

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA POR *Zenaide Solomão*

..... E APROVADA
PELA COMISSÃO JULGADORA EM *24.10.2011*

Leahath Zanghi
ORIENTADOR

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

Zenaide Solomão

**Desenvolvimento e
Caracterização de Compósitos de Poli-
(ϵ -caprolactona) PCL e β -fostato tricalcico
(β -TCP) para uso em Biomateriais**

Zenaide Solomão

Desenvolvimento e Caracterização de Compósitos de Poli (ϵ -Caprolactona) (PCL) e β -Fostato Tricálcico (β -TCP) para Uso em Biomateriais

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

Área de Concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Orientadora: Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia

Campinas, 2011

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

So36d Solomão, Zenaide
Desenvolvimento e caracterização de compósitos de
Poli(ε-caprolactona)(PCL) e Beta-Fosfato
Tricálcico (Beta-TCP) para uso em biomateriais /
Zenaide Solomão. --Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Cecilia Amélia de Carvalho Zavaglia.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

1. Polímeros. 2. Polímeros - Biodegradação. 3.
Biomaterias. 4. Compósitos poliméricos. I. Zavaglia,
Cecilia Amélia de Carvalho. II. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. III.
Título.

Título em Inglês: Development and characterization of compósitos
Poly(ε-caprolactone) (PCL) and Beta-Tricalcium
Phosphate (TCP) for use in biomaterials

Palavras-chave em Inglês: Polymers, polymer biodegradation, Biomaterials,
Polymeric composites

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Titulação: Mestre em Engenharia Mecânica

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

Data da defesa: 24/02/2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Mecânica

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADEMICO

Desenvolvimento e Caracterização de Compósitos de Poli- (ϵ -caprolactona) (PCL) e β -Fosfato Tricálcico (β -TCP) para uso em Biomateriais

Autor: Zenaide Solomão

Orientador: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia

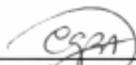
A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:



Profa. Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia
Instituição: Universidade Estadual de Campinas



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



Profa. Dra. Carmen Gilda Barroso Tavares Dias
Instituição: Universidade Federal do Pará

Agradecimentos

Meu agradecimento a DEUS pela oportunidade de crescimento.

Ao meu marido pela compreensão, amor e apoio.

A mãe Marta que me estendeu a sua mão e me acolheu em sua vida.

Ao meu pai Jovino e minha mãe Maria que me deram a graça da vida

E ao meu padrinho, todos os pais e mães e as crianças do jardim encantado que me auxiliam e me amparam.

Aos meus queridos irmãos e amigos pela convivência nas horas de alegria e nos momentos difíceis e aos familiares mais distantes.

A Profa. Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia pela confiança no meu trabalho.

A Mariana pela ajuda no preparo do β -TCP e aos alunos do LABIOMECC: Lonetá, Guinea, Leonardo pelas conversas, amizade e trabalho em equipe.

A Vanessa Bavaresco pela sua dedicação e amizade.

A professora Elizabete e a Christiane pela ajuda no desenvolvimento das análises.

A professora Carmen pelo otimismo e confiança.

A Claudenete da FEM/UNICAMP pela análises de microscopia eletrônica de varredura.

Ao pessoal do laboratório LOPCA pelas análises de DSC.

A todos que de forma direta e indireta colaboram para a realização deste trabalho.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”

(Emmanuel /Chico Xavier)

Resumo

A utilização de biomateriais para substituir, reparar tecidos e órgãos lesados dos seres humanos tem aumentado muito ultimamente devido a diversos fatores como o crescimento da população e a sua maior expectativa de vida. A engenharia tecidual é um campo interdisciplinar que integra princípios da biologia celular e molecular, química, genética, ciências dos materiais e engenharia biomédica, para produzir compósitos tridimensionais inovativos, capazes de substituir tecidos biológicos. O desenvolvimento de novo biomaterial pode ajudar a solucionar este problema, utilizando o método de evaporação de solvente. Este trabalho teve como objetivos: sintetizar e caracterizar o β -TCP através do método via seca; desenvolver e caracterizar as membranas de poli (ϵ -caprolactona) densas e porosas (*scaffolds*) utilizando dois solventes; preparar e caracterizar os compósitos densos e porosos PCL/ β -TCP; fazer uma avaliação da biocompatibilidade *in vitro* desses materiais. As seguintes técnicas de caracterização foram utilizadas: MO, MEV, EDS, DRX, TGA, DSC, ensaios mecânicos de tração, teste de viabilidade celular e atividade de fosfatase alcalina. Foi também analisada a sua degradação hidrolítica em solução tampão fosfato (PBS). Essas técnicas foram adequadas para diferenciar as amostras preparadas com os dois solventes utilizados: clorofórmio e diclorometano. Os ensaios mostraram que o último forneceu amostras mais resistentes mecanicamente, mantendo as propriedades térmicas do PCL puro sem alterações, com a adição das partículas do β -TCP. A biocompatibilidade foi analisada através das normas conhecidas (ASTM e ABNT) e foi possível concluir que os materiais confeccionados são biocompatíveis e a atividade de fosfatase alcalina (ALP) favoreceu o crescimento celular na membrana porosa. As avaliações *in vitro* não mostraram mudanças significativas nas composições preparadas com o solvente clorofórmio. Os materiais estudados possuem um grande potencial para aplicação em substitutos do tecido ósseo.

Palavras chave: poli(ϵ -caprolactona), biomaterial, compósitos, β -TCP, *scaffolds*

Abstract

The use of biomaterials to replace, repair damaged tissues and organs of humans has greatly increased lately due to various factors such as population growth and greater life expectancy. Tissue engineering is an interdisciplinary field that incorporates principles of molecular and cellular biology, chemistry, genetics, materials science and biomedical engineering to produce innovative three-dimensional composites, capable of replacing tissue. The development of new biomaterial can help solutions this problem by using on whole of evaporation of solvent. This work aimed to synthesize and characterize the β -TCP by the dry method; develop and characterize the membranes of poly (ϵ -caprolactone) porous and dense (scaffolds) using two solvents, to prepare and characterize the dense and porous PCL composites / β -TCP, perform an evaluation of in vitro biocompatibility of these materials. The following characterization techniques were used: OM, SEM, EDS, XRD, TGA, DSC, mechanical testing, testing cell viability, alkaline phosphatase activity. We also analyzed its hydrolytic degradation in phosphate buffer solution (PBS). These techniques were adequate to differentiate the samples prepared with two solvents used, chloroform and dichloromethane. The tests showed that the samples provided last more mechanically resistant, keeping the thermal properties of pure PCL unchanged with the addition of particles of β -TCP. The biocompatibility was determined by known standards (ASTM and ABNT) and we can conclude that the materials are biocompatible and made (ALP), promoted cell growth in the porous membrane. The in vitro evaluations showed no significant changes in the compositions prepared with the solvent chloroform. The materials studied have a great potential for application in bone tissue substitutes

Key words: poly (ϵ -caprolactone) biomaterial, composite, β -TCP

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática da engenharia tecidual	7
Figura 2 - Representação esquemática dos eventos que ocorrem na interface osso-implante. (A) Absorção da proteína do sangue e tecidos fluidos. (B) Abordagem do implante, células inflamatório e tecido conjuntivo. (C) Formação de uma camada afibrilar mineralizada e aderência das células osteogenicas. (D) Deposição óssea, tanto sobre o osso e superfície implante. (E) Remodelação do osso recém-formado por osteoblastos	9
Figura 3 - Fórmula estrutural do poli (ϵ -caprolactona)	12
Figura 4 - Reação de hidrólise da ligação éster	12
Figura 5 - Difração de raios X e a Lei de Bragg	20
Figura 6 - Fluxograma com as etapas do trabalho	26
Figura 7 - Fluxograma da degradação hidrolítica em PBS do grupo das membranas utilizando solvente clorofórmio	27
Figura 8 - Difratoograma de raios X do β -TCP calcinado a 1050°C por 6 horas	37
Figura 9 – Gráfico padrão do β -TCP do programa Philips X'Pert HighScore	37
Figura 10 - Micrografia eletrônica de varredura do pó β -TCP (A). (B) espectroscopia de energia dispersiva (EDS) associado à imagem (A)	38
Figura 11- Microscopia ótica de luz polarizada membrana densa PCL puro preparada com o solvente diclorometano (A). Membrana densa de PCL puro preparada com o solvente clorofórmio (B)	41
Figura 12 - Micrografia da superfície das membranas densas e porosas de PCL preparadas com o diclorometano (A,C) e das membranas densas e porosas de PCL preparadas com clorofórmio	

(B,D) 42

Figura 13 - Micrografia da superfície dos compósitos densos e porosos PCL/ β -TCP preparados com diclorometano (A,C) e dos compósitos densos e porosos PCL/ β -TCP preparados com clorofórmio(B,D) 43

Figura 14 - Micrografia das membranas densas e porosas de PCL preparadas com diclorometano (A,C) das membranas densas e porosas de PCL preparadas com clorofórmio (B,D) fraturadas em nitrogênio líquido 45

Figura 15 - Micrografia dos compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP preparados com diclorometano (A,C) e dos compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP preparados com clorofórmio (C,D) fraturados em nitrogênio líquido 46

Figura 16 - Curva das análises termogravimétrica das membranas densas e porosas de PCL preparadas com diclorometano (A,C) e das membranas densas e porosas de PCL preparadas com clorofórmio (B,D) 47

Figura 17 - Curvas das análises termogravimétrica dos compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP preparados com diclorometano (A,C) e compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP preparados com clorofórmio 48

Figura 18 - Curvas da DSC (2º aquecimento) membranas densas e porosas de PCL preparadas com diclorometano (A,C) e membranas densas e porosas de PCL preparadas com clorofórmio (B,D) 49

Figura 19 - Curvas da DSC (2º aquecimento) compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP, preparados com diclorometano (A,C) e compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP, preparados com clorofórmio (B, D). 50

Figura 20 - Curva de tensão vs deformação membranas densas e porosas de PCL preparados com diclorometano (A,C) e membranas densas e porosas de PCL preparados com clorofórmio (B,D). 52

Figura 21 - Curva de tensão vs deformação compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP preparados com diclorometano (A,C) e compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP preparados com clorofórmio (B,D) 53

Figura 22 - Viabilidade celular em osteoblastos humanos (MG63) em ensaios de metabolismo celular (MTT) das membranas densas e porosas de PCL e compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP preparadas com os solventes (A) diclorometano (B) clorofórmio 55

Figura 23 - Atividade de ALP (fosfatase alcalina) de células mesenquimais de medula óssea humana (hMSC) para as membranas densas e porosas de PCL e compósitos porosos de PCL/ β -TCP analisados por 15 dias 56

Figura 24 - Micrografia das membranas densas PCL (A) e porosas de PCL (B) e compósitos densos PCL/ β -TCP (C) e compósitos porosos de PCL/ β -TCP (D) preparados em clorofórmio por 17 meses de degradação hidrolítica 58

Figura 25 - Curva de DSC (2º aquecimento) membranas densas de PCL e compósitos densos PCL/ β -TCP e porosos em solução tampão fosfato (PBS) 60

Lista de Tabelas

Tabela 1- Aplicações de <i>scaffolds</i> de PCL com diferentes tamanhos de poros	13
Tabela 2 - Quantidade em massa de reagentes necessária para a produção de uma dada massa de β -TCP	28
Tabela 3 - Amostras preparadas com diferentes composições (membranas densas e porosas de PCL - compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP), utilizando os solventes diclorometano e clorofórmio	30
Tabela 4 - Dados obtidos das curvas de DSC para a temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_f) para as amostras analisadas	51
Tabela 5 - Resultados dos ensaios mecânicos de tração das membranas densas e porosas de PCL e compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP para os dois solventes diclorometano e clorofórmio	53
Tabela 6 - Dados da temperatura transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_f) das amostras envelhecidas	59

Lista de Abreviaturas e Siglas

Abreviaturas

ABNT = Associação brasileira de normas e terminologias

ACP = Fosfato de cálcio amorfo

ALP = Atividade de fosfatase alcalina

ASTM = *American national standards institute*

BCP = Fosfato de cálcio bifásico

α -TCP = α -fosfato tricalcico

β -TCP = β - fosfato tricalcico

α - MEM- Meio de cultura celular MEM

CDHA = Hidroxiapatita deficiente de cálcio

EDS= Espectroscopia energia dispersiva

DMA = Análise dinâmico-mecânica

DSC = Calorimetria diferencial de varredura

GPC = Cromatografia de permeação em gel

HA = Hidroxiapatita

hMSC = Linhagem de células mesenquimais de medula óssea humana

ISO = International organization for standardization

MEV = Microscopia eletrônica de varredura

MSCGM= Meio de cultura celular para células mesenquimais de medula humana

MG63 = Linhagem de osteoblasto de osteossarcoma humano

MO = Microscopia óptica

MTT = Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio

NaCl= Cloreto de sódio

OCP = Fosfato octacálcico

PBS = Solução tampão fosfato

PCL = Poli(ϵ -caprolactona)

PCL/ β -TCP = Compósito de poli(ϵ -caprolactona e β -fosfato tricalcico)

PGA = Poli (ácido glicólico)

PLA = Poli (ácido láctico)
PLLA=Poli- (L-ácido láctico)
PLGA = Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
PVA = Polivinil ácido álcool
SBF = Soro fetal bovino
TCP = Cerâmicas de fosfato de cálcio
TGA = Análise termogravimétrica

Elementos e Fórmulas Químicas

$(Ca_3(PO_4)_2)$, = Fosfato tricálcico
 $Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4 \cdot 5H_2O$ = Fosfato octacálcio
 $Ca_9(HPO_4)(PO_4)_5(OH)$ = Hidroxiapatita deficiente de cálcio
 $CaCO_3$ = Carbonato de cálcio
 Ca^{+2} = íons cálcio
F- = íon ferro
 H_2O = Molécula de água
 Mg^{++} = íon magnésio
 Na^+ = íon sódio
OH = grupo hidroxila
P = íon fósforo
 PO_4 = Fosfato

Símbolos

Tg = temperatura de transição vítrea
Tf = temperatura de fusão
°C= Graus celcius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.2 Objetivos	4
1.2.1 Objetivos gerais	4
1.2.2 Objetivos específicos	4
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 Engenharia Tecidual.....	6
2.2 Biomaterial	8
2.3 Polímeros Biorreabsorvíveis	9
2.4 Poli(ϵ -caprolactona) Estrutura e Propriedades.....	11
2.5 Materiais Compósitos - Conceitos Básicos.....	14
2.6.. Biomateriais Cerâmicos.....	14
2.7 Cerâmicas de β -Fosfato Tricalcico.....	15
3 METODOLOGIAS EMPREGADAS NA CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DOS BIOMATERIAIS.....	18
3.1 Introdução.....	18
3.2 Análise de difração de raios X.....	19
3.3 Análise por microscopia.....	20
3.3.1 Microscopia óptica (MO)	20
3.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	20
3.4 Análise térmica.....	21
3.5 Ensaio de resistência mecânica à tração.....	22
3.6 Avaliação de citotoxicidade e degradação hidrolítica.....	22
3.6.1 Teste de viabilidade celular pela absorção do MTT.....	22
3.6.2 Atividade fosfatase alcalina (ALP)	23
3.6.3 Estudo da degradação hidrolítica em solução tampão fosfato (PBS)	24
.....	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Materiais.....	25

4.2 Métodos.....	28
4.2.1 Síntese e caracterização do β -fosfato tricalcico - β -TCP.....	28
4.2.2 Caracterizações do β - fosfato tricalcico - β -TCP.....	29
a) Difração de raios X.....	29
b) Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	29
4.3 Obtenção das membranas densas de PCL puro e porosas e compósitos de PCL/ β -TCP – densas e porosas.....	29
4.4 Métodos de caracterização das membranas densas de PCL utilizando solvente diclorometano e clorofórmio.....	31
a) Microscopia óptica (MO)	31
b) Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	31
4.5 Caracterização térmica.....	31
4.5.1 Análise termogravimétrica (TGA)	32
4.5.2 Calorimetria diferencial varredura (DSC)	32
4.6 Ensaio de resistência mecânica à tração.....	32
4.7 Avaliação preliminar de biocompatibilidade.....	33
4.7.1 Cultura das células.....	33
4.7.2 Avaliação preliminar da viabilidade celular através da absorção do MTT.....	33
4.7.3 Atividade fosfatase alcalina (ALP)	34
4.8 Análise de biodegradação.....	35
4.8.1 Degradação <i>in vitro</i> em tampão fosfato (PBS)	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	36
5.1 Síntese e caracterização do β -fosfato tricalcico (β -TCP)	36
5.1.1 Ensaio de difração dos raios X.....	36
5.1.2 Microscopia eletrônica de varredura do β -TCP e espectroscopia de energia dispersiva EDS.....	38
5.2 Síntese e caracterização das membranas densas de PCL puro e porosas e compósitos de PCL/ β -TCP – densas e porosas.....	39
5.2.1 Microscopia óptica (MÕ).....	39
5.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) membranas densas e porosas de PCL e compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP.....	41

a) Membranas densas e porosas de PCL.....	41
b) Compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP.....	43
c) Fratura das membranas densas e porosas de PCL.....	44
d) Fratura dos compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP.....	45
5.3 Caracterizações termogravimétricas (TGA) das membranas densas e porosas de PCL e compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP.....	47
a) Membranas densas e porosas de PCL.....	47
b) Compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP.....	48
5.4 Calorimetria diferencial de varredura (DSC) das membranas densas e porosas de PCL e compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP.....	48
a) Membranas densas e porosas de PCL.....	48
b) Compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP.....	50
5.5 Análise das propriedades mecânicas das membranas densas e porosas de PCL e compósitos densos e porosos PCL/ β -TCP.....	51
a) Membranas densas e porosas de PCL.....	51
b) Compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP.....	52
5.6 Avaliação dos ensaios preliminares da citotoxicidade <i>in vitro</i> pelo método (MTT).....	54
5.7 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)	55
5.8 Análise do ensaio da degradação hidrolítica.....	56
5.8.1 Ensaio <i>in vitro</i> em solução salina fosfato (PBS)	57
a) Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	57
b) Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	58
6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

Materiais aplicáveis em componentes implantados no corpo humano para substituição de partes danificadas ou doentes são denominados biomateriais. Características de não toxicidade e compatibilidade com os tecidos do corpo, bem como capacidade de não promover reações biológicas adversas, despertaram os interesses da comunidade científica nos últimos anos, intensificando assim os estudos nessa área (Oréfice, 2006).

Os biomateriais usados em dispositivos médicos, sobretudo naqueles que são temporária ou permanentemente implantados, são manufaturados ou processados para se adequarem ao contato com proteínas, células, tecidos, órgãos e sistemas orgânicos. As complicações oriundas desses dispositivos variam de acordo com sua aplicação. Infecções e biodegradação podem afetar dispositivos que têm aplicações de longa duração como, por exemplo, próteses permanentes e válvulas cardíacas (Leonor, *et al* 2002 ; Silva, *et al* 2004).

Quanto ao tipo de material, os biomateriais podem ser: metais, cerâmicos, polímeros sintéticos, macromoléculas naturais (como biopolímeros), compósitos e semicondutores. Os materiais metálicos destacam-se pelo uso na confecção de implantes, principalmente devido a sua boa resistência mecânica, elevada tenacidade, facilidade de fabricação e baixo custo (Leonor *et al*, 2002 ; Silva *et al*, 2004).

A aplicação de cerâmicas, vidros e vitrocerâmicos para reparo ou substituição dos tecidos conectivos duros vêm sendo consolidada através do desenvolvimento de novos materiais contendo misturas de sílica, fosfato, óxido de cálcio entre outros (Leonor *et al*, 2002 ; Silva *et al*, 2004).

A engenharia tecidual é um campo interdisciplinar que integra princípios da biologia celular e molecular, química, genética, ciências dos materiais e engenharia biomédica, para produzir compósitos tridimensionais inovativos, capazes de substituir tecidos biológicos.

O termo *engenharia tecidual* foi pela primeira vez apresentado no Workshop da Fundação Nacional de Ciência, ocorrido em 1988 nos EUA, definido como “a aplicação dos princípios e métodos da engenharia e ciências da vida para entender as relações entre estrutura e funções em tecidos humanos normais e patológicos, e o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar as funções do tecido” (Nasseri *et al*, 2001).

Os diversos materiais utilizados na confecção dos *scaffolds* (arcabouços porosos e tridimensionais) para a engenharia tecidual são principalmente polímeros biorreabsorvíveis e algumas cerâmicas de fosfato de cálcio.

A adição de polímero biorreabsorvível pode melhorar a degradabilidade de biomateriais cerâmicos e alterar suas propriedades mecânicas e físicas. Também os perfis da liberação de drogas podem se alterar. Existe uma larga escala de diferentes polímeros que podem ser selecionados. Alguns exemplos de polímeros biorreabsorvíveis com o grupo polimérico éster (PLA, PLLA), poli (ácido glicólico (PGA), poli ácido (D,L ácido lático-co-glicólico)(PLGA) e poli(ϵ -caprolactona) (PCL), os quais mostram diferentes mecanismos e razões de degradação.

A taxa total da degradação está na seguinte ordem: PGA>PLGA>PLA>PCL (Barbanti, 2004). Partículas cerâmicas são adicionadas ao polímero para torná-lo (mais) osteocondutivo aumentando suas propriedades mecânicas. Esses *scaffolds* híbridos podem ter além de um polímero biorreabsorvível, um cerâmico hidroxiapatita (HA), ou fosfato de cálcio amorfo (ACP). Compósitos porosos de PCL, foi investigado por Mondrinos *et al* com 10-20% de partículas de fosfato de cálcio (Mondrinos *et al*, 2006).

As principais características dos *scaffolds* como interconectividade, tamanho dos poros, como a micro e macroporosidade, rugosidade da superfície, em muito influenciam a resposta celular, mas também controlam a taxa de entrega de nutriente e a remoção de produtos metabólicos, garantindo um meio rico em nutrientes para que seja possível o estudo de como as células e os *scaffolds* reagem a estímulos mecânicos.

As diversas técnicas empregadas para a fabricação desses suportes, resultam em poros distribuídos de forma não homogênea, o que prejudica o crescimento do novo tecido ósseo, pois estruturas com micro poros não uniformes formam regiões com concentrações de nutrientes insuficientes, inibindo assim, a atividade celular e resultando em um tecido ósseo de má qualidade. O desenvolvimento de técnicas mais avançadas de fabricação de *scaffolds*, como técnicas de prototipagem rápida estão garantindo uma distribuição geométrica e homogênea dos poros no *scaffold*. As pesquisas são de grande interesse nessa área.

Os materiais utilizados na área biomédica devem possuir características biomecânicas, elétricas e biológicas compatíveis com o tecido ou órgão lesado. Para escolha de um material para implantação no tecido vivo deve-se levar em conta vários fatores, tais como: resistência à fadiga do material, bioatividade, adesão celular, degradação do material e biocompatibilidade (Mondrinos *et al*, 2006).

Neste trabalho foi desenvolvido um biomaterial utilizando um polímero com alto peso molecular poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e um β -fosfato tricálcico (β -TCP), sintetizado em laboratório para o desenvolvimento de um compósito. Baseados em pesquisas atuais este trabalho está diretamente ligado ao interesse e à necessidade do desenvolvimento de estruturas que favorecem o crescimento e a expectativa de vida, para restaurar e substituir partes danificadas do tecido ósseo.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivos Gerais

Esta dissertação teve os seguintes objetivos gerais:

- a) Sintetizar o β -TCP através do método via seca. Desenvolver as membranas de poli (ϵ -caprolactona) PCL puras e porosas.
- b) Preparar diversas composições de compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP sintetizado em laboratório para uso na engenharia tecidual.
- c) Caracterizar o β -TCP, as membranas densas e porosas do PCL e todas as composições dos compósitos.
- d) Fazer uma avaliação da biocompatibilidade *in vitro* desses materiais.

1.2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar o β -TCP através da análise de difração de raios X (DRX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS).
- Verificar o efeito da utilização do agente porogênico (cloreto de sódio) na confecção de membranas porosas de PCL pelo método de lixiviação de sal.
- Preparar membranas densas de PCL e porosas e compósitos densos PCL/ β -TCP e porosos, utilizando dois solventes: diclorometano e clorofórmio.
- Verificar a morfologia das membranas densas através da microscopia óptica e da microscopia eletrônica de varredura (MEV).

- Avaliar as características térmicas dos materiais por termogravimetria (TGA), calorimetria diferencial de varredura (DSC), e as propriedades de resistência mecânica por tração das membranas densas e porosas e dos compósitos densos e porosos.
- Avaliar da citotoxicidade das amostras estudadas utilizando a técnica de colorimetria de MTT e a atividade da fosfatase alcalina (ALP).
- Estudar a degradação hidrolítica teste (*in vitro*) das membranas densas e porosas de PCL e compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP preparados com o solvente clorofórmio com solução salina à base de fosfato (PBS) 0,1 mol/L pH-7,4.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Engenharia Tecidual

Engenharia tecidual é uma técnica para criar tecidos funcionais que podem ser implantados em pacientes que possuem deficiências em tecidos ou órgãos. É um novo ramo da ciência voltada para a pesquisa e desenvolvimento (P&D) de substitutos biológicos de reparação, reconstrução e regeneração de tecidos. É uma área de pesquisas multidisciplinar, que envolve as áreas da medicina, biologia, engenharia e a ciência dos materiais.

O princípio metodológico mais utilizado, para se fazer engenharia tecidual, envolve as seguintes etapas:

1ª) Etapa:

Construção de arcabouços porosos tridimensionais, biocompatíveis, e biodegradáveis, chamados também de *scaffolds*. Entre as matérias primas mais utilizadas para os *scaffolds* podem-se destacar:

- os polímeros sintéticos biorreabsorvíveis (PLLA, PGA e PLGA)
- os polímeros naturais (colágeno e derivados do ácido hialurônico)
- os cerâmicos (hidroxiapatita, beta fosfato tricálcico, biovidros).

2ª) Etapa:

O cultivo de células em ambiente laboratorial próprio (bioreatores).

Há dois tipos de células cultivadas: as células maduras e diferenciadas (condrócitos ou osteócitos isolados de uma área doadora, exemplo: condilo femural; e as células tronco mesenquimais indiferenciadas adultas (origem: medula óssea, tecido gorduroso e sangue).

3ª) Etapa:

Adição de fatores de crescimento à matriz. Os fatores mais usados são as BMPS (proteínas morfo-genéticas) que podem ser de origem animal, como as BMPs bovinas, ou de origem recombinada (tecnologia do DNA recombinante).

4ª) Etapa:

Implantação do *scaffold* no local da lesão, que pode ser implantado das seguintes maneiras:

- a) Implantado sozinho
- b) Implantado juntamente com as células cultivadas fora do paciente (semeadas sobre o arcabouço).
- c) Implantado associado com fatores de crescimento (proteína morfogenética do osso (BMP), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e outros .

A figura 1 ilustra esquematicamente a engenharia tecidual.

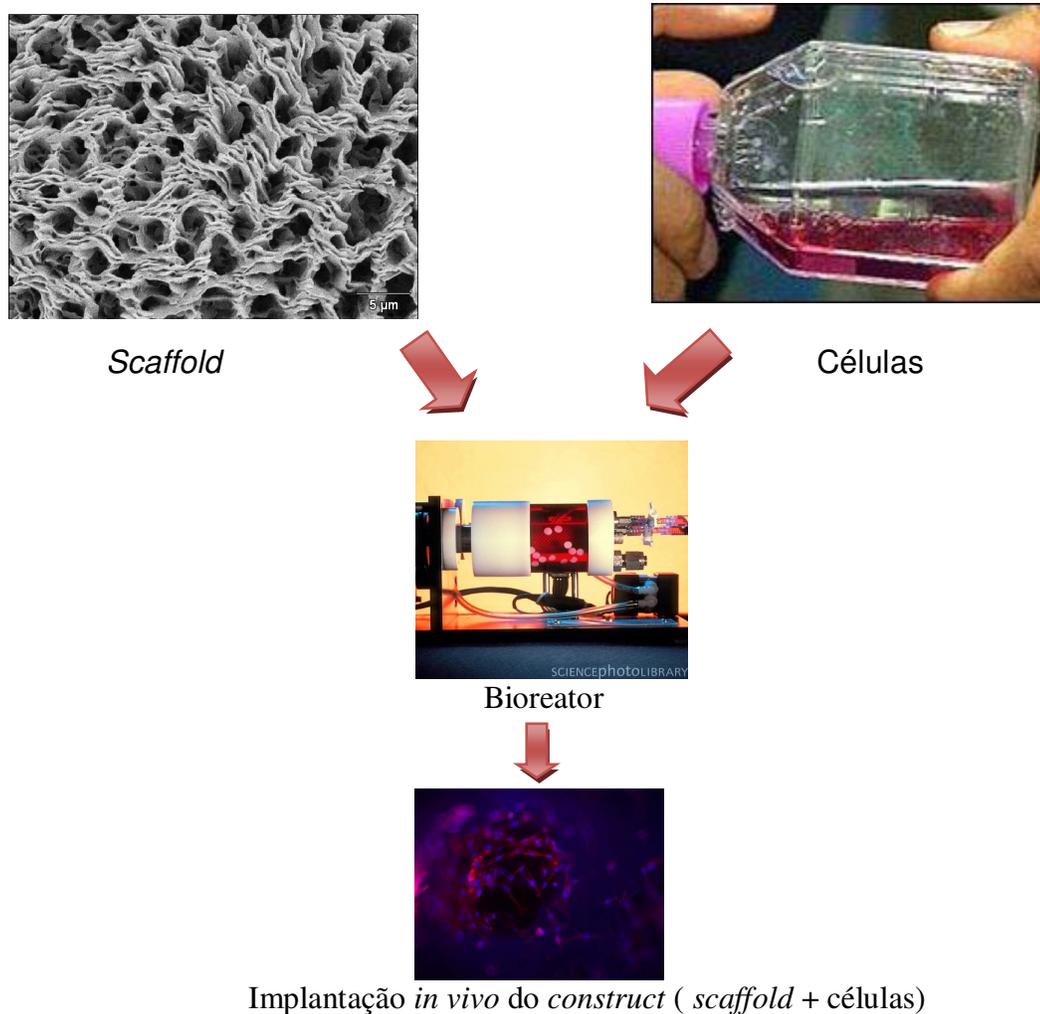


Figura 1- Representação esquemática da engenharia tecidual (fotos cedidas gentilmente por Guinéa Cardoso)

A essência da engenharia tecidual segundo (Kikuchi *et al*, 2004) é que todas as células sejam capazes de iniciação e sustentação e o processo de regeneração está ligado, através de fatores de crescimento ou genes de modo que elas produzam um novo tecido de variedade requerida.

A reposição total ou parcial é feita através de implantes ou transplantes. Os transplantes de tecidos ou órgãos podem ser obtidos de doadores vivos, como por exemplo, o coração, rins etc, ou de cadáveres, como no caso de ossos liofilizados e congelados. Em ambos os casos, é necessário à utilização de drogas imunossupressoras, para evitar a rejeição dos órgãos, e de outros medicamentos que neutralizem uma possível contaminação microbiológica e viral (Hench, 1993).

Uma alternativa é a utilização de um implante, dispositivo médico feito de um biomaterial que é intencionalmente inserido dentro do corpo total ou parcialmente abaixo da superfície, onde o implante estará em contato com o tecido, de acordo com a Definição do Consenso da Sociedade Européia de Biomateriais (Willians, 1987).

2.2 Biomaterial

Como definiu Williams em 1987, “os biomateriais são substâncias de origens naturais ou sintéticas que são toleradas de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos”. Ou seja, para que um material seja classificado como um biomaterial algumas características devem ser satisfeitas: biocompatibilidade, inércia e estabilidade química, biofuncionalidade e ser esterilizável (Kawachi e colaboradores, 2000).

Os biomateriais representam um importante por servirem como *scaffolds* para o favorecimento da regeneração tecidual, podendo ser utilizados na liberação de medicamentos e fator de crescimento simulando a resposta do tecido, ou até mesmo para criação de uma nova estrutura funcional quando o tecido danificado não regenera, simulando os mecanismos e características fisiológicas do tecido *in vivo* (Lombello *et al*, 2003).

Atualmente, entre os biomateriais mais utilizados estão biocerâmicas por possuírem características atrativas, sendo as principais a inércia e estabilidade química e elevada resistência mecânica, à corrosão e ao desgaste. As biocerâmicas são classificadas normalmente em relação à resposta desenvolvida na interface do tecido vivo com o implante, podendo ser praticamente inertes (alumina), porosas (aluminatos e hidroxiapatita), bioativas (biovidros e vitrocerâmicas) e reabsorvíveis (tricalcio fosfato) (Kawashi, 2000; Hench, 1993).

A figura 2 apresenta uma representação esquemática dos eventos que ocorrem na interface osso e implante (biomaterial).

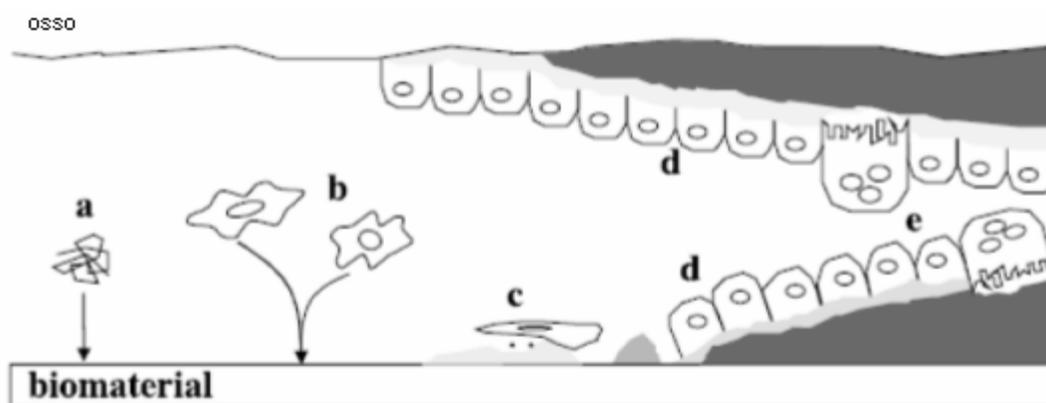


Figura 2- Representação esquemática dos eventos que ocorrem na interface osso-implante. (A) Absorção da proteína do sangue e tecidos fluidos. (B) Abordagem do implante, células inflamatórias e tecido conjuntivo. (C) Formação de uma camada afibrilar mineralizada e aderência das células osteogênicas. (D) Deposição óssea, tanto sobre o osso e superfície do implante. (E) Remodelação do osso recém-formado por osteoblastos (Schüssele, 2006).

2.3 Polímeros Biorreabsorvíveis

Os poli (α -hidróxi-ácidos) constituem uma classe de poliésteres que são representados pela fórmula geral $(-CHR-CO-)$ (Vert, 1992). Esses polímeros são relativamente novos e começaram a surgir na década de 60. Os polímeros biorreabsorvíveis são bastante utilizados na área médica em suturas, implantes, matrizes para liberação controladas de drogas, etc e por serem, muitos deles, biocompatíveis (Danielson *et al*, 2006).

Materiais usados em implantes podem ser classificados como bioestáveis ou permanentes e bioabsorvíveis ou temporários. Materiais bioestáveis incluem próteses, para substituir partes danificadas dos corpos por um período de tempo não específico. Os materiais usados nesses casos necessitam reter suas propriedades mecânicas e químicas *in vivo* por anos ou décadas.

Em muitos casos, apenas a presença de um biomaterial como suporte, é requerida durante a recolocação do tecido ou para servir de fator de crescimento. Os polímeros biorreabsorvíveis são componentes que são degradados *in vitro* e *in vivo*, e desaparecem com o tempo, de acordo com o reparo do tecido. Em ambos os casos o conhecimento para o teste padrão de adesão celular, crescimento, e diferenciação sobre esses materiais é importante (Lombello *et al*, 1998).

A adesão celular é influenciada pelas características físicas, químicas e morfológicas dos materiais usados como substratos para cultura celular. Enormes esforços têm sido devotados para construção de cultura celular *scaffolds* no campo da engenharia tecidual. Os *scaffolds* servem como um modelo tridimensional para adesão celular, proliferação e formação de matriz extracelular bem como um suporte para fator de crescimento ou outros sinais biomoleculares e além de alta porosidade, o *scaffold* ideal para praticar a engenharia tecidual deve possuir propriedades mecânicas, biodegradabilidade apropriada e boa biocompatibilidade.

A localização do *scaffold* pode afetar a adesão celular, para tanto a engenharia de superfície tem desenvolvido diversos métodos para melhorar a biocompatibilidade favorecendo a interação do material com as células. Diferentes moléculas biologicamente ativas têm sido quimicamente e fisicamente immobilizadas sobre matrizes poliméricas e polímeros em blocos onde são empregados sobre a superfície aditivos (Lucchesi, 2005).

Entre todos os métodos, a modificação de materiais sintéticos e produtos naturais, é uma maneira fácil e eficaz de conseguir *scaffolds* híbridos, com a vantagem de combinar os componentes (Chen *et al*, 2004). A grande vantagem dos polímeros sintéticos é a associação com a processabilidade, flexibilidade e suas propriedades químicas e físicas. A degradação dos polímeros sintéticos pode ocorrer por via hidrolítica e clivagem enzimática.

As desvantagens dos polímeros sintéticos é a possibilidade de uma inflamação crônica aguda, diminuição do pH no local do implante devido à acidez relativa e dos sub-produtos gerados através da degradação hidrolítica e função biológica limitada. Derivados de α -hidroxi ácidos como PLA, PGA e copolímeros, poliéster alifático, são polímeros comumente usados em diferentes tipos de projetos médicos em reconstrução cirúrgica podendo ser formulados com alta densidade e interconectividade dos poros.

Um dos polímeros estudados na engenharia tecidual é o PCL, polianidrido e copolímeros em bloco de PLA e cada polímero tem sido investigado em sua atividade particular. Por exemplo, o PCL foi usado para superar as propriedades mecânicas insuficientes do PLGA quando comparado ao osso trabecular humano. Matriz porosa do PCL fabricado pelo método de solvente lixiviação demonstrou alta tensão de estiramento e módulo Young. Muitos polímeros sintéticos para liberação de drogas são hidrofóbicos, dissolvem apenas em solventes orgânicos e sua aplicação na fabricação de sistemas para defeitos ósseos requer menor evasão cirúrgica.

Embora muitos suportes para liberação do fator de crescimento têm sido produzidos de polímeros sintéticos e naturais, materiais orgânicos têm sido usados para promover a formação específica na intervenção farmacológica de problemas musculares e esqueléticos (Dai, 2009). Estudos recentes no desenvolvimento de compósitos híbridos onde as partículas cerâmicas são embebidas em uma matriz polimérica biorreabsorvíveis. Esses compósitos híbridos freqüentemente melhoram a biocompatibilidade e a integração com o tecido.

2.4 Poli(ϵ -caprolactona) Estrutura e Propriedades

A poli(ϵ -caprolactona), também conhecido como PCL, é um polímero sintético, de caráter hidrofóbico, muito conhecido pela sua biodegradabilidade e habilidade em formar blendas com outros polímeros (Amass *et al*, 1998). A PCL pertence à família dos poliésteres alifáticos, sendo sintetizada por meio de polimerização por abertura de anel ϵ -prolactona, para obtenção da unidade repetitiva. O PCL é um polímero semicristalino e seu peso molecular pode variar de 5.000 a 80.000. Possui baixa temperatura de fusão ($T_f = 60^\circ\text{C}$) e a sua temperatura de transição

vítrea ocorre bem abaixo da temperatura ambiente ($T_g = -60^\circ\text{C}$). A fórmula estrutural esta ilustrada na figura 3 (Mariani, 2006).



Figura 3- Fórmula estrutural do poli (ϵ -caprolactona)

O Poli (ϵ -caprolactona) é biodegradado pela lipase, que hidrolisa a ligação éster, e que é capaz de degradar tanto a fase amorfa quanto a fase cristalina do PCL (Hakkarainen e Albertsson, 2002). A figura 4 ilustra uma reação de hidrólise de ligação éster.



Figura 4 - Reação de hidrólise da ligação éster

Polímeros biorreabsorvíveis como o poli (ϵ -caprolactona) (PCL) são materiais promissores e em sua hidrólise não produz nenhum produto tóxico. Possui características borrachosas de um tecido compatível macio, é um polímero duro e biodegradável com boas propriedades mecânicas e tem-se mostrado biocompatível em diferentes tipos de células. Após diversos estudos realizados com o poli(ϵ -caprolactona) incluindo os testes *in vitro* e *in vivo* a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso deste material para fins médicos e farmacêuticos(Khor, 2002). A tabela 1 apresenta algumas aplicações do PCL.

Tabela 1- Aplicações de *scaffolds* de PCL com diferentes tamanhos de poros

Tamanho poro	Pesquisa	Referencia
5 µm	Neovascularização	Brauker JH, 1995
5-15 µm	Crescimento de fibroblastos	Klawitter JJ, 1971
20 µm	Crescimento hepatocito	Yang S, 2001
20-125 µm	Regeneração pele	Yannas IV, 1989
70-120 µm	Crescimento condrocidos	Griffon DJ, 2006
40-150 µm	Ligação fibroblastos	Salem AK, 2002
45-15 µm	Regeneração de tecidos	Kimm SS, 1988
60-150 µm	Vascularização muscular de tecidos moles	Zeltinger J, 2001
100-300 µm	Adesão e crescimento celular de músculos da bexiga	Danielsson C, 2006
100-400 µm	Regeneração óssea	Robinson BP, 1995; Zardiackas LD, 2001; Bobyn JD, 1999; Hulbert SF, 1970
200-350 µm	Osteocondução	Whang K, 1999

Adaptado de Oh *et al*, 2007

Scaffolds cilíndricos do poli (ϵ -caprolactona) (PCL) com aumento gradual dos poros na direção longitudinal foram fabricados por Oh *et al* para a investigação do tamanho dos poros e interação do tecido sobre a célula. Os *scaffolds* mostraram aumento gradual no tamanho dos poros de (88 a 405µm) e porosidade de (88 a 94%) ao longo do eixo cilíndrico (Oh *et al*, 2007).

Os *scaffolds* foram examinados *in vitro* usando diferentes tipos de células (condrócitos, osteoblastos e fibroblastos) e *in vivo*. Tamanhos de poros com 380-405 µm mostraram um melhor crescimento de condrócitos e osteoblastos, enquanto que tamanhos de poros com 186-200µm apresentaram melhor crescimento de fibroblastos. *Scaffolds* com (290 - 310µm) mostraram melhor crescimento na formação óssea do que em outros tamanhos de poros (Oh *et al*, 2007).

2.5 Materiais Compósitos - Conceitos Básicos

Os materiais de aplicação estrutural podem ser divididos em quatro categorias básicas: metais, cerâmicos, polímeros e compósitos, sendo estes últimos obtidos a partir da combinação entre as duas ou três demais categorias. A importância relativa destes quatro grupos de materiais estruturais do ponto de vista histórico mostra claramente a crescente utilização dos materiais poliméricos, cerâmicos e dos compósitos, acompanhados pela queda na importância relativa dos materiais metálicos (Zavaglia, 1996).

Neste caso a incorporação de fibras ou partículas de elevada resistência ao impacto a uma matriz polimérica termofixa ou termoplástica eleva sua tenacidade à fratura. Exemplos de materiais deste tipo são as resinas epoxi reforçadas com fibra de vidro ou carbono (Zavaglia, 1996).

2.6 Biomateriais Cerâmicos

Os fosfatos de cálcio possuem propriedades semelhantes aos tecidos duros. A compressão de estiramento das cerâmicas densas ou porosas suportam o crescimento interno do osso com suas características químicas controladas, isto é, materiais bioativos e biodegradáveis. Com o tempo esses materiais devem ser reabsorvidos totalmente pelo corpo e substituídos pelo tecido. (Hench, 1993).

A função de um biomaterial biodegradável é apenas para servir como um *scaffold* (suporte) para preencher o espaço, permitindo a infiltração e substituição do tecido, favorecendo a formação de um novo tecido. A vantagem do uso de cerâmicas reabsorvíveis sobre o enxerto ósseo autólogo é como substituto temporário, controlando as variações do tamanho, e eliminando uma segunda cirurgia. Entretanto, as desvantagens deste tipo de biocerâmica é a redução da resistência mecânica, que ocorre durante o processo de reabsorção. Portanto o *design* mecânico deve ser seriamente calculado para prevenir a fratura de cerâmicas reabsorvíveis durante o estágio de cura da interface.

Os *scaffolds* são suportes que favorecem o crescimento ósseo facilitando a integração do implante com o tecido ósseo. A taxa de reabsorção e a razão de formação do osso reduz o esforço sobre o implante durante a cura dos tecidos

2.7 Cerâmicas de β -Fosfato Tricalcico

A razão de biodegradação do TCP tem-se mostrado maior que a HA devido a sua estrutura cristalina, enquanto que o mecanismo de biodegradação permanece intacto. Algumas pesquisas sugerem que quando o TCP é colocado em meio ácido dissolve *in situ*. Pesquisadores também notaram células osteoblasticas nas superfícies implantadas com TCP e favorecem a quebra celular por macrofases. Após a reabsorção do material um novo osso preenche a área ocupada pelo implante do TCP. Enquanto muitos implantes de TCP são reabsorvidos dentro dos primeiros meses, alguns traços dos materiais no local dos defeitos permanecem por períodos extensos, às vezes por anos em humanos. O material que não é reabsorvido incorpora-se dentro da estrutura do novo osso. Cerâmicas de β -TCP reabsorvíveis possuem uma elevada atividade de remodelação do osso em relação à hidroxiapatita, dependendo da sua razão Ca/P, e da sua formação óssea irregular ou plana na superfície da cerâmica. Dados sobre biodegradabilidade de diferentes tipos de cerâmicas de fosfato de cálcio densas ou porosas são conflitantes. As condições de fabricação, estrutura cristalina, razão Ca/P, impurezas, degradação e o tipo de porosidade ainda não são claramente definidos. As propriedades mecânicas das biocerâmicas de fosfato de cálcio são limitadas (Hench, 1993).

Para conseguir um estiramento alto necessário para implantes, ligas metálicas podem ser recobertas com partículas de fosfato de cálcio. Coberturas sobre metais ou outros substratos (cerâmicas, polímeros, compósitos) podem ser aplicadas por uma variedade métodos incluindo, banho de imersão, plasma spray, deposição por eletroforese, revestimento de partículas, pressão isostática a quente, implantação iônica, entre outros. As variações das propriedades dos materiais revestidos com fosfato de cálcio afetam o mecanismo da ligação química e a razão da formação óssea.

Variações na razão de Ca/P (2.0-1.5) de fosfato tricálcico, hidroxiapatita, α -TCP e β -TCP pois, possuem diferentes biodegradabilidade e diferenças no contato ósseo. A composição de

cargas de flúor para hidroxiapatita ou magnésio para β -TCP influencia na estabilidade da cobertura. A biodegradação do fosfato de cálcio e o aumento do tecido ósseo interno requerem conhecimentos das ligações das características da cobertura de fosfato de cálcio e do processo de cobertura dele mesmo (Hench, 1993).

Dados sobre a biodegradabilidade das cerâmicas de fosfato de cálcio são contraditórios. Muitos autores reportaram que o β -TCP possui uma degradação rápida, enquanto outros reportaram sobre a sua baixa reabsorção. A composição química de determinadas cerâmicas ou materiais de fosfato de cálcio com $1 < \text{Ca/P} > 2$ são degradáveis, segundo Koh que investigou esta questão (Koh, 2004)

Uma série de estrutura cristalina de hidroxiapatita e β -TCP foram investigados, com microscopia em torno de 2 a 55% com uma macroporosidade de 0-30%. Esses experimentos mostraram que a composição de Ca/P e as cargas de flúor ou magnésio estão relacionados com a micro/macroestrutura, fatores importantes associados com a biodegradação. Cerâmicas com a composição de Ca/P 1.67 são mais estáveis. O uso de cerâmicas porosas como substituto ósseo e *scaffolds* para engenharia tecidual óssea é um assunto muito investigado. Parâmetros como a porosidade, tamanho dos poros, e interconectividade têm sido mostradas através da influencia da osteogênese, sendo necessário aperfeiçoar a arquitetura dos *scaffolds* para aplicações específicas (Koh, 2004).

No desenvolvimento de novos implantes e preenchimentos ósseos, os fosfatos de cálcio possuem um perfil biológico altamente atrativo, pois apresentam composição química muito semelhante à fase mineral dos ossos e dentes. Podem, então, participar ativamente do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica apresentando grande habilidade em formar ligações com o tecido hospedeiro sem, no entanto, apresentar toxicidade local ou sistêmica, resposta inflamatória ao implante e formação de um tecido fibroso envoltório. Sendo assim, os CaPs, conseguem fornecer um grau de integridade estrutural ao implante a fim de mantê-lo no lugar e intacto até que o novo osso cresça. Além disso, estimulam o crescimento de um novo osso e são solúveis, de maneira que podem ser reabsorvidos pelo organismo permitindo que o novo osso substitua o implante (Orii, 2005).

O fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, (TCP) que pode ser encontrado em quatro formas distintas estáveis em diferentes intervalos de temperatura: o α -TCP estável entre 1120°C e 1470°C, porém metaestável em temperaturas abaixo de 1120°C; o α' -TCP estável apenas acima de 1470°C; o β -TCP estável abaixo de 1120°C e o β' -TCP estável apenas com elevadas pressões. Sabe-se que nenhum desses compostos é formado nos sistemas biológicos, porém a relevância destes CaPs está no fato de que o β -TCP facilmente hidrolisa a octacálcio fosfato (OCP), $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e o α -TCP a hidroxiapatita deficiente de cálcio (CDHA, $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$), materiais que são facilmente encontrados em tecidos biológicos mineralizados. No pH do organismo, o β -fosfato tricálcico (TCP), é muito solúvel e libera íons de cálcio e de fosfato que podem promover a osteogênese. De fato, íons cálcio possuem alguns mecanismos, como precursores da diferenciação das células osteogênicas para células ósseas. A saturação dos íons encoraja a precipitação de micro cristais de fosfato de cálcio, facilitando a nucleação para a osteogênese. O TCP é considerado altamente bioativo (Hench, 1993).

Fosfatos de cálcio sintético para substituto ósseo são classificados como hidroxiapatita (HA) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, fosfato tricálcico (β -TCP), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, fosfato de cálcio bifásico (BCP) para misturas de HA e β -TCP com deficiência de cálcio. Fosfato de cálcio possui diferentes solubilidades *in vitro* e uma velocidade de dissolução em solução tampão ácida, o que pode refletir na comparação de dissolução ou na degradação *in vitro* (LeGeros, 1991; LeGeros e LeGeros, 1996).

Os fosfatos de cálcio degradam da seguinte maneira: $\text{ACP} \gg \alpha\text{-TCP} \gg \beta\text{-TCP} \gg \text{CDA} \gg \text{HÁ}$ (Ratner e colaboradores, 1996 ; Kawachi e colaboradores, 2000). Os fosfatos de cálcio são biomateriais disponíveis em diferentes formas físicas (partículas ou blocos; densas ou porosas). Uma das suas principais características é a porosidade ideal para uma biocerâmica porosa semelhante à esponja do osso. Macroporosidade é introduzido no material, através de substâncias voláteis ou porosas (naftaleno, açúcar, peróxido de hidrogênio, polímero, fibras, etc) antes da sinterização em altas temperaturas (Daculsi *et al*, 1990; Daculsi *et al*, 1990c; Daculsi *et al*, 1992a ; Daculsi *et al*, 1998). A macroporosidade é formada quando a matéria volátil é liberada e enquanto que a microporosidade é o resultado do processo de sinterização, onde a temperatura e tempo são parâmetros críticos.

3 METODOLOGIAS EMPREGADAS NA CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DOS BIOMATERIAIS

3.1 Introdução

Diversas técnicas são empregadas para a caracterização e avaliação do desempenho dos diversos materiais desenvolvidos. As características químicas podem ser analisadas por (DRX), espectroscopia de infravermelho, a distribuição do tamanho das cadeias poliméricas pode ser analisada por GPC, a morfologia de superfície das amostras pode ser analisada por microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura as características térmicas podem ser analisadas por TGA, DSC e ensaios mecânicos de tração.

A viabilidade celular do biomaterial pode ser analisada por métodos diretos e indiretos, pela absorção do sal do MTT ou azul de alamar nas mitocôndrias das células e os de ensaios de degradação *in vitro* podem ser analisados através da degradação hidrolítica ou enzimática.

Degradação hidrolítica (fase lenta) em relação às degradações enzimáticas pode ser caracterizada pela perda de massa, ocasionando a diminuição da massa molar ponderal média, e pela perda das propriedades mecânicas e de tração (Li *et al* , 1999).

Os mecanismos estudados por (Ratner *et al*, 1996) que influenciam na degradação do PCL como morfologia, estrutura da superfície, condições de cristalização, espessura do filme e as condições de degradação podem afetar a biodegradabilidade e estabilidade do filme.

Diversas metodologias podem ser empregadas para a caracterização dos biomateriais, onde algumas técnicas foram utilizadas neste trabalho e serão destacadas.

3.2 Análise de difração de raios X

A análise de difração por raios X permite obter informações detalhadas sobre dimensões, presença de defeitos e orientação da rede cristalina. Na análise de difração de raios X, que corresponde a uma das principais técnicas de caracterização para diversos materiais cristalinos, suas aplicações se estendem em diversos campos de conhecimentos.

O fóton dos raios X após a colisão com os elétrons muda sua trajetória, mantendo a mesma fase e energia do fóton incidente. Fisicamente, podemos dizer que a onda eletromagnética é absorvida pelo elétron e reemitida; portanto, cada elétron atua como centro de emissão de raios X. Os raios são espalhados sem perda de energia pelos elétrons de um átomo por dispersão ou espalhamento coerente. Considerando a estrutura cristalina de dois ou mais planos, para que ocorra a difração de raios X, dependendo da diferença e do caminho percorrido pelos raios X e do comprimento de onda da radiação incidente.

Esta condição é expressa pela lei de Bragg, ou seja, $n \lambda = 2 d \sin \theta$ na figura 5, onde λ corresponde ao comprimento de onda da radiação incidente, “ n ” a um número inteiro (ordem de difração), “ d ” à distância interplanetar para o conjunto de planos hkl (índice de Miller) da estrutura cristalina e θ ao ângulo de incidência dos raios X. A equação abaixo mostra a lei de Bragg.

Equação de Lei de Bragg:

$$n \lambda = 2 d \sin \theta$$

equação 1

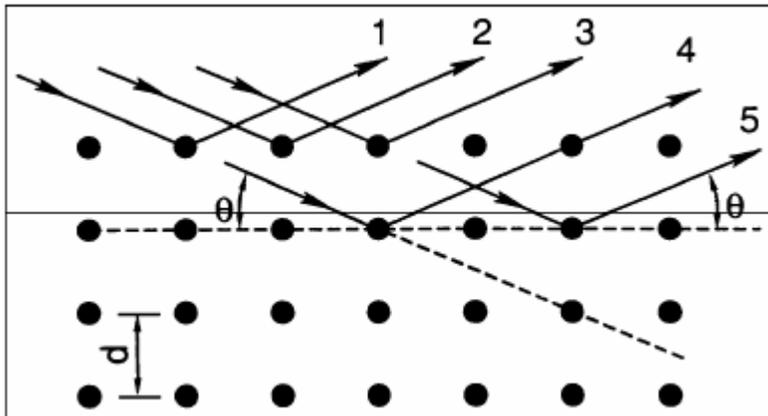


Figura 5 - Difração de raios X e a Lei de Bragg (Amigó, 1981)

3.3 Análise por microscopia

3.3.1 Microscopia óptica (MO)

Polímeros semicristalinos apresentam dois tipos fundamentais de formação cristalina: a lamelar, feita pela sobreposição de placas, e a formação esferulítica, caracterizada por glóbulos onde as cadeias estão dispostas radialmente. As regiões cristalinas esferulíticas podem ser observadas pela técnica de microscopia óptica com luz polarizada. Os parâmetros físicos influenciam nas condições de velocidade de cristalização e temperatura ambiente.

O processo de evaporação e solvente (Hutmacher, 2000; 2001; Dalton, 2009; Tsuji *et al.*, 2000) é suficientemente lento para a formação de esferulitos. Inicialmente ocorre a prorrogação da região amorfa e na seqüência dos ângulos lamelares alinhados com a direção da tensão aplicada.

3.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um equipamento que permite a obtenção e informações sobre a morfologia. A grande vantagem do microscópio eletrônico de varredura

em relação ao microscópio ótico é sua alta resolução, da ordem de 2 a 5nm, enquanto que no microscópio ótico é de 0,5 μ m. Os elétrons são acelerados na coluna através de duas ou três lentes eletromagnéticas com tensões de 1 a 30kV. Estas lentes obrigam um feixe de elétrons combinado (5 a 200 Å) a atingir a superfície da amostra. A área ou o volume a ser analisada é irradiado por um fino feixe de elétrons. A interação do feixe de elétrons com a amostra causa a geração de sinais que podem ser utilizados para produzir uma imagem ou realizar análise de composição química.

3.4 Análise térmica

A análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica da análise térmica pela qual a variação da massa da amostra (perda ou ganho) é determinada em função da temperatura e ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura. Essa técnica possibilita conhecer as alterações que o aquecimento pode provocar na massa das substâncias, permitindo estabelecer a faixa de temperatura em que elas adquirem composições químicas, fixas, definida e constante, a temperatura em que começa a se decompor e acompanhar o andamento de reações de desidratação, oxidação, combustão, decomposição.

A análise dinâmico-mecânico (DMA), tem sido amplamente usada como uma técnica de caracterização de polímeros através da detecção dos processos de relaxação, apresentando uma sensibilidade muito superior quando comparada às técnicas convencionais de análise térmica (DSC). O estudo dos movimentos moleculares dos segmentos da cadeia polimérica principal e o comportamento do material. E de vários fatores, tais como, a composição, a flexibilidade das cadeias, a massa molar do polímero, a presença de plastificantes, o grau de reticulação e de cristalinidade.

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) é uma técnica termoanalítica na qual a diferença de calor entre uma amostra e uma referência é medida como uma função da temperatura. A amostra e a referência são mantidas aproximadamente à mesma temperatura através de um experimento. A calorimetria diferencial de varredura pode ser utilizada para medir

várias propriedades características de uma amostra. Usando esta técnica é possível caracterizar processos como a fusão e a cristalização bem como temperaturas de transições vítreas (T_g). A DSC pode ser também utilizada para estudar a oxidação, bem como outras reações químicas.

3.5 Ensaio de resistência mecânica à tração

Todos os materiais poliméricos exibem uma faixa de diferentes comportamentos mecânicos, comportando-se como materiais frágeis a baixas temperaturas, passando pelos comportamentos plástico e viscoelástico, até o plástico e, finalmente, viscoso em temperaturas elevadas (Zavaglia, 1996).

Os metais e os cerâmicos também apresentam diferentes comportamentos mecânicos. Entretanto, como seus pontos de fusão são elevados, a variação de suas características em temperaturas próximas a ambiente é irrelevante. Por outro lado, em temperaturas entre (-20 e 300 °C), os materiais poliméricos podem atravessar toda a faixa de comportamento mecânico mencionada anteriormente, o que resulta em variações de seu módulo de Young e resistência mecânica de até 1000 vezes. Dessa forma, enquanto é possível considerar constantes a rigidez e a resistência mecânica de materiais metálicos e cerâmicos para fins de projeto, o mesmo não é válido para os polímeros. O comportamento mecânico de um polímero é função de sua massa molar e da temperatura, ou mais precisamente, o quão próximo de sua temperatura de transição vítrea ele se encontra. Cada tipo de comportamento mecânico cobre certa faixa de temperatura normalizada, definida como a razão entre a temperatura na qual o material se encontra e sua temperatura de transição vítrea (Zavaglia, 1996).

3.6 Avaliação de citotoxicidade e degradação hidrolítica

3.6.1 Teste de viabilidade celular pela absorção do MTT

A análise de biocompatibilidade do material produzido foi realizada por meio de teste *in vitro* de citotoxicidade, cuja Norma Técnica reguladora é a ISO (*International Organization of Standardization*) 10993-5: *Tests for Cytotoxicity – In Vitro Methods*. De acordo com esta Norma, foi selecionado o teste de viabilidade celular pela metabolização do MTT como o mais apropriado (Costa *et al*, 2003).

O princípio deste método consiste na absorção do sal MTT brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio pelas células, sendo reduzido no interior da mitocôndria a um produto chamado formazana. Este produto, acumulado dentro da célula, é extraído através da adição de um solvente apropriado (Mosmann, 1983). Esses testes são qualitativos, sendo também necessários alguns experimentos quantitativos para realmente comprovar com certeza da toxicidade do material.

O ensaio detecta as células vivas e o sinal é dependente do grau de ativação dessas células. Esse método pode, portanto, ser usado para medir a citotoxicidade, proliferação ou a ativação celular (Mosmann, 1983).

A avaliação da biocompatibilidade de um implante depende de vários fatores, especialmente do tipo de tecido que será exposto o material e a duração da exposição. A seleção dos testes depende do uso final do biomaterial. E em geral, a avaliação da biocompatibilidade de um biomaterial tem início com testes preliminares de citotoxicidade, empregando testes *in vitro*. A citotoxicidade de um biomaterial é definida por sua capacidade de liberar substâncias que possam causar danos ou morte celular, direta ou indiretamente, através da inibição de vias metabólicas (Oréfica *et al*, 2006).

3.6.2 Atividade fosfatase alcalina (ALP)

A atividade fosfatase alcalina ALP é hidrolisada por uma série de substratos fosfomonoésteres em pH alcalino além de atuar em reações de transfosforilação (Donachi *et al*, 1990; Blasco *et al*, 1993). A fosfatase alcalina é uma enzima que desempenha um importante e

crítico papel nos processos biológicos. É uma enzima participante do processo detoxificação, metabolismo e biossíntese de macromoléculas energéticas destinadas a diferentes e essenciais funções da célula. Qualquer interferência na atividade dessa enzima resulta no equilíbrio metabólico.

Esta enzima está presente em todos os tecidos e em altas concentrações de alguns órgãos como o osso e o fígado. A enzima fosfatase alcalina hidrolisa 4-NPP-(4-p-nitrofenilfosfato) formando 4-nitrofenol e fosfato orgânico em condições alcalinas. O 4-Nitrofenol detectado no espectrofotômetro a 405 nm fornecem a atividade da fosfatase alcalina da amostra.

3.6.3 Estudo da degradação hidrolítica em solução tampão fosfato (PBS)

O estudo de degradação hidrolítica em solução tampão fosfato (pH=7,4 – 37°C) 0,1 mol/L, realizado no grupo das membranas densas de PCL e porosas e compósitos densos PCL/ β -TCP e porosos preparados com o solvente clorofórmio e lixiviação de sal.

As membranas foram secas em estufa a 35°C por 17 horas e após esse processo as amostras foram acondicionadas em tubos de ensaio contendo 10 ml da solução tampão fosfato e mantidas em estufa a $37 \pm 0,5$ °C por um período de 17 meses. A degradação *in vitro* das amostras foram acompanhadas através dos resultados obtidos por MEV e pela técnica de DSC, com o objetivo de avaliar a influência no processo de degradação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo é apresentada a metodologia utilizada para o desenvolvimento deste trabalho, que compreende as etapas de síntese e caracterização do pó de β -TCP, preparo das membranas densas e porosas de PCL e compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP. Esta metodologia esta ilustrada nas figuras 6 e 7.

4.1 Materiais

Para a obtenção das membranas foi utilizado o polímero poli(ϵ -caprolatona), de massa molecular média (Mn) 80.000 g/mol, fornecido pela Sigma-Aldrich (EUA). O fosfato de cálcio dibásico anidro (Mn) 136,06 g/mol e o carbonato de cálcio (Mn) 100,09 g/mol foram fornecidos pela Labsynth (Diadema,SP) e utilizados na preparação do β -fosfato tricalcico.

Foram utilizados dois tipos de solventes: diclorometano P.A (Labsynth,Diadema,SP) (CH_2Cl_2) e o clorofórmio P.A de concentração 99,99% (J.T.Baker, EUA) (CHCl_3) e para a criação dos poros das membranas foi utilizado cloreto de sódio (NaCl) Labsynth (Diadema S.P)

O diclorometano é um solvente polar e um hidrocarboneto clorado; apresenta alta volatilidade e possui um aroma adocicado. Dos compostos organoclorados esse solvente é o menos perigoso e é usado também como decapante e desgordurante e na indústria de alimentos para descafeinar o café e para preparar extratos de lúpulo e outros aromas.

O clorofórmio é um anestésico eficiente um líquido incolor e volátil que apresenta um odor etéreo agradável. É miscível com os principais solventes orgânicos. Sua principal aplicação atualmente é como solvente. Também é usado na produção de outros compostos.

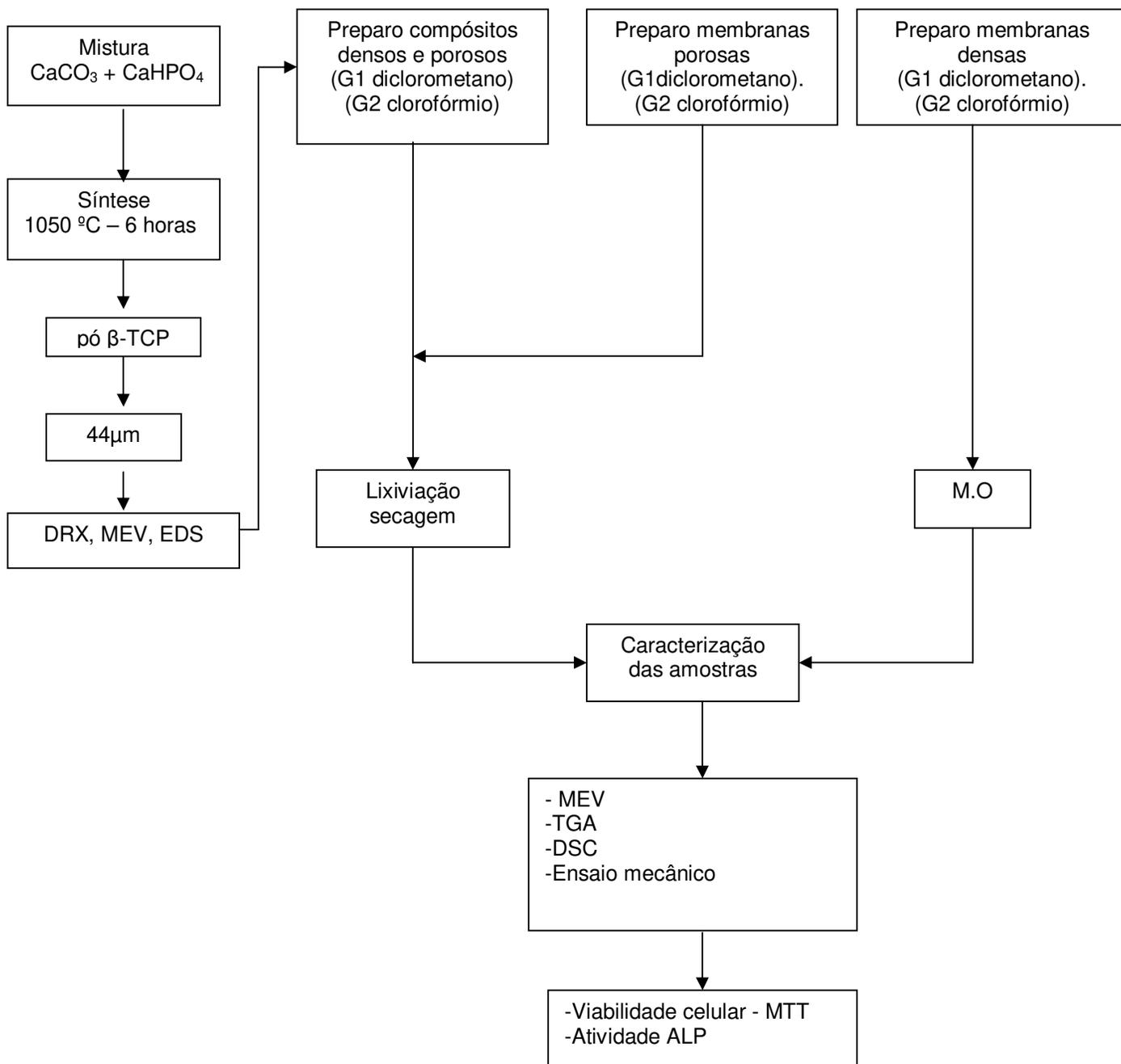


Figura 6 - Fluxograma com as etapas do trabalho

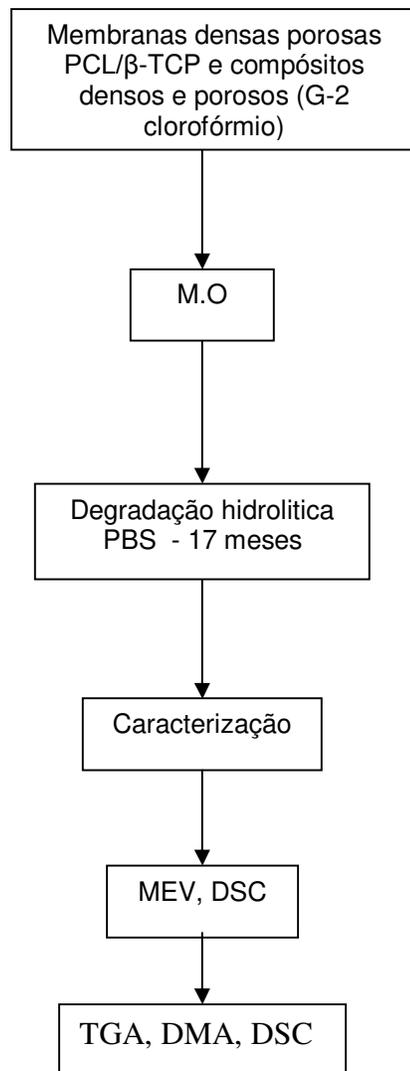


Figura 7 - Fluxograma da degradação hidrolítica em PBS do grupo das membranas utilizando solvente clorofórmio

4.2 Métodos

4.2.1 Síntese e caracterização do β -fosfato tricálcico - β -TCP

O β -fosfato tricálcico foi sintetizado utilizando o processo baseado na mistura de dois sólidos (Yang ; Wang; 1998).

Foram utilizados de carbonato de cálcio (CaCO_3 , Labsynth MM 100,09 g/mol) e fosfato de cálcio bibásico (CaHPO_4 , Labsynth MM 136,06 g/mol) para obtenção do pó β -TCP. Para tanto os pós foram vigorosamente agitados para garantir a homogeneidade da mistura e em seguida calcinados a 1050 °C em mufla por 6 horas com temperatura controlada. A tabela 2 mostra dados das quantidades de reagentes utilizados.

Tabela 2- Quantidade em massa de reagentes necessária para a produção de uma dada massa de β -TCP

$m(\text{CaCO}_3)$ g	$m(\text{CaHPO}_4)$ g	$m(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$ g
50,05	136,06	155,09
25,02	68,03	77,55
12,51	34,01	38,77

O material obtido foi posteriormente moído, peneirado e separado granulométricamente aproximadamente 44 μm . O pó foi submetido à caracterização por difração de raios x (DRX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4.2.2 Caracterizações do β - fosfato tricalcico - β -TCP

a) Difração de raios X

Os ensaios de difração por raios X foram realizados no equipamento RIGAKU, modelo DMAX 2200 da Co, que utiliza tubo de cobre, radiação Cu-K α , filtro de Ni, 40mA. O intervalo angular utilizado (2θ) foi de 4 a 40°, com velocidade de 3°min⁻¹.

b) Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a análise morfológica do pó fosfato de cálcio foram utilizado partículas com aproximadamente 44 μ m. As amostras foram coladas sobre suportes metálicos, recobertas com ouro utilizando o equipamento Balzers, modelo SCD 050, o microscópio utilizado foi o JSM 6360-LV (JEOL) a uma tensão de 20 kV

4.3 Obtenção das membranas densas de PCL puro e porosas compósitos de PCL/ β -TCP – densas e porosas

Para a obtenção das membranas densas de PCL puro, em um erlenmeyer 1,5g gramas de poli (ϵ -caprolactona) (PCL - Sigma – Aldrich – MM = 80.000 g/mol) foram adicionados 15 ml de solvente especificado (diclorometano, CH₂Cl₂ - Labsynth ou clorofórmio, CHCl₃ - J. T. Baker). A solução foi mantida sob agitação com o uso de agitador magnético até completa dissolução. Concluída a homogeneização, toda a mistura foi vertida em placa de petri de 15 cm de diâmetro. As membranas puras de PCL e dos compósitos de PCL/ β -TCP densas foram obtidas com a mesma metodologia descrita acima, porém com a adição em peso de 5% de β -TCP.

Para obtenção das membranas porosas foi adicionada à solução preparada para as membranas densas de PCL puro 50% em peso de cloreto de sódio (NaCl – Labsynth). Em seguida, após a

evaporação de todo o solvente, as membranas porosas e os compósitos de PCL- β -TCP-sal foram imersos em um recipiente com água destilada sob agitação por 72 horas para a remoção do sal, um processo de lixiviação que visa criação de porosidades com a retirada dos sal. O tamanho das partículas de NaCl variaram entre 210-500 μm , de acordo com o compósito produzido. Em todos os casos foram obtidos membranas com dois diferentes solventes - diclorometano e o clorofórmio. Os compósitos porosos foram colocados em papel para drenagem da água e, em seguida, colocados em estufa a 35 °C com circulação de ar por 17 horas para evaporar o resíduo da água.

Os compósitos foram obtidos na forma de membranas densas e porosas com aproximadamente 0,960 μm de espessura pelo método de evaporação do solvente ou *casting* e lixiviação do sal. O método consiste na dissolução do polímero em solvente apropriado e posterior evaporação do mesmo (Barbanti, 2004). Para efeito de comparação também foram obtidas membranas de PCL puro na forma densa e porosa.

Um resumo das composições das diferentes membranas obtidas é apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 – Amostras preparadas com diferentes composições (membranas densas e porosas de PCL - compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP), utilizando os solventes diclorometano e clorofórmio.

Sigla	Composição membranas	CH ₂ Cl ₂	CHCl ₃	β -TCP	NaCl 50%
D-PCL-1	Densa PCL puro	x			
D- PCL/ β -TCP-1	Densa PCL/ β -TCP	x		x	
P-PCL-1	Porosa PCL puro	x			x
P- PCL/ β -TCP-1	Porosa PCL/ β -TCP	x		x	x
D-PCL-2	Densa PCL puro		x		
D- PCL/ β -TCP-2	Densa PCL/ β -TCP		x	x	
P-PCL-2	Porosa PCL puro		x		x
P- PCL/ β -TCP-2	Porosa PCL/ β -TCP		x	x	x

D = membrana densa, P = membrana porosa, 1 = obtidas com CH₂Cl₂, 2 = obtidas com CHCl₃.

Todas as membranas densas e porosas de PCL e compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP foram armazenadas em dessecador a vácuo para caracterização morfológica por microscopia ótica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), e as análises termogravimétrica (TGA), calorimétrica diferencial de varredura (DSC) e ensaios de resistência mecânica a tração, citotoxicidade, atividade de fosfatase alcalina (ALP) e degradação *in vitro*.

4.4 Métodos de caracterização das membranas densas de PCL utilizando solvente diclorometano e clorofórmio

a) Microscopia ótica (MO)

Para a análise de microscopia ótica, foi utilizado o estereoscópico Olympus SZ 40 - modelo GX51 - com sistema automático de fotografia. Para a obtenção das imagens utilizou-se luz polarizada e a opção por *DIC*, *Differential Interference Contrast*, um dispositivo que ressalta as diferenças topográficas dos compósitos.

b) Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a análise morfológica das superfícies e fratura das membranas puras e porosas e dos compósitos densos e porosos por microscopia eletrônica de varredura, as amostras foram metalizadas com ouro utilizando o equipamento Balzers, modelo SCD 050, e o microscópio utilizado foi o JSM 6360-LV (JEOL) a uma tensão de 20 kV. Foram investigadas as superfícies dos compósitos em contato com o ar, e a fratura das amostras foi obtida em nitrogênio líquido, nas mesmas condições acima.

4.5 Caracterização térmica

4.5.1 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) das amostras foi conduzida empregando-se um equipamento TGA 2950 HR. As amostras das membranas densas e porosas de PCL e dos compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP foram aquecidas na faixa de 25°C a 800°C (taxa de aquecimento 10°C/min.) em atmosfera de argônio (100 mL.min⁻¹). As massas das amostras variaram cerca de 10 mg em uma termobalança. Este método descreve os dados de uma única etapa de degradação no estado sólido em termos da cinética da reação.

4.5.2 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As análises de DSC das membranas densas e porosas de PCL e compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP foram determinadas utilizando o equipamento de DSC modelo (STA 409C da Netzsch – Gerätebau GmbH Thermal Analysis). As amostras foram pesadas em torno de 10mg e transferidas para uma panela de alumínio e fechadas. O aquecimento inicial da amostra foi de 25 °C a 125°C e em seguida foi resfriada a uma temperatura de -150°C para que se pudessem desconsiderar as influências térmicas decorrentes da etapa de preparação das amostras e a seguir foi aquecida novamente a 125°C. Todas as etapas foram realizadas a uma taxa de 10°C/min. As etapas das corridas foram realizadas sob atmosfera de N₂ ultrapuro e ultra-seco, sob um fluxo constante de 50ml/min.

Através das curvas de DSC foram obtidos os valores da temperatura de transição vítrea (T_g) e a temperatura fusão (T_f)

4.6 Ensaios de resistência mecânica à tração

Os ensaios de resistência mecânica a tração das membranas densas e porosas de PCL e compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP, foram realizadas em um equipamento de Tração

Tinius Olsen. A dimensão das amostras de (10 x 1x 0,1cm), fixadas por garras a uma distância específica de 7cm e alongadas a uma taxa de deformação e velocidade constante de 50mm/min.

As amostras apresentaram-se extremamente finas e frágeis necessitando de uma adequação para a realização dos ensaios, que foram avaliados pela norma ASTM D882. Foram utilizados oito corpos de prova para cada composição das membranas analisadas. Os gráficos mostram os comportamentos mecânicos das membranas e compósitos bem como seus valores de tensão no limite elástico e plástico e a tensão máxima na ruptura.

4.7 Avaliação preliminar de biocompatibilidade

4.7.1 Cultura das células

As linhagens celulares (MG63) de osteoblastos de osteosarcoma humano - ATCC, foram cultivadas em meio de cultura (α -MEM), meio mínimo essencial com 10% de soro fetal bovino (SBF) até a sexta passagem.

As linhagens celulares hMSC (células-tronco mesenquimais de medula humana –ATCC), foram cultivadas em meio específico hMSCGM com 10% de SBF (Sigma) em ambos os meios de cultura foram adicionados 0,5% de solução contendo estreptomicina 100 mcg/ml e penicilina 100U/ml.

As células MG63 foram cultivadas em garrafas de poliestireno de 75 cm² em estufa a 37°C e 5% de CO₂ e quando a monocamada atingiu 90%, foi lavada com 3% de PBL e com 1,5 ml de tripsina bovina 0,2% (ATV). As células foram semeadas em uma concentração de 10⁶ células/poços de placas de cultura de 24 poços.

As células hMSC foram cultivadas em garrafas, de maneira semelhante ao procedimento anterior, porém com o meio específico (hMSCGM e 10 % SBF).

Após esse procedimento, as células foram semeadas em placas na concentração de 2x10³ células/ml. Para diferenciação das hMSC em osteoblastos, o meio de cultura foi trocado pelo kit

promotor de diferenciação osteogênico (dexametasona- 10^{-8} M, ácido ascórbico – 30 µg/ml e glicerofosfato – 10mM) após 24h de incubação.

4.7.2 Avaliação preliminar da viabilidade celular através da absorção do (MTT)

A análise de biocompatibilidade do material produzido foi realizada por meio de teste *in vitro* de citotoxicidade, cuja Norma Técnica reguladora é a ISO (*International Organization of Standardization*) 10993-5: *Tests for Cytotoxicity – In Vitro Methods*.

As células foram semeadas numa densidade de 10^4 células por poço em placas de poliestireno de 24 orifícios e incubadas em estufa a 37 °C e 5 % de CO₂.

Após 24 horas, os meios das placas foram trocados e as amostras dos materiais colocadas em contato com a monocamada celular. Como controle positivo foi utilizada uma solução de fenol 10% em meio de cultura e soro. As células com meio de cultura fresco foram avaliadas como controle negativo.

As células foram incubadas por 72 h sem renovação do meio de cultura e soro fetal bovino (Kim *et al.*, 2003). Após esse período, foi aplicado às placas 1 ml da solução de (0,5 mg/mL) de MTT, diluído em meio α -MEM (meio mínimo essencial) e 10% de soro. As células foram incubadas por 4 h, em estufa 37°C em uma atmosfera contendo 5% de CO₂. Em seguida após o tempo de incubação o meio de cultura foi aspirado e a monocamada celular dissolvida em 500 µl Dimetil Sulfoxido (DMSO), e o produto corado (formazano). A leitura da solução de cada placa foi determinada em espectrofotometro leitor de ELISA a 600nm (SLT Labinstruments – Áustria). A densidade óptica (DO) foi utilizada para cálculo das porcentagens de viabilidade, que foram analisadas versus os diferentes materiais incubados.

4.7.3 Atividade fosfatase alcalina (ALP)

A atividade da fosfatase alcalina (ALP) foi quantificada com fosfatase alcalina (Sigma). As membranas densas e porosas, os compósitos porosos e o controle negativo foram submetidos às condições para diferenciação osteogênica. A atividade da fosfatase alcalina foi avaliada no

intervalo de 3,7 e 10 dias com amostras em triplicata. As células foram lavadas com PBS e incubadas com 1% de (Triton X) por 30 minutos à 37°C. A suspensão de cada poço da placa de cultura foi homogeneizada e foram adicionados 200µL de substrato de ALP (p-nitrofenil fosfato) por 1 hora a 37°C. A reação foi interrompida usando 10µL de hidróxido de sódio (0,02M), e a absorbância final foi lida em um espectrofotômetro a 540nm (Bio Rad Laboratories, Hercules,CA,USA)

4.8 Análise de biodegradação

4.8.1 Degradação *in vitro* em tampão fosfato (PBS)

O estudo “in vitro” da degradação hidrolítica foi realizado em solução tampão fosfato (pH=7,4) com o grupo 2 das membranas e dos compósitos preparados com o solvente clorofórmio. As amostras na forma de discos com diâmetro de 13mm foram lavadas com etanol e água destilada e acondicionadas em tubos de ensaio contendo 10 ml da solução de tampão fosfato (PBS) 0,1 mol/L, pH 7,4 e mantidas em estufa a 37 °C ± 0,5 °C (Kaushiva *et al*, 2007). A solução tampão fosfato foi trocada periodicamente, por um período de 17 meses de incubação, após esse período as amostras foram retiradas, lavadas com água destilada e secas em estufa com circulação de ar a 35°C por 17horas. As amostras foram caracterizadas pelas técnicas de MEV e DSC.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Síntese e caracterização do β -fosfato tricálcico (β -TCP)

O β -fosfato tricálcico (β -TCP) foi sintetizado segundo o método descrito no capítulo 4. Foram realizadas as seguintes análises com esse material: difração de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva (EDS).

5.1.1 Ensaio de difração dos raios X

Para obter bons resultados foram utilizados os reagentes de marcas confiáveis. A análise por difração de raios X permitiu a identificação da fase do β -fosfato tricalcico produzido, garantindo que o produto formado era realmente o β -TCP como mostra a figura 8. O β -TCP apresentou uma estrutura cristalina e porosa. Apesar de a porosidade diminuir a resistência mecânica do material, esta estrutura pode permitir uma futura penetração do tecido ósseo. A análise de difração de raios X permite obter informações detalhadas sobre dimensões, presença de defeitos e orientação da rede cristalina.

Neste experimento foi obtido uma razão de $\text{Ca/P} = 1,45$, que é condizente com os dados encontrados na literatura para o β -TCP (Yang ; Wang, 1998). O gráfico apresentado na figura 8, mostra os diversos picos no ângulo 2θ e os dois picos intensos e característicos entre 30° e 35° indicam a formação do β -TCP. Os picos obtidos através da difração do raios X, foram analisados através do gráfico padrão do programa Philips X'Pert, como mostra a figura 9. A identificação dos picos indica a presença do β -TCP na amostra através da composição química dos cristais. Na análise por espectroscopia de energia dispersiva (EDS), que mostra os picos de Ca e P indicando a reprodução do método utilizado e a obtenção do β -TCP com alto grau de pureza.

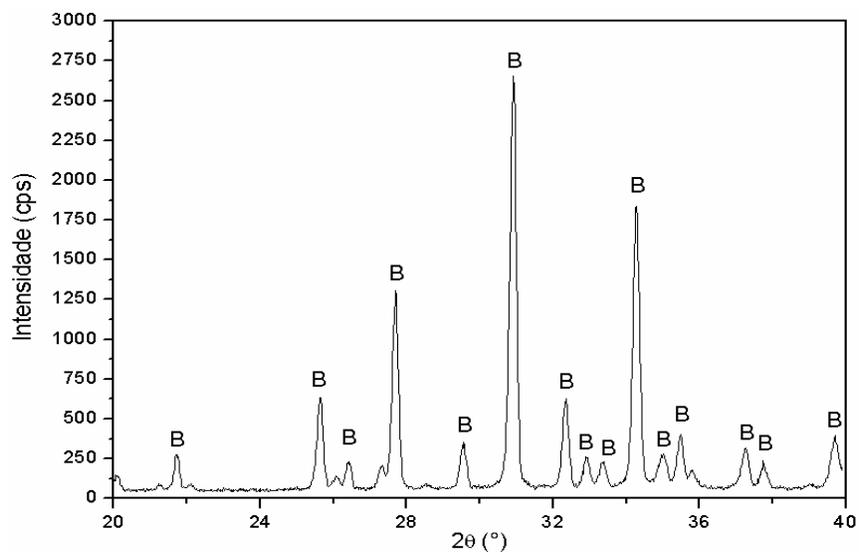


Figura 8 - Difratoograma de raios X do β -TCP calcinado a 1050°C por 6 horas

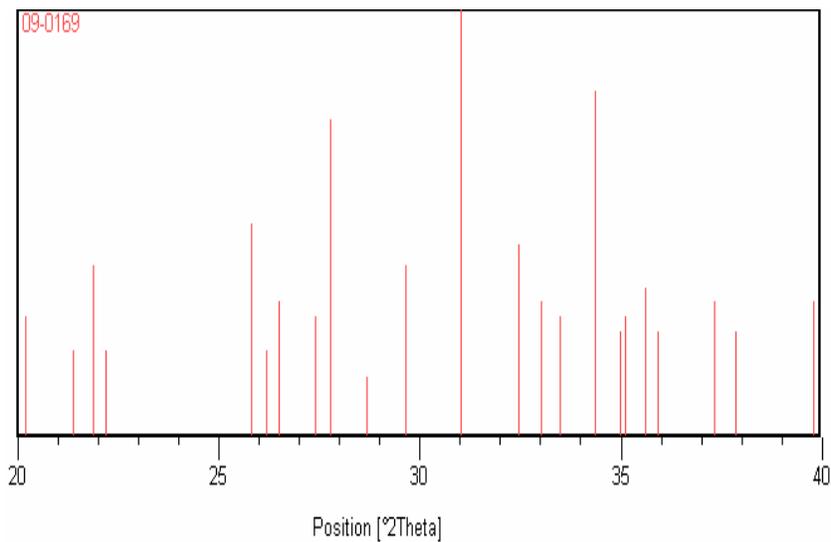


Figura 9 – Gráfico padrão do β -TCP do programa gráfico Philips X'Pert HighScore

5.1.2 Microscopia eletrônica de varredura do β -TCP e Espectroscopia de energia dispersiva EDS

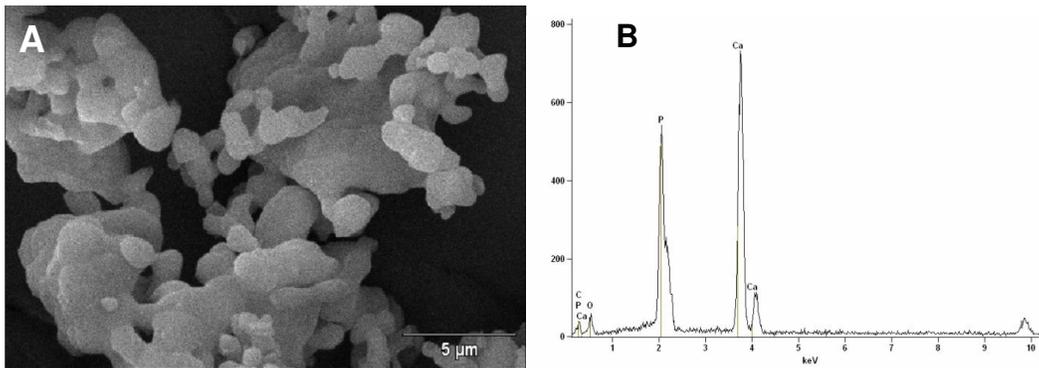


Figura 10 - Micrografia eletrônica de varredura do pó β -TCP (A). (B) Espectroscopia de energia dispersiva (EDS).

A morfologia do β -TCP foi analisada através da MEV. A figura 10A apresenta a superfície do pó β -TCP sintetizado a 1050°C por 6 horas. A micrografia mostra a microestrutura do material apresentando grãos interligados e a cristalinidade de forma esferoidal com estrutura de poros, interconectados demonstrando que o material sofreu o processo de sinterização, pelo empescoamento e a união das partículas, assim como Zyman *et al* observou em um trabalho semelhante (Zyman *et al*, 2008).

A espectroscopia de energia dispersiva (EDS) do β -TCP a confirma a presença de P e Ca de acordo com a estrutura da micrografia apresentada pelo MEV como mostra a Figura 10 (A). O β -fosfato tricalcico é um material cristalino e também conhecido como TCP. Devido sua estabilidade em água o β -TCP não pode ser precipitado em condições aquosas normais. Quanto menor a relação de Ca e P, maior a solubilidade em meio fisiológico de forma que cerâmicas TCP (Ca/P=1,5) apresentam uma maior biodegradação que as de HAp(Ca/P=1,67). Deve-se também ressaltar que a estabilidade é uma função não apenas da composição, mas também das propriedades físicas dos pós e dos produtos sinterizados, apresentando tamanho, forma das partículas, área superficial, estrutura cristalina e densidade.

Segundo alguns trabalhos da literatura (Gibson *et al*, 1996; Mirtchi *et al*, 1989), o β -TCP é um biomaterial com um alto potencial para implante apresentando uma limitação em seu processamento que esta relacionado a temperatura de transformação da fase polimórfica, que ocorre quando o TCP é processado em altas temperaturas podendo ocasionar pequenos defeitos (trincas), na estrutura do material reduzindo assim sua estrutura mecânica.

5.2 Síntese e caracterização das membranas densas de PCL puro e porosas e compósitos de PCL/ β -TCP – densas e porosas

Nas membranas densas PCL puro e porosas e compósitos de PCL/ β -TCP densos e porosos, preparados com os solventes diclorometano e clorofórmio, foram realizadas as seguintes análises:

- Membranas densas PCL puro preparadas com os solventes, diclorometano do grupo 1 e as membranas densas preparadas com clorofórmio do grupo 2.: microscopia óptica (MO) de luz polarizada, que a forneceu dados qualitativos para verificar a rede cristalina das amostras preparadas com os dois solventes (diclorometano e clorofórmio).
- Membranas densas e porosas de PCL e compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP, preparadas com os dois solventes: microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias estão representadas pela sigla da membrana ou compósito. O grupo 1 representa o solvente diclorometano e o grupo 2 representa o solvente clorofórmio utilizado no preparo das amostras.

5.2.1 Microscopia óptica (MO)

A figura 11 (A,B) mostra a microscopia ótica de luz polarizada da superfície das membranas densas de PCL puro de poli (ϵ -caprolactona) utilizando como solvente diclorometano e clorofórmio.

O objetivo da análise é visualizar a região da fase cristalina (esferulitos) do polímero semi-cristalino PCL. A porção amorfa do polímero apresenta região cristalina ordenada e continua. A figura 11 (A,B) mostra a superfície das composições semelhantes preparadas com solvente diclorometano (A) clorofórmio (B).

Pela análise da figura 11A, é possível notar que a estrutura cristalina (esferulitos) na membrana de PCL puro preparado com solvente diclorometano são ligeiramente maiores que a estrutura semelhante formada na membrana PCL puro preparada com clorofórmio (figura 8B). Observa-se a parte cristalina do poli (ϵ -caprolactona) (PCL), formando uma estrutura cristalina (esferulitos), circundados pela porção amorfa. A morfologia e as propriedades mecânicas são alteradas como uma das conseqüências das interações polímero-solvente na fase amorfa. Uma estrutura esferulítica mais refinada é devido a uma taxa de nucleação podendo fornecer propriedades mecânicas e ópticas melhores ao material.

A mesma estrutura cristalina também foi observada por Wang e colaboradores em seu trabalho (2006). A relação da polaridade do solvente pode influenciar na formação da estrutura cristalina como; cristalinidade, orientação e distribuição de peso molecular, pois os solventes diclorometano e o clorofórmio possuem polaridade e peso molecular diferentes.

Consequentemente diversos polímeros mostram mais que dois tipos de esferulitos variando formas diferentes, quanto ao sinal e a intensidade da birrefringência e para a presença de anéis unidos (Raimo, 2007).

Os resultados aqui apresentados estão de acordo com trabalhos anteriores, na literatura (Tsuji *et al.*, 2000), descreveu que o processo de evaporação de solvente é suficientemente lento para a formação de esferulitos que apresentam forma semelhante à observada na micrografia ótica da Figura 8.

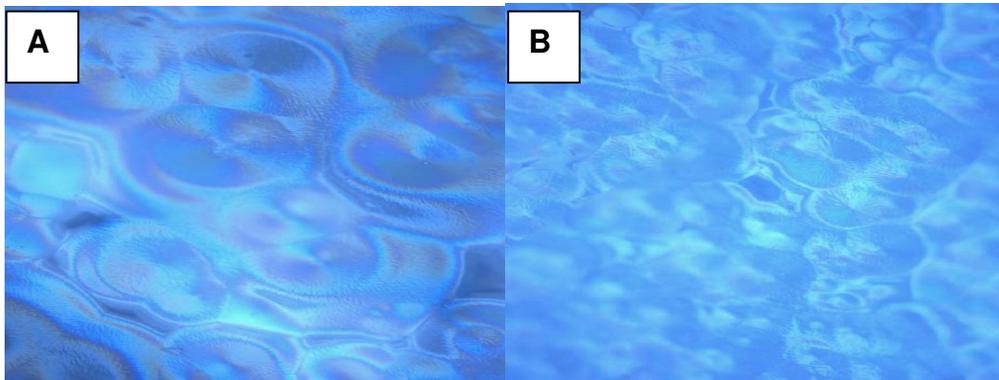


Figura 11 - Microscopia óptica de luz polarizada membrana densa PCL puro preparada com o solvente diclorometano (A). Membrana densa de PCL puro preparada com o solvente clorofórmio(B). (10x).

5.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) membranas densas e porosas de PCL e compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP.

a) Membranas densas e porosas de PCL.

As membranas densas de PCL puro como mostra a micrografia da figura 12 (A,B), preparadas com os dois solventes. Apresentaram na superfície uma estrutura lisa e uniforme com algumas imperfeições podendo estar relacionadas ao arranjo das cadeias poliméricas durante a evaporação do solvente. Essas concavidades são mais acentuadas na amostra preparada com o solvente clorofórmio figura (B).

As membranas porosas da figura 12 (C,D) preparadas com a adição de sal, houve um aumento na porosidade na superfície em relação às membranas densas de PCL puro. Estudos realizados por Combes e colaboradores prepararam amostras densas e porosas pelo processo de evaporação de solvente e concluíram que a estrutura é uma função do processo, condições do solvente, cristalinidade do material e o parâmetro solubilidade do solvente utilizado (Combes *et al*, 2004)

O tamanho dos poros e a irregularidade da superfície esta relacionada ao tamanho das partículas de sal e a quantidade utilizada no preparo das amostras. Durante a evaporação do solvente que apresenta uma abertura dos poros no processo de lixiviação para a retirada do sal, e a formação dos poros como pode ser visto na figura 12(C, D). O tamanho e a distribuição do agente porogenico variaram (210-500 μ m) de acordo com a composição, conforme tabela 3.

Para a engenharia tecidual é importante que os poros estejam interligados favorecendo o crescimento celular e a dissolução dos fatores de crescimento no interior dos poros. As vantagens deste processo incluem a sua simplicidade, versatilidade e facilidade de controle do tamanho dos poros e geometria. No entanto a dificuldade desse método para a precisão da interconectividade dos poros foi encontrado em trabalhos realizados por (Wintermantel *et al*, 1996 e Moore *et al*, 2004)

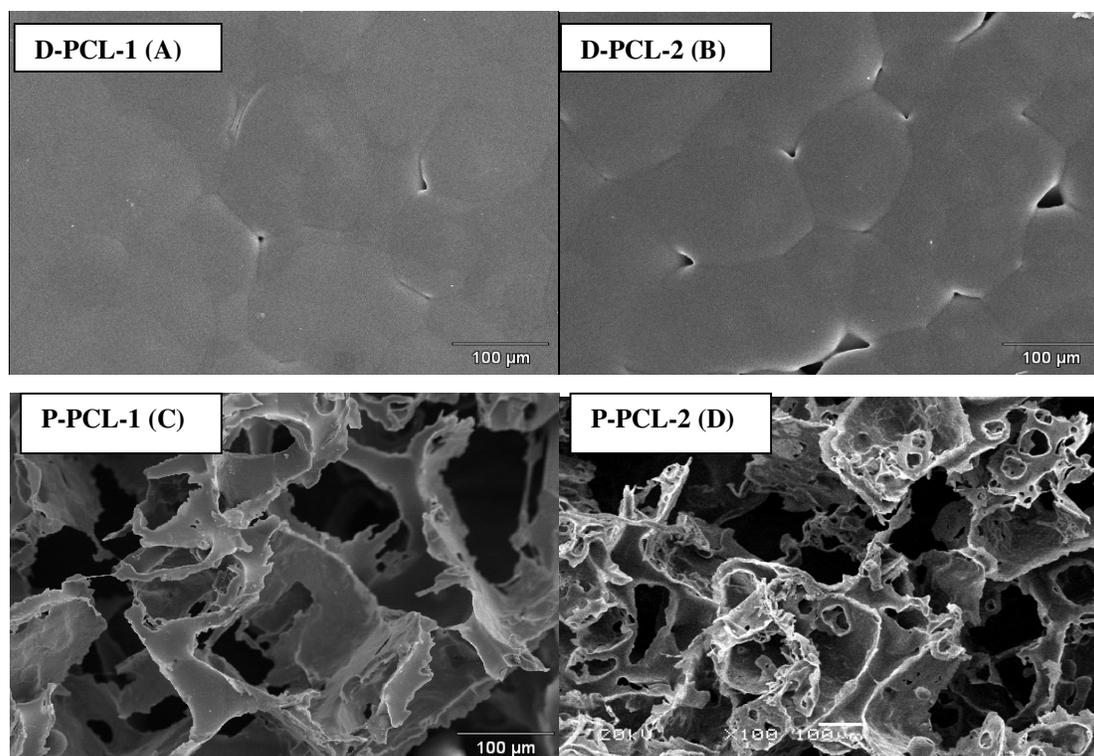


Figura 12 - Micrografia da superfície das membranas densas e porosas PCL(A,C) preparadas com diclorometano e das membranas densas e porosas (B,D) preparadas com clorofórmio.

b) Compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP

Na figura 13 (A,B,C,D) verificam-se as superfícies dos compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP. Os compósitos densos com a adição do β -TCP figura 13 (A,B) apresentam as superfícies densas e lisas com a presença das partículas do fosfato de cálcio dispersos no polímero sem qualquer indício de poros. As partículas do compósito denso na figura 13 (A) apresentam-se mais uniformes que as apresentadas na figura 13 (B). Nos compósitos porosos figura 13 (C,D) observa-se uma superfície irregular e rugosa devido a porosidade e a presença das partículas do β -TCP e do agente porogênico. A porosidade é de grande importância nas aplicações da engenharia tecidual para que haja adesão celular e proliferação sobre toda a superfície. Um estudo realizado por Mikos e colaboradores (Mikos *et al*, 1993; Mikos *et al*, 1994), relacionou o crescimento celular com a taxa de penetração das estruturas porosas dos polímeros biorreabsorvíveis juntamente com a distribuição e o tamanho dos poros no material.

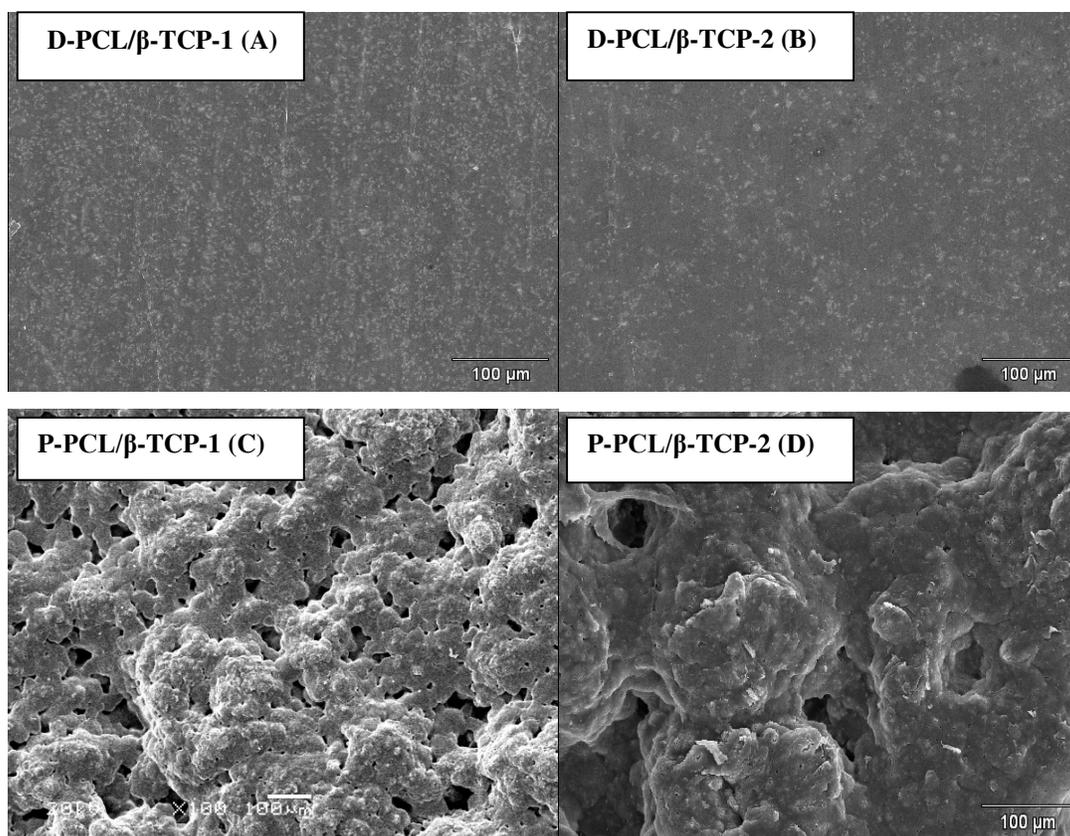


Figura 13 - Micrografia da superfície dos compósitos densos e porosos PCL/ β -TCP preparados com diclorometano (A,C) e compósitos densos e porosos PCL/ β -TCP preparados com clorofórmio (B,D)

c) Fratura das membranas densas e porosas de PCL.

A figura 14 (A,B,C,D) mostra as membranas densas de PCL e porosas fraturadas em nitrogênio líquido. As fraturas das membranas densas de PCL de acordo com a figura 14 (A,B), apresentam uma estrutura lisa, plana, compacta e homogênea sem a existência de poros.

As membranas porosas da figura 14 (C,D) apresentam no seu interior uma estrutura e morfologia dos poros interconectados com diferentes geometrias e espessuras devido ao processo de lixiviação para a retirada do sal.

A irregularidade dos poros e estrutura não uniforme é devido à técnica de obtenção das membranas por evaporação de solvente com adição de sal ou *casting*, variando a quantidade e o tamanho dos grãos (Barbanti, 2004). O nível de interconectividade é de grande importância para a vascularização e crescimento de tecidos. O solvente provavelmente pode influenciar no processo de cristalização e solidificação da estrutura e da morfologia.

Como pode ser observado na figura 14 (B) mostram no seu interior pequenos defeitos e irregularidades, que pode ser atribuído a evaporação do solvente. A geometria determina o volume e as composições semelhantes, fatores determinantes para a diferença entre as membranas porosas. As características porosidade e tamanho dos poros dependem do método de fabricação do *scaffolds*, segundo outros trabalhos realizados (Mikos *et al*, 1993; Mikos *et al*, 1994; Mooney *et al*, 1994; Mooney *et al*, 1996), que também observaram essas diferenças em seus resultados.

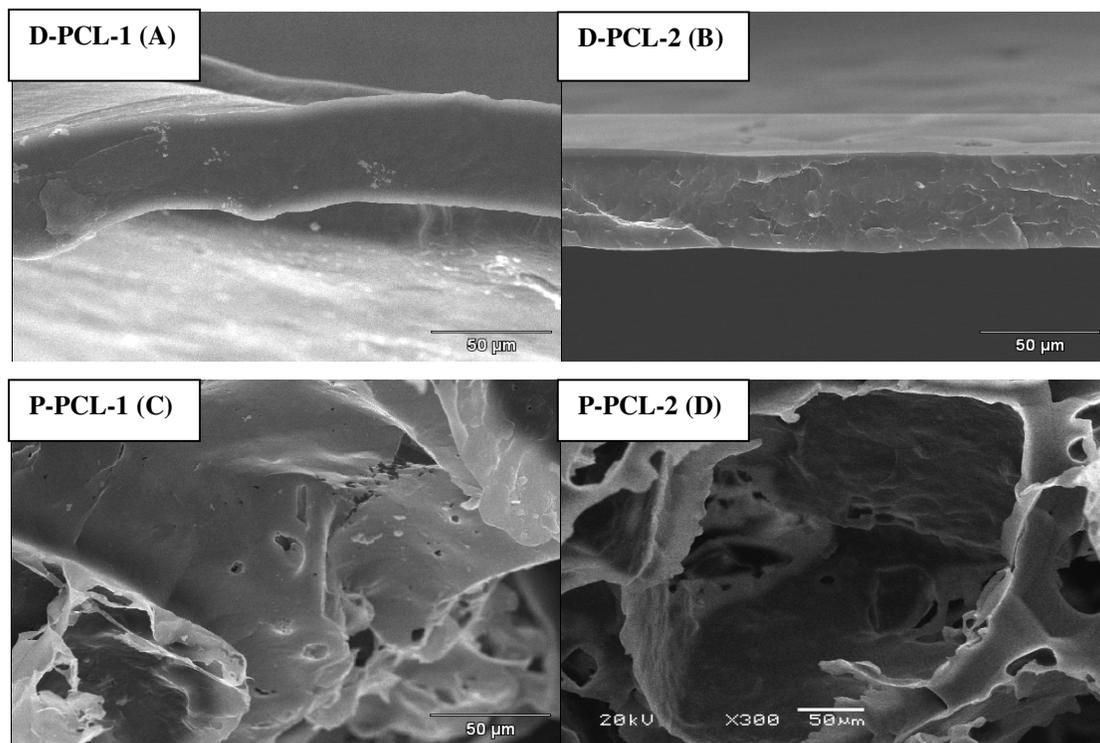


Figura 14 - Micrografia das membranas densas e porosas de PCL preparadas com diclorometano(A,C) e das membranas densas e porosas de PCL preparadas clorofórmio(B,D) fraturadas com nitrogênio líquido.

d) Fratura dos compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP

Os compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP fraturados com nitrogênio líquido são apresentados na figura 15. Os compósitos densos mostram-se compactos na parte interna com as partículas do β -TCP como mostra a figura 15(A,B). Os compósitos porosos com as partículas do β -TCP apresentam uma estrutura porosa e interconectividade dos poros, além de β -TCP disperso na fase polimérica do (PCL) como é observado na figura 15 (C,D). A matriz polimérica envolve as partículas do β -TCP, como mostra a micrografia das duas composições, mas permanecem separados formando duas fases.

Na figura 15 (A,C), membrana densa e o compósito preparados com o solvente diclorometano, apresentaram uma estrutura mais rígida e compacta comparada com a composição semelhante da figura 15 (B,D), preparada com o solvente clorofórmio. A morfologia e as

propriedades mecânicas são alteradas como uma consequência das interações polímero-solvente na fase amorfa. É possível afirmar, que, em geral, uma estrutura esferulítica mais refinada, é devida a uma taxa de nucleação maior, e pode fornecer propriedades mecânicas e óticas melhores ao material.

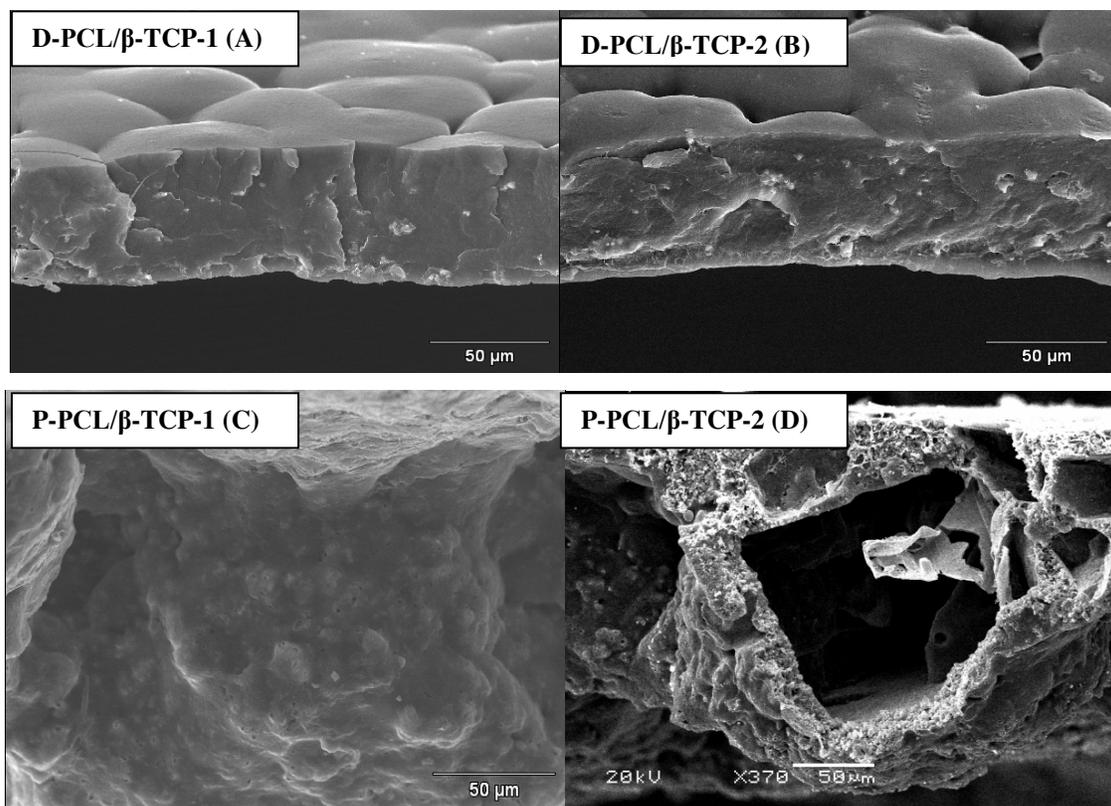


Figura 15 - Micrografia dos compósitos densos e porosos de PCL/β-TCP preparados com o diclorometano (A,C) e compósitos densos e porosos de PCL/β-TCP preparados com o clorofórmio (B,D) - fraturados com nitrogênio líquido.

5.3 Caracterizações termogravimétricas (TGA) das membranas densas e porosas de PCL e compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP .

a) Membranas densas e porosas de PCL

A verificação da estabilidade térmica e a composição das membranas densas e porosas de PCL e compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP foram obtidos através da análise termogravimétrica (TGA).

Na Figura 16 (A,B,C,D) as curvas de TGA apresentadas não exibiram picos endotérmicos relativos a liberação molécula de água que pode ser evidenciada na curva como uma perda de massa gradativa que ocorre desde a temperatura ambiente até próximo de 100°C.

As curvas de TGA da figura 16 (A, B) referentes às membranas densas de PCL puro e figura 16 (C,D) das membranas porosas preparadas com os dois solventes diclorometano e clorofórmio, apresentaram perda total da massa com um único estágio da curva.

A temperatura de degradação térmica foi igual para todas as amostras densas e porosas. Um estudo realizado por Penã (Penã *et al*, 2006) sobre a degradação térmica do PCL, demonstrou um único estágio de decomposição para o polímero. Um trabalho realizado por Wang e seus colaboradores (Wang *et al*, 2006) observaram uma perda de massa precoce da poli (ϵ -caprolactona) pura.

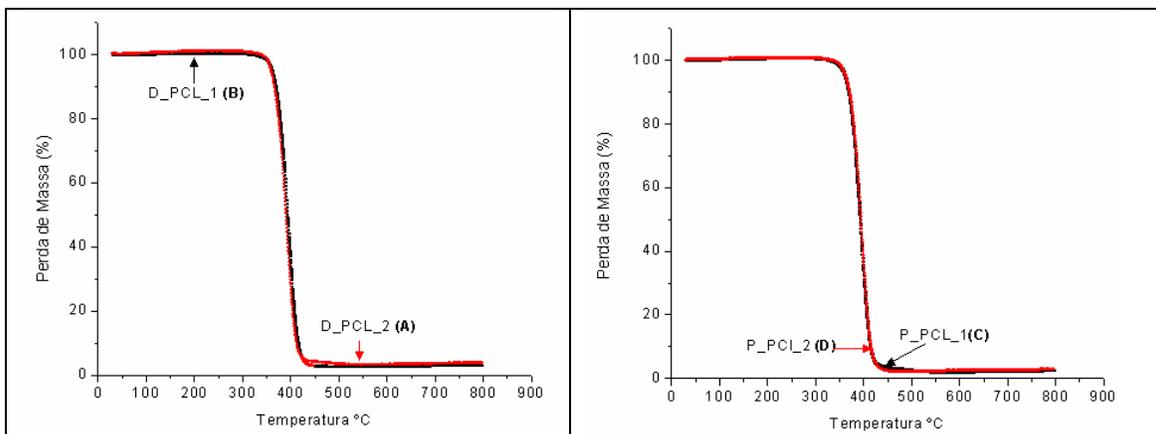


Figura 16 - Curva das análises termogravimétrica das membranas densas e porosas de PCL (A,C) preparadas com o diclorometano e membranas densas e porosas de PCL preparadas com o clorofórmio (B,D)

b) Compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP

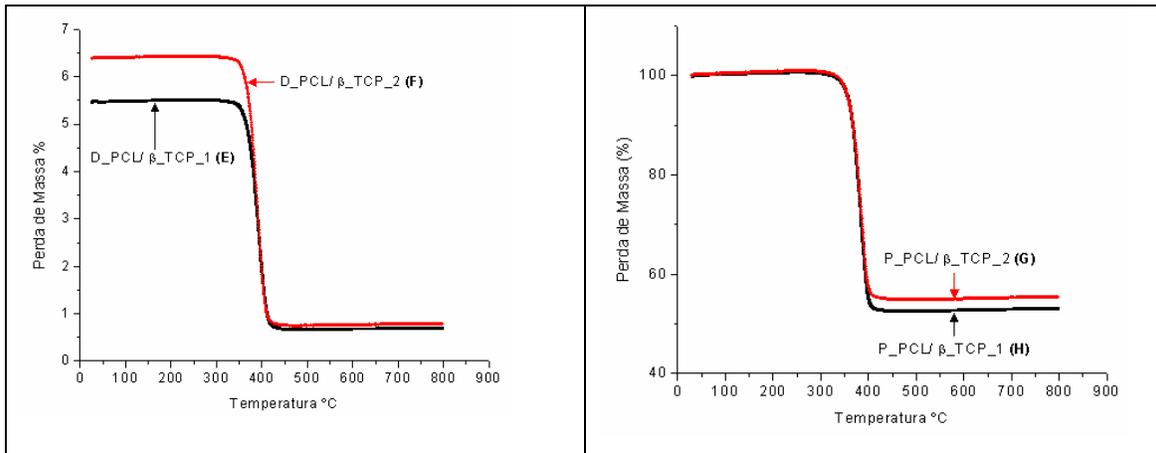


Figura 17 - Curva das análises termogravimétrica dos compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP preparados com o diclorometano (A,C) e compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP preparados com o clorofórmio (B,D).

As amostras densas conforme podem ser observadas na figura 17 (E,F) com adição das partículas do fosfato de cálcio, apresentaram uma perda de massa de aproximadamente 7% em relação a membrana de PCL puro que teve uma perda de massa total, deixando um resíduo de 93%, essa variação é decorrente a presença do β -TCP na amostra.

As membranas porosas com adição do β -TCP apresentaram perda de massa em torno de 50% podendo estar relacionado com a porosidade da membrana e a adição do β -TCP. Vale ressaltar que a faixa de temperatura de calcinação do β -TCP ocorre acima de 1000°C, e a faixa de temperatura de degradação dos polímeros ocorre na faixa de 200° - 400°C.

5.4 Calorimetria diferencial de varredura (DSC) das membranas densas e porosas de PCL e compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP

a) Membranas densas e porosas de PCL

A figura 18 (A,B,C,D) apresentam as curvas de DSC no segundo aquecimento das membranas densas e porosas de PCL preparados com dois solventes – diclorometano e clorofórmio.

Nas análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC), foi possível observar a Tg e Tf das amostras analisadas, a área do pico esta relacionada com a temperatura de fusão (Tf) das amostras, relacionada a quantidade de energia que o material necessita para a mudança de fase. O PCL é um polímero semicristalino com baixa cristalinidade, necessitando de pouca energia para a fusão. As membranas densas, como podem ser observadas na figura 18 (A), necessitaram de menos energia para atingir a Tf, comparando-se com as amostras correspondentes na figura 18 (B). Durante a evaporação do solvente ocorre a organização dos cristais da cadeia polimérica. A análise de MO nos permitiu observar a diferença no tamanho dos cristais formados durante o processo de nucleação.

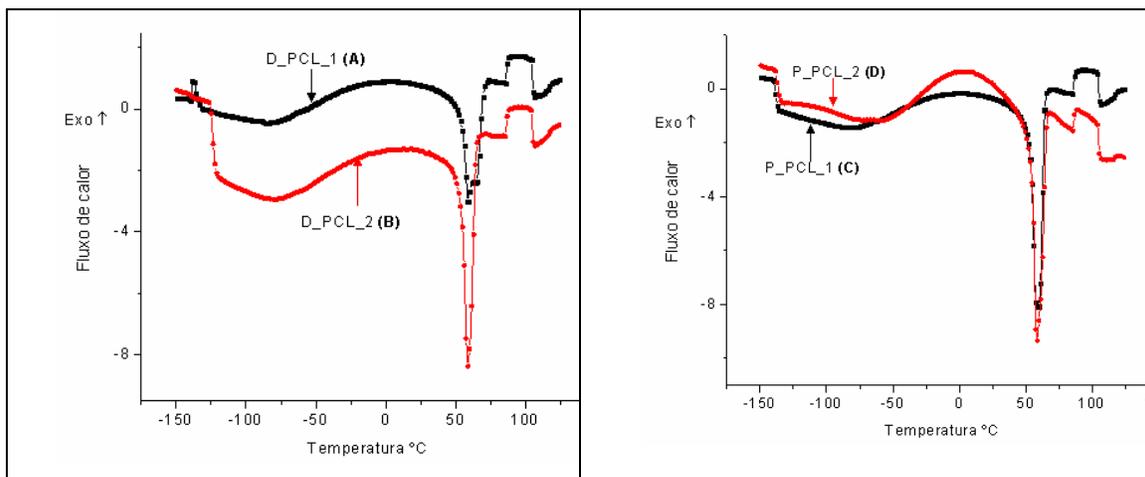


Figura 18 - Curvas de DSC (2º aquecimento das) membranas densas e porosas de PCL preparadas com diclorometano (A,C) e membranas densas e porosas de PCL preparadas com clorofórmio (B,D).

b) Compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP

A figura 19 (A,B,C,D) apresenta as curvas de DSC dos compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP preparados com os dois solventes – diclorometano e clorofórmio. A presença das partículas do β -TCP não influenciou nas propriedades térmicas dos compósitos como pode ser observada na figura 19 (A,B).

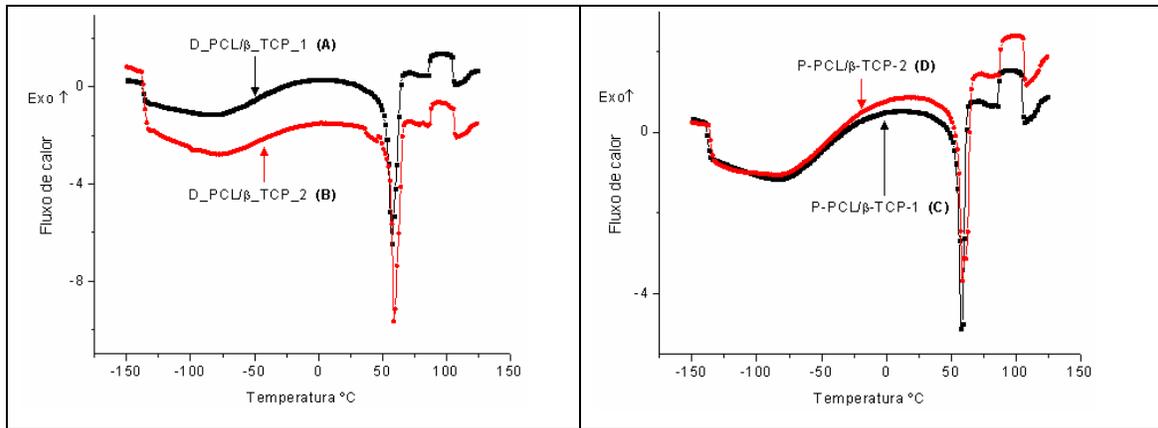


Figura 19 - Curvas de DSC (2º aquecimento) dos compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP preparados com diclorometano (A,C) e dos compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP preparados com clorofórmio (B,D).

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam os dados citados na literatura por (Huang, 2004), obtidas no segundo aquecimento com uma taxa de resfriamento (10°C/min.), a taxa de nucleação permite a organização dos cristais. Outro estudo realizado por Kweon e colaboradores (2003), utilizando o PCL e variando o tamanho das cadeias poliméricas (massa molar), observaram a redução da cristalinidade, entalpia e temperatura de fusão.

A maioria dos materiais poliméricos exibe características viscoelásticas, por possuem propriedades tanto elásticas como plásticas. A tabela 4 apresenta os resultados obtidos nas curvas de DSC para temperatura de transição vítrea (Tg), temperatura de fusão (Tf).

Tabela 4 - Dados obtidos das curvas de DSC para a temperatura de transição vítrea (Tg), temperatura de fusão (Tf) para as amostras analisadas.

Amostra	Tg (°C)	Tf (°C)
P-PCL-1	-54,81	59,74
P-PCL-2	-58,52	58,19
D-PCL-1	-69,10	58,90
D-PCL-2	-69,61	56,73
P-PCL/ β -TCP-1	-58,01	58,16
P-PCL/ β -TCP-2	-60,48	59,00
D-PCL/ β -TCP-1	-63,69	57,46
D-PCL/ β -TCP-2	-64,69	56,83

5.5 Análise das propriedades mecânicas das membranas densas e porosas de PCL e compósitos densos de porosos PCL/ β -TCP

a) Membranas densas e porosas de PCL

Os ensaios mecânicos realizados nas membranas densas e porosas de PCL e preparadas com dois solventes – diclorometano e clorofórmio são mostrados na figura 20 (A,B,C,D).

As membranas densas de PCL como mostra a figura 20 (A,B) apresentaram elevada tensão na ruptura das amostras. Sendo que a membrana da figura 20(B) preparada com o solvente clorofórmio apresentou maior resistência mecânica que a sua membrana correspondente como mostra a figura 20 (A) preparada com o solvente diclorometano, que apresentaram a mesma taxa de deformação. Na análise por MO foi possível observar as diferenças entre os processos de nucleação entre os solventes. Como mostra a figura 11(B), a parte cristalina (esferulitos) do PCL com tamanhos reduzidos. A evaporação lenta do solvente dificulta a organização das cadeias poliméricas do PCL, permitindo a formação de uma estrutura mais organizada.

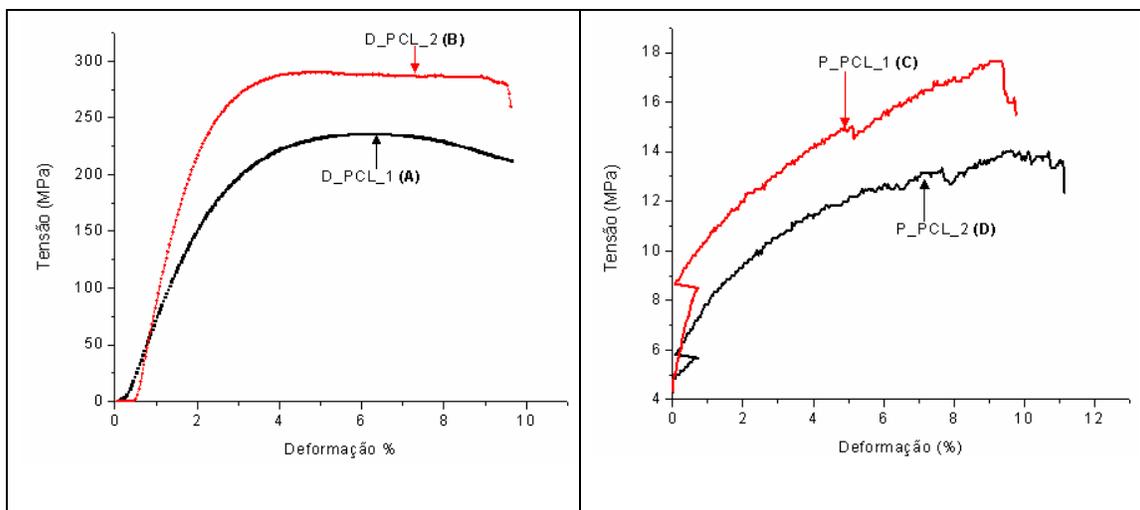


Figura 20 – Curva tensão vs deformação membranas densas e porosas de PCL preparadas com diclorometano(A,C) e membranas densas e porosas de PCL preparadas com clorofórmio (B,D).

b) Compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP

Na figura 21 (A,B,C,D) observa-se os compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP. É possível verificar uma diminuição da resistência mecânica nas amostras com a presença do β -TCP, em relação às membranas densas de PCL puro. Também pode ser observado que as propriedades mecânicas da figura 21 (A) foram significativamente superiores às membranas correspondentes figura 21 (B).

Esses resultados podem estar relacionados às características borrachosas e dúcteis do PCL com, a característica frágil do β -TCP. O PCL possui uma temperatura de transição vítrea T_g de -60°C , abaixo da temperatura ambiente, entretanto com a incorporação das partículas do β -TCP deveria aumentar a resistência mecânica do compósito, como é observado na figura 21 (A). A membrana correspondente (figura 21B) apresentou baixa resistência mecânica. Essa diminuição pode estar relacionada com a evaporação do solvente clorofórmio.

Como foi observado nas micrografias da figura 15 (A,B) dos compósitos densos de PCL/ β -TCP, a evaporação lenta do solvente e sua estrutura molecular, podem favorecer a geração de defeitos alterando as propriedades mecânicas do material. Estudos realizados do compósito de PCL com HA por Wang e colaboradores (Wang *et al*, 2006), concluíram que os compósitos podem ser caracterizados como duros e resistentes, resultados semelhantes aos deste trabalho.

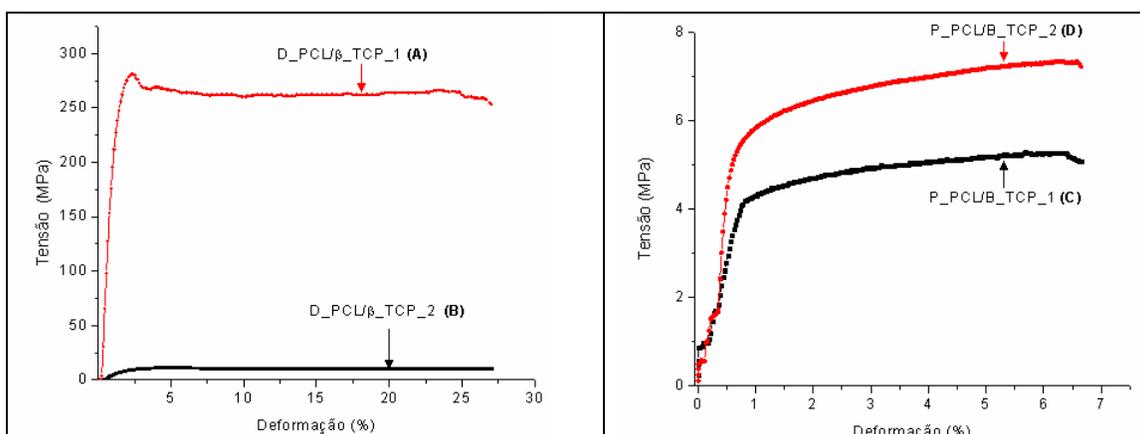


Figura 21 – Curva tensão *versus* deformação de compósitos densos e porosos de PCL/β-TCP preparados com dois solventes - diclorometano e clorofórmio

Tabela 5 - Resultados dos ensaios mecânicos de tração das membranas densas e porosas de PCL e compósitos densos e porosos de PCL/β-TCP para os dois solventes diclorometano e clorofórmio.

Amostra	Tensão (MPa)	Deformação na ruptura (%)	Modulo de Young (MPa)
D-PCL-1	379,1±137,2	10,7±3,84	7958,6±2740
D-PCL/β-TCP-1	2,6±123,4	68,51±90,1	49,7±1523
P-PCL-1	7,8±0,23	161,7±6,8	678,2±16,2
P-PCL/β-TCP-1	281±0,35	15,2±5,65	3950±22,4
D-PCL-2	366,0±27,4	11,8±8,6	6570,0±301
D-PCL/β-TCP-2	2,8±1,651	27,9±47,2	50,1±37,8
P-PCL-2	47,4±0,5	63,6±7,8	1290,6±19,2
P-PCL/β-TCP-2	34,1±0,424	32,7±11,28	1434,0±32,5

5.6 Avaliação dos ensaios preliminares da citotoxicidade *in vitro* pelo método MTT

O ensaio de viabilidade celular em osteoblastos através do método MTT está representado na Figura 22 (A,B). Os resultados estão apresentados em porcentagem relativa em comparação com o controle negativo sem qualquer material, somente a placa de cultura celular poliestireno. Este resultado representa 100% de viabilidade celular e calculado através da equação abaixo:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = (\text{Nt}/\text{Nc}) \times 100 \quad \text{equação (2)}$$

Onde Nt é a densidade óptica do grupo das amostras e Nc a densidade óptica do grupo controle (somente o plástico da cultura placa estava em contato com as células - poliestireno). O teste *in vitro* de biocompatibilidade das membranas de PCL puro e dos compósitos PCL/ β -TCP densos e porosos, demonstrou viabilidade celular superior a 90% em todas as amostras do contato indireto das composições analisadas com os dois solventes como mostram os gráficos da figura 22 (A,B).

Assim, nos resultados de citotoxicidade não foi observada qualquer diferença significativa entre as amostras com diferentes solventes (diclorometano e clorofórmio) ou o polímero poli (ϵ -caprolactona), respectivamente. A toxicidade de compostos orgânicos usualmente utilizados em método de evaporação de solvente é um fator limitante para aplicação desses materiais como implante.

Com os resultados analisados o material mesmo depois de dissolvido e processado não apresentou traços de solvente. Isso ficou evidente nos testes realizados, nos quais as células proliferaram na superfície do material; portanto os resultados indicaram que nenhuma membrana apresentou toxicidade.

A influência das características da topografia da superfície, lisa e rugosa (porosidade), propriedades químicas e energia de superfície determinam como as moléculas serão absorvidas e diferenciadas. Superfícies lisas, geralmente facilitam a adesão celular quando comparadas com as rugosas (Barbanti, 2004 ; Cardoso, 2010).

Le Ray e colaboradores (Le Ray *et al*, 2003) obtiveram resultados semelhantes utilizando discos da membrana de PCL puro em contato direto com fibroblastos (L929), que apresentaram uma porcentagem de viabilidade celular acima de 95%. O comportamento das células

osteoblasticas de camundongo acompanhados por Serrano (Serrano *et al*, 2004), por um período de três semanas, apresentou uma resposta biológica favorável.

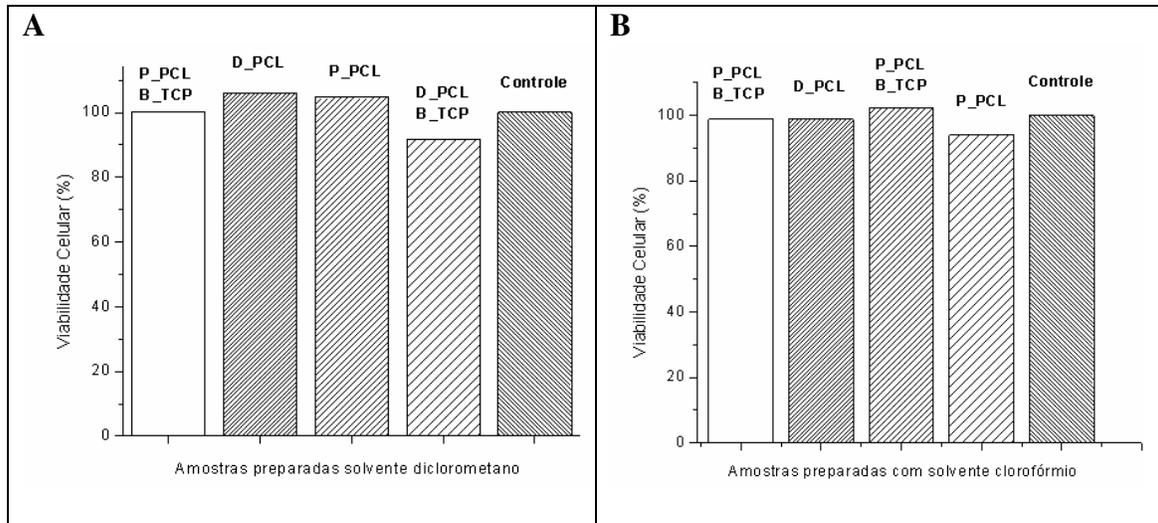


Figura 22 - Viabilidade celular em osteoblastos humanos (MG63) em ensaios de metabolismo celular (MTT) das membranas densas e porosas de PCL e compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP preparadas com os solventes (A) diclorometano e clorofórmio(B).

5.7 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

A atividade de fosfatase alcalina foi realizada nas membranas densas e porosas de PCL e compósito poroso preparados com o solvente diclorometano.

Analisando os dados do ensaio da atividade da fosfatase alcalina (ALP) a atividade indica um estímulo nas amostras incubadas por um período de 15 dias, mostrando um reforço da atividade desta enzima, entretanto as membranas densas PCL e porosas exibiram uma maior atividade, em relação ao compósito poroso (P-PCL/ β -TCP-1), o que pode ser influenciado pela superfície e os comportamentos podem ser observados na figura 23.

A atividade de fosfatase alcalina (ALP) é usada como um marcador bioquímico de formação óssea, o que pode ser explicado pela diminuição da atividade no compósito com o β -

TCP, já as membranas porosas apresentam maior superfície de contato em relação às membranas densas e aos compósitos porosos.

Incubando as células por maior tempo os resultados poderiam ser diferentes considerando que as partículas do β -TCP do compósito poroso estão envolvidas na matriz polimérica. De acordo com o trabalho da literatura (Moraes *et al*, 2004) a substituição do cimento de fosfato de cálcio por tecido ósseo pode ser explicada pela osteocondutividade que ocorre no implante do tecido ósseo; osteoclastos reabsorvem o material por fagocitose e osteoblastos produzem a neoformação óssea.

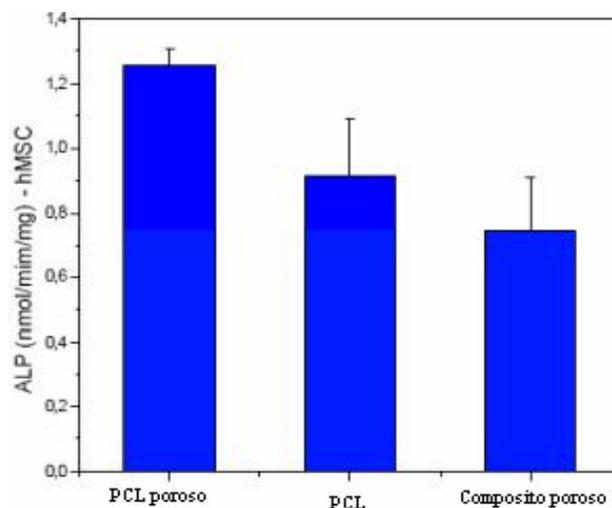


Figura 23 – Atividade de ALP (fosfatase alcalina) de células mesenquimais de medula óssea humana (hMSC) para as membranas densas e porosas de PCL e compósitos porosos (PCL/ β -TCP-1) analisados após 15 dias.

5.8 Análise do ensaio da degradação hidrolítica

O estudo da degradação hidrolítica foi realizada com o grupo 2, das membranas densas e porosas de PCL e compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP, preparadas com o solvente clorofórmio.

As amostras foram incubadas 17 meses, como descrito no capítulo 4. Após o período de degradação hidrolítica, as amostras foram lavadas em água destilada e secas em estufa a 35°C por 17 horas e analisadas por MEV e DSC

5.8.1 Ensaio *in vitro* em solução salina fosfato (PBS)

a) Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A figura 24 (A,B,C,D) apresenta as micrografias das superfícies resultantes da degradação hidrolítica das amostras após o período de 17 meses de degradação em solução tampão fosfato (PBS).

Os resultados da degradação hidrolítica no grupo das membranas densas e porosas de PCL e compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP foram semelhantes, devido ao alto grau de cristalinidade e da alta massa molar do PCL.

As amostras analisadas apresentaram superfície opaca, quebradiça e rugosa. Tais diferenças podem não ser significativas, mas denotam uma degradação da superfície do material.

A porosidade na membrana porosa figura 19(B), favorece a cultura das células, adesão e proliferação na superfície e no interior do material. Resultados similares também foram observados por Salgado (Salgado, 2009), em sua tese, que analisou a perda de massa das membranas de PCL e a distribuição morfológica dos cristais e a parte amorfa podem influenciar na degradação do material.

O PCL é um polímero hidrofóbico, dificultando a penetração da água e a quebra das cadeias como ocorre em polímeros hidrofílicos. Segundo relatos da literatura (Santos *et al*, 2002 e Vanin *et al*, 2004) a adesão celular em membranas densas e porosas é uma função química em consequência da hidrofiliidade do material, que estudaram o processo de degradação do polímero PCL, onde observaram trincas na sua superfície.

Entre os polímeros biodegradáveis o polímero, poli (ϵ -caprolactona) (PCL) é um material promissor, que sofre autocatálise por hidrólise e não produz nenhum produto tóxico na sua degradação. Outros estudos realizados (Pitt *et al*, 1981; Ali *et al*, 1993; Kymura, 1993; Duek,1997), verificaram que a biorreabsorção dos polímeros ocorre em dois estágios: decomposição e absorção por ligações metabólicas ou seus análogos com ligações hidrolisáveis são biorreabsorvíveis.

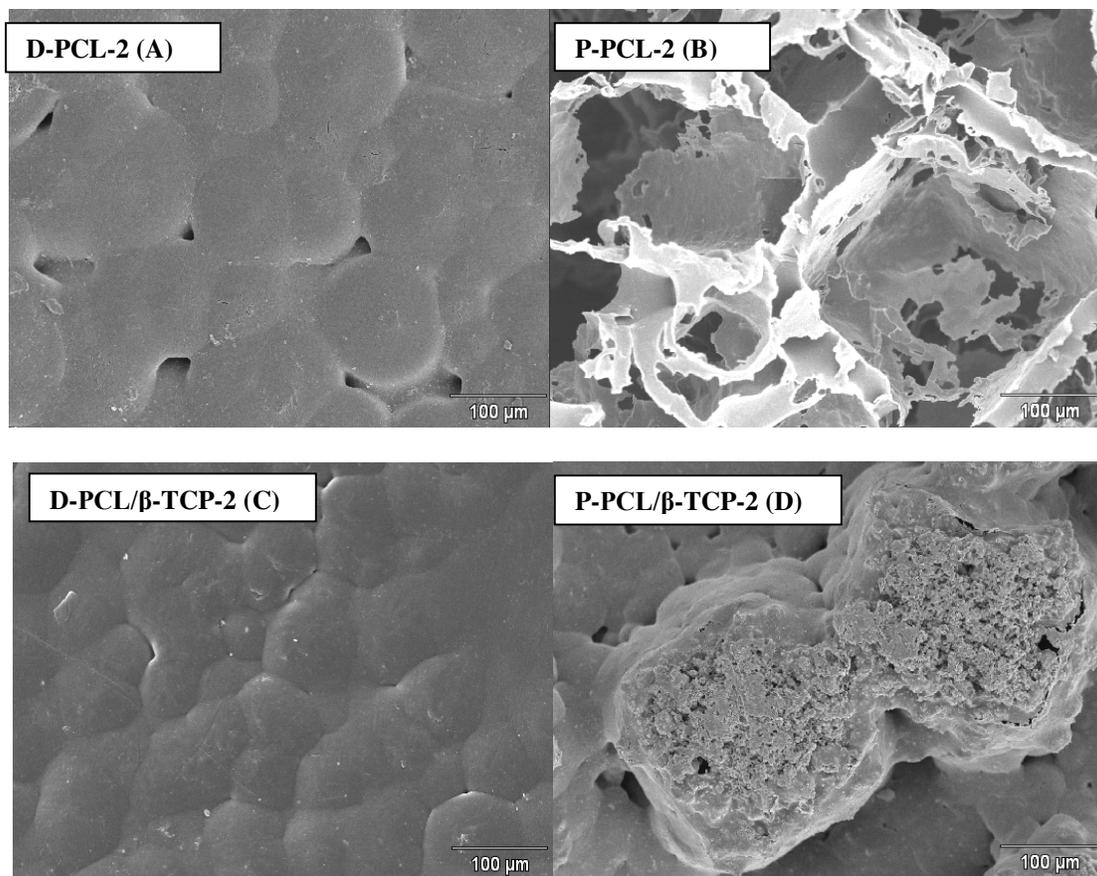


Figura 24- Micrografia das membranas densas (A) e porosas de PCL (B) e compósitos densos PCL/ β -TCP (C) e compósitos porosos de PCL/ β -TCP (D) preparados com clorofórmio degradadas por 17 meses.

b) Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Na figura 25 (A,B,C,D) apresentam-se as curvas de DSC no segundo aquecimento com a taxa de resfriamento do material (10 °C/min) para o favorecimento e a organização da cadeias moleculares. Os gráficos representam os resultados das membranas do (grupo 2) preparadas com o solvente clorofórmio após a degradação hidrolítica em PBS.

As amostras analisadas não mostraram mudanças na temperatura de transição vítrea (T_g) e na temperatura de fusão (T_f). Os valores não mostraram variação para a T_g (-62°C a -71°C) e para a T_f (58°C a 59°C), conforme mostram os gráficos da figura 25 e a tabela 6.

A Tg é uma característica do material amorfo e cristalino, o PCL é polímero semicristalino que exibe regiões amorfas onde foi possível obter os dados nas curvas. O polímero PCL que se apresenta de forma borrachosa em temperaturas abaixo da Tg, com um comportamento dúctil em temperaturas acima da Tf que podem afetar as propriedades mecânicas bem como o tempo de degradação do implante.

Estudos realizados por (Lu *et al*, 2000) com membranas porosas de PLLA, obtidas pelo processo de evaporação e solvente com adição de sal em tampão fosfato pH=7,4 a 37°C, foi possível observar uma variação no tamanho dos poros não tem influencia no processo de degradação.

Tabela 6 - Dados temperatura transição vítrea (Tg), temperatura de fusão (Tf) das amostras envelhecidas.

Amostras	Tg °C	Tm °C
D-PCL-2	-71,94	59,35
P-PCL-2	-62,10	58,41
D-PCL/ β -TCP-2	-56,11	57,69
P-PCL/ β -TCP-2	-57,27	58,93

A morfologia cristalina do material tamanho dos cristais e distribuição amorfa do PCL também pode influenciar na degradação juntamente com a espessura do filme. Normalmente a perda de massa e a quebra da cadeia do PCL em moléculas menores tais diferenças podem não ser significativas para fazer uma grande diferença na degradação.

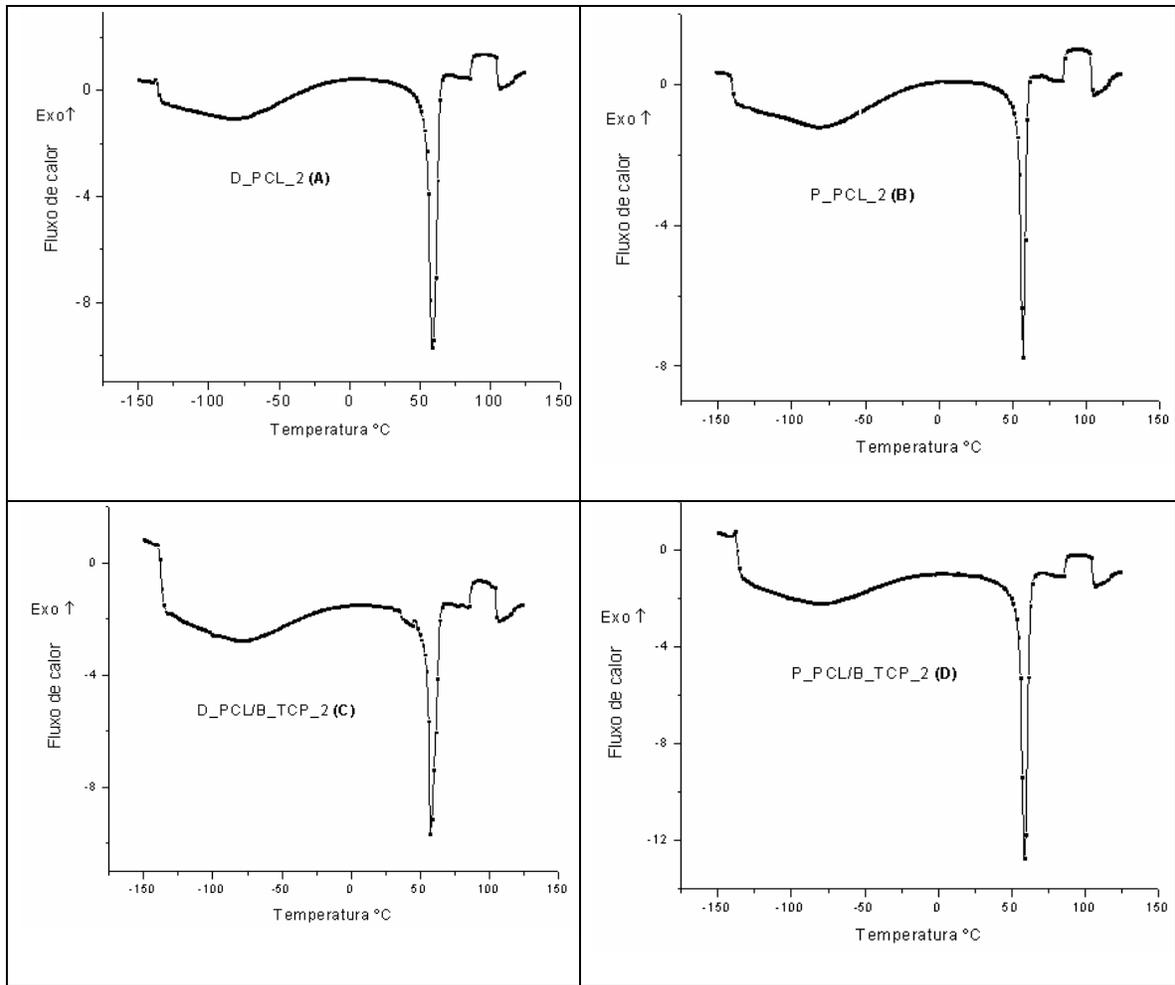


Figura 25 - Curva de DSC (2º aquecimento) das membranas densas PCL(A) e membranas porosas de PCL(B) e compósitos densos de PCL/ β -TCP (C) e compósitos porosos PCL/ β -TCP (D) em solução tampão fosfato (PBS)

As conclusões das análises geradas neste trabalho serão abordadas no próximo capítulo

6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

As análises realizadas nas membranas densas de PCL e porosas e compósitos densos e porosos de PCL/ β -TCP, foram adequadas para caracterizar e diferenciar as amostras preparadas com dois solventes diclorometano e clorofórmio.

O β -TCP foi produzido de acordo com a metodologia utilizada apresentando uma cristalinidade e porosidade e observado pelo MEV.

Os resultados obtidos dos compósitos com o β -TCP mostraram a fase do β -TCP dispersa na matriz polimérica do PCL, porém não houve uma interação entre a fase polimérica e as partículas do β -TCP.

Através de imagens de microscopia óptica, observou-se que as membranas densas preparadas com clorofórmio apresentaram esferulitos menores em relação às membranas densas preparadas com diclorometano. Os resultados sugerem uma diferença na razão de nucleação de cristais entre os solventes usados.

Através de imagens de microscopia eletrônica da varredura, observou-se que os compósitos porosos apresentaram interconectividade nos poros, que são favoráveis ao crescimento celular, adequados para a engenharia tecidual.

O conjunto de técnicas de caracterização utilizado neste estudo demonstrou-se eficiente e suficiente para avaliar as alterações no comportamento físico-químico das amostras estudadas.

Os ensaios das propriedades mecânicas de tração mostraram os compósitos densos PCL/ β -TCP preparados com o solvente diclorometano apresentaram boa resistência mecânica, quando comparado com os outros materiais estudados.

Nas curvas do DSC foram possíveis determinar as Tgs e Tfs, que estavam de acordo com o desejado, mostrando que os solventes utilizados não alteraram as características térmicas do polímero.

Os testes de viabilidade celular com osteoblastos mostraram que os materiais estudados não apresentaram citotoxicidade.

A atividade de fosfatase alcalina (ALP) é um marcador bioquímico, que mostrou melhor resultado nas membranas porosas em relação à membranas densas e aos compósitos com o β -TCP.

O estudo com a degradação hidrolítica após 17 meses com o grupo das membranas preparadas com o solvente clorofórmio, não apresentaram mudanças significativas, devido a massa molecular do PCL, que dificulta a degradação do material.

Nas análises de DSC observou-se que as membranas porosas apresentaram maior degradação do que todos os outros materiais estudados, no período de 17 meses.

Os resultados analisados com as membranas densas de PCL e porosas, assim como os compósitos densos PCL e porosos, sugerem uma aplicação para a engenharia tecidual. Neste estudo os resultados obtidos com esses biomateriais sugerem sua aplicação na área médica podendo ser utilizados como enxertos ósseos.

Sugestões para trabalhos futuros

As seguintes sugestões para trabalhos futuros podem ser feitas:

Melhorar as características físicas e químicas da mistura do polímero PCL com as partículas β -TCP, utilizando outro método de preparo, como por exemplo, a prototipagem rápida.

Dar continuidade no estudo *in vitro* da degradação hidrolítica com o PBS.

Realizar estudos *in vivo* com os materiais aqui estudados como implantes subcutâneos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ali, S.A.; Zhong, S.P.; Doherty, P.J.; Willians, D.F. **Biomaterials**. 1993, v.14, p.648.

Amass, W.; Amass, A.; Tigue, B. **A review of biodegradable polymer: uses corrent developmensts in the synthesis and characterization og biodegradable polyesters, blends of biodegradable and recent advances in biodegradation studies**. *Polymer international*. 1998, v.17, p.89-144.

Amigó, J.M.; **Cristalografia**.Editoria Rueda. 1981.

Barbanti, S.H.; Santos,A. R.; Zavaglia, C.A.C.; Duek,E.A.R **Porous and dense poly (L-lactic acid) and poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds: In vitro degradation in culture medium and osteoblasts culture**. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2004, v.15 p.1315.

Blasco, J.; Puppo, J.; Sarasquete, M. C. **Acid and alkaline phosphatases activities in the clam *Ruditapes philippinarum***. *Mar. Biol*. 1993, v.115, p. 113-118.

Bobyn, J.D.; Stackpool, G.J.; Hacking. S.A.; Tanzer, M.; Krygier. J.J. **Characteristics of bone ingrowth and interface mechanics of a new porous tantalum biomaterial**. *J Bone Joint Surg Br*. 1999, v.81, p.907-14.

Brauker, J.H.; Carr-Brendel, V.E.; Martinson, L.A.; Crudele, J.; Johnston,W.D.; Johnston, R.C, **Neovascularization of synthetic membranes directed by membrane micro architecture**. *J. Biomed Mater Res*. 1995, v.29, p.1517-24.

Canevarolo, S. V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. Editora Artber, São Paulo, 2004, p.448.

Cardoso, G.B.C.; Ramos, S.L.F.; Rodas, A.C.D.; Higa, O.Z.; Zavaglia,C.A.C.; Arruda, A.C.F.; **Scaffolds of poly(ϵ -caprolactone) with whiskers of hydroxyapatita**. *J.Mater.Sci.*, 2010, v.45, p.4990-4993.

Cassu, S.N.; **Comportamento Dinâmico-Mecânico e relaxações em polímeros e blendas poliméricas**. *Química Nova*. 2005, v. 28, 2, p. 255-263.

Coombes, A.G.A.; Rizzi, S.C.; Williamson, M.; Barralet, J.E.; Downes, S.; Wallace, W.A. **Precipitation casting of poly(ϵ -caprolactone) for applications in tissue engineering and drug delivery**.*Biomaterials*. 2004, v.25, p. 315-25.

Costa, C.A.; Hebling, J.; Garcia-Godoy, F.; Hanks, C.T. **In vitro cytotoxicity of five lassiono mercements**, *Biomaterials*. 2003, v.24, n.21, p.3853-3858.

Chen,G.; Zhou,P.;Mei,N.; Chen,X.; Xau,Z.; Pan.L.; Wu,C.J .Mater.Sci.Mater.Med. 2004, v.5, p.671.

Daculsi,G.; **Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute.** Biomaterials. 1998, v.19, p. 1473-1478.

Daculsi,G.; Passuti,N.; **Effect of the macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics.** Biomaterials. 1990, v.11, p.86-7.

Daculsi, G.; Passut, N.; Martin, S.; Deudon, C.; and Legeroz,R.Z.; **Macroporous calcium phosphate ceramic for long bone surgery in human and dogs.** Clinical and histological study. J. Biomed. Mater. Res.,1990c, v.24,p.379-396.

Daculsi. G.; Bagot. D'Arc M.; Corlieu, P.; and Gerdosrff, M, **Macroporous biphasic calcium phosphates efficiency in mastoid cavity obliteration.** Ann. Otl. Rhinol. Laryngol. 1992a, v.101, p.669-674.

Dalton, P.D.; Woodfield, T.; Hutmacher, D.W.; **SnapShot: polymer scaffolds for tissue engineering.** Biomaterials. 2009, v.30, p.2420.

Danielson, C.;Ruault. S.; Simonet. M.; Neuenschwander. P.; Frey. P. **Polyesterurethane foam scaffold for smooth muscle cell tissue engineering.** Biomaterials. 2006, v.27, p.1410-5.

Dai, N.T.; Yeh, M.K.; Chiang, C.H.; Chen. K.C.; Liu,T.H.; Feng, A.C.; et al. **Human single-donor composite skin substitutes based on collagen and polycaprolactone copolymer.** Biochem Biophys Res Commun.2009, v.386 p.21-5.

Duek, E.A.R.; Zavaglia, C. A. C.; Belangero, W. D.; Polymer. 1997,v.40, p.6465.

Donachy, J. E.; Watabe, N.; Showman, R. M. **Alkaline phosphatase and Carbonic anhydride activity associated with arm regeneration in the seaster *Asterias forbesi*.** Mar. Biol. 145. p. 471-476. 1990.

Enderle, R.; Gotz-Neunhoeffler, F.; Gobbels, M.; Muller, F.A.; Greil, P. **Influence of a magnesium doping on the phase transformation temperature of B-TCP ceramics examined by Rietveld refinement,** Biomaterials. 2005,v.26, p. 3379-3384.

Griffon, D.J.; Sedighi, M.R.; Schaeffer, D.V.; Eurell, J.A.; Johnson,A.L. **Chitosan sacaffolds interconnective pore size and cartilage engineering.** Acta Biomaterials. 2006, v.2, p.313-20.

Gybson, I.R.; Akao, M.; Best, S.M.E. Bonfield, W.; **Phase transformations of tricalcium phosphates using high temperature x-ray diffraction.** Bioceramics.1996, v.9, p.173-176.

Hakkarainen, M.; Albertsson, A.C. **Heterogeneous biodegradation of polycaprolactone – low molecular weight products and surface changes.** *Molecular changes and physics.*2002, v.203, p.1357-1363.

Hench, L. L.; Wilson,J. **Introduction to bioceramics.** Singapore: Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 1993, p. 1-13.

Huang, M.H.; Suming, L. Vert, M. **Synthesis and degradation of PLA-PCL-PLA triblock copolymer prepared by successive polymerization of poly(ϵ -caprolactone) and DL- lactide.** *Polymer.* 2004, v. 45, p. 8675-81.

Hulbert, S.F.; Young, F.A.; Matheus, R.S.; Klawitter, J.J.; Talbert,C.D.; Stelling, F.H. **Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses.** *J. Biomed. Mater. Res.* 1970, v.4, p.433-56.

Hutmacher,D.W. **Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage.** *Biomaterials.* 2000, v.21p.2529–43.

Hutmacher, D.W. **Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues-state of the art and the future perspectives.** *J Biomater Sci Polym.*2001, v.12, p. 107-124.

Hutmacher,D.W. **Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage,** *Biomaterials.* 2000, v.21, p.2529–2543.

ISO 10993-5, “**Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: In vitro methods**”, *International Organization for Standardization.*Geneva, 1999, Suíça.

Ignatius, A. A.; Claes, L. E. **Biomaterials.**1996, v.17, p.831.

JCPDS. **International centre for diffractional data.** Versão 1.30, 1997.

Kaushiva, A.; Turzhisky, M. V.; Backman, V.; Ameer.A.G.; **A biodegradable vascularizing membrane: Afeasibility study.** *Acta Biomaterialia.*2007, v.3, p. 631-642.

Kawachi, E.Y.; Bertran,C.A.; Reis, R.R.; dos Santos e Alves, O. L., **Bioceramics., Tendencias e Perspectivas de uma área interdisciplinas.** *Química Nova.* 2000,v.4,p. 518.

Kim, S.S.; Utsunomiya, H.; Koski, J.A.; Wu, B.M.; Cima, M.J.; Sohn. J.; *et al.* **Survival and function of hepatocytes on a novel three-dimensional synthetic biodegradable polymer scaffold with in intrinsic network of channels.** *Ann Suirg* 1988, v.228, p.8-13.

Kim, S.Y.; Lee, Y.M.; Baik,J.S. **Toxic characteristics of poly(ethylene glycol)/poly(ϵ -caprolactona) Nanospheres; in vitro and in vivo studies in the normal mice.** *Biomaterials.*2003, v.24, p.55-63.

Kimura, Y. **Biodegradable Polymers, in: Biomedical Applications of Polymeric Materials.** 1993, p. 163-189, CRC Press (ed.), EUA.

Kikuchi, M.; Suetsugu, Y.; Tanaka, J. Akao, M. **Preparation and mechanical properties of calcium phosphate/copoly-L-lactide composites.** J Mater Sci: Mater Med 1997, v.8, p.361-4.

Kikuchi, M.; Koyama, Y.; Yamada, T.; et al. **Development of guided bone regeneration membrane composed of β -tricalcium phosphate and poly(L-lactide-co-glycolide-co-b-caprolactone) composites.** Biomaterials 2004, v.25, p.5979-86.

Klawitter, J.J.; Hulbert, S.F. **Application of porous ceramics for the attachment of load-bearing internal orthopedic applications.** J. Biomed Mater Res Symp, 1971, v.2, p. 161-8.

Koh, Y.H.; and Halloran, J.W. J.Am. Ceramics Soc. 2004, v.87, p.1575

Khor, H.L.; Schants, J.T.; Phan, T-T.; Lim, T.C.; Teoh, S.H.; Hutmacher, D.W. **Poly(ϵ -caprolactone) films as a potential substrate for tissue engineering epidermal equivalent.** Materials Science and Engineering. 2002, v.20C, p.71-75.

Kweong, H.Y.; Yoo, M.K.; Park, I.K.; Kim, T.H.; Lee, H.C.; Lee, H-S.; Oh, J-S.; Akaike, T.; Cho, C-S. **A novel degradable poly(ϵ -caprolactone) networks for tissue engineering.** *Biomaterials.* 2003, v.24, p.801-808.

Lee, S.H.; Kim, B.S.; Kim, S.H.; Choi, S.W.; Jeong, S.I.; Kwon, I.K.; et al. **Elastic biodegradable poly(glycolide-co-caprolactone) scaffold for tissue engineering.** J Biomed Mater Res Part A. 2003, v. 66, p.29-37.

Lee, S. H.; et al. **Elastic biodegradable poly (glycolide-co-caprolactone) scaffold for tissue engineering.** J. Biomed. Mater. 1983. ater. Res. 2003 Part A 66, 29-37.

LeGeros, R.Z.; **Calcium phosphates in oral biology and medicine.** Meyers, São Francisco. 1991.

LeGeros, R.Z.; LeGeros, J.P. **Calcium phosphate biomaterials in medical application.** Bioceramics. 1996, v.9, p.7-10.

Leonor, L.B.; Souza, R. A.; Cunha, A. M.; Reis, R. L.; Zhong, Z. P.; Greenspan, D.; **Novel starch thermoplastic/Bioglass composites: Mechanical properties, degradation behavior and in-vitro bioactivity.** Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2002, v.13, p. 939-45.

Le-Ray, A-M.; Chiffolleau, S.; Iooss, P.; Grimandi, A.; Gouyette, A.; Daculsi, G.; Merle, C. **Vancomycin encapsulation in biodegradable poly(ϵ -caprolactone) microparticles, for bone implantation. Influence of the formulation process on size, drug loading, in vitro release and cytocompatibility.** *Biomaterials.* 2003, v.24, p.443-49.

Li, S. **Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids.** *Journal of Biomedical Materials Research.* 1999, v.48, n.3, p. 342-353.

- Li, W.-J., Tuli, R., Okafor, C., Derfoul, A. Danielson, K. G., Hall, D. J., Tuan, R. S. **A three dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells.** *Biomaterials*. 2005, v. 26, p. 599–609.
- Li, X.; Sogo, Y.; Ito, A.; Mutsuzaki, H.; Ochiai, N.; Kobayashi, T.; Nakamura, S.; Yamashita, K.; LeGeros, R.Z. **The optimum zinc content in set calcium phosphate cement for promoting bone formation in vivo.** *Materials Science and Engineering*, 2009, v. 29, p.969–975.
- Lichun Lu.; Susan J. Peter, Michelle D. Lyman, Hui-Lin Lai, Susan M. Leite, Janet A. Tamada, Shiro Uyama, Joseph P. Vacanti, Robert Langer, Antonios G. Mikos. **In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams.** *Biomaterials*.2000, v. 21, p.1837-1845.
- Lombello, R.A.; Forni-Martins, e.R.; **Cytological studies in climbers of a brazilian forest reserve.** *Cytologia*, tóquio, 1998, v.63, p.415-420.
- Lombello,C.; Reis Junior, G.M.; Cohen, M. **Estudo da viabilidade da cultura de condrócitos humanos visando aplicação clínica para o transplante autólogo.** *Eisntein*. 2003, v.1, p.84-88.
- Lu, L.; Garcia.C.A; Mikos, A.G. **In vitro degradation of thin poly (DL-lactic-co-glycolic acid).** *J Biomed Mater Res*, 1999, v.46, p.236-44.
- Lu, L.; Peter, S.J.; Lyman, M.D.; Lai, H.; Leite, S.M.; Tamada, J.J.; Vacanti, J.P.; Langer, R.; Mikos, A.G. **In vitro degradation of porous poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) foams.** *Biomaterials*, 2000, v.21, p.1837-45.
- Lucas, E. F.; Soares, B. G.; & Monteiro, E. – **Caracterização de polímeros**, e-papers, Rio de Janeiro 2001.
- Lucchesi, C.; Ferreria, B. M. P. Duek, E. A. R.; Joazeiro, P. P. **Surface Modification Of Phbv Affects Inicial Cell Attachment, Cell Morfology And Cell Growth.** *Anais Do Xx Congresso Da Sociedade Brasileira De Microscopia E Microanálises*. Águas De Lindóia, SP. Brasil, 2005.
- Mano, J.F.; Silva, G.A.; Azevedo, H.S.; Malafaya, P.B.; Sousa, R.A.; Silva, S.S.; Boesel, L.F.; Oliveira, J.M.; Santos, T.C. Marques, A.P.; Neves, N.M.; and Reis.R.L. **Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends.** *Review J. R. Soc. Interface*. 2007, v.4, p.999–1030.
- Mariani, Pilar Drummont Sampaio Correa, Tese Mestrado, **Estudo da biodegradação da blenda poli (ε-caprolactona) e amido modificado em meios sólidos e líquidos.** Campinas. São Paulo. 2006.
- Middleton, J.C.; Tripton, A.J. *Biomaterials*, 2000, v.21, p.2335-2346.

Mirtchi, A.A.; Lemaitre, J.; Terao, N. **Calcium phosphate cements: study of the tricalcium phosphate-monocalcium phosphate system.** *Biomaterials*, 1989, v.10, p.475-80.

Mikos, A.G., Thorsen, A.J., Czerwonka, L.A. **Preparation and characterization of poly (l-lactic acid) foams.** *Polymer*. 1994, v.35, p.1068-1077.

Mikos, A.G., Sarakinos, G. Lyman, M.D. et al. **Prevascularization of porous biodegradable sponges.** *Biotech Bioeng.* 1993, v.42, p.716-723.

Mondrinos, M.J.; Dembzyński, R.; Lu, L.; Byrapogu, V.K.C.; Wootton, D.M.; Lelkes, P.I.; Zhou, J. **Porogen-based solid freeform fabrication of polycaprolactone-calcium phosphate scaffolds for tissue engineering,** *Biomaterials* 2006, v.27, p.4399-4408.

Mooney, D.J.; Mazzoni, C.L.; Breuer, C.; McNamara, K.; Hern, D.; Vacanti, J.P. Langer R. **Stabilized polyglycolic acid "bre-based tubes for tissue engineering.** *Biomater* 1996, v.17, p.115-24.

Mooney, D.J., Sano, K.; Kaufmann, P.M.; Majahod, K.; Vacanti, B.J.P.; Langer, R.; **Long-term engraftment of hepatocytes transplanted on biodegradable polymer sponges,** *J. Biomed. Mat. Res.* 1997, v.37 p.413–420.

Mooney, D.J.; Kaufmann, P.M.; Sano, K.; Schwendeman, S.P.; Majahod, K.; Schloo, B.; Vacanti, J.P.; Langer, R. **Localized delivery of epidermal growth factor improves the survival of transplanted hepatocytes,** *Biotech. & Bioeng* 1996, v.50, p. 422–429.

Mooney, D.J.; Baldwin, D.F.; Suh, N.P.; Vacanti, J.P.; Langer, R. **Novel approaches to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents,** *Biomaterials* 1996, v.17 p.1417–1422.

Mooney, D.J., Park, S., Kaufmann, P.M. et al. **Biodegradable sponges for hepatocyte transplanstation.** *J. Biomed. Mater. Res.* 1995, v.29, p.959-966.

Mooney, D.J., Kaufmann, P.M., Sano, K. *et al.* **Transplantation of hepatocytes using porous, biodegradable sponges.** *Transplant Proc.* 1994, v.26, p.3425-3426.

Moore, M. J.; Jabbari, E.; Ritman, E. L.; Lu, L. C. Currier, B. L., Windebank, A. J. & Yaszemski, M. J. **Quantitative analysis of interconnectivity of porous biodegradable scaffolds with micro-computed tomography.** *J. Biomed. Mater. Res.* 2004 Part A 71, 258–267.

Moraes, P.C.; Filho, J.G.P.; Canola, J.C.; Santos, L.A.; Macoris, D.G.; Alessi, A.C.; Castro, M.B.; Neto, F.A.D. **Biocompatibilidade do cimento de fosfato de cálcio implantado na rádio de coelhos.** *Acta Cir Bras.* 2004, v.19, p.351-359.

Mosmann, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *J Immunol Methods.* 1983, 16, 55-63.

Nasseri, B.A; Ogawa, K. and Vacanti, J. **Tissue engineering: An evolving 21st-century science to provide biologic replacement for reconstruction and transplantation**, Surgical research review, 2001, v. 130, p.781-784.

Oh, S.H.; Park,I.K.; Kim, J.M.; Lee, J. H. **In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method** Biomaterials 2007, v.28, and p.1664-1671.

Oréface, R.L.; Pereira, M.M. Mansur, H.S. *Biomateriais Fundamentos e Aplicações*. Cultura Médica. 2006.

Orii, H.; Sotome, S.; Chen. J.; Wang. J.; S, K. **Beta tricalcium phosphate (beta-TCP) graft combined with bone marrow stromal cells (MSCs) for posterolateral spine fusion**. J.Med.Dent. Sci. 2005, v.52, p.51-57.

Park, S. H.; Lim, S. T.; Shin, T. K.; Choi, H. J.; Jhon, M. S. Polymer. 2001, v.42, p.5737.

Peña, J.; Corrales, T.; Izquierdo-Barba,I.; Doadrio,A.L.; Vallet-Regi,M **Long term degradation of poly(ϵ -caprolactone) films in biologically related fluids**, Polymer Degradation and Stability. 2006,v.91,p.1424-1432.

Pitt, C.G.; Chasalow,F.I.; Hibionada, Y.M.; Klimas, D.M.; Chindler, A.S. J Appl.Poly. Sci., 1981, v.26 p.3779.

Ratner, B. D.; Hoffman, A.; Schoen, F. J.; Lemons, J. E. **Biomaterials Science:An Introduction to Materials in Medicine**. Academic Press, London, 1996.

Raimo, M. **Kinematic analysis of growth and coalescence of spherulites for predictions on spherulitic morphology and on the crystallization mechanism**, *Prog. Polym. Sci.*, 2007,v.32,p.597–622.

Reis, R. L.; Cunha, A. M. J. Mat. Sci.: Materials in Medicine. 1996, v.6, p.786.

Riddle, K. W.; Mooney, D. J. **Role of poly(lactide-co-glycolide) particle size on gas-foamed scaffolds**. J. Biomater. Sci. Polym.2004 Ed. 15, 1561–1570.

Robinson, B.P.; Hollinger, J.O.; Szachowics, E.H.; Brekke, J.; **Calvarial bone repair with porous D,L-polyacide.Otolaryngol** Head Neck Surg,1995,v.112,p.707-13.

Ryu, H.S.; Youn. H. J.; Hong, K.S.; Chang. B. S.; Lee, O.K.; Chung, S.S. **An improvement in sintering property of β -Tricalcium phosphate by addition of calcium pyrophosphate**, Biomaterials.2000, v.23, p. 909-914.

Salem, A.K.; Stevens, R.; Pearson, R.G.; Davis, M.C.; Tendler, S.J.; Roberts, C.J.; et al. **Interactions of 3T3 fibroblasts and endothelial cells with defined pore freatures**. J. Biomed Mater Res. 2002, v.61, p. 212-7.

Salgado, C.L; **Desenvolvimento de matrizes tridimensionais poliméricas para aplicação em engenharia de tecido ósseo.** Faculdade de engenharia mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2009. tese doutorado p.164.

Santos, C.A.; Freedman, B.D.; Leach, K.J.; Press, D.L.; Scarpulla, M.; Mathiowitz, E. **Poly(fumaric-co-sebacic anhydride): a degradation study as evaluated by FTIR, DSC, GPC and X-ray diffraction.** *Journal of Controlled Release.* 1999, v.60, p.11-22.

Santos, L.A. **Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área medico-odontológico,** Faculdade de engenharia mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2002. tese de doutorado.

Schüssele, Andrea, **Drug delivery to the bone-implant interface: Functional hydroxyapatite surfaces and particles,** 2006 tese doutorado, p. 164.

Serrano, M.C.; Pagani, R.; Vallet-Regí, M.; Peña, J.; Rámila, A.; Izquierdo, I.; Portolés, M.T. **In vitro biocompatibility assessment of poly(epsilon-caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts.** *Biomaterials.* 2004, v.25, p.5603-11.

Silva, G.A.; Costa, F. J.; Coutinho, O. P.; Radin, S.; Ducheyne, P.; Reis, R.L.; **Synthesis and evaluation of novel bioactive composite starch/bioactive glass microparticles.** *Journal Biomedical Material Research.* 2004, v.70A, p. 442-49.

Sjogren, G.; Sletten, G.; Dahl, J.E. **Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by Milipore filter, agar overlay, and MTT tests.** *The Journal of Prosthetic Dentistry.* 2000, v.84, n.2, p.229-236.

Solvay caprolactones. Disponível em <http://www.solvays.com/capa>, 1998, acesso em 14/07/2010.

Tsuji, H.; Ikada, Y. **Properties and morphology of poly(L-lactide). Effects of structural parameters on long term hydrolyses of poly(L-lactide) in phosphate-buffered solution.** *Polymer Degradation and Stability.* 2000, v.67, p.179-189.

Vanin, M.; Santana C. C.; Torriani Í. L.; Privelic T. Duek E. A. R., **In vitro study of degradation of poly(beta-hydroxybutyrate) (PHB) / poly(L-lactic acid) (PLLA) blends in the form of films.** *Polímeros.* 2004, v.14, p. 187-193.

Vert, M. & Li, M. S., Spenlehauer, G., Guerin, P. **Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters.** *Journal of Materials Science.* 1992, v.3, p. 432-436.

Wang, S.; Lu, L.; Gruetzmacher, J.A.; Currier, B.L.; Yaszemski, M.J. **Synthesis and characterizations of biodegradable and crosslinkable poly(epsilon-caprolactone fumarate), poly(ethylene glycol fumarate), and their amphiphilic copolymer.** *Biomaterials.* 2006, v.27, p 832-841.

Wintermatel, E., Mayer, J., Blum, J., Eckert, K.I., Luscher, P., Mathey, M. **Tissue engineering scaffolds using superstructures.** Biomaterials. 1996, v.17, p.83-91.

Willians, D.F.; **Definitions in biomaterials**, Progress in Biomedical Engineering. 1987, v.4.

Yannas, I.V., Lee, E., Orgill, D.P., Skrabut, E.M., Murphy, G.F., **Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin.** Proc Natl Acad Sci USA. 1989, v. 86, p. 933-7.

Yang, S., Leong.K.F., Du Z., Chua C.K., **The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors.** Tissue Eng. 2001, v 7, p. 679-89.

Yang, X.; Wang, Z. **Synthesis of biphasic ceramics of hydroxyapatite and b-tricalcium phosphate with controlled phase content and porosity.** J. Mater. Chem., 1998, v.8, p.2233–2237.

Yang, Z.; Yuan, H.; Zou, P.; Tong, W.; Qu, S.; Zhang, X. **Osteogenic responses to extraskelally implanted synthetic porous calcium phosphate ceramics: an early stage histomorphological study in dogs.** J Mater Sci: Mater Med. 1997, v.8, p.697-701.

Zardiackas, L.D.; Parsell, D.E.; Dillon, L.D.; Mitchell, D.W.; Nunnery, L.A.Poggie R. **Structure, metallurgy, and mechanical properties of a porous tantalum foam.** J Biomed Mater Res. 2001, v.58, p.180-7.

Zavaglia, C.A.C.; **O uso de bioceramicas em próteses ortopédicas.** Tese de livre docência, Universidade Estadual de Campinas, 1993.

Zelttinger, J.; Sherwood. K, J.; Graham, D.A.; Mueller, R.; Griffith,L.G. **Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition.** Tissue Engineering 2001, v.7, p.557-72.

Zhang, Y.; Leblanc-Boily, V.; Zhao, Y. Prud'homme RE. Polymer. 2005, v. 46, p.8141.

Zhang, L.; Xiong, C.; Deng, X. J Appl Polym Sci. 1995, v.56, p.103.

Zhang, X. **A study of porous blocks HA ceramics, its osteogenesis.** In: Ravaglioli AA, Krajewski A, editors. Bioceramics and the human body. Amsterdam: Elsevier Science, 1991. p. 408-15.

Zhang, J. C.; Wu, L. B.; Jing, D. Y.; Ding, J. D. **A comparative study of porous scaffolds with cubic and spherical macropores.** Polymer. 2005, v.46, 4979–4985.

Zyman, Z. Z.; Tkachenko, E. M.V.; Polevodim, E. D. V. J. Mater. Sci: Mater Med. 2008, v.19,p. 2819-2825.