU; UYAR, 2011). No presente estudo utilizou-se dois solventes (acetona/DMF, 3:1), e a temperatura de ebulição dessa mistura foi estimada pela regra da mistura e o valor encontrado foi 79,7 °C. Dessa forma, a mistura de solventes pode não ter tido tempo suficiente para evaporar, e consequentemente, isso permitiu um aumento dos diâmetros médios das NFAC com o aumento da distância de trabalho.

A título de ilustração os espectros de FTIR do acetato de celulose (AC) e das nanofibras de acetato de celulose (NFAC) na condição de processamento de 12 cm e 16 kV estão apresentados na Figura 23.

Figura 23 - Espectros de FTIR do acetato de celulose (AC) e das nanofibras de acetato de celulose (NFAC).



Fonte: Elaborada pela autora.

Conforme esperado, os modos vibracionais das NFAC são muito similares aos modos da matéria-prima descritos na seção 5.1. Contudo, as bandas em 1736 e 1219 cm⁻¹, correspondentes ao estiramento carbonila de éster atribuída à ligação C=O e ao

estiramento do grupo acetila (C-O), sofreram um descolamento para 1753 e 1238 cm⁻¹, respectivamente. As bandas são deslocadas para valores mais altos de número de ondas, quando a amostra apresenta uma maior quantidade de componentes amorfos, como no caso das nanofibras. (CIOLACU; CIOLACU; POPA, 2011) Ressalta-se que as bandas dos grupos característicos do acetato de celulose são as mesmas observadas no trabalho de Soares e colaboradores (2020).

As curvas de TGA e DTGA das nanofibras de acetato de celulose estão representadas na Figura 24.





A principal faixa de degradação térmica das NFAC ocorre entre as temperaturas de 250 e 440 °C, com pico máximo em 355 °C. Nessa faixa, ocorre uma perda de massa de 77%, que está associada à pirólise da cadeia polimérica, bem como à decomposição dos grupos acetila (ARTHANAREESWARAN *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2008). O restante da perda de massa, de 13%, pode ser atribuído a carbonização dos produtos degradados a cinzas, que ocorre a partir de 450 °C (HANNA *et al.*, 1999; LUCENA *et al.*, 2003). Além dessas perdas, observa-se uma perda de massa em torno de 8%, por volta da temperatura de 46 °C. Essa perda pode ser atribuída a evaporação dos solventes remanescentes na NFAC. Esse resultado está de acordo com o trabalho anterior do grupo de pesquisa (SOARES *et al.*, 2020).

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DAS MICRO/NANO PARTÍCULAS DE ALGINATO RETICULADAS (ALG-R)

As partículas de alginato reticuladas (ALG-R) produzidas pelo processo *electrospray* em placa foram produzidas com dois valores de vazão da solução polimérica: 9,2 e 7,2 mL/h. Para a vazão de 9,2 mL/h, utilizou-se quatro distâncias de trabalho (6, 8, 10 e 12 cm) e para cada distância, quatro valores de tensão (12, 14, 15 e 16 kV). No caso da vazão de 7,2 mL/h, as partículas foram produzidas somente para as distâncias de trabalho 6 e 8 cm. Para facilitar a análise, os resultados das produções das diferentes vazões são apresentados separadamente e foi realizada uma padronização da morfologia, como apresentada no Quadro 1.

Quadro 1 – Padronização da morfologia das partículas de alginato.

FORMATOS ARREDONDADOS NOMENCLATURAS		FORMATOS	NOMENCLATURAS
\bigcirc	ovalado		retangular
\bigcirc	circular	\searrow	dendrítico

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.1. Produção de partículas de alginato na vazão de 9,2 mL/h

As imagens obtidas por MEV e as respectivas distribuições de diâmetro das partículas de ALG-R produzidas com vazão de 9,2 mL/h são representadas nas Figuras 25-28 O diâmetro médio das partículas de alginato reticuladas para cada condição é apresentado na Tabela 5.

Analisando as imagens apresentadas na Figura 25 para a produção de partículas de alginato reticuladas na distância de 2 cm, observa-se que houve um aumento da dimensão das partículas, bem como uma maior deposição, à medida que se intensifica a tensão aplicada. As formas das partículas para as duas primeiras tensões apresentam uma morfologia ovalada, enqu que para os maiores valores de tensão obtém-se, na maioria, partículas retangulares. Observa-se claramente que ocorreu um aumento do diâmetro médio das partículas com a elevação da tensão, variando de 304 ± 84 para a amostra de 12 kV até 1418 ± 318 nm para de 16 kV. Para

a condição de 16 kV, as partículas apresentaram uma distribuição de diâmetros mais ampla, na faixa de 509 a 3050 nm.

A Figura 26 mostra as imagens obtidas por MEV, para a amostra preparada para a distância de trabalho de 4 cm para as quatro tensões, bem como as distribuições de diâmetro das partículas. Observa-se que a maioria das partículas apresenta uma forma ovalada, exceto para a tensão de 15 kV, na qual encontram-se também algumas partículas na forma retangular de dimensões maiores. Comparando as imagens, conclui-se que a amostra de 16 kV apresenta menor deposição de partículas de alginato. Os diâmetros médios das partículas não apresentaram uma clara dependência em função da tensão aplicada (Tabela 5). Na amostra de 15 kV, a distribuição de diâmetros é mais ampla, apresentando maior concentração em valores abaixo de 800 nm, mas também microcristais com dimensões na faixa de 800 a 3350 nm.

As imagens de MEV, bem com as respectivas distribuições para as micro/nanopartículas de alginato reticuladas na distância de 6 cm estão mostradas na Figura 27. Para todas as tensões aplicadas, as partículas apresentam uma morfologia circular e uma maior homogeneidade de tamanho médio de partículas independente da tensão aplicada. O diâmetro médio das nanopartículas fica em torno de 223 ± 38 nm (Tabela 5). Todas as amostras apresentaram praticamente a mesma dispersão e deposição de nanopartículas.

As imagens e as distribuições das partículas de alginato reticuladas produzidas na distância de 8 cm estão representadas na Figura 28. Para a tensão de 12 kV, observa-se que o formato da amostra é dendrítico e as dimensões estão na ordem de grandeza de micrômetros, ou seja, $1,245 \pm 0,533 \mu$ m. Para os outros valores de tensão, verifica-se que há uma maior homogeneidade dos tamanhos médios das partículas, além de apresentarem formas circulares similares. Os diâmetros médios para cada amostra estão apresentados na Tabela 5, sendo que o valor médio para as três maiores tensões é 259 \pm 17 nm.

Figura 25 – Imagens de MEV e distribuições de diâmetro para ALG-R produzidas com distância de trabalho de 2 cm e vazão da bomba de 9,2 mL/h.



Legenda: Tensão de (a) 12 kV, (b) 14 kV, (c) 15 kV e (d) 16 kV.

Figura 26 – Imagens de MEV e distribuições de diâmetro para ALG-R produzidas com distância de trabalho de 4 cm e vazão da bomba de 9,2 mL/h.



Legenda: Tensão de (a) 12 kV, (b) 14 kV, (c) 15 kV e (d) 16 kV.





Legenda: Tensão de (a) 12 kV, (b) 14 kV, (c) 15 kV e (d) 16 kV.





Legenda: Tensão de (a) 12 kV, (b) 14 kV, (c) 15 kV e (d) 16 kV.

Distância de trabalho (cm)	Tensão (kV)	Diâmetro médio das partículas (nm) *
	12	304 ± 84
C	14	239 ± 61
2	15	442 ± 104
	16	1418 ± 318
	12	297 ± 66
4	14	217 ± 52
4	15	552 ± 381
	16	176 ± 38
	12	188 ± 40
G	14	277 ± 46
0	15	221 ± 49
	16	206 ± 41
	12	1245 ± 267
0	14	279 ± 62
ð	15	252 ± 44
	16	247 ± 42

Tabela 5 - Diâmetro médio das partículas de ALG-R para a vazão da bomba de

9,2 mL/h, variando a distância de trabalho e a tensão.

Legenda: *diferença significativa – p<0,05

Fonte: Elaborada pela autora.

Vale ressaltar que os diversos formatos se devem ao valor limite de Rayleight. O formato esférico é obtido por meio da evaporação do solvente, em que as gotículas antes de atingir o limite de Rayleight (L_R), não sofre interferência ou deformação pela fissão de Coulomb. Quando ocorre a fissão, a gotícula é deformada em formatos irregulares. Por outro lado, quando o solvente evapora em sua totalidade, as partículas congelam no momento da fissão, ocasionando um formato complexo, que pode ser a mistura entre os formatos esférico e irregular (ALMERÍA *et al.*, 2010)

A partir das análises acima, pode-se concluir que as distâncias de trabalho de 6 e 8 cm são as melhores para o controle da produção e a padronização para o processo de produção de partículas de alginato na vazão de 9,2 mL/h, pois as partículas de alginato reticuladas apresentaram uma morfologia arredondada.

5.3.2. Produção de partículas de alginato na vazão de 7,2 mL/h

As Figuras 29 e 30 apresentam as imagens obtidas no MEV das partículas de alginato reticuladas e produzidas com a vazão da bomba de 7,2 mL/h nas distâncias de trabalho de 6 e 8 cm, respectivamente.





Legenda: Tensão de (a) 12 kV, (b) 14 kV, (c) 15 kV e (d) 16 kV.

Figura 30 – Imagens de MEV e distribuições de diâmetro para ALG-R produzidas com distância de trabalho de 8 cm e vazão da bomba de 7,2 mL/h.



Legenda: Tensão de (a) 12 kV, (b) 14 kV, (c) 15 kV e (d) 16 kV.

Tensão (kV)	Diâmetro médio das partículas (nm) *	
12	171 ± 29	
14	232 ± 44	
15	234 ± 48	
16	200 ± 39	
12	146 ± 27	
14	194 ± 36	
15	253 ± 54	
16	249 ± 59	
	Tensão (kV) 12 14 15 16 12 14 15 16 12 14 15 14 15 16 15 16	

Tabela 6 - Diâmetro médio das partículas de ALG-R para a vazão da bomba de

7,2 mL/h, variando a distância de trabalho e a tensão.

Legenda: *diferença significativa – p<0,05

Fonte: Elaborada pela autora.

As morfologias das partículas apresentam predominantemente uma forma arredondada. Os diâmetros médios para a distância de 6 cm variaram de 171 ± 29 a 234 ± 48 nm, enquanto para a distância de 8 cm variaram de 146 ± 27 a 253 ± 54 nm. Observa-se que, para ambas as distâncias, o diâmetro médio das partículas apresenta um discreto acréscimo à medida que a tensão aumenta. Esse comportamento é divergente com a literatura para nanopartículas de alginato reticuladas com compostos biológicos. Alallam e colaboradores (2020) produziram nanopartículas de alginato com CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) e observaram uma diminuição de 679 nm para 260 nm (redução em torno de 68,9%), quando a tensão foi aumentada de 9,5 para 12,5 kV. As nanopartículas foram produzidas pela técnica electrospray em solução. As mesmas permaneceram no banho de gelificação por 15 minutos e posteriormente lavadas em água destilada. Esses autores propuseram que a redução das dimensões das partículas está relacionada ao fato de que a tensão aplicada cria maiores pontos de cargas elétricas na ponta da agulha. Dessa forma, o aumento da tensão ocasiona um acréscimo de carga elétrica o que intensifica as forças de repulsão entre as gotas adjacentes, produzindo partículas menores (ALALLAM et al., 2020). Também no trabalho de Moghaddam e colaboradores (2015) observou-se uma diminuição do tamanho das microcápsulas de alginato de cálcio contendo nonadecano (~ 700 para 500 µm) com o aumento da tensão (de 12 para 16 kV) (MOGHADDAM; MAJID; KHAYAMIAN, 2015). A técnica de produção das microcápsulas também foi a mesma do grupo anterior, *electrospray* em solução. O banho de gelificação ficou sobre agitação durante

30 minutos, enquanto as cápsulas eram curadas. É possível que essa aparente contradição possa ser explicada pelo tipo de técnica utilizada no presente trabalho, que difere das técnicas presentes na literatura. Não foram encontrados trabalhos na literatura que utilizaram a mesma técnica adotada nesse trabalho. Portanto, não foi possível uma comparação direta.

A comparação entre os espectros FTIR do alginato de sódio (ALG) e o alginato reticulado com cloreto de cálcio (ALG-R) é apresentada na Figura 31. A amostra representativa ilustrada no espectro é a de partículas de alginato produzidas com os seguintes parâmetros: vazão de 9,2 mL/h, distância de 2 cm e tensão 16 kV.

Figura 31 - Comparação entre os espectros de FTIR do ALG e do ALG-R.



Fonte: Elaborada pela autora.

Os espectros apresentam uma ligeira diferença que pode estar relacionada a substituição das interações dos íons monovalentes de sódio pelas interações dos íons bivalentes de cálcio com os grupos COO⁻ livres do alginato (PAPAGEORGIOU *et al.*, 2010). Observa-se que os modos vibracionais localizados em 1595 e 1406 cm⁻¹, no espectro do alginato de sódio, correspondem, respectivamente, aos estiramentos assimétrico e simétrico dos grupos carboxilatos (COO⁻). No espectro do alginato reticulado com cloreto de cálcio, esses foram deslocados para 1632 e 1437 cm⁻¹,

indicando assim a substituição dos cátions de Na⁺ por Ca²⁺ (DUPUY, B., ARIEN, A., & MINNOT, 1994; CHAN; LEE; HENG, 2006, e DAEMI; BARIKANI, 2012).

É importante ressaltar que a técnica de FTIR pode ser utilizada para avaliar a reticulação do alginato na solução por meio da visualização da banda característica em torno de 1737 cm⁻¹, que sugere o estiramento de Ca²⁺ com o grupo COO⁻ livre presente no alginato (DUPUY, B., ARIEN, A., & MINNOT, 1994). Esta banda está ausente no FTIR do alginato de sódio (CHAN; LEE; HENG, 2006). Na figura 31 observa-se no espectro de ALG-R que a banda próxima de 1737 cm⁻¹ sofreu um deslocamento para a região de 1794 cm⁻¹, contudo, sabe-se que o grau de deslocamento pode variar dependendo da proporção dos grupos M/G e do comprimento dos blocos G (NIKKO *et al.*, 2018).

5.4. CARACTERIZAÇÃO MORFOLOGÍCA E FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOFIBRAS DE AC COM PARTÍCULAS DE ALGINATO RETICULADAS (NFAC/ALG-R)

As mantas de nanofibras de acetato de celulose com micro/nano partículas de alginato reticuladas (NFAC/ALG-R) foram produzidas pelas técnicas de eletrofiação e *electrospray* simultâneas para dois valores de vazão da solução polimérica da solução de alginato: 9,2 e 7,2 mL/h. Para cada valor de vazão foram variados os parâmetros da síntese: tensão, distâncias de trabalho da solução de alginato e de acetato de celulose, de acordo com os valores definidos na Tabela 03, apresentada na página 64.

5.4.1. Produção de NFAC/ALG-R para a vazão de 9,2 mL/h

As imagens obtidas por MEV para as mantas sintetizadas com vazão de 9,2 mL/h, assim como as distribuições de diâmetro das nanofibras, estão representadas nas Figuras 32-36 para diferentes valores de distâncias de trabalho. Na Tabela 7 estão resumidos os diâmetros médios das NFAC/ALG-R, a umidade relativa do ar, a temperatura, assim como o número médio de contas. A umidade variou entre 51 e 75% e a temperatura variou entre 21,2 e 24,0 °C. Essas variações não afetam significativamente o diâmetro médio das NFAC/ALG-R, conforme discutido na seção 5.2.

As imagens obtidas por MEV para as mantas de NFAC/ALG-R na tensão de 14 kV e distância de trabalho do ALG-R de 8 cm estão apresentadas na Figura 32 para três valores de distâncias de trabalho do AC. As NFAC apresentam um formato cilíndrico e alongado, enquanto as nanopartículas de ALG-R não podem ser observadas nas imagens devido à sua sobreposição nas nanofibras de acetato de celulose, bem como a escassez de contraste. À medida que a distância de trabalho do AC aumenta (de 10 para 14 cm), observa-se uma diferença do diâmetro médio das fibras (p<0,05), como pode ser visto na Tabela 7. Os diâmetros das nanofibras variaram entre 50 a 400 nm para os três valores de distância de trabalho do AC, corroborando com as distribuições das NFAC puras apresentadas nas Figuras 20-22. Observa-se somente a presença de contas maiores para todas as condições de 14 kV, na qual a quantidade varia em média de 30 a 17 com a distância de trabalho do AC. Para a distância de trabalho de AC de 14 cm, encontra-se a menor número médio de contas.



Legenda: Distâncias de AC de 10 cm (a-b), 12 cm (c-d) e 14 cm (e-f). Fonte: Elaborada pela autora.





ALG-R de 6 cm.

100



Legenda: Distâncias de AC de 10 cm (a-b), 12 cm (c-d) e 14 cm (e-f). Fonte: Elaborada pela autora.



Legenda: Distâncias de AC de 10 cm (a-b), 12 cm (c-d) e 14 cm (e-f). Fonte: Elaborada pela autora.



Legenda: Distâncias de AC de 10 cm (a-b), 12 cm (c-d) e 14 cm (e-f). Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 7 - Diâmetro médio das mantas de NFAC/ALG-R e número de contaspara a vazão de 9,2 mL/h e diferentes de distâncias de trabalho de AC e de

Tensão (kV)	Distância de trabalho		Umidade relativa	Diâmetro módio dos	Número
	alginato (cm)	acetato (cm)	00 ar ± 2 (%)7 Temperatura ± 0,5 (°C)	nanofibras (nm)	médio de contas (±1)
14	8	10	65 / 22,7	198 ± 41	30
		12	63 / 23,1	180 ± 30	21
		14	62 / 23,2	186 ± 40	17
15	8	10	64 / 22,5	202 ± 41*	28
		12	64 / 23,2	190 ± 33*	27
		14	60 / 22,8	173 ± 36*	19
16	6	10	51 / 21,2	223 ± 44*	10
		12	64 / 21,6	197 ± 45*	38
		14	70 / 21,4	182 ± 38*	15
	8	10	75 / 24,0	228 ± 54*	8
		12	64 / 21,7	163 ± 35*	35
		14	63 / 22,0	170 ± 34*	26
	10	10	52 / 21,5	232 ± 44*	7
		12	67 / 21,5	163 ± 36*	36
		14	68 / 21,2	143 ± 31*	27

ALG-R.

Legenda: *diferença significativa – p<0,05

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 33, encontram-se as imagens MEV das mantas de NFAC/ALG-R para a tensão de 15 kV e distância de trabalho de 8 cm do alginato. Para essa condição, observa-se que existe uma diminuição do diâmetro médio das nanofibras, à medida que aumenta a distância de trabalho do AC (p<0,05). Esses valores podem ser vistos na Tabela 7. O intervalo dos diâmetros está entre 50 e 450 nm, similar ao intervalo das NFAC puras. O número de contas apresenta o mesmo comportamento observado das mantas com tensão de 14 kV, em que novamente a distância de trabalho de 14 cm apresenta menor quantidade de contas grandes (19 ± 1).

A análise da morfologia das mantas de NFAC/ALG-R para a condição de 16 kV foi realizada com base nas imagens MEV apresentadas nas Figuras 34-36. Para as mantas produzidas na distância de 10 cm do AC, tem-se uma maior dispersão de diâmetros, ou seja, o intervalo varia entre 50 e 600 nm. Entretanto, para as outras duas distâncias do AC (12 e 14 cm) tem-se uma distribuição mais estreita de 50 a 400 nm, independente da distância de trabalho do ALG-R. Observa-se que independente

da distância de trabalho do ALG-R para a tensão de 16 kV, à medida que aumenta a distância do AC (de 10 para 14 cm), o diâmetro médio das nanofibras diminui, como pode ser atestado na Tabela 7. Para facilitar a visualização dessa análise apresentase na Figura 37, a comparação dos diâmetros médios das mantas de NFAC/ALG-R.

Figura 37 - Comparação dos diâmetros médios das mantas de NFAC/ALG-R em relação a distância de trabalho do ALG-R para os 3 valores de distância de trabalho do AC na tensão de 16 kV.



Fonte: Elaborada pela autora.

Comparando as mantas de NFAC/ALG-R com as NFAC puras, ambas para a tensão de 16 kV, verifica-se que o diâmetro médio teve um acréscimo médio de 24% para a distância de 10 cm do AC. Para as outras distâncias do AC, observou-se uma diminuição dos diâmetros médios das nanofibras, sendo que para a distância de 12 cm um valor médio de 10% e para a distância de 14 cm uma variação de 6% a 35%. Analisando o número médio de contas, observa-se que para a distância de trabalho de 12 cm do AC (Figuras 34-36 (c)), independente da distância de trabalho do ALG-R, as mantas de NFAC/ALG-R apresentam a maior quantidade de contas nas nanofibras de AC, com média de 36 \pm 2 contas. Por outro lado, para a distância de trabalho de 10 cm do AC (Figuras 34-36(a)), as mantas de NFAC/ALG-R contêm uma menor quantidade de contas, com média de 8 \pm 2 contas grandes.

5.4.2. Produção de NFAC/ALG-R para a vazão de 7,2 mL/h

As imagens do MEV relativas as mantas produzidas na vazão de 7,2 mL/h estão representadas nas Figuras 38-41, bem como as distribuições de diâmetro das nanofibras. Os diâmetros médios das NFAC/ALG-R, as condições ambientais e o número médio de contas estão apresentados na Tabela 8.

As mantas de NFAC/ALG-R produzidas na distância de trabalho de ALG-R de 2 cm apresentam a maior dispersão do diâmetro médio das partículas dentre as diferenças de trabalho do AC, variando entre 50 a 1000 nm. Entretanto, para as outras distâncias do ALG-R, o intervalo de diâmetro médio das nanofibras é mais estreito, de 50 a 600 nm. Vale também ressaltar que independente da distância de trabalho do AC, observa-se que, à medida que aumenta a distância do ALG-R (de 2 para 10 cm), o diâmetro médio das nanofibras diminui. O mesmo comportamento é observado para o aumento da distância de trabalho do AC, considerando uma mesma distância de trabalho do ALG-R.

Para as maiores distâncias do ALG-R (8 e 10 cm), há uma maior homogeneidade na deposição de nanofibras (Figuras 40 e 41), enquanto para as distâncias de 2 e 6 cm do ALG-R, verifica-se um menor número de nanofibras, à medida que aumenta a distância de trabalho do AC. Esse resultado pode ser observado nas Figuras 38 e 39. É importante ressaltar que a manta de NFAC/ALG-R produzida nas distâncias de 2 cm do ALG e de 14 cm do AC apresenta a menor deposição de nanofibras (Figura 38 (e)).







Legenda: Distâncias de AC de 10 cm (a-b), 12 cm (c-d) e 14 cm (e-f). Fonte: Elaborada pela autora.






Legenda: Distâncias de AC de 10 cm (a-b), 12 cm (c-d) e 14 cm (e-f). Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 8 - Diâmetro médio das mantas de NFAC/ALG-R e número de contas para a vazão de 7,2 mL/h, tensão de 16 kV e diferentes distâncias de trabalho

Distância do alginato (cm)	Distância do acetato (cm)	Umidade relativa do ar ± 2 (%) / Temperatura ± 0,5 (°C)	Diâmetro médio das nanofibras (nm) *	Número médio de contas (+- 1)
2	10	51 / 21,4	300 ± 85	4
	12	52 / 21,5	326 ± 66	4
	14	53 / 21,5	208 ± 80	17
6	10	50 / 22,7	263 ± 57	7
	12	68 / 21,8	232 ± 48	10
	14	70 / 22,0	249 ± 49	25
8	10	49 / 22,4	270 ± 61	13
	12	49 / 22,7	249 ± 54	6
	14	49 / 22,6	217 ± 40	4
10	10	50 / 22,7	254 ± 41	4
	12	70 / 21,9	291 ± 70	18
	14	67 / 22,0	198 ± 44	18
Laganda, *diference significative n.c. 0.05				

de AC e de ALG-R.

Legenda: *diferença significativa – p<0,05

Fonte: Elaborada pela autora.

Verifica-se que na maioria das mantas de NFAC/ALG-R não se observa claramente as partículas de ALG-R recobrindo as nanofibras, contudo visualiza-se as mesmas depositadas no papel coletor. Para as mantas de NFAC/ALG-R com as distâncias de 2 cm do ALG-R e de 12 cm do AC ocorre uma grande deposição de partículas de ALG-R de dimensões micrométricas ao longo do comprimento das nanofibras (Figura 38 (c)). A confirmação da presença das partículas de ALG-R será abordada na análise de FTIR apresentada na seção 5.4.3. 5.4.3. Comparação das mantas de NFAC/ALG-R com vazão de 9,2 mL e 7,2 mL/h com as NFAC puras

Os diagramas obtidos em função das distâncias de trabalho de AC e ALG-R para a tensão de 16 kV, apresentados na Figura 42, relacionam os diâmetros médios das NFAC puras com as mantas de NFAC/ALG-R para as vazões de 9,2 e 7,2 mL/h. Observa-se que independente das distâncias de trabalho do AC (Figura 42 (a-c)) e do ALG-R (Figura 42 (d-f)), os diâmetros médios das mantas de NFAC/ALG-R aumentam com a diminuição da vazão da solução polimérica de alginato reticulada. Comparando essas com as NFAC puras, verifica-se também que as mantas de NFAC/ALG-R apresentam maiores valores de diâmetro médio. Esse comportamento também foi observado no trabalho de Braghirolli e colaboradores (2015), em que eles produziram nanofibras de PLGA com biopartículas, com o objetivo de fabricar um *scaffold* para a Engenharia de Tecidos utilizando também as técnicas de eletrofiação e *electrospray* simultaneamente. Os autores observaram que o diâmetro médio das nanofibras de PLGA com biopartículas aumentou de 1,5 ± 2,2 µm para 3,5 ± 6,1 µm (BRAGHIROLLI *et al.*, 2015).

Utilizando a combinação das técnicas de eletrofiação e *electrospray*, ou seja, acrescentando as micropartículas de alginato à manta de acetato de celulose, observa-se que, para a maioria das amostras, ocorreu aumento no diâmetro médio das nanofibras, independente das distâncias de trabalho da solução de acetato de celulose e da solução de alginato.



Figura 42 – Diagramas dos diâmetros médios das NFAC e das mantas de NFAC/ALG-R para as vazões de 9,2 e 7,2 mL/h, variando as distâncias de trabalho de AC (a-c) e ALG-R (d-f).

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 43 compara os espectros de FTIR das nanofibras de acetato de celulose (NFAC), partículas de alginato reticuladas (ALG-R) e as mantas de NFAC/ALG-R.

Figura 43 – Espectros de FTIR das NFAC, das ALG-R e das NFAC/ALG-R.





Os modos vibracionais localizados a 1574, 1536 e 840 cm⁻¹ são característicos das partículas de ALG-R, que podem ser vistas claramente nos espectros do ALG-R puro e das mantas de NFAC/ALG-R, conforme indicado na Figura 43. Os modos mais intensos das NFAC puras, localizados a 1753, 1368, 1238 e 1050 cm⁻¹, são também observados no espectro da manta de NFAC/ALG-R. Essa

comparação permite identificar as bandas características de ambos os materiais, além de confirmar a deposição de partículas de alginato nas mantas.

5.4.3.2. Análise térmica (TGA)

As curvas de TGA e DTGA das nanofibras de acetato de celulose com partículas de alginato reticuladas estão apresentadas na Figura 44.

Figura 44 - Curvas de TGA e DTGA das NFAC/ALG-R no intervalo de temperatura de 25 a 900 °C.



Fonte: Elaborada pela autora.

Para a manta de NFAC/ALG-R, observa-se uma perda inicial de massa de 7%, com pico máximo em torno de 40 °C, correspondendo a eliminação da água adsorvida na amostra (SOARES *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2021). Em torno de 233 °C, encontra-se uma perda de massa que indica a degradação do alginato de sódio anidro em carbonato de sódio e ao realinhamento da cadeia (DAEMI; BARIKANI, 2012). A principal degradação térmica das mantas NFAC/ALG-R, com perda de massa de 49%, ocorre entre 260 e 536 °C, com pico máximo em 342 °C. Essa decomposição corresponde à cisão da cadeia polimérica do acetato de celulose, bem

como à decomposição dos seus grupos acetila (ARTHANAREESWARAN *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2008). A partir de 540 °C, observa-se uma perda de 27% de massa relacionada a carbonização do acetato de celulose, bem como do alginato de sódio (ARTHANAREESWARAN *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2008; DAEMI; BARIKANI, 2012). O restante de massa em torno de 9% é atribuído a carbonização dos produtos degradados a cinzas para o acetato de celulose (HANNA *et al.*, 1999; LUCENA *et al.*, 2003) e à decomposição do carbonato de sódio com liberação de dióxido de carbono para o alginato de sódio (PARHI; RAMANAN; RAY, 2006; SARMENTO *et al.*, 2006).

5.4.3.3. Teste de intumescimento

Os resultados do teste de intumescimento para as amostras estão representados na Figura 45.

Figura 45 - Teste de intumescimento referentes às NFAC, às partículas de ALG-R e às NFAC/ALG-R.



Fonte: Elaborada pela autora.

Na primeira hora, tanto as NFAC quanto as mantas de NFAC/ALG-R imersas na solução de água destilada absorveram moléculas de água, com uma porcentagem de 350 a 450%. As partículas de alginato reticuladas com cloreto de cálcio apresentaram uma faixa de 50 a 120% de absorção de umidade. O elevado valor do intumescimento do AC é devido aos diversos grupos hidroxilas presentes em sua estrutura química. Esses resultados encontrados para as nanofibras de acetato de celulose e as partículas de alginato estão de acordo com a literatura (FAN *et al.*, 2006; ZACTITI; KIECKBUSCH, 2009; BRITES, 2015).

As NFAC recobertas com partículas de alginato reticuladas apresentaram maior intumescimento em comparação com as NFAC puras. As porcentagens de absorção de água observadas para as NFAC/ALG-R foram na faixa de 250 a 450%. Isso pode ter ocorrido porque as partículas de alginato de sódio reticuladas com cloreto de cálcio atraem as moléculas de água para a matriz das nanofibras, devido ao seu caráter hidrofílico, já que as partículas ALG-R absorvem água mesmo quando estão isoladas. Sabendo-se que a maioria das células animais preferem superfícies hidrofílicas para adesão, crescimento e diferenciação celular (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2018), a característica observada é extremamente importante para a interação célula-material e para futura utilização desse material na Engenharia de Tecido Muscular.

6. CONCLUSÃO

As NFAC produzidas pela técnica de eletrofiação apresentaram uma morfologia cilíndrica e alongada com diâmetros no valor em torno de 181 nm, contendo contas pequenas com dimensões de 0,5 nm e grandes com 4 nm. As NFAC obtidas na distância de trabalho de 12 cm e tensões de 12 e 15 kV, apresentaram maior uniformidade e média de 23 ± 1 contas por área. Em geral, as NFAC produzidas nas distâncias de trabalho de 10 e 14 cm apresentaram maior quantidade de contas, variando de 34 a 83 contas/área. Em relação ao intervalo de diâmetros, a distância de trabalho de 10 e 14 cm não se observou uma diferença significativa nos diâmetros médios com o aumento da tensão (p>0,05). Contudo, houve um acréscimo de 6,8% nos diâmetros médios à medida que a distância de trabalho aumentou. Isso pode ser explicado devido à presença do solvente DMF, que apresenta maior temperatura de ebulição comparado à acetona.

As micro/nano partículas de alginato reticuladas produzidas pelo processo *electrospray* em placa foram obtidas para dois valores de vazão da solução polimérica. Na vazão de 9,2 m/h e distância de trabalho de 2 cm, observa-se um aumento das dimensões das partículas com a elevação da tensão aplicada, contudo, esse mesmo efeito não foi observado na distância de trabalho de 4 cm. Na distância de trabalho de 6 cm, as partículas apresentaram uma maior homogeneidade em relação à morfologia e ao diâmetro médio. Já na vazão de 7,2 mL/h para as distâncias de 6 e 8 cm, observou-se que as faixas de diâmetro das partículas foram, respectivamente, de 171 \pm 29 a 234 \pm 48 nm e 146 \pm 27 a 253 \pm 54 nm.

Verificou-se que é possível modificar o equipamento de eletroficação para obter mantas de nanofibras de AC com micro/nano partículas de alginato reticuladas. Independentemente da distância de trabalho do ALG-R, para a tensão de 16 kV, à medida que aumenta a distância de AC, o diâmetro médio das nanofibras diminui. Na maioria das mantas de NFAC/ALG-R, utilizando-se a técnica de MEV, não se observa claramente as partículas de ALG-R recobrindo as nanofibras, contudo é possível visualizá-las sobre o papel coletor. Todavia, para as mantas de NFAC/ALG-R com as distâncias de 2 cm do ALG-R e de 12 cm do AC ocorre uma grande deposição de partículas de ALG-R de dimensões micrométricas ao longo do comprimento das nanofibras. Observa-se que independente das distâncias de trabalho do AC e do ALG-

R, os diâmetros médios das mantas de NFAC/ALG-R aumentam com a diminuição da vazão da solução polimérica de alginato reticulada. Comparando essas com as NFAC puras, verifica-se também que as mantas de NFAC/ALG-R apresentam maiores valores de diâmetro médio.

Analisando os espectros de FTIR observam-se os modos vibracionais característicos das partículas de ALG-R nos espectros do ALG-R puro e das mantas de NFAC/ALG-R. Em relação ao teste de intumescimento, verifica-se que as NFAC/ALG-R apresentaram maior intumescimento em comparação com as NFAC puras.

Apesar das análises de MEV serem pouco conclusivas em relação à deposição de alginato sobre as nanofibras de AC, os resultados de FTIR, TGA e do ensaio de intumescimento sugerem que o alginato está presente e que modificou, ainda que parcialmente, as características das mantas de nanofibras de AC. Essa modificação pode ter efeito favorável para a futura aplicação desse material como *scaffold* na Engenharia de Tecido Muscular, uma vez que muitos tipos de células necessitam de um material de suporte carregado para a adesão, crescimento e diferenciação.

Recomendações para trabalhos futuros

Recomendado o ensaio biológico com células do tipo mioblastos primários em placas com a manta de nanofibras de acetato de celulose recobertas com micropartículas de alginato reticuladas, bem como com a manta de nanofibras de acetato de celulose. Esse ensaio permite a avaliação da adesão, da migração, da diferenciação e da morfologia das células cultivadas nos materiais analisados

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AL-HAJRY, H. A. et al. Electrostatic Encapsulation and Growth of Plant Cell Cultures in Alginate. **Biotechnol. Prog.**, v. 15, p. 768–774, 1999.

ALALLAM, B. et al. Electrosprayed Alginate Nanoparticles as CRISPR Plasmid DNA Delivery Carrier : Preparation , Optimization , and Characterization. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 158, 2020.

ALMANY, L.; SELIKTAR, D. Biosynthetic hydrogel scaffolds made from fibrinogen and polyethylene glycol for 3D cell cultures. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2467–2477, 2005.

ALMERÍA, B. et al. Journal of Colloid and Interface Science Controlling the morphology of electrospray-generated PLGA microparticles for drug delivery. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 343, n. 1, p. 125–133, 2010.

ALMERÍA, B.; FAHMY, T. M.; GOMEZ, A. A multiplexed electrospray process for single-step synthesis of stabilized polymer particles for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 154, n. 2, p. 203–210, 2011.

ALVES, N. M. et al. Controlling cell behavior through the design of polymer surfaces. **Small**, v. 6, n. 20, p. 2208–2220, 2010.

AMRUTHWAR, S. S.; JANORKAR, A. V. In vitro evaluation of elastin-like polypeptidecollagen composite scaffold for bone tissue engineering. **Dental Materials**, v. 29, n. 2, p. 211–220, 2013.

ANDRESEN, I. L. et al. Some Biological Functions of Matrix Components in Benthic Algae in Relation to Their Chemistry and the Composition of Seawater. In: Cellulose chemistry and technology, Jett, C. A. J., American Chenical Society, U.S. [s.l: s.n.].

ANGEL, N. et al. Effect of Processing Parameters on the Electrospinning of Cellulose Acetate Studied by Response Surface Methodology. **Journal of Agriculture and Food Research**, 2020.

ARTHANAREESWARAN, G. et al. Synthesis, characterization and thermal studies on cellulose acetate membranes with additive. **European Polymer Journal**, v. 40, p. 2153–2159, 2004.

ATALA, A. et al. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. **Lancet**, v. 367, n. 9518, p. 1241–1246, 2006.

ATHANASIOU, K. A. et al. Fundamentals of Biomechanics in Tissue Engineering of Bone. **Tissue Engineering**, v. 6, n. 4, p. 361–381, 2002.

BACH, A. D. et al. Engineering of muscle tissue. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 30, n. 4, p. 589–599, 2003.

BAIGUERA, S.; BIRCHALL, M. A.; MACCHIARINI, P. Tissue-engineered tracheal transplantation. **Transplantation**, v. 89, n. 5, p. 485–491, 2010.

BARBOZA, R. D. G. E. M. A. **Estudo das características de Filmes Finos de Alginato**. [s.l.] Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, 2015.

BEDDOES, C. M. et al. Hydrogels as a replacement material for damaged articular hyaline cartilage. **Materials**, v. 9, n. 6, 2016.

BEIER, J. P. et al. Collagen matrices from sponge to nano: New perspectives for tissue engineering of skeletal muscle. **BMC Biotechnology**, v. 9, p. 1–14, 2009.

BHUSHANI, J. A. Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications. **Trends in Food Science & Technology**, 2014.

BOCK, N.; DARGAVILLE, T. R.; WOODRUFF, M. A. Progress in Polymer Science Electrospraying of polymers with therapeutic molecules : State of the art. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 11, p. 1510–1551, 2012.

BOLDRIN, L. et al. Satellite Cells Delivered by Micro-Patterned Scaffolds: A New Strategy for Cell Transplantation in Muscle Diseases. **Tissue Engineering**, v. 13, n. 2, p. 253–262, 2006.

BOLDRIN, L. . et al. Efficient delivery of human single fiber-derived muscle precursor cells via biocompatible scaffold. **Cell Transplantation**, v. 17, n. 5, p. 576–584, 2008.

BONZANINI, R.; GONÇALVES, C. Preparação e Caracterização de Compósitos acetato de celulose/argila8o Congresso Brasileiro de Polímeros. [s.l: s.n.].

BOYAN, B. D.; et al. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. **Biomaterials**, v. 17, n. 2, p. 137–146, 1996.

BRAGHIROLLI, D. I. et al. Association of electrospinning with electrospraying: a strategy to produce 3D scaffolds with incorporated stem cells for use in tissue engineering. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 5159–5170, 2015.

BRANCIFORTI, M. C. et al. Characterization of nano-structured poly(D,L-lactic acid) nonwoven mats obtained from different solutions by electrospinning. **Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics**, v. 48, n. 6, p. 1222–1240, 2009.

BRITES, M. D. E. M. Desenvolvimento de membranas de nanofibras a base de acetato de celulose do bagaço de cana-de-açúcar produzidas por eletrofiação para a incorporação de enzimas. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2015.

BRYANT, C. J. et al. Strategies for overcoming aversion to unnaturalness: The case of clean meat. **Meat Science**, v. 154, p. 37–45, 2019.

BRYANT, C. J.; BARNETT, J. C. What's in a name? Consumer perceptions of in vitro meat under different names. **Appetite**, v. 137, n. August 2018, p. 104–113, 2019.

CAI, K. et al. Influence of different surface modification treatments on poly(d,I-lactic acid) with silk fibroin and their effects on the culture of osteoblast in vitro. **Biomaterials**, v. 23, p. 1603–1611, 2002.

CANDIDO, R. G.; GODOY, G. G.; GONC, A. R. Characterization and application of cellulose acetate synthesized from sugarcane bagasse. v. 167, p. 280–289, 2017.

CAO, Y. et al. Acetone-soluble cellulose acetates prepared by one-step homogeneous acetylation of cornhusk cellulose in an ionic liquid 1-allyl-3-methylimidazolium chloride (AmimCl). v. 69, p. 665–672, 2007.

CASSIDAY, L. Clean meat. International News on Fats, Oils and Related Materials, v. 29, n. 2, p. 6–14, 2018.

CATHELL, M. D.; SCHAUER, C. L. Structurally Colored Thin Films of Ca 2 + -Cross-Linked Alginate. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 33–41, 2007.

CEBOTARI, S. et al. Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. **Circulation**, v. 114, n. SUPPL. 1, 2006.

CELEBIOGLU, A.; UYAR, T. Electrospun porous cellulose acetate fibers from volatile solvent mixture. **Materials Letters**, v. 65, n. 14, p. 2291–2294, 2011.

CERQUEIRA, D. A. Síntese e caracterização de misturas poliméricas contendo acetato de celulose: aproveitamento de resíduos da cana-de-açúcar. [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 2009.

CERQUEIRA, D. A.; CARVALHO, R. D. A. Caracterização de Acetato de Celulose Obtido a partir do Bagaço de Cana-de-Açúcar por 1 H-RMN. **Polímeros**, v. 20, n. 2, p. 85–91, 2010.

CHAN, L. W.; LEE, H. Y.; HENG, P. W. S. Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. v. 63, p. 176–187, 2006.

CHEN, C. et al. T h e r a n o s t i c s 3D Porous Calcium-Alginate Scaffolds Cell Culture System Improved Human Osteoblast Cell Clusters for Cell Therapy. **Theranostics**, v. 5, n. 6, 2015.

CHEN, L.; YAN, C.; ZHENG, Z. Functional polymer surfaces for controlling cell behaviors. **Materials Today**, v. 21, n. 1, p. 38–59, 2018.

CHEN, Z. et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Encapsulation of green tea polyphenol by pH responsive , antibacterial , alginate microgels used for minimally invasive treatment of bone infection. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 170, n. July, p. 648–655, 2018.

CHICKERING, D. E.; MATHIOWITZ, E. Bioadhesive microspheres: I. A novel electrobalance-based method to study adhesive interactions between individual microspheres and intestinal mucosa. **Journal of Controlled Release**, v. 34, n. 3, p.

251-262, 1995.

CHING, S. H.; BANSAL, N.; BHANDARI, B. Alginate gel particles – A review of production techniques and physical properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 6, p. 1133–1152, 2017.

CHRISTOFOROU, T.; DOUMANIDIS, C. Biodegradable Cellulose Acetate Nanofiber Fabrication via Electrospinning. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, n. 9, p. 6226–6233, 2010.

CIOLACU, D.; CIOLACU, F.; POPA, V. I. Amorphous Cellulose – Structure and Characterization. **CELLULOSE CHEMISTRY AND TECHNOLOGY AMORPHOUS**, v. 45, p. 13–21, 2011.

COSTA, R. G. F. et al. Parte I: Fundamentação Teórica. v. 22, p. 170–177, 2012. CUI, Y. L. et al. Biomimetic surface modification of poly(L-lactic acid) with chitosan and its effects on articular chondrocytes in vitro. **Biomaterials**, v. 24, n. 21, p. 3859–3868, 2003a.

CUI, Y. L. et al. Biomimetic surface modification of poly (L-lactic acid) with gelatin and its effects on articular chondrocytes in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 66, n. 4, p. 770–778, 2003b.

DA CRUZ, A. C. et al. Utilização do acetato de celulose produzido a partir da celulose extraída do caroço de manga como matriz para produção de sistemas microparticulados. **Quimica Nova**, v. 34, n. 3, p. 385–389, 2011.

DAEMI, H.; BARIKANI, M. Sharif University of Technology Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles. **Scientia Iranica**, v. 19, n. 6, p. 2023–2028, 2012.

DE VRIEZE, S. et al. The effect of temperature and humidity on electrospinning. **Journal of Materials Science**, v. 44, n. 5, p. 1357–1362, 2009.

DHAMECHA, D. et al. Applications of alginate microspheres in therapeutics delivery and cell culture : Past , present and future. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 569, n. August, p. 118627, 2019.

DHANDAYUTHAPANI, B. et al. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. **International Journal of Polymer Science**, v. 2011, n. ii, 2011.

DING, L.; LEE, T.; WANG, C. Fabrication of monodispersed Taxol-loaded particles using electrohydrodynamic atomization. **Journal of Con**, v. 102, p. 395–413, 2005.

DONG, Z.; WANG, Q.; DU, Y. Alginate/gelatin blend films and their properties for drug controlled release. **Journal of Membrane Science**, v. 280, n. 1–2, p. 37–44, 2006. DRAGET, K. I. et al. Gel strength of Ca-limited alginate gels made in situ. **Hydrobiologia**, v. 260/261, p. 563–565, 1993.

DRAGULESCU-ANDRASI A, MA Z, AYERS DC, WIXTED JJ, S. J. Electrospun

polysaccharide fiber meshes supporting the chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. Abstracts of Papers, 236th ACS National Meeting. Anais...Philadelphia, PA, United States: 2008

DUPUY, B., ARIEN, A., & MINNOT, A. P. FT-IR of membranes made with alginate/polylysine complexes. Variations with the mannuronic or guluronic content of the polysaccharides. **Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 71–82, 1994.

DUTTA, R. C. et al. Competent processing techniques for scaffolds in tissue engineering. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 2, p. 240–250, 2017.

EDGAR, K. J. Cellulose Esters, Inorganic. **Encyclopedia of Polymer Science and Technology**, v. 9, 2004.

EKAPUTRA, A. K. et al. Combining electrospun scaffolds with electrosprayed hydrogels leads to three-dimensional cellularization of hybrid constructs. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 8, p. 2097–2103, 2008.

ELBERT, D. L.; HUBBELL, J. A. Surface Treatments of Polymers for Biocompatibility. **Annual Review of Materials Science**, v. 26, n. 1, p. 365–394, 1996.

ENAYATI, M. et al. Size mapping of electric field-assisted production of polycaprolactone particles. **J. R. Soc. Interface**, v. 7, n. June, 2010.

FAN, L. et al. Preparation and properties of alginate / carboxymethyl chitosan blend fibers. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p. 447–452, 2006.

FEI, P.; LIAO, L.; CHENG, B. Analytical Methods Quantitative analysis of cellulose acetate with a high degree of substitution by FTIR and its. **Analytical Methods**, v. 9, p. 6194–6201, 2017.

FONG, H.; CHUN, I.; RENEKER, D. H. Beaded nanofibers formed during electrospinning. **Polymer**, v. 40, n. 16, p. 4585–4592, 1999.

FORMHALS. Method and Apparatus for the production of fibersUSA, 1938a.

FORMHALS, A. Artificial fiber constructionUSA, 1938b.

FORMHALS, A. Method and Apparatus for the production of fibersUSA, 1938c.

FORMHALS, A. **Method and apparatus for the production of artificial fibers**USA, 1939a.

FORMHALS, A. FIG 2 s Jechard Schreiber Gastett and Vichard . 5chreiber Gastellana. 1939b.

FUKUI, Y. et al. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects Preparation of monodispersed polyelectrolyte microcapsules with high encapsulation efficiency by an electrospray technique. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical** and Engineering Aspects, v. 370, n. 1–3, p. 28–34, 2010.

FUOCO, C. et al. Matrix scaffolding for stem cell guidance toward skeletal muscle tissue engineering. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 11, n. 1, p. 1, 2016.

GACESA, P. Alginates. Carbohydrate Polymers, v. 8, n. 3, p. 161–182, 1988.

GAWLITTA, D. et al. Temporal differences in the influence of ischemic factors and deformation on the metabolism of engineered skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, n. 2, p. 464–473, 2007.

GHAYEMPOUR, S.; MORTAZAVI, S. M. Fabrication of micro-nanocapsules by a new electrospraying method using coaxial jets and examination of effective parameters on their production. **Journal of Electrostatics**, v. 71, n. 4, p. 717–727, 2013.

GHORANI, B.; TUCKER, N. Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 227–240, 2015.

GOMBOTZ, W. R.; WEE, S. F. Protein release from alginate matrices. Advanced Drug Delivery Reviews 31, v. 31, p. 267–285, 1998.

GOMBOTZ, W. R.; WEE, S. F. Protein release from alginate matrices. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 64, n. SUPPL., p. 194–205, 2012.

GOMES, D. DO N. Desenvolvimento e Caracterização de filmes de alginato incorporadas com extratos de Anadenanthera Colubrina (Vell.) Brenan visando o desenvolvimento de substituto temporário de pele. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

GOMES, D. S. et al. Characterization of an electrospinning process using different PAN/DMF concentrations. **Polímeros**, v. 17, n. 3, p. 206–211, 2007.

GOPAL, R. et al. Surface modification and application of functionalized polymer nanofibers. **Topics in Applied Physics**, v. 109, p. 72–91, 2007.

GRANT, G. T.; MORRIS, E. R.; REES, D. A.; SMITH, P. J. C.; THOM, D. Biological interactions between. **Febs Letters**, v. 32, n. 1, p. 195–198, 1973.

GUERRINI, L. M. et al. Eletrofiação do poli (álcool vinílico) via solução aquosa. **Polímeros**, v. 16, n. 4, p. 286–293, 2007.

GUO, Y. et al. Effects of ginsenoside Rg1-loaded alginate-chitosan microspheres on human bone marrow stromal cells. **Biosciense Reports**, v. 37, 2017.

GUPTA, K. C. et al. Nanofibrous scaffolds in biomedical applications. n. Figure 1, p. 1–11, 2014.

HAGHI, A. K.; AKBARI, M. Trends in electrospinning of natural nanofibers. Physica

Status Solidi, v. 1834, n. 6, p. 1830–1834, 2007.

HAIDER, A.; HAIDER, S.; KANG, I. K. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 11, n. 8, p. 1165–1188, 2018.

HANNA, A. A. et al. Thermal properties of cellulose acetate and its complexes with some transition metals. **Polymer Degradation and Stability**, v. 63, p. 293–296, 1999.

HASHIZUME, R. et al. Morphological and mechanical characteristics of the reconstructed rat abdominal wall following use of a wet electrospun biodegradable polyurethane elastomer scaffold. **Biomaterials**, v. 31, n. 12, p. 3253–3265, 2010.

HE, W. et al. Fabrication and Endothelialization of Collagen-Blended Biodegradable Polymer Nanofibers: Potential Vascular Graft for Blood Vessel Tissue Engineering. **Tissue Engineering**, v. 11, n. 9–10, p. 1574–1588, 2005a.

HE, W. et al. Fabrication of collagen-coated biodegradable polymer nanofiber mesh and its potential for endothelial cells growth. **Biomaterials**, v. 26, n. 36, p. 7606–7615, 2005b.

HONG, Y. et al. Electrohydrodynamic atomization of quasi-monodisperse drug-loaded spherical / wrinkled microparticles. **Journal of aero**, v. 39, p. 525–536, 2008.

HUANGA, M. H.; YANGA, M. C. Swelling and biocompatibility of sodium alginate/poly(γ -glutamic acid) hydrogels. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 21, n. 8, p. 561–567, 2010.

JACOBS, V.; ANANDJIWALA, R.; MAAZA, M. The Influence of Electrospinning Parameters on the Structural Morphology and Diameter of Electrospun Nanofibers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 115, p. 3130–3136, 2009.

JIAO, Y. P.; CUI, F. Z. Surface modification of polyester biomaterials for tissue engineering. **Biomedical Materials**, v. 2, n. 4, 2007.

JUNQUEIRA e CARNEIRO. Biologia celular e molecular. 8ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005.

JUNQUEIRA e CARNEIRO. Histologia Básica. 11ªed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008.

KADIM, I. T. et al. Cultured meat from muscle stem cells: A review of challenges and prospects. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 2, p. 222–233, 2015.

KAUR, S. et al. Oligosaccharide Functionalized Nanofibrous Membrane. International Journal of Nanoscience, v. 05, n. 01, p. 1–11, 2006.

KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. **Quimica Nova**, v. 31, n. 1, p. 134–143, 2008.

KENRY; LIM, C. T. Nanofiber technology: current status and emerging developments. **Progress in Polymer Science**, v. 70, p. 1–17, 2017.

KI, C. S. et al. Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin-formic acid solution. **Polymer**, v. 46, n. 14, p. 5094–5102, 2005.

KLOKK, T. I.; MELVIK, J. E. Controlling the size of alginate gel beads by use of a high electrostatic potential. **Journal Microencapsulation**, v. 19, n. 4, p. 415–424, 2002.

KOCHT, S. et al. Alginate encapsulation of genetically engineered mammalian cells : comparison of production devices , methods and microcapsule characteristics. **Journal Microencapsulation**, v. 20, n. 3, p. 303–316, 2003.

KONWARH, R.; KARAK, N.; MISRA, M. Electrospun cellulose acetate nanofibers: The present status and gamut of biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 4, p. 421–437, 2013.

KUMBAR, S. G. et al. Novel mechanically competent polysaccharide scaffolds for bone tissue engineering. **Biomedical Materials**, v. 6, n. 6, 2011.

LANGELAAN, M. L. P. et al. Meet the new meat: tissue engineered skeletal muscle. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 2, p. 59–66, 2010.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue Engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920–926, 1993.

LEE, B.; RAVINDRA, P.; CHAN, E.-S. Size and Shape of Calcium Alginate Beads Produced by Extrusion Dripping. **Chemical Engineering Technology**, n. 10, p. 1627–1642, 2013.

LEE, K. H. et al. Influence of a mixing solvent with tetrahydrofuran and N,Ndimethylformamide on electrospun poly(vinyl chloride) nonwoven mats. **Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics**, v. 40, n. 19, p. 2259–2268, 2002.

LEE, K. H. et al. The change of bead morphology formed on electrospun polystyrene fibers. **Polymer**, v. 44, n. 14, p. 4029–4034, 2003.

LEE, Y.; BAI, M.; CHEN, D. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Multidrug encapsulation by coaxial tri-capillary electrospray. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, n. 1, p. 104–110, 2011.

LEONG, J. et al. Particuology Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems. **Particuology**, v. 24, p. 44–60, 2016.

LEWINSKA, D.; ROSINSKI, S.; WERYNSKI, A. Influence of Process Conditions During Impulsed Electrostatic Droplet Formation on Size Distribution of Hydrogel Beads. **ARTIFICIAL CELLS, BLOOD SUBSTITUTES, AND BIOTECHNOLOGY**, v. 32, n. 1, p. 41–53, 2004. LI, J. et al. Improving surface and mechanical properties of alginate films by using ethanol as a co-solvent during external gelation. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 208–216, 2015.

LI, W.-J. et al. Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 60, n. 4, p. 613–621, 2002.

LI, Z. et al. Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3919–3928, 2005.

LIH, E. et al. Polymers for cell/tissue anti-adhesion. **Progress in Polymer Science**, v. 44, p. 28–61, 2015.

LIU, G. et al. Electrospun starch nanofibers: Recent advances, challenges, and strategies for potential pharmaceutical applications. **Journal of Controlled Release**, 2017.

LIU, H. et al. Microfluidic Generation of Uniform Quantum Dot-encoded Microbeads by Gelation of Alginate. **The Royal Society of Chemistry**, v. 5, n. 77, p. 85–90, 2015.

LIU, H.; HSIEH, Y. Ultrafine Fibrous Cellulose Membranes from Electrospinning of Cellulose Acetate. **Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics**, v. 40, p. 2119–2129, 2002.

LUCENA, M. C. C. et al. The effect of additives on the thermal degradation of cellulose acetate. **Polymer Degradation and Stability**, v. 80, p. 149–155, 2003.

MAJUMDER, S. et al. Understanding solubility , spinnability and electrospinning. **Bulletin of Materials Science**, 2019.

MARTÍN, M. J. et al. Development of alginate microspheres as nystatin carriers for oral mucosa drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 140–149, 2015.

MARTINSEN, A. et al. Comparison of Different Methods for Determination of Molecular Weight and Molecular Weight Distribution of Alginates. **Carbohydrate Polymers**, v. 15, p. 171–193, 1991.

MASALOVA, O. et al. Alginate and chitosan gel nanoparticles for efficient protein entrapment. **Physics Procedia**, v. 40, p. 69–75, 2013.

MATABOLA, R. M.; MOUTLOALI, K. P. The influence of electrospinning parameters on the morphology and diameter of poly (vinyledene fluoride) nanofibers- effect of sodium chloride. **J Mater Sci**, n. 48, p. 5475–5482, 2013.

MAURSTAD, G. et al. Polyelectrolyte layer interpenetration and swelling of alginatechitosan multilayers studied by dual wavelength reflection interference contrast microscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 4, p. 672–681, 2008.

MCHUGH, D. J.; HERN, G.; ARVIZU-HIGUERA, D. L. Pilot plant scale extraction of

alginates from Macrocystis pyrifera 3 . Precipitation , bleaching and conversion of calcium alginate to alginic acid. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, n. December, p. 471–479, 2001.

MEDEIROS, E. S. et al. Electrospun nanofibers of poly(vinyl alcohol) reinforced with cellulose nanofibrils. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 2, n. 3, p. 231–242, 2008.

MIN, B. M. et al. Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro. **Biomaterials**, v. 25, n. 7–8, p. 1289–1297, 2004.

MO, X. M. et al. Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: A biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. **Biomaterials**, v. 25, n. 10, p. 1883–1890, 2004.

MOE, S. T. et al. Swelling of Covalently Crosslinked Alginate Gels: Influence of Ionic Solutes and Nonpolar Solvents. **Macromolecules.**, v. 26, p. 3589–3591, 1993.

MOGHADDAM, K. M.; MAJID, S.; KHAYAMIAN, T. Preparation of calcium alginate microcapsules containing n -nonadecane by a melt coaxial electrospray method. **Journal of Electrostatics**, v. 73, p. 56–64, 2015.

MOGHE, A. K. et al. Effect of the addition of a fugitive salt on electrospinnability of poly(ɛ-caprolactone). **Polymer**, v. 50, n. 14, p. 3311–3318, 2009.

MØRCH, Ä. A. et al. Effect of Ca 2 + , Ba 2 + , and Sr 2 + on Alginate Microbeads. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 1471–1480, 2006.

MORROW, D. A. et al. Transversely isotropic tensile material properties of skeletal muscle tissue. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 3, n. 1, p. 124–129, 2010.

MUZZARELLI, R. A. A. et al. Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. **Biomaterials**, v. 15, n. 13, p. 1075–1081, 1994.

NAGPAL, M. et al. Formulation Development and Evaluation of Alginate Microspheres of Ibuprofen. **Journal of Young Pharmacists**, v. 4, n. 1, p. 13–16, 2012.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 32, n. 8–9, p. 762–798, 2007.

NARAYANAN, N. et al. Polymeric Electrospinning for Musculoskeletal Regenerative Engineering. **Regenerative Engineering and Translational Medicine**, v. 2, n. 2, p. 69–84, 2016.

NEDOVIC, V. A. et al. Electrostatic generation of alginate microbeads loaded with brewing yeast. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 17–22, 2001.

NIKKO, A. M. et al. Electrospray-assisted encapsulation of caffeine in alginate

microhydrogels. International Journal of Biological Macromolecules, v. 116, p. 208–216, 2018.

OATES, G.; LEDWARD, D. A. Studies on the effect of heat on alginates. **Food Hydrocolloids**, v. 4, n. 3, p. 215–220, 1990.

ONILLA, G.; DA SILVA, A.B.. Processing and characterization of cellulose acetate nanofibers incorporated with progesterone, Proceedings of the 14th CBPOL, Águas de Lindóia, Brazil, Octo 22–26, 2018.

ORLANDO, G. et al. Discarded human kidneys as a source of ECM scaffold for kidney regeneration technologies. **Biomaterials**, v. 34, n. 24, p. 5915–25, 2013.

OSTROWSKA-CZUBENKO, J.; GIERSZEWSKA-DRU, M. Effect of ionic crosslinking on the water state in hydrogel chitosan membranes. v. 77, p. 590–598, 2009.

OSTROWSKA, B. et al. Evaluation of 3D hybrid microfiber / nanofiber scaffolds for bone tissue engineering. v. 62, n. 3, p. 551–556, 2014.

PACHECO, L. R. E. **Obtenção e Caracterização de uma matriz polimérica a base de alginato com diferentes agentes reticulantes**. [s.l.] Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2016.

PAPAGEORGIOU, S. K. et al. Metal-carboxylate interactions in metal-alginate complexes studied with FTIR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 4, p. 469–473, 2010.

PARHI, P.; RAMANAN, A.; RAY, A. R. Preparation and Characterization of Alginate and Hydroxyapatite-Based Biocomposite. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 102, p. 5162–5165, 2006.

PATIL, J. S. et al. lonotropic gelation and polyelectrolyte complexation: the novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: a review. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 5, n. 1, p. 241–248, 2010.

PATIL, S. B.; SAWANT, K. K. Development, optimization and in vitro evaluation of alginate mucoadhesive microspheres of carvedilol for nasal delivery. **Journal ofMicroencapsulation**, v. 26, n. 5, p. 432–443, 2009.

PATIL, J. V et al. Electrospinning: A versatile technique for making of 1D growth of nanostructured nanofibers and its applications: an experimental approach. **Applied Surface Science**, 2017.

PAVLOV, M. P. et al. Fibers and 3D mesh scaffolds from biodegradable starch-based blends: Production and characterization. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, n. 8, p. 776–784, 2004.

PENN, L. S.; WANG, H. Chemical modification of polymer surfaces: a review. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 5, n. 12, p. 809–817, 1994.

PESTOVSKY, Y. S.; MARTÍNEZ-ANTONIO, A. The Synthesis of Alginate Microparticles and Nanoparticles. **Drug Designing & Intellectual Properties International Journal**, v. 3, n. 1, p. 293–327, 2019.

PHAM, Q. P.; SHARMA, U.; MIKOS, A. G. Review---Electrospinning of Polymeric Nanofibers.pdf. v. 12, n. 5, 2006.

PILLAY, V.; FASSIHI, R. In vitro release modulation from crosslinked pellets for sitespecific drug delivery to the gastrointestinal tract I. Comparison of pH-responsive drug release and associated kinetics. **Journal of Controlled Release**, v. 59, p. 229–242, 1999.

PIORNOS, J. A. et al. Highly efficient encapsulation of linseed oil into alginate/lupin protein beads: Optimization of the emulsion formulation. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 139–148, 2016.

PONCELET, D. et al. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I1. Physicochemistry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 4, p. 644–650, 1995.

PONCELET, D. et al. Formation of Microgel Beads by Electric Dispersion of Polymer Solutions. **AIChEJournal**, v. 45, n. 9, 1999a.

PONCELET, D. et al. Theory of electrostatic dispersion of polymer solutions in the production of microgel beads containing biocatalyst. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 79, p. 213–228, 1999b.

PRABHAKARAN, M. P.; VATANKHAH, E.; RAMAKRISHNA, S. Electrospun Aligned PHBV / Collagen Nanofibers as Substrates for Nerve Tissue Engineering. v. 110, n. 10, p. 2775–2784, 2013.

PRÜSSE, U. et al. Comparison of different technologies for alginate beads production. **Chemical Papers**, v. 62, n. 4, p. 364–374, 2008.

PULS, J.; WILSON, S. A.; HÖLTER, D. Degradation of Cellulose Acetate-Based Materials: A Review. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 19, n. 1, p. 152–165, 2011.

RASTOGI, R. et al. Alginate microspheres of isoniazid for oral sustained drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 334, p. 71–77, 2007.

RAYA-RIVERA, A. et al. Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: An observational study. **The Lancet**, v. 377, n. 9772, p. 1175–1182, 2011.

RHIM, J. W. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. **LWT - Food Science and Technology**, v. 37, n. 3, p. 323–330, 2004.

RHO, J.-Y.; KUHN-SPEARING, L.; ZIOUPOS, P. Mechanical properties and the

hierarchical structure of bone. Nature, n. 20, p. 92–102, 1998.

RIBEIRO, J. et al. Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification / internal gelation technique. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, n. 1, p. 31–40, 2005.

RIBOLDI, S. A. et al. Skeletal myogenesis on highly orientated microfibrous polyesterurethane scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 84, n. 4, p. 1094–1101, 2008.

RODOPLU, D.; MUTLU, M. Effects of Electrospinning Setup and Process Parameters on Nanofiber Morphology Intended for the Modification of Quartz Crystal Microbalance Surfaces. **Journal of Engineered Fibers and Fabrics Volume**, v. 7, n. 2, p. 118–123, 2012.

RODRIGUES, G. et al. Synthesis and characterization of cellulose acetate produced from recycled newspaper. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 74–82, 2008.

RODRÍGUEZ, K.; RENNECKAR, S.; GATENHOLM, P. Biomimetic calcium phosphate crystal mineralization on electrospun cellulose-based scaffolds. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 3, n. 3, p. 681–689, 2011.

SADAT, A. et al. Effect of electrospinning parameters on morphological properties of PVDF nanofibrous scaffolds. **Progress in Biomaterials**, v. 6, n. 3, p. 113–123, 2017.

SAID, A. A.; HASSAN, R. M. Thermal decomposition of some divalent metal alginate gel compounds. **Polymer Degradation and Stability**, v. 39, n. 3, p. 393–397, 1993.

SALGADO, A. J.; COUTINHO, O. P.; REIS, R. L. Bone tissue engineering: State of the art and future trends. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, n. 8, p. 743–765, 2004.

SANDVIG, I. et al. RGD-peptide modified alginate by a chemoenzymatic strategy for tissue engineering applications. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 00A, p. 1–11, 2014.

SANTANA, A. A. Influência de Características Físicas e Químicas de Plastificantes na Confecção e no Comportamento Estrutural e Higroscópico de Filmes de Alginato de Cálcio. [s.l.] Universidade Estadural de Campinas, 2010.

SANTOS, A. E. A. DOS et al. Cellulose acetate nanofibers loaded with crude annatto extract : Preparation , characterization , and in vivo evaluation for potential wound healing applications. **Materials Science & Engineering C**, v. 118, n. November 2019, p. 111322, 2021.

SARMENTO, B. et al. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 1–7, 2006.

SARTORI, C.; FINCH, D. S.; RALPH, B. D e t e r m i n a t i o n of the cation content of alginate thin films by. **Polymer**, v. 38, n. 1, p. 43–51, 1997.

SCHOUBBEN, A. et al. Development of a scalable procedure for fine calcium alginate particle preparation. **Chemical Engineering Journal**, v. 160, p. 363–369, 2010.

SHEIKH, Z. et al. Biodegradable materials for bone repair and tissue engineering applications. **Materials**, v. 8, n. 9, p. 5744–5794, 2015.

SHENOY, S. L. et al. Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions: good solvent, non-specific polymer – polymer interaction limit. **Polymer**, v. 46, p. 3372–3384, 2005.

SHEPHERD, D. E. T. .; SEEDHOM, B. B. The 'instantaneous' compressive modulus of human articular cartilage in joints of the lower limb. **Rheumatology**, n. 38, p. 124–132, 1999.

SHINOKA T, IMAI Y, I. Y. Transplantation of a Tissue-Engineered Pulmonary Artery. v. 343, n. 7, p. 527–533, 2001.

SHIT, S. C.; SHAH, P. M. Edible Polymers : Challenges and Opportunities. **Journal of Polymers**, v. 2014, 2014.

SILL, T. J.; RECUM, H. A. VON. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. v. 29, 2008.

SILVA, V. L. Aproveitamento sustentável do bagaço de cana de açúcar para obtenção do acetato de celulose. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2014.

SMIDSRØD, O. Molecular Basis for some Physical Properties of Alginates in the Gel State. **Faraday Discussions Chemical Society**, v. 27, p. 263–274, 1974.

SMIDSRØD, O.; GLOVER, M.; WHITTINGTON, S. THE RELATIVE EXTENSION OF ALGINATES HAVING DIFFERENT CHEMICAL COMPOSITION*. **Carbohydrate Research**, v. 27, n. July 1972, p. 107–118, 1973.

SOARES, G. O. DO N. et al. Electrospun progesterone-loaded cellulose acetate nanofibers and their drug sustained-release profiles. **Polym Eng Sci.**, n. July, p. 11–13, 2020.

SOARES, J. P. et al. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. v. 29, n. 2, p. 53–56, 2004.

SOARES, R. M. D. et al. Electrospinning and electrospray of bio-based and natural polymers for biomaterials development. **Materials Science and Engineering C**, v. 92, n. November 2017, p. 969–982, 2018.

SODHI, R. N. S. Application of surface analytical and modification techniques to biomaterial research. **Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena**, v. 81, n. 3, p. 269–284, 1996.

SPECHT, E. A. et al. Opportunities for applying biomedical production and manufacturing methods to the development of the clean meat industry. **Biochemical Engineering Journal**, v. 132, p. 161–168, 2018.

SPECHT, L. Is the Future of Meat produce packaging. **Foodtechnology - Advancing Food & Health Through Sound Science**, v. 1, p. 17–21, 2018.

SRIDHAR, R.; RAMAKRISHNA, S. Electrosprayed nanoparticles for drug delivery and pharmaceutical applications. **Biomatter**, v. 3, n. 3, p. 37–41, 2013.

STANDFORD, E. C. C. On algin, a new substance obtained from some of the commoner species of marine algae. **American Journal of Pharmacy**, v. 55, n. 12, p. 1–2, 1883.

STANKUS, J. J. et al. Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix. **Biomaterials**, v. 27, n. 5, p. 735–744, 2006.

SULTANA, K. et al. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate – starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Journal of Food Microbiology 62**, v. 62, p. 47–55, 2000.

SUN, B. et al. Progress in Polymer Science Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning. v. 39, p. 862–890, 2014.

TAN, J.; SALTZMAN, W. M. Biomaterials with hierarchically defined micro- and nanoscale structure. v. 25, p. 3593–3601, 2004.

TAN, S. et al. Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process. **Polymer**, v. 46, p. 6128–6134, 2005.

TAPIA-HERNÁNDEZ, J. A. et al. Micro- and Nanoparticles by Electrospray: Advances and Applications in Foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 19, p. 4699–4707, 2015.

THAKKAR, S.; MISRA, M. Electrospun polymeric nanofibers: New horizons in drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2017.

THENMOZHI, S. et al. Electrospun nanofibers: New generation materials for advanced applications. **Materials Science & Engineering B**, v. 217, p. 36–48, 2017.

THU, B. et al. Alginate polycation microcapsules II . Some functional properties. **Biomaterials**, v. 17, n. 11, p. 1069–1079, 1996.

THU, B.; SMIDSRØD, O.; SKJAK-BRÆK, G. Alginate gels - Some structure-function correlations relevant to their use as immobilization matrix for cells. **Immobilized Cells: Basics and Applications**, v. 11, p. 19–30, 1996.

TUNGPRAPA, S. et al. Electrospun cellulose acetate fibers : effect of solvent system on morphology and fiber diameter. **Cellulose**, v. 14, p. 563–575, 2007.

UM-I-ZAHRA, S.; LI, H.; ZHU, L. Effect of different parameters on the fabrication of

sustained release cellulose acetate and ethyl cellulose polymer blends. **CELLULOSE CHEMISTRY AND TECHNOLOGY EFFECT**, v. 51, n. 9–10, p. 899–909, 2017.

UYAMA, Y.; KATO, K.; IKADA, Y. Surface Modification of Polymers by Grafting. **Grafting/Characterization Techniques/Kinetic Modeling**, v. 137, p. 1–39, 1998.

VANDENBURGH, H. et al. Drug-screening platform based on the contractility of tissueengineered muscle. **Muscle and Nerve**, v. 37, n. 4, p. 438–447, 2008.

VENUGOPAL, J. et al. In Vitro Culture of Human Dermal Fibroblasts on Electrospun Polycaprolactone Collagen Nanofibrous Membrane. **Artificial Organs**, v. 30, n. 6, p. 440–446, 2006.

WAN, Y. et al. Adhesion and proliferation of OCT-1 osteoblast-like cells on micro- and nano-scale topography structured poly(L-lactide). **Biomaterials**, v. 26, n. 21, p. 4453–4459, 2005.

WANG, C. et al. Correlation between processing parameters and microstructure of electrospun poly(D,I-lactic acid) nanofibers. **Polymer**, v. 50, n. 25, p. 6100–6110, 2009.

WASCHULIN, V.; SPECHT, L. Cellular agriculture: An extension of common production methods of food. **The Good Food Institute**, 2018.

WEINSTEIN-OPPENHEIMER, C. R. et al. The effect of an autologous cellular gelmatrix integrated implant system on wound healing. **Journal of Translational Medicine**, v. 8, p. 1–11, 2010.

WILKS, M. Consumer Attitudes and Acceptance of Clean Meat. [s.l.] Elsevier, 2018.

WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, n. 20, p. 2941–2953, 2008.

WONG, C. Y.; AL-SALAMI, H.; DASS, C. R. Microparticles, microcapsules and microspheres: a review of recent developments and prospects for oral delivery of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, 2017.

WOO, K. M.; CHEN, V. J.; MA, P. X. Nano-fibrous scaffolding architecture enhances protein adsorption and cell attachment. **MRS Proceedings**, v. 735, 2011.

WU, C. et al. Bioactive inorganic-materials / alginate composite microspheres with controllable drug-delivery ability. **J. Biomed. Mat. Res. Part B: Appl. Biomat.**, v. 94B, n. 1, p. 32–43, 2010.

WU, J.; HONG, Y. Enhancing cell infiltration of electrospun fibrous scaffolds in tissue regeneration. **Bioactive Materials**, v. 1, n. 1, p. 56–64, 2016.

WU, Y. et al. Electrospray Production of Nanoparticles for Drug/Nucleic Acid Delivery. **The Delivery of Nanoparticles**, 2012.

YANG, S. et al. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. **Tissue engineering**, v. 7, n. 6, p. 679–89, 2001.

YANG, Z. et al. Crystallization behavior of poly(ε-caprolactone)/layered double hydroxide nanocomposites. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 116, n. 5, p. 2658–2667, 2010.

YOO, H. S. et al. Hyaluronic acid modified biodegradable scaffolds for cartilage tissue engineering. v. 26, p. 1925–1933, 2005.

ZACTITI, B. E. M.; KIECKBUSCH, T. G. Release of Potassium Sorbate from Active Films of Sodium Alginate Crosslinked with Calcium Chloride and Science. n. April, p. 349–358, 2009.

ZACTITI, E. M. **Desenvolvimento e caracterização de filmes biodegradáveis de alginato de cálcio sem e com sorbato de potássio**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2004.

ZHANG, C. et al. Study on morphology of electrospun poly (vinyl alcohol) mats. **European Polymer Journal**, v. 41, p. 423–432, 2005.

ZHANG, H. et al. Microfluidic Production of Biopolymer Microcapsules with Controlled Morphology. **J. AM. CHEM. SOC. 2006,** v. 128, p. 339–343, 2006.

ZHANG, Y.; LIM, C. T.; RAMAKRISHNA, S. Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. v. 6, p. 933–946, 2005.

ZHAO, P. et al. Research on the electrospun foaming process to fabricate threedimensional tissue engineering scaffolds. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n. 46, p. 1–10, 2018.

ZHU, H. et al. Surface engineering of poly(D,L-lactic acid) by entrapment of chitosanbased derivatives for the promotion of chondrogenesis. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 62, n. 4, p. 532–539, 2002.

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