



**Guinea Brasil Camargo Cardoso**

**Desenvolvimento de matriz tridimensional  
compósita de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) e cerâmica  
bioativa para aplicação em engenharia  
tecidual.**

38/13

**CAMPINAS  
2013**



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA

Guinea Brasil Camargo Cardoso

# **Desenvolvimento de matriz tridimensional compósita de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) e cerâmica bioativa para aplicação em engenharia tecidual.**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Mecânica, na Área de materiais e processos de fabricação.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA  
GUINEA BRASIL CAMARGO CARDOSO, E ORIENTADA PELA  
PROFA DRA CECÍLIA AMÉLIA DE CARVALHO ZAVAGLIA.

ASSINATURA DA ORIENTADORA

CAMPINAS  
2013

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura  
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

C179d Cardoso, Guinea Brasil Camargo, 1986-  
Desenvolvimento de matriz tridimensional compósita de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) e cerâmica bioativa para aplicação em engenharia tecidual. / Guinea Brasil Camargo Cardoso. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia.

Coorientador: Antonio Celso Fonseca de Arruda.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

1. Engenharia tecidual. 2. Poli (e-caprolactona). 3. Hidroxiapatita. 4. Surfactantes. 5. Células- tronco. I. Zavaglia, Cecília Amélia de Carvalho, 1954-. II. Arruda, Antonio Celso Fonseca de, 1948-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Development of three-dimensional matrix composite of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) and bioactive ceramic for use in tissue engineering.

**Palavras-chave em inglês:**

Tissue engineering

Poly ( $\epsilon$ -caprolactone)

Hydroxyapatite

Surfactants

Stem cells

**Área de concentração:** Materiais e Processos de Fabricação

**Titulação:** Doutora em Engenharia Mecânica

**Banca examinadora:**

Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia [Orientador]

Christiane Bertachini Lombello

Eliana Cristiana da Silva Rigo

Marcos Akira d'Ávila

Maria Clara Filippini Ierardi

**Data de defesa:** 27-02-2013

**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**

**TESE DE DOUTORADO**

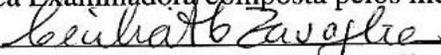
**Desenvolvimento de matriz tridimensional  
compósita de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) e cerâmica  
bioativa para aplicação em engenharia  
tecidual.**

Autora: Guinea Brasil Camargo Cardoso

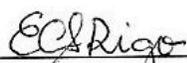
Orientadora: Professora Dra Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia

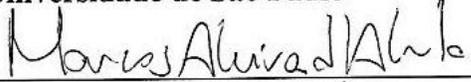
Co-orientador: Professor Dr. Antonio Celso Fonseca de Arruda

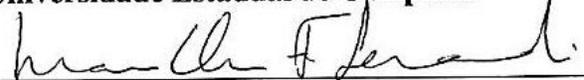
A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Tese:

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Cecilia Amélia de Carvalho Zavaglia, Presidente**  
Universidade Estadual de Campinas

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Christiane Bertachini Lombello**  
Universidade Federal do ABC

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Eliana Cristina da Silva Rigo**  
Universidade de São Paulo

  
\_\_\_\_\_  
**Prof Dr. Marcos Akira d'Ávila**  
Universidade Estadual de Campinas

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra Maria Clara Filippini Ierardi**  
Universidade Estadual de Campinas

Campinas, 27 de fevereiro de 2013.

## **Agradecimentos**

A todos que participaram do desenvolvimento desse projeto.

Ao órgão Fapesp pelo investimento e confiança no projeto de pesquisa (projeto número 2009/54546-9).

A Capes e CnPQ pelos equipamentos e recursos.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Biofabris pela possibilidade de recursos.

Aos colegas e ex-colegas do Labiomec os quais tenho um carinho especial.

A Professora Sara Saad, Adriana Duarte e Pedro Rego-Bordeux pela parceria com os estudos de célula tronco.

Aos Professores Claudio Miglaressi, Gerald Cote e Roland Kaunas pela oportunidade em trabalhar com sua equipe e permitir o imenso aprendizado conquistado durante os estágios, tanto em conteúdo relacionado a tese quanto o pessoal.

A Professora Cecília Zavaglia pelo carinho, apoio e confiança durante todo o processo de desenvolvimento do projeto.

Agradeço em especial aos meus pais Luiz e Elaine, pela paciência, calma e instruções nessa etapa de vida, as minhas irmãs Mariana e Gilda por diariamente me fazerem sentir única e muito especial, e ao meu namorado Erick pelos conselhos e apoio.

## Resumo

A variedade de sítios anatômicos e diferentes propriedades mecânicas são essenciais para o êxito em cirurgias de reconstrução óssea, com isso tratamentos envolvendo fraturas complexas, perda óssea e próteses são beneficiadas com o uso dos biomateriais. Com o presente estudo, buscou-se uma proposta original no uso de um biomaterial compósito para implantes na região da mandíbula, a singularidade deste dispositivo é a estrutura física do material, que é composto por um núcleo denso em uma matriz porosa. As influências das estruturas e dos materiais utilizados foram analisadas por caracterizações físicas, químicas e as atividades celulares em ensaios *in vitro*, analisando o comportamento dessas em condições similares ao ambiente de implantação o que permitiu qualificar este biomaterial. Para tanto, foram sintetizados reagentes primários para a síntese de fosfato tricálcico ( $\alpha$ -TCP), que ao ser hidrolisado resultou em *whiskers* de hidroxiapatita. As cerâmicas foram caracterizadas pelas análises de difração de raios X (DRX), fluorescência de raios X (FRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ensaio de citotoxicidade. As diversas composições poliméricas e compósitas foram analisadas utilizando os resultados obtidos pelos ensaios de ângulo de contato, calorimetria exploratória diferencial (DSC), microscópio de força atômica (MFA), microscopia óptica com luz polarizada (MO), ensaio mecânico de tração e ensaios *in vitro* com células U20S. Os suportes tridimensional passaram por análises como de: ensaio mecânico de compressão e ensaios *in vitro* com células tronco mesenquimais. Os estudos foram realizados para a verificação do potencial de aplicação clínica desse material na engenharia tecidual óssea. As amostras que se apresentaram mais promissoras foram as de composições poli ( $\epsilon$ -caprolactona)/ ácido oleico/ hidroxiapatita e poli caprolactona/ ácido oleico. Resistência mecânica, hidrofiliabilidade, rugosidade, cristalinidade, espraiamento celular e osteoindução foram os critérios utilizados neste trabalho. Os resultados obtidos demonstraram-se promissores e irão incentivar pesquisas futuras envolvendo estes materiais.

*Palavras Chave:* Engenharia tecidual; Poli ( $\epsilon$ -caprolactona); Hidroxiapatita; Surfactantes; Célula tronco.

## Abstract

The variety of anatomical sites and different mechanical properties are essential to the success of surgery bone reconstruction. Treatments involving this complex fractures, bone loss and prosthetics are benefited with the use of biomaterials. In the present study, we sought to an original use of a composite biomaterial for implants in the jaw area, the uniqueness of this device is the physical structure of the material, which is composed of a dense core in a porous matrix. The influences of structures and materials were analyzed by characterizing the physical, chemical and cellular activities in in vitro assays, analyzing the behavior of those in similar conditions to the deployment environment which would allow qualifying this biomaterial. Therefore, primers were synthesized reagents for the synthesis of tricalcium phosphate ( $\alpha$ -TCP), which when hydrolyzed resulted in hydroxyapatite whiskers. The ceramics were characterized by analysis of X-ray diffraction (XRD), X-ray fluorescence (XRF), scanning electron microscopy (SEM) and cytotoxicity assay. The various compositions were analyzed using the results obtained by contact angle tests, differential scanning calorimetry (DSC), atomic force microscope (AFM), optical microscopy with polarized light (OM), mechanical tests and in vitro assays with cells U20S. The scaffolds have undergone analyzes as: mechanical compression test and in vitro assays with mesenchymal stem cells. Studies were conducted to verify the potential clinical application of this material in bone tissue engineering. Because the analysis of the results of the characterizations, the samples which were the most promising compositions of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) / oleic acid and poly( $\epsilon$ - caprolactone)/ oleic acid/ hydroxyapatite. Mechanical strength, hydrophilicity, roughness, crystallinity, cell spreading and osteoinduction were the criteria used in this work. The results showed to be promising and will encourage future research involving these materials.

Key words: Tissue engineering; poly ( $\epsilon$ -caprolactone); hydroxyapatite; surfactants; stem cells.

## Lista de ilustrações

|  |    |
|--|----|
| Figura 3.1: Estrutura química da poli ( $\epsilon$ -caprolactona).....   | 10 |
| Figura 3.2: Molhamento da superfície: A - superfície hidrofóbica; B- superfície hidrofílica (Supova, 2009).....  | 19 |
| Figura 3.3: Células tronco MSC- célula tronco mesenquimal e os tipos de tecidos que podem se diferenciar.....  | 23 |
| Figura 4.1: Fluxograma da síntese dos <i>whiskers</i> de hidroxiapatita. ....  | 28 |
| Figura 4.5: Fluxograma amostra porosa com núcleo denso.....  | 34 |
| Figura 4.2: Fluxograma caracterizações das membranas e suas composições.....   | 30 |
| Figura 4.3: Fluxograma da fabricação das amostras, pelo método <i>casting</i> .....  | 32 |
| Figura 4.4: Fluxograma preparação dos corpos porosos e densos.....   | 32 |
| Figura 4.6: Foto do equipamento tensiómetro Wilhelmy.....  | 38 |
| Figura 4.7: Fluxograma do ensaio da avaliação da telomerase. ....  | 45 |
| Figura 5.1: Difratoograma da monetita. ....  | 51 |
| Figura 5.2: DRX do carbonato de cálcio. ....   | 51 |
| Figura 5.3: Difratoograma de raios X do [alfa] TCP.....  | 53 |
| Figura 5.4: DRX da amostra de [alfa] TCP: A- padrão JCPDS 09-0169; B- [Beta]- TCP padrão JCPDS 09-0348; C-amostra [alfa] TCP. ....   | 53 |
| Figura 5.5: Difratoograma de raios X do <i>whiskers</i> de HA.....   | 54 |
| Figura 5.6: Padrão JCPDS (A) comparando seus principais picos com a amostra de <i>whiskers</i> de HA (B).....  | 54 |
| Figura 5.7: Imagem dos <i>whiskers</i> de hidroxiapatita com escala de 200 nm. ....  | 55 |
| Figura 5.8: FT-IR das amostras superior porta amostra; inferior porta amostra com <i>whiskers</i> de hidroxiapatita. ....  | 56 |
| Figura 5.9: Imagens com aumento de 1000x das amostras PCL/HA; PCL/ac/HA e PCL/ <i>span</i> /HA.....  | 57 |
| Figura 5.10: MEV das amostras em contato com o ar e com o vidro, durante processo de evaporação de solvente. Aumentos de 100x e no detalhe de 400 vezes. A- PCL; B-PCL/ <i>Span</i> ; C- PCL/ ácido oleico; D- PCL/ <i>Span</i> / HA; E- PCL/ácido oleico/HA. .... | 59 |
| Figura 5.11: Microscopia óptica com luz polarizada: A- PCL; B- PCL/ácido oleico; C- PCL- <i>Span</i> ; D-PCL/HA; E- PCL/ácido oleico/HA; e F- PCL/ <i>Span</i> / HA. Utilizando lentes objetivas de 5 e 20 X.....  | 61 |
| Figura 5.12: Estrutura química do ácido oleico. ....   | 63 |
| Figura 5.13: Curva tensão deformação do ensaio de tração das membranas. ....   | 65 |
| Figura 5.14: Médias dos valores de modulo de elasticidade dos grupos densos e porosos. ....  | 67 |
| Figura 5.15: Imagens dos diferentes grupos de núcleos densos (A – D1; B- D2; C-D3 e D – D4; 1- 100 $\mu$ m 2- $\mu$ m).....  | 68 |
| Figura 5.16: Difratoograma da amostra de PCL com <i>whiskers</i> de hidroxiapatita.....  | 70 |
| Figura 5.17: FT-IR das amostras de PCL (superior) e PCL/ <i>whiskers</i> de HA (inferior). ....  | 70 |
| Figura 5.18: Porcentagem de porosidade nas amostras.....   | 72 |
| Figura 5.19: Imagem de uma amostra cortada horizontalmente, as flechas mostram o núcleo do interior da área porosa. ....   | 73 |
| Figura 5.20: Estrutura do <i>scaffold</i> : Núcleo denso com a área porosa na região externa. ....   | 73 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 5.21: Resistências mecânicas das amostras com núcleo denso e área porosa e a concentração de hidroxiapatita em peso na área densa (* amostras com $p > 0.05$ ) (S1-25 %w/w; S2- 10% w/w; S3- 15% w/w; S4- 20%w/w). .....   | 76  |
| Figura 5.22: Citotoxicidade da amostra <i>whiskers</i> de hidroxiapatita (Cardoso, et al., 2010).....   | 78  |
| Figura 5.23: Imagens de microscopia confocal, durante os dias 1 3 e 7 de cultura. Amostras A-PCL; B-PCL/ác oleico; C- PCL/ <i>span</i> ; D- PCL/ HA; E- PCL/ác oleico/ HA; F- PCL/ <i>span</i> / HA. Barra de aumento 25 $\mu\text{m}$ . .....  | 81  |
| Figura 5.24: Gráfico espriamento das células após primeiro dia de cultura.....  | 82  |
| Figura 5.25: Microscopia óptica e imunofluorescência de células-tronco mesenquimais após a quarta passagem em lamínulas de vidro. A- foto de microscopia óptica com aumento de 10x (lente objetiva). B-D Fotos de Imunocitoquímica dos marcadores CD105 (vermelho), CD90 (roxo) e CD73 (verde) e nuclear (DAPI-azul), aumento de 40X (lente objetiva). .....  | 84  |
| Figura 5.26: Citometria de fluxo das células-tronco mesenquimais após a quarta passagem. A- Dot-Plot das células, mostrando característica homogênea dessa população. B- Painel de histogramas dos marcadores. Em vermelho está representada a expressão do marcador específico e em branco o controle (IgG com fluorocromo). Observe a expressão dos marcadores CD105, CD90, CD29 e CD73 e ausência de expressão de HLA-DR, STRO-1, CD45, CD14 e CD34. C- Tabela com as médias das porcentagens dos marcadores celulares positivos e negativos (n=6)...  | 85  |
| Figura 5.27: Atividade da telomerase. ....  | 87  |
| Figura 5.28: Cariograma de célula tronco normal (Shaffer, et al., 2013) .....   | 88  |
| Figura 5.29: Cariograma das células MSC, passagem 8 e passagem 10.....  | 89  |
| Figura 5.30: Microscopia óptica de MSC submetidas à diferenciação. A- quarta passagem apresentando morfologia fibroblástica B-C diferenciadas em linhagem adipogênica coradas com Oil Red, mostrando acúmulo de vesículas de lipídios nas células. D diferenciadas na linhagem osteogênica coradas com Alizarin Red S mostrando acúmulo de cálcio formado, E células-tronco mesenquimais em microscopia óptica durante a cultura de diferenciação, mostrando formação de colônias e alinhamento das células com sua estrutura alongada. F-G. diferenciadas em linhagem condrogênica coradas com Alcian blue, observa-se a mudança da morfologia das células (arredondadas) e a produção de matriz com proteoglicanas coradas em azul. Foram utilizadas as lentes objetivas com os aumentos descritos nas imagens..... | 91  |
| Figura 5.31: Imagens de MEV das amostras do grupo I durante os períodos 4, 7, 14 e 21 dias de cultura: A- PCL; B-PCL/ácido oleico; C- PCL/ácido oleico/ HA. Aumento de 400X. ....   | 95  |
| Figura 5.32: Imagens de MEV das amostras do grupo II durante os períodos 4, 7, 14 e 21 dias de cultura: A- PCL/ácido oleico; B- PCL/ácido oleico/ HA. Aumento de 400X. ....   | 97  |
| Figura 5.33: Imagens de MEV das amostras do grupo III durante os períodos 4, 7, 14 e 21 dias de cultura: A- PCL/ácido oleico (poroso/denso); B- PCL/ácido oleico/ HA (poroso/denso). Aumento de 400X. ....  | 99  |
| Figura 5.34: Análise qualitativa da <i>Alizarin Red</i> do grupo I: A-controle; B-PCL; C-PCL/ácido oleico/HA e D- PCL/ácido oleico. ....  | 102 |
| Figura 5.35: Análise qualitativa da <i>Alizarin Red</i> do grupo II: A- controle; B-PCL/ácido oleico (poroso); e C- PCL/ácido oleico/HA (poroso).....   | 103 |
| Figura 5.36: Análise qualitativa da <i>Alizarin Red</i> do grupo III: A- controle; B-PCL/ácido oleico (poroso/denso); C-PCL/ácido oleico/HA (poroso/denso). ....  | 104 |

Figura 5.37: Resultados quantitativos da coloração Alizarin Red (períodos 14 e 21 dias). Grupos com valores de p inferior a 0,05, entre os períodos 14 e 21 dias, ou seja, apresentou diferença estatisticamente). .....105

## Lista de tabelas

|   |    |
|---|----|
| Tabela 3.1: Tipos de solicitação mecânica que atuam nos ossos (Rodrigues, 2003).....  | 6  |
| Tabela 3.2: Classificação das biocerâmicas segundo resposta da interface tecido vivo/implante (Hench, et al., 1993).....    | 12 |
| Tabela 3.3: Diferentes relações Ca/P (Dorozhkin, 2009).....   | 14 |
| Tabela 3.4: Fatores de indução para diferentes tipos celulares (Brown, et al., 2010). ....                                  | 25 |
| Tabela 4.1: Nomenclatura das diferentes amostras e suas composições.....  | 31 |
| Tabela 4.2: Alterações do primeiro método de produção do suporte tridimensional. ....                                       | 33 |
| Tabela 4.3: Diferentes suportes tridimensionais e suas composições.....   | 34 |
| Tabela 4.4: Amostras para ensaio mecânico de compressão.....  | 37 |
| Tabela 4.5: Amostras para ensaio mecânico de compressão.....  | 37 |
| Tabela 5.1: Valores dos elementos obtidos pela análise de FRX da monetita. ....   | 50 |
| Tabela 5.2: Valores retirados da análise do carbonato de cálcio pelo FRX. ....  | 52 |
| Tabela 5.3: Valores da Rugosidade pelo MFA.....   | 72 |
| Tabela 5.4: Resultados da análise de ângulo de contato; ângulo de contato de avanço, recesso e a diferença entre ambos..... | 62 |
| Tabela 5.5: Resultados do ângulo de contato estático.....   | 64 |
| Tabela 5.6: Resultados do ensaio de tração nas membranas. ....  | 64 |
| Tabela 5.7: Resultados indesejáveis das alterações do primeiro método de produção. ....                                     | 72 |
| Tabela 5.8: Temperaturas (Tg/ Tm) determinadas pelo ensaio de DSC. ....   | 75 |
| Tabela 5.9: Resultado do módulo de Young nas amostras porosas com núcleo denso. ....  | 77 |
| Tabela 5.10: Divisão das amostras para melhor discussão das imagens pelo MEV.....   | 92 |

## Lista de abreviaturas e siglas

ADSC- Adipose derived stem cells  
3D - tridimensional  
ACP- Amorfo cálcio fosfato  
ALP - atividade da fosfatase alcalina  
Ca/P relação cálcio e fosforo  
CaPs Fosfato de cálcio  
CDHA- Hidroxiapatita deficiente Cálcio  
DCPA- Hidrogeno fosfato de cálcio  
DCPD- Hidrogeno fosfato de cálcio diidratado  
DRX – Difração de raio X  
DSC- Calorimetria exploratória diferencial  
ECM - matriz extracelular  
ES- Célula tronco embrionária  
FA- Fluorapatita  
FBS - soro fetal bovino  
FN - fibronectina  
FRX- Fluorescência de raios X  
HA- Hidroxiapatita  
HSC- Célula tronco hematopoiética  
KCl- Cloreto de potássio  
MCPM- Diidrogeno fosfato de cálcio monoidratado  
MEV - microscopia eletrônica de varredura  
MMT - montmorilonita  
MO – Microscópio optico  
MSC - células mesenquimais indiferenciadas  
MTT - ensaio de redução do sal tetrazolio  
N<sub>2</sub> - nitrogênio  
NaCl – Cloreto de sódio  
OCP- Fosfato octacálcico  
PBS - Tampão fosfato salino)  
PCL poli (ε-caprolactona)  
PCR - reação da cadeia de polimerase  
PGA- poli (ácido glicólico)  
PH - concentração hidrogênio iônica  
PLA – Poli (ácido lático)  
PLLA- poli (ácido láctico)  
PMMA - poli(metacrilato de metila)  
TCP – Trifosfato de cálcio  
TTCP -Fosfato tetracálcico  
α - Alpha

$\alpha$ -TCP-  $\alpha$ -fosfato tricálcico  
 $\beta$ -TCP-  $\beta$ - fosfato tricálcico

### **Unidades de medidas**

g – Grama  
L - Litro  
mg - Miligrama  
mL - Mililitro  
mm – Milímetro  
 $\mu$ L - Microlitro  
 $\mu$ m – Micrometro

### **Siglas**

ASTM – *American society for testing and materials*  
FDA – *Food and drug administration*  
ISO – Organização internacional para padronização  
IPEN – Instituto de pesquisas energéticas e nucleares  
USP – *United states pharmacopeia*

# SUMÁRIO

|   |  |    |
|---|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO .....   | 1  |
| 2 | OBJETIVOS .....  | 2  |
|   | 2.1. Objetivo geral.....   | 2  |
|   | 2.2. Objetivo específico:.....   | 2  |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....  | 3  |
|   | <b>3.1. Tecido ósseo</b> .....   | 3  |
|   | <b>3.2. Biomateriais</b> .....   | 6  |
|   | 3.2.1. Polímeros Biorreabsorvíveis .....                                   | 8  |
|   | 3.2.2. Biocerâmicas .....  | 12 |
|   | 3.2.3. Materiais compósitos .....  | 18 |
|   | <b>3.3. Fundamentos da Engenharia Tecidual</b> .....                       | 19 |
|   | 3.3.1. Suporte tridimensional ( <i>scaffolds</i> ).....                    | 20 |
|   | <b>3.4. Célula-Tronco</b> .....  | 23 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS.....   | 27 |
|   | <b>4.1. Materiais</b> .....  | 27 |
|   | <b>4.2. Materiais cerâmicos</b> .....                                      | 27 |
|   | 4.2.1. Síntese do $\alpha$ -TCP.....                                       | 27 |
|   | 4.2.2. Obtenção dos <i>whiskers</i> de hidroxiapatita.....                 | 28 |
|   | <b>4.3. Estudos das superfícies e das alterações das composições</b> ..... | 29 |
|   | <b>4.4. Preparação dos núcleos porosos e densos</b> .....                  | 30 |
|   | <b>4.5. Preparação dos suportes tridimensionais</b> .....                  | 33 |
|   | <b>4.6 Técnicas de caracterização</b> .....                                | 35 |
|   | 4.6.1 Difração de raios X.....   | 35 |
|   | 4.6.2 Fluorescência de raios X .....                                       | 35 |
|   | 4.6.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....                      | 35 |
|   | 4.6.4. Espectroscopia de infravermelho (FTIR).....                         | 36 |
|   | 4.6.5 Ensaio mecânico .....  | 36 |
|   | 4.6.7. Porosidade .....  | 38 |
|   | 4.6.8 Ângulo de contato.....   | 38 |
|   | 4.6.6. Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....                    | 39 |
|   | 4.6.7 Microscopia de força atômica (MFA) .....                             | 40 |

|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
| 4.6.8       | Ensaio mecânico de tração .....   | 40        |
| 4.6.9       | Microscopia óptica – luz polarizada (MO) .....  | 40        |
| <b>4.7.</b> | <b>Ensaio preliminares <i>in vitro</i> .....</b>  | <b>41</b> |
| 4.7.1       | Avaliação da biocompatibilidade e citotoxicidade dos <i>whiskers</i> de hidroxiapatita .....  | 41        |
| 4.7.2.      | Ensaio com células de osteosarcoma humana (USO2) .....  | 42        |
| <b>4.8</b>  | <b>Obtenção e diferenciação das células tronco. ....</b>  | <b>43</b> |
| 4.8.1       | Coleta das células. ....  | 43        |
| 4.8.2.      | Expansão e cultura das ADSC.....  | 44        |
| 4.8.3.      | Diferenciação das ADSC .....  | 44        |
| 4.8.4.      | Avaliação de fenótipo celular por citometria de fluxo. ....   | 44        |
| 4.8.5       | Microscópio confocal. ....  | 45        |
| 4.8.6       | Avaliação da atividade da telomerase.....   | 45        |
| 4.8.7       | Citogenética das células tronco. ....   | 46        |
| <b>4.9</b>  | <b>Avaliação <i>in vitro</i> das ADSC nos <i>scaffolds</i>.....</b>   | <b>47</b> |
| 4.9.1       | Análise de <i>alizarin red</i> – para análise de deposição de cálcio. ....  | 47        |
| 4.9.2       | Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....   | 48        |
| <b>5</b>    | <b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>  | <b>50</b> |
| <b>5.1</b>  | <b>Caracterizações dos materiais cerâmicos .....</b>  | <b>50</b> |
| <b>5.2</b>  | <b>Estudo do uso de surfactantes: ensaio de molhabilidade, microscopia de força atômica (MFA), microscopia de varredura (MEV), microscópio óptico com luz polarizada e ensaio de tração das membranas. ....</b> | <b>56</b> |
| <b>5.3.</b> | <b>Caracterização dos núcleos densos. ....</b>  | <b>66</b> |
| <b>5.4.</b> | <b>Caracterização dos núcleos porosos.....</b>  | <b>68</b> |
| <b>5.5.</b> | <b>Caracterização dos suportes tridimensional.....</b>  | <b>69</b> |
| 5.5.1       | Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....  | 74        |
| 5.5.2.      | Resistência Mecânica.....   | 75        |
| <b>5.6</b>  | <b>Ensaio preliminares <i>in vitro</i> .....</b>  | <b>77</b> |
| 5.6.1       | Ensaio de citotoxicidade .....  | 77        |
| 5.6.2       | Ensaio com linhagem U20S.....   | 78        |
| <b>5.7</b>  | <b>Obtenção e caracterização das células-tronco mesenquimais.....</b>   | <b>82</b> |
| 5.7.1       | Citofluxograma.....   | 82        |
| 5.7.2.      | Avaliação da atividade da telomerase.....   | 86        |
| 5.7.3.      | Citogenética.....   | 88        |
| 5.7.4       | Diferenciação das células-tronco mesenquimais.....  | 89        |

|  |     |
|--|-----|
| <b>5.8 Estudos <i>in vitro</i> com scaffolds</b> .....   | 92  |
| 5.8.1 Microscopia eletrônica de varredura -MEV.....  | 92  |
| 5.8.2 Coloração Alizarin Red.....  | 100 |
| <b>6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS</b> .....  | 107 |
| Referências .....  | 109 |
| ANEXO I- Adendo do projeto de pesquisa “Diferenciação de células tronco obtidas de tecido adiposo (ADSC) em condrócito utilizando colágeno do tipo II como suporte para reparo cartilaginoso”..... | 120 |
| ANEXO II- Curva tensão por deformação dos diferentes grupos: A-D0; B-D1; C-D2; D-D3; E-D4. Cada grupo possui 4 replicações.....  | 121 |
| ANEXO III- Curva tensão por deformação dos diferentes grupos de amostras porosas: A-P1; B-P2; C-P3; D-P4.....  | 124 |

# 1 INTRODUÇÃO

Com o avanço da medicina e a evolução nos tratamentos clínicos e cirúrgicos os biomateriais têm uma contribuição importante no cenário mundial, fato este comprovado pela taxa de crescimento de mercado de 11% ao ano o que representa a quantia de 35 bilhões de dólares gerados neste segmento. Dentre os diversos itens comercializados, os transplantes de tecido ósseo ganham destaque com a produção de 2,2 milhões de enxertos anualmente (American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2012). A complexidade envolvida na área de reconstrução óssea exige uma evolução constante dos biomateriais. Fatores como, variedade de sítios anatômicos e propriedades mecânicas são essenciais para o êxito em cirurgias de reconstrução óssea, com isso tratamentos que envolvem fraturas complexas, perda óssea e próteses são beneficiadas com o uso dos biomateriais.

Empresas e universidades aumentaram os investimentos em pesquisas com polímeros biodegradáveis com o foco em aplicações biomédicas. Algumas linhas de pesquisas são bastante promissoras como a criação de tecidos extracorpóreas através de cultivo de células e sua subsequente introdução no organismo; outras utilizam o implante de uma matriz porosa na região danificada, onde se espera a infiltração, adesão, proliferação e diferenciação de células autógenas. Em ambas as técnicas, há necessidade de se desenvolver matrizes com características adequadas e compatíveis com os tecidos vivos. Assim o entendimento da relação entre a estrutura, morfologia, propriedades físicas e mecânicas é o principal objetivo quando se almeja um novo *design* em biomaterial. A estrutura óssea humana possui diversas características intrínsecas a cada região. Mandíbula, tíbia e disco cervical são locais com altas solicitações mecânicas, assim reparos nessas regiões necessitam de biomaterias que suportem tal esforço, usualmente esses materiais devem apresentar resistência mecânica superior a 150 MPa e uma degradabilidade superior a seis meses (Saiz, et al., 2012).

Com o presente estudo, buscou-se uma proposta original para o uso de um biomaterial compósito para implantes na região da mandíbula, a singularidade desse dispositivo é a estrutura física do material, que é composto por um núcleo denso em uma matriz porosa. As influências das estruturas e dos materiais utilizados foram analisadas por caracterizações físicas, químicas e

as atividades celulares em ensaios *in vitro*, analisando o comportamento dessas em condições similares ao ambiente de implantação permitirá qualificar este biomaterial.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo geral propor o desenvolvimento de um substituto ósseo artificial, que possua características biomiméticas à região implantada, focalizando o uso em odontologia na região mandibular. A matriz tridimensional (*scaffold*) foi composta pelo polímero poli ( $\epsilon$ -caprolactona) e a cerâmica bioativa - *whiskers* de hidroxiapatita, com um núcleo denso no interior do *scaffold* poroso.

### 2.2. Objetivo específico:

- Produzir amostras densas do compósito alterando a concentração de polímero/cerâmica, observar sua morfologia e resistência mecânica à compressão;
- Produzir amostras porosas do compósito alterando a concentração de polímero/cerâmica, observar sua morfologia e resistência mecânica à compressão;
- Recobrir as amostras densas com uma camada porosa com o mesmo compósito e analisar sua adesão à área densa;
- Caracterização das propriedades dos *scaffolds* e a influência do núcleo denso na resistência mecânica;
- Avaliar as alterações na morfologia, energia de superfície e rugosidade devido ao uso de dispersantes e avaliar o comportamento de células frente a cada superfície;
- Realizar ensaios *in vitro* e avaliar o comportamento das células em amostras densas e porosas com composições com e sem adição de *whiskers* de hidroxiapatita.

## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1. Tecido ósseo

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

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

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

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

Os osteócitos são as células encontradas no interior da matriz óssea, ocupando as lacunas das quais partem canalículos, sendo que cada lacuna contém apenas um osteócito. Dentro dos canalículos, os prolongamentos dos osteócitos estabelecem contatos através de junções

comunicantes, por onde podem passar pequenas moléculas e íons, de um osteócito para o outro. O pequeno espaço entre os prolongamentos celulares e as paredes dos canalículos estabelece vias de transporte de nutrientes e metabólitos, entre os vasos sanguíneos e os osteócitos situados na profundidade do tecido ósseo (Junqueira, et al., 1999).

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

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

A parte inorgânica da matriz óssea representa cerca de 50% de seu peso. Os íons mais comumente encontrados são o fosfato e o cálcio, além do bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato em pequenas quantidades. O cálcio e o fósforo formam cristais com estrutura de hidroxiapatita. Os íons da superfície do cristal de hidroxiapatita são hidratados, existindo, portanto uma camada de água e íons em volta desse cristal. Essa camada é denominada capa de hidratação facilitando a troca de íons entre o cristal e o líquido intersticial. A parte orgânica é formada por fibras colágenas (95%) constituídas de colágeno do tipo I e por pequena quantidade de proteoglicanas e glicoproteínas adesivas (Cullinane, et al., 2008). Como o osso é uma mistura de fibras tenazes (fibrilas de colágeno do tipo I) e partículas sólidas (cristais de fosfato de cálcio), ele apresenta boa resistência tanto a cargas compressivas quanto a cargas de tração.

O osso pode assumir diferentes morfologias e funções, de acordo com sua localização no esqueleto humano (Cullinane, et al., 2008). O osso cortical, também chamado osso compacto, é duro e forte e pode ser encontradas na superfície de ossos planos ou entre as duas extremidades de ossos longos em mamíferos, onde é característico do córtex ósseo. Logo, o nome osso

cortical. No osso cortical, os canais vasculares são muito estreitos de forma que o osso cortical é macroscopicamente sólido. Por outro lado, no osso trabecular esses canais são muito mais largos, variando de um milímetro a um centímetro ou mais de diâmetro (Kreider, et al., 2009).

Apesar de sua resistência às pressões e da sua dureza, o tecido ósseo é muito maleável, sendo capaz de remodelar sua estrutura interna em resposta a modificações nas forças a que está submetido. Um exemplo dessa plasticidade é a perda de um elemento dentário na arcada dentária, como o osso dessa região está sem a carga mastigatória que era acostumada a ter, com o passar dos anos esta região óssea acaba atrofiando, reduzindo a quantidade óssea tanto em altura como em espessura (Peterson, et al., 1942). O esqueleto contém 99% do cálcio do organismo e funciona como uma reserva desse íon. Ocorre um intercâmbio contínuo entre o cálcio do plasma e o dos ossos. O cálcio absorvido da alimentação é depositado no tecido ósseo, para manter esse equilíbrio. Existe um mecanismo duplo de mobilização do cálcio depositado nos ossos. Um dos mecanismos é representado pela simples transferência dos íons dos cristais de hidroxiapatita para o líquido intersticial, do qual o cálcio passa para o sangue. Sendo puramente físico é favorecido pela grande superfície dos cristais de hidroxiapatita e tem lugar principalmente no osso esponjoso (Oréfice, et al., 2006).

As propriedades mecânicas descrevem o comportamento do material quando sujeito às tensões externas. Deste modo, para a determinação das propriedades mecânicas do tecido ósseo é necessário que ele seja submetido a ensaios mecânicos. Como por exemplo, o ensaio mecânico à compressão, o qual uma tensão produz contração e deformação em amostras cilíndricas de osso cortical. Na tabela 3.1 observam-se os diferentes tipos de solitação mecânica que atuam em ossos (Rodrigues, 2003).

**Tabela3.1:** Tipos de solicitação mecânica que atuam nos ossos (Rodrigues, 2003).

| <b>Solicitação Mecânica</b> | <b>Efeito da solicitação mecânica no osso e sua ocorrência</b>   |
|-----------------------------|--|
| <b>Compressão</b>           | Tende a diminuir o comprimento e aumentar a largura do osso. Nas vértebras dos membros inferiores.   |
| <b>Tração</b>               | Tende a aumentar o comprimento e separar as partes. Na suspensão em barra.   |
| <b>Flexão</b>               | Atua através de um momento de força que age em um plano contendo o eixo longitudinal. As forças dos músculos atuando nos ossos longos.             |
| <b>Torção</b>               | Atua através de um momento de força que age em um plano perpendicular ao eixo longitudinal do osso. Nas fraturas de tibia.                         |
| <b>Cisalhamento</b>         | Atua quando cargas são aplicadas de forma transversal à superfície da estrutura e são contrárias entre si. Nas fraturas do osso esponjoso e fêmur. |

### 3.2. Biomateriais

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

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

Para que um biomaterial seja eficiente, ele necessita apresentar uma propriedade de biocompatibilidade, ou seja, esse não pode gerar uma resposta danosa ao organismo. Assim, um biomaterial e seus produtos de degradação devem ser tolerados pelos tecidos envoltórios e não acarretarem prejuízos ao organismo a curtos e longos prazos. Para afirmar que um material é

biocompatível, atualmente existem normas padronizando ensaios e análises que verificam as respostas dos biomateriais aos organismos. Os danos são observados e classificados, segundo os conceitos de algumas normas como a *American Society for Testing Materials* (ASTM), a *International Standards Organization* (ISO) e a *United States Pharmacopeia* (USP).

Tendo em vista que a biocompatibilidade é uma propriedade importante para o uso humano de biomateriais, fica evidente a necessidade do estudo *in vitro* e *in vivo* do comportamento celular na interface com esses materiais. A norma ISO 10993-5, sob o título geral de *Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos*, apresenta como o principal objetivo a proteção de humanos, com a sua função de servir como uma armação para o planejamento das avaliações biológicas que minimizem o número e exposição de animais (ISO, 2009).

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

O sucesso de um biomaterial e ou de sua implantação está relacionada às propriedades de biocompatibilidade e biofuncionalidade, e não menos importante, a condição do sítio receptor e a competência do cirurgião que implanta e monitora a preservação. Os biomateriais são utilizados em diferentes aplicações, sendo destinados à substituição de tecidos moles, substituição de tecidos duros e materiais para substituições nos sistemas cardiovasculares.

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

Muitas vezes, ao substituir o tecido ósseo, são utilizados materiais chamados de bioativos, ou seja, promovem ligações de natureza química entre material e tecido ósseo, em função da similaridade química entre estes materiais e a parte mineral óssea, ocorrendo uma osteocondução. Exemplos de materiais bioativos são alguns fosfatos de cálcio, como a hidroxiapatita.

Os biotoleráveis são materiais tolerados pelo organismo, ou seja, em sua presença, há a formação de uma camada de tecido fibroso em seu redor. De acordo com a espessura desta camada será definida a toxicidade do material aos tecidos e o efeito no organismo. Exemplos destes são praticamente todos os polímeros sintéticos e grande parte dos metais. No entanto,

quando essa camada fibrosa apresenta-se extremamente fina, praticamente inexistente esse material será classificado como bioinerte, ou seja, o material libera uma quantidade mínima de qualquer tipo de componente. São os mais utilizados a alumina, zircônia, titânio, ligas de titânio e carbono.

Quando os materiais, após certo período de tempo em contato com o tecido forem degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo serão chamados de biorreabsorvíveis. Estes materiais são de extremo interesse em aplicações nas quais não é desejável outra intervenção cirúrgica, tal como na engenharia tecidual. São materiais como a poli ( $\epsilon$ -caprolactona), o  $\beta$ - fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) o  $\alpha$ -fosfato tricálcico ( $\alpha$ -TCP).

### 3.2.1. Polímeros Biorreabsorvíveis

Os polímeros são materiais orgânicos ou inorgânicos, cujas estruturas são formadas por unidades de repetição, os meros, unidos por ligações covalentes. Entre os polímeros que são utilizados há mais de duas décadas na área médica, estão os poli ( $\alpha$ -hidróxi ácidos), que são considerados uma das famílias de polímeros mais promissoras na área dos biorreabsorvíveis. Sua grande vantagem está em sua forma de degradação que ocorre por hidrólise de suas ligações ésteres. Como exemplo são o poli (ácido láctico) (PLA), o poli (ácido glicólico) (PGA) e o poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), estas substâncias obtiveram a aprovação pelo “Food and Drug Administration” (FDA).

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

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

Os polímeros biodegradáveis são aqueles nos quais ocorre degradação macromolecular, porém sem a eliminação dos produtos e subprodutos pelo organismo, ao contrário dos bioerodíveis, que são caracterizados por uma perda de massa, sendo os produtos e subprodutos reabsorvidos pelo organismo.

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

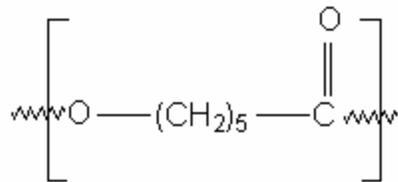
Alguns fatores podem influenciar na degradação polimérica são eles: o local de implantação do implante, solicitação mecânica, massa molar, distribuição da massa molar, composição química, cristalinidade, morfologia, entre muitos outros (Middleton, et al., 2000). A cristalinidade dos polímeros mostra-se relacionada à velocidade de degradação, devido à disposição espacial das cadeias poliméricas, assim o efeito de cristalinidade influi na taxa de absorção de água pelo polímero. A degradação polimérica ocorre em duas etapas, primeiramente consiste na penetração e difusão das moléculas de água nas regiões amorfas do material, e subsequente à cisão hidrolítica das ligações ésteres das cadeias. Posteriormente, quando uma considerável região amorfa está degradada, prossegue para regiões cristalinas. Nesse momento, ocorre um aumento da cristalinidade devido a rearranjos das cadeias de menor massa molar que são originadas no processo de degradação (Duek, et al., 1999).

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

### 3.2.1.1 PCL

A poli ( $\epsilon$ - caprolactona), ou policaprolactona (PCL) é um polímero sintético biocompatível, possuindo uma fórmula química apresentada figura 3.1. Apresenta um caráter hidrofóbico (Amass, et al., 1998), pertence à família dos poliésteres alifáticos, sendo sintetizado por meio de polimerização por abertura de anel de  $\epsilon$ - caprolactona, para a obtenção da unidade

repetitiva. Este polímero é por definição um produto de condensação de um grupo hidroxílico e um carboxílico dentro da mesma molécula.



**Figura 3.1:** Estrutura química da poli (ε-caprolactona).

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

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

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

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

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

A degradação de polímeros *in vitro* difere da degradação *in vivo*, principalmente por que no último o implante está submetido aos esforços mecânicos e contato com um sistema dinâmico, composto por diferentes células. A taxa de degradação depende da composição química, da forma e da superfície do implante. Sendo fatores que podem ser sistematicamente variados e avaliados nas situações de ensaios *in vitro*. As propriedades específicas como a massa molar inicial, a distribuição de massa molar, o grau de cristalinidade e a taticidade podem ser controlados e avaliados antes da implantação, pelo ensaio de degradação em solução tampão (Elst, 1996).

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

### 3.2.2. Biocerâmicas

Cerâmicas são todos os materiais inorgânicos, não-metálicos, obtidos geralmente após tratamento térmico em temperaturas elevadas. As propriedades dos materiais cerâmicos são em geral: elevada dureza, baixa condutividade térmica e elétrica, estabilidade dimensional e de forma, inércia química, refratariedade, fragilidade, resistência mecânica, à corrosão e ao desgaste e baixa tenacidade à fratura.

Um dos critérios mais aceitos para a classificação das biocerâmicas é aquele baseado na resposta desenvolvida na interface tecido vivo / implante, de acordo com a tabela 3.2 (Hench, et al., 1993).

**Tabela 3.2:** Classificação das biocerâmicas segundo resposta da interface tecido vivo/implante (Hench, et al., 1993).

| Tipo de Biocerâmica | Interações com os Tecidos                           | Exemplos                                   |
|---------------------|---|--|
| Inertes             | Não há interações químicas nem biológicas           | Alumina                                    |
| Porosas             | Ocorre o crescimento dos tecidos através dos poros  | Aluminatos e hidroxiapatita porosa         |
| Bioativas           | Ocorre uma forte ligação na interface osso-implante | Biovidros, hidroxiapatita e vitrocerâmicas |
| Absorvíveis         | São degradadas e substituídas pelos tecidos         | Gesso e fosfato tricálcico                 |

As cerâmicas de fosfato de cálcio são estudadas por muitos anos e comumente utilizadas em aplicações clínicas com o objetivo de preenchimento ósseo.

### 3.2.2.1. Fosfatos de Cálcio

Na ciência de desenvolvimento de implantes e/ ou preenchimentos ósseos, os fosfatos de cálcio (CaP) possuem um perfil biológico altamente atrativo, pois apresentam composição química muito semelhante à fase mineral dos ossos e dentes (íons fosfato e cálcio). 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 (Kawachi, et al., 2000) (Hench, et al., 1993).

Apesar da grande diversidade, os fosfatos de cálcio, são facilmente distinguidos utilizando análises como infravermelho e difração de raios X. Cada composto é caracterizado pelo espectro ou pelo padrão de raios X, o qual permite uma descrição de sua estrutura.

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

O polimorfo do fosfato tricálcico mais conhecido e mais fácil de ser obtido é o  $\beta$ -TCP que apresenta propriedades muito semelhantes às calcificações encontradas em cálculos patológicos (Le Geros, 1991). Porém, este é facilmente hidrolisado a fosfato octacálcico ou a hidroxiapatita.

As apatitas são materiais com fórmula geral do tipo  $M_{10}(XO_4)_6Y_2$  que, normalmente, são conhecidas pela capacidade de permitir uma infinidade de combinações, alterações e substituições em seu retículo. Porém, o nome apatita está sendo exaustivamente utilizado para designar fosfatos de cálcio com fórmula geral  $Ca_{10}(PO_4)_6X_2$  em que  $X = F^-$ ,  $OH^-$  ou  $Cl^-$ . Termodinamicamente, as apatitas são as fases mais estáveis dos fosfatos de cálcio e, por isso, é considerada como provável produto final da maioria das reações.

Os fosfatos de cálcio são classificados de acordo com a relação Ca/P que apresentam em sua fórmula química, com razões Ca/P que podem variar de 0,50 a 2,00, visto na tabela 3.3, o que define seu comportamento em relação à biodegradação (Layrolle, et al., 2009).

Mesmo apresentando a mesma composição química, os fosfatos tricálcico diferenciam em sua estrutura cristalina. O [Beta] TCP é menos solúvel em água ao comparar com o [alfa]

TCP, o qual apresenta mais ativo em sistemas aquosos. O último em contato com fluido corpóreo, é rapidamente hidrolisado. A hidroxiapatita estequiométrica é o segundo fosfato mais estável e menos solúvel após da fluorapatita (FA).

A dissolução das cerâmicas CaP é afetada pela porosidade e tamanho de partículas. Aumentando a porosidade, ocorre o aumento da área de contato da superfície com os fluidos e assim leva a uma taxa de dissolução mais rápida.

Tabela 3.3: Diferentes relações Ca/P (Dorozhkin, 2009).

| Relação Ca/P | Nome  | Formula química   | Solubilidade em 25°C, g/L |
|--------------|---|---|---------------------------|
| 0,5          | Diidrogeno fosfato de cálcio monoidratado(MCPM) | $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$   | ~18                       |
| 1,0          | Hidrogeno fosfato de cálcio diidratado (DCPD)   | $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  | ~0,088                    |
| 1,0          | Hidrogeno fosfato de cálcio (DCPA)              | $\text{CaHPO}_4$  | ~0,048                    |
| 1,33         | Fosfato octacálcico (OCP)                       | $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$                                  | ~0,0081                   |
| 1,5          | $\alpha$ -Fosfato tricálcico ( $\alpha$ -TCP)   | $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$   | ~0,0025                   |
| 1,5          | $\beta$ -Fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP)     | $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  | ~0,0005                   |
| 1,2-2,2      | Amorfo cálcio fosfato (ACP)                     | $\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot \text{H}_2\text{O}$ , n= 3-4,5; 15-20% $\text{H}_2\text{O}$ |                           |
| 1,5-1,67     | Hidroxiapatita deficiente Cálcio (CDHA)         | $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ (0<x<1)                          | 0,0094                    |
| 1,67         | Hidroxiapatita (HA)                             | $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  | ~0,0003                   |
| 1,67         | Fluorapatita (FA)                               | $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$   | ~0,0002                   |
| 2,0          | Fosfato tetracálcico (TTCP)                     | $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$  | ~0,0007                   |

## Fosfatos Tricálcico

Existem muitos métodos para a obtenção do TCP por reação no estado sólido, mas a utilização de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) e monetita ( $\text{CaHPO}_4$ ) é o método mais simples e econômico para se formar  $\beta$ -TCP ou  $\alpha$ -TCP. Dessa maneira, sabe-se que essa reação ocorre somente com uma relação Ca/P dos reagentes de 3/2 e é um processo de alta complexidade descrito a seguir (Carrodeguas, et al., 2008).

Entre 450 e 500°C a monetita desidrata para formar pirofosfato ( $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ). Em seguida e por volta de 800 °C, inicia-se a reação do CaO com o pirofosfato formando  $\beta$ -TCP. Essa reação completa-se por volta de 1100°C. A transformação  $\beta$ -TCP  $\leftrightarrow$   $\alpha$ -TCP tem lugar em temperaturas mais elevadas que 1200°C e, finalmente, tem-se  $\alpha$ -TCP puro a partir de 1300°C.

As temperaturas de formação e transformação de fase já determinadas em diversos estudos (Carrodeguas, et al., 2008) (Motisuke, et al., 2008) não são totalmente exatas e variam de acordo com as características dos processos e da quantidade de impureza dos reagentes utilizados.

Apesar da pureza das fases do TCP serem determinadas pela rotina de calcinação, o excesso de temperatura durante a queima pode levar a perda do material, podendo resultar em produtos pouco reativos ou que necessitem tamanho de partícula muito pequeno, gerando contaminações devido ao excesso de moagem.

## Processamento de Fosfatos de Cálcio

O objetivo da síntese cerâmica é obter uma forma específica de um dado material que irá realizar uma determinada função, ou seja, a maneira como o CaP é sintetizado em muito influi na sua microestrutura final e conseqüentemente suas características *in vivo* (Van Vlack, 1973).

Os fosfatos de cálcio podem ser obtidos a partir de dois tipos de rotas de obtenção: (1) os pós reagentes são misturados com água ou uma solução aquosa, na qual ocorre uma precipitação. Em seguida, a solução é levada a secar resultando no CaP desejado; (2) reação no estado sólido

através da sinterização (líquida ou sólida) dos pós-iniciais até a estabilização da fase desejada (Hench, et al., 1993).

As temperaturas elevadas constituem um importante fator no processamento de materiais cerâmicos. Elas são usadas: (1) para a secagem prévia dos produtos já conformados, (2) para produzir aglomeração e reduzir a porosidade, (3) para modificar as tensões residuais e (4) para produzir cristalização. Os tratamentos térmicos implicam em alterações de peso e volume, promovem movimentação dos átomos e aceleram as velocidades de difusão, reduzem a porosidade e a área específica, e modificam as propriedades (Van Vlack, 1973).

Portanto, as propriedades do produto final dependem da composição das matérias primas, do processo de conformação utilizado, das fases estabilizadas durante o tratamento térmico e da microestrutura.

### Hidroxiapatita

A hidroxiapatita possui uma fórmula química representada por:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , sendo depositada na matriz extracelular de tecidos calcificados como o osso e a dentina. Porém, apatitas quando estão em meio biológico (tanto as sintéticas como as biológicas) podem incorporar uma série de impurezas e dificilmente serão encontradas em sua forma pura e estequiométrica (Vallet-Regi, et al., 2004).

O crescimento da hidroxiapatita, tanto no fluído biológico quanto em soluções aquosas, ocorre em meios contendo íons cálcio e fósforo, e elementos-traços essenciais tais como  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$  (Reid, et al., 2006) (Vallet-Regi, et al., 2004). A hidroxiapatita deficiente em cálcio permite que quando em contato com o osso, estabeleça ligações químicas com o tecido ósseo (Saleh, et al., 2004). Isto por que o material é composto pelos mesmos íons que compõe a fase mineral do osso natural, sendo, portanto capaz de participar do equilíbrio cálcio fosfato no organismo (Dorozhkin, 2009). A superfície permite uma interação de ligações do tipo dipolo, fazendo que moléculas de água e proteínas e colágeno sejam adsorvidos na superfície induzindo a regeneração óssea.

A hidroxiapatita pode ser sintetizada em laboratório por métodos nos estados sólidos e por métodos úmidos. As sínteses de estado sólido requerem altas temperaturas e o material

obtido é muito cristalino, pelos métodos úmidos podem resultar em diferentes morfologias e diferentes cristalinidades (Dourado, 2006).

A hidroxiapatita quando utilizada como reforço, com formato de *whiskers*, permite que sejam acentuados suas vantagens, tais como biocompatibilidade, inércia química, resistência à corrosão e alta resistência à compressão e minimize suas desvantagens, por exemplo, baixa resistência ao impacto, alta densidade e dificuldade de fabricação de formatos complexos (Bozkurt, 1995). A morfologia dos *whiskers* é caracterizada pela semelhança de agulhas com uma alta razão de aspecto, sendo calculada utilizando seu comprimento por o valor do seu diâmetro, assim caracterizado a morfologia de monocristais muito finos e alongados (Ramos, et al., 2008). A nano hidroxiapatita se mostra superior à micro hidroxiapatita ao aspecto de promover adesão, diferenciação e proliferação osteoblástica, e ainda na deposição de cálcio em sua superfície, o qual permite um aumento na formação óssea em um curto período (Webster, et al., 2000). Alguns métodos de síntese de *whiskers* ou fibras serão explicados a diante, tais como precipitação, hidrotermal, *molten salt synthesis* e hidrólise alcalina.

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

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

O método de hidrólise alcalina do [alfa]-fosfato tricálcico, permite que sejam dissolvidas as partículas de [alfa] TCP e que ocorra uma re-nucleação com crescimento ordenado em um eixo da célula unitária da hidroxiapatita. Assim, ao medir a distância entre os vértices da estrutura obtida, e comparando estas com as distâncias interatômicas de uma célula unitária de HA, pode-se supor que o processo gera estruturas muito similares aos *whiskers* (Callister, 2006). A principal característica destas estruturas é a ausência de defeitos, uma vez que são

monocristais, fazendo com que o material atinja propriedades mecânicas muito superiores, próxima à sua resistência mecânica teórica (Ramos, et al., 2009) (Ota, et al., 1998).

### 3.2.3. Materiais compósitos

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

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

É muito importante avaliar o molhamento da superfície em compósitos, principalmente quando depende da hidrofiliicidade ou polaridade dos *whiskers* e da disponibilidade dos grupos polares do polímero. Desse modo, se o contato for  $<90^\circ$ , o fluido irar se espalhar e cobrir a área da superfície, assim é considerado uma superfície hidrofílica. Porém se o ângulo apresentar  $90^\circ$  ou maior, geralmente é caracterizada uma superfície hidrofóbica, como é observado na figura 3.2, na qual  $\theta_c$  e o ângulo de contato do fluido com a superfície.

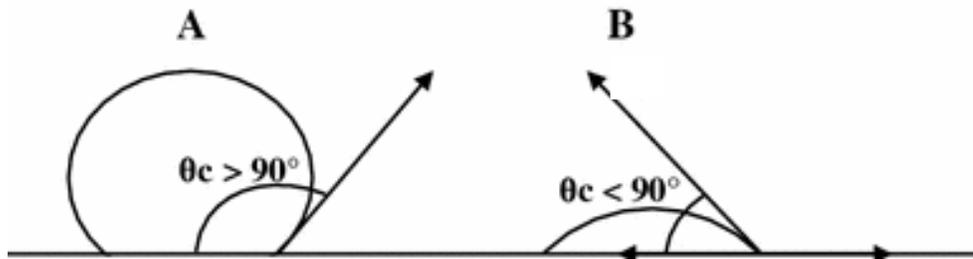


Figura 3.2: Molhamento da superfície: A - superfície hidrofóbica; B- superfície hidrofílica (Supova, 2009).

Para aumentar a hidrofiliicidade do compósito é necessário adicionar surfactante anfifílico para, o qual realiza à interação entre a cerâmica hidrofílica (HA) e o polímero hidrofóbico (PCL), exemplos são ácido oleico ( $C_{18}H_{34}O_2$ ) e Sorbital mooleate, conhecido como *Span* ( $C_{24}H_{44}O_6$ ).

O ácido oleico apresenta ótimos resultados na dispersão da cerâmica na matriz polimérica. Além de possuir características como o ponto de fusão próximo de  $13-14^\circ C$ , solubilidade em metanol e insolubilidade em água e é capaz de criar uma homogênea dispersão de partículas de cerâmicas dentro de uma matriz polimérica (Hae-Won, 2007). Outro dispersante muito utilizado o é *Span*, o qual e um derivado do ácido oleico, esse apresenta características semelhantes com o ácido oleico, porém apresenta solubilidade em água (Raucci, et al., 2010).

### 3.3. Fundamentos da Engenharia Tecidual

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

compatibilidade do órgão implantado ao organismo gerou o interesse em regeneração e reparação de tecidos.

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

Existem três principais áreas de estudo na engenharia tecidual (i) o uso de um ambiente para recrutar e guiar células do sítio operatório para regeneração tecidual, (ii) colocação de células com ou sem fatores de indução para reparar a área em questão, (iii) cultivo de células em um *scaffold*, utilizando um sistema chamado de biorreator, em condições necessárias para a obtenção de um tecido funcional (Discher, et al., 2009).

O objetivo da engenharia tecidual é a utilização de células para o crescimento de tecidos, guiada por uma estrutura tridimensional, os suportes porosos. A maioria dos suportes são produzidos com materiais biodegradáveis ou biorreabsorvíveis. Os principais objetivos da engenharia tecidual são que esses novos tecidos aliviem a dor, restaurárem mecanicamente a estabilidade, além de recuperar a função original (Langer, et al., 1993).

Exemplos de enxertos dessa engenharia incluem estudos com os diferentes tecidos tais como cartilaginoso, ósseo, epidérmico, sanguíneo, muscular, miocárdio assim como os órgãos: bexiga, traquéia e dentes (Ingber, et al., 2006) (Grayson, et al., 2008) (Mikos, et al., 2006), (Radisic, et al., 2004) (Tandon, et al., 2009) (Vunjak-Novakovic, et al., 2004).

### 3.3.1. Suporte tridimensional (*scaffolds*)

O principal objetivo dos suportes tridimensional, também conhecido como *scaffold*, é mimetizar o tecido para o crescimento tecidual nesse biomaterial para a adesão e proliferação celular (Murphy, et al., 2011). Os *scaffolds* apresentam um papel muito importante na engenharia tecidual, desse modo existem muitas pesquisas de técnicas avançadas para sua fabricação.

As técnicas de produção poliméricas de suportes tridimensionais dependem quase que inteiramente das propriedades internas e superficiais do material, e da função proposta para o suporte. Porém, o custo e o tempo de fabricação devem ser considerados para a viabilidade do

método. Uma variedade de técnicas de fabricação de *scaffold* é explorada, desse modo podem ser divididas em duas classes, as técnicas tradicionais e os métodos de prototipagem rápida. As técnicas convencionais envolvem a aplicação de calor e ou de pressão no polímero ou de dissolução por solventes orgânicos para moldar o material em sua forma desejada. As principais técnicas convencionais são: a evaporação de solvente com adição de sal (*solvent-casting particule leaching*) (Mikos, et al., 1996), a injeção de gás (*gas foaming*) (Harris, et al., 1998), a inversão de fases (*phase separation*) (Pezzin, et al., 2002), a deposição por fusão (*melt moulding*) (Hutmacher, et al., 2004), a *freeze drying* (Patist, et al., 2004).

Desde 1980 pesquisadores desenvolvem várias técnicas de fabricação dos *scaffolds*, que resultam em suportes com propriedades específicas para cada tecido (Murphy, et al., 2011). Suportes poliméricos podem permitir resistência mecânica e poros interconectados, variando a química da superfície e a geometria. As características dos suportes devem ser analisadas de acordo com sua aplicação, assim deve ser selecionado o polímero, os componentes adicionais e as técnicas de fabricação.

Os suportes tridimensionais possuem as características de permitirem a adesão inicial celular e conseqüentemente o crescimento tecidual (Hutmacher, et al., 2001). Esses *scaffolds* idealmente necessitam ter as seguintes características (Hutmacher, et al., 2001) (Varghese, et al., 2006): (i) possuir biocompatibilidade e bioatividade para promover o crescimento celular; (ii) exibir morfologia adequada ao tecido em questão e possuírem microestrutura interconectada para induzir um fluxo de transporte de nutrientes e resíduos metabólicos, além da vascularização da área; (iii) ser biodegradável ou bioreabsorvível, com um controle da taxa de degradação e reabsorção, com o objetivo de ser compatível com o crescimento tecidual sem produzir produtos citotóxicos; (iv) exibir uma superfície susceptível para adesão, proliferação e diferenciação celular; (v) possuir propriedades mecânicas semelhantes ao tecido repostado; e (vi) ter fácil processamento em distintas formas e tamanhos.

As propriedades mecânicas dos suportes aumentam de acordo com as propriedades poliméricas; a geometria da matriz tridimensional; a incorporação de materiais que atuam como reforços mecânicos; e a técnica de fabricação. Por exemplo, polímeros com alta cristalinidade exibem alta resistência à tração e apresentam lenta taxa de degradação.

Para a engenharia tecidual é muito interessante a utilização de *scaffold* biorreabsorvíveis que tenham a taxa de absorção controlada, além de exibirem propriedades mecânicas e físicas

controladas sobre condições desejadas. Estes suportes são principalmente formados por polímeros biorreabsorvíveis, devido à facilidade de modificação na estrutura para a obtenção de materiais com a taxa de degradação ideal.

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

A técnica de evaporação de solvente com adição de sal (*solvent-casting and particule leaching*) foi desenvolvida para aumentar o controle na porosidade e no diâmetro dos poros. Essa técnica envolve a dissolução polimérica com a adição de um agente porogênico, que após a secagem e solidificação do polímero, ocorre sua retirada permitindo assim, a criação de uma rede de poros interconectados (Murphy, et al., 2011). A técnica permite uma boa reprodutibilidade, entretanto a interconexão dos poros nem sempre é total e pode ainda reter partículas de sal no seu interior (Mikos, et al., 1993). Para Harris (1998) existem desvantagens nos processos de preparação de amostras porosas que requerem o uso de solventes orgânicos, já que pode deixar resíduos que influenciarão na cultura celular (Harris, et al., 1998).

Os trabalhos encontrados na literatura sobre os *scaffolds* porosos implantados em tecidos ósseos apresentam discordâncias em relação ao diâmetro ideal dos poros para o crescimento tecidual. Alguns autores falam em variações de diâmetro entre 300-400  $\mu\text{m}$  (Harris, et al., 1998) (Mikos, et al., 1993), outros dão intervalos ainda mais amplos na ordem de 200-400  $\mu\text{m}$  (Choong, et al., 2004). Assim o diâmetro ideal dos poros é algo a ser elucidado. Quando os poros são inferiores a 100  $\mu\text{m}$ , não se permite uma vascularização no suporte e quando são superiores a 500  $\mu\text{m}$ , não se fornece uma mimetização óssea, não apresentando uma superfície adequada para a adesão e proliferação celular (Mikos, et al., 1993). A porosidade é fornecida pela taxa entre agente porogênico e polímero.

### 3.4. Célula-Tronco

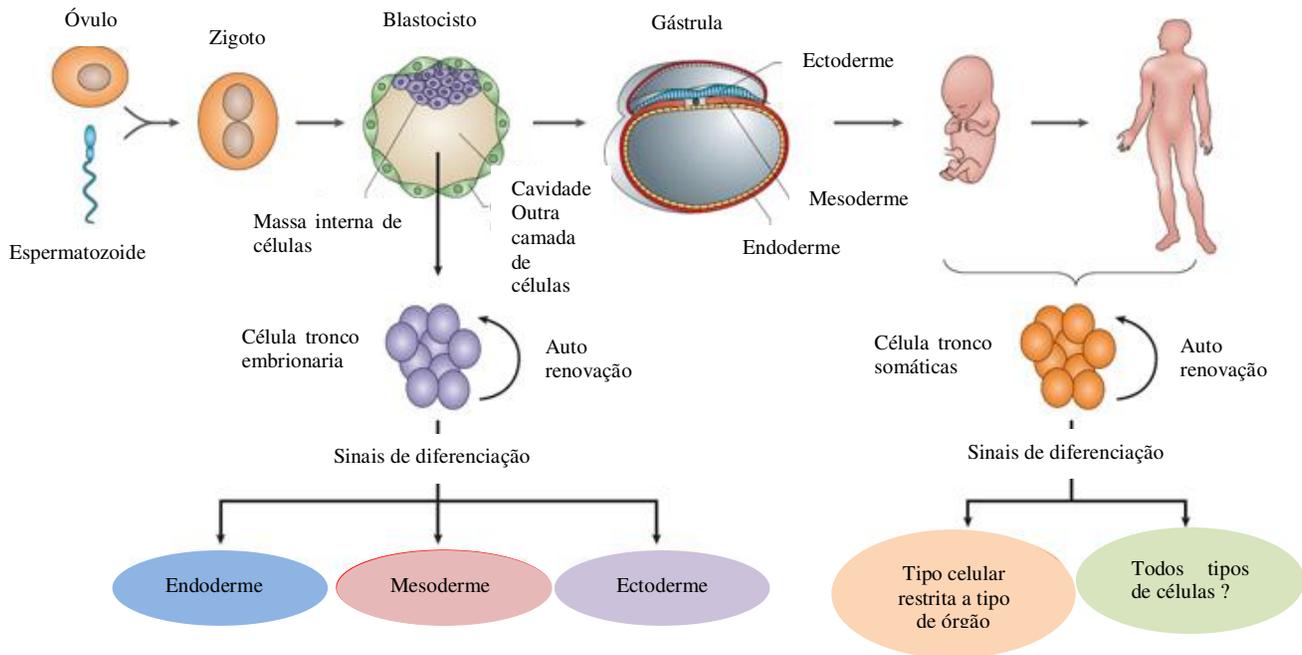


Figura 3.3. Células tronco (O'Connor, et al., 2006).

As células tronco possuem propriedades essenciais tais como a capacidade de auto renovação e a diferenciação em outras linhagens sobre condições apropriadas. Para a realização destas tarefas, chamadas de replicação e diferenciação, elas podem se utilizar de dois modelos de divisão: o determinístico, o qual sua divisão gera sempre uma nova célula tronco e uma diferenciada ou modelo aleatório, quando algumas células tronco geram somente novas células tronco e outras geram apenas células diferenciadas (Cardoso, et al., 2009).

As células tronco podem ser classificadas de acordo com o potencial de diferenciação: totipotente, pluripotente, multipotentes, oligotentes e unipotentes. As embrionárias são totipotentes, conseqüentemente, podem diferenciar em todos os tipos celulares embrionários e extra-embrionários. São derivadas até a fase em que o embrião tem cerca de dezesseis até trinta e duas células, ou seja, três a quatro dias de vida, visto que cada célula é capaz de se transformar

em um ser humano completo. Estas células só podem ser encontradas no embrião (figura 3.3). As células tronco pluripotentes também só podem ser encontradas em embriões, conseguem se diferenciar em quase todos os tecidos humanos, exceto em placenta e nos anexos embrionários. As células multipotentes são derivadas de tecidos já desenvolvidos e do cordão umbilical e podem se diferenciar em vários tipos celulares. Já as oligopotentes são capazes de gerar células mais restritas a uma linhagem do que as multipotentes, e por final, as unipotentes podem contribuir originando apenas um grupo único tipo celular.

As células multipotentes podem ser originadas de diversos tecidos, como o estroma de medula óssea, cordão umbilical, tecido adiposo, entre outros, essas são conhecidas como célula-tronco mesenquimais (*mesenchymal stem cell* - MSC) e foram primeiramente descritas por Friedenstein e colaboradores na década de 80 (Friedenstein , 1980).

As células-tronco mesenquimais possuem a capacidade de se diferenciar em linhagens de origem mesodérmica, tais como: músculo esquelético, ossos, tendões, cartilagem e tecido adiposo, quando submetidas a meios de cultura suplementados com fatores de crescimento e hormônios específicos (Castro-Malaspina, et al., 1980) (Barry, et al., 2004) (Pittenger, et al., 1999). Além disso, as células-tronco mesenquimais possuem outras características tais como: efeito imunomodulador, efeito parácrino, fácil obtenção, grande capacidade de proliferação, grande aderência e comportamento migratório (Nasef , et al., 2008) (Gnecchi , et al., 2006) (Chamberlain , et al., 2007).

As células tronco mesenquimais, retiradas da medula óssea, podem se diferenciar em osteoblastos, adipócitos, condrócitos, mioblastos, neurônios e fibroblastos. Essa fonte celular pode ser retirada do paciente, expandida *in vitro* e combinada com um *scaffold* para reparo de defeitos ósseos. No entanto, são células raras, que geralmente correspondem a 1 em cada 100.000 células nucleadas da medula, além de que a cirurgia para a retirada dessas células é considerada um procedimento invasivo.

Por outro lado as retiradas do cordão umbilical podem diferenciar em adipócitos, osteoblastos, condrócitos, neurônios e outros tipos celulares. Essa fonte celular apresenta maiores vantagens ao se comparar com a fonte medular, devido ao baixo custo, ao procedimento não invasivo, não gera questões éticas e exibem alta plasticidade (Xu, et al., 2010).

O tecido adiposo é um tecido o qual apresenta múltiplos tipos celulares incluindo as células tronco (*adipose derived stem cells* -ADSC). Estas são multipotentes, as quais podem ser

retiradas do sítio operatório por lipossucção sem alterar sua viabilidade; desse modo apresentam-se como uma fonte ideal para células autógenas, devida sua acessibilidade. As ADSC podem ter seu meio de cultura modificado, *in vitro*, por adição de alguns agentes bioquímicos para direcionar a diferenciação em tecido osteogênico, adiposo, entre outros, como pode ser visto na tabela 3.4 (Brown, et al., 2010).

**Tabela 3.4: Fatores de indução para diferentes tipos celulares (Brown, et al., 2010).**

| <b>Tipos celulares</b> | <b>Fatores de indução</b>  |
|------------------------|--|
| <b>Osteoblastos</b>    | Ácido Ascórbico, Dexametasona, Proteína morfogênica óssea 2, $\beta$ -glicerol fosfato |
| <b>Condrócitos</b>     | Ácido ascórbico, Proteína morfogênica óssea 6, Insulina, TGF $\beta$ 1                 |
| <b>Adipócitos</b>      | Dexametasona, 3-isobutil metalxantina, Insulina, Indometacina                          |

Atualmente, a lipoaspiração é um processo rotineiro na medicina estética e propicia a obtenção de grande quantidade de tecido adiposo que será descartado. O isolamento de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo é realizado através de processo enzimático simples, mostrando que esse tecido é uma fonte atrativa para pesquisadores e clínicos em terapia celular (Casteilla, et al., 2005) (Oedayrajsingh-Varma , et al., 2006). Análises comparativas de células-tronco mesenquimais isoladas de sangue de cordão umbilical, medula óssea e tecido adiposo, que são fontes mais utilizadas, demonstram que as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo não são diferentes em relação à morfologia, fenótipo imune, frequência na formação de colônias e capacidade de diferenciação (Kern , et al., 2006). Em estudo comparativo, Wagner e colaboradores analisaram, através de micro arranjos, a expressão global dos genes de células-tronco mesenquimais obtidas de medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical (Wagner , et al., 2005). Os resultados demonstraram que, quando as células foram cultivadas em meios de cultura idênticos, a expressão de genes envolvidos na produção de proteínas da matriz extracelular, morfogênese e desenvolvimento foram semelhantes, sugerindo que as células-tronco mesenquimais de diferentes fontes são semelhantes do ponto de vista de expressão gênica

(Wagner , et al., 2005). Dessa forma, a utilização do tecido adiposo como fonte de células-tronco mesenquimais torna-se vantajosa para a pesquisa isso porque contem grandes quantidades de células mesenquimais e ser um material de descarte.

Os estudos tendem a avançar na identificação, isolamento, expansão e controle de diferenciação das células tronco (Jackson, et al., 2002). Identificação e isolamento das células tronco têm sido mais comum utilizando técnicas de clonagem (Stemple, et al., 1992) e ativação celular fluorescente que é empregada para a separação de células tronco específicas, baseando-se em um marcador de superfície celular (Morrison, et al., 1999). Esses marcadores de superfície atuam na superfície das células, nas quais apresentam específicas proteínas chamadas receptoras, os quais têm a capacidade de selecionar ou se ligar em outras moléculas “sinalizadoras”. Existem vários tipos de receptores, os quais se diferenciam pela sua estrutura e pela sua afinidade com as moléculas sinalizadoras. Desse modo as células tronco possuem em sua superfície receptores específicos, os quais se ligam em marcadores permitindo análises para sua caracterização (Morrison, et al., 1999).

As células-tronco mesenquimais possuem três principais características: é uma população celular morfológicamente homogênea, apresentam grande capacidade de diferenciação em diversas linhagens (principalmente linhagem adipócito, cartilaginosa e óssea) e apresentam as mesmas características moleculares, mesmo sendo de origem tecidual diferente (devem ser positivas para marcadores celulares CD90, CD105 e CD73 e negativas para marcadores de linhagem hematopoiética, como CD34, CD45, CD1443 (Schaffler , et al., 2007).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

Os materiais utilizados para o desenvolvimento do *scaffold* foram:

-Reagentes para síntese de monetita e carbonato de cálcio: acetato de cálcio, carbonato de amônio, EDTA sal dissódico, fosfato de amônio monobásico todos da marca Synth.

- Hidroxido de amonio- Synth

-Span – Aldrich

- Poli ( $\epsilon$ -caprolactona)- Aldrich- lote MKBB8278

-Ácido oleico – Synth- lote 121338

-Cloroformio – Merck – lote K42267545

### 4.2. Materiais cerâmicos

#### 4.2.1. Síntese do $\alpha$ -TCP

Os reagentes sintetizados foram a monetita ( $\text{CaHPO}_4$ ) e carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), pelo método de precipitação em solução aquosa, no próprio laboratório, resultando em cerâmicas com alta pureza e, principalmente livres de Mg (Motisuke, et al., 2008). Posteriormente, foi realizada a homogeneização dos reagentes primários com almofariz de ágata,  $\text{CaHPO}_4$  e  $\text{CaCO}_3$ , em uma proporção molar de 2:1. A mistura reacional foi então aquecida a  $1225^\circ\text{C}$  durante 6 horas, com uma taxa de aquecimento de  $4^\circ\text{C}/\text{min}$ , utilizando cadinhos de porcelana, obtendo assim a sinterização do  $\alpha$ -TCP, figura 4.1.

As amostras foram moídas em moinhos de bolas de alumina, por 24 horas, em meio seco, com rotação de 40rpm. As cerâmicas foram submetidos à caracterizações químicas e físicas por análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios X (DRX) e espectroscopia de fluorescência de raios X (FRX).

#### 4.2.2 Obtenção dos *whiskers* de hidroxiapatita

Para a obtenção dos *whiskers* de hidroxiapatita foi adicionado 100 mL de água deionizada para cada 1,56 g de  $\alpha$ -TCP. A mistura foi aquecida a 90 °C durante 6 horas, sendo controlado o pH através da adição de hidróxido de amônio,  $\text{NH}_4\text{OH}$  (Quimex). O pH foi mantido sempre em 11 (Ramos, et al., 2008). Posteriormente, foi filtrado e lavado com água destilada e secado na estufa por 24 horas a 50°C, resultando assim em *whiskers* de hidroxiapatita, visto na figura 4.1.

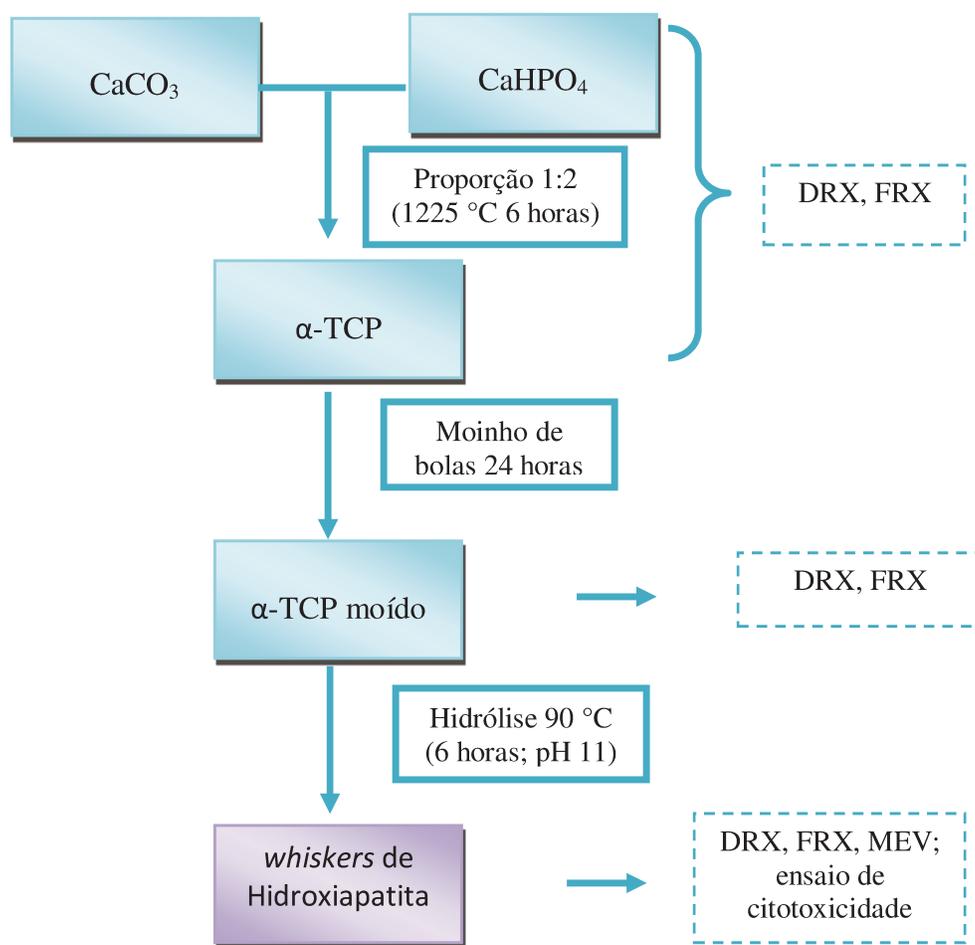


Figura 4.1: Fluxograma da síntese dos *whiskers* de hidroxiapatita.

### 4.3. Estudos das superfícies e das alterações das composições

Para o estudo da influencia das diferentes composição às propriedades dos materiais, foram obtidas amostras em formato de filme com os diferentes surfactantes e com e sem *whiskers* de hidroxiapatita.

As amostras foram obtidas pelo método de *casting*, utilizando clorofórmio como solvente e a placa petri como o molde. A concentração de polímero e solvente foi de 1,5 g para 10 mL.

As amostras estão descritas a seguir:

- Filme de PCL:

A solução foi agitada mecanicamente controlando a velocidade, durante 6 horas. Após foi utilizado à placa petri como molde, esperou-se 48 horas para a evaporação do solvente em um ambiente controlado.

- Filme de PCL com ácido oleico ou *Span*:

A solução foi obtida adicionando clorofórmio e dispersante, em uma concentração de 10:1 % w/w, sob agitação durante 30 minutos antes da adição do polímero. Após essa etapa, foram seguidas as mesmas etapas que o filme do PCL.

- Filme de PCL com hidroxiapatita e surfactantes (ácido oleico ou *Span*):

Foram agitados o clorofórmio e dispersante durante 30 minutos antes da adição da hidroxiapatita, em uma proporção de 15 % w/w, utilizando ultrassom de ponta. Posteriormente, as etapas foram idênticas ao filme PCL.

As amostras foram caracterizadas conforme a figura 4.2.

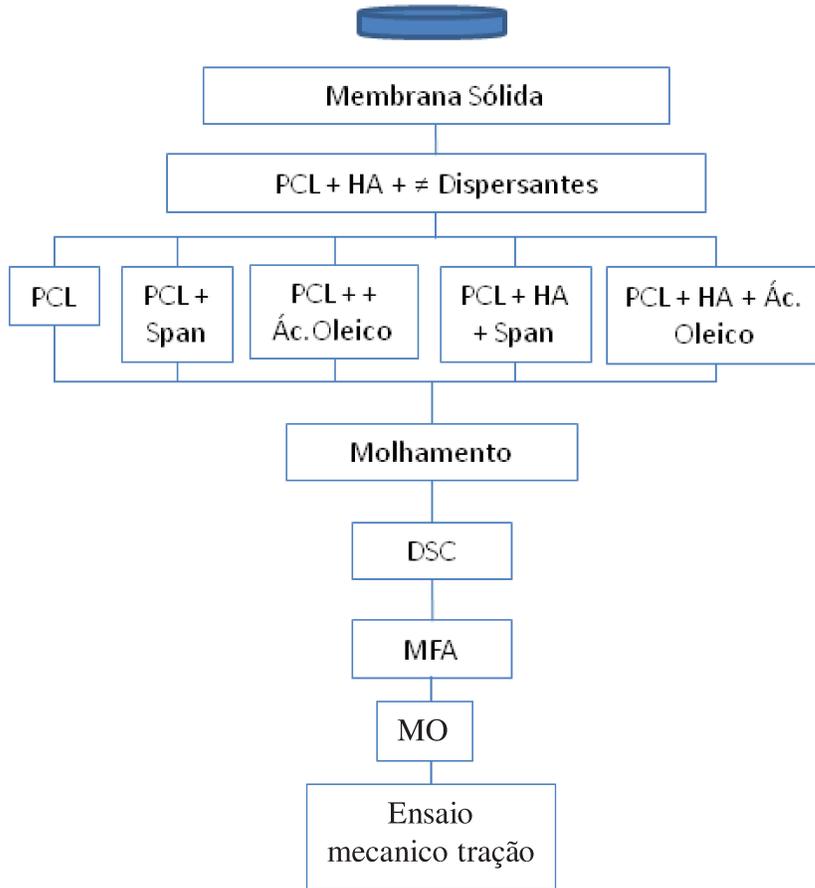


Figura 4.2: Fluxograma caracterizações das membranas e suas composições.

#### 4.4. Preparação dos núcleos porosos e densos

Após a realização dos estudos das composições foi determinada a escolha do surfactante, o qual foi utilizado nas seguintes etapas de obtenção do *scaffold*. Para a obtenção das amostras ditas com núcleos porosos e densos, com formato cilíndrico de altura de 4 mm e raio de 2 mm, foi variado o percentual de cerâmica na solução polimérica e a presença de agente porogênico.

O método utilizado foi evaporação de solvente (*solvent-casting*), utilizando 0,75 g do polímero poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (Sigma, Estados Unidos da América), 6 ml de clorofórmio (Merck, Alemanha), proporção descrita por Mikos (Mikos, et al., 1996). Foram produzidas membranas com diferentes proporções cerâmica/polímero, visto na tabela 4.1.

**Tabela 4.1.:** Nomenclatura das diferentes amostras e suas composições.

| <b>Referências</b> | <b>PCL (g)</b> | <b>Whiskers de HA<br/>(%w/w)</b> | <b>NaCl (g)</b> |
|--------------------|----------------|----------------------------------|-----------------|
| <b>D0</b>          | 1,5            | 0                                | -               |
| <b>D1</b>          | 1,5            | 10                               | -               |
| <b>D2</b>          | 1,5            | 15                               | -               |
| <b>D3</b>          | 1,5            | 20                               | -               |
| <b>D4</b>          | 1,5            | 25                               | -               |
| <b>P1</b>          | 1,5            | 10                               | 2,5             |
| <b>P2</b>          | 1,5            | 15                               | 2,5             |
| <b>P3</b>          | 1,5            | 20                               | 2,5             |
| <b>P4</b>          | 1,5            | 25                               | 2,5             |

O dispersante ácido oleico (Synth) (0.5 %w/w) foi adicionado ao solvente durante 30 minutos em agitação constante, posteriormente foram adicionados os *whiskers* de hidroxiapatita e agitado por mais 30 minutos. Depois foram adicionados o agente porogênico, quando cabível, NaCl (Synth, Brasil – dimensão de 350 a 177 micros) e o polímero (massa molar de 80.000 g/mol). Após agitação por 6 horas, as soluções foram colocadas em placas de petri, as quais foram mantidas em uma câmara para evaporação do solvente. Após 48 horas as membranas foram cortadas com um diâmetro de 4 mm, colocadas no molde de Teflon® e levadas a estufa em uma temperatura de 70 °C durante 30 minutos, posteriormente foi realizado uma pressão nas amostras contra o molde, para evitar bolhas ou falhas entre as membranas aquecidas, visto na figura 4.3., permitindo assim a produção de amostras com a dimensão de 4x4 mm.

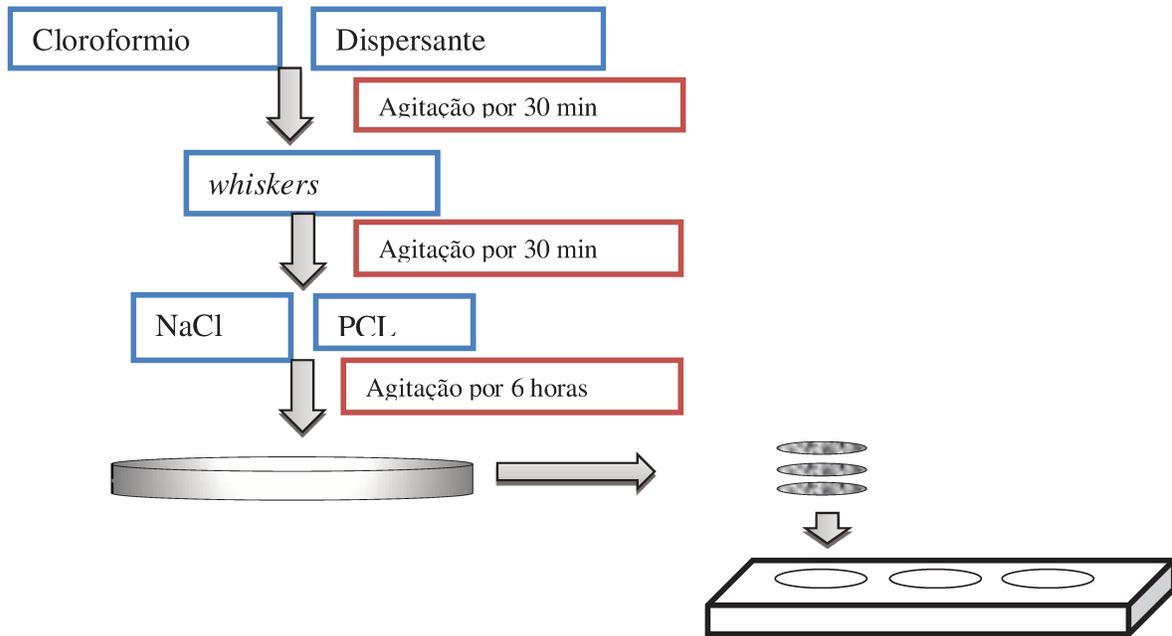


Figura 4.3: Fluxograma da fabricação das amostras, pelo método *casting*.

A figura 4.4 esquematiza as diferentes composições e caracterizações dos núcleos porosos e densos.

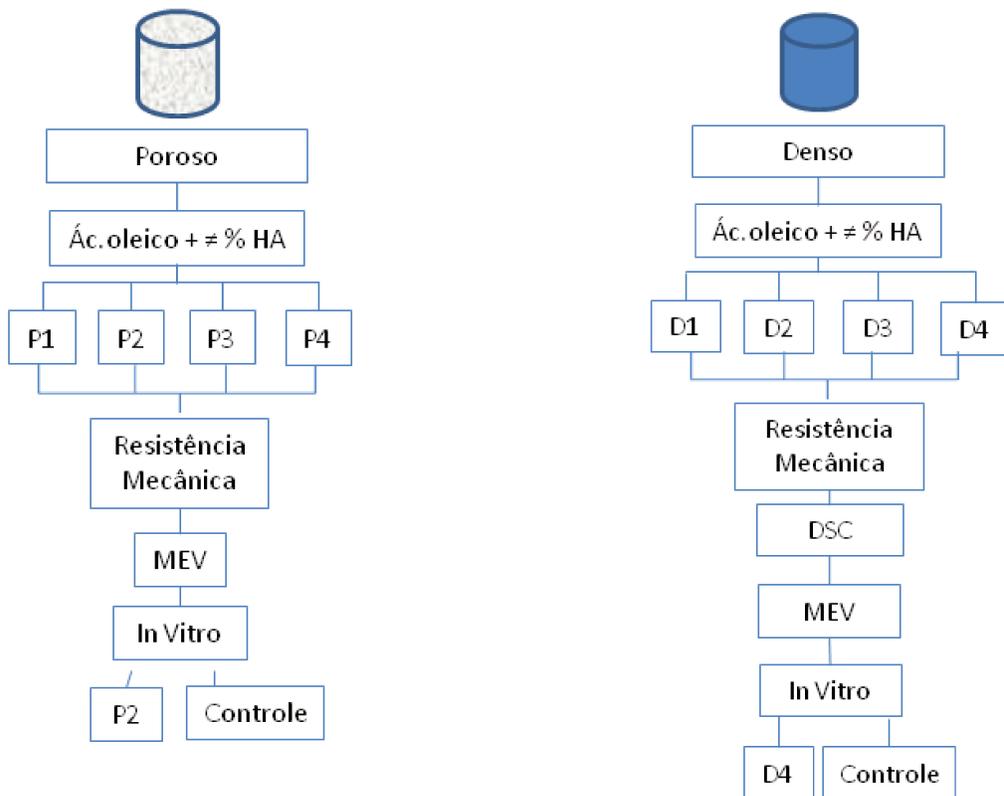


Figura 4.4: Fluxograma preparação dos corpos porosos e densos.

#### 4.5. Preparação dos suportes tridimensionais

Após a determinação da melhor concentração do percentual dos *whiskers* de hidroxiapatita na área porosa, foi realizado a etapa de obtenção dos *scaffolds*. Nesta etapa foi alterado a concentração de cerâmica no núcleo denso das amostras, para tal ocorreu a preparação da solução, descrita a seguir.

Inicialmente, a solução solvente/dispersante foi agitada com uma frequência constante durante 30 minutos, depois foi adicionada a parte cerâmica e agitada durante 30 minutos, posteriormente foi adicionado o polímero e o agente porogênico e agitada por mais 6 horas. A partir dessa etapa foram abertos dois processos, o primeiro consistiu em colocar a solução em placas de petri e outro em moldes de teflon®, ambos descritos a seguir.

O método utilizado inicialmente basicamente consistiu em realizar um filme de 1 mm no molde de teflon®, o qual posteriormente foi colocado o núcleo centralmente, e preenchido com o restante da solução, foram realizadas algumas alterações visto na tabela 4.2. As amostras foram levadas a uma câmara para evaporação de solvente, durante 24 horas. Depois foram lavadas com água deionizada por mesmo período, sendo trocadas a cada 6 horas.

**Tabela 4.2:** Alterações do primeiro método de produção do suporte tridimensional.

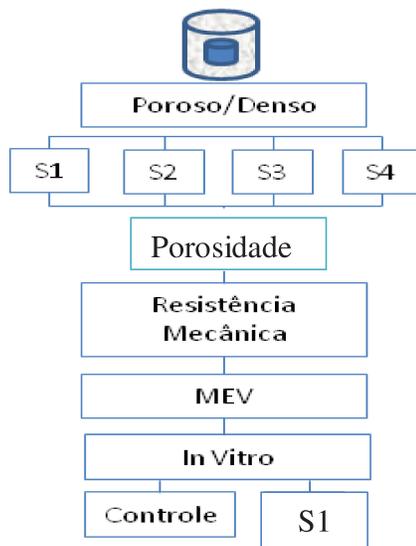
| <b>Amostras</b> | <b>Corpo denso</b>            | <b>Primeira etapa (<i>casting</i>)</b>  | <b>Segunda etapa (<i>casting</i>)</b>                            | <b>Terceira etapa (<i>casting</i>)</b> |
|-----------------|-------------------------------|---|--|--|
| <b>T1</b>       | Fixação apos a primeira etapa | 2 horas para evaporação do solvente (colocação de 30% do volume)                  | 4 horas para evaporação do solvente (colocação de 30% do volume) | (colocação de 30% do volume)           |
| <b>T2</b>       | Fixação apos a segunda etapa  | 2 horas para evaporação do solvente (colocação de 30% do volume)                  | 4 horas para evaporação do solvente (colocação de 60% do volume) | -----                                  |
| <b>T3</b>       | Fixação apos a primeira etapa | 5 horas para evaporação do solvente (colocação de 30% do volume)                  | 2 horas para evaporação do solvente (colocação de 30% do volume) | (colocação de 30% do volume)           |
| <b>T4</b>       | Fixação apos a primeira etapa | Solução viscosa- 2 horas para evaporação do solvente (colocação de 90% do volume) | -----  | -----                                  |

O outro processo foi realizado utilizando recursos da Universidade de Trento (Departamento de Engenharia de Materiais, Itália), no qual foram produzidas membranas porosas, utilizando placas de petri como moldes. Após a evaporação do solvente em câmeras a vácuo, as membranas foram cortadas em discos com 6 mm de diâmetro, os quais foram colocados no molde de teflon® ocupando 50% da altura do molde (6 mm), permanecendo durante 15 minutos à 70 °C em uma estufa. Posteriormente, a pilha de discos foi pressionada contra o molde, para minimizar o surgimento de bolhas ou falhas entre os discos e adicionado o núcleo e preenchido com discos de amostras, o conjunto foi aquecido novamente por 10 minutos a 70 °C e pressionado novamente. As amostras foram fabricadas de acordo com a Tabela 4.3.

**Tabela 4.3:** Diferentes suportes tridimensionais e suas composições.

| Referência | Região Porosa |                              |          | Região Densa |
|------------|---------------|------------------------------|----------|--------------|
|            | PCL (g)       | <i>whiskers</i> de Ha (%w/w) | NaCl (g) |              |
| S1         | 1,5           | 15                           | 2,5      | D4           |
| S2         | 1,5           | 15                           | 2,5      | D1           |
| S3         | 1,5           | 15                           | 2,5      | D2           |
| S4         | 1,5           | 15                           | 2,5      | D3           |

A figura 4.5 demonstra as diferentes composições e as caracterizações que as amostras porosas com núcleo densos foram submetidas.



**Figura 4.5:** Fluxograma amostra porosa com o núcleo denso.

## 4.6 Técnicas de caracterização

### 4.6.1 Difração de raios X

O plano cristalino dos materiais é analisado pelos resultados da difração de raios X. Para observar qualitativamente a fase cristalina das cerâmicas utilizadas foi utilizado o equipamento de difração de raios X, DMAX 2200 x - ray diffractometer, equipamento da Unicamp-FEM (Rigaku, Japan) (CuK $\alpha$ , Ni filtro, 20kV, 20 mA, 20-40° (2 $\theta$ ), 0,05° (2 $\theta$ ) /s).

Padrões e condições de medidas:

Carbonato de cálcio (JCPDS 05-0586) analisado de 20-50°;

Monetita (JCPDS 09-0080) analisado de 20-40°;

$\alpha$ -TCP (JCPDS 09-0169) analisado de 20-40°;

$\beta$ -TCP (JCPDS 09-0348) analisado de 20-40°;

Hidroxiapatita (JCPDS 09-0432) analisado de 20-40°;

Pirofosfato de cálcio (JCPDS 09-0346) analisado de 20-40°.

### 4.6.2 Fluorescência de raios X

Para a análise quantitativa dos elementos dos materiais é utilizado a fluorescência de raios X. Essa técnica foi realizada utilizando o equipamento marca Rigaku modelo RIX 3100 (Unicamp-FEM), obtendo resultados sobre as cerâmicas, em relação à taxa Ca/P pela quantificação dos elementos Ca, P e O, além de verificar a presença de impurezas nos reagentes primários com o elemento magnésio.

### 4.6.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das amostras cerâmicas e dos compósitos foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura utilizando um microscópio Jeol, Unicamp-FEM (JXA 840 A). Algumas amostras de compósitos foram fraturadas em N<sub>2</sub> líquido e recobertas com ouro, por meio do Sputer Coater (Bal- Tec- SCD 050) com corrente de 40 mA durante 200 s, com tensão de operação em 10 kV.

As imagens das amostras realizadas na Universidade de Trento, Itália, foram provenientes do equipamento Cambridge Stereoscan 200 (operating mode, high vacuum, secondary electron SE detector). As amostras secas foram recobertas por meio do Sputer Coater (SEM Coating Unit PS3, Assing S.p.A, Rome, Itália) com uma fina camada de ouro em atmosfera de argônio (20 mA a  $5 \times 10^{-7}$  Pa por 30 segundos).

Para as amostras analisadas durante o estágio na Universidade Texas A&M foi utilizado o equipamento JEOL 6400, com uma aceleração de voltagem de 15 kV, o recobrimento da superfície foi realizado utilizando o equipamento *sputer coater*, permitindo uma formação de uma fina camada de ouro (~4 nm).

#### 4.6.4. Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

É uma técnica utilizada para analisar superfícies e interfaces. O espectro FTIR pode ser adquirido por distintos métodos de medidas tais como, transmissão, reflexão, refletância total atenuada (ATR) e entre outros (Mueller, 2001) (Hirschmugl, 2002). O método ATR por não necessitar que a amostra esteja polida é utilizado com maior frequência no estudo de biomateriais (Ratner, et al., 2004). As amostras foram caracterizadas pelo equipamento *Fourier transform infrared spectroscopy*, Unicamp-FEM (Perkin Elmer® 1760X FTIR), utilizando uma faixa de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.6.5 Ensaio mecânico

As amostras passaram por ensaio mecânico à compressão. Para a avaliação foi utilizado o equipamento 4502 (Instron, Trento, Italy), a velocidade do ensaio foi de 1mm/min, com uma célula de carga de 1kN. Para cada grupo foram testadas 3-4 amostras, as quais foram medidas antes e depois do ensaio. Tabela 4.4 são as amostras de núcleos densos e porosos e na tabela 4.5 apresenta as amostras dos suportes tridimensionais. As amostras tridimensionais foram avaliadas utilizando o ensaio de compressão mecânica em condições úmidas, recurso disponível pelo departamento de Bioengenharia da Universidade do Texas A&M, utilizando o equipamento *Test Resources* (College Station, Estados Unidos), a velocidade do ensaio foi 2 mm/min.

Tabela 4.4: Amostras para ensaio mecânico de compressão.

| Amostras | Dimensões (mm x mm) |
|----------|---------------------|
| P1       | 4x4                 |
| P2       | 4x4                 |
| P3       | 4x4                 |
| P4       | 4x4                 |
| D0       | 4x4                 |
| D1       | 4x4                 |
| D2       | 4x4                 |
| D3       | 4x4                 |
| D4       | 4x4                 |
| D5       | 4x4                 |

Tabela 4.5: Amostras para ensaio mecânico de compressão.

| Amostras (composição)  | Dimensões (mm x mm) |
|--|---------------------|
| S1 (porosa – 15%w/w de hidroxiapatita; denso- 25% w/w de hidroxiapatita) | 10x6                |
| S2 (porosa – 15%w/w de hidroxiapatita; denso- 10% w/w de hidroxiapatita) | 10x6                |
| S3 (porosa – 15%w/w de hidroxiapatita; denso- 15% w/w de hidroxiapatita) | 10x6                |
| S4 (porosa – 15%w/w de hidroxiapatita; denso- 20% w/w de hidroxiapatita) | 10x6                |

Após a obtenção dos dados, gráficos de força por deslocamento, foi calculada a tensão à compressão para cada amostra, de acordo com as equações apresentadas a seguir, para o ensaio axial foi utilizado a:

$$\text{Equação 1: Tensão (MPa)} = N/\pi r^2$$

Os dados utilizados para o cálculo de tensão à compressão foram retirados da curva de força (N) por deslocamento (mm), fornecido pelos ensaios mecânicos à compressão, o modulo de elasticidade das amostras foram calculados seguindo as normas ASTM D1621-10 e D695-08

para as amostras densas e porosas, respectivamente. Os resultados foram submetidos aos ensaios estatísticos ANOVA e “2-sample-t”.

#### 4.6.7. Porosidade

Para analisar a porosidade das amostras porosas com o núcleo denso, foi realizada a pesagem das amostras com o NaCl, após a retirada do agente porogênico e das amostras secas. A porosidade foi determinada através da:

$$\text{Equação 2: Porosidade \%} = (1 - P/P') \times 100$$

Onde P é o peso das amostras com o agente porogênico e P' é o peso da amostra após lixiviação do agente (amostra seca). O peso das amostras foi obtido utilizando a balança eletrônica de alta precisão.

#### 4.6.8 Ângulo de contato

Os experimentos foram realizadas usando uma micro balança diWilhelmy DCA322 (Termo Cahn) capaz de recolher dados a uma taxa de 1 Hz, mostrado na Figura 4.6.



Figura 4.6. Foto do equipamento tensiômetro Wilhelmy.

O tensiômetro Wilhelmy mede as forças de molhamento no perímetro das amostras, normalmente utiliza amostras com formato de placa ou cilindro. Desse modo, ao ser imersa em líquido, a amostra entra em contato com a solução e são determinadas as forças. As forças determinam os cálculos para atingir os ângulos de avanço e recuo. A força do componente é a força de molhamento que é definida como: Força de molhamento =  $lv P \cos \theta$ .

Onde,  $lv$  é a tensão da superfície do líquido,  $P$  é o perímetro da amostra. O ângulo de contato é obtido a partir dos dados gerados, como o avanço da amostra para o líquido, é chamado de ângulo de avanço. Já quando o processo é invertido, os dados recolhidos são utilizados para determinar o ângulo de recuo. Esta análise também foi durante o estágio na Universidade de Trento- Itália.

Para a observação do ângulo de contato estático das amostras foi utilizado o equipamento KSV-CAM 200 (College Station, Texas-US), o qual utiliza um sistema de autorecipiente, vídeo câmera e software para análise do formato da gota. O líquido utilizado para a criação da gota foi água deionizada, com um volume de 5  $\mu\text{L}$  sendo observado durante 15 e 120 segundos. Para cada grupo foram testadas as duas superfícies a em contato com o ar durante a evaporação do solvente e a em contato com o vidro, em todas foram realizadas triplicatas.

#### 4.6.6. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Análises de DSC (Mettler, Model DSC30, Germany) foram realizadas por meio de um primeiro aquecimento na faixa de -100 a 100  $^{\circ}\text{C}$  (taxa de aquecimento de 10  $\text{C}/\text{min}$ , sob atmosfera de nitrogênio), para que se pudesse desconsiderar a influência térmica decorrente da etapa de preparação das amostras. Posteriormente, outra varredura foi realizada para avaliar o pico endotérmico com sua faixa entre -100 a 300  $^{\circ}\text{C}$ , com a taxa de aquecimento de 10  $\text{C}/\text{min}$ , sob atmosfera de nitrogênio. Com estes resultados, foram medidos os valores da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), fusão ( $T_m$ ) e a variação da entalpia de fusão ( $\Delta H_f$ ). A porcentagem de cristalização das amostras foi calculada a partir das curvas obtidas para a área do pico endotérmico e a entalpia de fusão do material.

O grau de cristalinidade,  $X_c$ , foi determinado pela relação do calor da fusão,  $\Delta H_f$ , das amostras (corrigidos retirando o valor de fosfato de cálcio presente) a entalpia de cristalização do PCL,  $\Delta H_c$ , o qual é 136  $\text{J}/\text{g}$ , desse modo  $X_c = \Delta H_f/\Delta H_c$  (Ergun , et al., 2012) (Ozkan, et al., 2010). Esta análise ocorreu durante o estágio na Universidade de Trento-Itália.

#### 4.6.7 Microscopia de força atômica (MFA)

A topografia e rugosidade das superfícies das amostras foram analisadas pelo equipamento de força atômica (NT-MDT Solver AFM). Os filmes de PCL, PCL/ácido oleico, PCL/ *Span*, PCL/ ácido oleico/ HA e PCL/ *Span*/ HA foram analisados em condições secas, permanecendo 24 horas no dessecador antes da análise.

Os dados foram obtidos em temperatura ambiente, utilizando uma ponta de varredura em uma área de no máximo 90 mm<sup>2</sup>, a frequência ficou entre 1.0 a 1.2 Hz. Assim como as anteriores, esta análise ocorreu durante o estágio na Universidade de Trento- Itália.

#### 4.6.8 Ensaio mecânico de tração

Para a avaliação da adição de hidroxiapatita na matriz polimérica foi realizado o ensaio de tração nas amostras fabricadas em forma de membrana. As amostras foram cortadas em tiras retangulares (~20 mm × ~5 mm × ~1.0 mm) , seguindo a norma ASTM D882-12. Foi utilizado o equipamento Instron 3345 ( Universidade TexasA&M- College Station, EUA), com uma taxa de tração constante de 50 mm/mim. Usando a curva de tensão deformação foi calculado o modulo de elasticidade (MPa), a carga máxima (N), tensão da carga máxima (MPa) e a carga durante o rompimento (MPa). Os valores foram retirados de uma media de 6 amostras por grupo. Esta analise ocorreu durante o estagio na Universidade Texas A&M.

#### 4.6.9 Microscopia óptica – luz polarizada (MO)

Para analisar a interação dos surfactantes e dos *whiskers* de hidroxiapatita com a nucleação dos esferulitos nas membranas foi realizada imagens com luz polarizada, utilizando microscópio optico Olympus SZ 40 - modelo GX51 - com sistema acoplado de fotografia, com a lente polarizadora GX-PO.

## 4.7. Ensaio preliminares *in vitro*

### 4.7.1 Avaliação da biocompatibilidade e citotoxicidade dos *whiskers* de hidroxiapatita

A linhagem celular utilizada no ensaio de citotoxicidade foi proveniente da ATCC, utilizando as células do CHO-k1 (Chinese ovary hamster), em cultura com meio RPMI 1640 (Gibco 23400) suplementado com antibiótico e antimicótico (penicilina 100 unidades/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina 0,025 µg/mL Gibco 15240-062), 2mM de glutamina e 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas) em incubadora úmida a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, até atingirem a subconfluência (aproximadamente 90% de utilização da área de cultura) na placa de cultura da qual foram descoladas pela ação da solução de tripsina 0,05%/EDTA 0,02% em solução tampão fosfato pH 7,4.

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

Para o ensaio de citotoxicidade foi seguido à norma ISO 1993 (ISO, 2009) a preparação dos extratos com as amostras em pó de *whiskers* de hidroxiapatita foi seguido uma proporção de 0,2g/mL de meio de cultura. Como controle negativo para os pós foi utilizado Alumina (0,2g/mL). As amostras foram mantidas em um banho termostaticado a 37° C com agitação leve, por 48 horas. Como controle positivo, foi preparado uma solução fenol 0,5% v/v. Os extratos foram esterilizados por filtração por membrana de acetato de celulose e diluídos de 100 a 6,25% v/v de meio de cultura RPMI para realização do ensaio de viabilidade celular.

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

#### 4.7.2. Ensaio com células de osteosarcoma humana (USO2)

Para o ensaio de proliferação nas membranas foi utilizado à linhagem celular U2OS (MarinPharm GmbH), células osteosarcoma humana, entre as passagens 2 a 6. Foi utilizada uma cultura de DMEM (GIBCO) complementada com 10% de soro fetal bovino, 2mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio e 1mM de penicilina/ estreptomomicina em uma incubadora mantida a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>, como descrito anteriormente (Hsu, et al., 2010).

As amostras foram cortadas com um bisturi circular de 11 mm de diâmetro, posteriormente foram esterilizadas por imersão em álcool 70% durante 2 horas. Após a fixação das amostras nas placas petri, foram deixadas em contato com a luz UV durante 30 minutos. As células foram semeadas em uma concentração de células  $2,5 \times 10^4$  células/ cm<sup>2</sup> e esperou 45 minutos para a adição do meio, para uma melhor fixação das células nas amostras.

Após os períodos 1, 3 e 7 dias as amostras (PCL, PCL/HA, PCL/ácido oleico, PCL/ ácido oleico/HA, PCL/*Span* e PCL/*Span*/HA) foram lavadas com PBS e adicionados 4% de paraformaldeído durante 10 minutos, posteriormente foram adicionados PBS para a visualização no microscópio Nikon FN1 (University of Texas A&M). As imagens foram obtidas utilizando a câmera Nikon C1 com uma cabeça de laser confocal, com 40-mW Argon (Melles Griot) e uma lente objetiva 60x imersa em água (Tondon, et al., 2012).

Foi medido o pH no meio de cultura antes e depois dos períodos utilizando as tiras ColorpHast (EMD- pH 5,0 -10,0). Os ensaios ocorreram durante o estágio na Universidade Texas A&M, em College Station – Texas.

#### **4.8 Obtenção e diferenciação das células tronco.**

O estudo com células tronco ocorreu com parceria com o Centro de Hematologia e Hemoterapia da Unicamp, com colaboração dos pesquisadores: Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad, Adriana da Silva Santos Duarte e Pedro Bordeaux Rego. Toda pesquisa passou por julgamento do comitê de ética, sendo um adendo no projeto do aluno Pedro Bordeaux Rego, o aceite do comitê esta em anexo I.

As etapas de preparação das células tronco de origem humana do tecido adiposo foram a separação das células, expansão e cultura das ADSC, avaliação de fenótipo celular por citometria de fluxo, citogenética e atividade da telomerase.

##### **4.8.1 Coleta das células.**

A separação das células tronco de origem humana provenientes de tecido adiposo foi realizada seguindo o protocolo, descrito no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas (processo CEP-Nº 838/2008), o qual resumidamente diz que o tecido adiposo é lavado com PBS e dissecado em pequenos fragmentos. Depois, os fragmentos são tratados com colagenase tipo I em solução-tampão com 25mM Hepes (20mg/ml BSA + 1.5mg/ml colagenase) por 30-90 minutos e a 37°C e agitação gentil. A enzima é desativada pela adição de igual volume de DMEN-low glucose/10% SFB e centrifugada (220g) por 10 minutos. O pellet é ressuspendido em 40 ml de DMEN-low glucose /10% SFB e filtrado por uma membrana de nylon(100µ). O filtrado é centrifugado novamente (220g) por 10min e ressuspendido em meio de cultura padrão DMEN-low glucose / 10% SFB. As células foram plaqueadas numa densidade de  $1,5 \times 10^5$  células/ml. Após 48 horas de incubação, a cultura é lavada com PBS para retirar as células não aderentes.

#### 4.8.2. Expansão e cultura das ADSC.

As células foram incubadas por 3-5 dias para permitir a formação de colônias de ADSC, ou até atingirem confluência. Ao atingir confluência de 60-70%, as células foram tripsinizadas e distribuídas a  $4 \times 10^4$  células/ml. O meio de cultivo foi DMEM-LG/ 10% SFB com antibiótico.

#### 4.8.3. Diferenciação das ADSC

Após a quarta passagem, as células tronco foram diferenciadas em células adipósitas, osteoblasticas e condrócitas. Para induzir a diferenciação das células foram cultivadas em meio de cultura específico para cada diferenciação, de acordo com o protocolo Invitrogen (A10296, versão A).

Para o meio de cultura para a diferenciação adipogênica foram utilizados dexametasona, 3-isobutil metalxantina, insulina e indometacina. No meio osteogênico foram utilizados ácido ascórbico, dexametasona, proteína morfogênica óssea 2,  $\beta$ - glicerol fosfato. No meio de cultura utilizado para a diferenciação condrogênica foram utilizados ácido ascórbico, proteína morfologênica óssea 6, insulina e TGF  $\beta$ 1. Todos os meios de cultura foram trocados a cada 3 dias.

#### 4.8.4. Avaliação de fenótipo celular por citometria de fluxo.

Após a quarta passagem, as células foram analisadas por citometria de Fluxo. As células foram coletadas, totalizando  $10^5$  células, e ressuspensas em PBS com 200uL de solução para análise por citometria de fluxo ( PBS1X sem  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Mg}^{2+}$ , 3%FCS, 10mM HEPES pH 7,2) com os anticorpos CD73, CD90 e CD105, CD3, CD14, CD45 e CD133 e IGg 1 (controle positivo) ou sem os anticorpos (controle negativo). Em seguida e por duas vezes, as células foram lavadas com PBS por 5 min e centrifugadas a 220g por 5 minutos e descarta-se o sobrenadante. As células foram incubadas em 200uL de anticorpo secundário conjugado com fluocromo (fluoresceína ou rodamina) por 30min e a 4°C (em gelo). Para remover o excesso de anticorpo, as células, por duas vezes, foram centrifugadas a 220g por 5 min e sobrenadante foi descartado.

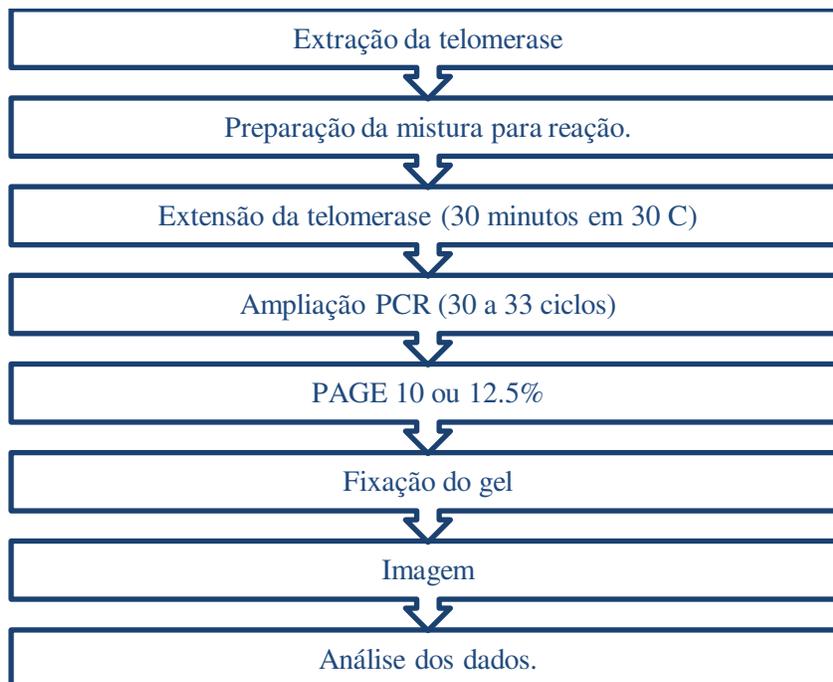
As células foram analisadas em um citômetro de fluxo (Becton-Dicknson) imediatamente. Para análise posterior, o material foi fixado em 1% de paraformaldeído.

#### 4.8.5 Microscópio confocal.

As células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro, lavadas com PBS e fixadas com uma solução de paraformaldeído 4% por 10 minutos. Em seguida, foi realizado o bloqueio e a permeabilização celular com uma solução 3% de BSA e 0,1% de Triton 100x. Os anticorpos primário anti-CD90, anti-CD73 e anti-CD105 foram diluídos para 10 µg/mL em solução 1% de BSA e incubados com as células, em câmara úmida a 4°C, durante 18 horas. As lamínulas foram lavadas com PBS e montadas em lâminas, utilizando-se meio de montagem para fluorescência (ProLong® Gold com DAPI, da Molecular Probes).

#### 4.8.6 Avaliação da atividade da telomerase.

A avaliação da atividade da telomerase foi realizada utilizando o kit TRAPEze S7700 (Chemicon, U.S.A.) (Figura 4.7).



**Figura 4.7:** Fluxograma do ensaio da avaliação da telomerase.

O ensaio do protocolo da amplificação repetida da telomerase (TRAP)3 e as variações desse ensaio são os métodos mais comuns para o monitoramento da atividade telomerase. O ensaio TRAP, originalmente descrito por Kim é um ensaio com dois estágios, baseado em PCR. No primeiro estágio, a telomerase acrescenta repetições de 5' TTAGGG 3' ao final de um primer sintético (denominado primer TS) que apresenta uma sequência tipo telômero. No segundo estágio, os produtos são amplificados com uso de um primer reverso (denominado primer CX), que é complementar às sequências repetidas. Quando visualizadas por autorradiografia, um teste positivo com o ensaio TRAP revela uma sequência de bandas diferindo em 6 bp, do comprimento da repetição hexaédrica 5' TTAGGG 3' ( Kim, et al., 1994).

A extração da telomerase consistiu em suspender o concentrado celular em 200 µL de solução 1X CHAS Lysis Buffer por  $10^5$ - $10^6$ . Posteriormente a suspensão foi incubada no gelo por 30 minutos, a qual foi centrifugada utilizando uma micro centrífuga por 20 minutos a 4 °C. Foram transferidos 160 µL do sobrenadante para um novo tubo, no qual foi determinada a concentração de proteínas.

Foi avaliada a atividade da enzima telomerase, nas passagens 4, 8 e 12.

#### 4.8.7 Citogenética das células tronco.

Para a obtenção dos cromossomos para esse ensaio, foi realizada a separação das células de 70 a 80% do confluente da placa de cultura e tratada com colchicina (10µg/mL) em uma concentração de 100 µL/mL, diretamente adicionada na cultura e incubada por um 12 horas a 37 °C.

As células foram removidas da placa e tripsinizadas por 3 minutos em 37 °C, posteriormente foram lavadas com PBS e coletadas em tubos de centrifugação de 15 mL os quais foram centrifugados por 10 minutos em 1200 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 5 mL de 0,075 mol/L de KCl em 37 °C por 12 minutos. As células foram fixadas com metanol e ácido acético (3:1), marcadas para bandas G e analisadas.

Desse modo, foram observadas utilizando microscópio óptico com magnificação de 1000x. As imagens de metáfase foram capturadas utilizando um sistema próprio de análise de citogenética.

#### 4.9 Avaliação *in vitro* das ADSC nos *scaffolds*.

As células ADSC foram cultivadas até a passagem 4 e depois colocadas no meio para indução de diferenciação osteogênica. Foi analisada a capacidade de aderência das ADSC ao biomaterial, a sua taxa de proliferação e diferenciação.

O protocolo seguido nesse projeto foi retirado do artigo do grupo de pesquisadores norte americanos da Universidade de Colorado (Kuckh, et al., 2010). As amostras foram produzidas com o diâmetro de 6 mm por 2 mm de altura, os grupos das amostras analisados foram:

- PCL (controle)- Denso;
- PCL com ácido oleico- Denso;
- PCL com ácido oleico –Poroso;
- PCL com ácido oleico e *whiskers* de hidroxiapatita (15 %w/w HA) – Poroso;
- PCL com ácido oleico e *whiskers* de hidroxiapatita (25 %w/w HA)- Denso;
- Núcleo denso área porosa com hidroxiapatita;
- Núcleo denso área porosa.

Cada ensaio foi repetido três vezes para cada grupo de amostras, todos os ensaios realizados serão detalhados adiante:

##### 4.9.1 Análise de *alizarin red* – para análise de deposição de cálcio.

Essa análise permite que identifique a presença de cálcio nas amostras analisadas. Porém a reação não é estrita para identificação do cálcio, os elementos magnésio, bário, e ferro podem interferir na reação, entretanto normalmente não apresentam em concentrações suficientes para interferir na marcação.

A solução de *alizarin red* foi misturada com água destilada 100 ml para cada 2 g de alizarin. Depois foi ajustado o pH com hidróxido de amônia. As amostras foram colocadas em

contato com a solução e depois foi removida a solução e as amostras foram analisadas pelo microscópio óptico, para uma análise qualitativa.

Já para a análise quantitativa, foram realizados os seguintes procedimentos: os poços foram lavados com PBS e as células fixadas com solução de formalina 10% por 24 horas e, após esse período, desidratadas em concentrações crescentes de álcool, mantendo cada solução em contato com as células por 1 hora. Após a última hora, a solução foi removida e as placas mantidas abertas até a secagem total. Uma vez secos, os poços foram preenchidos com uma solução de vermelho de alizarina (SIGMA), mantida durante 8 minutos. Após esse período, o excesso de corante foi removido pela lavagem abundante do material com água bidestilada e as placas novamente foram mantidas abertas até a secagem. A quantificação da coloração foi avaliada por método colorimétrico de acordo com (Gregory, et al., 2004). Foram adicionados 280 µl de ácido acético a 10% a cada poço previamente corado com vermelho de alizarina, e a placa foi levada ao agitador por 30 minutos em temperatura ambiente. O conteúdo de cada poço foi transferido para tubos tipo eppendorf, e então aquecidos a 85°C por 10 minutos e depois mantidos em gelo por 5 minutos. Os tubos foram levados para centrífuga a 20.000g por 15 minutos, e 100 µl do sobrenadante de cada tubo foi transferido para um novo tubo. Então 40 µl de hidróxido de amônia a 10% foram adicionados a cada tubo para neutralizar o ácido, e todo o conteúdo (140 µl) foi transferido para uma placa de 96 poços. A absorbância foi medida em espectrofotômetro µQuant (BioTek Instruments, Inc.) no comprimento de onda de 405 nm. A formação de matriz mineralizada foi expressa como absorbância. Foi analisada nos períodos 0, 14 e 21 dias.

#### 4.9.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Todas as amostras foram cultivadas em meio com 10% de SFB por 24h a 37°C. As amostras foram fixadas utilizando duas soluções de fixação: a primeira é constituída pelos reagentes glutaraldeído 2.5% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2, e a segunda tampão de cacodilato 0.1M. Os procedimentos consistiram em colocar as amostras em imersão na solução 1, durante 30 minutos em 4°C; posteriormente foi removido a solução das amostras e lavadas mais de uma vez na solução de fixação 2. O tempo máximo de conservação das amostras na solução de fixação 2 é de 15 dias a 4°C, todas as amostras respeitaram esse tempo de conservação.

Para o ponto crítico foi realizada a preparação das amostras pela desidratação em etanol em concentrações crescente: 70,85,95,99.8%, mantendo na última concentração durante 10 minutos até ser seco em ponto crítico (Balzers CTD 030).

As amostras foram submetidas ao recobrimento com ouro em *sputter* (Balzers CTD 050) e foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL 5800) nos períodos 4, 7, 14 e 21 dias de cultura.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

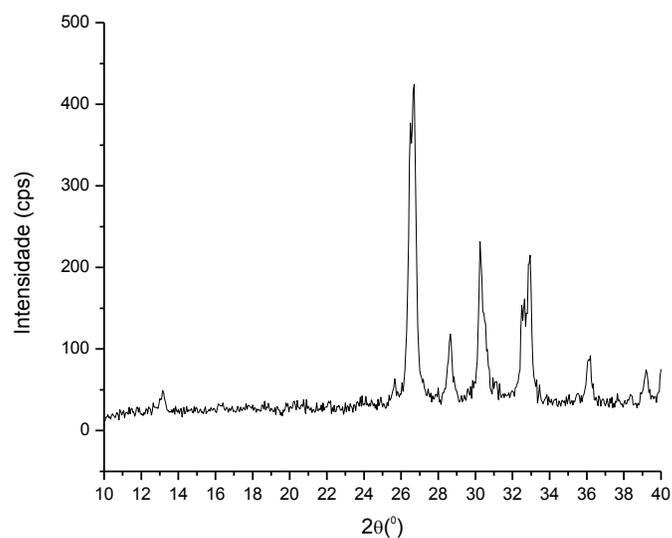
### 5.1 Caracterizações dos materiais cerâmicos

Os fosfatos de cálcio podem ser obtidos a partir de dois tipos de processamentos principais: o primeiro processo é caracterizado por utilizar pós-reagentes, os quais são misturados com água ou uma solução aquosa, na qual ocorre uma precipitação. Em seguida, a solução é levada a secar resultando no CaP desejado; esse processo foi utilizado para a síntese de monetita e carbonato de cálcio. O outro processo é quando a reação ocorre no estado sólido através da sinterização (líquida ou sólida) dos pós-iniciais até a estabilização da fase desejada, esse processo foi utilizado para a síntese do  $\alpha$ - fosfato tricálcico (Hench, et al., 1993).

O primeiro processo de fabricação permitiu a síntese de monetita com uma relação cálcio fósforo compatível ao padrão JCPDS, sendo 1,27 confirmado pela relação Ca/P com os valores retirados da FRX, visto na Tabela 5.1. A pureza de fase cristalina foi comparada com o padrão JCPDS 08090, visto na Figura 5.1.

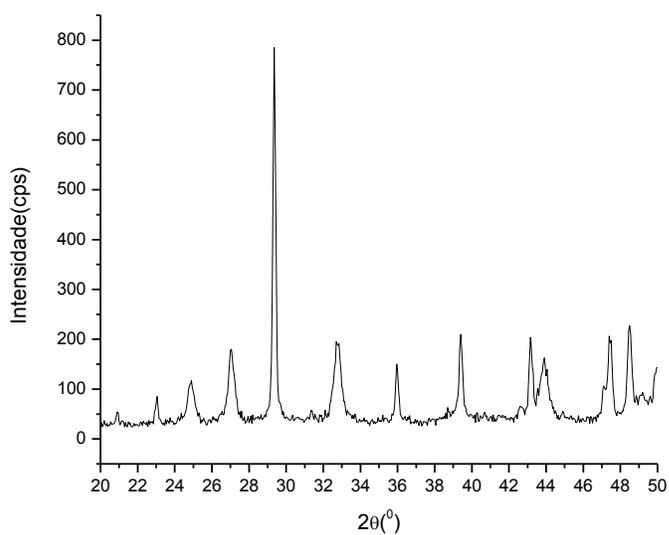
**Tabela 5.1: Valores dos elementos obtidos pela análise de FRX da monetita.**

| <b>Elementos</b>    | <b>Resultados (wt %)</b> |
|---------------------|--------------------------|
| <b>O</b>            | 48,5399                  |
| <b>Ca</b>           | 31,9937                  |
| <b>P</b>            | 19,4108                  |
| <b>Relação Ca/P</b> | 1,27                     |



**Figura 5.1: Difratograma da monetita.**

O carbonato de cálcio apresentou-se puro, possuindo uma rede cristalina compatível com os padrões JCPDS 05-0586 e 01-1032, visto na Figura . Ao realizar a análise de FRX foram detectados níveis aceitáveis de impurezas, como por exemplo, de sódio, o qual apresentou um nível de 0,1067 ppm na amostra analisada, Tabela 5.2.



**Figura 5.2: DRX do carbonato de cálcio.**

Ainda em termos de impurezas, o nível de magnésio na amostra de carbonato não alterou a temperatura de síntese de  $\alpha$ - fosfato tricálcico. A literatura referencia que valores acima de 250 ppm podem provocar o comprometimento da síntese do  $\alpha$ -TCP, devido à possibilidade de estabilizar a fase  $\beta$ -TCP, forma de baixa temperatura do TCP, e inibir a total conversão para  $\alpha$ -TCP em temperaturas altas como 1500°C (Motisuke, et al., 2008). Desse modo amostras com níveis altos de Mg necessitam da temperatura de transformação de fase [ $\beta$ ]-[ $\alpha$ ] de aproximadamente 1125°C para valores acima de 1400°C (Carrodeguas, et al., 2008).

**Tabela 5.2: Valores retirados da análise do carbonato de cálcio pelo FRX.**

| <b>Elementos</b> | <b>Resultados (wt%)</b> |
|------------------|-------------------------|
| <b>O</b>         | 48,6802                 |
| <b>Ca</b>        | 51,1441                 |
| <b>Na</b>        | 0,1067                  |
| <b>Mg</b>        | 0,0227                  |

Após a realização da síntese da mistura de monetita e carbonato de cálcio, foi obtido  $\alpha$ -TCP, em seu difratograma são visto picos de  $\beta$ -TCP, porém seu pico de 100% não foi detectado no difratograma, o qual é visto no ângulo de aproximadamente 31, visto na figura 5.3. Na figura 5.4 é visto o difratograma da amostra de  $\alpha$ -TCP, comparando com os padrões JCPDS do próprio e do  $\beta$ -TCP, pode observar que os picos principais são compatíveis com o padrão desejado.

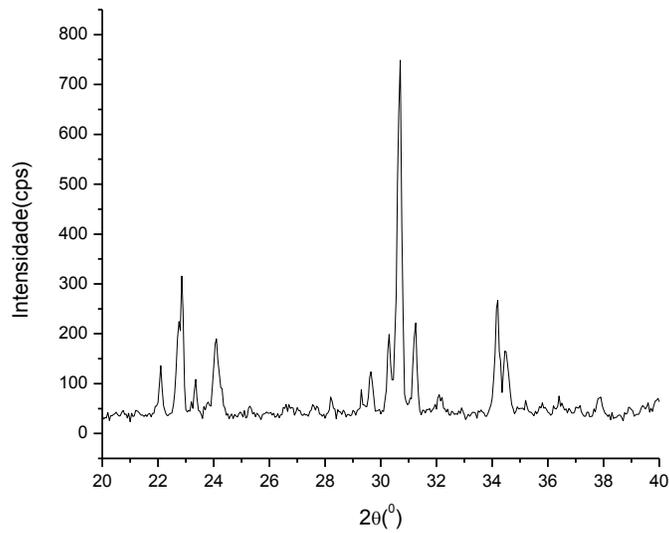


Figura 5.3: Difratoograma de raios X do [alfa] TCP.

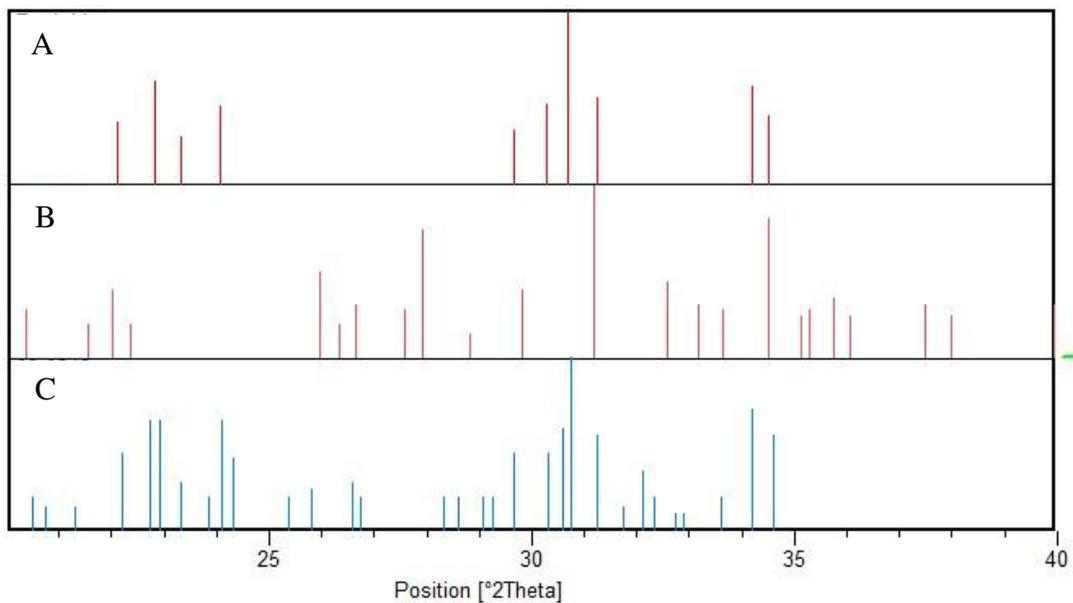
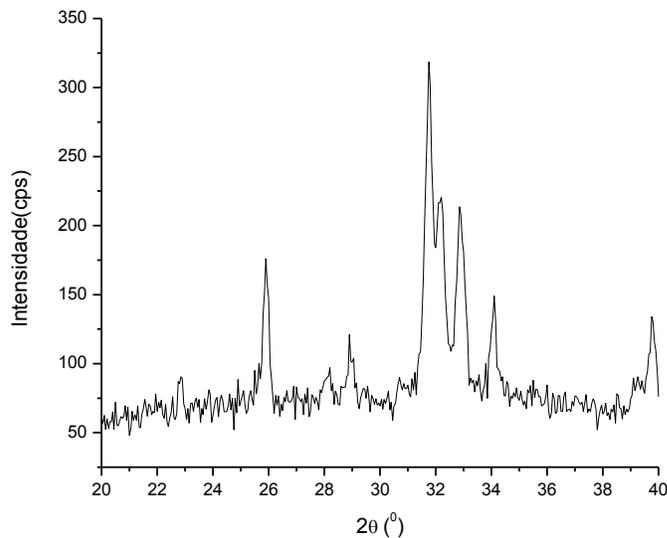


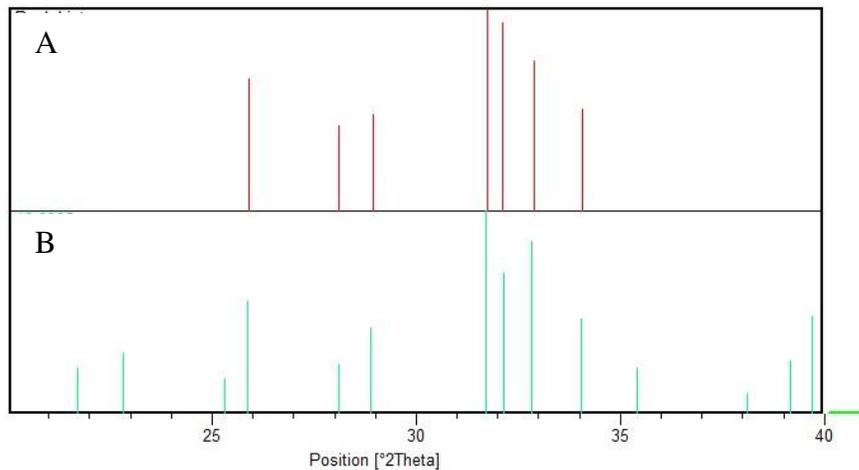
Figura 5.4: DRX da amostra de [alfa] TCP: A- padrão JCPDS 09-0169; B- [Beta]- TCP padrão JCPDS 09-0348; C-amostra [alfa] TCP.

Após a hidrólise do [Alfa]-TCP, foram obtidos e caracterizados os *whiskers* de hidroxiapatita. Essa cerâmica apresentou seu difratograma compatível com o padrão JCPDS de hidroxiapatita deficiente em cálcio (46-0905), já que foi produzido utilizando como reagente o

[Alfa]-TCP, o qual apresentou uma relação Ca/P de 1,50 (figura 5.5 e figura 5.6). Essa relação permite uma maior solubilidade da cerâmica no fluido corpóreo, ao se comparar com hidroxiapatita estequiométrica, já que é apresentado na literatura que a taxa de reabsorção é de aproximadamente 1-2% por ano (Constantino, et al., 1994).



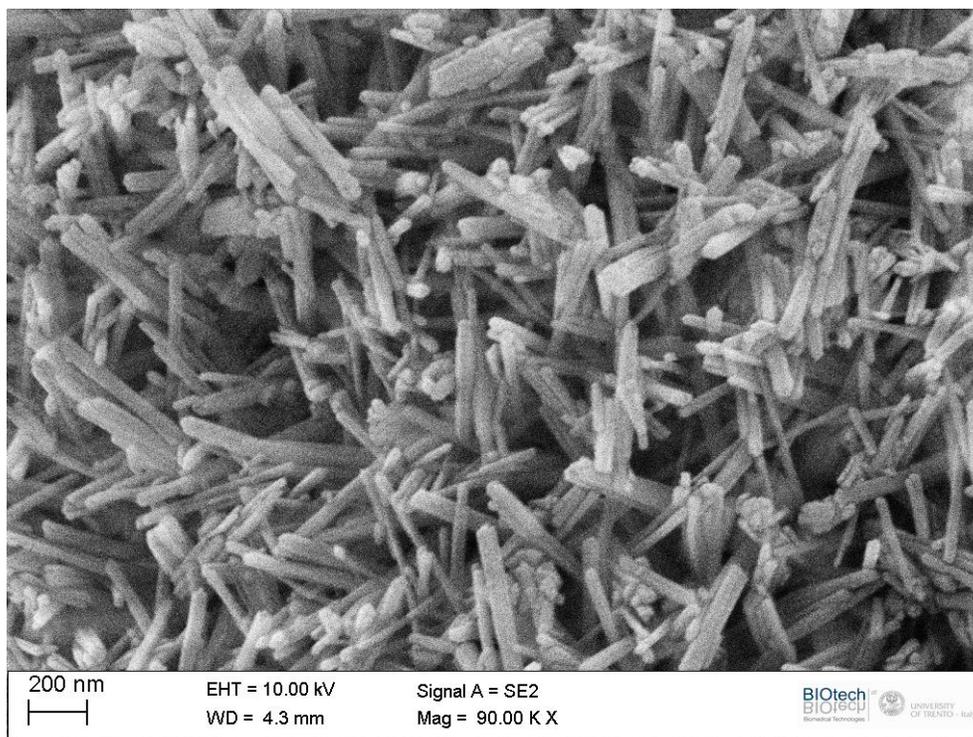
**Figura 5.5:** Difratoograma de raios X do *whiskers* de HA.



**Figura 5.6:** Padrão JCPDS (A) comparando seus principais picos com a amostra de *whiskers* de HA (B).

De fato, a morfologia dos *whiskers* de hidroxiapatita é caracterizada pela semelhança de agulhas com uma alta razão de aspecto, sendo calculada utilizando  $l/d$ , sendo  $l$  o valor do comprimento e  $d$  o valor do diâmetro do *whiskers*. Desse modo, quando apresentaram altos

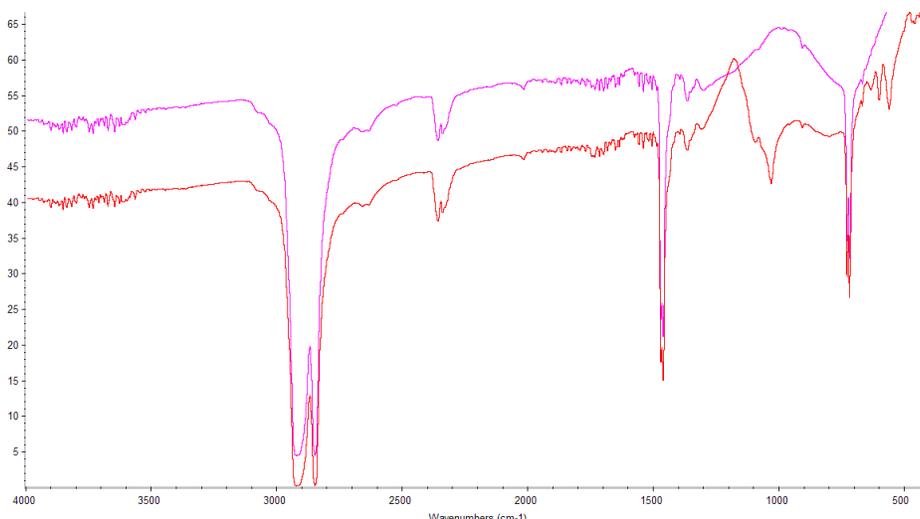
valores de razão de aspecto estes componentes cerâmicos demonstram uma morfologia alongada e fina, porém quando apresentarem baixos valores é caracterizado por uma morfologia próxima a de partículas. A morfologia semelhante com agulhas pode ser visualizada na figura 5.7.



**Figura 5.7:** Imagem dos *whiskers* de hidroxiapatita com escala de 200 nm.

Essa morfologia mostrou ser a responsável pelo aumento nos valores da resistência mecânica à compressão, em trabalhos anteriores, pois essa característica de semelhança com agulhas minimiza a fragilidade da cerâmica, e aproxima com a resistência teórica, desse modo são utilizado *whiskers* como reforço em matrizes poliméricas (Cardoso, et al., 2010).

Na figura 5.8 são vistos os espectros das amostras de *whiskers* de hidroxiapatita com o porta amostra e o somente o porta amostra. Alguns picos da amostra de hidroxiapatita parecem sobrepostos com alguns picos do plástico utilizado como porta amostra. O pico próximo a banda de  $1000 \text{ cm}^{-1}$  é atribuída a vibrações dos grupos de fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), os picos de absorção próximos a  $600$  e  $500 \text{ cm}^{-1}$  corresponde a vibrações de  $\text{PO}_4^{3-}$ .



**Figura 5.8: FT-IR das amostras superior porta amostra; inferior porta amostra com *whiskers* de hidroxiapatita.**

## **5.2 Estudo do uso de surfactantes: ensaio de molhabilidade, microscopia de força atômica (MFA), microscopia de varredura (MEV), microscópio óptico com luz polarizada e ensaio de tração das membranas.**

A interface entre a matriz polimérica e a cerâmica deve ser minuciosamente estudada, assim análises como molhamento e topografia da superfície foram realizadas para o entendimento da influência da hidroxiapatita e dos surfactantes na matriz polimérica.

A necessidade de utilizar surfactantes para uma melhor distribuição de cerâmicas em materiais poliméricos tem sido abordada por diversos grupos de pesquisas, entre eles o grupo de pesquisa da Universidade Dankook, o qual pesquisou a utilização do ácido oleico para melhor distribuição de hidroxiapatita em membrana de PCL (Hae-Won, 2007). Assim como tal, foi possível afirmar que a utilização de surfactantes permitem uma melhor dispersão e homogeneização das amostras. Figura 5.9 mostra as imagens das fraturas das amostras PCL/HA, PCL/Ac oleico/HA e PCL/*Span*/HA.

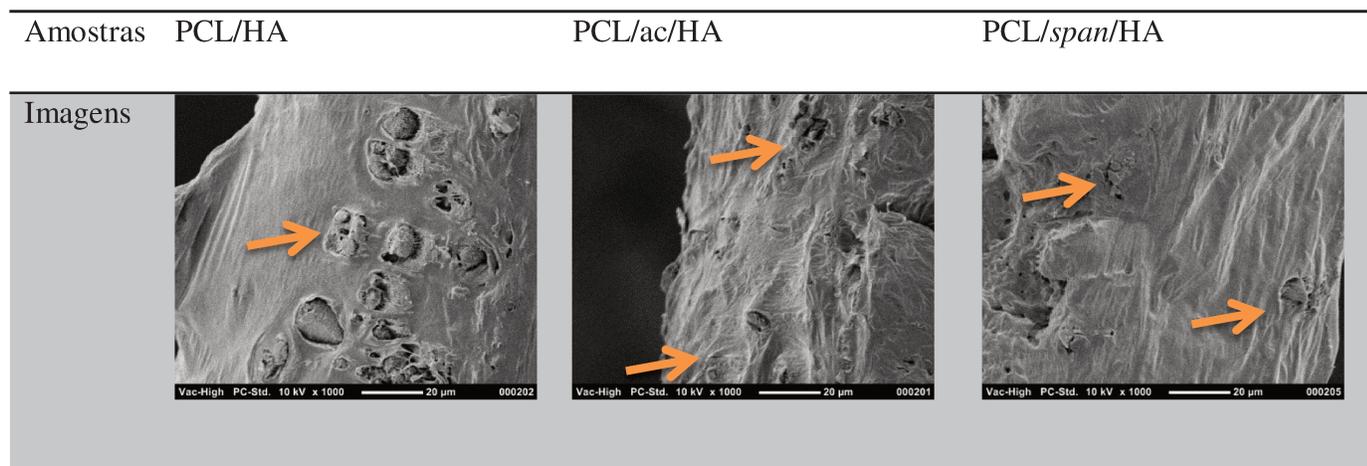


Figura 5.9: Imagens com aumento de 1000x das amostras PCL/HA; PCL/ac/HA e PCL/span/HA.

A amostra que não teve a adição de surfactante resultou em maiores aglomerados cerâmicos e uma possível decantação da composição cerâmica, devido a maior presença dos aglomerados na área em contato com o vidro. Nas amostras que apresentaram surfactantes em sua composição, os aglomerados cerâmicos foram menores e apresentaram-se nas áreas em contato com o ar e com o vidro.

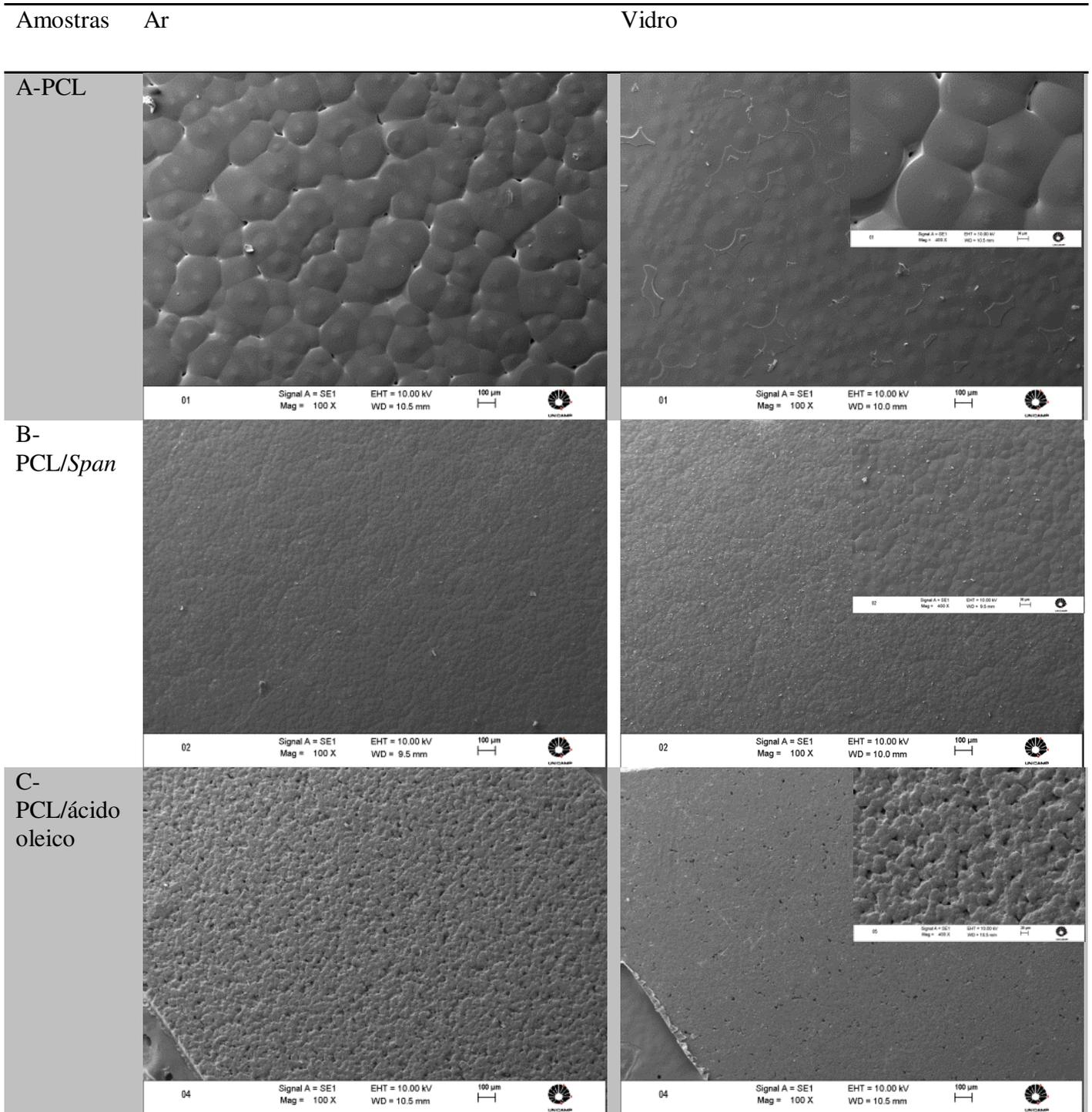
A presença de surfactantes também altera as propriedades de molhabilidade da superfície, desse modo, quando é aumentado a hidrofiliabilidade pode aumentar a interação entre a superfície do biomaterial com o fluido corpóreo (Kilpadi , et al., 1994).

A técnica de ângulo de contato por análise dos ângulos de uma gota com a superfície estudada utiliza apenas uma secção da forma da gota para análise, entretanto com essa técnica é possível reduzir as variáveis, devido analisar apenas uma superfície da amostra. Já o método Wilhelmy, utiliza uma média dos valores dos ângulos de contato, revelando resultados sobre o ângulo de avanço e de recesso (Good, 1993).

Nesta análise alguns aspectos devem ser abordados, como rugosidade, dureza e composição, pois podem alterar o resultado do ângulo de avanço e recesso. A irregularidade da superfície pode alterar o ângulo de avanço, pois a água pode permanecer no defeito da superfície.

A Figura 5.10 contém imagens de microscopia eletrônica dos filmes analisados, tanto da superfície em contato com o ar durante o processo de evaporação de solvente, quanto da superfície em contato com o vidro. Todas as superfícies em contato com ar apresentaram mais rugosas; a membrana de PCL com ácido oleico resultou em superfícies rugosas em ambos os

grupos, com ou sem hidroxiapatita; o mesmo não ocorreu quando adicionado *Span*, sendo que apenas no grupo com hidroxiapatita apresentou rugosidade na superfície.



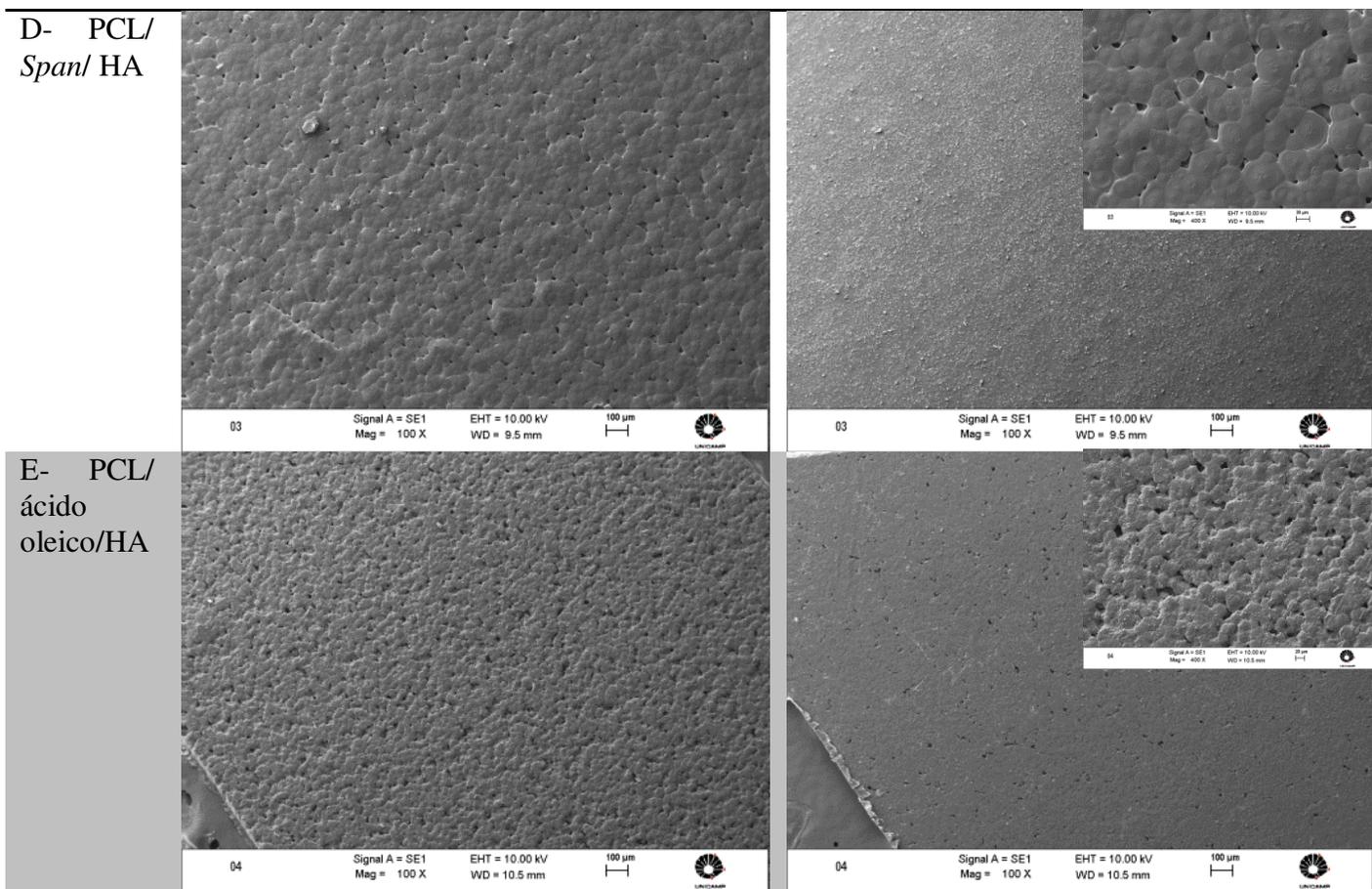
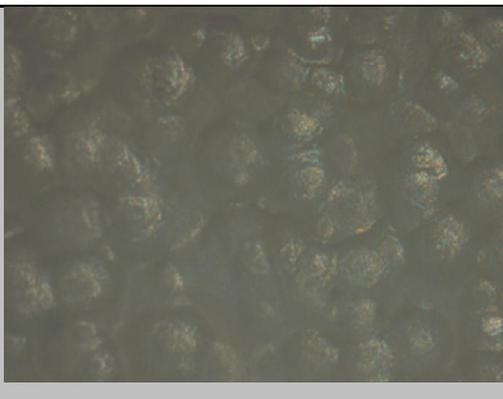
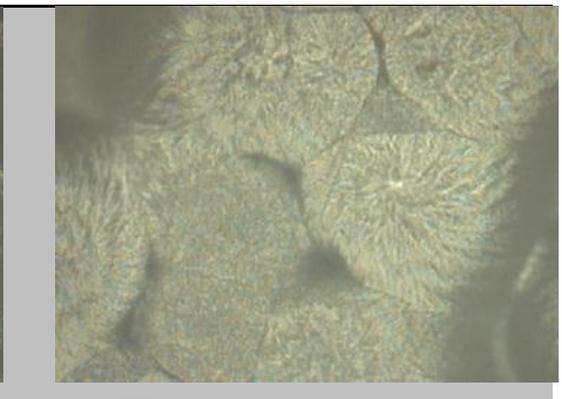
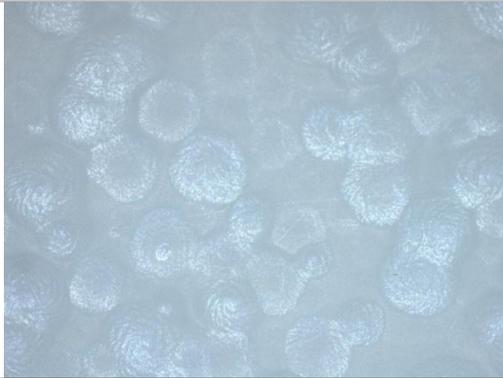
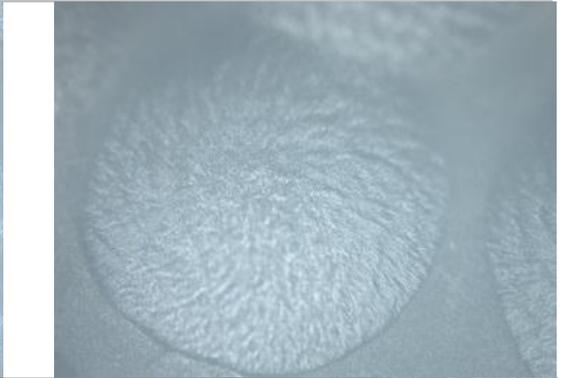
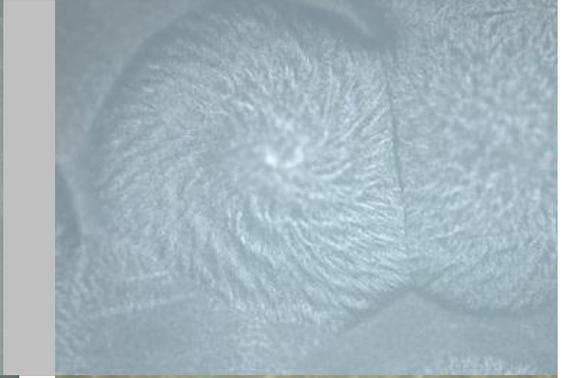
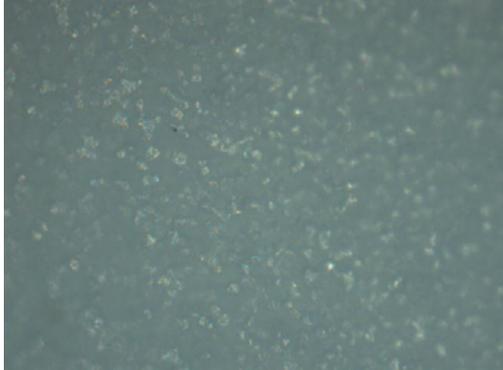


Figura 5.10: MEV das amostras em contato com o ar e com o vidro, durante processo de evaporação de solvente. Aumentos de 100x e no detalhe de 400 vezes. A- PCL; B-PCL/*Span*; C-PCL/ ácido oleico; D- PCL/ *Span*/ HA; E- PCL/ácido oleico/HA.

Para comprovar se ocorreu alguma alteração na formação dos esferulitos foi realizado imagens de microscopia óptica utilizando uma lente polarizadora. Nas amostras sem adição de cerâmica, foi possíveis visualizar os esferulitos. Os quais se apresentaram com um diâmetro semelhante nas amostras com surfactantes em comparação com o controle (PCL) (figura 5.11).

Entretanto, nas amostras com hidroxiapatita ocorreu uma dificuldade em obter uma amostra com espessura ideal para a passagem de luz. Desse modo, sendo as amostras opacas, não facilitaram a passagem da luz, reduzindo a visibilidade dos núcleos de cristalizações. Porém, é notável a redução do tamanho dos esferulitos nas amostras com adições cerâmicas.

| Amostras           | Aumento 50x   | Aumento 200 x  |
|--------------------|---|--|
| A-PCL              |    |    |
| B-PCL/Ácido oleico |   |   |
| C-PCL/Span         |  |  |
| D-PCL/HA           |  |  |

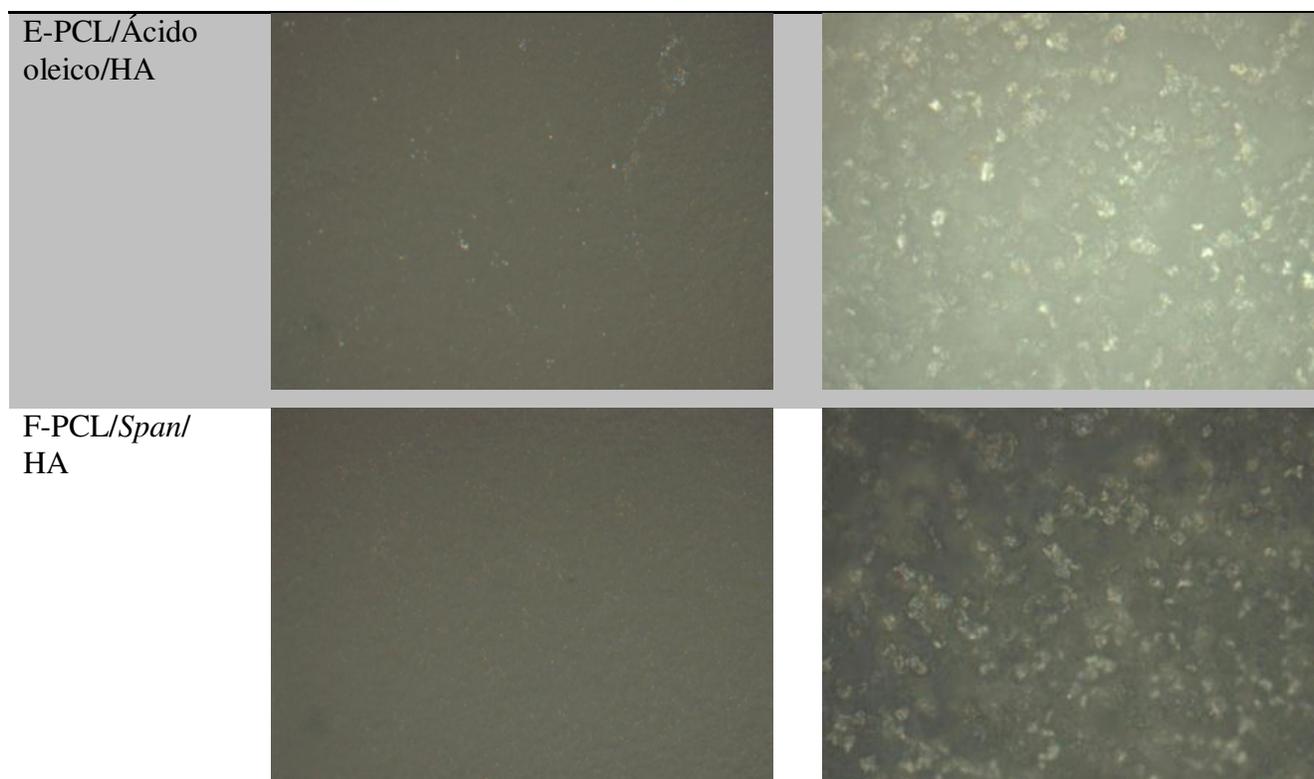


Figura 5.11: Microscopia óptica com luz polarizada: A- PCL; B- PCL/ácido oleico; C- PCL-Span; D-PCL/HA; E- PCL/ácido oleico/HA; e F- PCL/Span/ HA.

A observação da superfície pela análise das imagens de MEV, não gera um resultado palpável a respeito da rugosidade da superfície. Desse modo, foi realizada a análise da topografia pelo microscópio de força atômica.

Tabela 5.3: Valores da Rugosidade pelo MFA.

| Amostras                   | Ra       |
|----------------------------|----------|
| PCL ar                     | 89 nm    |
| PCL vidro                  | 61 nm    |
| PCL/ <i>Span</i> ar        | 27 nm    |
| PCL/ <i>Span</i> vidro     | 12 nm    |
| PCL/ácido oleico ar        | 117 nm   |
| PCL/ácido oleico vidro     | 49 nm    |
| PCL/ <i>Span</i> / HA ar   | 21 nm    |
| PCL/ <i>Span</i> /HA vidro | 0,476 nm |
| PCL/ ácido oleico/HA ar    | 200 nm   |
| PCL/ácido oleico/ HA vidro | 154 nm   |

Os valores de rugosidade observados na Tabela 5.3 são compatíveis com a morfologia observada pelas imagens do MEV. Assim, as superfícies da amostra de PCL, apresentam uma rugosidade de 89 e 61nm, das superfícies em contato com ar e vidro, respectivamente.

As amostras com adição de ácido oleico apresentaram valores de rugosidade altos, em torno de 117 nm e 49 nm, das superfícies em contato com ar e vidro. Quando adicionada hidroxiapatita esses valores aumentaram passando para 200 e 154 nm respectivamente, devido à adição de cerâmica na matriz polimérica.

Os valores de rugosidade das amostras com adição de *Span* apresentaram valores interessantes. Ambas as amostras resultaram em superfícies mais lisas, e mesmo ao adicionar hidroxiapatita os valores apresentaram baixos, em torno de 21 e 0,476 nm. Fato curioso é que ao adicionar a hidroxiapatita a superfície em contato com o vidro, contrariamente mostrou os valores mais baixo de todas as amostras.

A adição de dispersantes em compósito é realizada para aumentar a adesão proteica na superfície do biomaterial para facilitar a cultura de células, porém caso torne o material muito hidrofílico ou muito hidrofóbico tendem a inibir a adsorção de proteínas e a adesão celular.

Por outro lado, a dureza da superfície permite atribuir um aumento no ângulo de contato. Desse modo, foi esperado que as amostras com hidroxiapatita tendessem a possuir um maior ângulo de contato, devido à presença de cerâmica na matriz polimérica.

Na tabela 5.4, é visto os resultados do ângulo de contato pelo método Wilhelmy.

Tabela 5.4 Resultados da análise de angulo de contato; angulo de contato de avanço, recesso e a diferença entre ambos.

| Amostras              | Ângulo de avanço $\theta_a$<br>(°)- desvio padrão | Ângulo de recesso $\theta_r$<br>(°)- desvio padrão | Diferença entre $\theta_a\theta_r$<br>(°) |
|-----------------------|---|--|---|
| PCL                   | 88,1 (3,4)  | 59,5 (3,2)   | 28,6                                      |
| PCL/ <i>Span</i>      | 90,6 (2,2)  | 54,1 (1,1)   | 36,5                                      |
| PCL/ácido oleico      | 108,9 (4,2)                                       | 25,7 (1,2)   | 83,3                                      |
| PCL/ <i>Span</i> / HA | 90,4 (3,6)  | 41,1 (2,3)   | 49,3                                      |
| PCL/ ácido oleico/HA  | 95,3 (2,1)  | 37,2 (0,2)   | 58,0                                      |

O dispersante ácido oleico apresenta uma cabeça polar e uma cauda apolar. Quando é realizado o ângulo de avanço esse é relacionado com a parte mais hidrofílica da superfície, já quando realizado o ângulo de recesso, é relacionado com superfícies hidrofóbicas.

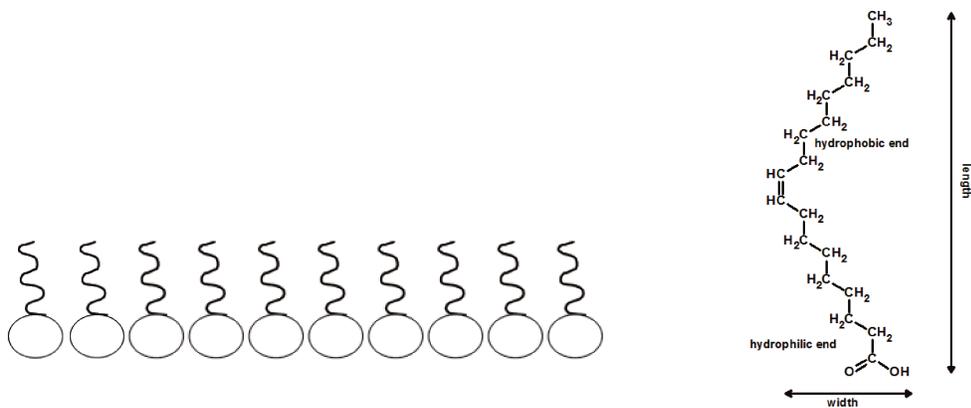


Figura 5.12.: Estrutura química do ácido oleico.

A figura 5.12, mostra como é a estrutura química do ácido oleico, o final hidrofílico apresenta-se no começo da estrutura, já o restante é uma cadeia hidrofóbica. Assim, quando as moléculas de ácido oleico entram em contato com água, se movimentam “levantando” de modo que esse final hidrofílico fica em contato com a água e a cauda fique no interior da estrutura, a qual por forças de atrações entre as moléculas hidrofóbicas. Devido à parte hidrofóbica ser muito maior que o final hidrofílico, a molécula de ácido oleico não é solúvel em água. Essas características da estrutura química do ácido oleico foram responsáveis pela redução do ângulo de recesso.

Entretanto ao utilizar o método Wilhelmy as duas superfícies das amostras podem estar influenciando os resultados. Desse modo foi realizado o ângulo de contato por gota na superfície em contato com o ar e com vidro. Foram analisados durante os períodos 15 segundos, como período curto de análise, e 120 segundos para uma melhor estabilidade da água com as amostras.

Tabela 5.5: Resultados do ângulo de contato estático.

| Amostras      | PCL             | PCL/AC         | PCL/Span       | PCL/HA         | PCL/AC/HA       | PCL/Span/HA    |
|---------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|
| Ar (15 s)     | 104,66<br>(4,8) | 97,30<br>(2,7) | 93,25<br>(4,3) | 79,75<br>(9,3) | 61,75<br>(4,4)  | 65,72<br>(3,3) |
| Ar (120 s)    | 103,65<br>(6,9) | 99,17<br>(2,7) | 95,52<br>(3,5) | 81,09<br>(9,1) | 63,30<br>(4,7)  | 67,80<br>(2,9) |
| Vidro (15 s)  | -----           | -----          | 95,30<br>(5,2) | 96,54<br>(2,0) | 98,59<br>(4,1)  | 94,53<br>(3,7) |
| Vidro (120 s) | -----           | -----          | 97,48<br>(5,1) | 97,04<br>(2,0) | 100,38<br>(4,3) | 96,60<br>(3,7) |

As amostras não apresentaram resultados estatísticos entre os dois períodos, desse modo não existem uma modificação da superfície durante a janela estudada. Analisando a superfície em contato com o ar pode se observar um valor hidrofílico nas amostras com hidroxiapatita, apresentando diferença estatisticamente. Entretanto, ao comparar as amostras com adição dos surfactantes ao controle, o valor não apresenta diferença estatisticamente tabela 5.5.

Nas amostras PCL e PCL/ácido oleico não foram possível realizar a análise na superfície em contato com o vidro, devido não apresentar uma superfície plana resultado da evaporação do solvente pelo método de *casting*.

Também foi analisado a interferência da adição dos surfactantes e dos *whiskers* de hidroxiapatita na resistência a tração das membranas, assim na tabela 5.6 são apresentados os valores da carga máxima, tensão na carga máxima, a carga durante o rompimento e o modulo de elasticidade.

Tabela 5.6: Resultados do ensaio de tração nas membranas.

| Amostras            | Carga máxima (N) | Tensão máxima (MPa) | Carga durante o rompimento (N) | Módulo de elasticidade (MPa) |
|---------------------|------------------|---------------------|--------------------------------|------------------------------|
| PCL                 | 42,43 (4,35)     | 22,81 (2,66)        | 37,32 (7,55)                   | 181 (7,6)                    |
| PCL/Ácido Oleico    | 54,23 (3,39)     | 26,72 (1,61)        | 48,20 (7,41)                   | 160 (3,6)                    |
| PCL/Span            | 54,1 (3,54)      | 26,06(1,13)         | 53,09 (4,03)                   | 166 (6,3)                    |
| PCL/HA              | 34,61 (1,97)     | 15,59 (1,63)        | 27,20 (5,04)                   | 216 (8,7)                    |
| PCL/Ácido oleico/HA | 29,35 (2,62)     | 13,14 (1,01)        | 21,18 (4,79)                   | 244 (7,7)                    |
| PCL/Span/HA         | 30,08 (1,68)     | 14,06 (0,62)        | 20,00 (4,85)                   | 217 (4,4)                    |

As amostras PCL, PCL/ácido oleico e PCL/ *span* apresentaram uma maior resistência a tração, possuindo valores de carga máxima equivalente ao dobro em relação às amostras com cerâmicas, assim como nos valores de carga durante o rompimento das amostras.

As amostras PCL/HA, PCL/ácido oleico/ HA e PCL/*span*/HA tiveram os módulos de elasticidade aumentados ao serem comparados com as amostras sem adição. Assim, a composição com HA diminui a deformação elástica com a mesma carga aplicada e aumentam os valores de carga que as amostras mantem sem deformação. Ou seja, a cerâmica diminui o valor de carga durante a quebra, devido tornar a matriz polimérica mais friável do que dúctil (Figura 5.13). Assim as amostras com adição de HA apresentaram menos alongamento antes de fraturarem.

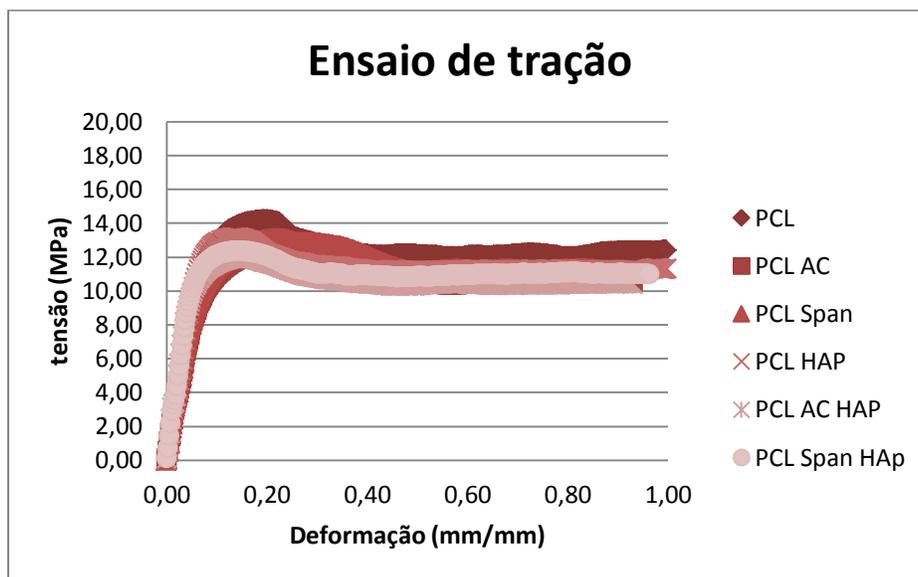


Figura 5.13: Curva tensão x deformação do ensaio de tração das membranas.

Com análises de caracterizações das superfícies pode-se concluir que as adições de cerâmicas e surfactantes alteraram as propriedades dos materiais. Assim valores de hidrofobicidade, resistência mecânica a tração, cristalinidade e rugosidade geraram argumentos para uma tendência na escolha de composição.

No atual caso, a composição que demonstra ser a mais promissora é a amostra com ácido oleico e hidroxiapatita, pois demonstrou maior valor no ângulo de contato, aumentando a hidrofobicidade da superfície, no módulo de elasticidade a tração, devido à redução nos tamanhos

dos esferulitos, na cristalinidade, aumentando a área amorfa polimérica tendendo a reduzir o tempo de degradação, e valores maiores na rugosidade da superfície, devido a alteração química pela adição do ácido oleico.

### 5.3. Caracterização dos núcleos densos.

Foi realizado um estudo detalhado de cada área do suporte tridimensional: área porosa e densa. Assim, para a caracterização dos núcleos densos foi realizada utilizando imagens obtidas pelo MEV e dados obtidos pela análise dos resultados do ensaio de compressão.

Em relação ao aumento da resistência mecânica, algumas características básicas necessitaram serem seguidas relacionadas ao tamanho da partícula, a concentração da cerâmica e a compatibilidade com o polímero.

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

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

O comportamento da deformação das amostras densas de PCL/ *whiskers* de HA durante ensaios de compressão é visto no anexo II. O grupo de amostras densas que apresentou um aumento significativo na resistência à compressão foi o D4, o qual apresenta 25% de *whiskers* de hidroxiapatita em sua matriz polimérica.

Para melhor visualização dos resultados foi gerado um gráfico com a média dos grupos dos módulos de elasticidade e o desvio padrão de todas as amostras dos grupos, visto na figura 5.14. Os valores apresentaram similares quando comparados os grupos D0, D1, D2, D3, ou seja, 0, 10, 15, 20% w/w de *whiskers* de hidroxiapatita, embora o desvio padrão do grupo D4 apresentou os

valores mais altos, o grupo apresentou um aumento significativo ao comparar com o grupo D0, o qual não apresenta *whiskers* em sua composição.

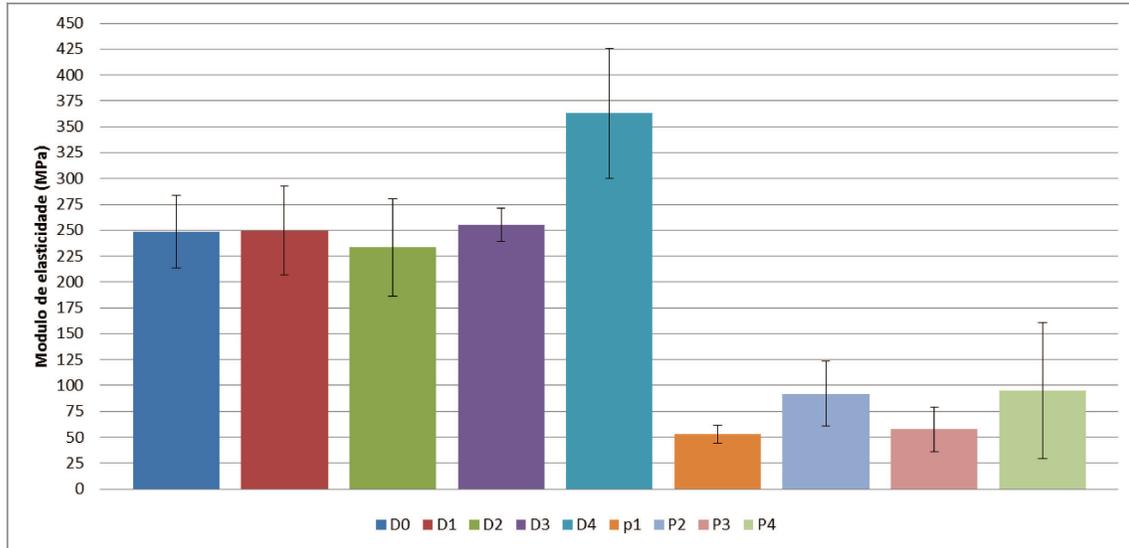
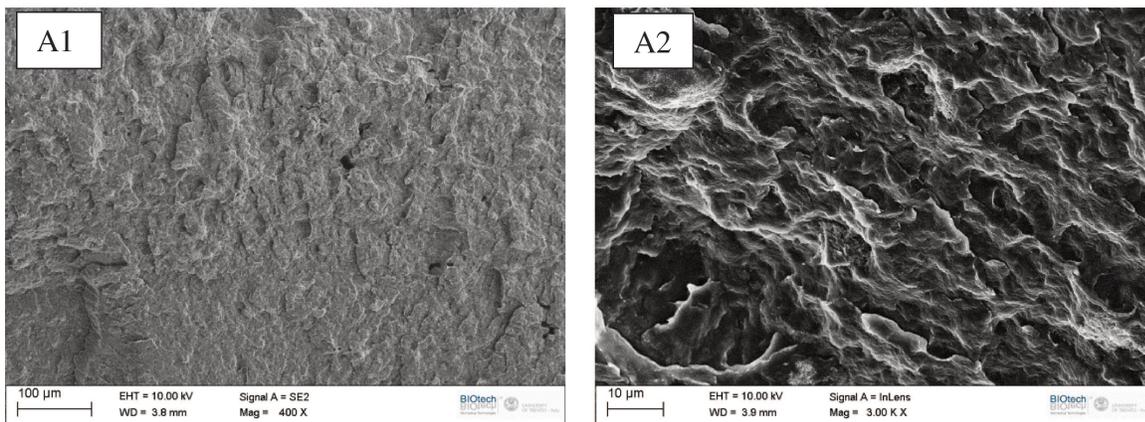


Figura 5.14: Médias dos valores de módulo de elasticidade dos grupos densos e porosos.

Na figura 5.15, são vistas as imagens dos diferentes grupos de núcleos densos, com escalas de 100  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{m}$ . Como as amostras foram fraturadas após imersão em nitrogênio líquido é possível observar o início da fratura em algumas amostras, tal como na figura 5.15(3B), a qual a fratura contorna o aglomerado cerâmico. Esses aglomerados podem ser os responsáveis por defeitos nas amostras.



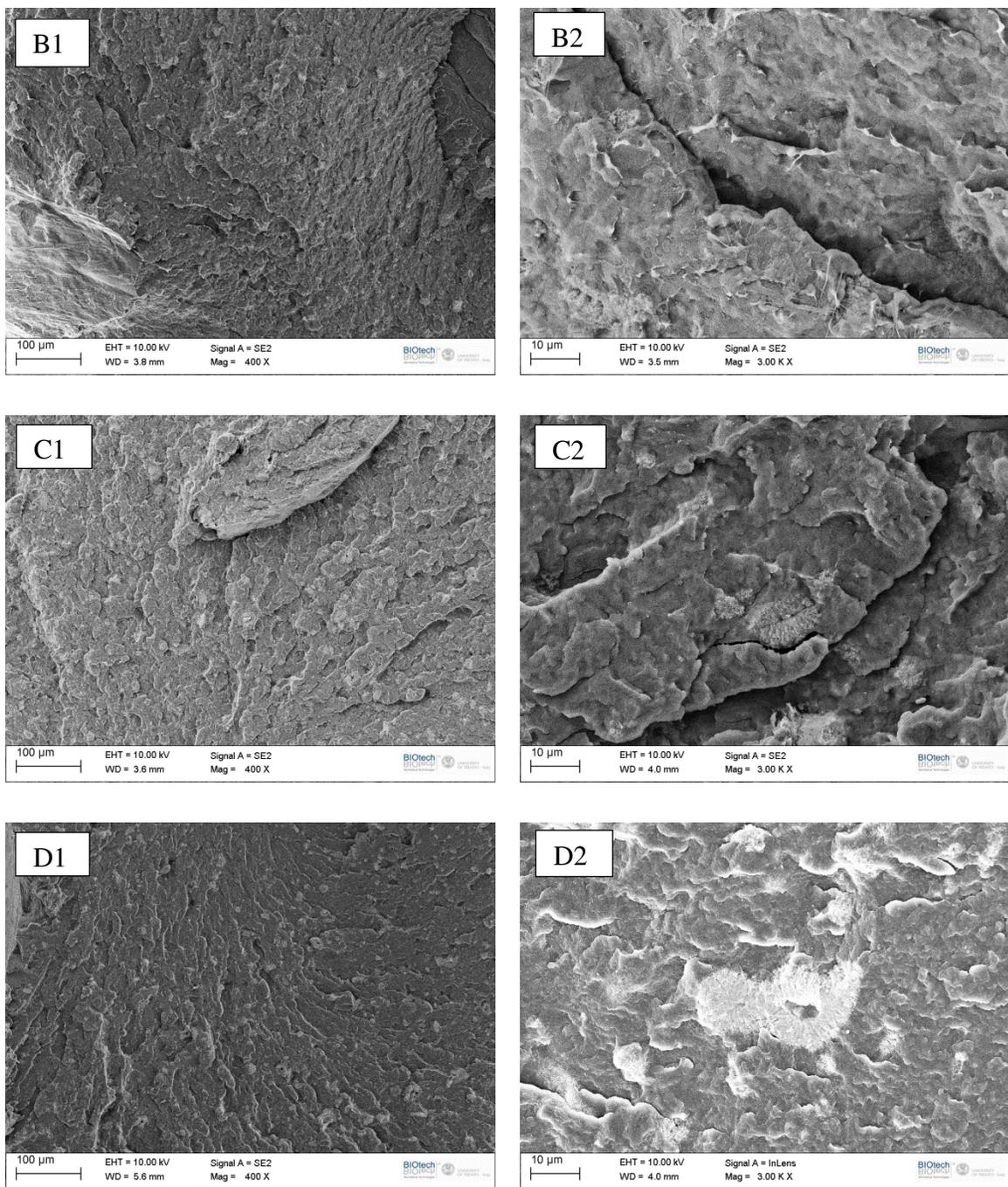


Figura 5.15: Imagens dos diferentes grupos de núcleos densos (A – D1; B- D2; C-D3 e D – D4; 1- 100 $\mu\text{m}$  2-  $\mu\text{m}$ ).

#### 5.4. Caracterização dos núcleos porosos.

Para o estudo da área porosa da estrutura tridimensional foi realizada o ensaio de compressão. Analisando as curvas geradas nota-se que a presença de poros influencia na

resistência mecânica da amostra, a região inicial da curva ilustra este fato, sendo que a estrutura deforma-se de maneira suave, exigindo menos tensão quando comparado ao material no final do ensaio (anexo III).

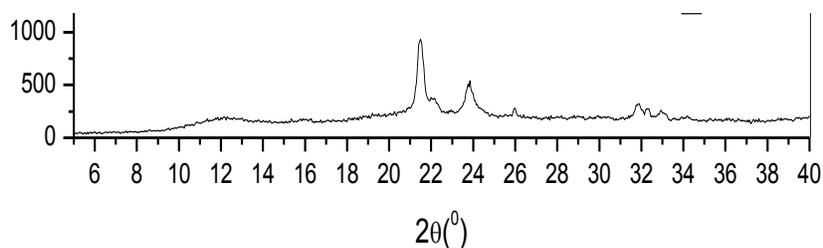
O grupo de amostras P2, ao fim da deformação de 50% da altura das amostras, apresentou uma deformação máxima de 4,57 mm e mínima de 4,32, ou seja, 0,57 mm do diâmetro inicial das amostras, por outro lado ao comparar com o grupo de amostras densas D2, o valor máximo foi de 5,10 mm e mínimo de 4,74 mm, ou seja, 1,10 mm de diferença do diâmetro inicial das amostras. Desse modo, as amostras porosas apresentaram uma redução na espessura sem apresentar o efeito barril, apresentado nos grupos de amostras densas. Entretanto os resultados entre as mesmas não apresentaram diferença estatística.

Ao analisar os valores de resistência à compressão das amostras porosas, notou-se uma alta variação do desvio padrão. Algumas variáveis podem ser responsáveis por essa variação, como por exemplo: porosidade irregular, bolhas internas e acúmulo de cerâmica na matriz polimérica. Grupos de pesquisadores determinam que a porcentagem de hidroxiapatita maior que 20 % w/w na matriz polimérica porosa, resulta em uma heterogeneidade no material, na qual a hidroxiapatita atua como uma área de tensão no material, um dos fatores responsáveis pelo alto valor do desvio padrão nas amostras com 25% w/w de HA (Bakar, et al., 2003) (Espigares, et al., 2002) (Boesel, et al., 2008).

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

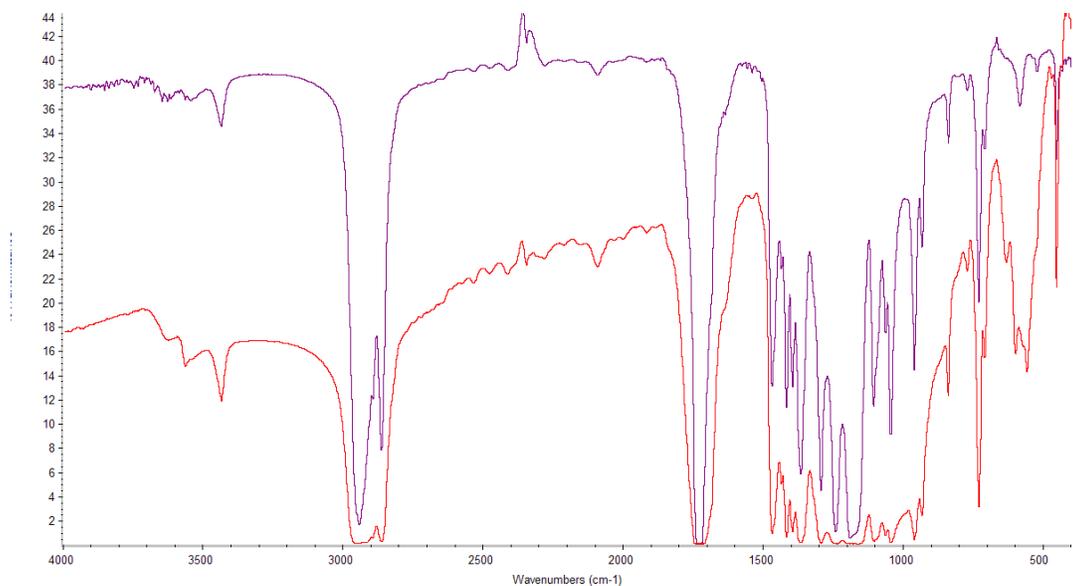
## **5.5. Caracterização dos suportes tridimensional**

Na figura 5.16, é visto o difratograma do compósito de PCL com a adição de *whiskers* de hidroxiapatita, o qual é possível observar o plano cristalino do compósito. Desse modo, nos ângulos próximos a 23 e 24 são os principais picos do PCL, já nos ângulos próximos aos 32 e 33 são os relacionados aos *whiskers* de hidroxiapatita. A hidroxiapatita no difratograma mostra-se caracterizada por picos de baixa intensidade, tal fato ocorre pela baixa cristalinidade da cerâmica. Quando PCL e HA são misturados, os picos característicos são observados, porém com uma baixa intensidade (Park, et al., 2011).



**Figura 5.16: Difratoograma da amostra de PCL com whiskers de hidroxiapatita**

Ao analisar os espectros de FT-IR, é possível ver a integração dos principais grupos. A figura 5.17 mostra o espectro do PCL (superior), PCL/HA (inferior), onde se pode observar que as bandas estão deslocadas  $300\text{ cm}^{-1}$ . A ligação O-H é visto próximo a banda  $3400\text{ cm}^{-1}$ , os picos equivalente a  $2900$  e  $2800\text{ cm}^{-1}$  são relacionados ao estiramento C-H. O pico em  $1700\text{ cm}^{-1}$  na amostra de PCL aparece mais intensa quando comparada com o compósito, indicando variações da vibração do estiramento do grupo carbonila e da ligação do hidrogênio entre o grupo carbonila (OH) da HA e  $\text{COO}^-$  do PCL.



**Figura 5.17: FT-IR das amostras de PCL (superior) e PCL/ whiskers de HA (inferior).**

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

Os objetivos da área porosa das amostras são permitir a proliferação e a adesão celular nessas áreas, desse modo permitindo o aumento da vascularização. O aumento da vascularização permite uma maior nutrição do implante, o qual permite um suprimento metabólico para as células as quais estão localizadas o mais distante do tecido no sítio hospedeiro.

Os poros são necessários para uma formação de tecido ósseo, já que são por eles que penetram as células que são responsáveis pela migração e proliferação de osteoblastos e células mesenquimais, assim como a vascularização dessa área. Outra característica dos poros é que permitem uma propriedade mecânica conhecida como *interlocking* entre o material implantado e o tecido adjacente, permitindo uma estabilidade na interface.

A necessidade de uma alta porosidade é crucial para assegurar uma uniforme distribuição de células e assim um crescimento homogêneo do novo tecido, entretanto com o aumento da porosidade ocorre uma redução drástica nas propriedades mecânicas (Koboki, et al., 2001). O valor ideal da porosidade dos *scaffolds* continua ser um assunto estudado, pesquisadores determinaram uma faixa ideal para a fabricação de *scaffolds* biomiméticos para tecido ósseo é dentro da faixa 60- 90 % de porosidade (Hutmacher, et al., 2001) (Zein, et al., 2002) (Widmer, et al., 1998). O grupo de pesquisa Goldstein, em seu artigo publicado em 1999 apoiou o valor inferior a 80% devido interferir o comprometimento da integridade do *scaffold* (Goldstein, et al., 1999). As amostras variaram entre 61 a 63.5% de porosidade, aproximadamente, visto na figura 5.18.

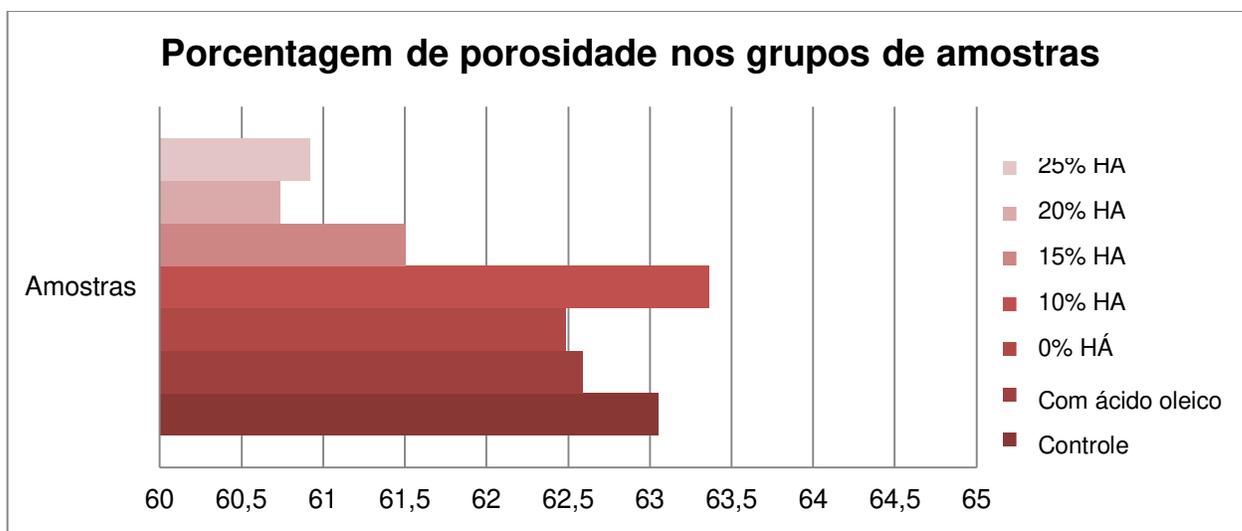


Figura 5.18: Porcentagem de porosidade nas amostras.

Após a realização de ensaios mecânicos de compressão nas amostras porosas, foi adotado que a produção da área porosa focalizou na integração célula/material e não a resistência mecânica, desse modo a quantidade de *whiskers* utilizado na matriz polimérica foi alterada de 25% w/w para 15 % w/w cerâmica/polímero, devido a apresentar resultados satisfatórios de deposição de apatita e resposta celular a partir de 10 %w/w (Cardoso, et al., 2010).

A fixação da área densa no interior do suporte poroso ocorreu em diversas tentativas, devido a resultados indesejáveis, mostrados na tabela 5.7. Desse modo, o método de fabricação foi passando por modificações, de modo a atingir o resultado desejado figura 5.19 e figura 5.20.

Tabela 5.7: Resultados indesejáveis das alterações do primeiro método de produção.

| Amostras | Resultados   |
|----------|--|
| T1       | Bolhas e núcleo apresentaram-se dissolvidos.                                     |
| T2       | Núcleo dissolveu e apresentou-se no topo da amostra.                             |
| T3       | Bolhas e núcleo apresentaram-se dissolvidos.                                     |
| T4       | Núcleo não se apresentou no local ideal, além de apresentar bolhas nas amostras. |



Figura 5.19: Imagem de uma amostra cortada horizontalmente, as flechas mostram o núcleo do interior da área porosa.

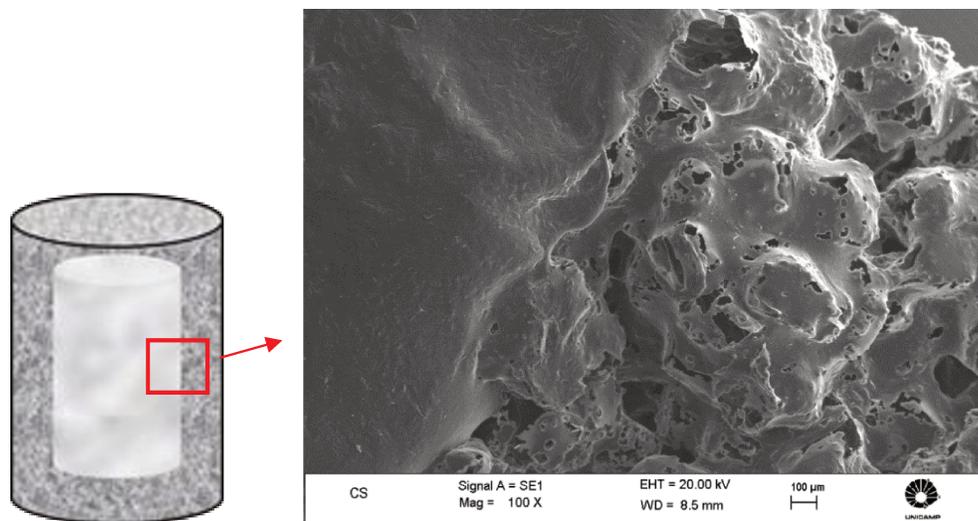


Figura 5.20: Estrutura do *scaffold*: Núcleo denso com a área porosa na região externa.

O tamanho dos poros é de extrema importância, ao ser muito pequeno as células são incapazes de penetrar o material e caso contrário às células reconhecem os poros como espaços vazios. Desse modo, o tamanho mínimo para a mineralização óssea pode ser considerada 100 µm. Poros maiores como de 100–150 e 150–200 µm mostraram uma penetração e proliferação adequada de tecido ósseo, já poros em uma faixa de 75 –100 µm resultaram em penetração de tecido osteogênico não mineralizado e poros inferiores de 75 µm permitiram apenas a penetração

de tecido fibroso (Mikos , et al., 1996). Os poros gerados pela adição do NaCl possuíram dimensão de 177 a 350  $\mu\text{m}$ .

### 5.5.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

O resultado obtido pela análise de DSC permite medir várias propriedades de uma amostra, ou seja, analisar dados provenientes da curva de fluxo calorífico contra temperatura ou tempo. Desse modo, podem-se calcular entalpias de transições, picos exotérmicos, picos endotérmicos, entre outros dados. Assim, a entalpia da transição pode ser expressa pela seguinte equação:

$$\text{Equação 3: } \Delta H_f = KA$$

onde  $\Delta H_f$  é a entalpia da transição,  $K$  é a constante calorimétrica e  $A$  é a área baixo a curva. A constante calorimétrica variará de instrumento a instrumento, e pode ser determinada analisando uma mostra bem caracterizada com entalpias de transição conhecidas.

O grau de cristalinidade,  $X_c$ , foi determinado pela relação do calor da fusão,  $\Delta H_f$ , das amostras (retirando o valor da concentração de fosfato de cálcio presente) a cristalinidade do puro PCL,  $\Delta H_c$ , o qual é 136 J/g, desse modo  $X_c = \Delta H_f / \Delta H_c$  (Ergun , et al., 2012).

Com os gráficos obtidos pela análise de DSC, é possível conhecer a temperatura de cristalização ( $T_c$ ), a qual é o momento que as moléculas obtêm liberdade de movimento para dispor em uma forma cristalina, ou seja, é a transição de sólido amorfo a sólido cristalino. À medida que a temperatura aumenta, a amostra atinge eventualmente sua temperatura de fusão ( $T_m$ ). O processo de fusão resulta evidenciado por um bico endotérmico na curva DSC.

O processo de obtenção das amostras realizou uma mudança brusca de temperatura e isso pode ter realizado uma alteração na cadeia cristalina do polímero, como visto na Tabela 5.8.

As amostras aquecidas apresentaram uma alteração na temperatura de  $T_g$ , porém pouco expressivo. A cristalinidade relativa foi alterada de 36%, sendo como o controle, a no máximo 42%, entretanto amostras que não foram aquecidas também apresentaram uma alteração em sua cristalinidade, de acordo com o processamento, modificando a 39%.

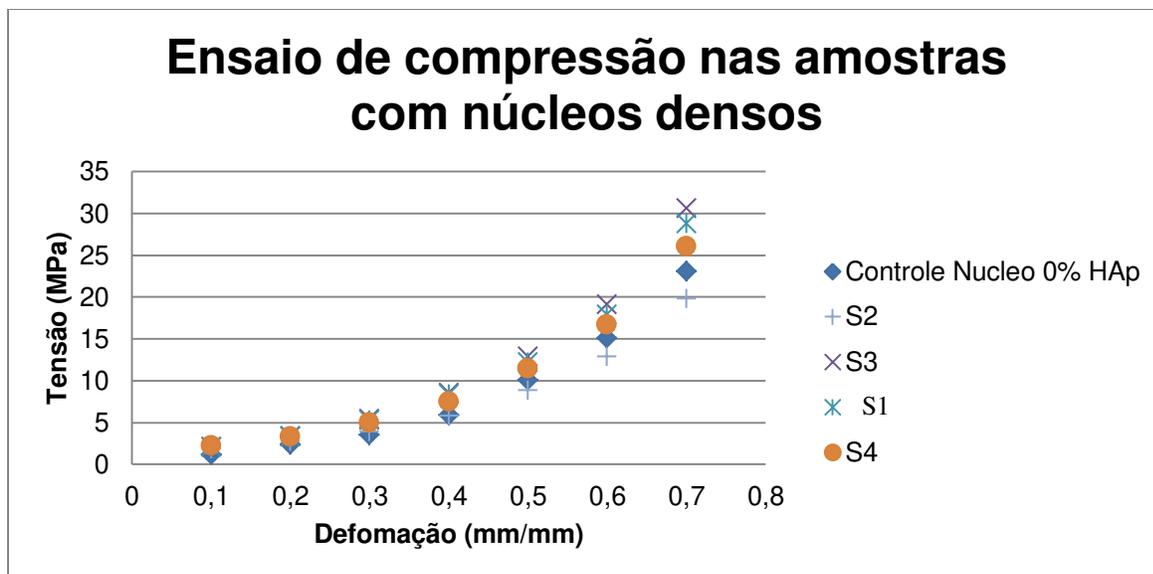
Tabela 5.8: Temperaturas (Tg/ Tm) determinadas pelo ensaio de DSC.

| Amostras  | Tg (0C) | Tm (0C) | Cristalinidade Relativa (%) |
|---|---------|---------|-----------------------------|
| PCL Pellets                                       | - 59.88 | 63.83   | 36                          |
| PCL<br>(Sem aquecimento)                          | - 59.88 | 66.09   | 39                          |
| PCL<br>(Aquecido)                                 | - 60.17 | 67.55   | 42                          |
| PCL/HA <i>whiskers/</i> ácido<br>(Aquecido)       | - 60.40 | 65.91   | 33                          |
| PCL/HA <i>whiskers/</i> <i>Span</i><br>(Aquecido) | - 61.40 | 65.90   | 32                          |

Por outro lado, observou-se nas amostras com a incorporação de partículas de hidroxiapatita que ocorreu uma redução na cristalinidade do polímero. As amostras com ácido oleico tiveram sua cristalinidade próxima a 33%, e quando se adicionou *Span* reduziu para 32%. Note que a porcentagem de hidroxiapatita adicionada a essas duas amostras foram de 11%w/w. Segundo o artigo publicado pelo grupo de pesquisa norte americano do Instituto de Tecnologia de Stevens, em Hoboken, a cristalinidade do PCL, com o mesmo peso molecular utilizado nesse projeto, foi de aproximadamente de 40%, já quando adicionado partículas de hidroxiapatita essa porcentagem reduziu para 27%, quando 14%w/w de cerâmica foi adicionado, e 19% quando adicionado 24% w/w de cerâmica (Ergun , et al., 2012). Assim, foi confirmado que a presença de partículas de hidroxiapatita e  $\alpha$ -TCP reduzem a cristalinidade, devido a interferir no “empacotamento” das lamelas na cadeia polimérica (Lam, et al., 2008 ) ( Harris, et al., 2004) (Ozkan, et al., 2010).

### 5.5.2. Resistência Mecânica

A composição da estrutura porosa foi a mesma para os diferentes grupos, ou seja, 15% w/w de hidroxiapatita (P2) na matriz polimérica. Sendo assim foi apenas alterada a concentração de HA do núcleo da estrutura, variando entre 0 a 25 % em peso.



**Figura 5.21:** Curva tensão versus deformação das amostras com núcleo denso e área porosa e a concentração de hidroxiapatita em peso na área densa (\* amostras com  $p > 0.05$ ) (S1-25 % w/w; S2- 10% w/w; S3- 15% w/w; S4- 20% w/w).

As amostras foram ensaiadas até o valor de 80% de sua altura inicial, resultando inicialmente em respostas de resistência a compressão semelhante às amostras porosas, ou seja, até atingir a região com o núcleo denso as amostras responderam como os materiais porosos. Na deformação equivalente a região do núcleo denso (0,35 mm/mm), a tensão aumentou o valor, respondendo como material denso figura 5.21.

Os valores de tensão e módulo de Young foram superiores aos encontrados na literatura: Kim realizou um trabalho com PCL com recobrimento de HA, o biomaterial estudado obteve uma porosidade em torno de 87% e uma resposta de módulo de Young de 1,00- 1,43 Mpa e com uma tensão de 1,24 – 1,45 MPa (Kim, et al., 2004). Assim como Heo em seu artigo sobre PCL com nano HA, o qual obteve uma porosidade de 72-73% e valores de módulo de Young em torno de 1,3- 3,2 MPa (Heo, et al., 2009). Nota-se que as porosidades nos artigos comentados são superiores ao atual estudo, o qual esta em torno de 60-65%, o qual foi responsável pelo aumento nos valores de resistência mecânica.

**Tabela 5.9: Resultado do modulo de Young nas amostras porosas com núcleo denso.**

| <b>Amostras</b>                  | <b>Controle<br/>(0%HA)</b> | <b>S1<br/>(25%HA)</b> | <b>S2<br/>(10%HA)</b> | <b>S3<br/>(15%HA)</b> | <b>S4<br/>(20%HA)</b> |
|----------------------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>Módulo de<br/>Young – MPa</b> | 12,164                     | 28,76                 | 17,98                 | 25,33                 | 25,03                 |
| <b>Desvio padrão</b>             | (1,8)                      | (4,6)                 | (2,0)                 | (8,0)                 | (7,3)                 |

Os valores do modulo de Young comprovam a interferência da cerâmica no “empacotamento” das lamelas poliméricas, assim como visto na cristalinidade. A cerâmica aumenta a rigidez do compósito gerando um aumento no modulo de Young. As amostras apresentaram diferenças estatísticas comprovado pelo teste estatístico ANOVA com o valor de  $p < 0,05$ . As principais diferenças foram entre os valores do grupo controle com o grupo S1, o qual possui 25% de HA, tabela 5.9.

## **5.6 Ensaio preliminares *in vitro***

### **5.6.1 Ensaio de citotoxicidade**

Para analisar a toxicidade da cerâmica utilizada foi realizado o ensaio de citotoxicidade indireto com a amostra de *whiskers* de hidroxiapatita. A amostra não apresentou toxicidade, entretanto foi observada uma pequena redução da viabilidade celular, a partir da concentração de 50% do extrato na amostra de *whiskers* de HA (figura 5.22)

Alguns fatores podem ter sido responsáveis a essa redução, tais como a solubilidade da cerâmica no meio utilizado e alterações nos valores do pH. A literatura confirma uma possibilidade de redução da viabilidade celular atribuida a íons de pirofosfato de cálcio (Cardoso, et al., 2010).

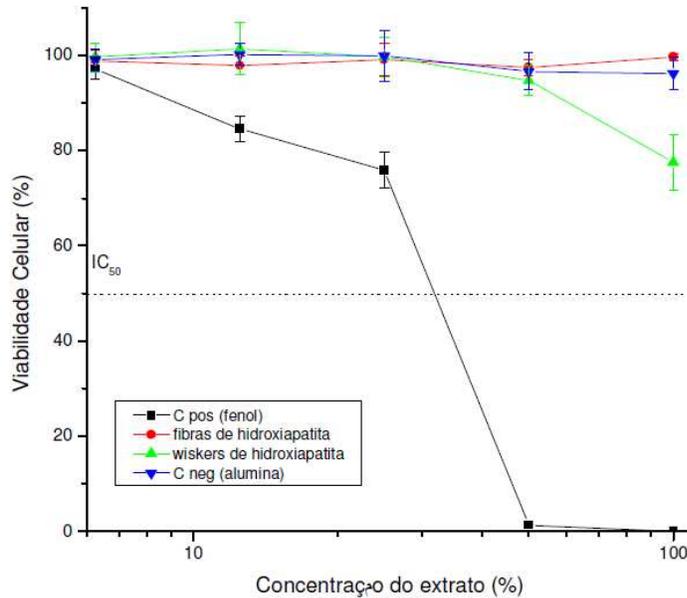


Figura 5.22: Citotoxicidade da amostra *whiskers* de hidroxiapatita (Cardoso, et al., 2010)

### 5.6.2 Ensaio com linhagem U20S

A poli ( $\epsilon$ -caprolactona) é um polímero aprovado pelo órgão FDA como um material para uso interno, ou seja, não apresenta toxicidade. Porém alguns estudos já relataram a respeito de sua propriedade hidrofóbica e sua rugosidade relacionada à adesão e proliferação celular (Cheng, et al., 2004). Desse modo, foi realizado um estudo com as diferentes composições analisando o aspecto das células em contato com as superfícies durante os períodos 1, 3 e 7 dias. É de extrema dificuldade o controle da rugosidade, tipicamente descrita por Ra, pois é difícil reproduzir duas superfícies com valores semelhantes de Ra, assim nesse estudo a cultura celular foi cultivada apenas na superfície em contato com o ar durante a evaporação do solvente.

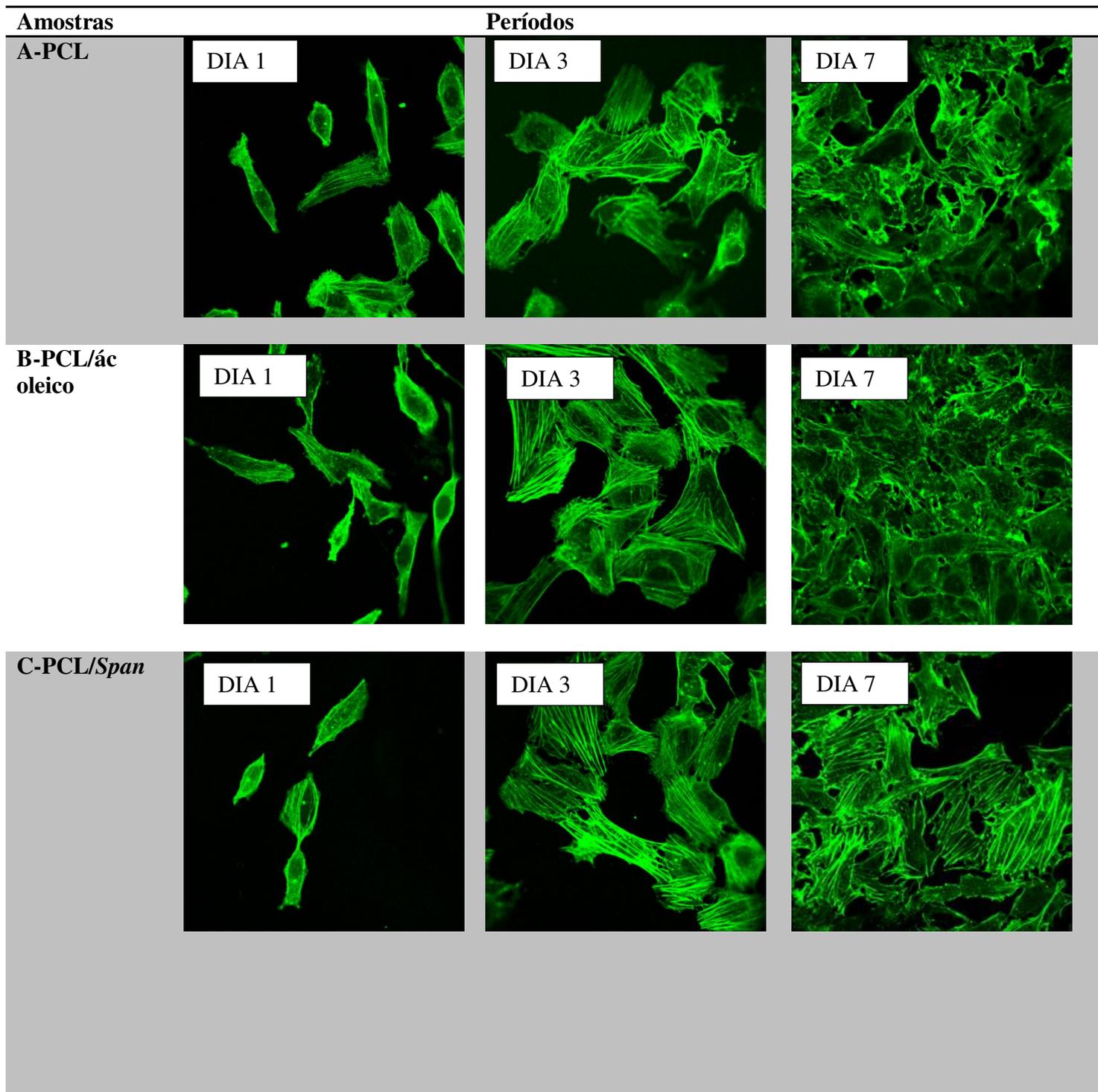
Para análise da morfologia, foram considerados os seguintes parâmetros: quantidade, dimensões e características intrínsecas das células. O estudo do comportamento das células US02 em particular, foi realizado a partir dos valores das dimensões a qual consiste de um valor numérico que traz informações a partir dos valores dos respectivos perímetros (P), aplicando-se uma divisão do comprimento máximo pela largura máxima. A morfometria foi empregando-se um sistema computadorizado, utilizando-se o programa ImageJ (NIH) ( Hsu, et al., 2010).

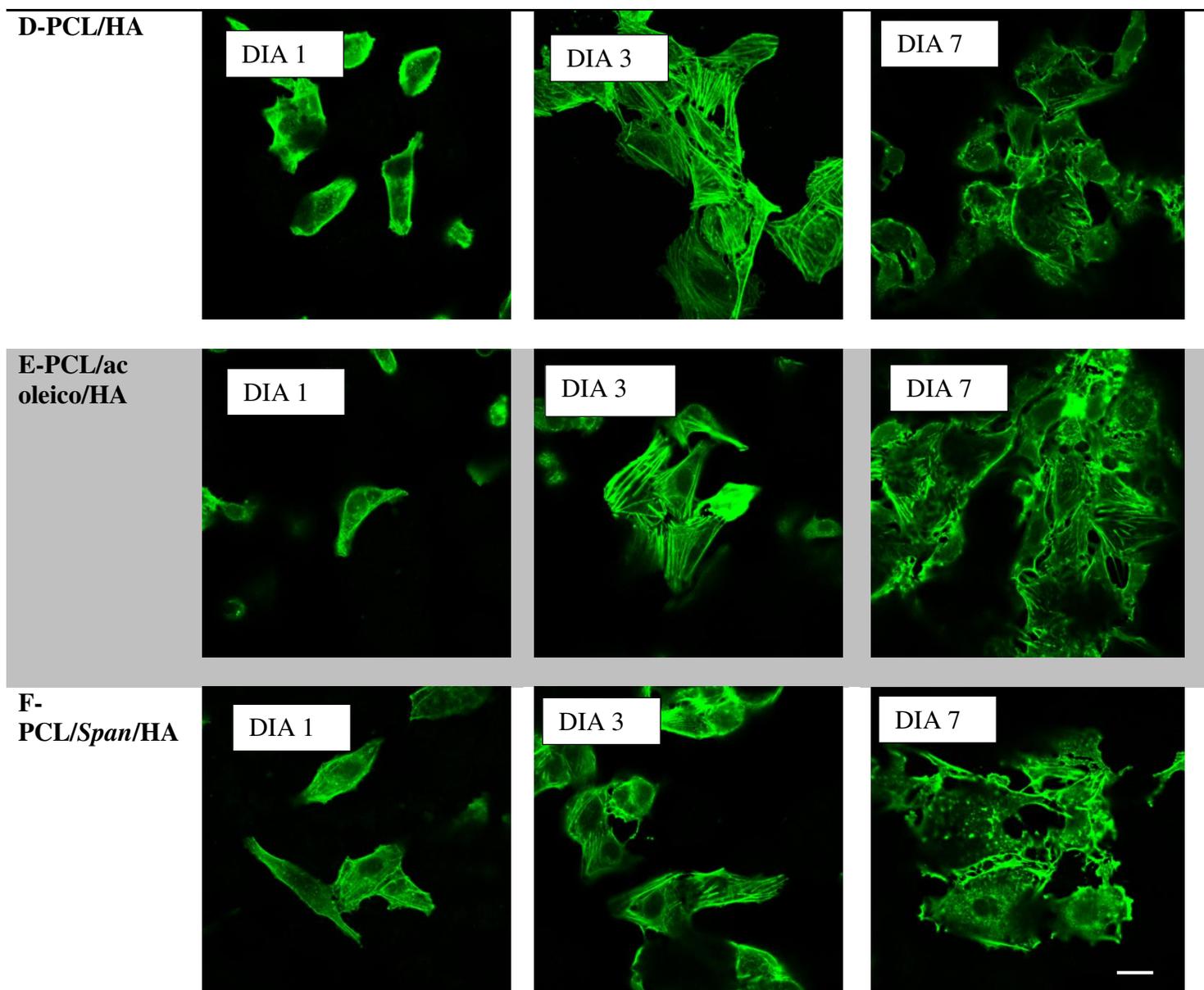
As proliferações celulares em substratos rígidos tendem a promover espreadimento de células ricas em fibras de tensão actina-miosina (Discher, et al., 2009). As forças de contração das células são geradas pelas interações entre os microfilamentos actina, uma proteína presente no citoplasma das células eucariotas, e miosina, proteína a qual se movimenta ao longo da actina. As forças são originadas dos feixes de miosina deslizamento ao longo dos filamentos de actina e são transmitidos para a matriz extracelular (MEC), uma proteína fibrilar tridimensional a qual circunda e ancora as células.

Existem algumas maneiras já conhecidas em interferir no comportamento de diferenciação e proliferação das células, tais como alterações na dureza, composição, topografia do substratos. Apenas a manipulação da topografia da superfície mostra estimular a diferenciação de células tronco. Pesquisas mostraram que substrato de poli metacrilato (PMMA) com poços espaçados entre de 120 a 200 nm induzem uma expressão de proteínas vinculadas a calcificação óssea de células tronco, quando comparadas a substratos lisos (Dalby, et al., 2007). Outra pesquisa utilizou nano tubos de carbono com o objetivo de alterar a topografia; tubos com o diâmetro de 100nm promoveram expressões da osteocalcina e osteopontina, proteínas vinculadas a neoformação e remodelação óssea, ao contrario dos tubos de 30 nm os quais induziram uma proliferação, porem sem indutor uma diferenciação óssea (Oh, et al., 2009).

Células indiferenciadas, como as mesenquimais, podem se diferenciar de acordo com o modo a habilidade de ser espriar no substrato e contrair contra o mesmo. Assim, células bem espriadas expressa proteínas comuns a osteoblastos em uma maneira de depender da capacidade da célula para aplicar a tração para o material. De outro modo, células pouco espriadas desenvolvem depósitos de lipídeos, típicos de adipócitos, e possui uma limitação do espriamento e da tensão gerada (McBeath, et al., 2004). Tais descobertas implicam em consideração de aspectos para fabricação de novos biomateriais, tais como a topografia e o controle da forma e força celular para o futuro da engenharia tecidual.

O ensaio com as células U20S resultou em dados os quais complementam o estudo com células tronco. Nas amostras poliméricas com adições de surfactantes a proliferação celular se manteve similar com a do controle (puro PCL), entretanto em todas que apresentaram hidroxiapatita em sua composição apresentaram uma redução aparente do número de células (figura 5.23)





**Figura 5.23:** Imagens de microscopia confocal, durante os dias 1, 3 e 7 de cultura. Amostras A-PCL; B-PCL/ác oleico; C- PCL/*span*; D- PCL/ HA; E- PCL/ác oleico/ HA; F- PCL/*span*/ HA. Barra de aumento 25  $\mu\text{m}$ .

O formato das células nas culturas foi avaliado principalmente durante os períodos iniciais, de modo ser possível quantificar o formato das células. De modo que células mais espalhadas mostram ter maior interação com o substrato em questão, caso as células estejam em formato arredondados esse fato pode significar que pode ocorrer uma futura apoptose ou até mesmo uma pequena proliferação a qual seu contato será principalmente célula- célula e não

célula-substrato. Células arredondadas apresentam sua razão em torno de 1, ao se dividir seu comprimento pela largura, assim quanto maior a razão mais espreada estão as células, figura 5.24.

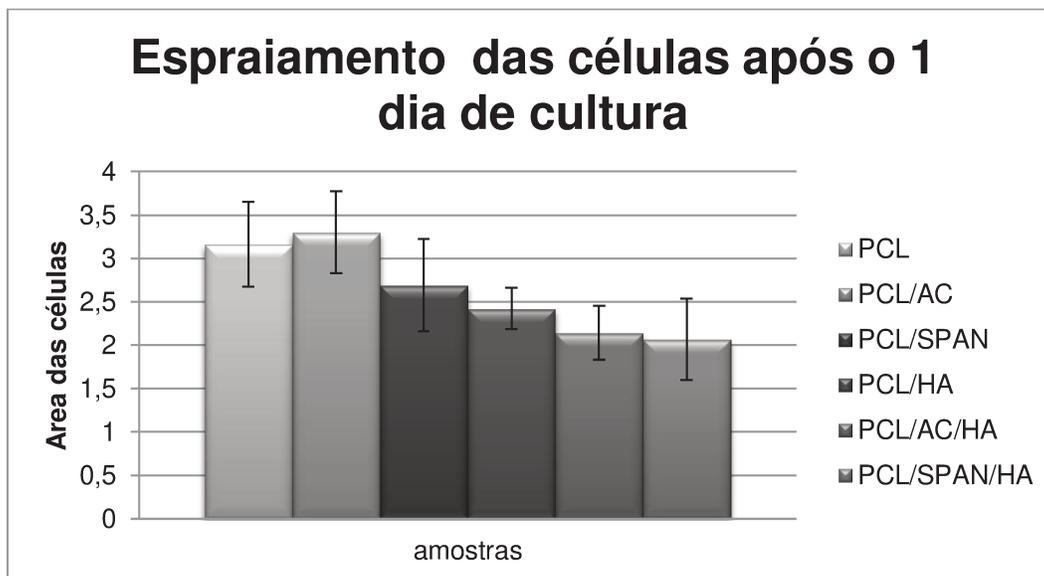


Figura 5.24: Gráfico espraio das células após primeiro dia de cultura.

Foi realizado a verificação do pH no meio de cultura antes e depois dos dias analisados, entretanto não foi detectado nenhuma alteração nos valores. Os valores neutros não foram responsáveis por nenhum dano na viabilidade celular das amostras.

## 5.7 Obtenção e caracterização das células-tronco mesenquimais

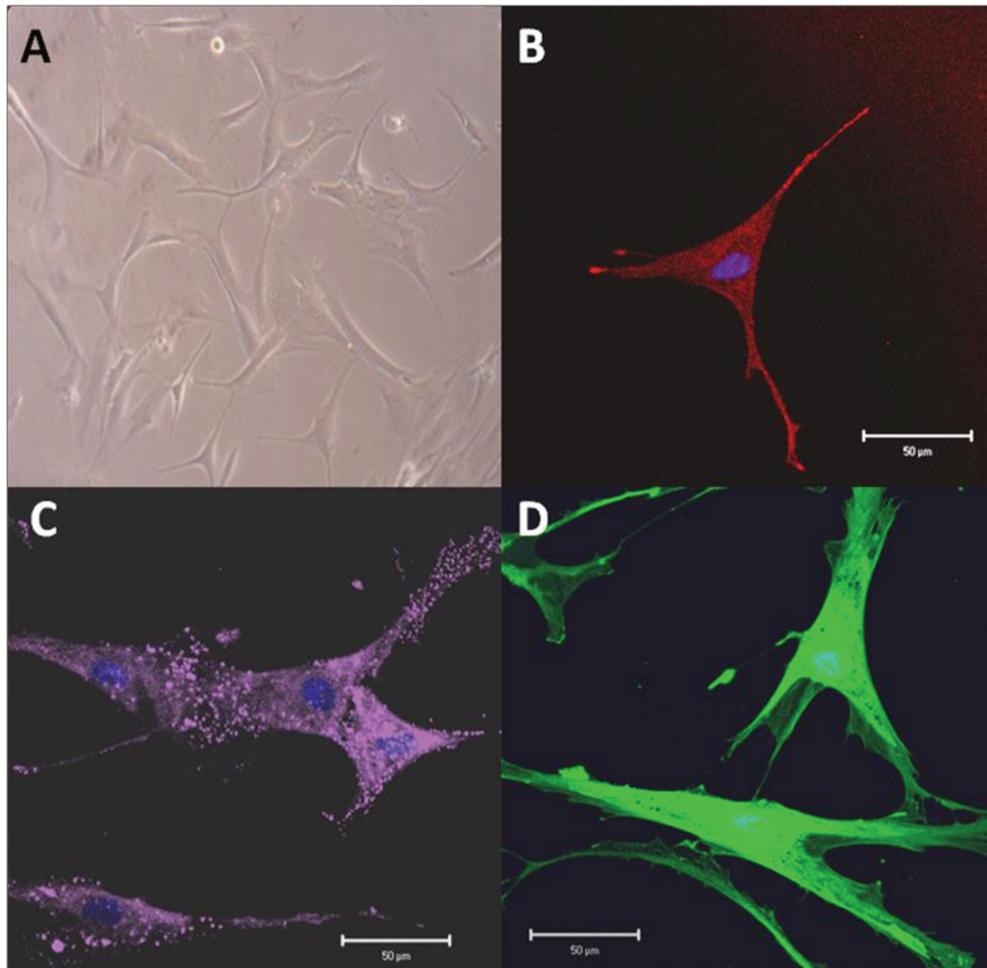
Para a obtenção de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo foi necessário padronizar o método de extração celular, desde a separação celular, expansão e caracterização. Essa padronização ocorreu durante o Mestrado do aluno Pedro Bordeaux Rego, no Hemocentro-Unicamp (Rego, et al., 2011).

### 5.7.1 Citofluxograma

Segundo a International Society for Cellular Therapy, são três requerimentos para uma população de células serem classificadas como células tronco mesenquimais: serem isoladas de uma população de células monocleares com base à sua aderência seletiva; positivas as

expressões dos marcadores CD105, CD73 e CD90, e que sejam negativos os CD34, CD45 e CD14 em mais de 95% das células em cultura; e por fim, que possam ser diferenciadas em osso, gordura e cartilagem (Bydlowski, et al., 2009). Há um consenso geral que MCSs humanas adultas de medula óssea não expressam os marcadores hematopoéticos CD34 (um marcador de célula-tronco hematopoética primitiva, raramente expressa em MSCs humanas, apesar de ser positiva em camundongos), CD45 (marcador de todas as células hematopoiéticas), e CD14 (receptor de lipopolissacarídeo LPS) (Kolft, et al., 2007).

Ao analisar a expressão da população de células cultivadas, foi possível observar marcadores de célula tronco mesenquimais em suas membranas e em citoplasmas, tais quais CD105 (endoglina: marcador angiogênico), CD90 (Thy-1) e CD73 (SH<sub>3</sub> e SH<sub>4</sub>). A expressão de CD90 foi encontrada na membrana celular e em vesículas citoplasmáticas, enquanto CD105 e CD73 foram expressos na superfície celular.



**Figura 5.25:** Microscopia óptica e imunofluorescência de células-tronco mesenquimais após a quarta passagem em lamínulas de vidro. A- foto de microscopia óptica com aumento de 100x. B-D Fotos de Imunocitoquímica dos marcadores CD105 (vermelho), CD90 (roxo) e CD73 (verde) e nuclear (DAPI-azul).

Para uma caracterização mais completa da população celular obtida, foi necessário identificar alguns marcadores de células-tronco mesenquimais por citometria de fluxo. Todas as células analisadas neste estudo apresentaram homogeneidade quanto ao seu tamanho e granulosidade, conforme observado na região delimitada da figura 5.25A e possuíam o mesmo perfil de expressão dos marcadores descrito; CD105 (99.30%), CD29 (84.11%), CD73 (97.87%) e CD90 (99.6%), sendo que o marcador CD90 apresentou marcação mais intensa em todos os experimentos, enquanto os marcadores Stro-1 (1.63%), CD34 (0,84%), CD45 (2.31%), CD14 (1.7%) e HLA-DR (0.96%) mostraram baixa expressão.

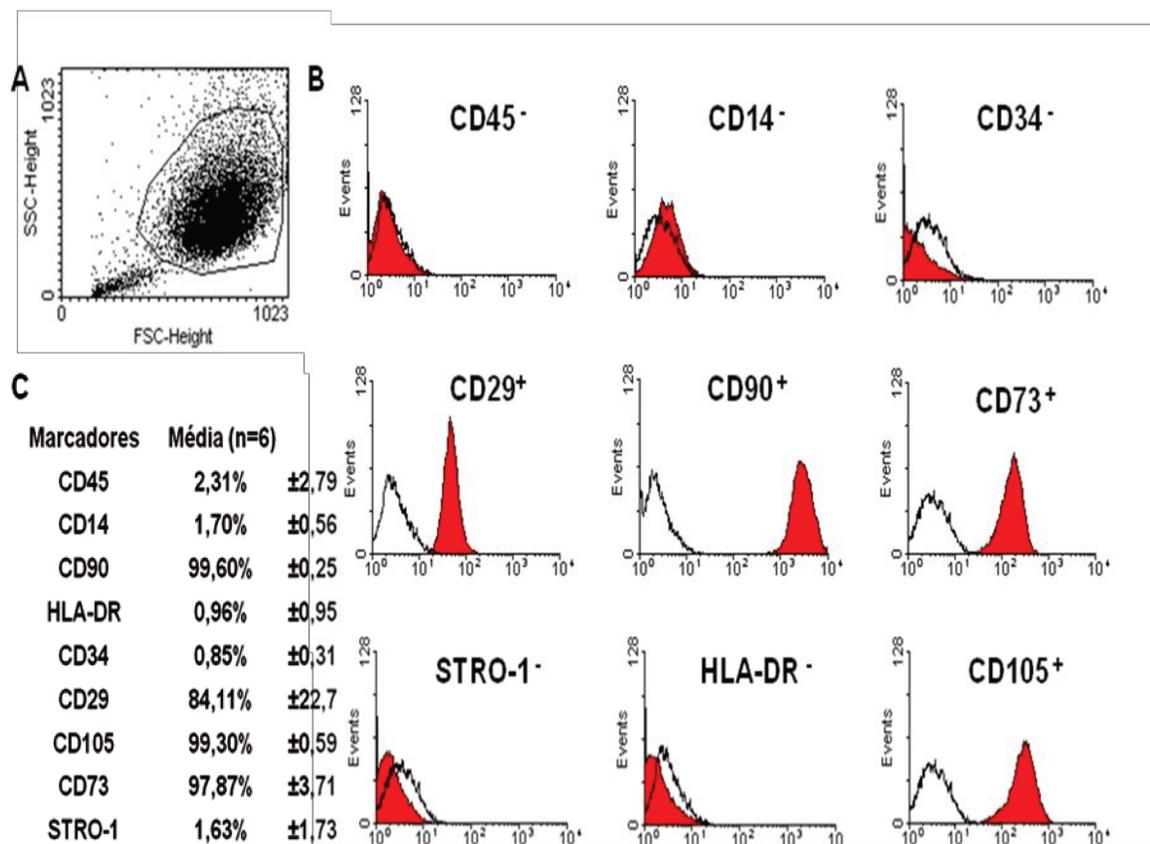


Figura 5.26: Citometria de fluxo das células-tronco mesenquimais após a quarta passagem. A- Dot-Plot das células, mostrando característica homogênea dessa população. B- Painel de histogramas dos marcadores. Em vermelho está representada a expressão do marcador específico e em branco o controle (IgG com fluorocromo). Observe a expressão dos marcadores CD105, CD90, CD29 e CD73 e ausência de expressão de HLA-DR, STRO-1, CD45, CD14 e CD34. C-Tabela com as médias das porcentagens dos marcadores celulares positivos e negativos (n=6).

Embora o marcador Stro-1 seja o marcador mais conhecido para MSC, não é exclusivo, pois sua expressão é gradativamente perdida durante a expansão em cultura, limitando o seu uso no isolamento de MSC ou sua identificação nas passagens iniciais (Bydlowski, et al., 2009). Assim, a ausência dos antígenos CD14, CD34 E CD45 na superfície dessas células permitem distingui-las das precursoras hematopoiéticas, e como a International Society for Cellular Therapy concorda que apenas a identificação dos marcadores CD105, CD73 e CD90, quando não estiverem expressos marcadores hematopoéticos, é suficiente para a imunofenotipagem dessas células.

Desse modo, a caracterização dessas células com os marcadores específicos definiu a população obtida do tecido adiposo como uma população de células-tronco mesenquimais, definição utilizada para essas células nos demais experimentos.

### 5.7.2. Avaliação da atividade da telomerase

Telômeros são estruturas nas extremidades dos cromossomos, nos humanos são caracterizados pelas repetições das bases (TTAGGG). As presenças dos telômeros são responsáveis pela manutenção da integridade cromossômica, garantia da replicação completa das extremidades dos cromossomos e pelo estabelecimento da estrutura tridimensional do núcleo celular (Passos, 2003). A enzima telomerase é uma proteína ribonucléica que reconhece os terminais dos telômeros e acrescenta repetições adicionais no final da cadeia 3' do DNA. A atividade do telômero é controlada por dois mecanismos: erosão e adição. A erosão ocorre quando as células se dividem, e a adição é determinada pela atividade da telomerase (Dr. Shay , et al.).

Nas células somáticas o tamanho do telômero é progressivamente encurtado a cada divisão celular tanto *in vivo* quanto *in vitro*, normalmente a parte perdida é de 25-200 pares de bases por divisão. Quando o telômero encontra-se encurtado, é considerado que o cromossomo chegou a um “tamanho crítico” e não pode mais replicar-se, significando o envelhecimento celular, e ocorre o processo de apoptose. Assim, na maioria dos tipos de células pós-embrionárias, a atividade da telomerase é reduzida, entretanto nas células cancerosas, a expressão da telomerase é ativada (Dr. Shay , et al.).

O ensaio da atividade da telomerase foi realizado em três diferentes períodos 4, 8 e 12 passagens. O resultado está na figura 5.27. Para confirmação da atividade telomérica, o gel deve revelar um aumento de seis pares de bases em cada banda (equivalente às repetições TTAGGG).

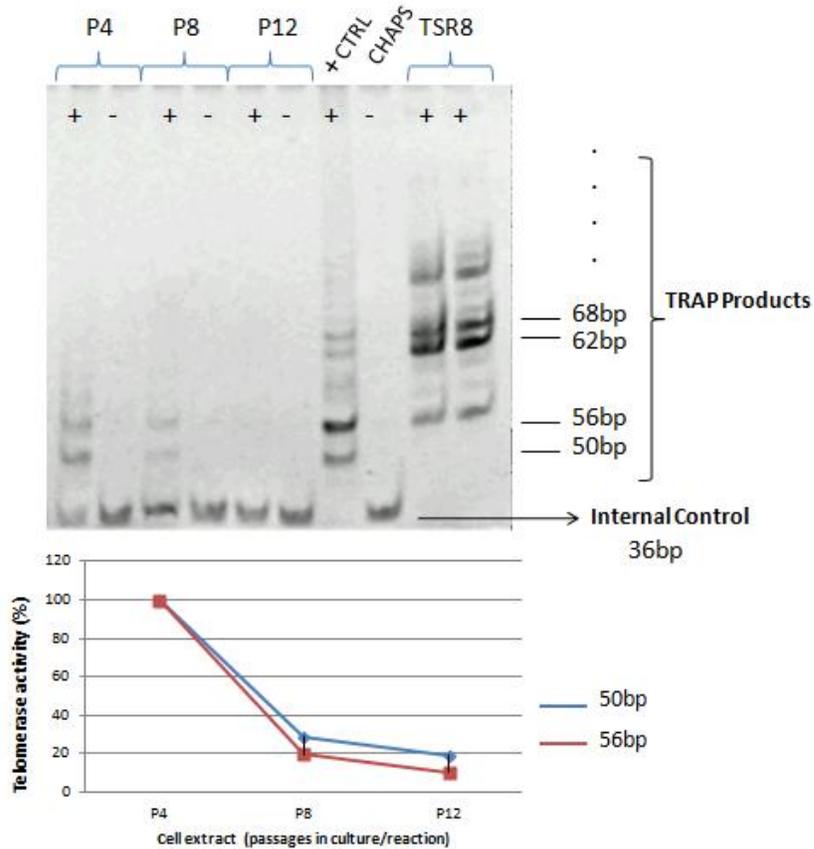


Figura 5.27: Atividade da telomerase.

As células tronco mesenquimais na quarta passagens (P4) demonstraram a presença de bandas com 56 bp e 50 bp que se relacionaram com uma atividade de 100% em relação ao controle. Houve diminuição da intensidade das bandas no decorrer das passagens, P8 e P12, com respectiva diminuição na atividade de telomerase, descartando momentaneamente a possibilidade de potencial cancerígeno.

### 5.7.3. Citogenética

A citogenética é o estudo da estrutura dos cromossomos. Para cada espécie possui um conjunto cromossômico típico (cariótipo), em termos de morfologia e número de cromossomos. Desse modo, as técnicas de bandeamento, permitem que sejam criadas bandas horizontais com diferentes intensidades de coloração. Banda é definida como uma parte do cromossomo o qual é claramente distinguida pelos seguimentos, os quais aparecem mais escuros ou claros. As bandas coradas mais escuras podem ser coradas mais claras, dependendo da técnica utilizada. Assim, os cromossomos consistem em uma continua serie de bandas claras e escuras (Karger, 1995).

A análise em bandamento G é utilizada para detectar possíveis alterações numéricas e/ou estruturais nos cromossomos obtidos das diferentes passagens de culturas de células-tronco mesenquimais. A análise cromossômica ou cariótipo pode ser realizada em cromossomos obtidos a partir de células nucleadas originadas de diferentes tecidos, submetidos a métodos de preparação citológica direta ou a técnicas de cultivo em laboratório. O cariograma é montado após pareamento dos cromossomos homólogos, de acordo com o tamanho e padrão de bandas, segundo o Sistema Internacional de Nomenclatura para Citogenética Humana (Karger, 1995). Na figura 5.28 é visto uma imagem que mostra o cariograma de uma célula tronco normal de um ser humano.

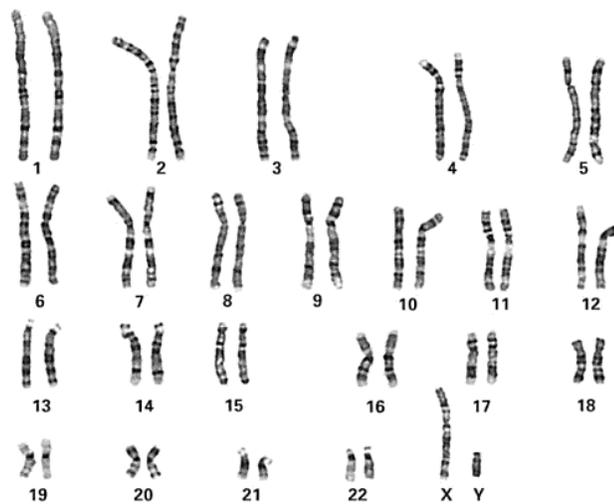


Figura 5.28: Cariograma de célula tronco normal (Shaffer, et al., 2013)

A análise foi realizada nas células nas passagens 8 e 10, embora a atividade da telomerase foi analisada nas passagens 4, 8 e 12. A escolha por analisar as células da passagem 10 em vez da 12, foi feita por não ser comum utilizar as células da 12 passagens para cultura em biomateriais, por já ser considerada uma célula próxima da apoptose celular. Assim foi realizado a coloração longitudinal e bandas G das células das passagens 8 e 10, foi possível afirmar que não fora encontradas anormalidades e os cromossomas se mantiveram estáveis, visto na figura 5.29.

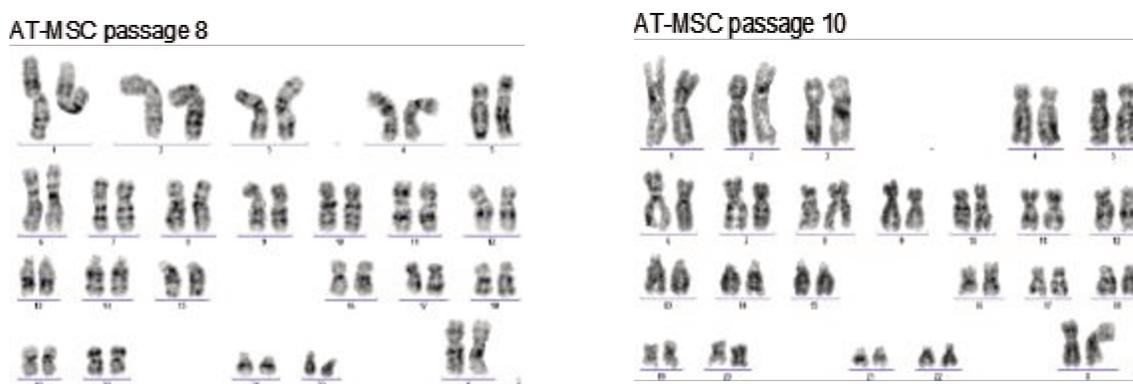


Figura 5.29: Cariograma das células MSC, passagem 8 e passagem 10.

#### 5.7.4 Diferenciação das células-tronco mesenquimais

Para comprovar a capacidade de diferenciação das células-tronco mesenquimais, foi padronizado pela equipe da Professora Sara Saad e com o aluno Pedro Rego, Hemocentro-Unicamp, um protocolo eficiente para diferenciação nas linhagens osteogênicas, condrogênicas e adipogênicas. O qual após a expansão celular e a caracterização por citometria de fluxo, realizava diferenciação nas três linhagens descritas:

##### 5.7.4.1 Diferenciação adipogênica

As células foram coradas com *Oil Red*, apresentaram uma coloração vermelha no citoplasma em pequenas vesículas. O corante utilizado interage com lipídeos e triglicerídeos

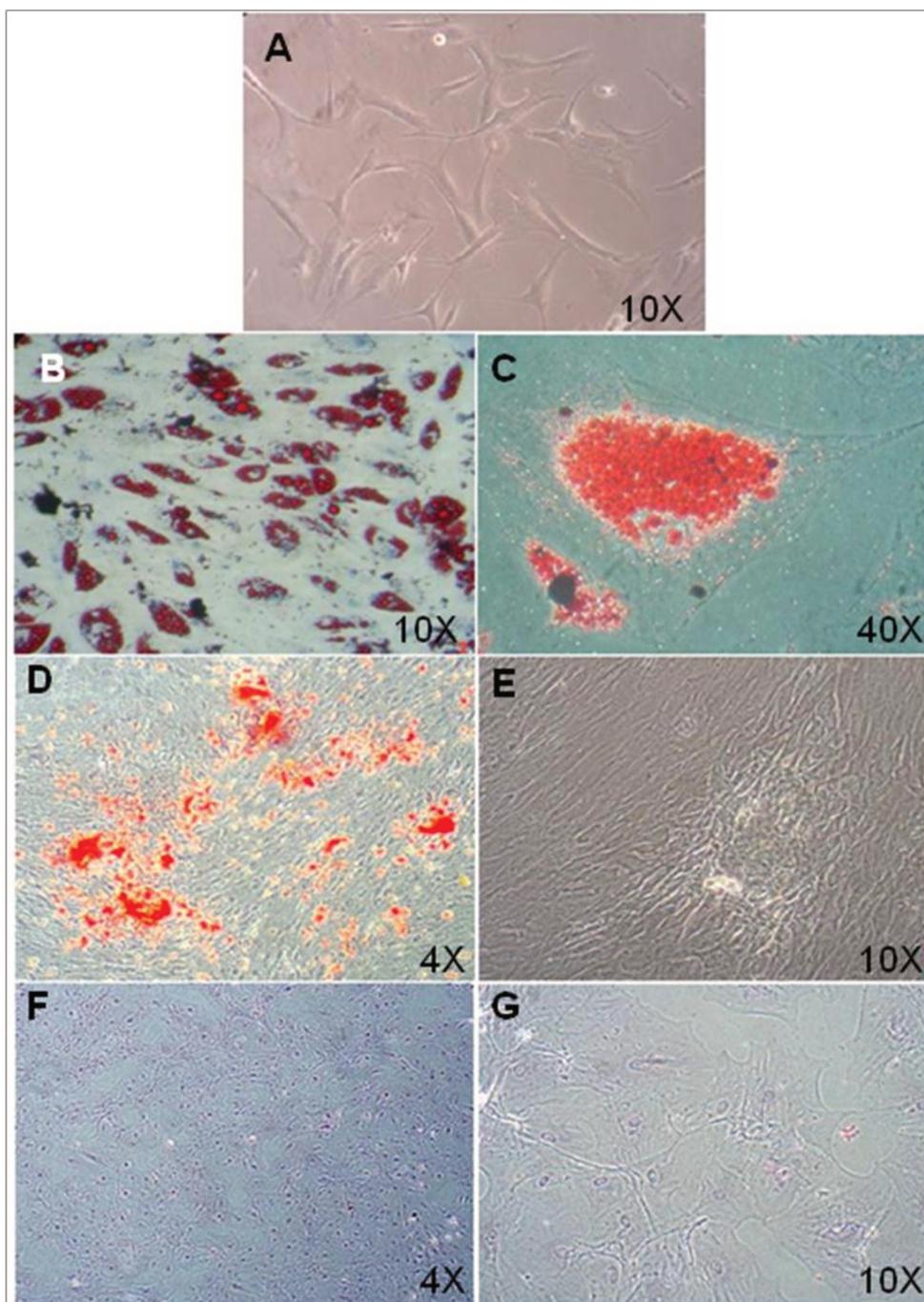
neutros, assim permite que seja evidenciado o acúmulo dessas substâncias em vesículas citoplasmáticas das células diferenciadas. Como pode ser observado na figura 5.30B-C, as quais mostram que as MSC perderam a morfologia fibroblástica e adquiriram uma morfologia redonda e com inúmeras vesículas, caracterizando o acúmulo de lipídeos.

#### *5.7.4.2 Diferenciação osteogênica*

Para a confirmação de diferenciação das MSC para a linhagem osteogênica foi realizado a coloração *Alzarin Red S* que cora de vermelho os depósitos de cálcio e outros minerais. Como podemos observar na figura 5.30 D-E, em volta das células diferenciadas encontram-se regiões avermelhadas, as quais se supõem que sejam depósitos de minerais provenientes da formação de uma matriz extracelular mineralizada, semelhante a do tecido ósseo. Outra característica marcante é a mudança de morfologia, pois as células fibroblásticas alteram seu formato de células alongadas e alinhadas, para presenças de colônias recobrando toda placa de cultura e em alguns lugares.

#### *5.7.4.3 Diferenciação condrogênica*

Após três semanas as células-tronco mesenquimais induzidas para diferenciação condrogênica, foram coradas com *Alcian blue* (figura 5.30 F-G). As células apresentaram expansão no tamanho celular com significativo aumento no citoplasma, tornando-se arredondadas e achatadas. É possível observar uma coloração celular azulada devido à interação do corante com as glicosaminoglicanas expressas durante a diferenciação.



**Figura 5.30: Microscopia óptica de MSC submetidas à diferenciação. A- quarta passagem apresentando morfologia fibroblástica B-C diferenciadas em linhagem adipogênica coradas com Oil Red, mostrando acúmulo de vesículas de lipídios nas células. D diferenciadas na linhagem osteogênica coradas com Alzarin Red S mostrando acúmulo de cálcio formado, E células-tronco mesenquimais em microscopia óptica durante a cultura de diferenciação, mostrando formação de aglomerados celulares e alinhamento das células com sua estrutura alongada. F-G. diferenciadas em linhagem condrogênica coradas com Alcian blue, observa-se a mudança da morfologia das células (arredondadas) e a produção de matriz com proteoglicanas coradas em azul. Foram utilizadas as lentes objetivas com os aumentos descritos nas imagens.**

## 5.8 Estudos *in vitro* com *scaffolds*

### 5.8.1 Microscopia eletrônica de varredura -MEV

Foi realizada microscopia eletrônica de varredura para visualizar o crescimento e expansão das células mesenquimais nos *scaffolds*. Esta análise ocorreu durante os períodos 4, 7, 14 e 21 dias.

Para uma melhor discussão das imagens, essas foram separadas de acordo com sua composição, conforme tabela 5.10.

**Tabela 5.10: Divisão das amostras para melhor discussão das imagens pelo MEV.**

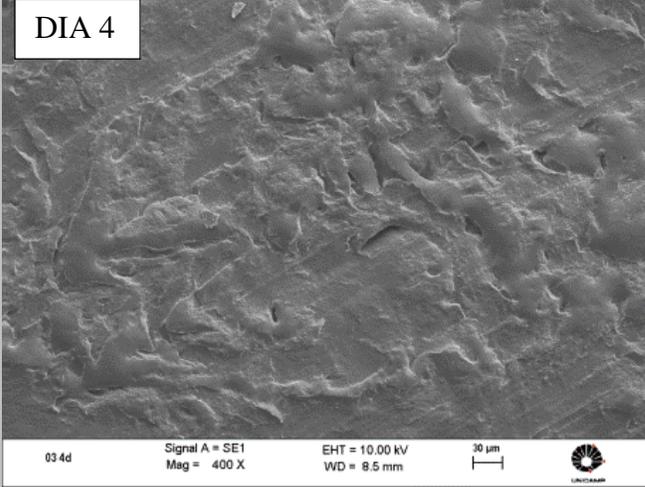
| Grupos | Características                                   | Amostras                          |
|--------|---|-----------------------------------|
| I      | Amostras densas.                                  | PCL<br>PCL- ácido<br>PCL-ácido-HA |
| II     | Amostras porosas.                                 | PCL- ácido<br>PCL- ácido – HA     |
| III    | Amostras com duas<br>composições: densa e porosa. | PCL- ácido<br>PCL- ácido- HA      |

Nas amostras densas de PCL (utilizado como controle), foi observado um crescimento e espraiamento das células na superfície semelhantes durante os quatro períodos. Já nas amostras com ácido oleico o crescimento das células mostraram proeminente durante os primeiros períodos 4 e 7 dias, após esses períodos as células visualmente mostram reduzir de quantidade e de tamanho. Ao comparar com as amostras com hidroxiapatita é notável um crescimento da camada celular em todos os períodos. As células tiveram seu crescimento abundante na superfície e a partir da segunda semana as células se conectavam via seus prolongamentos (figura 5.31).

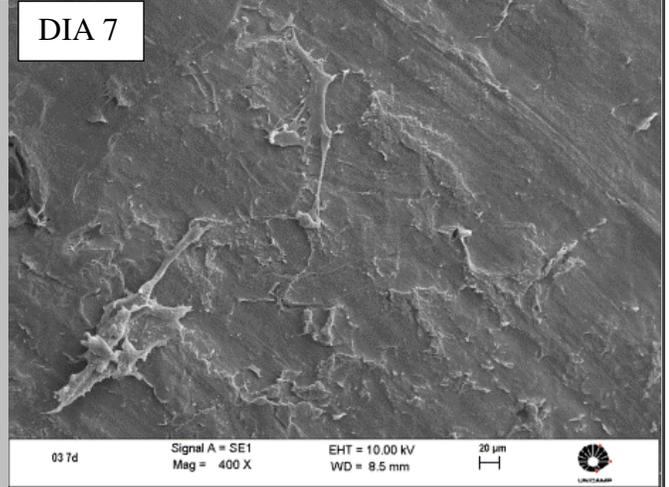
**GRUPO I**  
**Amostras**

**A-PCL**

**DIA 4**

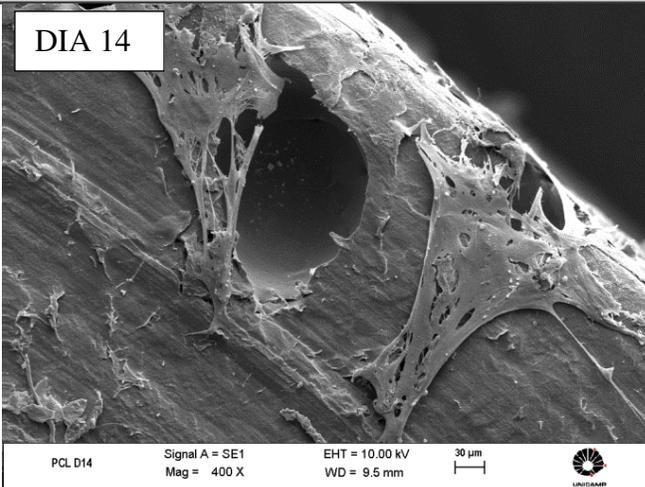


**DIA 7**

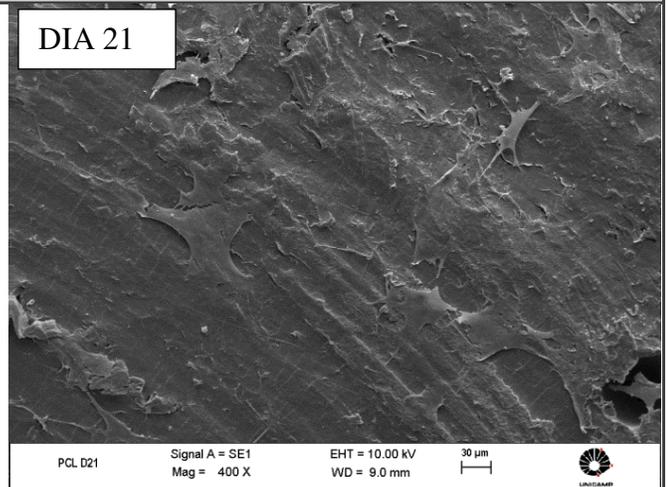


**A-PCL**

**DIA 14**

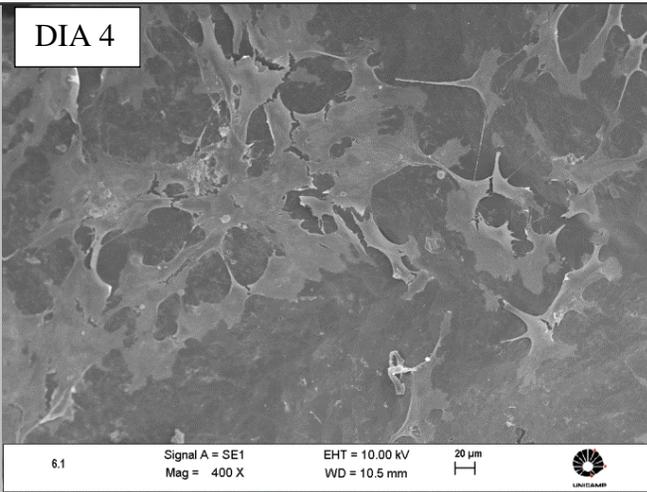


**DIA 21**

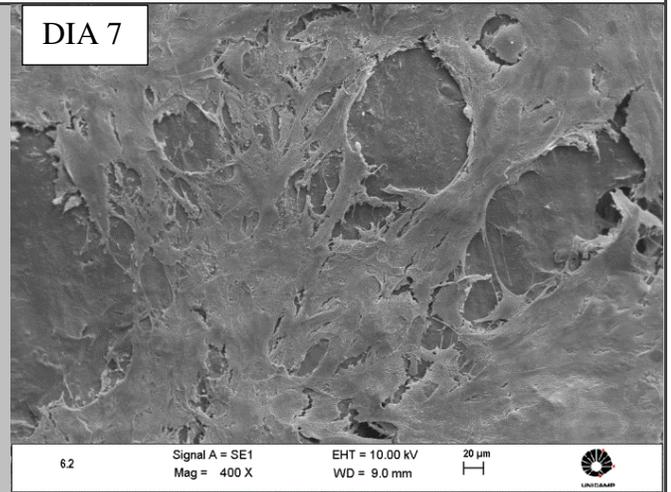


B-  
PCL/ácido  
oleico

DIA 4

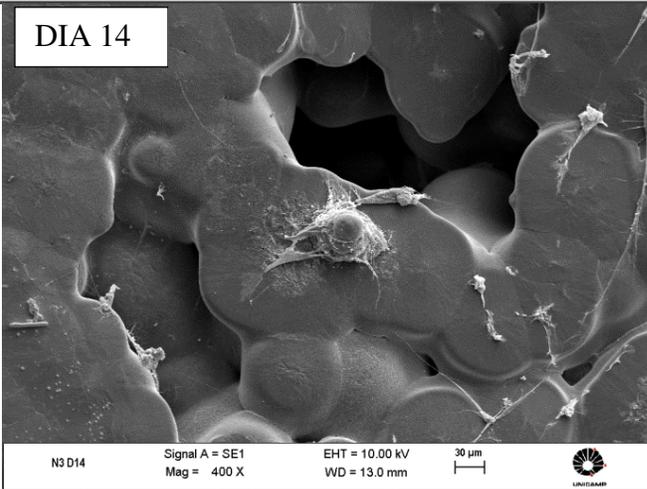


DIA 7

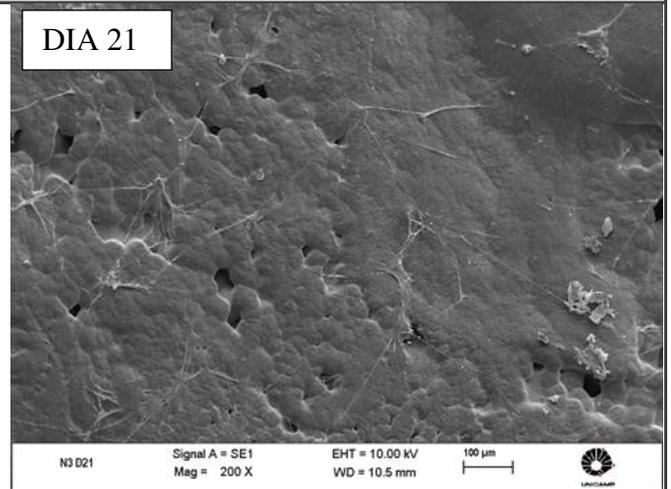


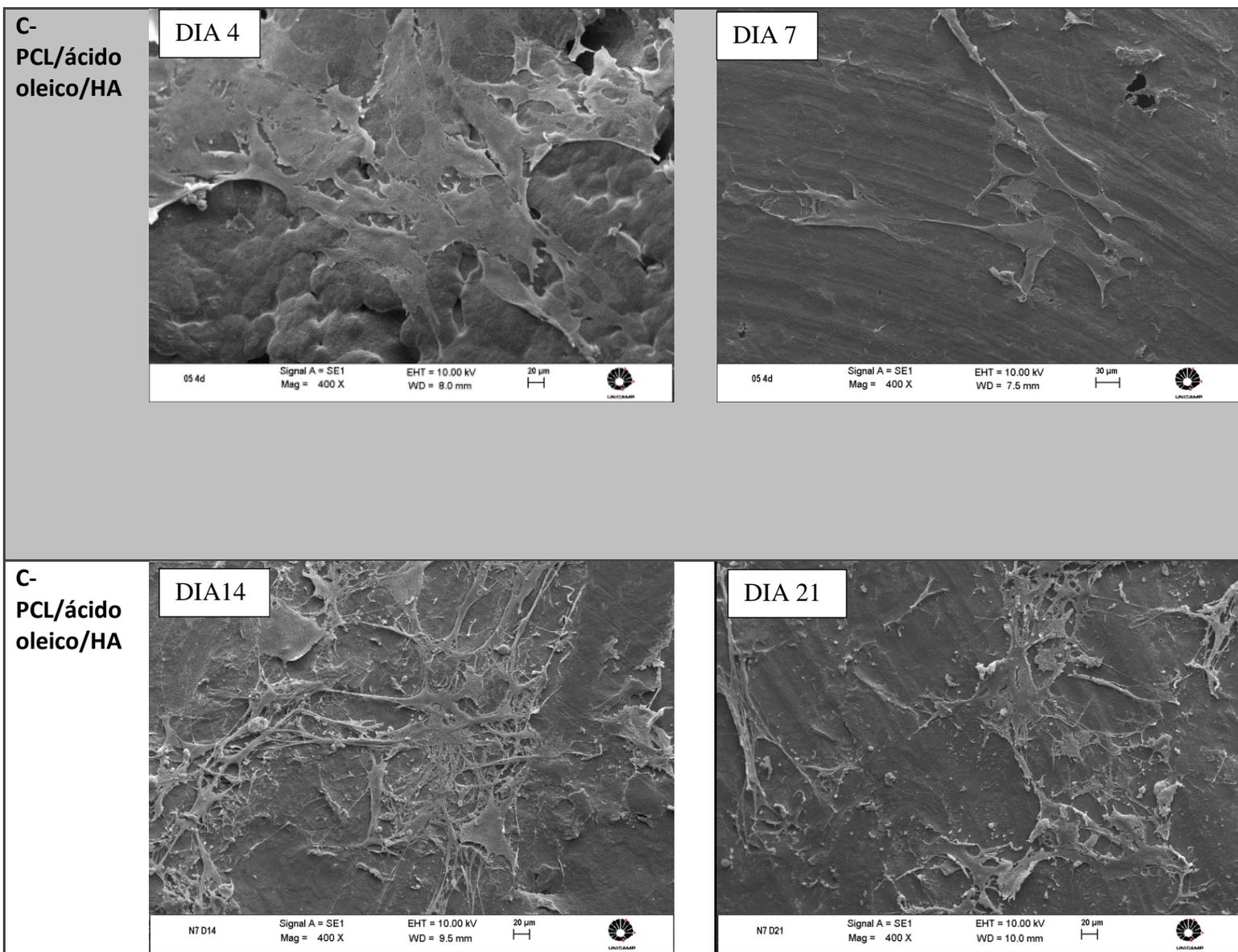
B-  
PCL/ácido  
oleico

DIA 14



DIA 21





**Figura 5.31: Imagens de MEV das amostras do grupo I durante os períodos 4, 7, 14 e 21 dias de cultura: A- PCL; B- PCL/ácido oleico; C- PCL/ácido oleico/ HA. Aumento de 400X.**

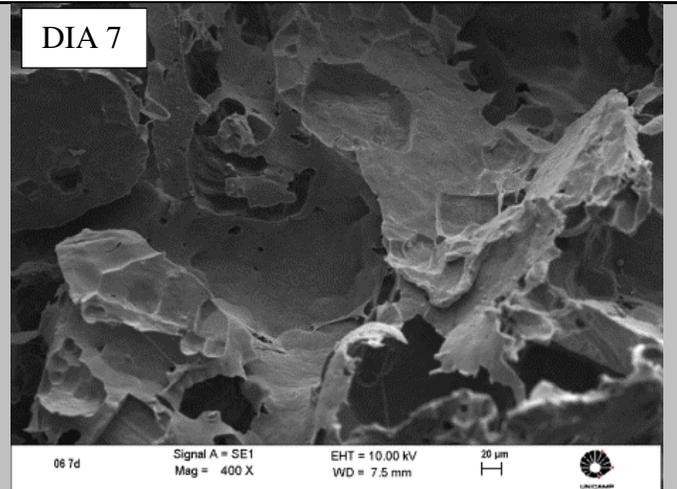
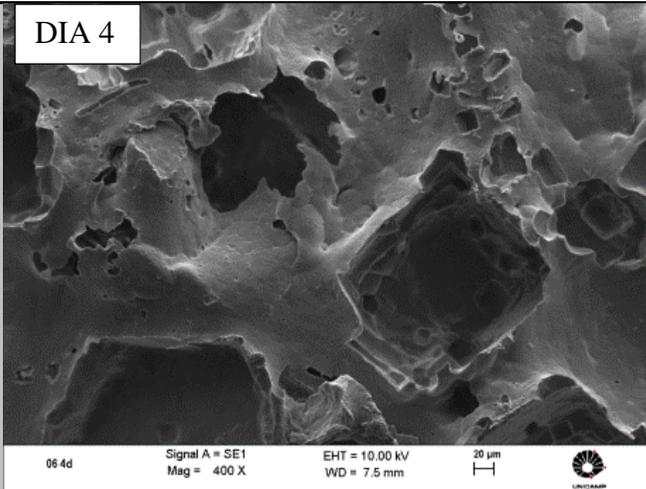
No grupo II, visto na figura 5.32, as amostras de ambos os grupos, com e sem hidroxiapatita, apresentaram uma grande quantidade de células nas superfícies dos materiais em comparação com os grupos I e III. Por serem materiais porosos pode ter ocorrido uma proliferação celular em ambas as superfícies e não só na superfície que estava em contato inicial com a cultura celular.

As amostras sem hidroxiapatita apresentaram prolongamentos celulares principalmente a partir da segunda semana de cultura. As células produziram prolongamentos os quais se ligavam a diferentes paredes dos poros. Entretanto quantidade de células nas amostras com hidroxiapatita

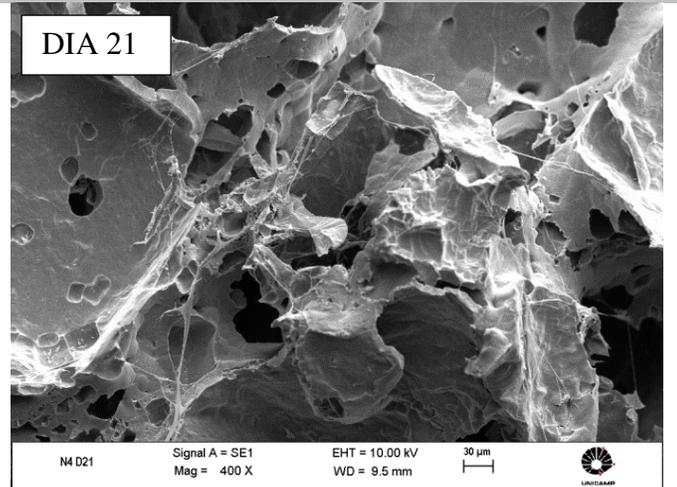
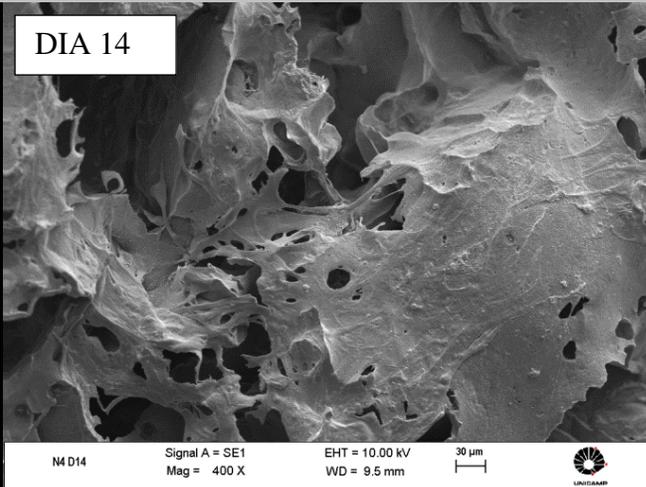
demonstrou ser mais abundante a partir do quarto dia de cultura, na qual foi possível visualizar uma camada de células aderida em toda superfície.

## Grupo II Amostras

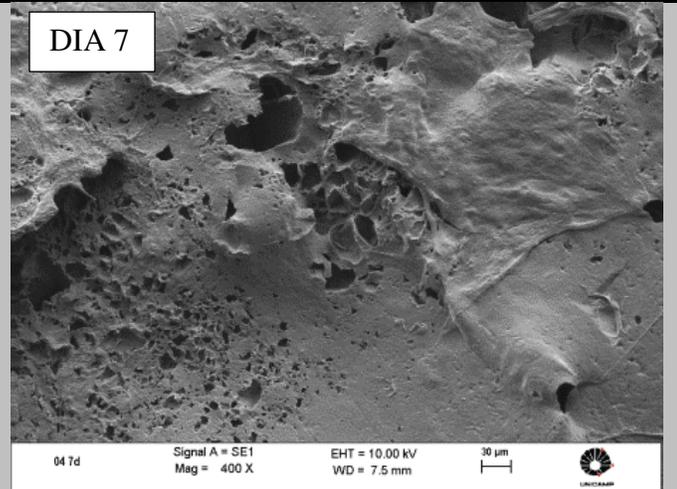
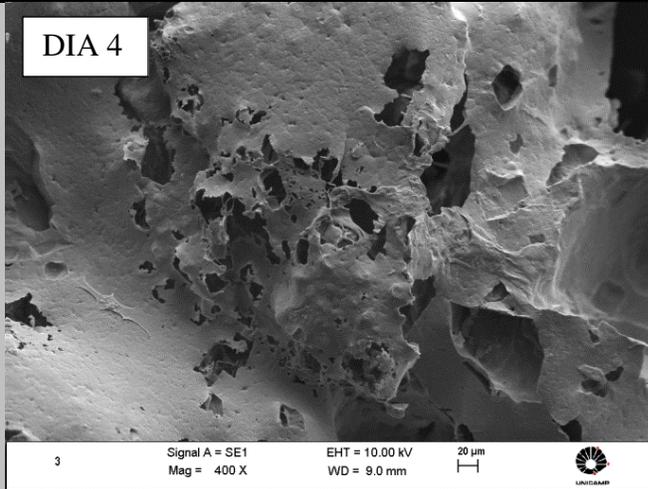
A-PCL/  
ácido  
oleico  
(poroso)



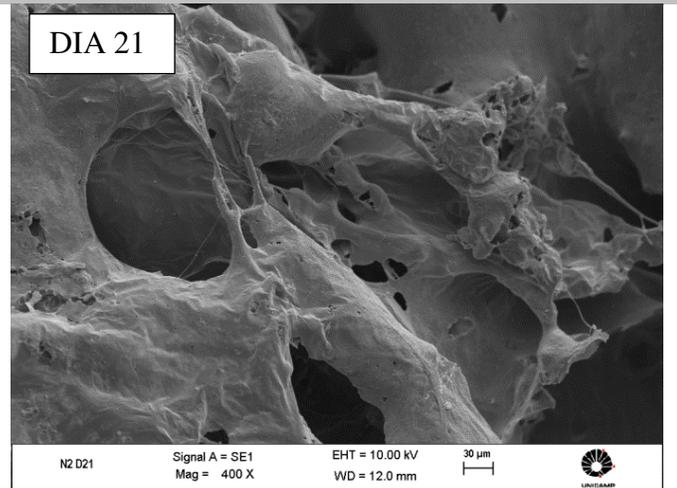
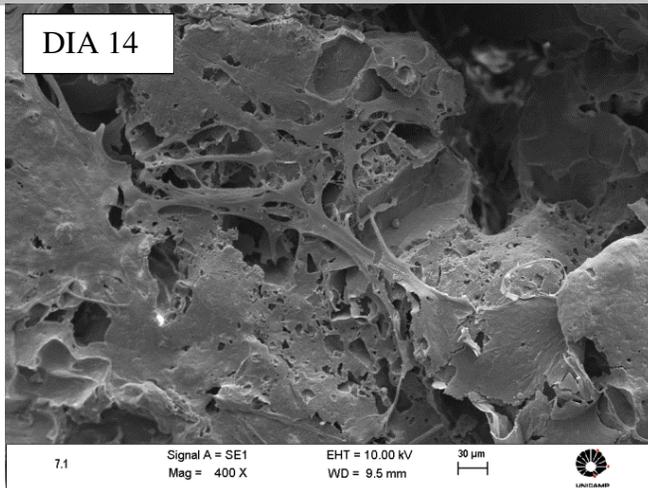
A-  
PCL/ácido  
oleico  
(poroso)



B-  
PCL/ácido  
oleico/HA  
(poroso)



B-  
PCL/ácido  
oleico/HA  
(poroso)

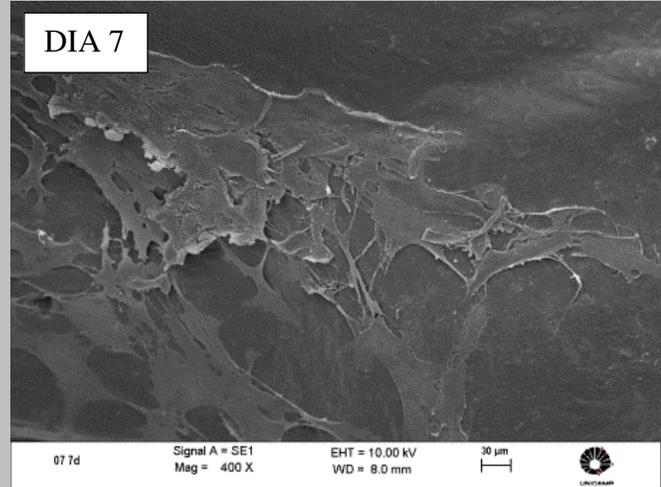
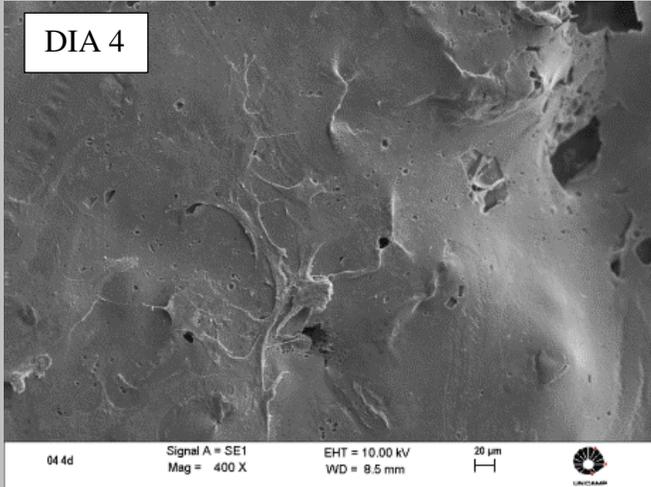


**Figura 5.32: Imagens de MEV das amostras do grupo II durante os períodos 4, 7, 14 e 21 dias de cultura: A- PCL/ácido oleico; B- PCL/ácido oleico/ HA. Aumento de 400X.**

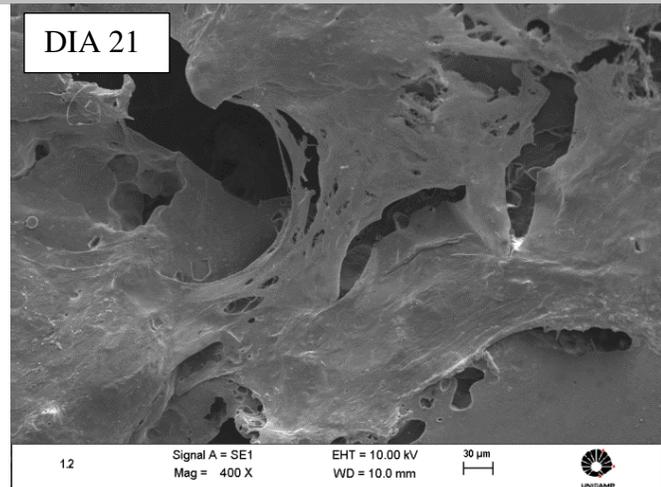
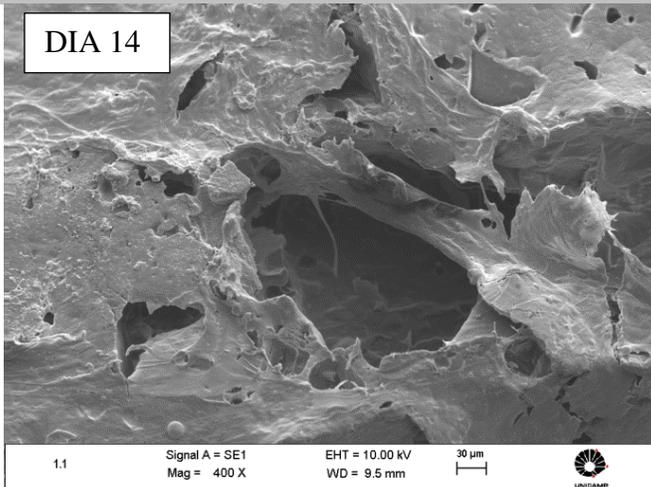
O grupo III comparou as com áreas densas e porosas com e se hidroxiapatita. Nas amostras sem hidroxiapatita ocorreu um crescimento em ambas as superfícies com prolongamentos celulares, entretanto no período de 7 dias ocorreu um artefato durante a preparação das amostras para a análise de microscopia, assim a camada celular mostra “descolando” da superfície. Nas imagens das amostras com hidroxiapatita é possível observar um maior número de prolongamentos citoplasmático (figura 5.33).

**Grupo III**  
**Amostras**

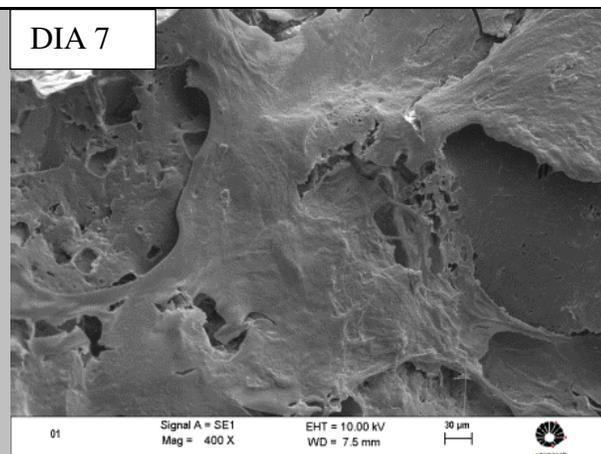
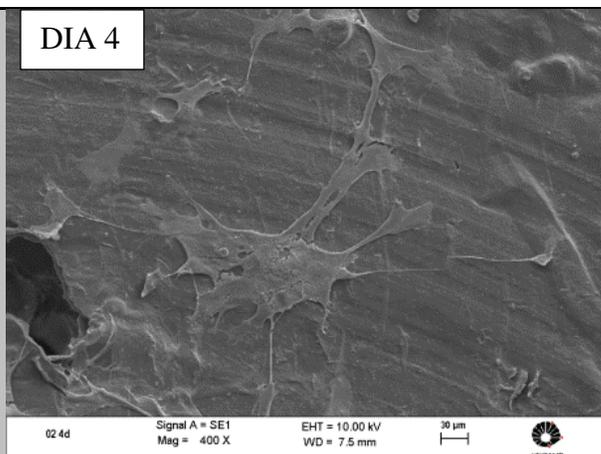
**A-PCL/ácido  
oleico  
(poroso/denso)**



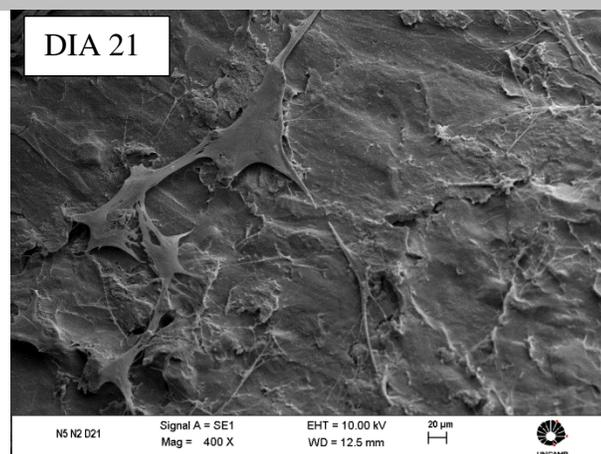
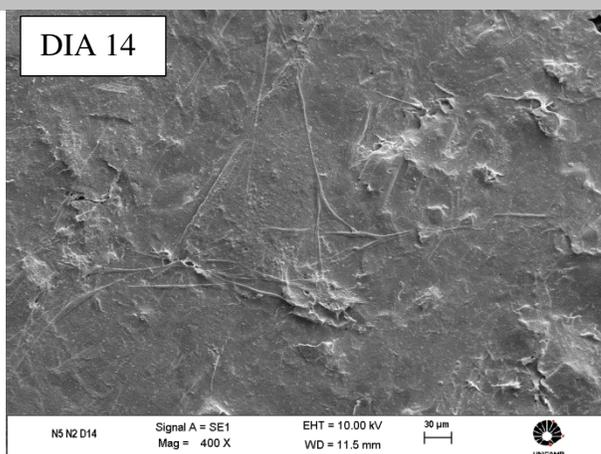
**A-PCL/ácido  
oleico  
(poroso/denso)**



**B-PCL/ácido oleico/HA (poroso/denso)**



**B-PCL/ácido oleico/HA (poroso/denso)**



**Figura 5.33: Imagens de MEV das amostras do grupo III durante os períodos 4, 7, 14 e 21 dias de cultura: A- PCL/ácido oleico (poroso/denso); B- PCL/ácido oleico/ HA (poroso/denso). Aumento de 400X.**

Ao analisar as imagens, por um método qualitativo, os resultados sugerem que a adição de hidroxiapatita na composição da matriz polimérica pode levar a afetar a proliferação celular. Isto pode ocorrer pela presença de produtos de degradação da hidroxiapatita deficiente em cálcio, a qual ao ser solubilizada resulta em produtos como cálcio e fósforo no sítio a qual é inserida, potencializando a indução da bioatividade (Polini, et al., 2011). Os substratos porosos resultaram em melhores respostas de proliferação celular.

Com as imagens das células em cultura durante os períodos analisados, também são possíveis investigar as morfologias celulares e o que elas representam. As células tronco mesenquimais quando diferenciadas em osteoblastos, por exemplo, se tornam mais alongadas e espreiadas (Mathieu, et al., 2012). O formato das células mostra-se ser relacionado com a

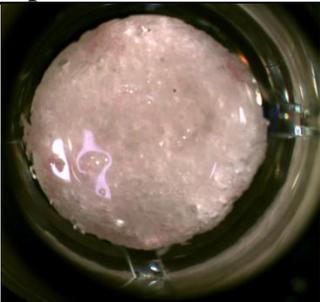
regulação da actina no citoesqueleto. Assim células tronco colocadas em superfícies as quais permitem uma maior atividade de espreiar gera uma maior expressão de RhoA, proteína relacionada com a organização dos filamentos de actina (Alberts, et al., 2011).

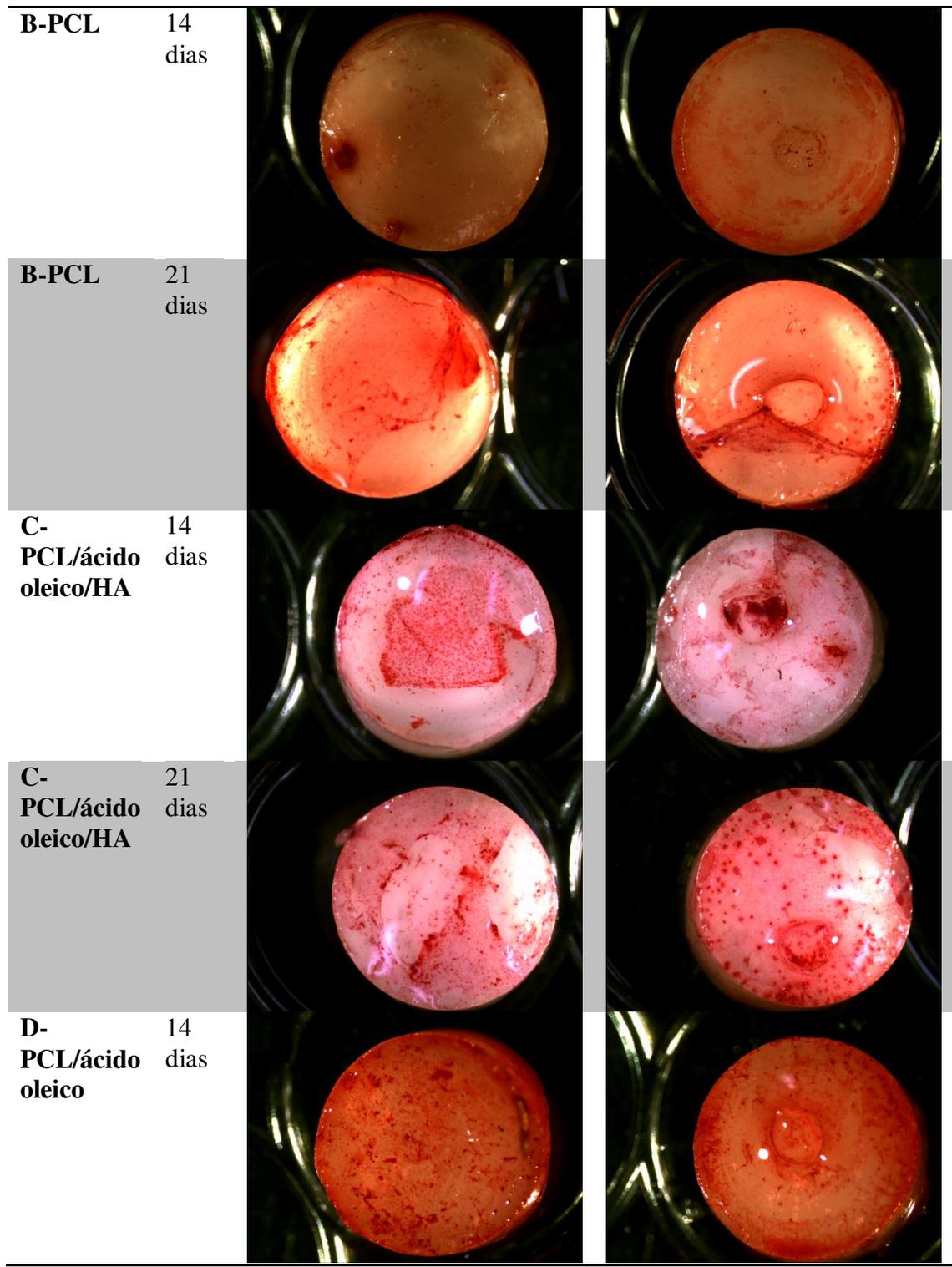
Entretanto não é apenas o espreiamento das células que influenciam a configuração citoesquelética e a diferenciação osteogênica. Assim a topografia da superfície demonstra ter conectividade com o potencial de diferenciação. Desse modo foi estudada a topografia da superfície nas diferentes composições, item 5.6.2.

### 5.8.2 Coloração Alizarin Red

Essa técnica de coloração Alizarin Red é utilizada como fixador do mineral cálcio para análise histoquímica ( Sasmazel, 2011). Nesse estudo, essa coloração foi utilizada para observar quantitativamente e qualitativamente a deposição de cálcio nas amostras com células tronco, durante os períodos 0,14 e 21 dias.

As amostras foram divididas assim como as amostras de MEV, em três principais grupos: I (PCL; PCL- ácido; PCL-ácido-HA), II (PCL- ácido poroso; PCL- ácido- HA poroso) e III (amostras duplas PCL- ácido e PCL- ácido- HA) em todos os grupos foi adicionado uma amostra como controle. Esta amostra controle não apresentou coloração na superfície, sendo compatível com o esperado, já que não possuía cultura celular semeada e hidroxiapatita em sua composição.

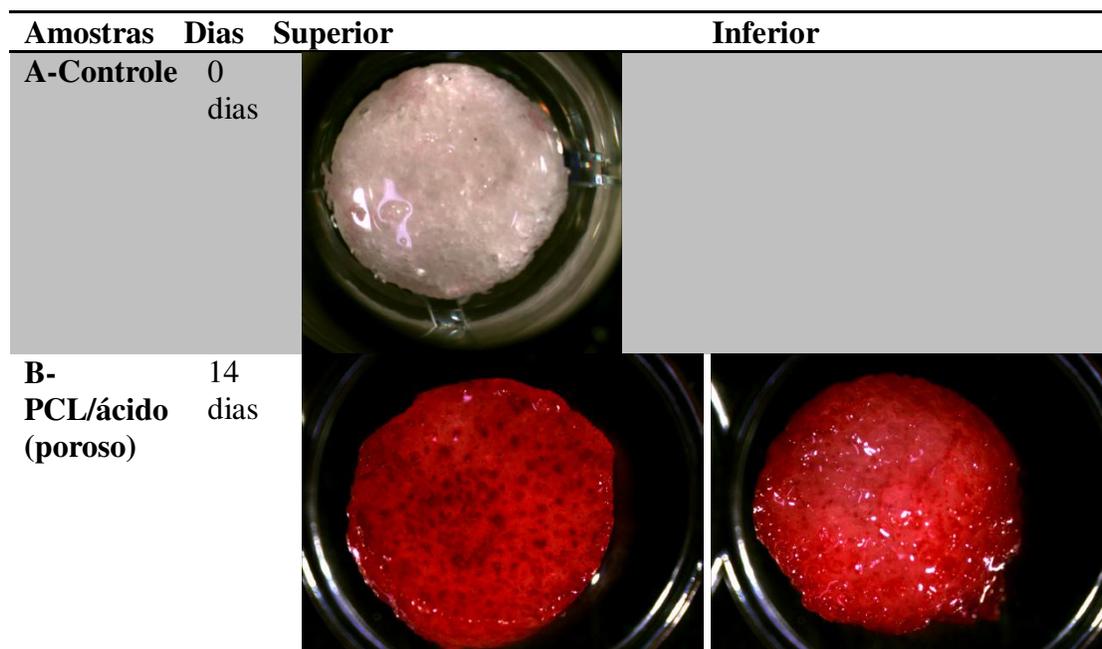
| <b>Amostras</b>        | <b>Dias</b>       | <b>Superior</b>   | <b>Inferior</b> |
|------------------------|-------------------|---|-----------------|
| <b>A-<br/>Controle</b> | <b>0<br/>dias</b> |  |                 |

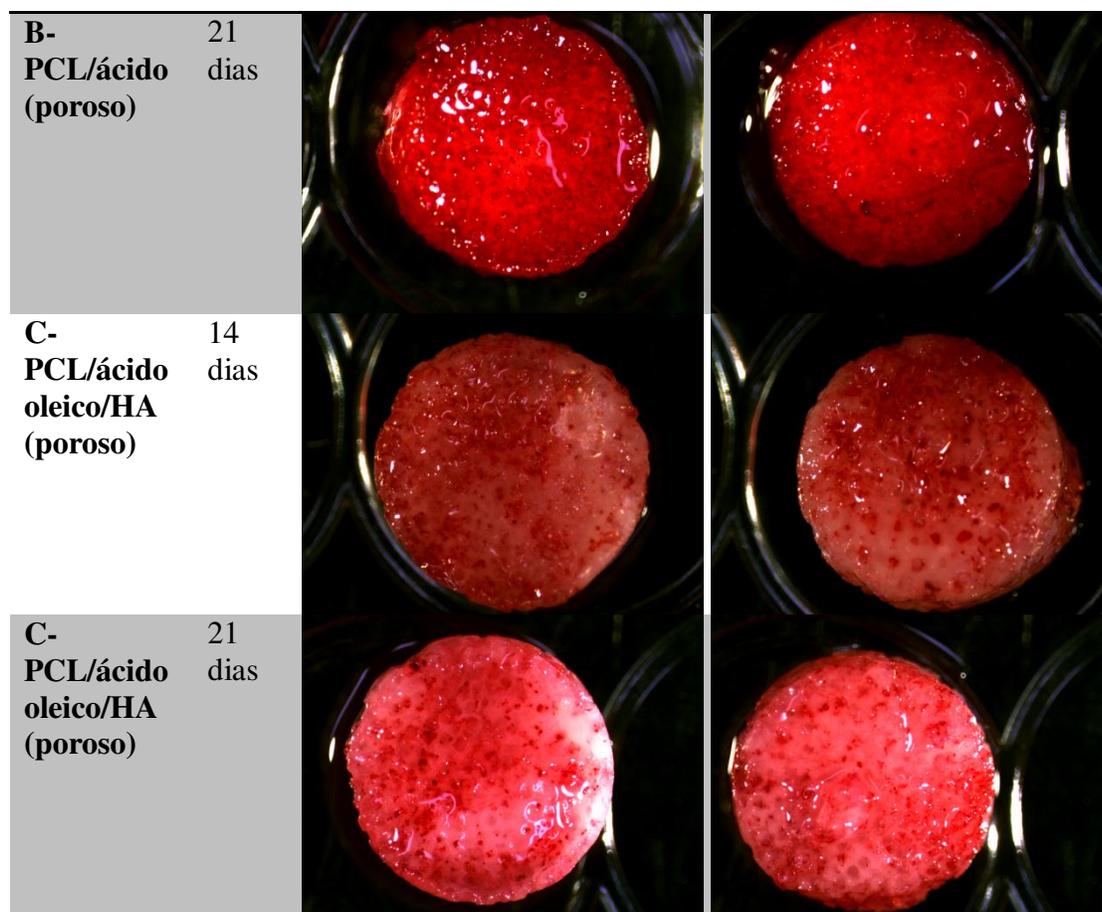




**Figura 5.34:** Análise qualitativa da *Alizarin Red* do grupo I: A-controle; B-PCL; C-PCL/ácido oleico/HA e D-PCL/ácido oleico.

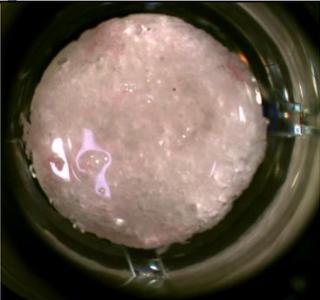
As amostras que apareceram mais pigmentadas no grupo I, em ordem decrescente, foram PCL- ácido>PCL- ácido- HA>PCL>controle. Todas as amostras dos 21 dias de cultura apresentaram mais pigmentadas em comparação com ao 14 dias, principalmente as amostras com apenas PCL e ácido oleico em sua composição, por uma análise qualitativa, essas foram as que apresentaram maior presença de cálcio. Em contrapartida, as amostras com hidroxiapatita, não apresentaram uma pigmentação excessiva em suas superfícies, confirmando que os *whiskers* estão englobados pela matriz polimérica (figura 5.34).





**Figura 5.35: Análise qualitativa da Alizarin Red do grupo II: A- controle; B-PCL/ácido oleico (poroso); e C- PCL/ácido oleico/HA (poroso).**

Ambas as amostras do grupo II apresentaram pigmentação em suas superfícies mais evidenciadas em comparação com os grupos I e III. Novamente, as amostras com PCL- ácido oleico (porosas) em sua composição apresentaram maior coloração quando comparado com as amostras com hidroxiapatita (figura 5.35).

| Amostras   | Dias   | Superior  | Inferior |
|------------|--------|---|----------|
| A-Controle | 0 dias |  |          |

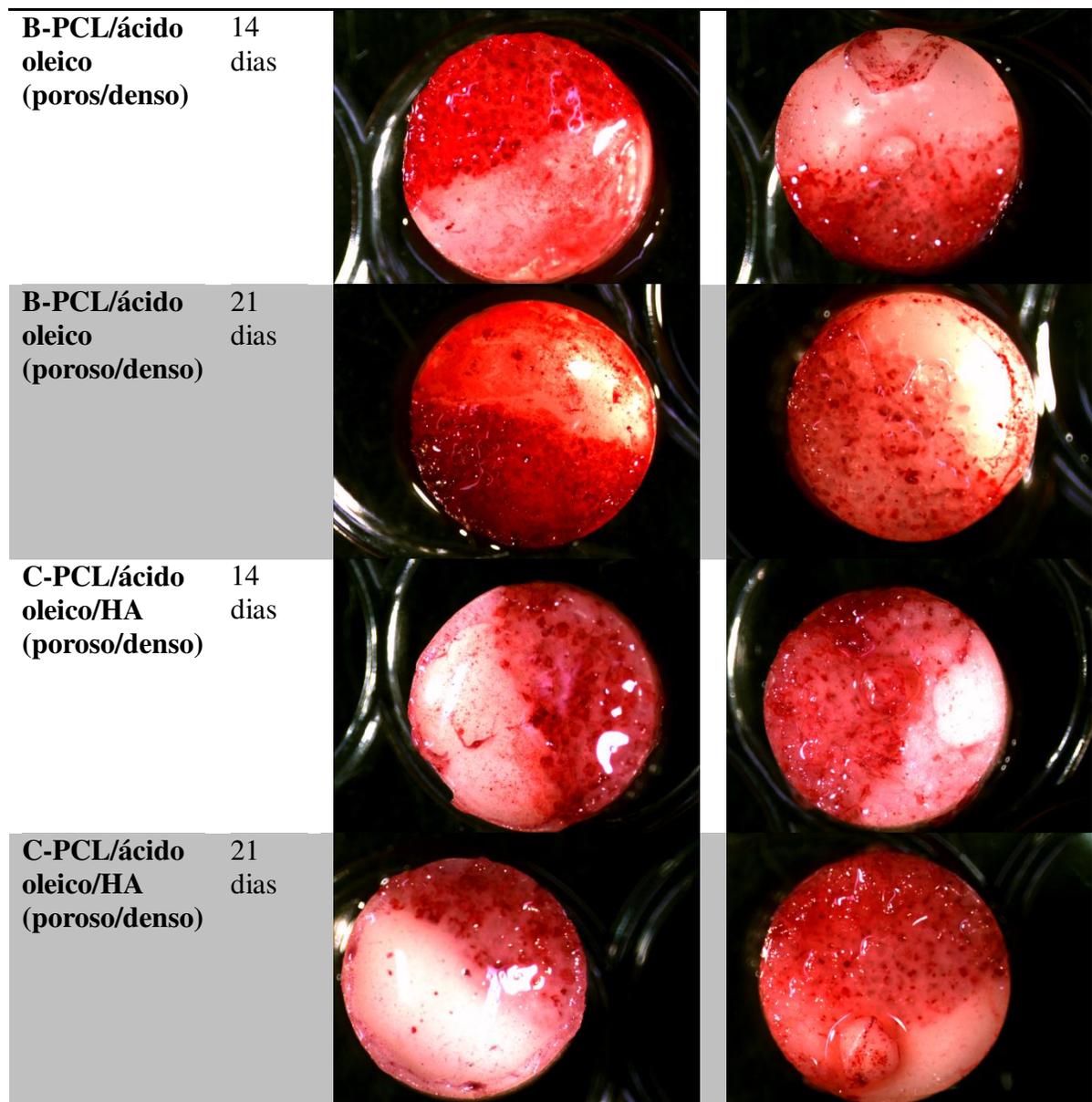


Figura 5.36: Análise qualitativa da Alizarin Red do grupo III: A- controle; B-PCL/ácido oleico (poroso/denso); C-PCL/ácido oleico/HA (poroso/denso).

O grupo III, no qual as amostras apresentam áreas porosas e densas, apresentou marcações das superfícies das amostras mais evidenciadas quando adicionada hidroxiapatita na matriz polimérica, visto na figura 5.36.

Os resultados da análise quantitativa da coloração Alizarin Red estão apresentados na figura 5.37. Essa análise consiste em resultados mais objetivo do que a análise qualitativa por apresentar um procedimento de avaliação da tonalidade de coloração pela absorvância. O grupo I apresentou em ordem crescente o valor de absorvância PCL= PCL-ácido> PCL- ácido-HA> Controle, entretanto realizando o ensaio estatístico *Student-T*, foi possível verificar que apenas o

grupo PCL 21 dias apresentou diferença estatística com o grupo PCL-ácido. Desse modo, analisando as amostras densas a adição de cerâmica não levou a uma maior deposição de cálcio, entretanto confirmou que os *whiskers* de hidroxiapatita apresentam-se bem envoltos de polímero.

O grupo II possuiu o maior valor de absorbância das amostras, a amostra porosa de PCL-ácido, apresentando maior que o grupo com adição de hidroxiapatita.

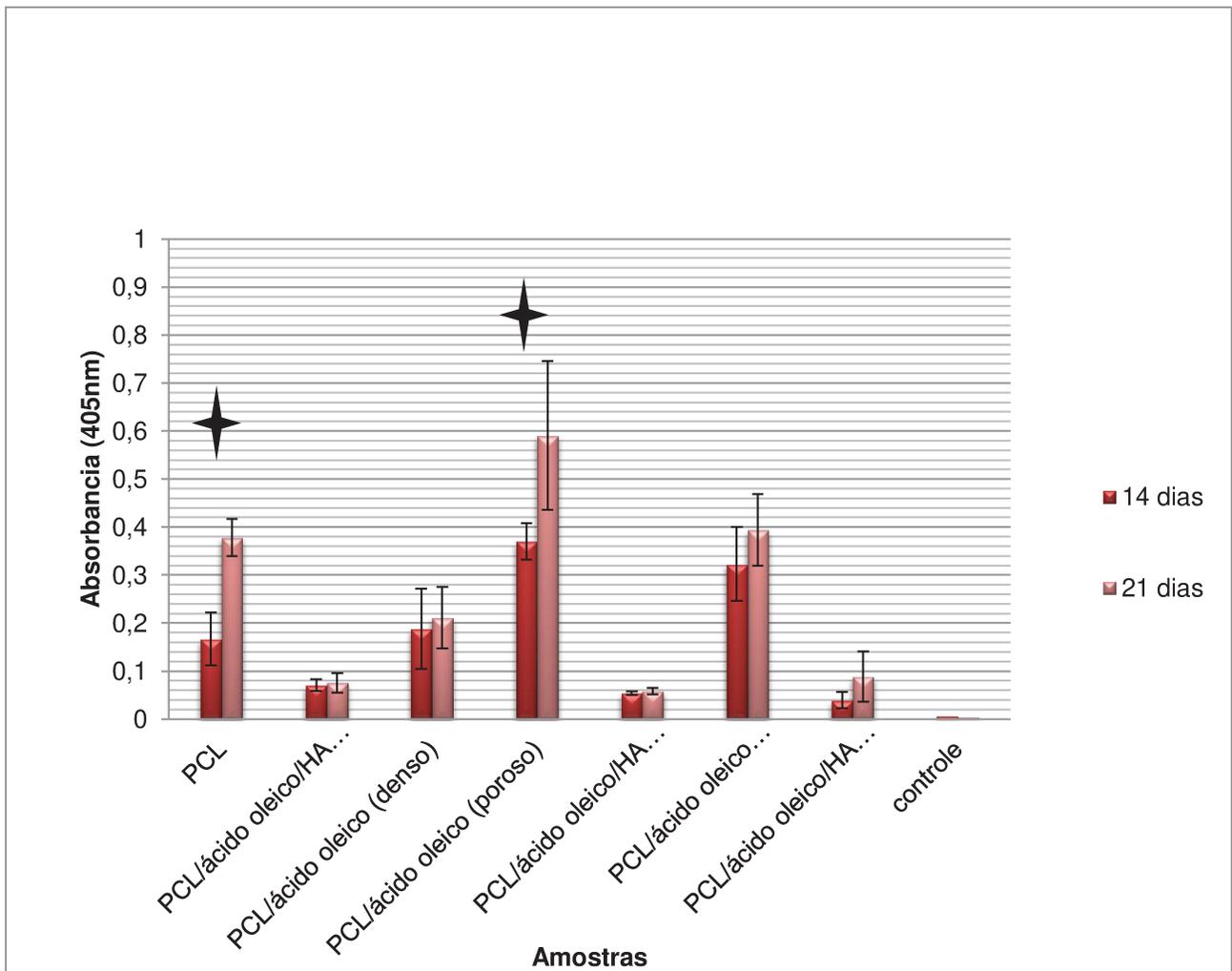


Figura5.37: Resultados quantitativos da coloração Alizarin Red (períodos 14 e 21 dias). ✦ Grupos com valores de p inferior a 0,05, entre os períodos 14 e 21 dias, ou seja, apresentou diferença estatisticamente).

Os valores de absorbância do grupo III foram os que apresentaram uma maior discrepância. As amostras com adição de hidroxiapatita em ambos os períodos 14 e 21 dias

mostraram resultados de menor deposição de cálcio. Esse fato pode ser resultado da alteração do pH da solução, não indicando que deverá apresentar o mesmo resultado *in vivo*.

Todas as amostras, exceto controle, apresentaram um aumento na absorbância nos valores durante o período de 21 dias, podendo ser associado à possibilidade de diferenciação das células mesenquimais.

O grupo de pesquisa italiano Netti, comparou em seu artigo publicado em 2011 que o comportamento do compósito PCL/HA com diversas concentrações de hidroxiapatita, interessante o valor apresentado de deposição de cálcio (verificado pela análise Alizarin Red) utilizando células MG63, mostrou-se sem diferença estatística entre os grupos com e sem adição de hidroxiapatita (5%w/w) durante 14 dias. Os autores concluíram que neste caso pode-se sugerir que uma maior concentração de hidroxiapatita no compósito geraria uma melhor deposição de cálcio (Salerno, et al., 2011).

## 6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

As análises dos resultados e das discussões permitem as seguintes conclusões:

- Os *whiskers* de hidroxiapatita apresentaram a morfologia desejada com uma relação Ca/P 1,5;
- Com a adição de cerâmica foi reduzida a cristalinidade devido a interferência no “empacotamento” das cadeias poliméricas, reduzindo o tamanho dos esferulitos comprovado pelas imagens de MO;
- As composições com cerâmica tiveram superfícies mais hidrofílicas em comparação com o controle;
- Com a análise dos resultados dos ensaios de resistência a compressão, hidrofílicidade e cristalização foi possível determinar a melhor concentração de HA da estrutura de núcleo denso, sendo essa de 25% w/w.
- Para a estrutura porosa, utilizando os critérios de deposição de apatita e cristalinidade, a amostra que obteve o melhor resultado foi a de concentração de 15% de *whiskers* de HA.
- A união entre as estruturas porosas e densas obteve uma eficaz consolidação, tornando-as uma matriz tridimensional com duas estruturas diferentes;

As amostras foram caracterizadas em parceria utilizando os recursos da Unicamp, Universidade de Trento- Itália e Universidade Texas A&M- EUA. Desse modo foi possível realizar caracterizações minuciosas do material para certificar a sua correta aplicação. Após estas etapas foi possível avançar o projeto nos ensaios *in vitro* com células U20S. Os quais permitem as seguintes conclusões:

- A adição de surfactante gerou um aumento no valor da rugosidade das superfícies, as quais demonstraram serem substratos em potencial para a adesão e proliferação celular;
- A amostra que apresentou células com maior valor de espraiamento e a presença de fibras actinas foi a composição PCL/ac oleico;
- Com base nos resultados de topografia e hidrofílicidade frente ao ensaio *in vitro* com U20S a composição PCL/ ac oleico/ HA tende a ser promissora em ensaios futuros;

Estudos com células tronco oferecem importantes perspectivas sobre possibilidades e desafios. Fatores de indução com estratégias de adesão celular indicam um grande potencial na área de engenharia tecidual, na reconstrução de tecidos utilizando biomateriais os quais possuem um papel essencial na etapa de reconstrução. As principais conclusões dessa etapa foram:

- Após análises de morfologia utilizando microscópio confocal, avaliação do fenótipo pela citometria de fluxo, citogenética e a atividade da telomerase, foi possível afirmar que o isolamento e expansão das células mesenquimais do tecido adiposo foi adequada;

- As amostras porosas apresentaram células mais espraçadas nas superfícies analisadas pelo MEV;

- O grupo PCL e PCL com ácido oleico (poroso) apresentaram diferenças entre os valores de deposição de cálcio nos períodos 14 e 21 dias;

- Amostras com HA resultaram em uma redução no perímetro das células- MEV e na coloração de deposição de cálcio devido possivelmente a dissolução e interação com os ions dessa cerâmica.

Quando se almeja um biomaterial com interação com célula tronco, a influência na resposta *in vivo* faz com que alguns fatores sejam avaliados, topografia da superfície, a qual idealmente devera incentivar a adesão e diferenciação; resistência mecânica a compressão e tração, devendo ser mais próximo à realidade; hidroflicidade do material, objetivando uma superfície atrativa para a interação célula-material; tempo de degradação, com a meta de degradar de acordo com a neoformação tecidual. Estas características permitem qualificar o potencial do biomaterial para o uso na engenharia tecidual óssea.

### **Sugestões para trabalhos futuros**

Investigações da redução da viabilidade celular nas amostras com hidroxiapatita;

Ensaio *in vitro* com as amostras 3D;

Ensaio *in vivo* para futura aplicação comercial das composições.

## Referências

- Amass, W., Amass, A. e Tigue, B. 1998.** A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. *Polymer International*. 1998, Vol. 47, pp. 89-144.
- American Academy of Orthopaedic Surgeons. 2012.** www.orthoinfo.org. [Online] 2012. [Citado em: 1 de 12 de 2012.]
- Bakar, A., Cheang, P. e Khor, K.A. 2003.** Tensile properties and microstructural analysis of spheroidized hydroxyapatite - poly (etheretherketone) biocomposites. *Materials Science and Engineering*. A345, 2003, pp. 55-63.
- Barry, FP e Murphy, JM. 2004.** Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004, Vol. 36, pp. 568-584.
- Barth, E., Ronningen, H. e Solheim, L.F. 1988.** Tissue reactions to ceramics and glass ceramics. *Acta Orthopaedica Scandinava*. 1988, Vol. 59, pp. 219-220.
- Boesel, L.F. e Reis, R.L. 2008.** A review on the polymer properties of hydrophilic, partially degradable and bioactive acrylic cements (HDBC). *Progress in polymer science*. 2008, Vol. 33, 2, pp. 180-190.
- Bozkurt, S. B. 1995.** The Densification and Sintering Behavior of Molten Salt Synthesized HA Whiskers/HA composites. *Izmir Institute of Technology*. 1995.
- Brown, S. A., et al. 2010.** Basic Science Review on Adipose Tissue for Clinicians. *American Society of Plastic Surgeons*. 2010, Vol. 126, 6.
- Bydlowski, Sergio P., et al. 2009.** Características Biológicas das Células-tronco Mesenquimais. *Revista Brasileira de hematologia e hemoterapia*. 2009, Vol. 31, pp. 25-35.
- Callister, W.D. 2006.** *Fundamentos da ciência e engenharia de materiais*. 2. s.l. : LTC, 2006.
- Cardoso, G.B.C. e Arruda, A.C.F. 2009.** O papel das células tronco na engenharia tecidual. *Ciências & Congnição*. 2009, Vol. 14, 3, pp. 214-219.
- Cardoso, G.B.C., Zavaglia, C.A.C. e Arruda, A.C.F. 2010.** Apatite formation on polycaprolactone/ hydroxyapatite whiskers scaffolds. *Memorias V Congresso Internacional de Biomateriales*. 2010.
- Carrodeguas, R.G., et al. 2008.** New approach to the b-a polymorphic transformation in magnesium substituted tricalcium phosphate and its practical implications. *Journal of the american ceramic society*. 2008, Vol. 91, 4.

**Casteilla, L, Planat-Benard , V e Cousin, B. 2005.** Plasticity of adipose tissue: a promising therapeutic avenue in the treatment of cardiovascular and blood diseases? *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2005, Vol. 98, pp. 922-926.

**Castro-Malaspina, H, Gay , RE e Resnick, G. 1980.** Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood.* 1980, Vol. 56, pp. 289-301.

**Chamberlain , G, et al. 2007.** Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007, Vol. 25, pp. 2739-2749.

**Cheng, Ziyuan e Teoh, Swee-Hin. 2004.** Surface modification of ultra thin poly (ε-caprolactone) films using acrylic acid and collagen. *Biomaterials.* 2004, Vol. 25, pp. 1991-2001.

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

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

**Constantino, P.D. e Freidman, C.D. 1994.** Synthetic bone graft substitutes. *Otolaryngol Clin. North Am.* 27, 1994, pp. 1037-1073.

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

**Cummings, Michael R. 2006.** Cytogenetics: Karyotypes and chromosome aberrations. [A. do livro] Michael R. Cummings. *Human Heredity: Principles and issues.* 2006, pp. 128-131.

**Dalby, M.J., et al. 2007.** The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nat Mater.* 2007, Vol. 6, pp. 997-1003.

**Discher, D.E., Mooney, D.J. e Zandstra, P.W. 2009.** Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science.* 2009, Vol. 324, pp. 1673-1677.

**Discher, Dennis E., Janmey, Paul e Wang, Yu-li. 2005.** Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate. *Science.* 18, 2005, Vol. 310, pp. 1139-1144.

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

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

**Dr. Shay e Dr. Wright's .**  
[http://www4.utsouthwestern.edu/cellbio/shaywright/research/sw\\_research.html#cancer](http://www4.utsouthwestern.edu/cellbio/shaywright/research/sw_research.html#cancer). *Shay / Wright Laboratory.* [Online]

- Duarte, L.S. e Schaeffer, L. 2000.** Comparação da resistência à compressão de ossos bovinos congelados e liofilizados. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*. 2000, Vol. 16, 2, pp. 89-93.
- Duek, E.A.R., Zavaglia, C.A.C e Belangero, W.D. 1999.** In vitro study of poly(lactic acid) pin degradation. *Polymer*. 1999, Vol. 40, pp. 6465-6473.
- Elst, M van der. 1996.** The burst phenomenon, an animal model simulating the long-term tissue response on PLLA interlocking nails. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1996, Vol. 30, pp. 139-143.
- Ergun , A, et al. 2012.** Unitary bioresorbable cage/core bone graft substitutes for spinal arthrodesis coextruded from polycaprolactone biocomposites. *Ann Biomed Eng*. 40, 2012, Vol. 5, pp. 1073-87.
- Espigares, I., et al. 2002.** New partially degradable and bioactive acrylic bone cements based on starch blends and ceramics fillers. *Biomaterials*. 2002, Vol. 23, 8, pp. 1883-1895.
- Friedenstein , A.J. 1980.** Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Haematol Blood Transfus*. 1980, Vol. 25, pp. 19-29.
- Gestí, Sebastià, et al. 2004.** Molecular packing and crystalline morphologies of biodegradable poly(alkylene dicarboxylate)s derived from 1,6-hexanediol. *Polymers*. 2004, Vol. 45, pp. 8845-8861.
- Gnecchi , M, He , H e Noiseux, N. 2006.** Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *Faseb J*. 2006, Vol. 20, pp. 661-669.
- Goldstein, A.S., et al. 1999.** Effect of osteoblastic culture conditions on the structure of poly(DL-Lactic-co-Glycolic Acid) foam scaffolds. *Tissue Eng*. 1999, Vol. 5, 5, pp. 421-433.
- Good, R.J. 1993.** Contact angle, wetting, and adhesion: A critical review. [A. do livro] KL Mittal. *Contact Angle, Wettability and Adhesion*. s.l. : Utrecht: VSP, 1993, pp. 3-36.
- Grayson, W.L., et al. 2008.** Engineering custom-designed osteochondral tissue grafts. *Trends Biotechnol*. 2008, Vol. 26, pp. 181-189.
- Gregory, CA, et al. 2004.** An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem*. 329, 2004, Vol. 1, pp. 77-84.
- Guarino, V, Causa, F e Ambrosio, L. 2007.** Bioactive scaffolds for connective tissue regeneration. *Expert Rev. Med. Devices*. 4, 2007, Vol. 3, pp. 405-418.
- Hae-Won, Kim. 2007.** Biomedical nanocomposites of hydroxyapatite/polycaprolactone obtained by surfactant mediation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2007, pp. 169-177.

- Hao, J, et al. 2003.** Investigation of nanocomposites based on semi-interpenetrating network of [L- poly(e-caprolactone)]/[net-poly (e-caprolactone)] and hydroxyapatite nanocrystals. *Biomaterials*. 2003, Vol. 24, pp. 1531-1539.
- Harris, L.D, Kim, B. e Mooney, D.J. 1998.** Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1998, Vol. 42, pp. 396-402.
- Harris, C T e Cooper, L F. 2004.** Comparison of bone graft matrices for human mesenchymal stem cell-directed osteogenesis. *J Biomedical Materials Research*. 2004, Vol. 68, pp. 747-755.
- Hench, L.L e Wilson, J. 1993.** Introduction to bioceramics. Singapore : Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, 1993, pp. 1-15.
- Heo, S. J., et al. 2009.** In vitro and animal study of novel nano-hydroxyapatite/poly (epsilon-caprolactone) composite scaffolds fabricated by layer manufacturing process. *Tissue Engineering A*. 2009, Vol. 15, pp. 977-989.
- Hirschmugl, C.J. 2002.** Frontiers in infrared spectroscopy at surfaces and interfaces. *Surface Science*. 2002, Vol. 500, pp. 577-604.
- Hsu, Hui-Ju, et al. 2010.** Stretch-induced stress fiber remodeling and the activations of JNK and ERK depend on mechanical strain rate, but not FAK. *Plos One*. 2010, Vol. 5, 8, pp. 1-12.
- Hutmacher, D.W. 2000.** Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 2000, Vol. 21, pp. 2529-2543.
- Hutmacher, D.W., Goh, J.C. e Teoh, S.H. 2001.** An introduction to biodegradable materials for tissue engineering applications. *Ann Acad Med*. 2001, Vol. 30, pp. 183-191.
- Hutmacher, D.W., Sittinger, M. e Risbud, M.V. 2004.** Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends Biotechnology*. 2004, Vol. 22, pp. 354-362.
- Ingber, D.E., et al. 2006.** Tissue engineering and developmental biology: going biomimetic. *Tissue Eng*. 2006, Vol. 12, pp. 3265-3283.
- ISO. 2009.** *ISO Biological Evaluation of Medical Devices*. 2009. ISO 10993.
- Jackson, K.A., et al. 2002.** Stem-cells : a mini-review. *J. Cell biochem*. 2002, pp. 1-6.
- Jones, T, et al. 2002.** Optimization of living ring-opening polymerization of caprolactone. 2002, p. 3.
- Junqueira, L.C e Carneiro, J. 1999.** *Histologia Básica*. 1999.
- Kaigler, D e Mooney, D. 2001.** Tissue engineering's impact on dentistry. *J Dent Educ*. 2001, Vol. 65, 5, pp. 456-462.
- Kanzaki, N, et al. 2000.** *J Phys Chem*. 2000, Vol. 104, p. 4189.

- Karger, S. 1995.** *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1995)*. [ed.] Felix Miltelman. 1995.
- Kawachi, E.Y., et al. 2000.** Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Química Nova*. 23, 2000, Vol. 4, pp. 518-522.
- Kern, S, et al. 2006.** Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006, Vol. 24, pp. 1294-1301.
- Kilpadi, DV e Lemons, JE. 1994.** Surface-energy characterization of unalloyed titanium implants. *J Biomed Mater Res*. 1994, Vol. 28, pp. 1419–1425.
- Kim, H. W., Knowles, J. C. e Kim, H. E. 2004.** Hydroxyapatite/poly(e-caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. *Biomaterials*. 2004, Vol. 25, pp. 1279-1287.
- Kim, N. W., et al. 1994.** Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Cells and Cancer. *SCIENCE*. 1994, Vol. 266, pp. 2011-2015.
- Koboki, Y, Jin, Q. e Takita, H. 2001.** Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis. *J. Bone Joint Surg*. 2001, Vol. 83, 2, pp. 105-115.
- Kokubo, T e Takadama, H. 2006.** How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity. *Biomaterials*. 2006, Vol. 27, pp. 2907- 2915.
- Kokubo, T, Kim, HM e Kawashita, M. 2003.** Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*. 2003, Vol. 24, pp. 2161-2175.
- Kokubo, T. e Takadama, H. 2006.** How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity. *Biomaterials*. 2006, Vol. 27, pp. 2907-2915.
- Kolft, Catherine M., Cho, Elizabeth e Tuan, Rocky S. 2007.** Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research & Therapy*. 2007, Vol. 9, p. 204 .
- Kreider, J.M. e Steven, A.G. 2009.** Trabecular bone mechanical properties in patients with fragility fractures. *Clin Orthop relat res*. 2009, pp. 11955-1963.
- Kuckh, T.T., et al. 2010.** Osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells on poly (caprolactone) nanofiber scaffolds. *Acta Biomaterialia*. 2010, Vol. 6, pp. 2949-2959.
- Lam, CX, et al. 2008 .** Dynamics of in vitro polymer degradation of polycaprolactone-based scaffolds: accelerated versus simulated physiological conditions. *Biomed Mater*. 3, 2008 , Vol. 3.
- Langer, R e Vacanti, J.P. 1993.** Tissue engineering. *Science*. 1993, Vol. 260, 5110, pp. 920-960.
- Layrolle, P. e Daculsi, G. 2009.** Physicochemistry of apatite and its related calcium phosphates. [A. do livro] B. Leon e J.A. Jansen. *Thin calcium phosphate coatings for medical implants*. 2009, pp. 9-25.

- Le Geros, R.Z. 1991.** *Calcium phosphates in oral biology and medicine.* São Francisco. : Meyers, 1991.
- Li, L., et al. 2009.** Apatite formation on poly (vinyl alcohol)- coated poly (caprolactone) films by incubation in simulated body fluids. *Applied Surface Science.* 2009, Vol. 255, pp. 7734-7738.
- Lucas, E.F., Soares, B.G. e Monteiro, E. 2001.** *Caracterização de Polímeros- Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica.* [ed.] E-paper. 2001.
- Mariani, P.D.S.C. 2005.** *Estudo da biodegradação da blenda de poli caprolactona e amido modificado em meios sólido e líquido.* Faculdade de Engenharia Química. Campinas : Dissertação, 2005.
- Mathieu, Pattie S. e Loba, Elizabeth G. 2012.** Cytoskeletal and Focal Adhesion Influences on Mesenchymal Stem Cell Shape, Mechanical Properties, and Differentiation Down Osteogenic, Adipogenic, and Chondrogenic Pathways. *Tissue Engineering:Part B.* 6, 2012, Vol. 18, pp. 436-444.
- Mayer, I, Schlam, R e Featherstone, FDB. 1997.** *J of Inorg Bioch.* 1997, Vol. 66, p. 1.
- McBeath, R., et al. 2004.** Cell SHAE, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev. Cell.* 2004, Vol. 6, pp. 483–495.
- Middleton, JC e Tipton, AJ. 2000.** Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials.* 2000, Vol. 21, pp. 2335-2346.
- Mikos , A.G, et al. 1996.** *Polymer membranes and methods of preparation of three dimensional membrane structures.* 5514378 US, 7 de May de 1996. US Patent.
- Mikos, A.G, et al. 1996.** *Polymer Membranes and Methods of Preparation of Three Dimensional Membrane Structures.* US Patent, 5514378 7 de Maio de 1996.
- Mikos, A.G, et al. 1993.** Prevascularization of porous biodegradable polymers. *Biotechnology and Bioengineering.* 1993, Vol. 42, pp. 716-723.
- Mikos, A.G., et al. 2006.** Engineering complex tissues. *Tissue Engineering.* 2006, Vol. 12, 12, pp. 3307-3339.
- Mooney, DJ, et al. 1992.** Principles of tissue engineering and reconstruction using polymer-cell constructs. *Mater Res Soc Symp Proc.* 1992, Vol. 52, pp. 252-345.
- Morrison, S., et al. 1999.** Prospective identification, isolation by flow cytometry, and i vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell.* 1999, Vol. 96, pp. 737-749.
- Motisque, M., Carrodeguas, R. G. e Zavaglia, C.A. C. 2008.** Mg-Free Precursors for the synthesis of Pure Phase Si-Doped  $\alpha$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. *Engineering Materials.* 2008, Vols. 361-363, pp. 199- 202.
- Mueller, M. 2001.** *Fundamentals of quantum chemistry: molecular spectroscopy and modern electronic structure computations.* s.l. : Kluwer publishers, 2001.

- Murphy, M.B. e Mikos, A.G. 2011.** Polymer scaffold fabrication. [A. do livro] Lanza, Langer e Vacanti. *Principles of tissue engineering*. 2011, pp. 309-321.
- Nasef , A, Ashammakhi , N e Fouillard , L. 2008.** Immunomodulatory effect of mesenchymal stromal cells: possible mechanisms. *Regen Med*. 2008, Vol. 3, pp. 531-546.
- Natta, G. 1958.** Stereospecific polymerizations by means of coordinated anionic catalysis: Introductory Lecture. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*. 1958, Vol. 8, pp. 589-611.
- O'Connor , Timothy P. e Crystal, Ronald G. . 2006.** Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. *Nature reviews*. 2006, Vol. 7, pp. 261-276.
- Oedayrajsingh-Varma , MJ, Van Ham , SM e Knippenberg , M. 2006.** Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy*. 2006, Vol. 8, pp. 166-177.
- Oh, S., et al. 2009.** Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009, Vol. 106, pp. 2130-2135.
- Oréface, R.L, Pereira, M.M. e Mansur, H.S. 2006.** *Biomateriais: fundamentos e aplicações*. s.l. : Cultura médica, 2006.
- Ota, Y., et al. 1998.** Novel preparation method of hydroxyapatite fibers. *J. Am. Ceram. Soc.* 1998, Vol. 81, 6, pp. 1665-1668.
- Ozkan, S, Kalyon, D.M. e Yu, X. 2010.** Functionally graded b-TCP/PCL nanocomposite scaffolds: In vitro evaluation with human fetal osteoblast cells for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 3, 2010, Vol. 92A, pp. 1007-1018.
- Park, J e Lakes, R.S. 2007.** *Biomaterials: An Introduction*. 2007.
- Park, S.A., Lee, A.H. e Kim, W.D. 2011.** Fabrication of porous polycaprolactone/hydroxyapatite (PCL/HA) blend scaffolds using a 3D plotting system for bone tissue engineering. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2011, Vol. 34, pp. 505-513.
- Passos, Henrique A. . 2003.** Telômeros, Telomerase e Câncer. *Revista Faculdade de Ciências Médica de Sorocaba*. 2003, Vol. 5, pp. 54-59.
- Patist, C.M., et al. 2004.** Freeze-dried poly(D,L-lactic acid) macroporous guidance scaffolds impregnated with brain-derived neurotrophic factor in the transected adult rat thoracic spinal cord. *Biomaterials*. 2004, Vol. 25, pp. 1569-1582.
- Peterson, L.J., et al. 1942.** *Cirurgia oral e maxilofacial contemporânea*. s.l. : Elsevier, 1942.
- Peterson, L.J., et al. 1942.** *Cirurgia oral e maxilofacial contemporânea*. s.l. : Elsevier, 1942.
- Pezzin, A.P.T. e Duek, E.A.R. 2002.** Hydrolytic degradation of poly(para-dioxanone) prepared by casting or phase separation. *Polymer Degradation and Stability*. 2002, Vol. 78, pp. 405-411.

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

**Pittenger, MF, Mackay , AM e Beck , SC. 1999.** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999, Vol. 284, pp. 143-147.

**Polini, Alessandro, et al. 2011.** Osteoinduction of Human Mesenchymal Stem Cells by Bioactive Composite Scaffolds without Supplemental Osteogenic Growth Factors. *Journal Bone*. 10, 2011, Vol. 6, pp. 1-8.

**Quere , D. 2008.** Wetting and roughness. *Ann Rev Mater Res*. 2008, Vol. 38, pp. 71–99.

**Radisic, M., et al. 2004.** Funcional assembly of engineering myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds. *Proc. Natl. Acad Sci*. 2004, Vol. 101, pp. 18129-18134.

**Ramos, S.L.F, Motisuke, M. e Zavaglia, C.A.C. 2008.** Whiskers-like silicon doped hydroxyapatite synthesis by hydrolysis of silicon doped [alfa]-tcp. *Engineering Materials*. 2008, Vols. 396-398, pp. 501-503.

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

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

**Ratner, B.D., et al. 2004.** Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine. *Elsevier Academic Press*. 2, 2004.

**Raucci, M.G., et al. 2010.** Biomineralized porous composite scaffolds prepared by chemical synthesis for bone tissue regeneration. *Acta Biomaterials*. 2010, Vol. 6, pp. 4090-4099.

**Rego, Pedro Bordeaux e Saad, Sara Teresinha Olalla. 2011.** Diferenciação condrogênica de células-tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo utilizando colágeno do tipo II como suporte para reparo cartilaginoso. *Dissertação de mestrado* . Campinas : Universidade Estadual de Campinas, 2011.

**Reid, J.W., et al. 2006.** Synthesis and Characterization of single-phase silicon substituted [alfa]- tricalcium phosphate. *Biomaterials*. 2006, Vol. 27.

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

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

**Rivera, J.A, et al. 2004.** Injertos óseos-Nueva alternative. Fase III. Obtención, caracterización y evaluación de hidroxiapatita sintética y el compuesto de hidroxiapatita sintética porosa-

Proteínas morfogenéticas óseas en un modelo experimental Lapino. *Rev Col Cienc Pec.* 2004, Vol. 17, 1, pp. 20-28.

**Rodrigues, M.E.S. 2003.** *Análise do risco de fratura óssea por ultrasonometria e ensaio mecânico de compressão.* Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos- Universidade de São Paulo. : Dissertação (Mestrado), 2003.

**Saiz, Eduardo , et al. 2012.** Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering. *Dental Materials.* 2012, pp. 1-13.

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

**Salerno, A. , et al. 2011.** Processing/Structure/Property Relationship of and PCL–HA Composite Scaffolds Prepared via Gas Foaming and NaCl Reverse. *Biotechnology and Bioengineering.* 2011, Vol. 108, 4, pp. 963-976.

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

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

**Sasmazel, Hilal Turkoglu. 2011.** Novel hybrid scaffolds for the cultivation of osteoblast cells. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2011, Vol. 49, pp. 838-846.

**Schaffler , A e Buchler, C. 2007.** Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells.* 25, 2007, pp. 818-827.

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

**Shaffer, L., McGowan- Jordan, Jean e Schmid, Michael. 2013.** *ISCN An international system for human cytogenetic nomenclature.* s.l. : KARGER, 2013. Cat. N° SCR108.

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

**Smith, I.O., et al. 2009.** Nano-structured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Rev. Nanomed Nanobiotechnol.* 2009, Vol. 2, pp. 226-236.

**Stein , G.S. e Lian , J.B. 1993.** Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrine Rev.* 1993, Vol. 14, pp. 424–442.

**Stemple, D.L. e Anderson, D.J. 1992.** Isolation of stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell.* 1992, Vol. 71, pp. 973-985.

- Suchanek, W, et al. 1997.** Hydroxyapatite/hydroxyapatite- Whisker composites without sintering additives: mechanical properties and microstructural evolution. *Journal of the american ceramic society.* 1997, Vol. 80, 11, pp. 2805-2813.
- Suchanek, W., Yaashima, M. e Kakihana, M. 1997.** Hydroxyapatite/hydroxyapatite-whiskers composition without sintering additives: mechanical properties and microstructure evolution. *J. Am. Ceram. Soc.* 80, 1997, pp. 2805-2813.
- Supova, M. 2009.** Problem of hydroxyapatite dispersion in polymer matrices: a review. *J Mater Sci: Mater Med.* 2009, Vol. 20, pp. 1201-1213.
- Tandon, N., et al. 2009.** Electrical stimulation systems for cartiac tissue engineering. *Nat. Protoc.* 2009, Vol. 4, pp. 155-173.
- Tollon, M.H. 2005.** *Fabrication of coated biodegradable polymer scaffolds and their effects on murine embryonic stem cells.* s.l. : University of Florida, dissertação (mestrado), 2005.
- Tondon, Abhishek, Hsu, Hui-Ju e Kaunas, Roland. 2012.** Dependence of cyclic stretch-induced stress fiber reorientation on stretch waveform. *Journal of Biomechanics.* 2012, Vol. 45, pp. 728-735.
- Vallespir, G.P. 2001.** *Clavos de fijación externa recubiertos de hidroxiapatita. Estudio clínico en alargamientos de extremidades.* Departamento de cirurgia, Universitat autònoma de Barcelona, UAB. 2001. p. 388, Tese de doutorado.
- Vallet-Regi, M. e González- Calbet, J.M. 2004.** Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Progress in solid state chemistry.* 2004, Vol. 32.
- Van Vlack, L.H. 1973.** Propriedades dos materiais cerâmicos. [A. do livro] Edgard Blucher. 7. São paulo : s.n., 1973, pp. 55-67.
- Varghese, S. e Elisseff, J.H. 2006.** Hydrogels for musculoskeletal tissue engineering. *Polymers for regenerative medicine.* 2006, Vol. 203, pp. 95-144.
- Vert, M, et al. 1993.** Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *Journal of Materials Science.* 1993, Vol. 3, pp. 432-436.
- Vunjak-Novakovic, G., et al. 2004.** Tissue engineering of ligaments. *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 2004, Vol. 6, pp. 131-156.
- Wagner , W, Wein, F e Seckinger, A. 2005.** Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol.* 2005, Vol. 33, pp. 1402-1416.
- Webster, T.J., et al. 2000.** Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials.* 2000, Vol. 21, pp. 1803-1810.
- Widmer, M.S., et al. 1998.** Manufacture of porous biodegradable polymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration. *Biomaterials.* 19, 1998, pp. 1945-1955.
- Wikipédia. 15/01/2013.** <http://pt.wikipedia.org/wiki/Actina>. [Wikipédia] 15/01/2013.

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

**Xu, H.H.K., Zhao, L. e Weir, M.D. 2010.** Stem cell-calcium phosphate constructs for bone engineering. *Journal of Dental Research.* 2010, Vol. 89, 12, pp. 1482-1488.

**Zein, I., et al. 2002.** Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials.* 23, 2002, p. 2002.

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

# ANEXO I- Adendo ao projeto de pesquisa “Diferenciação de células tronco obtidas de tecido adiposo (ADSC) em condrócitos utilizando colágeno do tipo II como suporte para reparo cartilaginoso”.



CEP: 22/06/10.  
(PARECER CEP: N° 838/2008)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

## PARECER

### I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO OBTIDAS DE TECIDO ADIPOSE (ADSC) EM CONDRÓCITOS UTILIZANDO COLÁGENO DO TIPO II COMO SUPORTE PARA REPARO CARTILAGINOSO”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sara Terezinha Olalla Saad

### II - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o adendo que inclui o projeto “DESENVOLVIMENTO DE UMA MATRIZ TRIDIMENSIONAL DE POLI (ε-CAPROLACTONA) COM CERÂMICA BIOATIVA PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA TECIDUAL”, com finalidade de doutorado da aluna Guinea Brasil Camargo Cardoso, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

### III - DATA DA REUNIÃO.

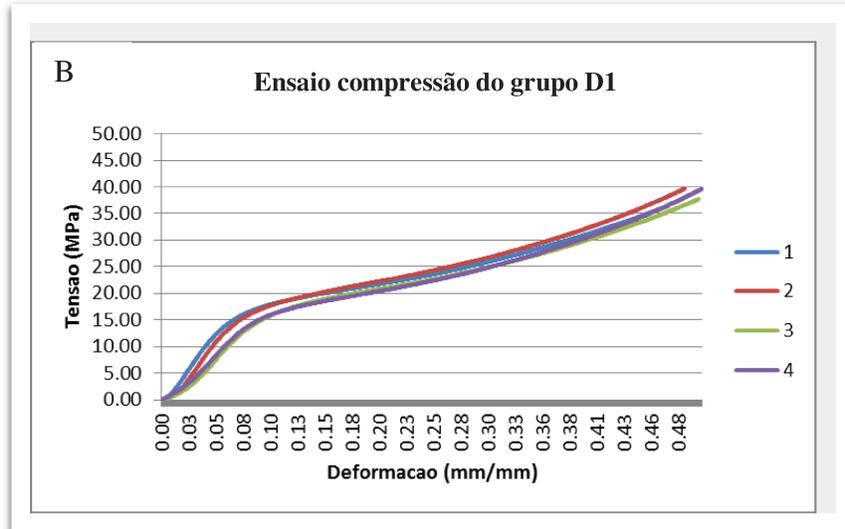
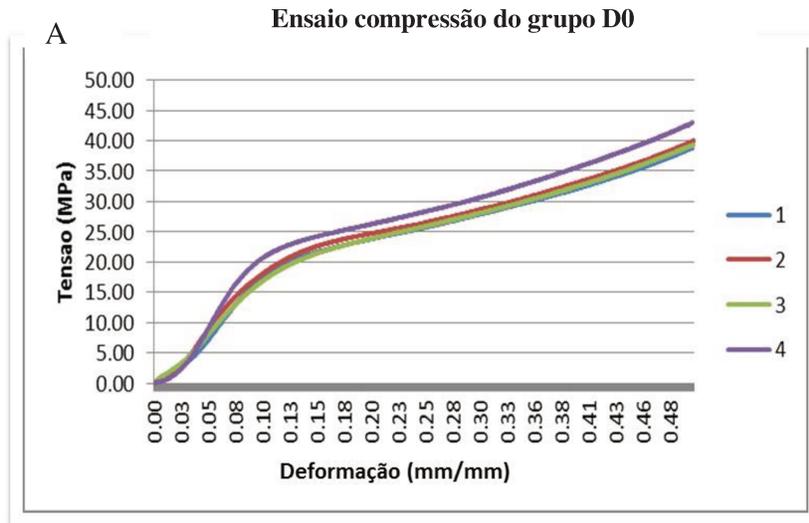
Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de junho de 2010.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner  
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13083-887 Campinas - SP

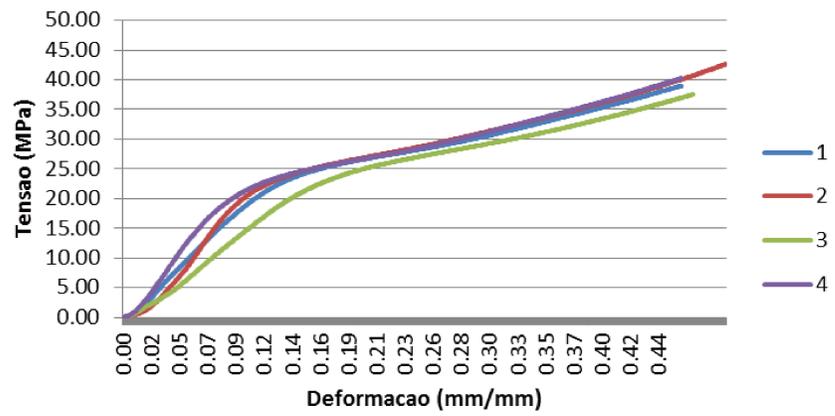
FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187

**ANEXO II- Curva tensão por deformação dos diferentes grupos: A-D0; B-D1; C-D2; D-D3; E-D4. Cada grupo possui 4 amostras de replicações.**



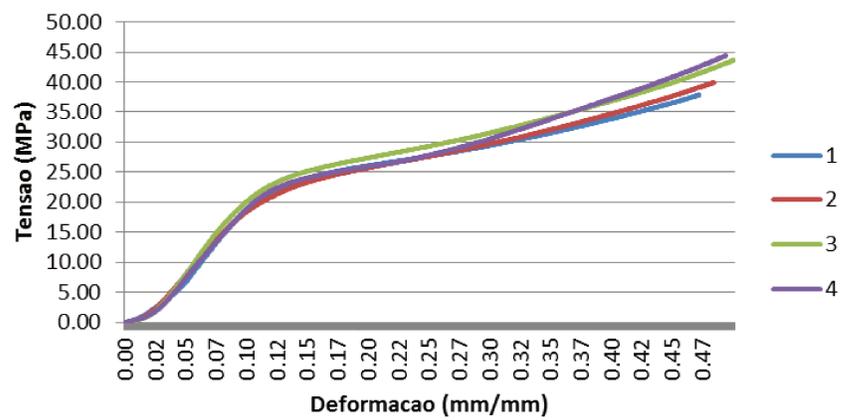
C

### Ensaio de compressão do grupo D2



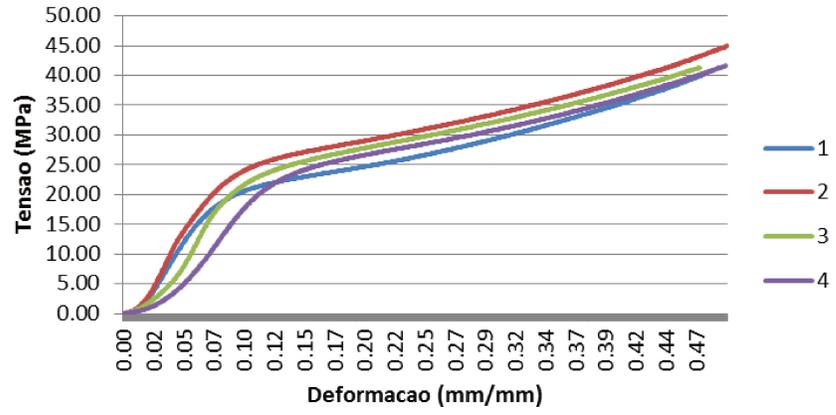
D

### Ensaio de compressão do grupo D3



E

### Ensaio de compressão do grupo D4



### ANEXO III- Curva tensão por deformação dos diferentes grupos de amostras porosas (A-P1; B-P2; C-P3; D-P4).

