ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR Guinea Brasil Camargo Cardoso E APROVADA PELA COMISSÃO JULGADORA EM 26/02/2010.

ORIENTADOR

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA

COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

Matriz tridimensional polimérica com adição de cerâmicas para reconstruções ósseas

Autora: **Guinea Brasil Camargo Cardoso**
Orientador: **Antonio Celso Fonseca de Arruda**
Co-orientadora: **Cecília Amélia Carvalho Zavaglia**

27/2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA

COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS

Matriz tridimensional polimérica com adição de cerâmicas para reconstruções ósseas.

Autora**: Guinea Brasil Camargo Cardoso**
Orientador: **Antonio Celso Fonseca de Arruda**
Co-Orientadora: **Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia**

Curso: Engenharia Mecânica
Área de concentração: Materiais e processos de fabricação

Dissertação de mestrado acadêmico apresentada à comissão de Pós Graduação da Faculdade de Engenharia Mecânica, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica.

Campinas, 2010
SP- Brasil

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

C179m

Cardoso, Guinea Brasil Camargo
Matriz tridimensional polimérica com adição de cerâmicas para reconstruções ósseas / Guinea Brasil Camargo Cardoso. --Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadores: Antonio Celso Fonseca de Arruda, Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

1. Poli (caprolactona). 2. Suportes. 3. Hidroxiapatita. 4. Polímeros na medicina. I. Arruda, Antonio Celso Fonseca de. II. Zavaglia, Cecília Amélia de Carvalho. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. IV. Título.

Título em Inglês: Polymers scaffolds with addition of ceramics for use in bone reconstruction
Palavras-chave em Inglês: Poly (caprolactone), Scaffolds, Hydroxyapatite, Polymers in medicine
Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação
Titulação: Mestre em Engenharia Mecânica
Banca examinadora: Maria Clara Filippini Ierardi, Eliana Cristina da Silva Rigo
Data da defesa: 26/02/2010
Programa de Pós Graduação: Engenharia Mecânica

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA

COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADEMICO

Matriz tridimensional polimérica com adição de cerâmicas para reconstruções ósseas.

Autora: Guinea Brasil Camargo Cardoso
Orientador: Antonio Celso Fonseca de Arruda
Co-orientadora: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:

Prof. Dr. Antonio Celso Fonseca de Arruda, presidente
Instituição: Universidade Estadual de Campinas

Profª. Dra. Maria Clara Filippini Ierardi
Instituição: Universidade Estadual de Campinas

Profª. Dra. Eliana Cristina da Silva Rigo
Instituição: Universidade de São Paulo

Campinas, 26 de Fevereiro de 2010

Dedicatória:

Dedico esse trabalho a todos que sempre me apoiaram e me incentivaram.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Celso Fonseca de Arruda, pela paciência, auxílio, ajuda e amizade.

A minha Co-orientadora, Profª Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, pela chance de trabalhar em conjunto, além da amizade, suporte e ajuda.

Aos colegas do laboratório de biomateriais, pela ajuda e orientação.

Aos meus pais, pela força e suporte.

Aos meus amigos e meu namorado, Erick, pela compreensão do meu nervosismo.

A equipe de pesquisadores do IPEN, em especial às Dra. Olga Zazuco Higa e Dra. Andrea Rodas pela realização dos ensaios de citotoxicidade.

Aos pesquisadores do Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC), pela realização do ensaio de distribuição granulométrica.

Agradeço à rede CYTED-Biofab e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia BIOFABRIS pelo apoio durante o projeto.

Resumo

CARDOSO, Guinea Brasil, *Matriz tridimensional polimérica com adição de cerâmicas para reconstruções ósseas*, Campinas,: Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2010. 75 p. Dissertação (mestrado).

A engenharia tecidual, que tem como objetivo a reconstrução de tecidos de animais, enfrenta um desafio: a construção de suportes. Uma das propriedades relevantes desse eventual material é a sua taxa de absorção, que deve ser inversamente proporcional à taxa de crescimento tecidual. Nesse sentido, a poli (ε-caprolactona) (PCL), que é um polímero biocompatível e bioreabsorvível, mostra-se ser um material promissor para reconstruções ósseas, já que possui uma taxa de reabsorção lenta. Esse polímero, por não ser capaz de atrair células osteoblásticas, deve ter a adição de cerâmicas bioativas com o propósito de fortalecer a estrutura do suporte. Adicionalmente, deve atuar como um condutor para a proliferação de células ósseas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver suportes tridimensionais de poli (ε-caprolactona) com fibras ou *whiskers* de hidroxiapatita. A estrutura deve ser porosa de modo a permitir a vascularização dessa área e consequentemente a osteocondução. Foram sintetizados reagentes primários tais como monetita e carbonato de cálcio, para a sinterização de fosfato tricálcico (α-TCP), que ao ser hidrolisado resultou em *whiskers* de hidroxiapatita. As fibras de hidroxiapatita foram obtidas pelo método de *molten salt* utilizando a hidroxiapatita precipitada. As cerâmicas foram caracterizadas por análises de difração de raios X (DRX), fluorescência de raios X (FRX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os suportes passaram por testes mecânicos de compressão e testes *in vitro*, além de MEV e DRX. Os resultados indicaram que os suportes poliméricos com adição de *whiskers* de hidroxiapatita apresentaram-se mais resistentes à compressão. A presença de *whiskers*, diferentemente das fibras, caracterizou-se como reforço na matriz polimérica. Os resultados do teste de imersão em fluído corpóreo mostraram que os suportes com *whiskers* de hidroxiapatita, diferentemente das fibras, resultaram em deposição de apatita em suas superfícies.

Palavras chave: Poli (ε-caprolactona), hidroxiapatita, suporte tridimensional.

Abstract

CARDOSO, Guinea Brasil Camargo, *Polymers scaffolds with addition of ceramics for use in bone reconstruction*, Campinas: Faculty of Mechanical Engineering, State University of Campinas. 75p. Master of Science.

Tissue engineering, which aim is the reconstruction of animal tissues, faces a challenge: the building supports. One of the relevant properties of any material is its rate of absorption, which should be inversely proportional to the rate of tissue growth. Accordingly, to the poly (ε-caprolactone) (PCL), which is a biocompatible polymer and bioresorbable shows to be a promising material for bone reconstruction since it has a slow rate of resorption. This polymer, for not being able to attract osteoblastic cells, should have the addition of bioactive ceramics in order to strengthen the supporting structure. Additionally, it should acts as an inducer for the proliferation of bone cells. The objective of this study was to develop three-dimensional scaffolds of poly (ε-caprolactone) with fibers and whiskers of hydroxyapatite. The structure should be porous to allow vascularization of this area and consequently the osteoinduction. Were synthesized reagents such as monetita and calcium carbonate, for sintering of tricalcium phosphate (α-TCP), which when hydrolyzed results in hydroxyapatite whiskers. The fibers of hydroxyapatite were obtained by the method molten salt using precipitated hydroxyapatite. The ceramics were characterized by analysis of X-ray diffraction (XRD), X-ray fluorescence (XRF) and scanning electron microscopy (SEM). The scaffolds were tested by mechanical compression and in vitro tests, in addition to SEM and XRD. The results indicated that the scaffolds with the addition of hydroxyapatite whiskers were more resistant to compression. The presence of whiskers, unlike fiber, characterized as reinforcement in polymer matrix. The test results of immersion in body fluid showed that the scaffolds with hydroxyapatite whiskers, unlike fiber, aimed to the deposition of apatite on their surfaces.

Key words: Poly (ε-caprolactone), hydroxyapatite, scaffolds.

Índice

Lista de Figuras x

Lista de Tabelas xii

Lista de Equações xiii

Capítulo 1 1

Introdução 1

1.1 Objetivos 2

1.1.1 Objetivo geral: 2

1.1.2 Objetivos específicos: 3

Capítulo 2 4

Revisão bibliográfica 4

2.1 Tecido ósseo 4

2.1.1 Enxertos ósseos 7

2.2 Biomaterial 9

2.3 Introdução a engenharia tecidual 11

2.3.1 Suporte (scaffolds) 12

2.4 Polímeros bioreabsorvíveis 14

2.4.1 PCL 15

2.5 Fosfato de Cálcio 18

2.5.1 Hidroxiapatita, HA 18

2.6 Compósito de PCL com hidroxiapatita 20

Capítulo 3 22

Materiais e Métodos 22

3.1 Sintetização dos *whiskers* de hidroxiapatita 23

3.1.1 Síntese do α-TCP 23

3.1.2 Obtenção dos whiskers 24
3.2 Sintetização das fibras de hidroxiapatita 24
3.3 Preparação dos suportes 25
3.4 Técnicas de caracterização 27
3.4.1 Difração de raios X 27
3.4.2 Fluorescência de raios X 27
3.4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 28
3.4.4 Distribuição Granulométrica 28
3.4.5 Análises in vitro 29
3.4.5.1 – Estudo em Fluído Corpóreo Simulado (FCS) 30
3.4.5.2- Estudos em solução de Ringer (Oxoid, Inglaterra) 30
3.4.5.3 – Avaliação biológica 31
Capítulo 4 33
Resultados e Discussões 33
4.1 Caracterizações das cerâmicas 33
4.1.1 Influência na moagem do α-TCP na hidrólise dos whiskers 39
4.2 Caracterização dos suportes 42
4.2.1 Idealização da proporção PCL/ fibra de hidroxiapatita 47
4.2.2 Idealização da proporção PCL/whiskers de hidroxiapatita 50
4.2.3 Analise in vitro: fluido corpóreo simulado (FCS) 54
4.2.4 Estudo em solução de Ringer 59
4.2.5 Teste mecânico à compressão 60
4.2.5.1 Influência da porosidade na resistência mecânica à compressão 62
Capítulo 5 65
Conclusões e sugestões para próximos trabalhos 65
Capítulo 6 68
Referências 68
Capítulo 7 73
Anexo I 73
Anexo II 74

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura do PCL 16

Figura 2: Reação de obtenção da poli (caprolactona)..... 17

Figura 3: Fluxograma da síntese dos *whiskers* de hidroxiapatita..... 23

Figura 4: Fluxograma da síntese das fibras de hidroxiapatita..... 24

Figura 5: Fluxograma da preparação dos suportes..... 25

Figura 6: Difratograma de raios X da monetita..... 34

Figura 7: Difratograma de raios X do carbonato de cálcio (c- picos de outra fase de carbonato de cálcio)..... 34

Figura 8: Difratograma de raios X do alfa TCP (marcados as fases de β-TCP e α-TCP)..... 35

Figura 9: Difratograma de raios X: Hidroxiapatita precipitada, fibras e *whiskers* de hidroxiapatita. 37

Figura 10: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras de *whiskers* (a) e fibras de hidroxiapatita (b) com escala de 5µm (a) e 25µm (b)..... 38

Figura 11: Citotoxicidade das cerâmicas. 39

Figura 12: Análise granulométrica do α-TCP moído (a) 24 e (b) 48 horas..... 40

Figura 13: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras de *whiskers* resultado da moagem do α-TCP, escala de 2,5 µm, (a) 0, (b) 24 e (c) 48 horas. 41

Figura 14: Difratogramas de raios X dos *whiskers* moídos por 0, 24 e 48 horas..... 42

Figura 15: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras com diferentes porosidades: (a) tipo I, (b) tipo II e (c) tipo III, com escala de 500µm. 43

Figura 16: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras (1) PCL, (2) PCL/fibras de hidroxiapatita, (3) PCL/*whiskers* de hidroxiapatita, com escala de (a) 500 µm e (b) 25µm. ... 45

Figura 17: Análise de citotoxicidade dos suportes..... 46

Figura 18: Teste de citotoxicidade dos suportes, PCL/ fibra, PCL/*whiskers* e PCL com ácido e sem ácido oléico. 47

Figura 19: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras P1 (1); F1 (2); F2 (3); F3 (4) e F4 (5), com escala de (a) 250 µm; (b) 25µm. 50

Figura 20: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras P1 (1); W2 (2); W3 (3); W6 (4), com escala de 250µm (a) e 50µm (b). 53

Figura 21: Imagem de microscopia eletrônica de varredura da amostra W5, com escala 5 µm, as setas estão indicando os concentrados de cerâmica na matriz polimérica. 53

Figura 22: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da amostra W2 após imersão em FCS escala de aumento de 5 µm (a) e 2,5µm. (b). 55

Figura 23: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras (1) P1, (2) F2 , (3) W2, após imersão de 1 semana em FCS com escala de (a) 250 µm e (b) 50µm. 57

Figura 24: Difratograma de raios X do PCL, antes do FCS (a) e depois (b) (p- picos de PCL).... 58

Figura 25: Difratograma de raios X do PCL/*whisker* de hidroxiapatita, antes do FCS (a) e depois (b) (p- picos de PCL; h- picos de HA). 58

Figura 26: Difratograma de raios X do PCL/fibra de hidroxiapatita, antes do FCS (a) e depois (b) (p- picos de PCL; h- picos de HA). 59

Figura 27: Boxplot dos resultados de resistência mecânica à compressão axial. 61

Figura 28: Gráfico tensão por deslocamento das amostras P1 63

Figura 29: Gráfico tensão por deslocamento das amostras SP1. 64

Figura 30: Difratograma de raios X da amostra de *whiskers* de hidroxiapatita e o padrão JCPDS do pirofosfato de cálcio (09-0346). 73

Figura 31: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras (1) W1, (2) W4, (3) W5, (4) W7, (5) W8 e (6) W9, com escala de 250 µm (a) e 50 µm (b). 75

Lista de Tabelas

Tabela 1: Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de enxertos ósseos. 8

Tabela 2: Alteração na proporção polímero/cerâmica nas amostras com whiskers de hidroxiapatita. 26

Tabela 3: Alteração na proporção polímero/cerâmica nas amostras com fibras de hidroxiapatita. 27

Tabela 4: Quantidade de amostras para o teste de compressão. 28

Tabela 5: Composição iônica do FCS comparando com a do plasma sanguíneo (Kokubo, et al., 2006). 30

Tabela 6- Relação Ca/P resultados oriundos de análises FRX. 36

Tabela 7: Razão de aspecto das cerâmicas (* valores retirados da literatura) (Ramos, et al., 2008). 37

Tabela 8: Variação de polímero e NaCl. 43

Tabela 9: Teste para remoção do ácido oléico, pH do controle, polímero com ácido e com fibra de hidroxiapatita. 46

Tabela 10: Diferentes quantidades de fibra para a matriz polimérica. 48

Tabela 11: Amostras com variação na quantidade de *whiskers* com o PCL. 51

Tabela 12: Peso das amostras antes e após imersão de 1 semana em FCS. 56

Tabela 13: Peso das amostras do dois meses de imersão em solução de Ringer. 60

Tabela 14: Variações nas quantidades de agente porogênico e polímero, nas amostras dos grupos P1 e SP1. 62

Tabela 15: Diferenças entre as amostras P1 e SP1. 62

Lista de Equações

Equação 1: Cálculo para tensão axial 29

Equação 2: Cálculo para razão de aspecto..... 36

Lista de Abreviaturas e Siglas

Letras latinas

d- Diâmetro [mm]

r- Raio [mm]

l – Comprimento [mm]

v- Volume [l]

.....

Letras Gregas

α – Alfa

β– Beta

ε- Épsilon

π- Pí [3,1415]

Θ- Ângulo do feixe de raios X incidentes

.....

Abreviações

Ca- Cálcio

Ca/P - Relação cálcio/fósforo

$CaPO_4$- Monetita de cálcio

$CaCO_3$- Carbonato de cálcio

CaO- Óxido de cálcio

$CHCl_3$- Clorofórmio

CHO-K1- *Chinese ovary hamster*

Cl^-- Íon de cloro

cm^{3-} Centímetro cúbico

CO_2- Gás carbônico

Cu- Cobre

$C_{18}H_{34}O_2$- Ácido oléico

Da – Unidade de massa atômica (Dalton)

DRX – Difração de raios X

EDS – Espectrometria de energia dispersiva de raios X

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA- *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

F1- Referência das amostras de PCL/fibras com a relação de peso em 87,5/12,5 %

F2- Referência das amostras de PCL/fibras com a relação de peso em 75/25 %

F3- Referência das amostras de PCL/fibras com a relação de peso em 62,5/37,5 %

F4- Referência das amostras de PCL/fibras com a relação de peso em 50 %

FCS- Solução de fluído corpóreo simulado

FRX – Fluorescência de raios X

HA - $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ hidroxiapatita

Hap - Hidroxiapatita sintética

HCO_3^- - Bicarbonato

H_3PO_4- Ácido fosfórico

K^+ - Íon potássio

KCl- Cloreto de potássio

kV- Kilo volts

CellTiter96® AQ_{ueous} - *Kit CellTiter96® AQ_{ueous} Non Radioactive Cell Proliferation Assay Promega Corporation*

m- Metro

mA- Miliampère

MEV- Microscópio eletrônico de varredura

Mg- Magnésio

Mg^{2+} - Íon magnésio

min- Minuto

mL- Mililitro

mm- Milímetro

mol- $6{,}02 \times 10^{23}$ moléculas

MPa- Mega pascal

MSS- *Molten Salt Synthesis*

MTS- Corante supravital do composto tetrazólico

N- Newton

Na^{+} - Íon sódio

NaCl- Cloreto de sódio

NH_4OH- Hidróxido de amônio

nm- Nanometro

Ni- Níquel

N_2- Nitrogênio líquido

O- Oxigênio

OH- Hidroxila

P- Fósforo

P1- Referência das amostras de PCL

PCL - Poli (ε-caprolactona)

PCL/ácido- Poli (ε-caprolactona) com ácido oléico

PCL/fibra- Poli (ε-caprolactona) com fibras de hidroxiapatita

PCL/fibra/ácido- Poli (ε-caprolactona) com fibras de hidroxiapatita e ácido oléico

PCL/*whiskers*- Poli (ε-caprolactona) com *whiskers* de hidroxiapatita

PEAD- Poli etileno de alta densidade

PGA- Poli (ácido glicólico)

pH- Potencial hidrogeniônico

PLLA - poli (ácido láctico)

PMS- Agente acoplador de elétrons

ppm- Parte por milhão

RPMI 1640- Meio de cultura

SO_3^{2-}Íon de ácido sulfúrico

TCP - $Ca_3(PO_4)_2$ tricálcico fosfato

W1- Referência das amostras de PCL/*whiskers* com a relação de peso em 95/5 %

W2- Referência das amostras de PCL/*whiskers* com a relação de peso em 90/10 %

W3- Referência das amostras de PCL/*whiskers* com a relação de peso em 87,5/12,5 %

W4- Referência das amostras de PCL/*whiskers* com a relação de peso em 85/15 %

W5- Referência das amostras de PCL/*whiskers* com a relação de peso em 80/20 %

W6- Referência das amostras de PCL/*whiskers* com a relação de peso em 75/25 %

W7- Referência das amostras de PCL/*whiskers* com a relação de peso em 70/30 %

W8- Referência das amostras de PCL/whiskers com a relação de peso em 62,5/37,5 %

W9- Referência das amostras de PCL/whiskers com a relação de peso em 50 %

°C – Graus centígrados

%- Porcentagem

µm – micrometro

µg- micrograma

.....

Siglas

ASTM- *American Society for Testing Materials*

ANOVA- Análise de variância

ATCC- *American Type Culture Collecion*

FDA - *Food and Drug Administration*

ISO- *International Standards Organization*

IPEN- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

JCPDS - Banco de dados de padrões de difração de raios X em materiais particulados

LRAC- Laboratório de Recursos Analítico e de Calibração

USP- *United States Pharmacopeia*

Capítulo 1

Introdução

O avanço da medicina proporcionou um aumento na expectativa de vida humana, como consequência ocorre o aumento de doenças relacionadas à terceira idade. Dentre as doenças relacionadas com o tecido ósseo pode-se citar: a osteoporose, a perda de massa óssea por atrofia, os tumores, o câncer entre outras. O tratamento das perdas ósseas é realizado com enxertos, tais como os autógenos (mesmo paciente), os alógenos (mesma espécie), os xenoenxertos (diferentes espécies) e os biomateriais. O uso de biomateriais apresenta vantagens quando comparado com outros tratamentos, já que o seu uso reduz a possibilidade de contaminação cruzada, quando seguidos os protocolos de fabricação e cirúrgico, reduz o risco de rejeição e elimina uma segunda intervenção cirúrgica, quando o material é bioreabsorvivel (Peterson, et al., 1942).

Apesar do avanço tecnológico no desenvolvimento de novos materiais, ainda existe uma escassez em biomateriais bioreabsorvíveis. Para atender a necessidade de aumentar a qualidade de vida, diretamente relacionada ao envelhecimento da população, esses materiais deverão ser capazes de guiar processos de restauração da funcionalidade dos tecidos afetados, além de serem biocompatíveis, ou seja, não conduzirem a processos danosos ao organismo. Assim, a medida que o tecido é formado, não haveria a necessidade da presença do biomaterial. Esta idéia de conduzir o processo de regeneração do tecido levou ao estabelecimento da engenharia tecidual, que por sua vez, força o estabelecimento de novas estratégias de criação de novos biomateriais.

A engenharia tecidual é definida como um campo interdisciplinar que aplica princípios das engenharias e de ciências, para o desenvolvimento de substitutos biológicos que restaurem,

mantenham ou melhorem a função de diferentes tecidos e órgãos. Consiste numa técnica que utiliza células vivas do paciente ou as atrai, para auxiliar na formação de tecidos ou na regeneração, e assim produzir benefícios terapêuticos (Langer, et al., 1993).

As alternativas para restaurar, manter ou melhorar a função de tecidos e órgãos são dependentes de duas abordagens: a primeira consiste em uma abordagem, na qual as células são semeadas em matrizes tridimensionais *in vitro*, e irão se proliferar e posteriormente, serem implantadas a partir de biorreatores nos pacientes, para substituir os tecidos doentes ou danificados; a segunda abordagem envolve o uso de materiais bioativos, para estimular o reparo de tecidos localizados, pois esses materiais liberam substâncias inorgânicas na forma de produtos iônicos de dissolução, que ativam os genes das células em contato com um estímulo bioativo, assim nessa abordagem a matriz com materiais bioativos é implantada no paciente sem células semeadas (Oréfice, et al., 2006).

Visando a utilização dos princípios da engenharia tecidual, muitas pesquisas tem objetivos de desenvolver novos biomateriais para o uso nas áreas odontológicas e médicas para substituições ósseas. Com o objetivo de agir como um molde para as células aderirem, migrarem, diferenciarem e proliferarem os suportes devem mimetizar a matriz extracelular. Esse trabalho teve como o principal objetivo desenvolver um suporte polimérico com adição de agentes de reforços, sendo eles fibras e *whiskers* de hidroxiapatita, os quais foram selecionados devido as suas propriedades de bioatividade.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral:

O principal objetivo dessa pesquisa foi à obtenção de um compósito com o polímero poli (ε-caprolactona) com *whiskers* de hidroxiapatita ou fibras de hidroxiapatita, atuando como agentes bioativos e melhorando a resistência mecânica à compressão dos suportes, para sua utilização na engenharia tecidual óssea.

1.1.2 Objetivos específicos:

As obtenções dos compósitos poliméricos com fibras e *whiskers* de hidroxiapatita desencadearam uma série de processos laboratoriais, tais como as produções de reagentes primários, caracterizações dos reagentes e dos suportes e processos de preparação dos suportes tridimensionais.

As produções de reagentes primários foram:

- Monetita ($CaPO_4$);
- Carbonato de cálcio ($CaCO_3$);

Nesses reagentes foram avaliados a contaminação pelo elemento magnésio durante o processo de síntese. Os reagentes primários foram utilizados para a síntese do fosfato tricálcico (α-TCP), que após sua caracterização, foi hidrolisado resultando em *whiskers* de hidroxiapatita.

A obtenção das fibras foi realizada a síntese da hidroxiapatita precipitada.

O preparo dos suportes tridimensionais foi utilizado os produtos finais das sínteses, ou seja, fibras e *whiskers* de hidroxiapatita. Foi realizado caracterizações com o intuito de objetivar o uso no futuro como dispositivo na área médica e odontológica.

Capítulo 2

Revisão bibliográfica

2.1 Tecido ósseo

Um dos aspectos importantes a considerar para o desenvolvimento de materiais biocompatíveis, está primeiramente, em estudar as características e funções do tecido natural a substituir.

O tecido ósseo é o constituinte principal do esqueleto, serve de suporte para as partes moles e protege os órgãos vitais, como os contidos nas caixas cranianas e torácicas, e no canal raquidiano. Aloja e protege a medula óssea é responsável por formar células do sangue. Além de proporcionar apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis, constitui um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular. Não menos importante, o tecido ósseo também possui a função de depósito de cálcio, fosfato e outros íons importantes para o equilíbrio do corpo humano, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada de acordo com a concentração nos líquidos corporais (Junqueira, et al., 1999)

Sendo um tipo especializado de tecido conjuntivo, o tecido ósseo é formado por células e uma matriz extracelular calcificada, a matriz óssea. As células são os osteócitos, os osteoblastos e os osteoclastos. Cada célula é responsável por funções nesse tecido, como por exemplo, os osteócitos, são essenciais para a manutenção da matriz óssea, os osteoblastos, são os produtores da parte orgânica da matriz e os osteoclastos participam dos processos de remodelação ósseas.

Todos os ossos são revestidos em suas superfícies externas e internas por membranas conjuntivas que possuem células osteogênicas: o periósteo e o endósteo, respectivamente. As suas principais funções são a nutrição e o fornecimento de novos osteoblastos, para o crescimento e a recuperação do tecido ósseo (Peterson, et al., 1942).

Os osteócitos são as células encontradas no interior da matriz óssea, ocupando as lacunas das quais partem canalículos. Cada lacuna contém apenas um osteócito. Dentro dos canalículos os prolongamentos dos osteócitos estabelecem contatos através de junções comunicantes, por onde podem passar pequenas moléculas e íons de um osteócito para o outro. O pequeno espaço entre os prolongamentos celulares e as paredes dos canalículos estabelece vias de transporte de nutrientes e metabólitos, entre os vasos sanguíneos e os osteócitos situados na profundidade do tecido ósseo (Junqueira, et al., 1999).

Os osteoblastos são as células que sintetizam a parte orgânica da matriz, como o colágeno tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas adesivas. Essas células são capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. Sua localização se concentra nas superfícies ósseas. O osteoblasto quando aprisionado pela matriz óssea passa a ser chamado de osteócito. A matriz se deposita ao redor do corpo da célula e de seus prolongamentos, formando assim as lacunas e os canalículos. A matriz óssea, recém formada, adjacente aos osteoblastos ativos, e que não está ainda calcificada, recebe o nome de osteóide (Junqueira, et al., 1999).

Os osteoclastos são células móveis, gigantes, extensamente ramificadas, com partes dilatadas. Frequentemente, nas áreas de reabsorção de tecido ósseo encontram-se porções dilatadas dos osteoclastos, colocadas em depressões da matriz escavadas pela ação enzimática e conhecidas como lacunas de *Howship*. Os osteoclastos secretam ácido, colagenase e outras enzimas que atacam a matriz e liberam cálcio (Junqueira, et al., 1999).

A parte inorgânica representa cerca de 50% do peso da matriz óssea. Os íons mais encontrados são o fosfato e o cálcio. Há também bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato em pequenas quantidades. O cálcio e o fósforo formam cristais com a estrutura de hidroxiapatita. Os íons da superfície do cristal de hidroxiapatita são hidratados, existindo, portanto uma camada de água e íons em volta do cristal. Essa camada é denominada capa de hidratação, essa camada facilita a troca de íons entre o cristal e o líquido intersticial. A parte orgânica é formada por fibras

colágenas (95%) constituídas de colágeno do tipo I e por pequena quantidade de proteoglicanas e glicoproteínas adesivas. A associação de hidroxiapatita com fibras colágenas é a responsável pela dureza e a resistência do tecido ósseo (Cullinane, et al., 2008).

Como o osso é uma mistura de fibras tenazes (fibrilas de colágeno do tipo I) e partículas sólidas (cristais de fosfato de cálcio), ele apresenta boa resistência tanto para cargas de compressão quanto para cargas de tração. O osso pode assumir diferentes morfologias e funções, de acordo com sua localização no esqueleto humano (Cullinane, et al., 2008). Os ossos podem ser classificados em ossos corticais (compacto) ou trabecular (esponjosos) definidos adiante.

O osso cortical, também chamado osso compacto, é duro, forte e pode ser encontrado na superfície de ossos planos ou entre as duas extremidades de ossos longos em mamíferos, onde é característico do córtex ósseo. Logo, o nome osso cortical. No osso cortical, os canais vasculares são muito estreitos de forma que o osso cortical é macroscopicamente sólido. Por outro lado, no osso trabecular grosseiro ou esponjoso, esses canais são muito mais largos, variando de um milímetro a um centímetro ou mais de diâmetro. No osso trabecular fino, o componente vascular é também dominante, mas a textura é bem mais fina e este somente pode ser observado com um microscópio (Kreider, et al., 2009).

Apesar de sua resistência às pressões e da sua dureza, o tecido ósseo é muito plástico, sendo capaz de remodelar sua estrutura interna em resposta a modificações nas forças a que está submetido. Um exemplo dessa plasticidade é quando na arcada dentária ocorre a perda de um elemento dentário, como o osso dessa região está sem a carga mastigatória que era acostumada a ter, com o passar dos anos esta região óssea acaba atrofiando, reduzindo a quantidade óssea tanto em altura como em espessura (Peterson, et al., 1942).

O esqueleto contém 99% do cálcio do organismo e funciona como uma reserva desse íon. Ocorre um intercâmbio contínuo entre o cálcio do plasma e o dos ossos. O cálcio absorvido da alimentação é depositado no tecido ósseo, para manter esse equilíbrio. Existe um mecanismo duplo de mobilização do cálcio depositado nos ossos. Um dos mecanismos é representado pela simples transferência dos íons dos cristais de hidroxiapatita para o líquido intersticial, do qual o cálcio passa para o sangue. Sendo puramente físico é favorecido pela grande superfície dos cristais de hidroxiapatita e tem lugar principalmente no osso esponjoso (Oréfice, et al., 2006).

2.1.1 Enxertos ósseos

O uso de enxertos ósseos na odontologia objetiva a reconstrução de defeitos nos ossos faciais, infelizmente são inúmeras causas desses defeitos, como erradiação de condições patológicas, trauma, infecções e deformidades congênitas. Quando uma estrutura óssea é defeituosa, tanto em tamanho, forma, posição ou volume, a cirurgia reconstrutora pode substituir essa estrutura. Os enxertos ósseos são comumente usados para substituição do tecido ósseo perdido (Cullinane, et al., 2008).

Diversos são os tipos de enxertos disponíveis para o uso em cirurgia reconstrutora em odontologia, uma classificação útil divide-os de acordo com sua origem. Devido às suas origens e ao preparo utilizado para evitar intensa resposta imunológica, os enxertos têm diferentes qualidades e indicações de uso. São eles os enxertos autógenos, alogênicos, xenogênicos e os biomateriais (Peterson, et al., 1942).

Os enxertos autógenos também conhecidos como auto-enxertos, são compostos de tecidos do próprio indivíduo. Por ser do mesmo indivíduo, apresenta uma imunocompatibilidade com o organismo receptor. Esse tipo de enxerto é o mais utilizado na cirurgia oral e maxilofacial. Ele pode ser obtido de diversas regiões do corpo, como da crista ilíaca, costela, abóboda craniana, mento e ramo mandibular, a extração do tecido pode ser sob diversas formas, como blocos, tiras, particulados, entre outros. Existe uma limitação em torno do tamanho e formato do enxerto, não podendo ser alterados significantemente, já que o tecido mole é o tecido responsável pelo suprimento ósseo, ou seja é responsável pelo suprimento de fluidos ao tecido ósseo, necessitando cobrir completamente o enxerto ósseo. A maior vantagem desse método é de fornecer células osteogênicas para a fase inicial de formação óssea, quando o enxerto tiver sua retirada e implantação de imediato não irar desencadear uma resposta imunológica. Porém necessita de um segundo sítio cirúrgico para a obtenção do enxerto (Peterson, et al., 1942).

Outro tipo são os enxertos alogênicos, ou aloenxertos, os quais são obtidos de outro indivíduo da mesma espécie. Como existe uma diferença geneticamente, esses enxertos são tratados para reduzir a antigenicidade. O mais utilizado é o osso liofilizado, ou seja, que passou pela técnica de liofilização, a qual consiste na retirada de umidade do osso desengordurado.

Vantagem desse enxerto é a ausência de necessidade de outro local cirúrgico no hospedeiro, porém como uma importante desvantagem é o não fornecimento de células viáveis para a osteogênese (Duarte, et al., 2000).

Os enxertos xenogênicos, ou xenoenxertos, são retirados de uma espécie e transplantados para outra. As diferenças antigênicas desse enxerto são mais pronunciadas do que no enxerto alogênico. Vantagens desse enxerto é a possibilidade de obtenção de grande quantidade, além de não requerer outro local cirúrgico. Porém não fornecem células viáveis para osteogênese e devem ser tratados rigorosamente para a redução da antigenicidade (Peterson, et al., 1942).

Os biomateriais podem ser definidos como substâncias de origem naturais ou sintéticas que são tolerados de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos (Williams, 1987). Infelizmente, as desvantagens desses materiais são que em alguns casos, não apresentam uma resistência adequada, assim como a necessidade de uma segunda cirurgia para a troca ou retirado do enxerto. No item 2.2 são apresentados mais detalhes nos conceitos de biomateriais.

Na Tabela 1, pode visualizar as vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de enxertos ósseos.

Tabela 1: Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de enxertos ósseos.

Enxertos ósseos	Vantagens	Desvantagens
Auto-enxertos	-Fornece células osteogênica; -Não despertar resposta imunológica.	-Segundo sítio cirúrgico.
Aloenxertos	-Ausência de outro local cirúrgico.	-Não fornece células viáveis para osteogênese.
Xenoenxertos	-Grande disponibilidade óssea; -Não requer outro local cirúrgico.	-Não fornece células viáveis para osteogênese; -Tratamento rigoroso antes do uso.
Biomateriais	-Grande disponibilidade; -Biocompatível.	-Dependendo do material, não apresenta resistência adequada; -Necessidade de uma segunda cirurgia (depende do material).

2.2 Biomaterial

De acordo com a *Clemson Advisory Board for Biomaterials*, "um biomaterial é uma substância sistêmica e farmacologicamente inerte designada para implante ou para incorporação em sistemas vivos" (Park, et al., 2007). Assim, o termo biomaterial engloba todos os materias usados para aplicações médicas que estejam em interfaces com sistemas vivos ou outros sistemas desenvolvidos para usos extracorpóreos. Os biomateriais incluem metais, cerâmicas, polímeros naturais (biopolímeros), polímeros sintéticos de estruturas simples ou complexas.

Outra definição é a que "toda substância (com exceção de drogas) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que durante um período de tempo indeterminado é empregado como um todo ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais", segundo a *Consensus Development Conference* (Williams, 1987).

Para que um biomaterial seja eficiente, ele necessita apresentar uma propriedade de biocompatibilidade, ou seja, esse não pode gerar uma resposta danosa ao organismo. Assim, um biomaterial e seus produtos de degradação devem ser tolerados pelos tecidos envoltórios e não acarretarem prejuízos ao organismo à curto e longo prazo. Para afirmar que um material é biocompatível, atualmente existem normas padronizando testes e análises que testam as respostas dos biomateriais ao organismos. Os danos são observados e classificados, segundo os conceitos de algumas normas como a *American Society for Testing Materials* (ASTM), a *International Standards Organization* (ISO) e a *United States Pharmacopeia* (USP).

Tendo em vista que a biocompatibilidade é uma propriedade importante para o uso humano de biomateriais, fica evidente a necessidade do estudo *in vitro* e *in vivo* do comportamento celular na interface com esses materiais. A norma ISO 10093, sob o título geral de avaliação biológica de dispositivos médicos, apresenta como o principal objetivo a preservação da saúde dos seres humanos, com a sua função de servir como uma armação para o planejamento das avaliações biológicas que minimizem o número e exposição de animais (ISO, 1992).

Outra propriedade relacionada à utilização em seres humanos é a biofuncionalidade, ou seja, é a capacidade do biomaterial em realizar a função designada. Um exemplo dessa propriedade é quando um material necessita reparar um tecido ou fixar uma fratura, assim é de extrema importância as propriedades físicas, mecânicas e químicas do material.

O sucesso de um biomaterial e/ou de sua implantação está relacionada às propriedades de biocompatibilidade e biofuncionalidade, e não menos importante, a condição do sítio receptor e a competência do cirurgião que implanta e monitora a proservação. Os biomateriais são utilizados em diferentes aplicações, sendo destinados à substituição de tecidos moles, substituição de tecidos duros e materiais para substituições no sistemas cardiovasculares.

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

Muitas vezes, ao substituir o tecido ósseo, são utilizados materiais denominados de bioativos, ou seja, promovem ligações de natureza química entre material e tecido ósseo, em função da similaridade química entre estes materiais e a parte mineral óssea, ocorrendo uma osteocondução. Exemplos de materiais bioativos são: a hidroxiapatita, vidrobioativos e vitro-cerâmicas.

Os biotoleráveis são materiais tolerados pelo organismo, ou seja, em sua presença há a formação de uma camada de tecido fibroso ao redor do implante. De acordo com a espessura desta camada será definida a toxicidade do material. Exemplos destes são praticamente todos os polímeros sintéticos e grande parte dos metais.

No entanto, quando essa camada fibrosa apresentar-se extremamente fina, praticamente inexistente esse material será classificado como bioinerte, ou seja, o material libera uma quantidade mínima de seu composto. São os mais utilizados a alumina, zircônia, titânio, ligas de titânio e carbono.

Quando os materiais, após certo período de tempo em contato com o tecido forem degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo serão chamados de bioreabsorvíveis. Estes materiais são de extremo interesse em aplicações que não é desejável outra intervenção

cirúrgica, tal como na engenharia tecidual. São materiais como a poli (ε-caprolactona), o β-fosfato tricálcico (β-TCP) o α-fosfato tricálcico (α-TCP).

2.3 Introdução a engenharia tecidual

Mesmo com o avanço tecnológico na área da saúde, ainda hoje para a maioria dos tecidos e órgãos, a melhor resposta funcional do organismo a implantes, continua sendo o transplante de órgãos. Porém, a disponibilidade desses transplantes e empecilhos relacionados à compatibilidade do órgão implantado gera o interesse em regeneração e reparação de tecidos.

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

O objetivo da engenharia tecidual é a utilização de células para o crescimento de tecidos, guiada por uma estrutura tridimensional, os suportes porosos. As maiorias dos suportes são produzidos com materiais biodegradáveis ou bioreabsorvíveis. No item 2.3.1. será detalhando as características dos suportes. Os principais objetivos da engenharia tecidual são que esses novos tecidos repostos e reconstruídos aliviem a dor, restaurarem mecanicamente a estabilidade, além de recuperar a função (Langer, et al., 1993).

A engenharia tecidual consiste na regeneração de órgãos e tecidos vivos por duas linhas importantes: na primeira, há a coleta de tecidos de um indivíduo, que é dissociado em células, cultivadas sobre um suporte biológico ou sintético, para então serem enxertados no mesmo paciente. Na outra linha, o suporte é introduzido, sem uma cultura celular implantada previamente, assim essa estrutura implantada necessita conter fatores de indução para gerar à atração de células (Kaigler, et al., 2001).

2.3.1 Suporte (scaffolds)

Em uma era de redução da disponibilidade de transplantes e o aumento de necessidades de reposições, o campo de engenharia tecidual abre esperança para pacientes que necessitam desesperadamente de substituições de tecidos e órgãos. O principal objetivo dos suportes, também conhecido como *scaffolds,* é mimetizar o tecido para o crescimento tecidual nesse biomaterial para a adesão e proliferação celular (Murphy, et al.).

Desde 1980, os pesquisadores desenvolvem varias técnicas de fabricação de suportes, que resultam em suportes com propriedades específicas para cada tipo tecidual (Murphy, et al.). Suportes poliméricos podem permitir resistência mecânica e poros interconectados, variando a química da superfície e a geometria. As características dos suportes devem ser analisadas de acordo com sua aplicação, assim deve ser selecionado o polímero, os componentes adicionais e as técnicas de fabricação.

A superfície do material e seus produtos de degradação necessitam serem biocompatíveis com o organismo. O processo de escolha do processo de fabricação não deve afetar a biocompatibilidade e a biodegradabilidade dos suportes.

A função imediata dos suportes ao relacionar com o direcionamento celular é para o crescimento tecidual e migração de células dos tecidos adjacentes para o defeito ou para a facilitação do crescimento das células implantadas na matriz tridimensional. Assim, é desejado uma superfície favorável para o crescimento e proliferação celular. O controle de poros e sua interconectividade são essenciais para a formação tecidual, vascularização da área, além do transporte de nutrientes e resíduos metabólicos.

As propriedades mecânicas dos suportes aumentam de acordo com: as propriedades poliméricas; a geometria da matriz tridimensional; a incorporação de materiais que atuam como reforços mecânicos: e a técnica de fabricação. Por exemplo, polímeros com alta cristalinidade exibem alta resistência à tensão e apresentam lenta taxa de degradação. Métodos de fabricação podem reduzir a cristalinidade reduzindo a vida útil do suporte.

As técnicas de produção poliméricas de suportes tridimensionais dependem quase que inteiramente das propriedades internas e superficiais do material, e da função proposta para o

suporte. Porém, o custo e o tempo de fabricação devem ser considerados para a viabilidade do método. As maiorias das técnicas envolvem a aplicação de calor e/ou de pressão no polímero ou de dissolução por solventes orgânicos para moldar o material em sua forma desejada. As principais técnicas são: a evaporação de solvente com adição de sal (*solvent-casting particule-leaching)* (Mikos, et al., 1996), a injeção de gás *(gas foaming* (Harris, et al., 1998), a inversão de fases *(phase separation)* (Pezzin, et al., 2002), a deposição por fusão *(melt moulding)* (Hutmacher, et al., 2004), *a freeze drying* (Patist, et al., 2004).

A técnica de evaporação de solvente com adição de sal (*solvent-casting and particule-leaching)* foi desenvolvida para aumentar o controle na porosidade e no diâmetro dos poros. Essa técnica envolve a dissolução polimérica com a adição de um agente porogênico, que após a secagem e solidificação do polímero, ocorre sua retirada permitindo assim, a criação de uma rede de poros interconectados (Murphy, et al.). A técnica permite uma boa reprodutibilidade, entretanto a interconexão dos poros nem sempre é total e pode ainda reter partículas de sal no seu interior (Mikos, et al., 1993). Para Harris (1998) existem desvantagens nos processos de preparação de amostras porosas que requerem o uso de solventes orgânicos, já que pode deixar resíduos que influenciarão na cultura celular (Harris, et al., 1998).

Os suportes porosos implantados em tecidos ósseos apresentam discordâncias em relação ao diâmetro ideal dos poros para o crescimento tecidual. Alguns autores falam em variações de diâmetro entre 300-400 µm (Harris, et al., 1998) (Mikos, et al., 1993), outros dão intervalos ainda mais amplos na ordem de 200-400 µm (Choong, et al., 2004). Assim o diâmetro ideal dos poros é algo a ser elucidado. Quando apresentado poros inferiores a 100 µm, não se permite uma vascularização no suporte e quando superior a 500 µm, não se fornece uma mimetização óssea, não apresentando uma superfície adequada para a adesão e proliferação celular. A porosidade é fornecida pela taxa entre agente porogênico e polímero, o ideal é ser acima de 70%, já que a porosidade de osso trabecular se encaixa nessa faixa.

Para a engenharia tecidual é muito interessante a utilização de suportes bioreabsorvíveis que tenham a taxa de absorção controlada, além de exibirem propriedades mecânicas e físicas controladas sobre condições desejadas. Estes suportes são principalmente formados por polímeros bioreabsorvíveis, devido à similaridade química e estrutural. Entretanto reabsorções de diferentes tipos de polímeros podem ocorrer dependendo das interações das espécies e da adesão

intermoleculares, as quais induzem um diferente aspecto no ataque hidrolítico e quebra que irão caracterizar mudanças nos efeitos do comportamento da degradação final.

Para a substituição no tecido ósseo, os suportes tridimensionais necessitam apresentar uma elevada resistência mecânica à compressão, devido à necessidade de suporte aos tecidos adjacentes, assim materiais como poli (ε-caprolactona) e poli (ácido lático) são muito utilizados (Guarino, et al., 2007).

2.4 Polímeros bioreabsorvíveis

Os polímeros são materiais orgânicos ou inorgânicos, cujas estruturas são formadas por unidades de repetição, os meros, unidos por ligações covalentes. Entre os polímeros que são utilizados há mais de duas décadas na área médica, estão os poli (α-hidróxi ácidos), que são considerados uma das famílias de polímeros mais promissoras na área dos bioreabsorvíveis. Sua grande vantagem esta em sua forma de degradação que ocorre por hidrólise de suas ligações ésteres. Como exemplo são o poli(ácido lático) (PLLA), o poli(ácido glicólico) (PGA) e o polímero poli(ε-caprolactona) (PCL), estas substâncias obtiveram a aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (Salgado, et al., 2009).

Ao utilizar apenas um tipo de polímero para a fabricação de suportes, muitas vezes não é atingido todas as características necessárias para a determinada aplicação clínica. Desta forma, pesquisas têm se direcionado para o estudo de blendas, copolímeros e compósitos que aperfeiçoem as propriedades fundamentais dos suportes, tais como a permeabilidade, a taxa de absorção e as propriedades elásticas (Zhang, et al., 1995).

Seria muito interessante a utilização de suportes que se degradam em uma taxa controlada, sendo a taxa ideal, proporcionalmente oposta ao crescimento tecidual. De tal forma, permitiria que mantivesse suas propriedades mecânicas e físicas até uma condição desejada. Os polímeros podem ser classificados de acordo com sua degradação em biodegradáveis, bioerodíveis, bioreabsorvíveis e bioabsorvíveis (Vert, et al., 1993).

Os polímeros biodegradáveis são aqueles nos quais ocorre degradação macromolecular, porém sem a eliminação dos produtos e subprodutos pelo organismo, ao contrário dos

bioerodíveis, que são caracterizados por uma perda de massa, sendo os produtos e subprodutos reabsorvidos pelo organismo.

Os bioreabsorvíveis são degradados através da diminuição de tamanho e são reabsorvidos *in vivo*, ocorrendo sua eliminação por rotas metabólicas. Quando sua dissolução ocorre em fluídos sem qualquer clivagem das cadeias moleculares ou por uma diminuição da massa molecular, podemos chamá-los de bioabsorvíveis.

Alguns fatores podem influenciar na degradação polimérica são eles: o local de implantação do implante, solicitação mecânica, massa molar, distribuição da massa molar, composição química, cristalinidade, morfologia, entre muitos outros (Middleton, et al., 2000).

A cristalinidade dos polímeros mostra-se relacionada à velocidade de degradação, devido à disposição espacial das cadeias poliméricas, assim o efeito de cristalinidade influi na taxa de absorção de água pelo polímero. A degradação polimérica ocorre em duas etapas, primeiramente consiste na penetração e difusão das moléculas de água nas regiões amorfas do material, e subsequente a cisão hidrolítica das ligações ésteres das cadeias. Posteriormente, quando uma considerável região amorfa está degradada, prossegue para regiões cristalinas. Nesse momento, ocorre um aumento da cristalinidade devido a rearranjos das cadeias de menor massa molar que são originadas no processo de degradação (Duek, et al., 1999).

A morfologia do implante também possui uma influência na taxa de degradação, devido à taxa de penetração e o crescimento celular apresentarem diretamente relacionadas ao tamanho e distribuição dos poros (Mikos, et al., 1993).

2.4.1 PCL

A poli (ε- caprolactona), ou policaprolactona (PCL) é um polímero sintético biocompatível, possuindo uma fórmula estrutural apresentada na Figura 1. Apresenta um caráter hidrofóbico (Amass, et al., 1998), pertence à família dos poliésteres alifáticos, sendo sintetizado por meio de polimerização por abertura de anel de ε- caprolactona, para a obtenção da unidade repetitiva. Este polímero é por definição um produto de condensação de um grupo hidroxílico e um carboxílico dentro da mesma molécula.

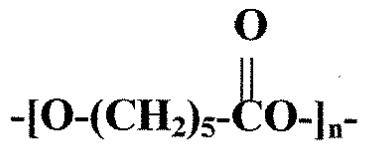


Figura 1: Estrutura do PCL

O polímero é semicristalino, apresenta alta cristalinidade o que garante um pico de fusão bem definido e intenso. Sua massa molecular pode variar de 5.000 a 80.000 Da. Apresenta como características especiais um caráter hidrofóbico (Amass, et al., 1998), uma baixa ordem de toxicidade, baixo ponto de fusão (50-60 graus Celsius), temperatura de transição vítrea abaixo da temperatura ambiente (-60 graus Celsius), grande miscibilidade ou compatibilidade mecânica com outros tipos de polímeros (Sinha, et al., 2004), baixa viscosidade e densidade no valor de 1.13 g/cm^3 (Mooney, et al., 1992). As propriedades de baixa viscosidade e grande miscibilidade tornam esse polímero um bom auxiliar de processamento de polímeros, reduzindo assim a temperatura de transição vítrea e o módulo de elasticidade (Mariani, 2005).

As aplicações desse polímero são diversas como, por exemplo, em sistemas de liberação de drogas, recobrimento de cânulas uretrais, assim como na engenharia tecidual, no tecido epidérmico, muscular e também para crescimento de células osteoblásticas e fibroblásticas (Sasmazel, et al., 2008).

O processo de obtenção da policaprolactona consiste na polimerização por abertura do anel, oriundo do monômero de e-caprolactona, resultando como produto um poliéster alifático, visto na Figura 2 (Jones, et al., 2002). Em 1958, foi descrita a primeira síntese do PCL, devido à abertura do anel do monômero, pela adição de carbonato de potássio, com uma temperatura de 150 °C por 5 horas, sintetizando a primeira poli(ε-caprolactona) (Natta, 1958).

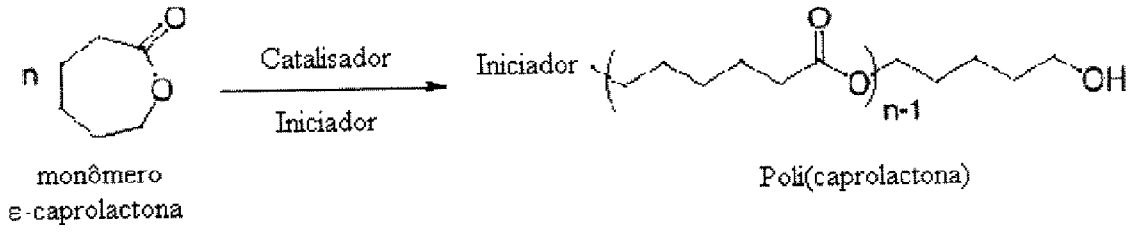


Figura 2: Reação de obtenção da poli (caprolactona).

O PCL é solúvel em clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, benzeno, tolueno, ciclohexanona e 2- nitropropano em temperatura ambiente. Possui uma lenta solubilidade em acetona, 2- butanona, acetato de etila, dimetilformamida, acetonitrila e é insolúvel em álcool, petróleo éter (benzina) e em éter dietílico (Sinha, et al., 2004).

A degradação do PCL é auto catalítica (Pitt, 1990). Os padrões cinéticos da degradação consistem em um processo auto catalítico, qual a liberação do ácido carboxílico e hidrólises de grupos e a clivagem de grupos ésters. A degradação é um pouco mais lenta se estendendo por um período maior de um ano, sendo dividido em três etapas. A primeira etapa o material sofre um processo de degradação não enzimática que resulta na susceptibilidade da ligação éster à hidrólise. A segunda é caracterizada por um declínio da taxa de cisões das cadeias e um aparecimento de perda de massa molar, formando oligômeros de cadeia curta. A perda de massa tem uma grande probabilidade de ser relacionada às cisões das cadeias de peso molecular mais baixo, as quais irão produzir um fragmento pequeno capaz de difundir para fora do volume do polímero produzindo partículas menores aumentando a facilidade de serem fagocitadas. A última etapa, o PCL de baixo peso molecular é fagocitado por macrófagos e metabolizado pelo ciclo dos ácidos tricarboxílicos ou eliminado pela excreção renal (Tollon, 2005).

A degradação de polímeros *in vitro* difere da degradação *in vivo*, principalmente que no último o implante está submetido aos esforços mecânicos. A taxa de degradação depende da composição química, da forma e da superfície do implante. Sendo fatores que podem ser sistematicamente variados e avaliados nas situações de testes *in vitro.* As propriedades específicas como a massa molar inicial, a distribuição de massa molar, o grau de cristalinidade e a taticidade

podem ser controlados e avaliados antes da implantação, pelo teste de degradação em solução tampão (Elst, 1996).

O suporte de PCL quando implantado sozinho em defeitos ósseos, pode vir a ser encapsulado por tecido fibroso e assim não apresentando uma aderência ao osso devido à falta de bioatividade, desse modo sendo isolado do osso ao seu redor, permanecendo como um corpo estranho (Kokubo, et al., 2003). Para obter a osteocondutividade e a bioatividade são sintetizados suportes de PCL com adição de materiais bioativos, tal como o compósito de PCL com hidroxiapatita (Choi, et al., 2004) (Hae-Won, 2007) (Hao, et al., 2003).

2.5 Fosfato de Cálcio

Os fosfatos de cálcio de relevância biológica são: fosfato de cálcio amorfo, brushita, monetita, fosfato de cálcio octacálcico, fosfato tricalcico, pirofosfato de cálcio e apatita. Dentre as fases minerais presentes em calcificações normais, ou seja, não patológicas, as apatitas são as mais comumente encontradas (Dorozhkin, 2009).

Os fosfatos de cálcio são classificados de acordo com a relação Ca/P que apresentam em sua fórmula química, variando de 0,50 a 2,00, o que define seu comportamento em relação à biodegradação. Por exemplo, o fosfato tricálcico, cuja fórmula química é $Ca_3(PO_4)_2$, tem uma relação Ca/P de 1,5 e é solubilizado em meio fisiológico, enquanto que a hidroxiapatita estequiométrica, cuja relação é de 1,67 é menos solúvel (Vallespir, 2001).

Estudos de difração de raios X e análise química em 1926 identificaram a fase mineral da dentina, esmalte e osso como sendo fosfato de cálcio com uma estrutura de apatita, idealizada como $(Ca)_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, ou seja: hidroxiapatita (Le Geros, 1991).

2.5.1 Hidroxiapatita, HA

Classificado como um material bioativo a hidroxiapatita possui uma fórmula química representado por: $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Sendo depositados na matriz extracelular de tecidos calcificados do osso e dentina. A hidroxiapatita sintética (Hap) é uma cerâmica de fosfato de cálcio, tem sido utilizada como biomaterial, por apresentar uma excelente biocompatibilidade e uma estrutura química similar com a porção mineral do osso (Sepulveda, et al., 2002).

O crescimento da hidroxiapatita, tanto no meio biológico quanto em soluções aquosas, ocorre em meio contendo íons cálcio e fósforo, e elementos-traços essenciais tais como Mg^{2+}, HCO_3^-, K^+ e Na^+ (Kanzakl, et al., 2000) (Mayer, et al., 1997).

A hidroxiapatita deficiente em cálcio permite que quando em contato com o osso, estabeleça ligações químicas com o tecido ósseo (Saleh, et al., 2004). Isto por que o material é composto pelos mesmos íons que compõe a fase mineral do osso natural, sendo, portanto capaz de participar do equilíbrio Ca/P no organismo (Barth, et al., 1988). A superfície permite uma interação de ligações do tipo dipólo, fazendo que moléculas de água, proteínas e colágeno sejam adsorvidos na superfície induzindo a regeneração óssea.

Suportes produzidos totalmente de hidroxiapatita exibem propriedades típicas de cerâmicas, ou seja, apresenta uma baixa resistência a tração, ao impacto e a fadiga, embora altas resistências possam ser conseguidas controlando-se o grau de porosidade e espessura do implante (Rivera, et al., 2004).

A hidroxiapatita quando utilizada como reforço, com formato de *whiskers* e fibras, permite que sejam acentuados suas vantagens, tais como biocompatibilidade, inércia química, resistência à corrosão e alta resistência a compressão e diminua suas desvantagens, por exemplo, baixa resistência ao impacto, alta densidade e dificuldade de fabricação de formatos complexos (Bozkurt, 1995).

A hidroxiapatita pode ser sintetizada em laboratório por métodos nos estados sólidos e por métodos úmidos. As sínteses de estado sólidos requerem altas temperaturas e o material obtido é muito cristalino, pelos métodos úmidos podem resultar em diferentes morfologias e diferentes cristalinidades (Dourado, 2006).

Os métodos de precipitação podem ser preparados cristais de dimensões nanométricas com formas variadas: do tipo agulha, lâmina e bastões. As condições de preparação influenciam diretamente a estequiometria, razão Ca/P e cristalinidade da HA. O método hidrotermal usa soluções aquosas em altas temperaturas para facilitar a precipitação dos cristais de dimensões maiores do que aqueles obtidos pelos método úmidos (Dourado, 2006) (Suchanek, et al., 1997).

O método fusão de sais (*Molten Salt Synthesis)* (MSS) é um método de precipitação no qual uma porção cerâmica é misturada com um sal ou mistura de sais de baixo ponto de fusão (frequentemente NaCl e KCl), que após a mistura e a trituração são aquecidos em temperaturas acima do ponto de fusão do sal. Ao realizar este procedimento a parte cerâmica da mistura é lentamente dissolvida no banho de sal, permitindo, durante o processo, a re-nucleção e crescimento da cerâmica em morfologia distinta à inicial (Bozkurt, 1995).

O método de hidrólise alcalina do α-fosfato tricálcico, permite que sejam dissolvidas as partículas de α-TCP e que ocorra uma re-nucleação com crescimento ordenado em um eixo da célula unitária da hidroxiapatita. Assim, ao medir a distância entre os vértices da estrutura obtida, e comparando estas com as distâncias interatômicas de uma célula unitária de HA, pode-se supor que o processo gera estruturas muito similares aos *whiskers* (Callister, 2006). A principal característica destas estruturas é a ausência de defeitos, uma vez que são monocristais, fazendo com que o material atinja propriedades mecânicas muito superiores, próxima à sua resistência mecânica teórica (Ramos, et al., 2008) (Ota, et al., 1998).

2.6 Compósito de PCL com hidroxiapatita

Compósito pode ser definido como materiais formados por dois ou mais componentes com distintas composições, estruturas e propriedades e que são separados por uma interface. Assim a melhor maneira de tentar melhorar as propriedades mecânicas das cerâmicas é aumentar a tenacidade através da sua combinação com polímeros, formando um compósito. Porém não são todos os agentes de reforços que levam à um aumento na propriedade de resistência mecânica à compressão. Agentes de reforços com uma razão de aspecto inferiores a 3 apresentam uma morfologia mais próxima de esfera, assim não permitem que as tensões seja transferidas efetivamente da matriz para os agentes, além de que podem atuar como agentes nucleadores de trincas e assim contribuir para redução da resistência mecânica à compressão. Por outro lado, caso esses agentes tenham um formato de fibras longas e finas, normalmente apresentam grandes resistências mecânicas permitindo atuar como reforços na matriz polimérica (Oréfice, et al., 2006).

Com o aperfeiçoamento da união de polímeros com cerâmicas, a propriedade intrínseca de fragilidade da cerâmica, não se torna algo preocupante quando organizado em uma matriz polimérica flexível. Entretanto, na maioria das vezes, o compósito polímero/cerâmica não demonstra uma organização e uma estrutura apropriada, principalmente devido aos componentes cerâmicos serem hidrofílicos, que apresentam extrema dificuldade em se misturar eficientemente com a solução polimérica dissolvida em solventes orgânicos. Os *whiskers* de hidroxiapatita apresentam ainda mais dificuldade para apresentar uma distribuição homogênea em soluções poliméricas, já que tendem a se aglomerar quando dispersos na solução. Porém existem poucos relatos na literatura focalizando esse problema. Um exemplo é introduzir a partícula ultrafina de cerâmica dentro da solução polimérica, entretanto nesse caso a quantidade de hidroxiapatita é limitada (Hao, et al., 2003). Outra pesquisa visou a precipitação de cristais de hidroxiapatita dentro da solução de polímero em vez de utilizar pós comerciais de hidroxiapatita, porém a reação dentro do solvente orgânico foi extremamente restrita, resultando em um pobre desenvolvimento da fase apatita (Choi, et al., 2004).

Ácido oléico é um ácido carboxílico, por possuir um grupo funcional COOH é um ácido graxo insaturado de cadeia longa, sendo um surfactante anfifílico, o qual possui o intuito de mediar a interação entre a cerâmica hidrofílica (HA) e o polímero hidrofóbico (PCL) quando adicionados em compósitos cerâmica/polímero. Esse ácido possui características como o ponto de fusão próximo de 13-14 graus Celsius, solubilidade em metanol e insolubilidade em água e é capaz de criar uma dispersão homogênea de partículas de cerâmicas dentro de uma matriz polimérica (Hae-Won, 2007).

Compósitos porosos contendo uma fase cerâmica bioativa e uma fase polimérica bioreabsorvível são promissores como matrizes para aplicações de engenharia tecidual.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1 Materiais utilizados

- $CaHPO_4$ e $CaCO_3$ sintetizados no próprio laboratório;
- CaO (Vetec, Brasil);
- H_3PO_4 (Lafan, Brasil);
- KCl (Synth, Brasil);
- NaCl (Synth, Brasil);
- $CH_3(CO)CH_3$(Synth, Brasil);
- poli (ε-caprolactona) massa molar de 80.000 g/mol (Sigma, Estados Unidos da América);
- $CHCl_3$ (Merck, Alemanha);
- $C_{18}H_{34}O_2$ (Synth, Brasil);
- CH_3CH_2OH 70 e 99,5% (Synth, Brasil);
- água deionizada;
- almofariz de ágata;
- agitadores magnéticos;
- barras magnéticas;
- beckers de vidro;
- cadinhos de porcela;
- bolas de alumina;
- termometro;

- molde de teflon.

3.2 Sintetização dos *whiskers* de hidroxiapatita

Na sintetização dos *whiskers* de hidroxiapatita foi seguido o fluxograma apresentado na Figura 3.

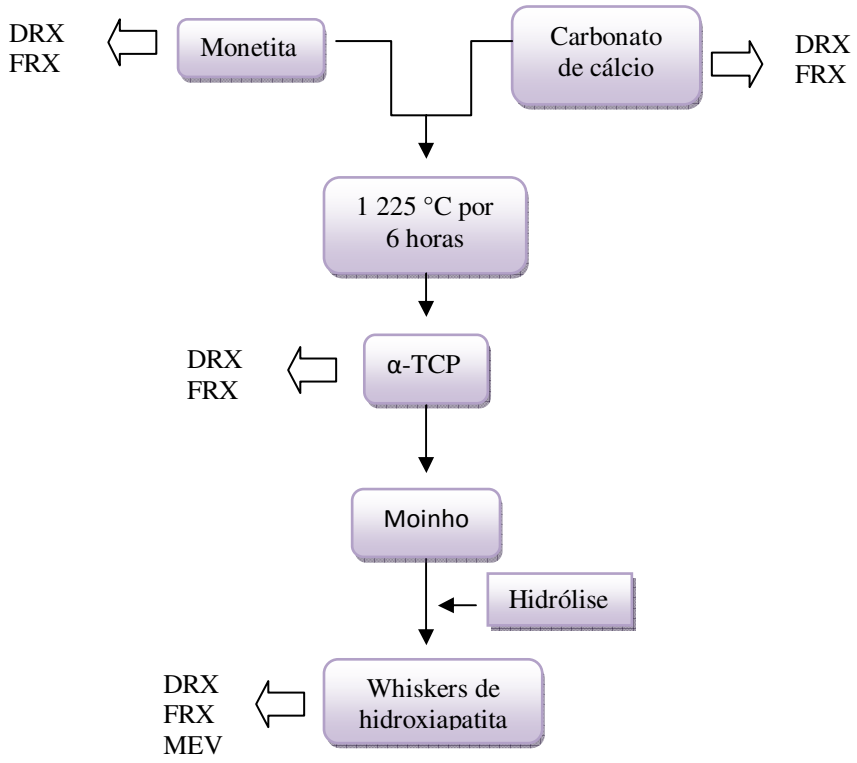


Figura 3: Fluxograma da síntese dos *whiskers* de hidroxiapatita.

3.2.1 Síntese do α-TCP

Os reagentes sintetizados foram a monetita ($CaHPO_4$) e carbonato de cálcio ($CaCO_3$), pelo método de precipitação em solução aquosa, no próprio laboratório, resultando em cerâmicas com alta pureza e, principalmente livres de Mg (Motisuke, et al., 2008). Posteriormente, foi realizada a homogeneização dos reagentes primários com almofariz de ágata, $CaHPO_4$ e $CaCO_3$, em uma proporção molar de 2:1. A mistura reacional foi então aquecida a 1225°C durante 6 horas, com uma taxa de aquecimento de 4°C/min, utilizando cadinhos de porcelana, obtendo assim a sinterização do α-TCP.

Algumas amostras de α-TCP passaram por moagem em moinhos de bolas de alumina, por 24 e 48 horas, em meio seco, para estudos da influência da granulométrica na dimensão dos *whiskers*.

3.2.2 Obtenção dos whiskers

Para a obtenção dos *whiskers* de hidroxiapatita foi adicionado 100 mL de água deionizada para cada 1,56 g de α-TCP. A mistura foi aquecida a 90 °C durante 6 horas, sendo controlado o pH através da adição de hidróxido de amônio, NH_4OH (Quimex). O pH foi mantido sempre em 11 (Ramos, et al., 2008). Posteriormente, foi filtrado e lavado com água destilada e secado na estufa por 24 horas a 50°C, resultando assim em *whiskers* de hidroxiapatita.

3.3 Sintetização das fibras de hidroxiapatita

Foi seguido o fluxograma apresentado na Figura 4.

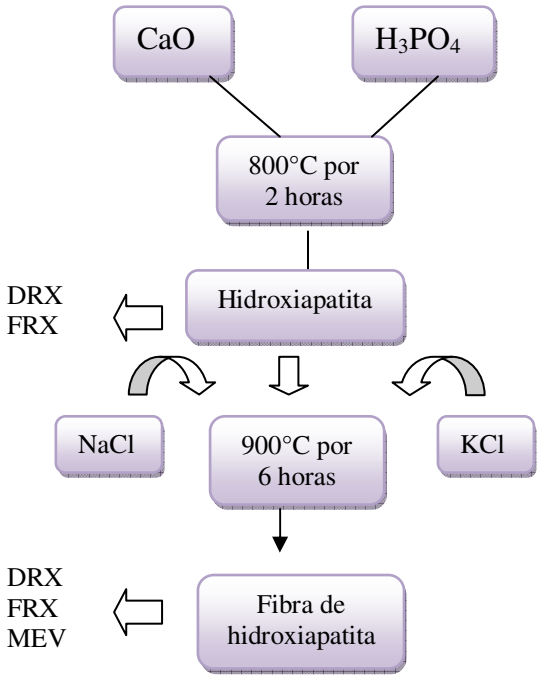


Figura 4: Fluxograma da síntese das fibras de hidroxiapatita.

Na síntese de fibra de hidroxiapatita, foi utilizada a hidroxiapatita precipitada. Essa precipitação ocorre pela mistura de CaO (Vetec, Brasil) e H_3PO_4 (Lafan, Brasil) em uma

concentração de 0,5 mol/L. Inicialmente, a solução foi aquecida e estabilizada em 90°C em constante agitação. Após a estabilização, foi adicionada lentamente à solução ácido fosfórico, permitindo que ocorresse uma precipitação. Este precipitado foi filtrado, secado em estufa e calcinado a 800°C por 2 horas (Rigo, 1995).

O método utilizado para a produção de fibra de hidroxiapatita foi o *Molten salt synthesis* (MSS), ou seja, foi utilizada a hidroxiapatita precipitada juntamente com NaCl e KCl. Na quantidade de 3, 5 e 5 g respectivamente. Esses reagentes foram misturados e moídos em um almofariz de ágata com um pistilo, em um meio de acetona. Essa mistura foi levada a 900°C por um período de 6 horas, com uma taxa de aquecimento de 5°C/mim e esfriado até temperatura ambiente. Ao ser filtrada, foi lavada com água destilada, para permitir a remoção do excesso de sal na amostra (Bozkurt, 1995).

3.4 Preparação dos suportes

Na preparação dos suportes foi seguido o fluxograma apresentado na Figura 5.

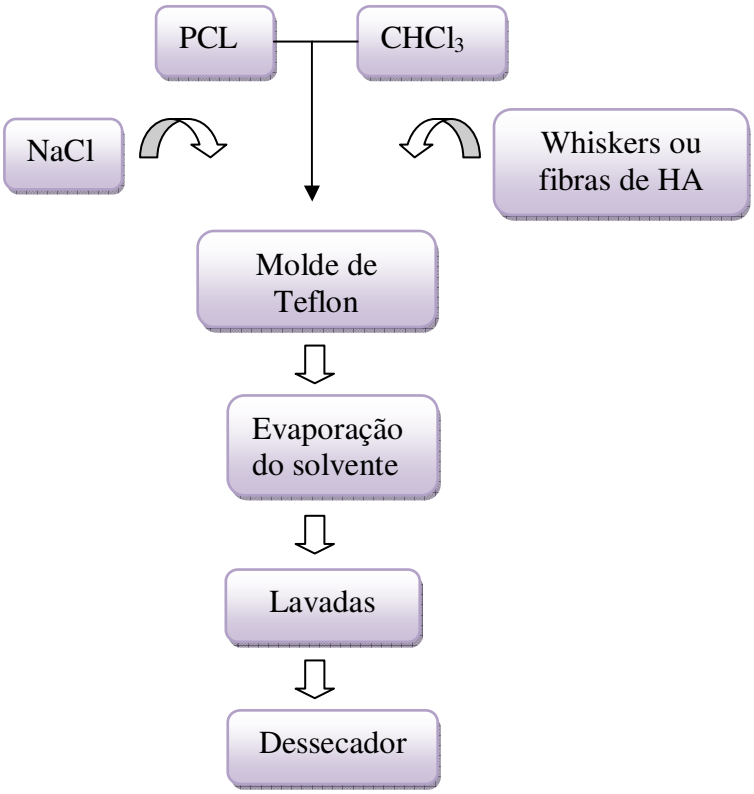


Figura 5: Fluxograma da preparação dos suportes.

O polímero poli (ε-caprolactona) utilizado foi com a massa molar de 80.000 g/mol (Sigma, Estados Unidos da América) foi dissolvido em clorofórmio, $CHCl_3$ (Merck, Alemanha), em uma proporção descrita por Mikos (1996), ou seja, 0,75 g do polímero por 6 ml de solvente (Mikos, et al., 1996). Foi utilizado o método de evaporação do solvente com adição e lixiviação de NaCl (Synth, Brasil) (*solvent-casting particule-leaching*). Após as 48 horas iniciais, para evaporação do solvente, as amostras foram lavadas com água deionizada por este mesmo período, sendo trocada a cada 6 horas.

Na preparação das amostras poliméricas com adição de cerâmica, foi adicionado o ácido oléico, um dispersante $C_{18}H_{34}O_2$ (Synth, Brasil), de acordo com a quantidade de polímero utilizado para 10 mL de clorofórmio foi utilizado 0,1 mL de ácido oléico, relação já comprovada em estudo anterior (Hae-Won, 2007). Para analisar a extração desse dispersante foram utilizadas diferentes concentrações de álcool etílico, 70 e 99,5% (Synth, Brasil), por um período de 24 horas.

Em ambos compósitos, PCL/fibras e PCL/*whiskers* de hidroxiapatita, foram necessários estudos empíricos para atingir proporções ideais da composição polímero/cerâmica, com o intuito de obter valores próximos da resistência mecânica à compressão dos ossos trabeculares. As alterações na proporção polímero/cerâmica podem ser vistas na Tabela 2 e na Tabela 3.

Tabela 2: Alteração na proporção polímero/cerâmica nas amostras com whiskers de hidroxiapatita.

RelaçãoPCL/Whiskers (peso)	Referência	Poli (ε-caprolactona)	Whiskers de hidroxiapatita
100%	P1	2,0	0
95/5%	W1	1,9	0,1
90/10%	W2	1,8	0,2
87,5/12,5%	W3	1,75	0,25
85/15%	W4	1,7	0,3
80/20%	W5	1,6	0,4
75/25%	W6	1,5	0,5
70/30%	W7	1,4	0,6
62,37,5%	W8	1,25	0,75
50%	W9	1,0	1,0

Tabela 3: Alteração na proporção polímero/cerâmica nas amostras com fibras de hidroxiapatita.

Relação PCL/Fibra (peso)	Referência	Poli (ε-caprolactona)	Fibras de hidroxiapatita
100%	P1	2 g	0 g
87,5/12,5%	F1	1,75 g	0,25 g
75/25%	F2	1,5 g	0,5 g
62,5/37,5%	F3	1,25 g	0,75 g
50%	F4	1 g	1 g

3.5 Técnicas de caracterização

3.5.1 Difração de raios X

O equipamento de difração de raios X, DMAX 2200 X - Ray Diffractometer (Rigaku, Japan) (CuKα, Ni filtro, 20kV, 20 mA, 20-40° (2θ), 0,05° (2θ) /s), foi utilizado para observar qualitativamente a pureza da fase cristalina das cerâmicas.

Padrões e condições de medidas:
Carbonato de Cálcio (JCPDS 05-0586) analisado de 20-50°;
Monetita (JCPDS 09-0080) analisado de 20-40°;
β-TCP (JCPDS 09-0169) analisado de 20-40°;
α-TCP (JCPDS 09-0348) analisado de 20-40°;
Hidroxiapatita (JCPDS 09-0432) analisado de 20-40°;
Pirofosfato de cálcio (JCPDS 09-0346) analisado de 20-40°.

3.5.2 Fluorescência de raios X

A análise de fluorescência de raios X foi realizada com o equipamento marca Rigaku modelo RIX 3100, obtendo resultados sobre as cerâmicas, em relação à taxa Ca/P pela quantificação dos elementos Ca, P e O, além de verificar a presença de impurezas nos reagentes primários com o elemento Magnésio.

3.5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das amostras cerâmicas e dos compósitos foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura utilizando um microscópio Jeol (JXA 840 A). Algumas amostras de compósitos foram fraturadas em N_2 líquido e recobertas com ouro, por meio do Sputer Coater (Bal- Tec- SCD 050) com corrente de 40 mA durante 200 s, com tensão de operação em 10 kV.

3.5.4 Distribuição Granulométrica

A distribuição granulométrica foi determinada pelo aparelho Mastersizer S da Malvern, tendo sido utilizado álcool isopropílico como meio dispersante para amostras de α-TCP. Este ensaio foi realizado no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC), que pertence à Faculdade de Engenharia Química, Unicamp.

3.4.5 Teste mecânico à compressão

As amostras passaram por teste mecânico à compressão. Foi utilizado o equipamento universal de ensaios da marca MTS modelo Test Star II, a velocidade do ensaio foi de 1mm/mim. Foram realizados ensaios de compressão axiais, para cada grupo de cerâmica foram testadas 5 amostras. A porosidade nas amostras também foi avaliada, desse modo foi realizado teste mecânico à compressão em amostras sem e com agente porogênico, SP1 e P1, respectivamente. Seguido a Tabela 4.

Tabela 4: Quantidade de amostras para o teste de compressão.

Amostra (% relação de peso)	Referência	Quantidade de amostras para o ensaio de compressão axial
PCL s/poros	SP1	3
PCL	P1	5
PCL/ Fibra 87,5/12,5	F1	5
PCL/Fibra 75/25	F2	5
PCL/ Fibra 62,5/37,5	F3	5
PCL/Fibra 50	F4	5
PCL/Whisker	W1	5

95/5		
PCL/Whisker 90/10	W2	5
PCL/Whisker 87,5/12,5	W3	5
PCL/Whisker 85/15	W4	5
PCL/Whisker 80/20	W5	5
PCL/Whisker 75/25	W6	5
PCL/Whisker 70/30	W7	Nenhuma
PCL/Whisker 62,5/37,5	W8	Nenhuma
PCL/Whisker 50	W9	Nenhuma

Após a obtenção dos dados, gráficos de força por deslocamento, foi calculada a tensão à compressão para cada amostra, de acordo com a equação apresentada a seguir, para o ensaio axial foi utilizado a Equação 1.

Equação 1: Cálculo para tensão axial

$$Tensão\ (MPa) = N/\pi r^2$$

Os dados utilizados para o cálculo de tensão à compressão foram retirados da curva de força (N) por deslocamento (mm), fornecido pelos ensaios mecânicos à compressão. Para a padronização dos cálculos, a força utilizada foi referente ao deslocamento de 1 mm para as amostras axiais.

3.5.5 Análises in vitro

As amostras passaram por análises *in vitro,* como o estudo em fluído corpóreo simulado (FCS) e em solução de *Ringer*, além de avaliações biológicas como de citotoxicidade. O teste de citotoxicidade foi realizado com a parceria do Centro de Biotecnologia, do IPEN, com a professora responsável Dra. Olga Zazuco Higa.

3.5.5.1 – Estudo em Fluído Corpóreo Simulado (FCS)

A atividade biológica é caracterizada pela presença da deposição de apatita na superfície. Assim foi realizado o estudo em fluído corpóreo simulado, o qual permite estudar a atividade biológica *in vitro*. A solução de FCS foi preparada para que apresenta-se uma composição próxima a dos íons presentes no plasma sanguíneo humano. Os corpos de prova foram submetidos à imersão, por período de 7 dias, sendo a solução trocada a cada 24h. Após o período de imersão foram realizadas analises por microscopia eletrônica de varredura e difração de raios X.

O preparo da solução de FCS necessitou alguns ajustes prévios: a redução da temperatura do ambiente e o controle da temperatura da água utilizada. Os sais foram dissolvidos em uma ordem sequêncial recomendada na literatura, para evitar a precipitação devido à solução ser saturada. A composição do FCS está disposta na Tabela 5.

Tabela 5: Composição iônica do FCS comparando com a do plasma sanguíneo (Kokubo, et al., 2006).

Composição (mMol/L)	Na^+	K^+	Ca	Mg^{2+}	Cl^-	HCO_3^{2-}	HPO_4^{2-}	SO_3^{2-}
FCS	142,0	5,0	2,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5
Plasma sanguíneo	142,0	5,0	2,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5

3.5.5.2- Estudos em solução de Ringer (Oxoid, Inglaterra)

A solução de *Ringer* permite uma análise da degradação polimérica. As amostras de PCL, PCL/*whiskers* de hidroxiapatita e PCL/ fibras de hidroxiapatita foram submetidas à imersão por 60 dias em uma solução de *Ringer*, a qual foi preparada e esterilizada antes do uso. Após o período de 60 dias as amostras foram lavadas com água deionizada e secadas em dessecadores, posteriormente foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura.

3.5.5.3 – Avaliação biológica

Seguindo a ISO 10993, para dispositivos de implante com duração de contato que exceda 30 dias, a avaliação biológica foi dividida nas seguintes etapas:

- *Avaliação da Biocompatibilidade e Citotoxicidade*

A linhagem celular utilizada no teste de citotoxicidade foi proveniente da ATCC, utilizando as células do CHO-k1 (Chinese ovary hamster), em cultura com meio RPMI 1640 (Gibco 23400) suplementado com antibiótico e antimicótico (penicilina100 unidades/mL, estreptomicina100 µg/mL e anfotericina 0, 025 µg/mL Gibco 15240-062), 2mM de glutamina e 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas) em incubadora úmida a 37° C e atmosfera de 5% de CO_2, até atingirem a subconfluência (aproximadamente 90% de utilização da área de cultura) na placa de cultura de onde foram descoladas pela ação da solução de tripsina 0,05%/EDTA 0,02% em solução tampão fosfato pH 7,4.

A metodologia empregada foi a *Kit CellTiter96® AQ_{ueous} Non Radioactive Cell Proliferation Assay Promega Corporation.* O teste de proliferação celular não radioativo é um método colorimétrico para determinação do número de células viáveis em testes proliferativos ou quimiosensitivos. O teste *CellTiter96® AQ_{ueous}* é um conjunto de soluções de um composto tetrazólico ((3-(dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium, sal inerte; MTS) e um reagente acoplador de elétrons (metasulfato de fenazida); PMS). O MTS é bioreduzido pelas células a produto *formazan* que é solúvel no meio de cultura tecidual. A absorbância do *formazan* a 490 nm pode ser medida diretamente de placas de 96 poços sem adição de outros processos. A conversão do MTS em formazan solúvel aquoso é executada pela enzima desidrogenase encontrada em células metabolicamente ativas. A quantidade do produto de *formazan* como medida da quantidade de absorbância a 490 nm é diretamente proporcional ao número de células viáveis em cultura.

A preparação dos extratos com as amostras em pó, *whiskers* e fibras de hidroxiapatita, foi seguido uma proporção de 0,2g/mL de meio de cultura e para as amostras com PCL 2 cm^2/mL de meio de cultura. Como controle negativo para os pós foi utilizado Alumina (0,2g/mL) e para as amostras com PCL polietileno de alta densidade (PEAD). As amostras foram mantidas em um

banho termostatizado a 37º C com agitação leve, por 48 horas. Como controle positivo, foi preparado uma solução fenol 0,5% v/v. Os extratos foram esterilizados por filtração por membrana de acetato de celulose e diluídos de 100 a 6,25% v/v de meio de cultura RPMI para realização do teste de viabilidade celular.

A viabilidade das células CHO-k1 foi observada em uma placa de cultura de 96 poços, que foram colocados 50µL da suspensão de células CHO-k1, na concentração final de 3000 células por poço, sobre 50µL do extrato em suas diluições, em quadruplicata. A placa foi colocada na incubadora úmida com 5% de CO_2 por 72 horas a 37°C. A viabilidade celular foi determinada pela adição de 20 µL de solução de MTS (corante supravital do composto tetrazolico) /PMS (agente acoplador de elétrons), na razão 20:1, e incubado por mais 2 horas. Após o último período de incubação, a placa foi levada a uma leitora ELISA (espectrofotômetro para placas de 96 poços) com filtro de 490 nm para leitura das densidades ópticas.

Capítulo 4

Resultados e Discussões

4.1 Caracterizações das cerâmicas

Para a síntese do α-TCP, foram utilizados monetita e carbonato de cálcio, sintetizados no próprio laboratório. A presença do elemento magnésio nesses reagentes foi averiguada pela FRX, sendo o valor de 1 e 3 ppm respectivamente. Estudos mostram que quantidades acima de 250 ppm provocam o comprometimento da síntese do α-TCP, ocorrendo à formação de uma mistura de β+α (Motisuke, et al., 2008).

A monetita apresentou pureza de fase, confirmando que o processo utilizado foi eficaz. A monetita quando comparada com o padrão JCPDS (09-0080), mostrou semelhança entre os principais picos cristalinos. Ao comparar os picos cristalinos do carbonato de cálcio ao padrão JCPDS (05-0586) foi notado alguns picos de outra fase de carbonato de cálcio, entretanto as existências desses picos não alteraram a síntese do α-TCP.

Os resultados das difrações de raios X da monetita e do carbonato de cálcio podem ser observados na Figura 6 e Figura 7, respectivamente. Os picos marcados no difratograma do carbonato de cálcio são referente aos picos diferentes do padrão JCPDS.

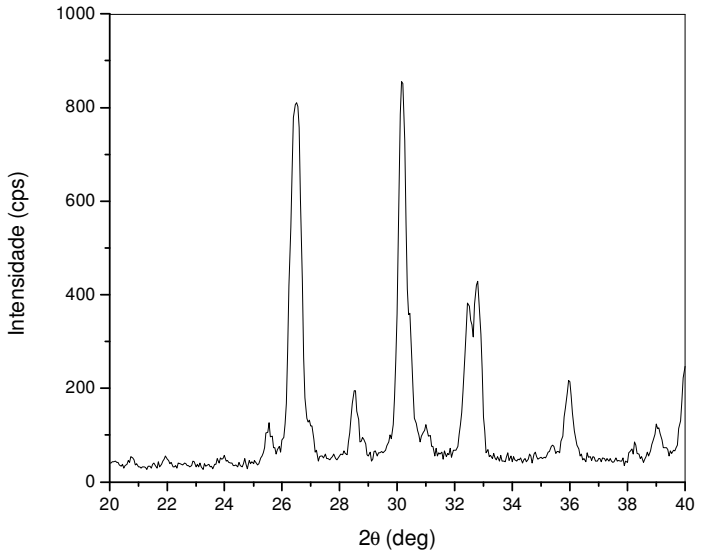


Figura 6: Difratograma de raios X da monetita.

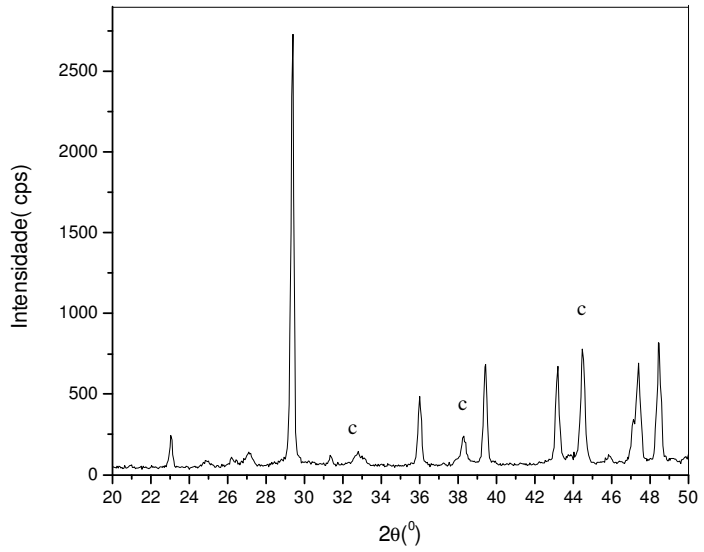


Figura 7: Difratograma de raios X do carbonato de cálcio (c- picos de outra fase de carbonato de cálcio).

Com a utilização dos reagentes monetita e carbonato de cálcio, foi possível sintetizar α-TCP, que apresentou uma relação Ca/P de 1,58, confirmado pela FRX, visto na Tabela 6. Pela análise de difração de raios X, foi possível comparar com o padrão JCPDS (09-0348), permitindo observar os picos, semelhantes e definidos. Na Figura 8 estão marcados os picos de β-TCP e α-TCP.

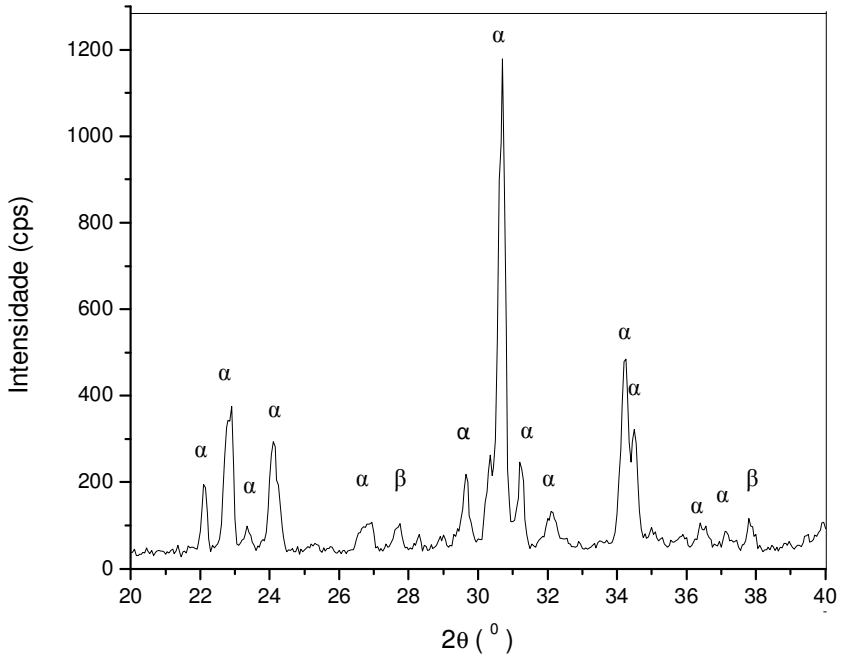


Figura 8: Difratograma de raios X do alfa TCP (marcados as fases de β-TCP e α-TCP).

Ao realizar a hidrólise do α-TCP foi possível a obtenção de *whiskers* de hidroxiapatita, apresentando deficiência em cálcio, como mostra a relação Ca/P de 1,61, comprovada pela análise de FRX, evidenciada na Tabela 6. A cristalinidade compatível com hidroxiapatita foi mostrada pelo difratograma na Figura 9, sendo semelhante ao padrão JCPDS (09-0432). A morfologia caracterizada pelo formato de agulhas foi observada na Figura 10.

O reagente primário para a síntese das fibras de hidroxiapatita foi a hidroxiapatita precipitada. A hidroxiapatita precipitada caracterizada pelas análises de DRX e FRX mostrou resultados adequados, apresentando pureza cristalina e relação Ca/P 1,67. Os picos cristalinos da

hidroxiapatita precipitada são semelhantes ao padrão JCPDS e o cálculo da relação Ca/P obteve como base os valores obtidos pela análise FRX, visto na Tabela 6.

Tabela 6- Relação Ca/P resultados oriundos de análises FRX.

Elemento	α- TCP (em %)	*Whiskers* (em%)	HA p (em %)	Fibra (em %)
Ca	38,1316	34,4260	34,29	34,6436
P	17,8071	16,5437	15,84	13,855
O	42,4754	43,1682	42,67	40,830
Ca/P	1,51	1,61	1,67	1,93

As fibras de hidroxiapatita apresentaram uma pureza de fase, com picos bem definidos, vistos na Figura 9, além de mostrarem uma morfologia hexagonal, visto na Figura 10. Na Tabela 6, obteve-se a relação Ca/P, próximo a 1,93.

A razão de aspecto das fibras e dos *whiskers* de hidroxiapatita, foi calculada utilizando *l/d*, sendo *l* o valor do comprimento da fibra e *d* o valor do diâmetro da fibra. Quando a razão de aspecto de componentes cerâmicos apresentarem altos números estes demostram uma morfologia alongada e fina, porém quando apresentarem um baixo número, estes componentes serão caracterizados por uma morfologia próxima a de partículas.

Por meio da análise da microscopia de varredura das fibras de hidroxiapatita, pode-se obter os valores de comprimento e de diâmetro das diversas fibras. Foram analisadas e mensuradas dez fibras aleatórias e uma faixa de razão de aspecto foi obtida, como mostra a Tabela 7. Nesta tabela encontram-se as razões de aspectos das fibras e dos *whisker* de hidroxiapatita, sendo esses últimos valores retirados da literatura, sobre o mesmo método de síntese e condições laboratoriais, tendo um comprimento de aproximadamente 2-4 µm com uma largura de 128-157 nm, obtendo a razão de aspecto de 17 a 23 (Ramos, et al., 2008).

Tabela 7: Razão de aspecto das cerâmicas (* valores retirados da literatura) (Ramos, et al., 2008).

Amostras	Comprimento	Largura	Razão de aspecto	Desvio padrão
Fibras de hidroxiapatita	26-73µm	18-27µm	1-3	0,47
***Whiskers* de hidroxiapatita ***	2-4µm	128-157nm	17-23	2,7

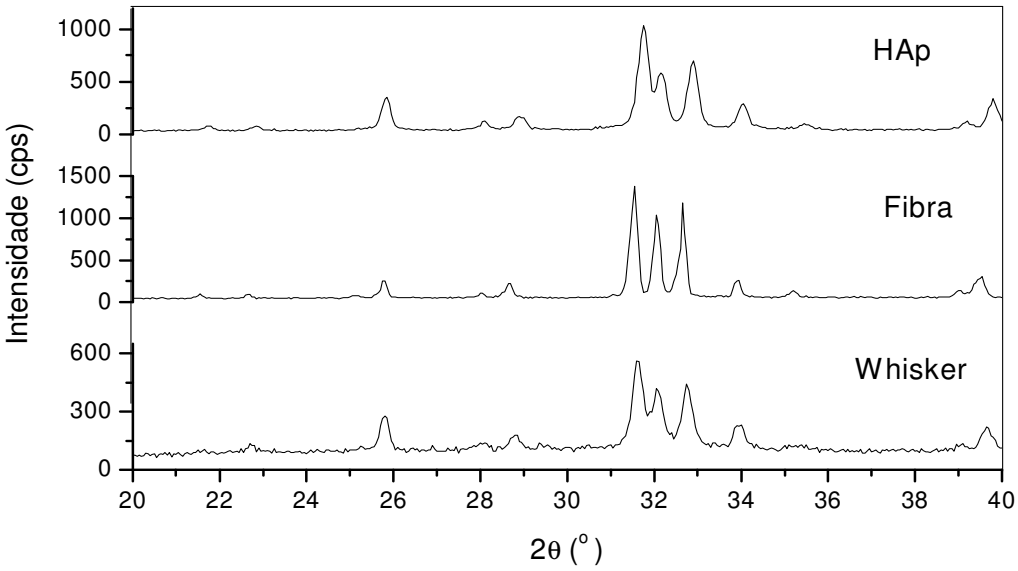


Figura 9: Difratograma de raios X: Hidroxiapatita precipitada, fibras e *whiskers* de hidroxiapatita.

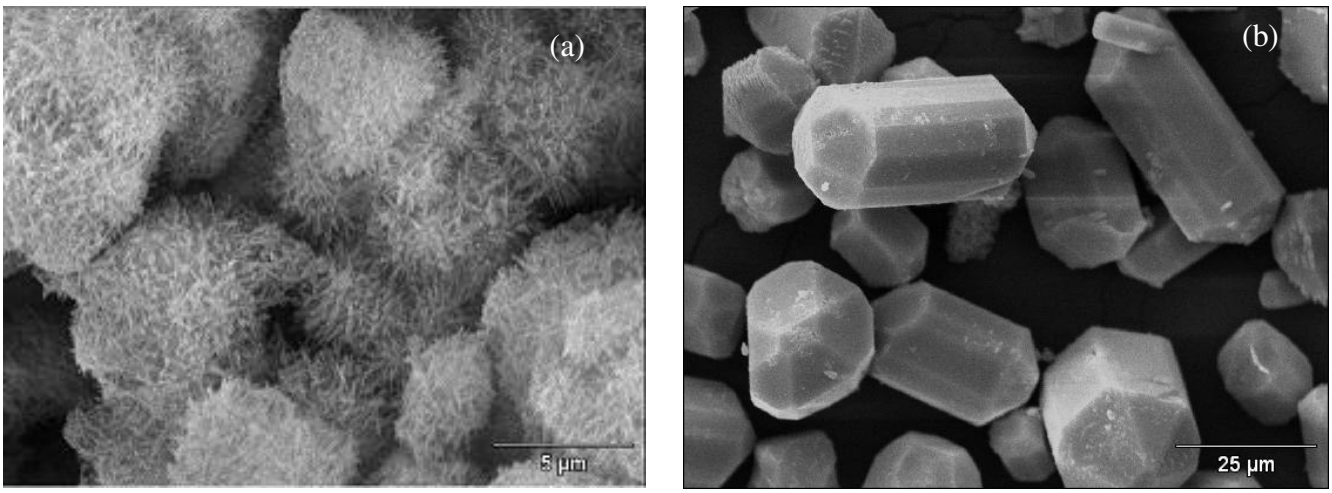


Figura 10: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras de *whiskers* (a) e fibras de hidroxiapatita (b) com escala de 5µm (a) e 25µm (b).

As cerâmicas, quando utilizadas em biomateriais, necessitam apresentar biocompatibilidade com o sítio hospedeiro. A avaliação da toxicidade das cerâmicas foi realizada pelo teste de citotoxicidade. As fibras e os *whiskers* de hidroxiapatita apresentaram resultados positivos, ou seja, não apresentaram toxicidade. Foi mostrado uma pequena redução da viabilidade celular, a partir da concentração de 50% do extrato na amostra de *whiskers* de hidroxiapatita, reduzindo sua viabilidade celular lentamente até 80%, como visto na Figura 11.

A redução da viabilidade celular na amostra de *whiskers* de hidroxiapatita poderia ser atribuída pela presença da fase de pirofosfato de cálcio, porém ao comparar com o padrão dessa cerâmica, JCPDS 09-0346, não foi detectado picos semelhantes, visto em anexo I. Entretanto para confirmar a ausência de íons de pirofosfato de cálcio seria necessário realizar análises mais detalhadas como a de espectroscopia de infravermelho. Outro possível motivo para a redução de viabilidade celular das amostras de *whiskers* seria a alteração no pH, porém foi constatado o valor 7. Assim sendo um valor neutro não foi o responsável por nenhum dano na viabilidade celular da amostra. Dessa maneira existe a necessidade de realizar mais análises para detectar o responsável por essa redução na viabilidade celular das amostras de *whiskers* de hidroxiapatita.

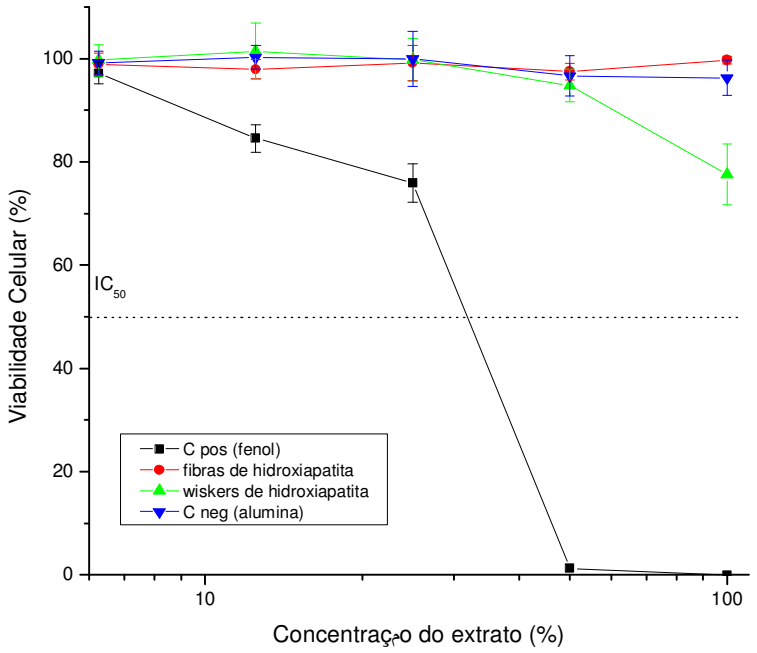


Figura 11: Citotoxicidade das cerâmicas.

4.1.1 Influência na moagem do α-TCP na hidrólise dos whiskers

A alteração na dimensão dos *whiskers* de hidroxiapatita apresenta um aspecto interessante para ser controlado, devido sua relação com as propriedades mecânicas e físicas do material.

As partículas do α-TCP foram alteradas para constatar a influência na moagem em sua hidrólise, assim foram preparadas amostram não moídas e moídas por 24 e 48 horas. As partículas 24 e 48 horas passaram por análises de granulométrica. A redução do tamanho da partícula com o aumento do tempo da moagem pode ser visto na Figura 12. A distribuição granulométrica apresenta-se entre 0,58 e 12,47 µm para as partículas moídas por 24 horas e 0,56 e 9,99 µm para as moídas 48 horas, com um tamanho médio de 6,61 e 5,12 µm, respectivamente.

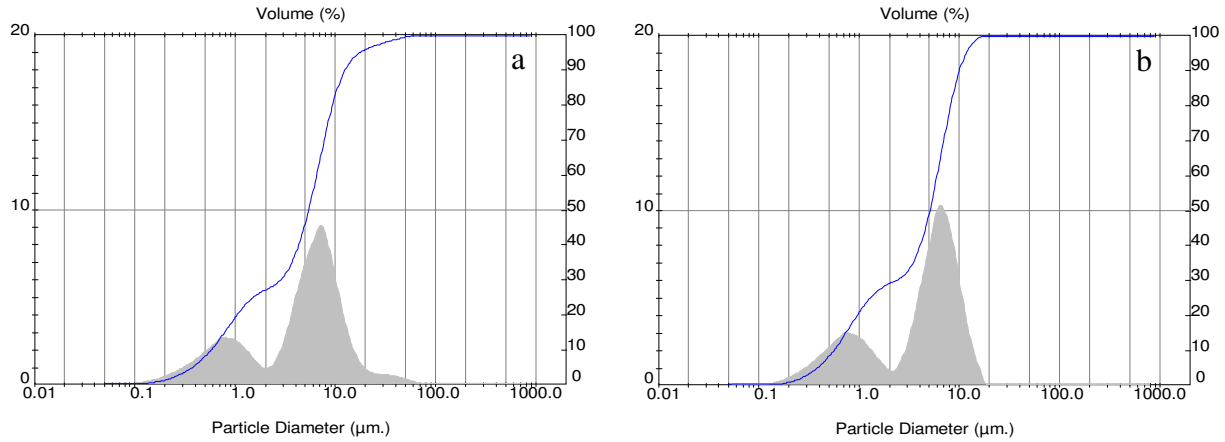


Figura 12: Análise granulométrica do α-TCP moído (a) 24 e (b) 48 horas.

Os *whiskers* de hidroxiapatita apresentaram, quando obtidos a partir de partículas não moídas, dimensões maiores do que os moídos por 24 e 48 horas, como visto na Figura 13. Devido a essa alteração na dimensão, ocorreram dificuldades para observar picos cristalinos em seu difratograma.

Na Figura 14 foram comparados os difratogramas dos diferentes *whiskers* de hidroxiapatita. Os *whiskers* de hidroxiapatita que não tiveram suas partículas moídas apresentaram picos mais definidos, quando comparados com os moídos por 24 e 48 horas, nos quais os picos mostraram-se largos, o que pode ser resultado da dificuldade de definição do equipamento devido à espessura dos cristais.

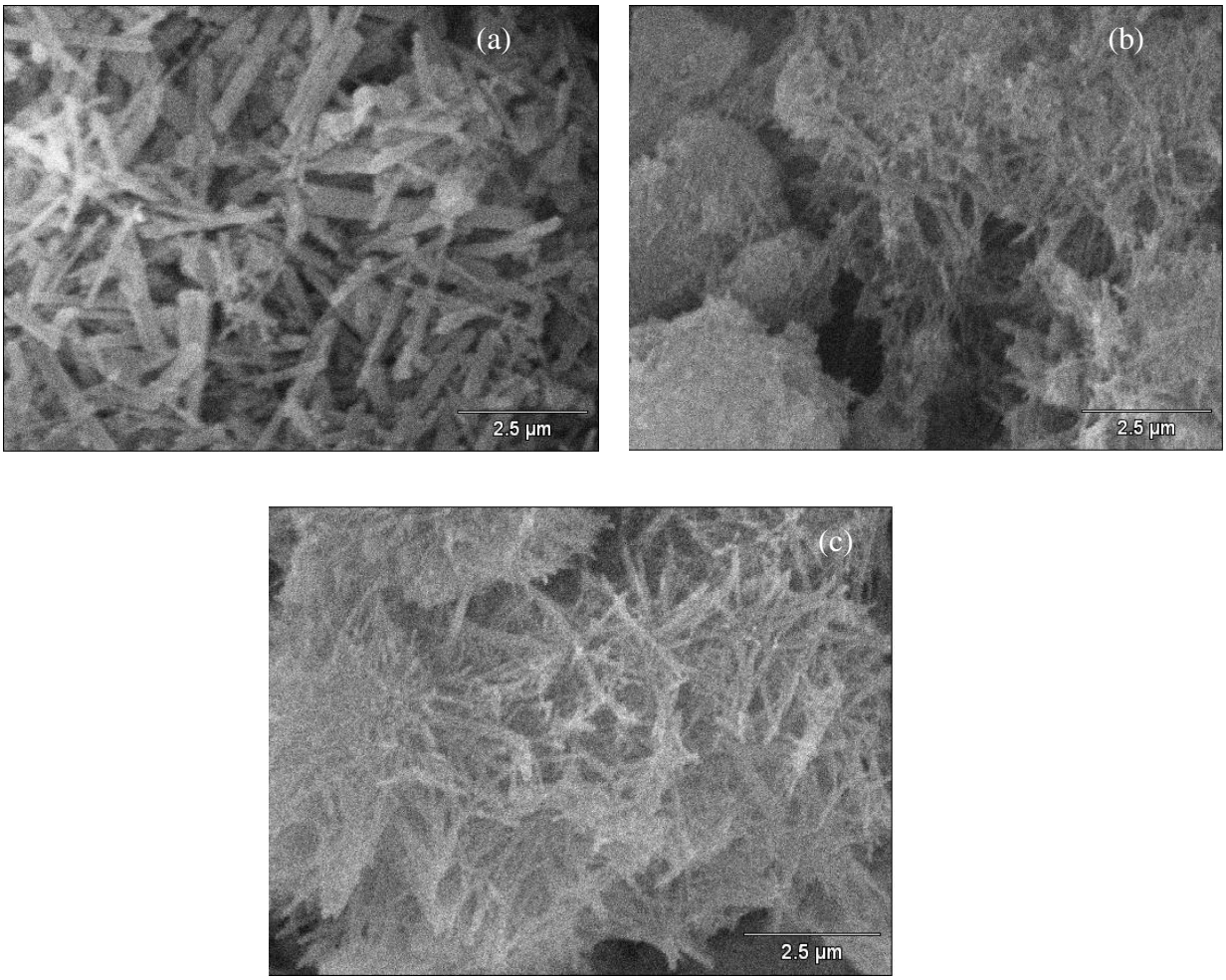


Figura 13: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras de *whiskers* resultado da moagem do α-TCP, escala de 2,5 µm, (a) 0, (b) 24 e (c) 48 horas.

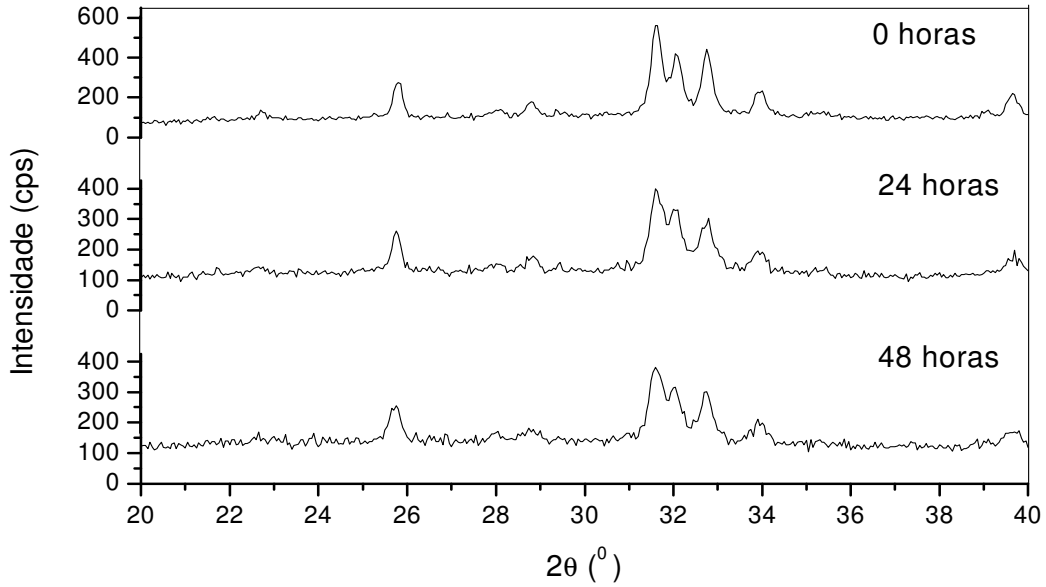


Figura 14: Difratogramas de raios X dos *whiskers* moídos por 0, 24 e 48 horas.

4.2 Caracterização dos suportes

A determinação da porosidade foi realizada com as relações polímero/ NaCl de acordo com a Tabela 8. Na Figura **15** foi possível observar a diferença entre essas variações, resultando-se em diferentes morfologias, devido à interconexão entre os poros. As amostras do tipo I apresentaram as melhores respostas ao manuseio, já que não foi detectada nenhuma ruptura em suas amostras. Ao contrário as amostras do tipo III, as quais não apresentaram resistência mecânica ao manuseio. As amostras do tipo II, apresentaram uma resposta intermediária, assim apresentaram rupturas mas não em todas as suas amostras.

A baixa resistência mecânica durante o manuseio pode ser relacionada com a estrutura polimérica. Amostras com alto índice de NaCl permitem uma aglomeração de poros, resultando em locais com alta porosidade, sem uma interconexão polimérica, acarretando na ruptura da matriz polimérica. Assim, para o melhor desempenho mecânico à compressão e resposta favorável do tecido ósseo, a porosidade selecionada foi a do tipo I.

Tabela 8: Variação de polímero e NaCl.

	Polímero (g)	NaCl (g)
Tipo I	0,75	1,75
Tipo II	0,5	2,0
Tipo III	0,25	2,25

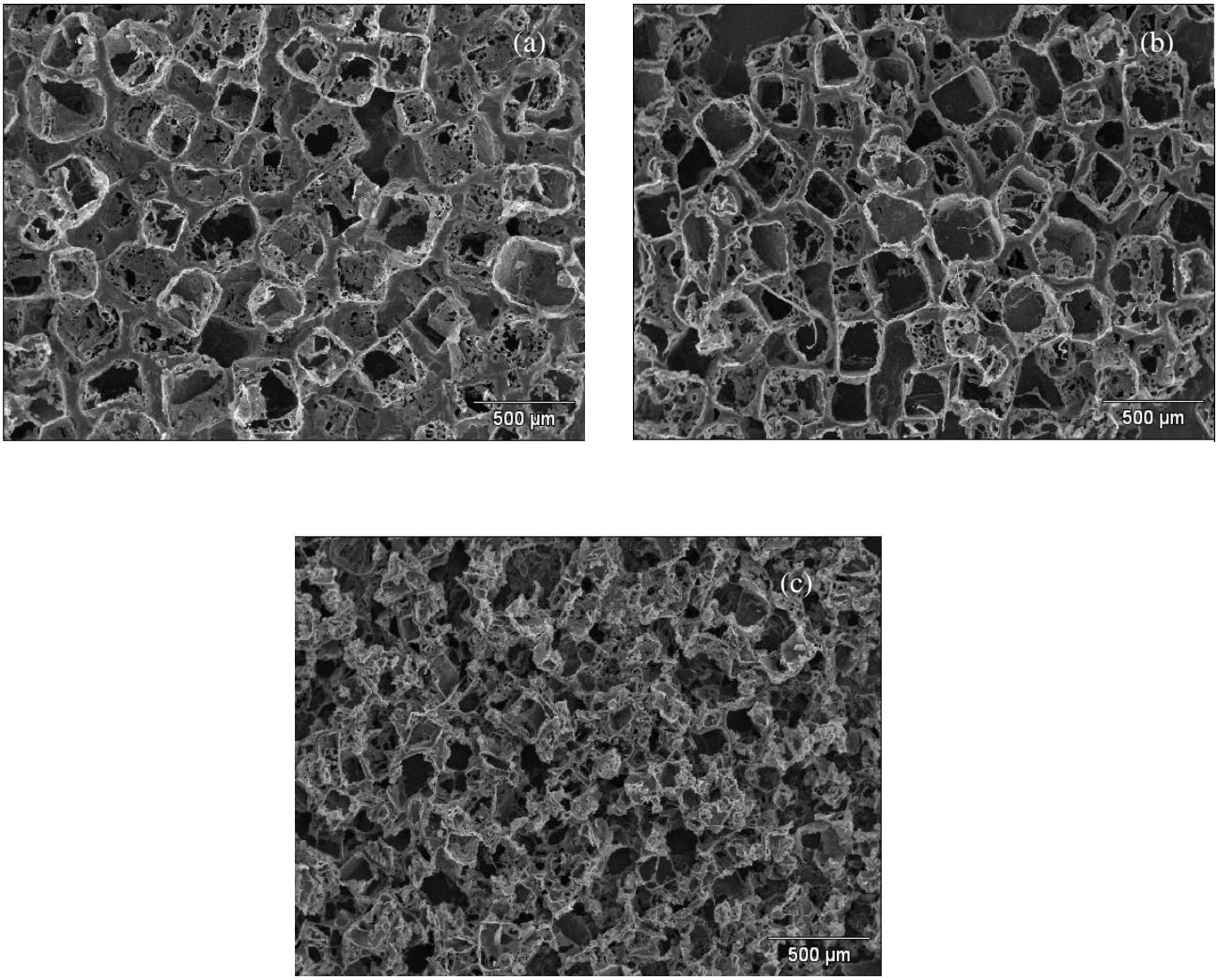
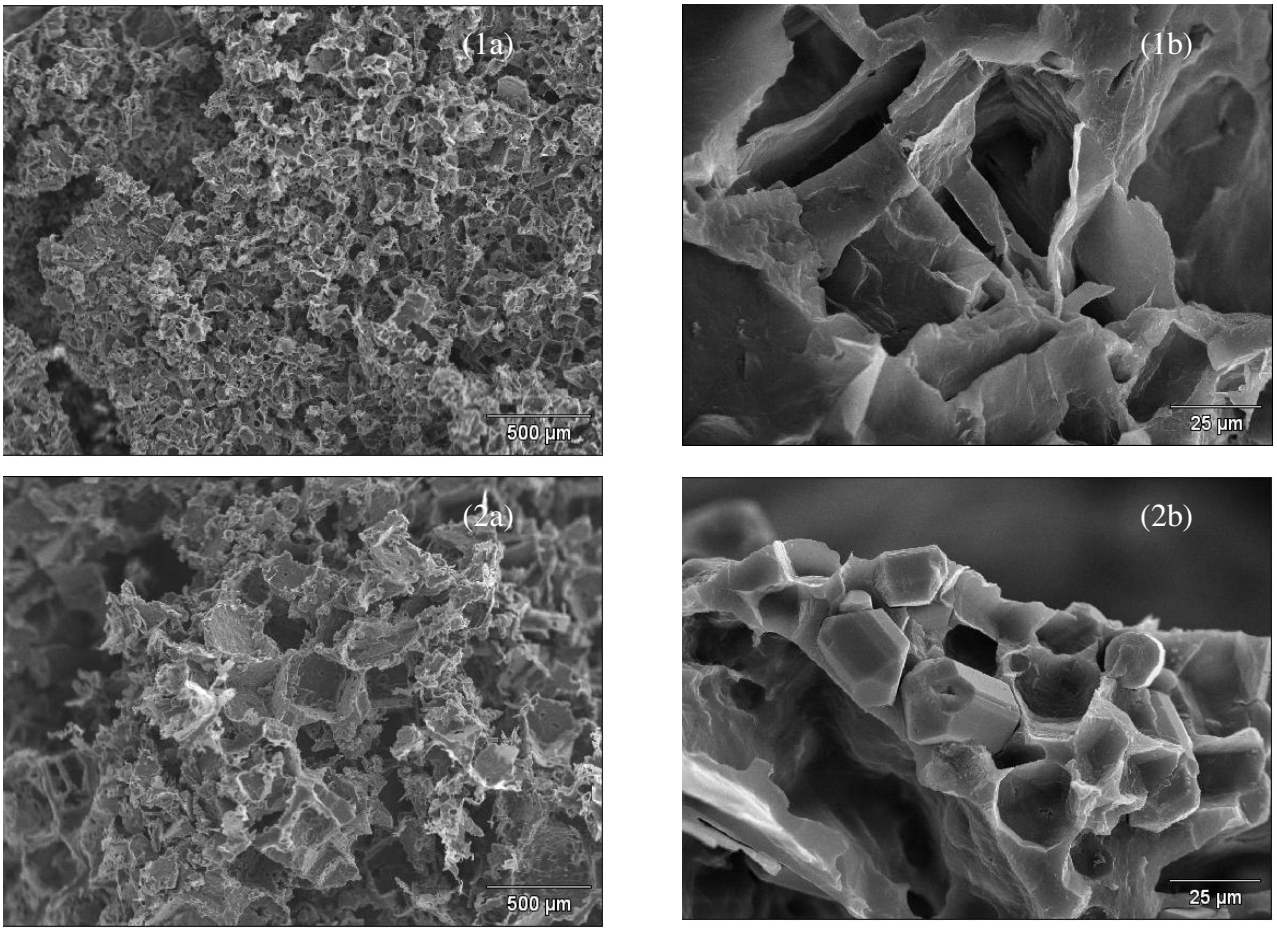


Figura 15: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras com diferentes porosidades: (a) tipo I, (b) tipo II e (c) tipo III, com escala de 500µm.

As morfologias dos suportes foram analisadas por imagens realizadas por meio do microscópio eletrônico de varredura. Na Figura 16 foi possível analisar as estruturas das diferentes amostras, na escala de 500µm e 25µm, foi possível observar os poros, interconexões, fibras e *whiskers* de hidroxiapatita. Observou-se ainda a distribuição dos *whiskers* na matriz polimérica, pela presença de pequenos aglomerados.



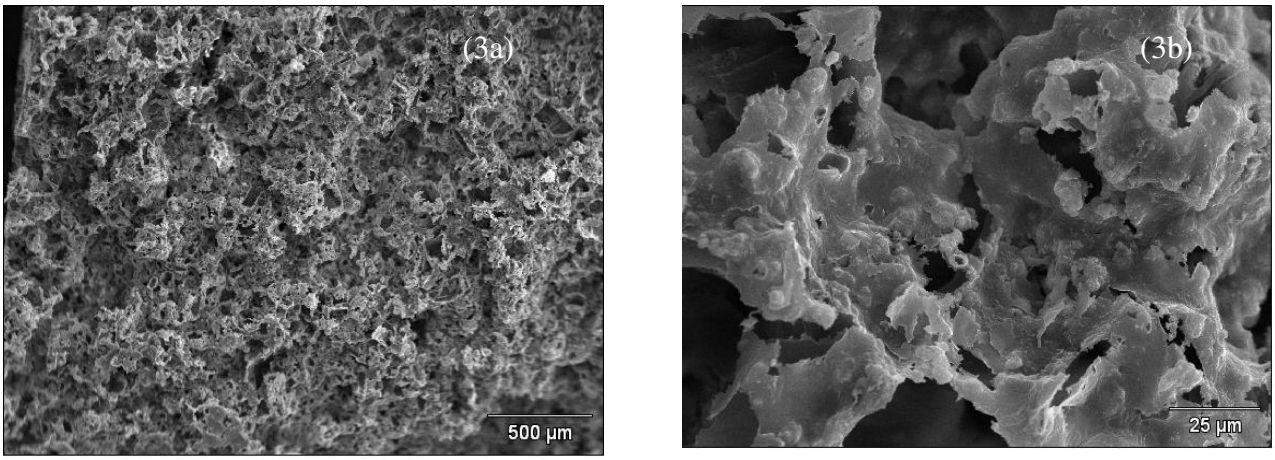


Figura 16: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras (1) PCL, (2) PCL/fibras de hidroxiapatita, (3) PCL/*whiskers* de hidroxiapatita, com escala de (a) 500 µm e (b) 25µm.

A importância da biocompatibilidade foi avaliada por teste de citotoxicidade, porém os resultados apresentados não foram satisfatórios. Cabe ressaltar que todas as amostras passaram pelo mesmo método de fabricação, assim como de extração de NaCl e evaporação do solvente. Indícios dessa toxicidade podem ser atribuídos à presença do ácido oléico, já que na Figura 17 foi visto que a amostra sem a adição do ácido oléico foi a única que não se apresentou como tóxica.

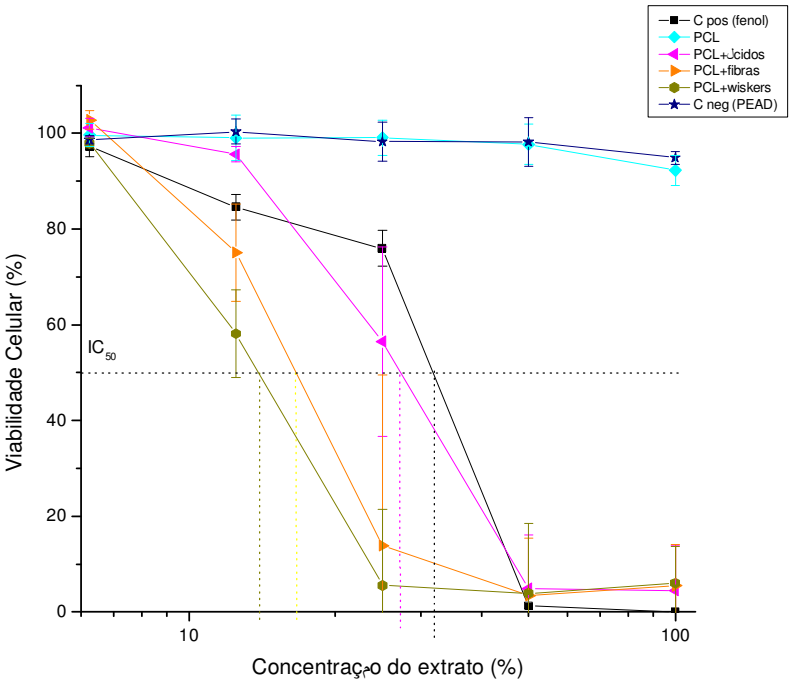


Figura 17: Análise de citotoxicidade dos suportes.

Para comprovar a toxicidade por resíduos de ácido oléico foram realizados testes de extração do ácido nas amostras, assim foi analisado a extração pela imersão em álcool etílico 70 e 99,5%, as amostras posteriormente foram submetidas a testes de citotoxicidade. O pH dos alcoóis foi medido antes da imersão das amostras, sendo o valor 6,8 e 7,5 respectivamente. Assim, como o pH dos alcoóis, o valor do ácido oléico foi medido sendo de 4,7. Após o período de imersão das amostras os valores obtidos estão apresentados na Tabela 9. Nas amostras que apresentaram ácido oléico em sua composição foi demonstrada uma maior redução no valor do pH, após imersão em álcool 99,5%, assim foi selecionado essa concentração de álcool para o uso em todo estudo.

Tabela 9: Teste para remoção do ácido oléico, pH do controle, polímero com ácido e com fibra de hidroxiapatita.

	Controle (PCL)	PCL/ácido	PCL/fibra/ácido
pH 70%	6,7	5,6	6,5
pH 99,5%	7,4	5,0	6,6

Após a remoção do ácido oléico, por imersão em álcool etílico 99,5%, as amostras que antes se apresentaram tóxicas com os resultados obtidos pela análise de citotoxicidade, agora se mostraram com um resultado próximo ao controle negativo, ou seja, não se apresentaram tóxicas. A imersão das amostras em álcool etílico 99,5% foi comprovada como eficiente pelos resultados da análise de citotoxicidade, os quais estão graficamente na Figura 18. Usualmente, a toxicidade dos solventes utilizados na preparação dos suportes pelo método de evaporação de solvente funciona como um fator limitante na aplicação como um biomaterial, porém nessas amostras essa toxicidade não foi observada.

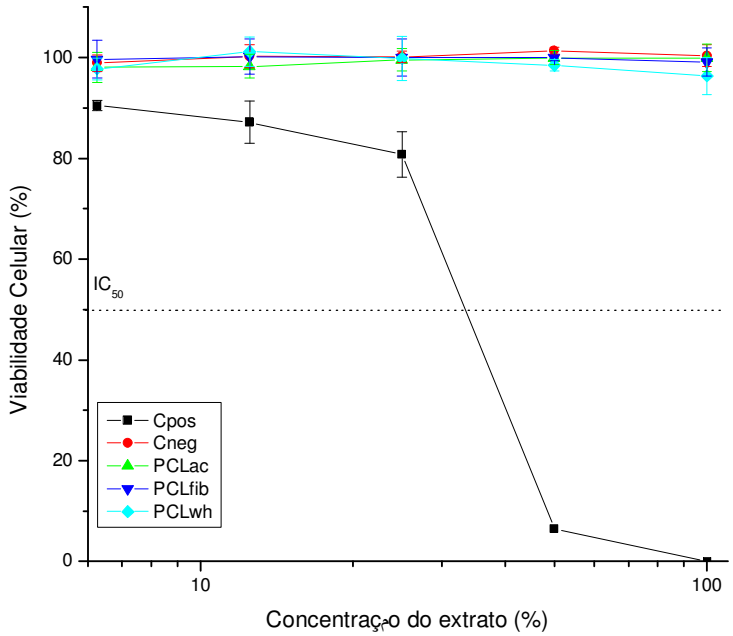


Figura 18: Teste de citotoxicidade dos suportes, PCL/ fibra, PCL/*whiskers* e PCL com ácido e sem ácido oléico.

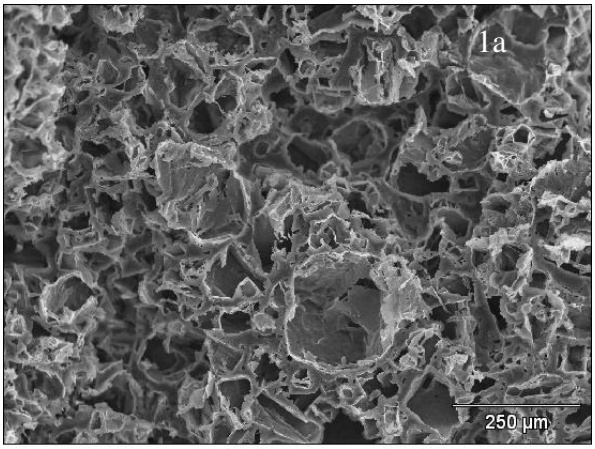
4.2.1 Idealização da proporção PCL/ fibra de hidroxiapatita

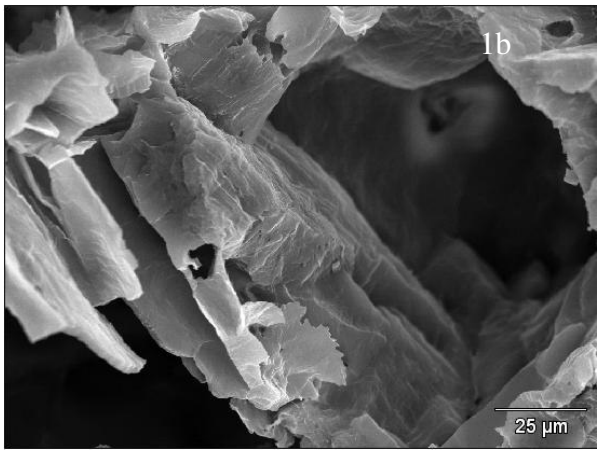
Para atingir uma proporção de escolha de PCL/fibra de hidroxiapatita foram analisadas diferentes quantidades de cerâmica na matriz, que posteriormente foram analisadas por testes de compressão. Assim foi seguido a Tabela 10.

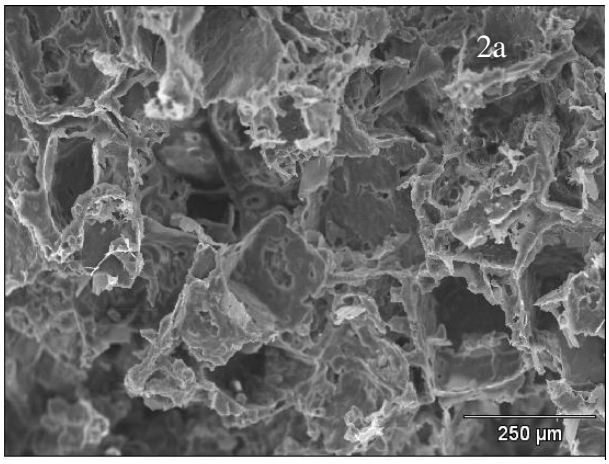
Tabela 10: Diferentes quantidades de fibra para a matriz polimérica.

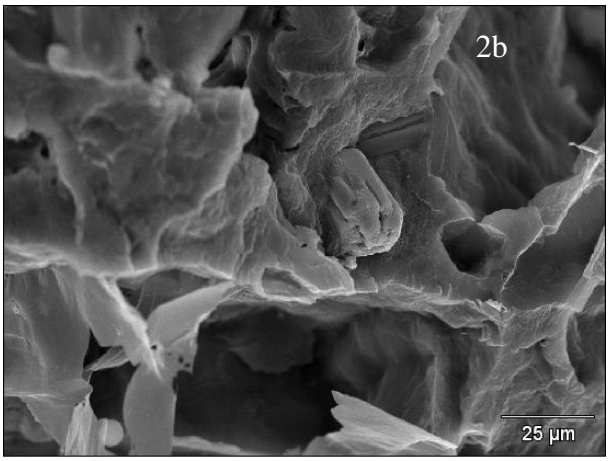
Relação PCL/Fibra (peso)	Referência	Poli (ε-caprolactona)	Fibras de hidroxiapatita
100%	P1	2 g	0 g
87,5/12,5%	F1	1,75 g	0,25 g
75/25%	F2	1,5 g	0,5 g
62,5/37,5%	F3	1,25 g	0,75 g
50%	F4	1 g	1 g

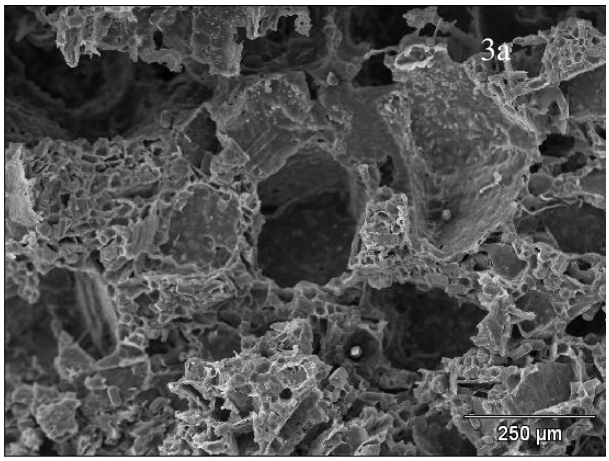
A alteração na morfologia, caracterizada por alterações na proporção de fibra de hidroxiapatita, esta apresentada na Figura 19. Como visto, com uma escala de 250µm e 25µm, foi notado alterações na morfologia devido ao aumento na quantidade de cerâmica. A amostra sem fibra apresenta uma estrutura entre os poros mais definida, ao contrário da amostra com maior quantidade de fibra, que apresenta nessa estrutura uma quantidade excessiva de cerâmica, causando a impressão de excesso de cerâmica em relação ao polímero. Como as amostras foram fraturadas com nitrogênio líquido, muitas das fibras inseridas na matriz foram perdidas durante seu preparo. Porém, podem ser notadas a presença de moldes negativos na matriz, decorrentes da introdução da fibra nesta matriz. A proporção com a distribuição mais homogênea e o envolvimento mais abrangente do polímero na fibra foi com a variação de 0,5 g de fibra, ou seja, a amostra F2.

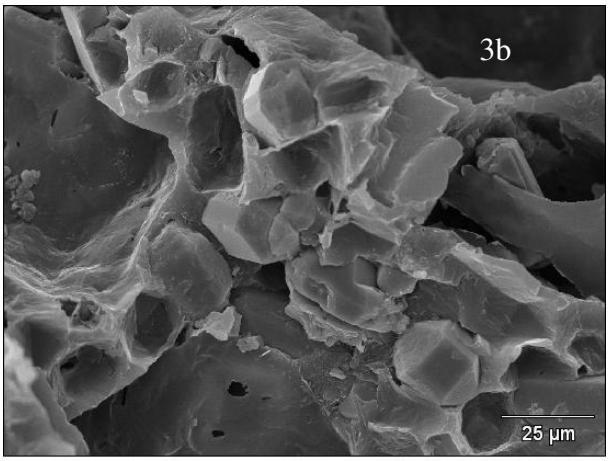


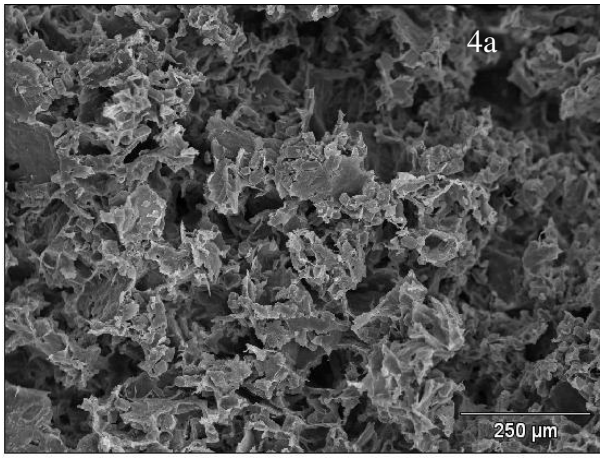


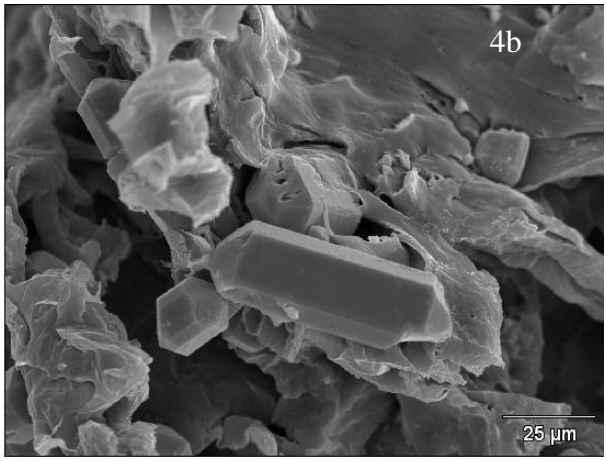

2a
250 µm


2b
25 µm


3a
250 µm


3b
25 µm


4a
250 µm


4b
25 µm

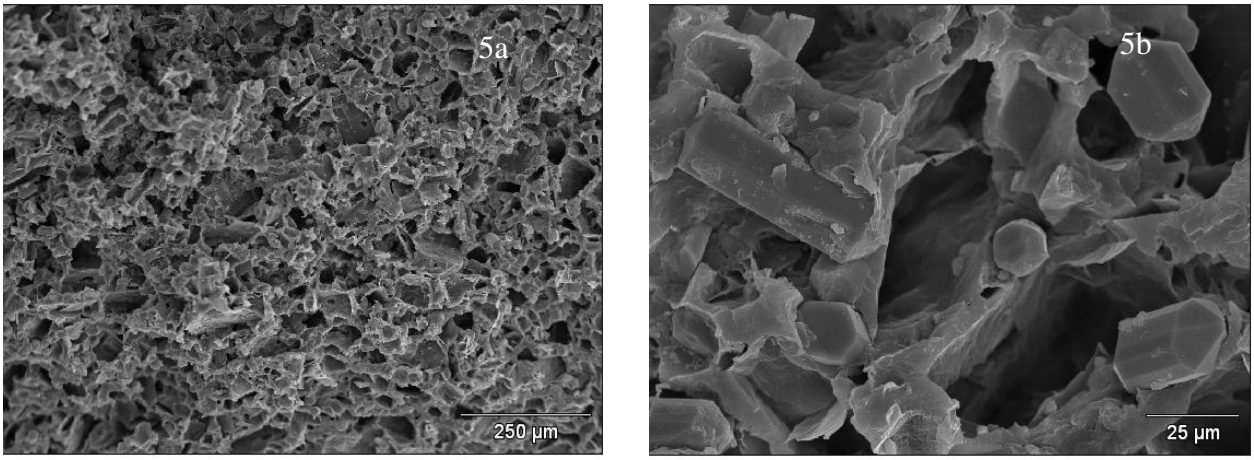


Figura 19: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras P1 (1); F1 (2); F2 (3); F3 (4) e F4 (5), com escala de (a) 250 µm; (b) 25µm.

4.2.2 Idealização da proporção PCL/whiskers de hidroxiapatita

Visualizando aumentar as propriedades mecânicas e reduzir o custo de produção foram utilizados *whiskers* de hidroxiapatita dispersos em uma matriz polimérica. Em relação ao aumento da resistência mecânica, algumas características básicas necessitaram serem seguidas relacionadas ao tamanho da partícula, a concentração da cerâmica e a compatibilidade com o polímero.

O tamanho da partícula é importante devido a relação entre as distâncias das cadeias poliméricas, sendo o ideal o tamanho da cerâmica apresentar-se menor do que essas distâncias, para que não ocorra pontos de concentração de tensão no material. A cerâmica deve apresentar compatibilidade com o polímero para que possa permitir que ocorra a transferência de forças da matriz até os *whiskers* (Ramos, et al., 2009).

O aumento da resistência mecânica com a adição de *whiskers* de hidroxiapatita pode ser atribuído ao fato de que as forças introduzidas nessa matriz ao encontrarem com os *whiskers* permitiram que ocorresse uma absorção e dissipação de energia. Quando é utilizada uma matriz sem adição de reforços ocorre uma absorção de tensão nessa matriz acarretando uma deformação da matriz (Ramos, et al., 2009).

A variação inicial foi de 0,25 g na concentração da cerâmica entre os grupos das amostras. Esta variação mostrou-se significativa pelos resultados obtidos dos ensaios de compressão e das

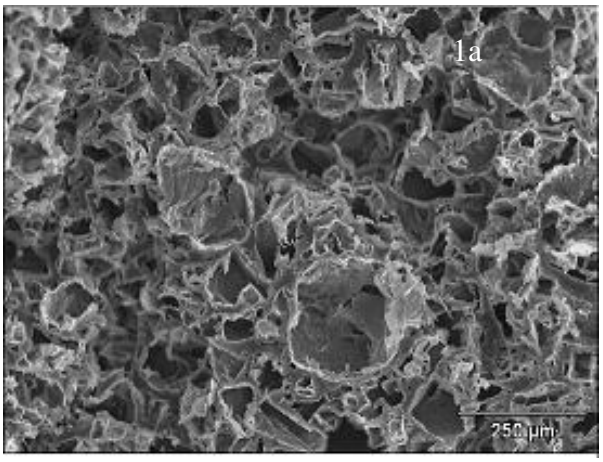
microscopias eletrônicas de varredura. Dos grupos das amostras P1, W3, W6, W8 e W9, em apenas três (P1, W3 e W6) permitiu-se a continuidade das análises. Os grupos W8 e W9 apresentaram um acúmulo de *whiskers* de hidroxiapatita nas matrizes poliméricas, acarretando fragilidade nas amostras. Devido aos resultados dessa variação foi ajustado a variação de 0,1 entre os grupos, permitindo assim uma melhor observação entre as variações.

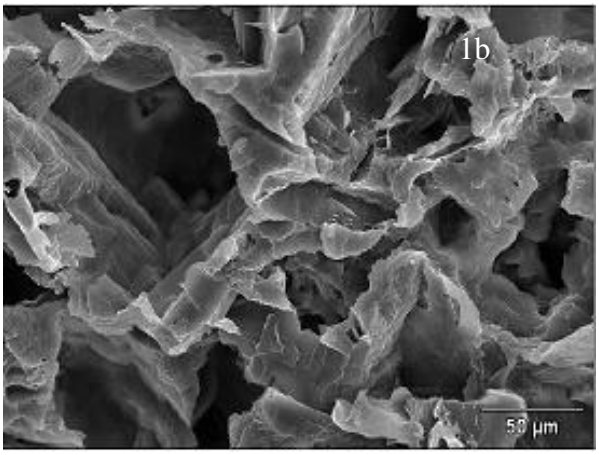
As variações na proporção de *whiskers* de hidroxiapatita com a matriz polimérica estão apresentadas na Tabela 11, todas as amostras foram observadas pelo microscópio eletrônico de varredura, entretanto devido ao grande número de imagens, algumas delas estão no anexo II.

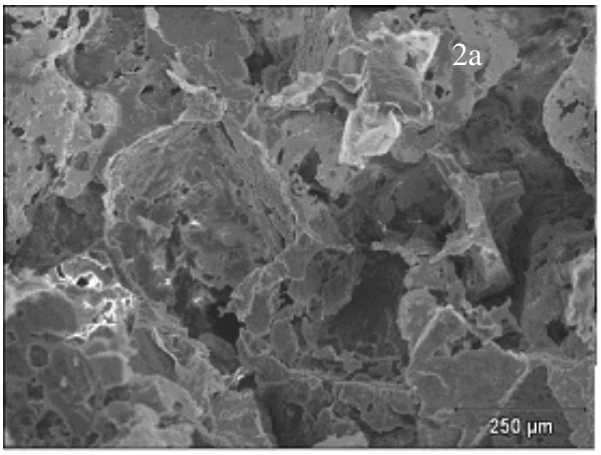
Tabela 11: Amostras com variação na quantidade de *whiskers* com o PCL.

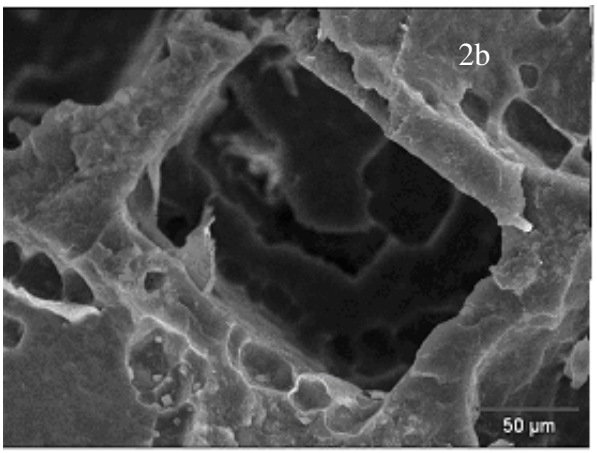
RelaçãoPCL/Whiskers (peso)	Referência	Poli (ε-caprolactona)	Whiskers de hidroxiapatita
100%	P1	2,0 g	0 g
95/5%	W1	1,9 g	0,1 g
90/10%	W2	1,8 g	0,2 g
87,5/12,5%	W3	1,75 g	0,25 g
85/15%	W4	1,7 g	0,3 g
80/20%	W5	1,6 g	0,4 g
75/25%	W6	1,5 g	0,5 g
70/30%	W7	1,4 g	0,6 g
62,37,5%	W8	1,25 g	0,75 g
50%	W9	1,0 g	1,0 g

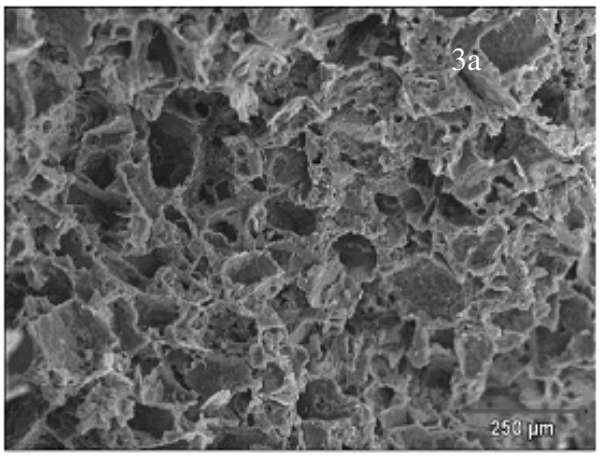
Na Figura 20 foram observados as microscopias eletrônica de varredura das amostras com as melhores distribuições da cerâmica em suas matrizes, com a exceção da amostra P1, a qual não exibe cerâmica em sua matriz. São as amostras: P1, W2, W3 e W6.

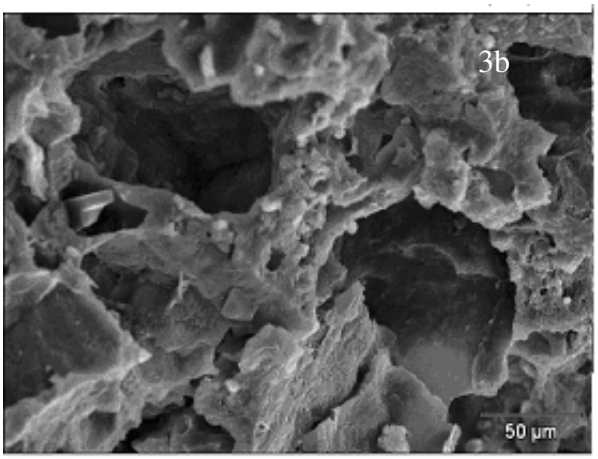

1a
250 µm


1b
50 µm


2a
250 µm


2b
50 µm


3a
250 µm


3b
50 µm

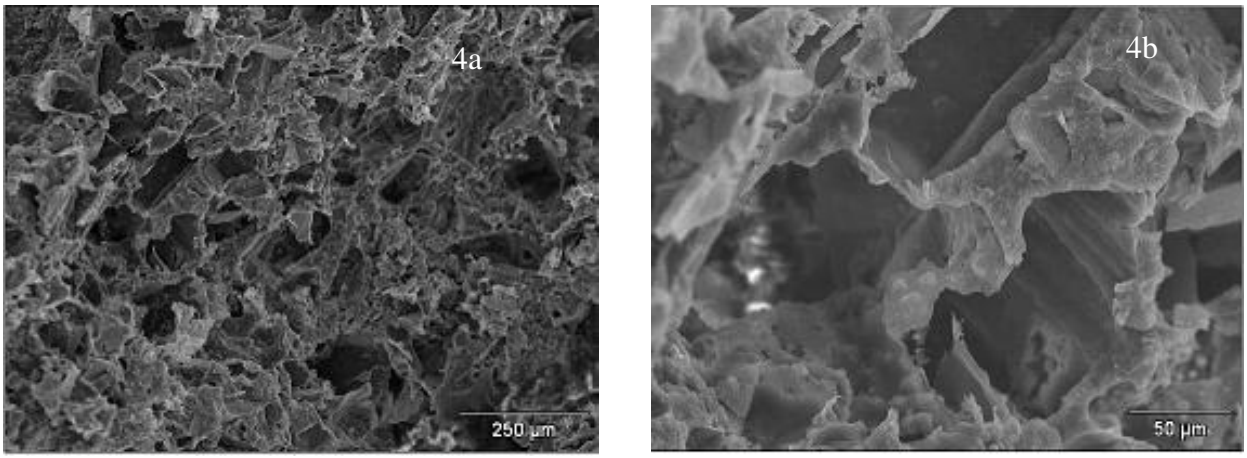


Figura 20: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras P1 (1); W2 (2); W3 (3); W6 (4), com escala de 250µm (a) e 50µm (b).

Ao contrário das amostras com fibra de hidroxiapatita, a presença de *whisker* não foi visualizada com facilidade com a escala de 50µm. Por esse motivo na Figura 21, com uma escala de 5µm pode-se visualizar a presença de pequenos aglomerados na matriz polimérica. Com o aumento da concentração de *whiskers* ocorre uma maior aglomeração de cerâmica, transformando a matriz polimérica um aglomerado cerâmico, o que foi notado em menores aumentos, como visto em anexo II.

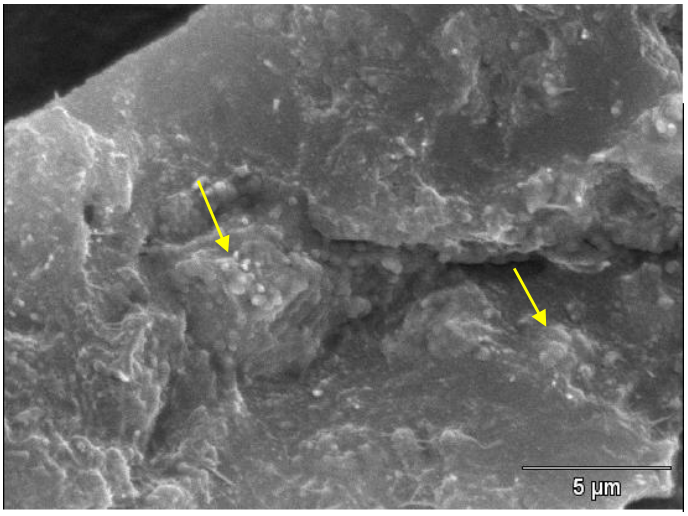


Figura 21: Imagem de microscopia eletrônica de varredura da amostra W5, com escala 5 µm, as setas estão indicando os concentrados de cerâmica na matriz polimérica.

De acordo com o pesquisador Hae-Won Kim (2007), a quantidade de ácido oléico, para resultar em uma dispersão homogênea de cerâmica na matriz é aproximadamente 0,5% peso/volume de hidroxiapatita para ácido oléico, nesse estudo foi utilizada uma hidroxiapatita comercial (Alfa Aesar), a qual difere com a hidroxiapatita sintetizada neste estudo (Hae-Won, 2007). Foi notada a necessidade de aumentar a concentração de ácido oléico de acordo com a concentração de cerâmica adicionada, devido a relação aumento cerâmico com a redução da dispersão na matriz. O presente estudo não avaliou essa variação.

4.2.3 Analise in vitro: fluido corpóreo simulado (FCS)

Toda superfície de dispositivos médicos necessita de uma atenta observação, já que a resposta da superfície ao meio biológico é algo muito importante, pois as propriedades físicas, químicas e bioquímicas da superfície interferem em processos como de absorção de proteínas, interações célula-superfície, e desenvolvimento de células e tecidos na interface entre o corpo e o biomaterial. O desenvolvimento de novos biomateriais aplicáveis na engenharia tecidual tem como objetivo dispositivos biodegradáveis que podem promover regeneração tecidual. O recobrimento de apatita em superfícies biodegradáveis poliméricas mostra-se útil para os suportes utilizados em tecidos ósseos, pois a apatita é a maior componente inorgânica natural do osso e exibe boas propriedades como biocompatibilidade e osteocondutividade (Li, et al., 2009).

O mecanismo de formação de apatita em cerâmicas bioativas foi estudada por vários autores (Kokubo, et al., 2006) (Ribeiro, et al., 2004). De acordo com Kokubo (2006), a deposição de apatita na superfície é uma característica essencial para que *in vivo* ocorra um crescimento ósseo em biomateriais (Kokubo, et al., 2006). Os materiais com superfícies bioativas objetivam a nucleação e crescimento de cristais *in situ*. O estudo *in vitro* da bioatividade, pelo mecanismo de dissolução das cerâmicas de fosfato de cálcio durante a imersão em FCS, pode fornecer informações relevantes para a formação de apatita (Ribeiro, et al., 2004).

O estudo de imersão em fluído corpóreo simulado verifica a formação de uma camada de apatita na superfície dos materiais, em alguns casos quando o material permite uma ligação ao tecido ósseo, esse estudo permite a verificação de outras características, como a degradação,

mudança de pH e de fase cristalina, e a precipitação de camada de apatita quando o material não for a hidroxiapatita estequiométrica.

As amostras de poli (ε-caprolactona) analisadas foram PCL (P1), PCL/fibra de hidroxiapatita (F2) e PCL/*whisker* de hidroxiapatita (W2) visando analisar o comportamento após a imersão em fluído corpóreo simulado. As amostras foram analisadas com 1 semana.

Na Figura 22 pode observar que na amostra de PCL/*whiskers* de hidroxiapatita, ocorreu a deposição de uma camada de apatita em sua superfície, estimulado pela solubilização dos *whiskers* de hidroxiapatita deficiente em cálcio, o que permitiu a precipitação de apatita. Essa deposição ocorreu em toda a superfície da amostra, concluindo assim que a dispersão dos *whiskers* foi homogênea [Figura 22(a)]. A amostra com fibras de hidroxiapatita não apresentou uma deposição de camada de apatita, visto na Figura 23(2b), o que pode ser atribuído à relação já documentada de Ca/P 1,9.

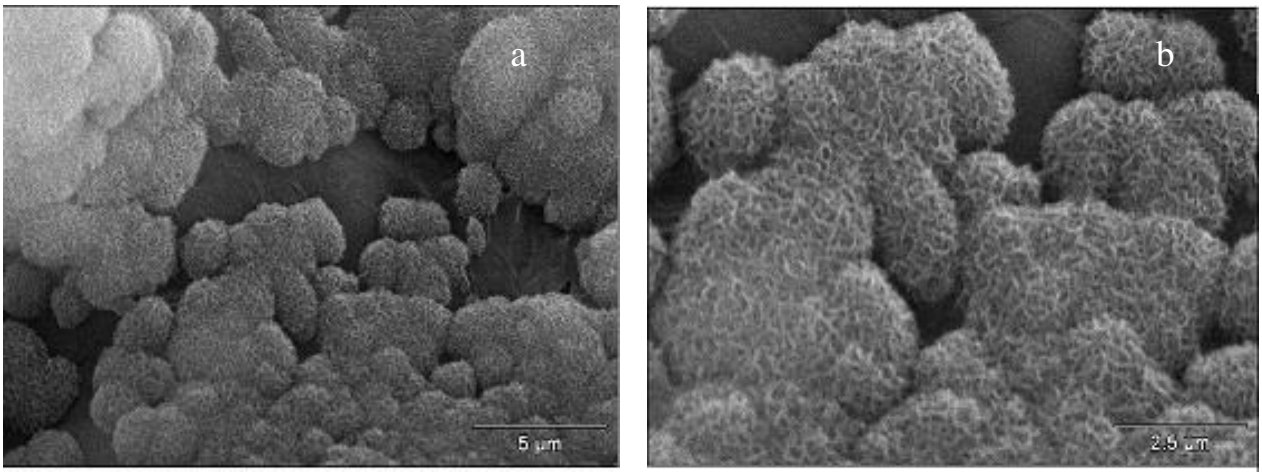


Figura 22: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da amostra W2 após imersão em FCS escala de aumento de 5 µm (a) e 2,5µm. (b).

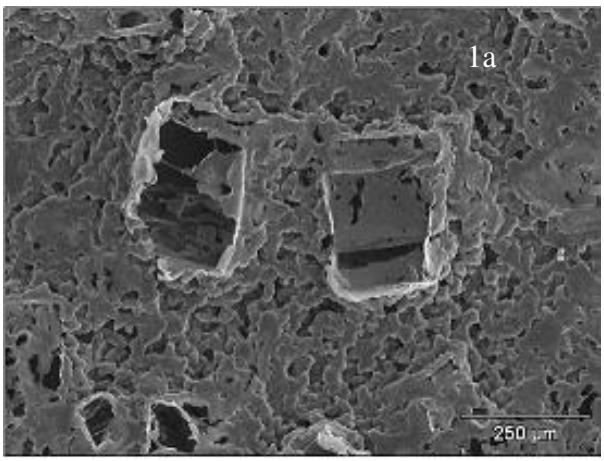
Todas as amostras com uma semana de imersão apresentaram resultados não esperados em relação a perda de peso. Na Tabela 12 foi observado que ocorreu uma redução de peso após o período de imersão de uma semana, sendo uma redução de 36% para a amostra de PCL, 26% para PCL/fibra e 50% de redução para a amostra de PCL/*whisker* de hidroxiapatita. A literatura reporta

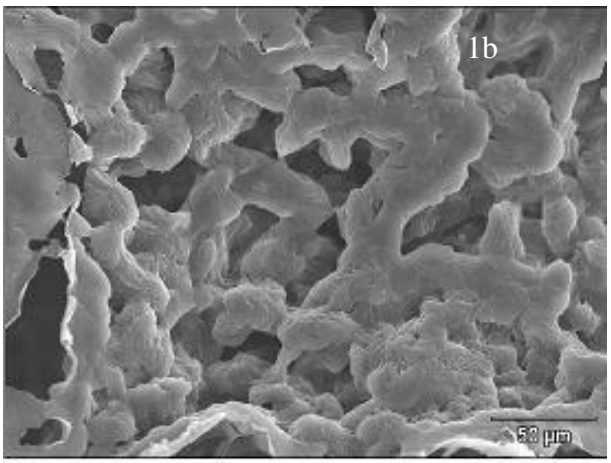
uma redução significativa do peso das amostras somente após quatro semanas de imersão em FCS (Tollon, 2005).

Tabela 12: Peso das amostras antes e após imersão de 1 semana em FCS.

Amostras	Peso das amostras (g)	
	Antes do FCS	Depois do FCS
PCL (P1)	0,057	0,037
PCL/fibra (F2)	0,135	0,101
PCL/*whisker* (W2)	0,064	0,032

A redução de peso das amostras indica uma possível iniciação de degradação na matriz polimérica, porém não é esperado que ocorra em uma semana de imersão. A amostra de PCL/*whiskers* de hidroxiapatita que obteve a maior redução de peso, não apresentou nenhuma alteração na morfologia do polímero, somente uma alteração relacionada com a deposição de apatita em sua superfície (Figura 23).





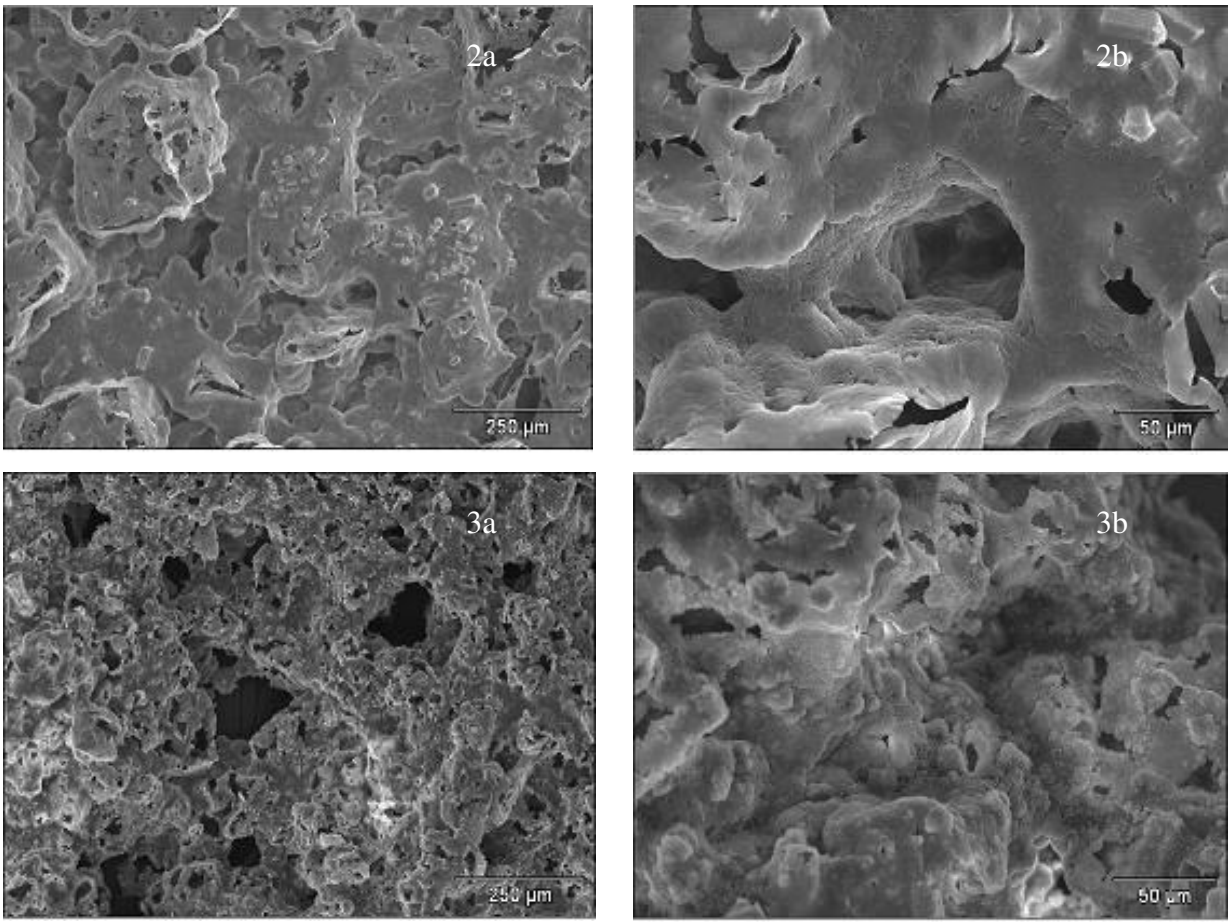


Figura 23: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras (1) P1, (2) F2 , (3) W2, após imersão de 1 semana em FCS com escala de (a) 250 µm e (b) 50µm.

Ao visualizar os gráficos de difração de raios X, Figura 24 a Figura 26, das amostras de PCL, PCL/fibras e PCL/ *whiskers* de hidroxiapatita, antes e depois do FCS, pode se concluir que não ocorreram alterações na fase cristalina das amostras. A alteração na fase cristalina do polímero somente poderia ser observada com um período de imersão mais longo, por apresentar as primeiras alterações de degradação na porção amorfa do PCL (Salgado, et al., 2009).

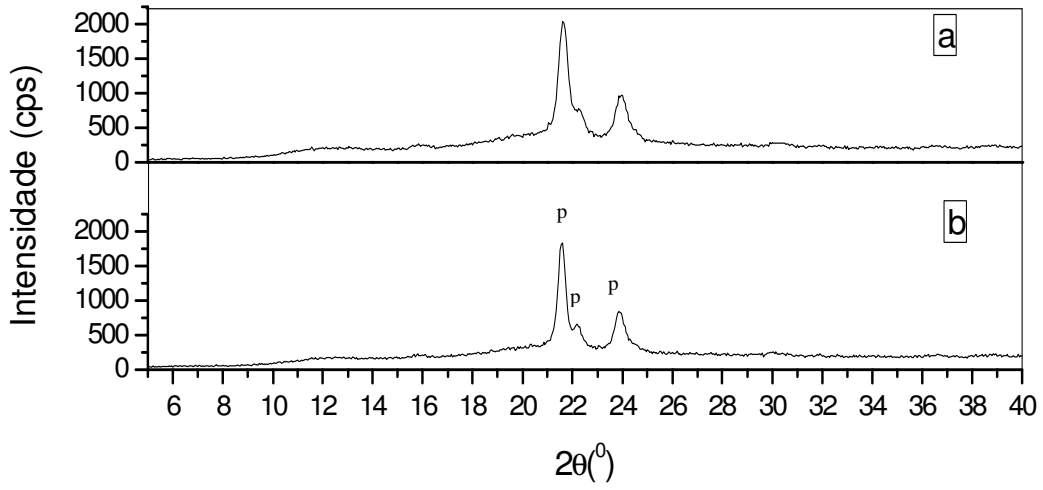


Figura 24: Difratograma de raios X do PCL, antes do FCS (a) e depois (b) (p- picos de PCL).

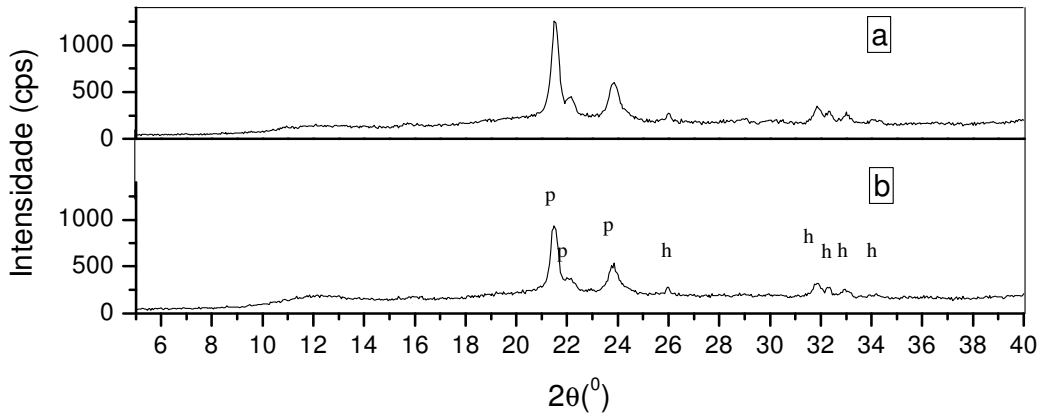


Figura 25: Difratograma de raios X do PCL/*whisker* de hidroxiapatita, antes do FCS (a) e depois (b) (p- picos de PCL; h- picos de HA).

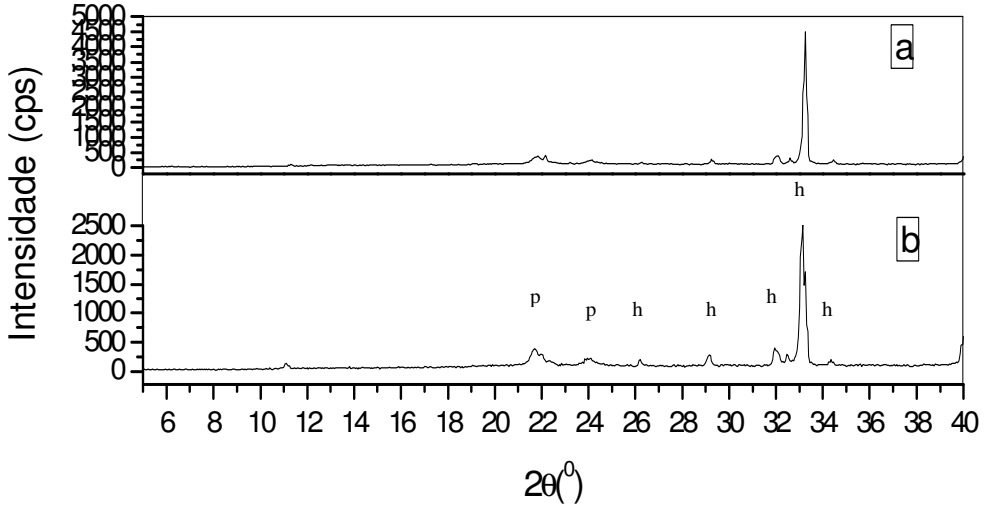


Figura 26: Difratograma de raios X do PCL/fibra de hidroxiapatita, antes do FCS (a) e depois (b) (p- picos de PCL; h- picos de HA).

Um fato interessante foi registrado na Figura 26, é visto um grande pico próximo ao ângulo 33, esse pico pode ser oriundo da orientação das fibras de hidroxiapatita dentro da matriz. Nesse difratograma devido sua escala de intensidade apresentar altos valores, os picos de menores intensidade, como o de PCL apresentam dificuldades de visualização.

4.2.4 Estudo em solução de Ringer

Com esse estudo seria possível a análise da degradação polimérica, porém devido à hidrofobicidade do polímero essa análise não foi possível. As amostras analisadas não obtiveram uma imersão adequada na solução, resultando em alterações não satisfatórias, já que não ocorreram mudanças significativas em sua morfologia e nem em seu peso. Na Tabela 13 pode-se observar que o peso das amostras antes e depois de dois meses de imersão.

Tabela 13: Peso das amostras do dois meses de imersão em solução de Ringer.

Amostras	Peso das amostras	
	Antes	Depois
PCL	0,021	0,024
PCL/fibras de hidroxiapatita	0,056	0,054
PCL/*whiskers* de hidroxiapatita	0,018	0,016

Foi medido o pH da solução após o período de imersão, sendo constatado que em todas as amostras ocorreram uma redução no pH, mas nada significante, já que todos reduziram menos de 0,1.

4.2.5 Teste mecânico à compressão

As matrizes tridimensionais utilizadas em tecidos ósseos necessitam apresentar características tais como: a interconectividade, o tamanho adequado dos poros, micro e macro-porosidade e rugosidade da superfície. Todas essas características influenciam na resposta celular, sendo muito interessante a utilização de suportes bioreabsorvíveis que tenham a taxa de absorção controlada, além de exibirem propriedades mecânicas e físicas controláveis sob condições desejadas.

Para a biomimetização as propriedades mecânicas do suporte devem ser as mais próximas possíveis ao tecido de escolha, a tenacidade à fratura do tecido ósseo pode variar de acordo com o tipo ósseo, apresentando os valores de 2-12 MPa x $m^{1/2}$ (Suchanek, et al., 1997).

Ao analisar os valores de compressão das amostras, notou uma variação entre as amostras do mesmo grupo. Algumas variáveis podem ser responsáveis por essa variação, como por exemplo: porosidade irregular, bolhas internas e acúmulo de cerâmica na matriz polimérica.

A amostra ideal deve ter resistência à compressão durante um grande período de implantação, já que a mesma quando estiver sendo bioreabsorvida deve resistir às cargas em seu redor, não permitindo que ocorra a danificação de células no interior da amostra.

Para avaliação da tenacidade à fratura das amostras, foram realizado teste de compressão axialmente nas amostras P1, F1, F2, F3, F4, W1, W2, W3, W4, W5 e W6. As amostras com adição de fibras na matriz polimérica não alteraram a resistência à compressão. Já a adição de *whiskers* permitiu um aumento na resistência à compressão, porém o resultado ainda se encontra muito longe da resistência à compressão do osso trabecular. Os resultados à compressão estão mostrados no boxplot na Figura 27.

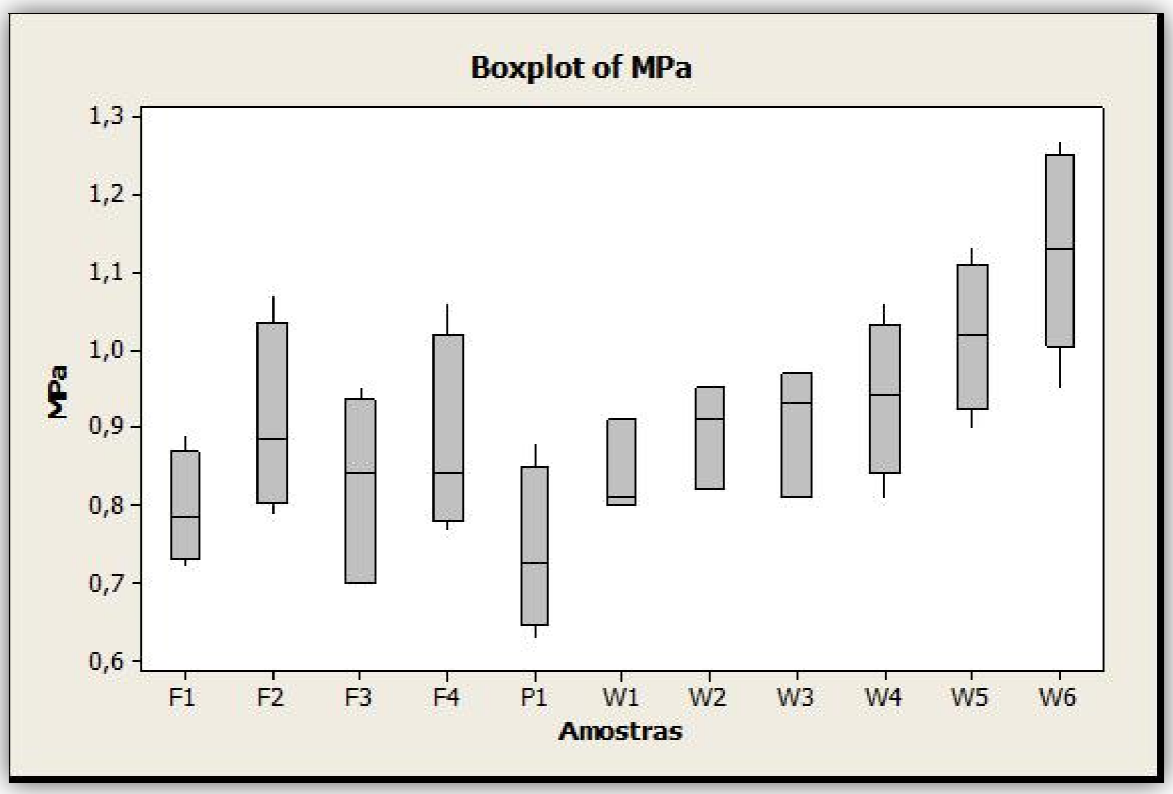


Figura 27: Boxplot dos resultados de resistência mecânica à compressão axial.

Para confirmar que os resultados obtidos apresentaram diferenças estatisticamente, foi realizado o teste estatístico ANOVA, o qual avalia a variância entre as médias. Desse modo, o resultado do teste apresentou um valor de p inferior a 0,005, ou seja, apresentou diferença estatisticamente.

O teste “2-sample-t”, o qual avalia a diferença estatisticamente entre dois grupos, foi realizado para comprovar a diferença da resposta mecânica entre os grupos P1 e F2 e entre o P1 e W6. Analisando estatisticamente foi confirmado que apenas com a adição de *whisker* de hidroxiapatita realmente aumentou a resistência mecânica do material, uma vez que o teste “2-sample-t” mostrou um valor de p=0,000, ou seja para ambas as amostras de P1 e W6 obtiveram resultados estatisticamente diferentes.

4.2.5.1 Influência da porosidade na resistência mecânica à compressão

A influência da porosidade nos resultados de tensão à compressão foi comprovada por uma comparação entre dois grupos de amostras, um dois grupos tiveram a adição do agente porogênico (NaCl), enquanto o outro foi composto apenas de PCL. Os grupos de amostras foram os P1 e o SP1, respectivamente, visto na Tabela 14. Devido dificuldades de produção das amostras do SP1, foram realizados apenas 3 amostras.

Tabela 14: Variações nas quantidades de agente porogênico e polímero, nas amostras dos grupos P1 e SP1.

Amostras	Quantidades de amostras	Agente porogênico (g)	Polímero (g)
P1	5	4,6	2,0
SP1	3	0	2,0

Os resultados dos ensaios de resistência à compressão demonstraram diferenças entre as amostras com e sem agente porogênico. A relação da porosidade é inversamente proporcional a resistência à compressão. Assim as amostras com alto índice de porosidade apresentaram menores valores conforme Tabela 15.

Tabela 15: Diferenças entre as amostras P1 e SP1.

Amostras	Deslocamento (mm)	Média da tensão (MPa)	Desvio padrão
P1	1,0	0,78	0,12
SP1	1,0	5,82	0,41

Nas Figura 28 e Figura 29 são observados os gráficos das amostras dos diferentes grupos, P1 e SP1, respectivamente. O valor da resistência mecânica revela o nível de relação entre porosidade e resistência.

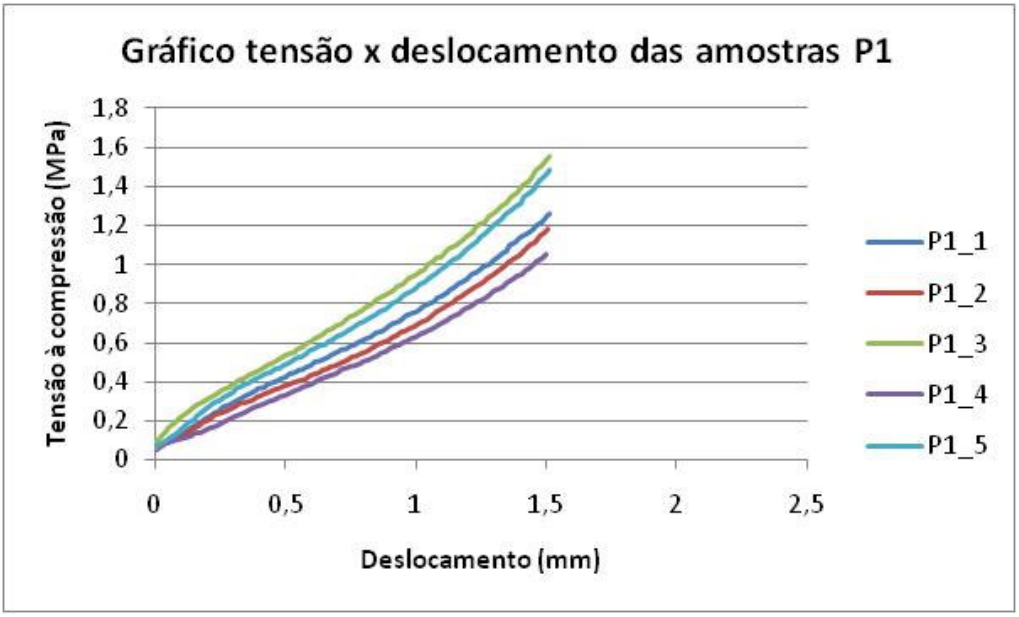


Figura 28: Gráfico tensão por deslocamento das amostras P1.

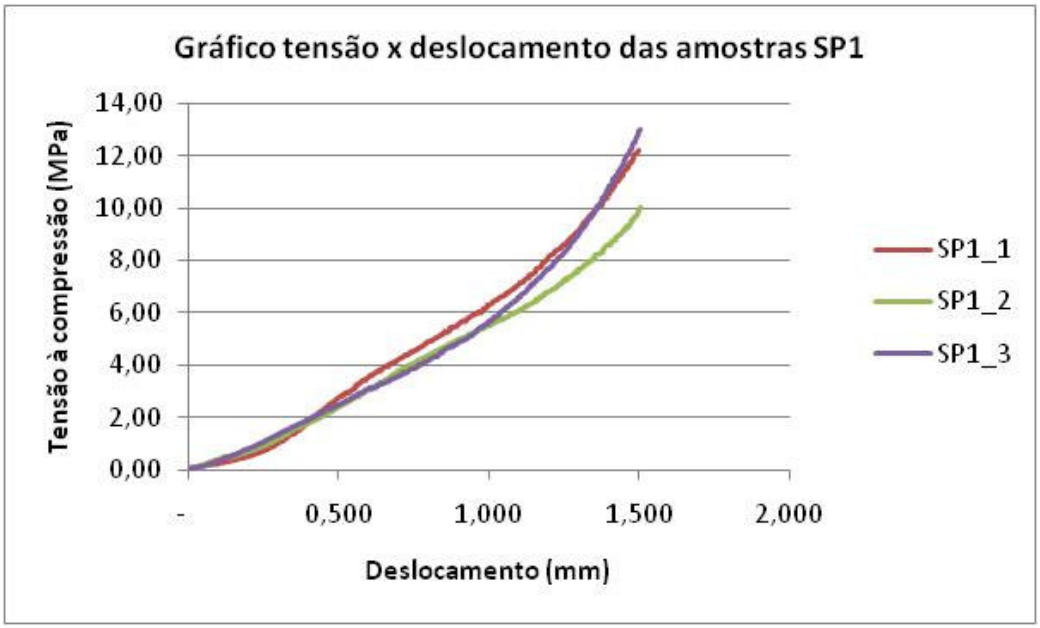


Figura 29: Gráfico tensão por deslocamento das amostras SP1.

As médias de tensões à compressão dos grupos das amostras possibilitaram um entendimento da grandeza entre essa relação de porosidade e resistência, visto que o grupo sem adição apresentou um valor de sete vezes maior quando comparado com o grupo P1.

Capítulo 5

Conclusões e sugestões para próximos trabalhos

As análises dos resultados e das discussões permitem as seguintes conclusões em relação aos suportes de PCL/ *whisker* de hidroxiapatita:

- A síntese da monetita e carbonato de cálcio apresentaram-se satisfatória na obtenção dessas fases;

- O α-TCP apresentou uma relação de Ca/P no valor de 1,58, além de picos semelhantes ao padrão com poucos picos de β-TCP;

- Os *whiskers* de hidroxiapatita, produtos da hidrólise do α-TCP, apresentaram uma relação Ca/P no valor de 1,61, uma semelhança com o padrão JCPDS, além de uma morfologia caracterizada pelo formato de agulhas;

- A análise de citotoxicidade dos *whiskers* de hidroxiapatita evidenciou resultados citocompatíveis, com uma pequena redução na viabilidade celular, porém foi excluída a possibilidade da presença de fase de pirofosfato, ou de alterações no pH;

- A influência na moagem do α-TCP, foi comprovada pela alteração na morfologia dos *whiskers* de hidroxiapatita e em seus difratogramas, o aumento no tempo de moagem promoveu uma redução no tamanho da partícula, resultando em *whiskers* mais finos, desejável para aplicações nanométricas;

- Após a remoção do ácido oléico, por imersão em álcool 99,5%, os suportes de PCL com *whiskers* de hidroxiapatita apresentaram-se citocompatíveis;

- As diferentes morfologias dos suportes de PCL, com diferentes concentrações de *whiskers* de hidroxiapatita, analisadas por MEV e testes de compressão permitiram concluir estatisticamente, que o melhor resultado mecânico à compressão foi com a distribuição de 25% de *whiskers* na matriz polimérica, ou seja a amostra W6;

- O estudo de imersão em fluido corpóreo simulado (FCS) observou-se a deposição de apatita na superfície das amostras com *whiskers*, com o período de sete dias de imersão.

As análises dos suportes de PCL/fibra de hidroxiapatita permitem concluir que:

- A hidroxiapatita precipitada foi caracterizada por DRX, apresentando a fase de hidroxiapatita e uma relação Ca/P de 1,67;

- As fibras de hidroxiapatita apresentaram uma morfologia hexagonal, além de uma relação Ca/P de 1,9;

- As fibras de hidroxiapatita, pelos resultados obtidos pela análise de citotoxicidade, mostraram-se citocompatíveis;

- Após a remoção do ácido oléico, por imersão em álcool 99,5%, os suportes de PCL com fibras de hidroxiapatita apresentaram-se citocompatíveis;

- As amostras de PCL com fibras de hidroxiapatita não evidenciaram deposição de apatita em suas superfícies, após o estudo de imersão em FCS;

- A adição de fibras de hidroxiapatita não promoveu um aumento na resistência mecânica na matriz polimérica.

Trabalhos futuros

As sugestões de novos trabalhos tem como objetivo a melhoria dos resultados dos suportes de PCL com fibras ou *whiskers* de hidroxiapatita, portanto são sugeridos, como sequência do presente estudo, os seguintes trabalhos:

1. Estudo da adição de outros agentes porogênicos na matriz polimérica, visando a melhora na distribuição de poros e na suas áreas de contato;

2. Estudo da modificação da cadeia polimérica do PCL com o intuito de reduzir sua taxa de degradação;

3. Avaliação da degradabilidade do suporte de PCL com *whiskers* de hidroxiapatita;

4. Avaliação *in vivo* em defeitos ósseos com o suporte de PCL com *whiskers* de hidroxiapatita, desenvolvido neste trabalho.

5. Estudo de alterações na estrutura do suporte com o objetivo de melhorar a resistência mecânica à compressão;

Capítulo 6

Referências

Amass, W., Amass, A. e Tigue, B. 1998. A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegration studies. *Polymer International.* 1998, Vol. 47, pp. 89-144.

Barth, E., Ronningen, H. e Solhein, L.F. 1988. Tissue reactions to ceramics and glass ceramics. *Acta Orthopaedica Scandinava.* 1988, Vol. 59, pp. 219-220.

Bozkurt, S. B. 1995. The Densification and Sintering Behavior of Molten Salt Synthesized HA Whiskers/HA composites. *Izmir Institute of Technology.* 1995.

Callister, W.D. 2006. *Fundamentos da ciência e engenharia de materiais.* 2. s.l. : LTC, 2006.

Choi, D, Marra, KG e Kumta, PN. 2004. Chemical synthesis of hydroxyapatite/poly (e-caprolactone) composites. *Mater Res Bull.* 2004, Vol. 39, pp. 417-432.

Choong, C., Triffitt, J.T. e Cui, Z.F. 2004. Polycaprolactone scaffolds for bone tissue engineering. *Institution of Chemical Engineers.* 2004, Vol. 82, pp. 117-125.

Cullinane, D. e Einhorn, T.A. 2008. Biomechanics of bone. [A. do livro] J. Bilezikian, L. Raisz e T.J. Martin. [ed.] Segund. *Principles of bone biology.* 2008, Vol. 1.

Dorozhkin, S.V. 2009. Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid biomaterials. *Journal of Materials Science.* 2009, pp. 2343-2387.

Dourado, E.R. 2006. *Preparação e caracterização de hidroxiapatita nanoestruturada dopada com estrôncio.* Rio de Janeiro : Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, Dissertação de mestrado, 2006.

Duarte, L.S. e Schaeffer, L. 2000. Comparação da resistência à compressão de ossos bovinos congelados e liofilizados. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica.* 2000, Vol. 16, 2, pp. 89-93.

Duek, E.A.R., Zavaglia, C.A.C e Belangero, W.D. 1999. In vitro study of poly(lactic acid) pin degradation. *Polymer.* 1999, Vol. 40, pp. 6465-6473.

Elst, M van der. 1996. The burst phenomenon, an animal model simulating the long-term tissue response on PLLA interlocking nails. *Journal of Biomedical Materials Research.* 1996, Vol. 30, pp. 139-143.

Guarino, V, Causa, F e Ambrosio, L. 2007. Bioactive scaffolds for connective tissue regeneration. *Expert Rev. Med. Devices.* 4, 2007, Vol. 3, pp. 405-418.

Hae-Won, Kim. 2007. Biomedical nanocomposites of hydroxyapatite/polycaprolactone obtained by surfactant mediation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 2007, pp. 169-177.

Hao, J, et al. 2003. Investigation of nanocomposites based on semi-interpenetrating network of [L- poly(e-caprolactone)]/[net-poly (e-caprolactone)] and hydroxyapatite nanocrystals. *Biomaterials.* 2003, Vol. 24, pp. 1531-1539.

Harris, L.D, Kim, B. e Mooney, D.J. 1998. Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming. *Journal of Biomedical Materials Research.* 1998, Vol. 42, pp. 396-402.

Hench, L.L e Wilson, J. 1993. Introduction to bioceramics. Singapore : Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, 1993, pp. 1-15.

Hutmacher, D.W., Sittinger, M. e Risbud, M.V. 2004. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-from fabrication systems. *Trends Biotechnology.* 2004, Vol. 22, pp. 354-362.

ISO. 1992. *ISO Biological Evaluation of Medical Devices.* 1992. ISO 10993.

Jones, T, et al. 2002. Optimization of living ring-opening polymerization of caprolactone. 2002, p. 3.

Junqueira, L.C e Carneiro, J. 1999. *Histologia Básica.* 1999.

Kaigler, D e Mooney, D. 2001. Tissue engineering's impact on dentistry. *J Dent Educ.* 2001, Vol. 65, 5, pp. 456-462.

Kanzakl, N, et al. 2000. *J Phys Chem.* 2000, Vol. 104, p. 4189.

Kokubo, T e Takadama, H. 2006. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivit. *Biomaterials.* 2006, Vol. 27, pp. 2907- 2915.

Kokubo, T, Kim, HM e Kawashita, M. 2003. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials.* 2003, Vol. 24, pp. 2161-2175.

Kreider, J.M. e Steven, A.G. 2009. Trabecular bone mechanical properties in patients with fragility fractures. *Clin Orthop relat res.* 2009, pp. 11955-1963.

Langer, R e Vacanti, J.P. 1993. Tissue engineering. *Science.* 1993, Vol. 260, 5110, pp. 920-960.

Le Geros, R.Z. 1991. *Calcium phosphates in oral biology and medicine.* São Francisco. : Meyers, 1991.

Li, L., et al. 2009. Apatite formation on poly (vinyl alcohol)- coated poly (caprolactone) films by incubation in simulated body fluids. *Applied Surface Science.* 2009, Vol. 255, pp. 7734-7738.

Mariani, P.D.S.C. 2005. *Estudo da biodegradação da blenda de poli caprolactona e amido modificado em meios sólido e líquido.* Faculdade de Engenharia Química. Campinas : Dissertação, 2005.

Mayer, I, Schlam, R e Featherstone, FDB. 1997. *J of Inorg Bioch.* 1997, Vol. 66, p. 1.

Middleton, JC e Tipton, AJ. 2000. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials.* 2000, Vol. 21, pp. 2335-2346.

Mikos, A.G, et al. 1996. *Polymer Membranes and Methods of Preparation of Three Dimensional Membrane Structures. US Patent, 5514378* 7 de Maio de 1996.

Mikos, A.G, et al. 1993. Prevascularization of porous biodegradable polymers. *Biotechnology and Bioengineering.* 1993, Vol. 42, pp. 716-723.

Mooney, DJ, et al. 1992. Principles of tissue engineering and reconstruction using polymer-cell constructs. *Mater Res Soc Symp Proc.* 1992, Vol. 52, pp. 252-345.

Motisuke, M., Carrodeguas, R. G. e Zavaglia, C.A. C. 2008. Mg-Free Precursors for the synthesis of Pure Phase Si-Doped α-Ca3(PO4)2. *Engineering Materials.* 2008, Vols. 361-363, pp. 199- 202.

Murphy, M.B. e Mikos, A.G. Polymer scaffold fabrication. [A. do livro] Lanza, Langer e Vacanti. *Principles of tissue engineering.* pp. 309-321.

Natta, G. 1958. Stereospecific polymerizations by means of coordinated anionic catalysis: Introductory Lecture. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry.* 1958, Vol. 8, pp. 589-611.

Oréfice, R.L, Pereira, M.M. e Mansur, H.S. 2006. *Biomateriais: fundamentos e aplicações.* s.l. : Cultura médica, 2006.

Ota, Y., et al. 1998. Novel preparation method of hydroxyapatite fibers. *J. Am. Ceram. Soc.* 1998, Vol. 81, 6, pp. 1665-1668.

Park, J e Lakes, R.S. 2007. *Biomaterials: An Introduction.* 2007.

Patist, C.M., et al. 2004. Freeze-dried poly(D,L-lactic acid) macroporous guidance scaffolds impregnated with brain-derived neurotrophoc factor in the transected adult rat thoracic spinal cord. *Biomaterials.* 2004, Vol. 25, pp. 1569-1582.

Peterson, L.J., et al. 1942. *Cirurgia oral e maxilofacial contemporânea.* s.l. : Elsevier, 1942.

Pezzin, A.P.T. e Duek, E.A.R. 2002. Hydrolytic degradation of poly(para-dioxanone) prepared by casting or phase separation. *Polymer Degradation and Stability.* 2002, Vol. 78, pp. 405-411.

Pitt, C.G. 1990. Poly (caprolactone) and its co-polymers. [A. do livro] M. Chansin e R. Langer. *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems.* New York : Marcel Decker, 1990, pp. 71-120.

Ramos, S.L.F., et al. 2009. *Electrospun composites for biomedical applications.* s.l. : Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal de Santa Catarina., 2009.

Ramos, S.L.F., Motisuke, M. e Zavaglia, C.A.C. 2008. Whiskers-like Silicon doped hydroxiapatite Synthesis by Hydrolysis of silicon doped α-TCP. *Engineering Materials.* 2008, Vols. 396-398, pp. 501-503.

Ribeiro, C., et al. 2004. Formation of calcium phosphate layer on ceramics with different reactivities. *Materials Science and Engineering.* 2004, Vol. 24, pp. 631-636.

Rigo, E.C.S. 1995. Efeito das condições de precipitação sobre as características físico-químicas da Hidroxiapatita. *Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR.* 1995.

Rivera, J.A, et al. 2004. Injertos óseos-Nueva alternative. Fase III. Obtención, caracterización y avaluación de hidroxiapatita sintética y el compuesto de hidroxiapatita sintética porosa- Proteínas morfogenéticas óseas en un modelo experimental Lapino. *Rev Col Cienc Pec.* 2004, Vol. 17, 1, pp. 20-28.

Saleh, J, et al. 2004. Obtenção e avaliação de hidroxiapatite in vivo. *Cbecimat.* 2004.

Salgado, C.L., Zavaglia, C.A.C. e Sanchez, E.M.S. 2009. *Desenvolvimento de matrizes tridimensionais poliméricas para aplicação em engenharia de tecido ósseo.* s.l. : Universidade Estadual de Campinas, Dissertação de mestrado., 2009.

Sasmazel, H.T, et al. 2008. Comparation of cellular proliferation on dense and porous PCL scaffolds. *Bio-medical materials and engineering.* 2008, Vol. 18, pp. 119-128.

Sepulveda, P., et al. 2002. In vivo evaluation of hydroxatite foams. *Mat res.* 2002, Vol. 5, 3, pp. 253-256.

Sinha, V.R, et al. 2004. Poly-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International Journal of Pharmaceutics.* 278, 2004, pp. 1-23.

Suchanek, W, et al. 1997. Hydroxyapatite/hydroxyapatite- Whisker composites without sintering additives: mechanical properties and microstructural evolution. *Journal of the american ceramic society.* 1997, Vol. 80, 11, pp. 2805-2813.

Suchanek, W., Yaashima, M. e Kakihana, M. 1997. Hydroxyapatite/hydroxyapatite-whiskers composition without sintering additives: mechanical properties and microstructure evolucion. *J. Am. Ceram. Soc.* 80, 1997, pp. 2805-2813.

Tollon, M.H. 2005. *Fabrication of coated biodegradable polymer scaffolds and their effects on murine embryonic stem cells.* s.l. : University of Florida, dissertação (mestrado), 2005.

Vallespir, G.P. 2001. *Clavos de fijación externa recubiertos de hidroxiapatita. Estudio clínico en alargamientos de extremidades.* Departamento de cirurgia, Universitat autònoma de Barcelona, UAB. 2001. p. 388, Tese de doutorado.

Vert, M, et al. 1993. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *Journal of Materials Science.* 1993, Vol. 3, pp. 432-436.

Williams, D.F. 1987. Definitions in biomaterials, . *Progress in biomedical Engineering.* 1987, Vol. 4.

Zhang, L., Xiong, C. e Deng, X. 1995. Biodegradable polyesters blends for biomedical apllication. *Journal of Applied Polymer Science.* 1995, Vol. 56, pp. 103-112.

Capítulo 7

Anexo I

Difratograma comparando a amostra de *whiskers* de hidroxiapatita com o padrão da fase de pirofosfato de cálcio JCPDS 09-0346, visto na Figura 30.

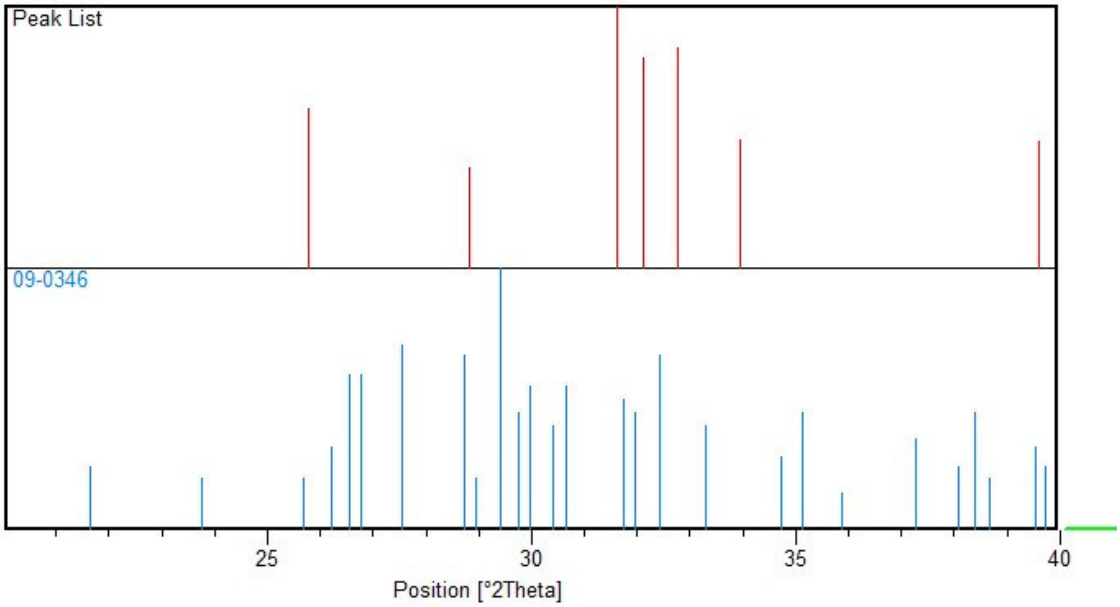
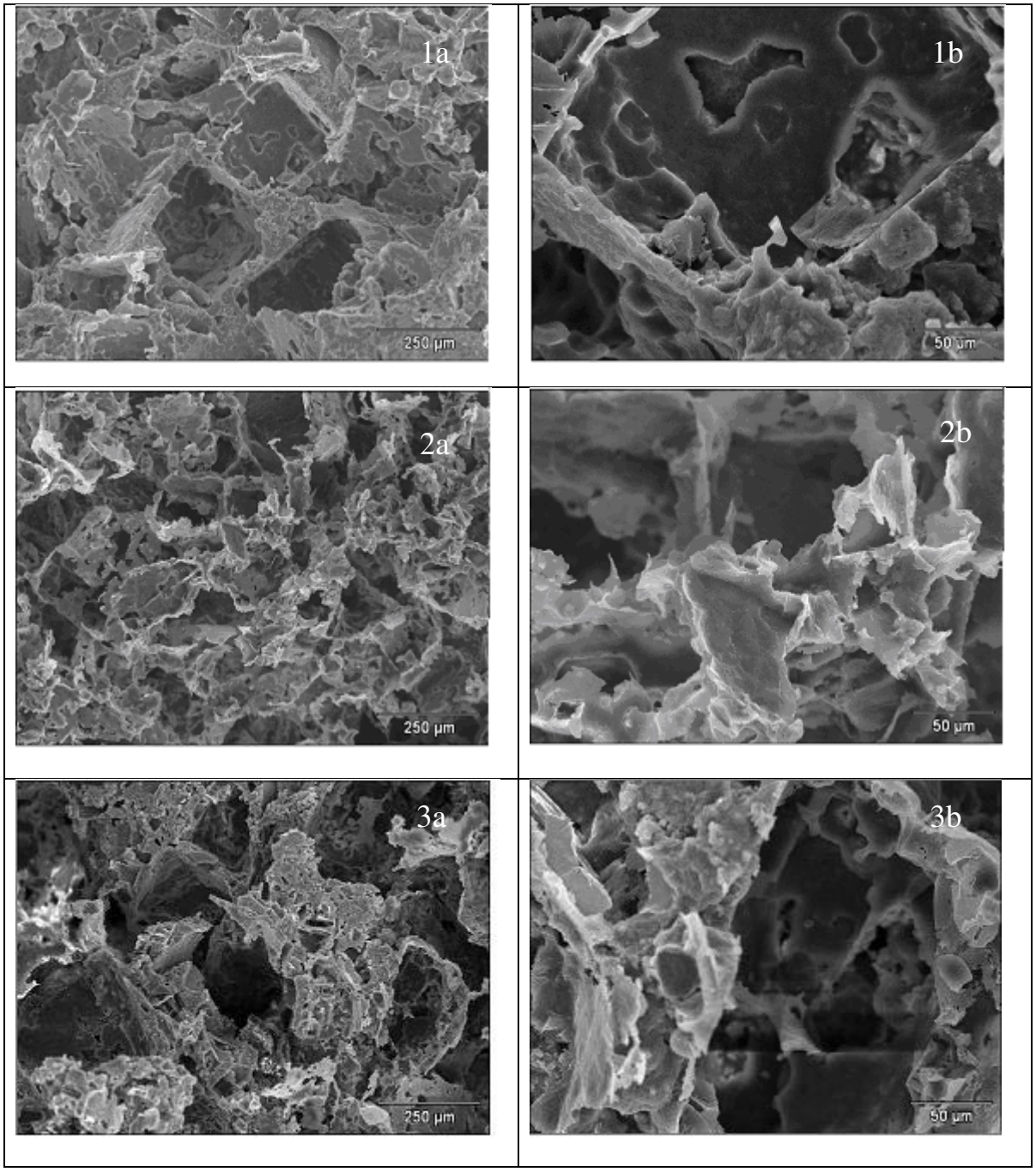


Figura 30: Difratograma de raios X da amostra de *whiskers* de hidroxiapatita e o padrão JCPDS do pirofosfato de cálcio (09-0346).

Anexo II

Micrografias eletrônicas de varreduras das amostras com diferentes concentrações de cerâmica na matriz polimérica, observado na Figura 31.



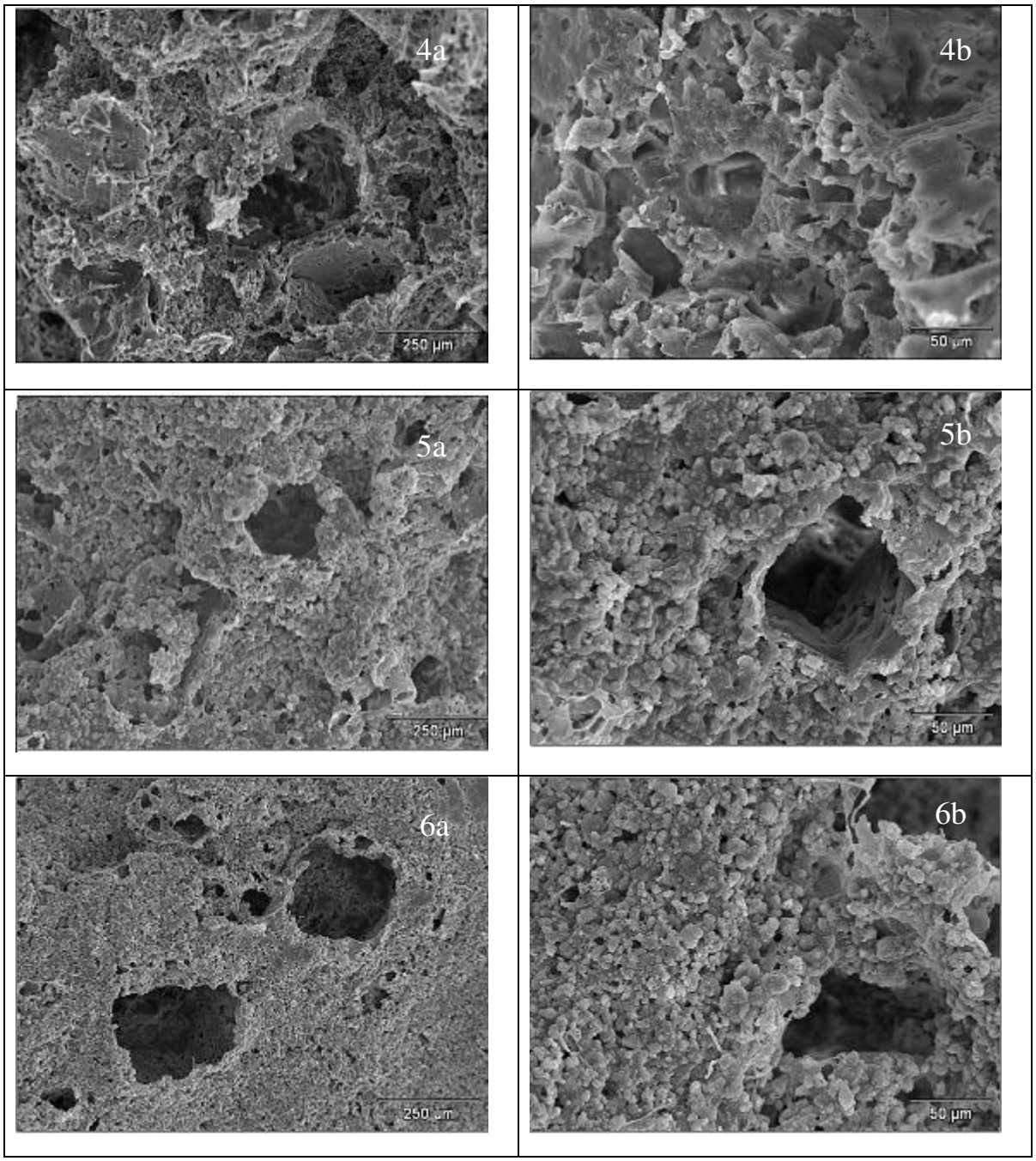


Figura 31: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras (1) W1, (2) W4, (3) W5, (4) W7, (5) W8 e (6) W9, com escala de 250 µm (a) e 50 µm (b).