



**LAURA CAETANO ESCOBAR DA SILVA**

**MEMBRANAS ASSIMÉTRICAS DE POLI( $\epsilon$ -CAPROLACTONA) COM  
SUPERFÍCIES MODIFICADAS PELO CRESCIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO**

**CAMPINAS**

**2014**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**LAURA CAETANO ESCOBAR DA SILVA**

**MEMBRANAS ASSIMÉTRICAS DE POLI( $\epsilon$ -CAPROLACTONA) COM  
SUPERFÍCIES MODIFICADAS PELO CRESCIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO**

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MARIA DO CARMO GONÇALVES**

**CO-ORIENTADOR: PROF. DR. CELSO APARECIDO BERTRAN**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA  
AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRA EM QUÍMICA  
NA ÁREA DE FÍSICO-QUÍMICA.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR  
LAURA CAETANO ESCOBAR DA SILVA, E ORIENTADA PELA PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MARIA DO CARMO  
GONÇALVES.**

---

**Assinatura da orientadora**

**CAMPINAS**

**2014**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Química  
Simone Lucas Gonçalves de Oliveira - CRB 8/8144

Si38m Silva, Laura Caetano Escobar da, 1987-  
Membranas assimétricas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) com superfícies modificadas pelo crescimento de fosfato de cálcio / Laura Caetano Escobar da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Maria do Carmo Gonçalves.  
Coorientador: Celso Aparecido Bertran.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Poli( $\epsilon$ -caprolactona). 2. Fosfato de cálcio. 3. Membrana. 4. Biomaterial. 5. Imersão sequencial. I. Gonçalves, Maria do Carmo. II. Bertran, Celso Aparecido. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Asymmetric poli( $\epsilon$ -caprolactone) membranes with surfaces modified by calcium phosphate growth

**Palavras-chave em inglês:**

Poli( $\epsilon$ -caprolactone)

Calcium phosphate

Membrane

Biomaterial

Alternating soaking

**Área de concentração:** Físico-Química

**Titulação:** Mestra em Química na área de Físico-Química

**Banca examinadora:**

Maria do Carmo Gonçalves [Orientador]

Eliana Aparecida de Rezende Duek

Marcelo Ganzarolli de Oliveira

**Data de defesa:** 19-02-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Química



Aos meus pais, Lúcia e Aristeu, por me ensinarem a importância do estudo e por acreditarem em mim sempre. À minha irmã, Luisa, pelo carinho e incentivo.



“Gentileza gera gentileza”  
José Dadrino – o profeta gentileza



## **Agradecimentos**

À professora Carminha por todas as oportunidades, pela orientação, pelo aprendizado diário e principalmente pela amizade e carinho.

Ao professor Bertran, pela verdadeira co-orientação, desde a concepção do projeto, pelas risadas, pelo incentivo e pelo eterno otimismo.

Aos meus pais, Lúcia e Aristeu, minha irmã, Luisa, meus tios, Vera, Zig, Lúcia e Carlinhos, e também à minha prima Débora pelo apoio e amor incondicional.

Aos técnicos: Fabiana Amorim, Daniel Razzo, Cíntia Massae, Douglas Soares e Renan Gadioli pelas conversas e pelo tempo que dedicaram a mim em todos os treinamentos e análises.

Aos meus mais caros amigos: Vanessa, Priscilla, Késia, Gabi, Japinha, Humanas, Guilherme, Akaishi, Rei, Sebastian, Nati, Nataly e Marcela por estarem sempre por perto, torcendo por mim, mesmo quando eu estive distante.

À Bruna Antunes Más e a Prof<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Duek não só pelos ensaios de viabilidade celular, mas principalmente por toda a paciência, pelas discussões e explicações durante o processo. Aprendi muito com vocês.

À Márcia Fávoro por me iniciar na vida acadêmica e me mostrar o caminho das pedras, sempre com muito carinho e atenção.

Aos professores Maria Isabel Felisberti e Marco Aurélio De Paoli pela convivência e por tudo que nos ensinam nas reuniões de grupo.

Aos colegas do laboratório I-114: Lívia, Rose, Rufino, Marcelo, Lili Leite, Lili Battirola, Ana Paula, Trinca, Paula, Patrícia, Luiz Guilherme, Igor, Lucas, Helton, Mamute e Marcinha pela convivência, paciência, e por todas as conversas.

Ao instituto de química, não só pela infra-estrutura, mas por ter sido minha segunda casa nos últimos 9 anos.

Finalmente, à CAPES, à FAPESP, e ao CNPq pelo financiamento.



## Curriculum Vitae

### 1. Dados pessoais

Nome: Laura Caetano Escobar da Silva

Nascimento: 09/11/1987

e-mail: [laucaetano@gmail.com](mailto:laucaetano@gmail.com)

### 2. Formação acadêmica

- **Mestrado em físico-química, 2014**

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

**Título:** Membranas assimétricas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) modificadas em sua superfície pelo crescimento de fosfato de cálcio

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Carmo Gonçalves

**Co-orientador:** Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran

- **Bacharelado em química, modalidade tecnológica, 2012**

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

- **Bacharelado em química, 2012**

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

### 3. Publicações em anais de congresso

- Silva, L. C. E.; Bertran, C. A.; Gonçalves M. C.; **New polycaprolactone based membranes for guided bone regeneration**, III Euro Bio-inspired Materials, 2014, Potsdam – Alemanha.
- Silva, L. C. E.; Bertran, C. A.; Gonçalves M. C.; **Surface morphology of polycaprolactone membranes containing calcium phosphate particles**, XXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, CSBMM, 2013, Caxambú – Brasil.
- Silva, L. C. E.; Bertran, C. A.; Gonçalves M. C.; **Novos biomateriais baseados em policaprolactona e partículas de fosfato de cálcio**

**impregnadas na superfície**, 12º Congresso Brasileiro de Polímeros, CBPol, 2013, Florianópolis – Brasil.

- Silva, L. C. E.; Bertran, C. A.; Gonçalves M. C.; **Poly(caprolactone) asymmetric membranes impregnated with calcium phosphate particles**, **European Polymer Congress**, EPF, 2013, Pisa – Itália.
- Silva, L. C. E.; de Farias, M. A.; Gonçalves M. C.; **Rheological behaviour of nanofluids containing poly(vinyl pyrrolidone) adsorbed silica**, European Polymer Congress, EPF, 2013, Pisa – Itália.

#### **4. Artigos Publicados**

- Ferrarezzi, M. M. F.; Taipina, M. O.; Silva, L. C. E.; Gonçalves, M. C.; **Poly(ethylene glycol) as a compatibilizer for poly(lactic acid)/thermoplastic starch blends**, Journal of polymers and the environment, 21 (1), 2013, 151-159.

#### **5. Demais atividades relacionadas**

##### **Curso de microscopia eletrônica de transmissão (V Curso TEM)**

Organizado pelo grupo microscopia eletrônica (LME) do laboratório nacional de nanotecnologia (LNNano), no período de 06 a 23 de janeiro de 2014, no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas – Brasil.

##### **Programa de Estágio Docente (PED)**

Participação no programa de estágio docente no período de agosto a dezembro de 2013, na disciplina química aplicada (QF 661), sob supervisão da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Carmo Gonçalves.

##### **Iniciação científica**

Realizada no período de agosto a dezembro de 2010 na área de físico-química, sob supervisão da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Carmo Gonçalves, com trabalho intitulado: Blendas de poli(ácido láctico) e amido termoplástico – estudo das propriedades mecânicas.

## Resumo

Membranas para regeneração óssea guiada (GBR) são uma nova classe de membranas utilizadas em cirurgias dentárias, que têm a habilidade adicional de induzir o crescimento ósseo. Neste trabalho, foram preparadas membranas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) pelo método de inversão de fases induzida por vapor, que foram modificadas pelo crescimento de fosfato de cálcio em sua superfície, visando obter propriedades de osteoindução, características de membranas GBR. Para promover a modificação de superfície, inicialmente, moléculas aniônicas foram utilizadas como agentes de nucleação, fixando grupos aniônicos na superfície da membrana. Foram avaliados três agentes de nucleação diferentes: ácido esteárico, hidrogenofosfato de bis(2-etilhexila) e hidrogenofosfato de bis(metacrilóioxetila). As membranas foram imersas alternadamente em soluções de nitrato de cálcio e de hidrogenofosfato de diamônio, para que as moléculas aniônicas pudessem atuar como sítios de nucleação e crescimento das partículas de fosfato de cálcio. As propriedades térmicas e mecânicas das membranas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) não foram alteradas pela presença de agente de nucleação ou de fosfato de cálcio na superfície. No entanto, devido à redução da massa molar do polímero na presença de hidrogenofosfato de bis(2-etilhexila) e de hidrogenofosfato de bis(metacrilóioxetila), observou-se um discreto aumento no grau de cristalinidade da PCL nesses casos. Foi possível obter partículas de fosfato de cálcio na superfície das membranas utilizando-se os três agentes de nucleação propostos, no entanto, a morfologia e estrutura cristalina dessas partículas mostraram-se dependentes da estrutura química do agente de nucleação. As membranas contendo ácido esteárico ou hidrogenofosfato de bis(metacrilóioxetila) que foram submetidas ao tratamento superficial por ciclos de imersão sequencial apresentaram o melhor desempenho nos ensaios de biocompatibilidade. A nova metodologia desenvolvida neste trabalho, envolvendo o preparo de membranas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) modificadas superficialmente pelo crescimento de fosfato de cálcio mostrou-se bastante promissora na produção de dispositivos bioreabsorvíveis e osteoindutores com características úteis para aplicação na periodontia.



## Abstract

Guided bone regeneration (GBR) membranes are a new class of membranes for periodontal surgery that have the additional ability of inducing bone formation. The aim of this study was to produce biodegradable GBR membranes based on poly( $\epsilon$ -caprolactone) by vapour induced phase separation whose surfaces were modified by calcium phosphate growth, in order to achieve the osteoinductive properties, a characteristic of GBR membranes. Anionic molecules were used as nucleating agents to promote these surface modifications and were added to the polymeric membranes to generate anionic groups on the surface. Three different nucleating agents were tested: stearic acid, bis(2-ethylhexyl) hydrogenphosphate and bis(-(methacryloyloxyethyl) hydrogenphosphate. The membranes were immersed alternately in calcium nitrate and diammonium hydrogenphosphate solutions so that the anionic molecules could act as nucleating sites for calcium phosphate growth. The thermal and mechanical properties of the poly( $\epsilon$ -caprolactone) membranes did not change in spite of the presence of the nucleating agents nor the calcium phosphate particles on the surface. Nevertheless the crystallinity degree showed a slight increase, due to a decrease in PCL molar mass, in the presence of bis(2-ethylhexyl) hydrogenphosphate and bis(methacryloyloxyethyl) hydrogenphosphate. The calcium phosphate growth on the membrane surface was successfully achieved by using all of the three different nucleating agents, moreover the particle morphology and crystallinity showed a dependence on the nucleating agent chemical structure. The membranes containing stearic acid or bis(methacryloyloxyethyl) hydrogenphosphate that went through the alternating soaking surface treatment showed the best performance on the biocompatibility essays. The new methodology developed in this work for the preparation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) membranes with surfaces modified by calcium phosphate growth has proven to have good potential to produce bioresorbable and osteoinductive devices with useful properties in periodontic applications.



---

<b>Lista de abreviaturas .....</b>	<b>xxi</b>
<b>Lista de tabelas .....</b>	<b>xxv</b>
<b>Lista de Figuras .....</b>	<b>xxvii</b>
<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Membranas biomédicas .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Poli(<math>\epsilon</math>-caprolactona) .....</b>	<b>13</b>
<b>1.3. Características de membranas para periodontia.....</b>	<b>15</b>
<b>1.4. Compatibilidade implante/tecido hospedeiro. ....</b>	<b>20</b>
<b>CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1. Objetivos gerais .....</b>	<b>27</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos.....</b>	<b>27</b>
<b>CAPÍTULO 3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1. Materiais utilizados .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2. Métodos .....</b>	<b>30</b>
3.2.1. Preparações .....	30
3.2.1.1. Preparo das membranas (VIPS) .....	30
3.2.1.2. Tratamento superficial – ciclos de imersão sequencial.....	31
3.2.1.3 Filmes obtidos por <i>spin coating</i> .....	33
3.2.2. Caracterizações.....	34
3.2.2.1. Microscopia laser confocal (LSCM) .....	34
3.2.2.2. Porosidade.....	34
3.2.2.3. Calorimetria diferencial exploratória (DSC).....	36
3.2.2.4. Análise dinâmico-mecânica (DMA) .....	36
3.2.2.5. Ângulo de contato .....	37
3.2.2.6. Microscopia eletrônica de varredura (SEM) .....	38
3.2.2.7. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) .....	38

<b>3.3 Ensaio <i>in vitro</i> .....</b>	<b>39</b>
3.3.1. Degradação hidrolítica .....	39
3.3.2. Mineralização.....	39
3.3.3. Citocompatibilidade.....	40
<b>CAPÍTULO 4 – RESULTADOS PRELIMINARES .....</b>	<b>41</b>
<b>4.1. Evidências da geração de cargas negativas na superfície .....</b>	<b>41</b>
<b>4.2. Otimização do método VIPS .....</b>	<b>48</b>
<b>4.3. Otimização do tratamento superficial .....</b>	<b>56</b>
<b>CAPÍTULO 5 – CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS .....</b>	<b>61</b>
<b>5.1. Caracterizações físico-químicas .....</b>	<b>61</b>
<b>CAPÍTULO 6 – CARACTERIZAÇÕES MORFOLÓGICAS .....</b>	<b>69</b>
<b>6.1. Morfologia das membranas .....</b>	<b>69</b>
<b>6.2. Morfologia do fosfato de cálcio .....</b>	<b>78</b>
<b>CAPÍTULO 7 – AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE.....</b>	<b>83</b>
<b>7.2. Mineralização .....</b>	<b>89</b>
<b>7.3. Viabilidade celular MTT .....</b>	<b>94</b>
<b>CAPÍTULO 8 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>99</b>
<b>8.1 Conclusões.....</b>	<b>99</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>103</b>

## Lista de abreviaturas

- 1,5 SBF** Fluido corpóreo simulado contendo 1,5 vezes as concentrações iônicas convencionais.
- 10 SBF** Fluido corpóreo simulado contendo 10 vezes as concentrações iônicas convencionais.
- 2D** Duas dimensões.
- 3D** Três dimensões.
- $\Delta H_c$**  Variação de entalpia de cristalização.
- $\Delta H_f$**  Variação de entalpia de fusão.
- $\Delta_m$**  Variação de massa, em porcentagem.
- $\Delta pH$**  Variação de pH.
- $\Delta T$**  Variação de temperatura.
- $\epsilon$**  Porosidade, em porcentagem.
- $\mu$**  Potencial químico.
- $\phi_I$**  Fase líquida pobre em polímero.
- $\phi_{II}$**  Fase líquida rica em polímero.
- ACP** Fosfato de cálcio amorfo.
- ANOVA** Análise de variância.
- BBD** *Box-Behnken Design*.
- BF** *Bright field*, ou campo claro.
- CaP** Fosfato de cálcio.
- CHA** Hidroxiapatita dopada com íons carbonato.
- DCPD** Fosfato de dicálcio dihidratado.
- DF** *Dark field*, ou campo escuro.
- DMSO** Dimetilsulfóxido.
- DMA** *Dynamic mechanical analysis*, ou análise dinâmico-mecânica.
- DSC** *Differential Scanning Calorimetry*, ou calorimetria exploratória diferencial.
- E'** Módulo de armazenamento, em MPa.
- E''** Módulo de perda, em MPa.
- EELS** *Electron energy loss spectroscopy*, ou espectroscopia de perda de energia de elétrons.
- e-PTFE** Poli(tetrafluoreto de etileno) expandido.

- FDA** *Food and Drug Administration.*
- FT-IR** *Fourier Transformed Infrared*, ou Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.
- GBR** *Guided bone regeneration*, ou regeneração óssea guiada.
- GPC** *Gel permeation chromatography*, ou cromatografia de permeação em gel.
- HA** Hidroxiapatita.
- L-L** Separação de fases líquido-líquido.
- LSCM** *Laser scanning confocal microscopy*, ou microscopia laser confocal.
- L-S** Transição de fases líquido-sólido.
- $m_f$**  Massa final.
- $m_i$**  Massa inicial.
- $M_m$**  Massa da membrana.
- $M_{molhada}$**  Massa da membrana molhada.
- $M_{seca}$**  Massa da membrana seca.
- MTT** [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil] brometo de tetrazólio.
- $M_w$**  Massa molar média ponderal.
- nHA** Nanohidroxiapatita.
- NIPS** *Nonsolvent induced phase separation*, ou inversão de fases induzida por não solvente.
- OCP** Fosfato de octacálcio.
- $P_c$**  Ponto crítico.
- PBS** *Phosphate buffer solution*, ou tampão fosfato salino.
- PCL** Poli( $\epsilon$ -caprolactona).
- PCL-A** Poli( $\epsilon$ -caprolactona) contendo ácido esteárico.
- PCL-A/t** Poli( $\epsilon$ -caprolactona) contendo ácido esteárico e tratada por ciclos de imersão sequencial.
- PCL-E** Poli( $\epsilon$ -caprolactona) contendo hidrogenofosfato de bis(2-etilhexila).
- PCL-E/t** Poli( $\epsilon$ -caprolactona) contendo hidrogenofosfato de bis(2-etilhexila) e tratada por ciclos de imersão sequencial.
- PCL-M** Poli( $\epsilon$ -caprolactona) contendo hidrogenofosfato de bis(metacrilóioxietila).
- PCL-M/t** Poli( $\epsilon$ -caprolactona) contendo hidrogenofosfato de bis(metacrilóioxietila) e tratada por ciclos de imersão sequencial.

- PCL/t** Poli( $\epsilon$ -caprolactona) tratada por ciclos de imersão sequencial.
- PDO** Polidioxanona.
- PE** Polietileno.
- PEG** Polietilenoglicol.
- PES** Poliétersulfona.
- PLGA** Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico).
- Psf** Polisulfona.
- PLA** Poli(ácido láctico).
- PU** Poliuretana.
- PVA** Poli(álcool vinílico).
- PVDF** Poli(fluoreto vinilideno).
- PVP** Poli(vinil pirrolidona).
- SBF** *Simulated body fluid*, ou fluido corpóreo simulado.
- SEM** *Scanning electron microscopy*, ou microscopia eletrônica de varredura.
- T<sub>c</sub>** Temperatura de cristalização.
- TCP** Fosfato de tricálcio.
- TEM** *Transmission electron microscopy*, ou microscopia eletrônica de transmissão.
- T<sub>f</sub>** Temperatura de fusão.
- T<sub>g</sub>** Temperatura de transição vítrea.
- THF** Tetrahidrofurano.
- TIPS** *Thermally induced phase separation*, ou inversão de fases induzida por temperatura.
- T<sub>onset</sub>** Temperatura de início de cristalização.
- VIPS** *Vapour induced phase separation*, ou inversão de fases induzida por vapor.
- V<sub>m</sub>** Volume da membrana.
- X<sub>c</sub>** Grau de cristalinidade, em porcentagem.
- XPS** *X ray photoelectron spectroscopy*, ou espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X.



## Lista de tabelas

Tabela 1- Parâmetros avaliados no planejamento <i>Box-Behnken</i> para otimizar o preparo de membranas assimétricas de PCL por inversão de fases induzida por vapor (VIPS).....	50
Tabela 2 – Condições experimentais utilizadas nas preparações segundo o planejamento experimental <i>Box-Behnken</i> e suas respectivas respostas.....	53
Tabela 3 – Parâmetros avaliados no planejamento $2^{4-1}$ para otimizar o procedimento do tratamento superficial por ciclos de imersão sequencial.....	57
Tabela 4 - Condições experimentais utilizadas nas preparações segundo o planejamento experimental $2^{4-1}$ e suas respectivas respostas.....	59
Tabela 5 - Resumo das nomenclaturas utilizadas. ....	63
Tabela 6 - Porosidade volumétrica e ângulo de contato das membranas, com e sem tratamento que foram avaliadas. ....	64
Tabela 7 - Propriedades térmicas das membranas avaliadas. ....	67



## Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática de uma membrana (Strathmann, 2001). ...	2
Figura 2 - Representação esquemática das principais morfologias de membranas simétricas (acima) e assimétricas (abaixo).....	4
Figura 3 - Representação esquemática de um processo de inversão de fases induzido por vapor (VIPS). .....	6
Figura 4 - Representação esquemática de um diagrama de fases ternário para um processo de inversão de fases induzido por vapor (VIPS). .....	8
Figura 5 - Reação de hidrólise de PCL formando oligômeros com álcoois ou carboxilatos terminais (Araujo <i>et al.</i> , 2008). .....	14
Figura 6 – Representação esquemática de uma cirurgia dentária. Extraído de <a href="http://www.geistlich.com">www.geistlich.com</a> . .....	16
Figura 7 - Representação esquemática da ação de diferentes dispositivos em implantes ósseos.....	18
Figura 8 - Estrutura química da poli( $\epsilon$ -caprolactona). .....	29
Figura 9 - Estrutura química dos agentes de nucleação utilizados. ....	29
Figura 10 – Representação esquemática da metodologia de preparo das membranas assimétricas de PCL por inversão de fases induzida por vapor (VIPS). ....	31
Figura 11 – Representação esquemática do procedimento experimental de um ciclo de imersão sequencial. ....	32
Figura 12 – Exemplo de medida do ângulo de contato.....	37
Figura 13 - Representação esquemática do método de obtenção de membranas com íons aprisionados na superfície. ....	44
Figura 14 - Micrografias eletrônicas de varredura da superfície livre (esquerda) e da seção transversal (direita) de uma membrana densa contendo 1,0% (em massa) de estearato de amônio.....	45
Figura 15 - Micrografias eletrônicas de transmissão de membranas contendo 0,5% (em massa) de ácido esteárico, preparadas por VIPS (esquerda) e por evaporação controlada de solvente (direita). ....	46
Figura 16 - Estrutura química do corante fluorescente, alaranjado de acridina. ....	47

Figura 17 - Projeção 2D de reconstruções 3D da superfície livre de uma membrana pura (esquerda) e uma membrana contendo 0,5% (em massa) de ácido esteárico (direita), ambas coradas com alaranjado de acridina. ....	48
Figura 18 - Representação esquemática do espaço amostral de um planejamento de experimentos do tipo <i>Box-Behnken</i> (Ferreira, et al., 2007). ....	49
Figura 19 - Micrografias eletrônicas de varredura da membrana de menor (esquerda) e maior (direita) porosidade, obtidas no planejamento de experimentos BBD. ....	51
Figura 20 - Perfil de cristalização no resfriamento da calorimetria exploratória diferencial da PCL, do ácido esteárico e de membranas obtidas no planejamento <i>Box-Behnken</i> . ....	51
Figura 21 - Gráfico de pareto (esquerda) e mapa de contorno obtido com concentração de ácido no nível -1 (direita) obtidos no planejamento <i>Box-Behnken</i> para a resposta porosidade. ....	55
Figura 22 - Gráfico de pareto (esquerda) e mapa de contorno no nível -1 de PCL (direita) obtidos no planejamento <i>Box-Behnken</i> para a resposta $\Delta T$ . ....	56
Figura 23 - Micrografias eletrônicas de varredura de filmes de PCL após o tratamento superficial por ciclos de imersão sequencial nas condições A (esquerda) e B (direita), destacadas na Tabela 4. ....	59
Figura 24 - Gráfico de pareto (esquerda) e mapa de contorno obtido utilizando temperatura no nível -1 e concentrações no nível 1. ....	60
Figura 25 - Variação do ângulo de contato em função do tempo das membranas sem tratamento. ....	65
Figura 26 - Curvas de DSD dos materiais avaliados. a) resfriamento e b) segundo aquecimento. ....	66
Figura 27 - Módulo de armazenamento (esquerda) e módulo de perda (direita) obtidos no DMA das membranas com e sem tratamento por ciclos de imersão sequencial. ....	67
Figura 28 - Micrografias eletrônicas de varredura apresentando visões panorâmicas típicas da superfície livre (à esquerda) e da superfície do substrato (à direita) das membranas preparadas neste trabalho. ....	69

Figura 29 - Micrografias eletrônicas de varredura das membranas de PCL pura, com (direita) e sem (esquerda) tratamento por ciclos de imersão sequencial. Acima estão apresentadas as superfícies livres, ao centro a seção transversal e abaixo as superfícies do substrato. ....71

Figura 30 - Micrografias eletrônicas de varredura das membranas de PCL contendo ácido esteárico, com (direita) e sem (esquerda) tratamento por ciclos de imersão sequencial. Acima estão apresentadas as superfícies livres, ao centro a seção transversal e abaixo as superfícies do substrato.....72

Figura 31 - Micrografias eletrônicas de varredura das membranas de PCL contendo hidrogenofosfato de bis(2-etilhexila), com (direita) e sem (esquerda) tratamento por ciclos de imersão sequencial. Acima estão apresentadas as superfícies livres, ao centro a seção transversal e abaixo as superfícies do substrato. ....73

Figura 32 - Micrografias eletrônicas de varredura das membranas de PCL com hidrogenofosfato de bis(metacrilóioxetila), com (direita) e sem (esquerda) tratamento por ciclos de imersão sequencial. Acima estão apresentadas as superfícies livres, ao centro a seção transversal e abaixo as superfícies do substrato. ....74

Figura 33- Micrografias ampliadas da face livre das membranas após tratamento superficial por ciclos de imersão sequencial. (A) PCL/t; (B) PCL - A/t; (C) PCL - E/t e (D) PCL - M/t. ....75

Figura 34 - Micrografia eletrônica de transmissão de campo claro de uma partícula amorfa de fosfato de cálcio desprendida da superfície de PCL-A/t e o respectivo mapa de cálcio (direita). ....79

Figura 35 - Micrografia eletrônica de transmissão de campo claro de uma partícula semi-cristalina de fosfato de cálcio desprendida da superfície de PCL-A/t, seu mapa de cálcio (centro) e seu padrão de difração (direita). ....80

Figura 36 - Micrografia eletrônica de transmissão (acima) de uma partícula de fosfato de cálcio aderida a um filme fino de PCL. Abaixo os espectros de perda de energia que caracterizam a presença de oxigênio (esquerda) e cálcio (direita).....81

Figura 37 – Micrografias eletrônicas de transmissão de campo claro (esquerda) e campo escuro (direita) de uma partícula semicristalina de fosfato de cálcio aderida à matriz de PCL-A/t e seu respectivo padrão de difração (direita). ....81

Figura 38 - Perda de massa e variação de massa molar média ponderal durante o ensaio de degradação hidrolítica. As barras verdes referem-se à $M_w$ antes da imersão das membranas em PBS, enquanto que as barras vermelhas referem-se a $M_w$ após 30 dias de imersão em PBS. ....	84
Figura 39 - Micrografias eletrônicas de varredura das membranas sem tratamento por ciclos de imersão sequencial após 24 horas (esquerda) e 30 dias (direita) de degradação hidrolítica. ....	85
Figura 40 – Micrografias eletrônicas de varredura das membranas tratadas com os ciclos de imersão sequencial após 24 horas (esquerda) e 30 dias (direita) de degradação hidrolítica. ....	86
Figura 41 - Mecanismo proposto para a recombinação de oligômeros de poli( $\epsilon$ -caprolactona) durante solubilização em THF após 30 dias de degradação hidrolítica. ...	88
Figura 42 – Micrografias eletrônicas de varredura das superfícies livres de PCL-A/t (esquerda) e PCL-M/t (direita) após 30 dias de degradação hidrolítica. ....	88
Figura 43 - Representação esquemática do mecanismo de osteoindução de implantes recobertos com fosfato de cálcio (Surmenev <i>et al.</i> , 2014). ....	90
Figura 44 - Micrografias eletrônicas de varredura das membranas, com e sem o tratamento por ciclos de imersão sequencial, após 1 hora de mineralização em tampão PBS a 37°C. ....	92
Figura 45 - Micrografias eletrônicas de varredura da superfície livre (esquerda) e do substrato (direita) da membrana PCL - A/t, após 1 hora mineralização. ....	93
Figura 46 - Viabilidade celular pelo método do ensaio metabólico do MTT das membranas estudadas em 1, 5 e 12 dias de cultivo celular. ....	95
Figura 47 - Redução química do MTT a formazan. ....	96

### 1.1. Membranas biomédicas

Desde o início do segundo milênio o ser humano busca formas de reparar ou substituir partes do corpo humano. Nesta época já era possível substituir partes danificadas de dentes por ouro. Porém, somente na década de 40 a pesquisa nessa área formalizou-se. A constituição da Sociedade de Biomateriais, em 1975 nos Estados Unidos, determina o início da ciência de biomateriais, que é interdisciplinar e está em constante reformulação. No ano de 1996, Ratner e colaboradores publicaram o primeiro livro sobre o assunto e definiram biomateriais como sendo todos os materiais, naturais ou sintéticos, desenvolvidos com o intuito de interagir com sistemas biológicos (Ratner *et al.*, 1996).

Na década de 60, o progresso da ciência de polímeros contribuiu para o desenvolvimento da ciência de biomateriais, o que permitiu sua rápida expansão. Polímeros são materiais versáteis, flexíveis e de fácil manipulação, que permitem a produção de dispositivos nas mais diversas geometrias. O desenvolvimento da síntese em larga escala de poli( $\alpha$ -hidróxiácidos), na década de 80, trouxe uma nova tendência para a ciência de biomateriais: os dispositivos bioreabsorvíveis. Esses dispositivos são capazes de se degradar no meio corpóreo, sendo absorvidos pelo organismo e evitando novas intervenções cirúrgicas para sua remoção (Nair & Laurencin, 2007).

A periodontia, que é a cirurgia reparadora do tecido ósseo da região bucal, é a área médica pioneira no desenvolvimento e utilização de biomateriais. Um dispositivo implantável para a região bucal em geral é pequeno, bidimensional e, preferencialmente, bioreabsorvível. Para isso, a membrana é a geometria mais utilizada.

Membranas são materiais que possuem grande área superficial e pequena espessura, que atuam como barreiras físicas seletivas entre duas fases. O transporte de massa entre essas fases pode ser governado por diversas forças motrizes, sendo as mais comuns as diferenças de pressão, de potencial químico ( $\mu$ ) ou de potencial elétrico entre as duas fases. A Figura 1 trás uma representação esquemática do transporte de massa seletivo entre duas fases, movido pela diferença de potencial químico.

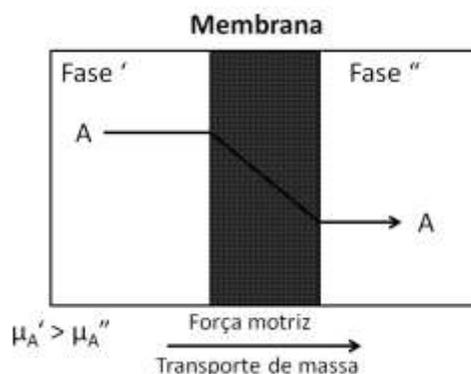


Figura 1 - Representação esquemática de uma membrana (Strathmann, 2001).

Os princípios envolvidos no preparo de membranas, bem como a teoria que os fundamentam, são conhecidos desde o século XIX, a partir dos estudos de *Pfeffer* (1877) e *van't Hoff* (1887). No entanto, foi apenas na década de 60, com a descoberta das membranas assimétricas por *Loeb e Sourirajan* (1959), que esses materiais passaram a ser produzidos comercialmente (Saier & Strathmann, 1975).

A indústria de separação e filtração foi a primeira a utilizar membranas em larga escala, uma vez que estas permitem um transporte de massa mais seletivo e eficiente que os filtros convencionais. A possibilidade de controlar a seletividade de uma membrana, alterando apenas alguns parâmetros simples de seu preparo, impulsionou não só o aumento da utilização comercial desses materiais como também as pesquisas na área. A ciência de polímeros também contribuiu significativamente para o desenvolvimento da tecnologia de membranas. Atualmente membranas são utilizadas em diversas outras áreas da indústria, como a de geração de energia e a de biotecnologia (Strathmann, 2001).

Diversos estudos foram feitos visando compreender e sistematizar os mecanismos de permeabilidade e seletividade de membranas de filtração, características intimamente relacionadas entre si. Em geral, o termo permeabilidade é utilizado para tratar do transporte do componente majoritário de um fluido, o qual frequentemente é a água. Já o termo seletividade refere-se à habilidade de uma membrana em reter um ou mais componentes minoritários deste fluido, separando-os do fluido permeado. Esses processos são governados pelas interações intermoleculares entre a membrana e o

fluido, pela energia de superfície, porosidade da membrana, pressão hidrodinâmica aplicada, ou outra força motriz (Saier & Strathmann, 1975; Strathmann, 2001).

Existem dois modelos propostos para explicar a seletividade de membranas: o modelo de seleção por poros e o modelo de seleção por solubilização. Membranas seletivas por poro atuam como peneiras moleculares, retendo compostos de dimensões superiores ao tamanho de seus poros. Já membranas seletivas por solubilização permitem o transporte de compostos de composição química similar, uma vez que podem ser solubilizados na membrana. A maior parte das membranas apresenta, na verdade, um comportamento misto entre estes dois modelos (Saier & Strathmann, 1975).

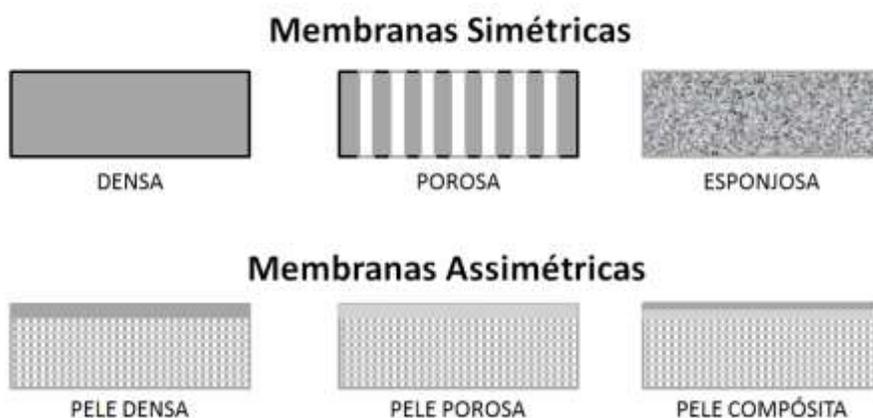
As interações intermoleculares, entre a membrana e o fluido que a permeia, são o principal fator a ser considerado para avaliar as características de permeabilidade e seletividade. No caso das membranas poliméricas, essas características são influenciadas principalmente por fatores como cristalinidade, flexibilidade, estabilidade térmica e mecânica. A presença de cristalitos, nos polímeros semicristalinos, diminui a taxa de permeação da membrana, pois estes atuam como barreiras físicas para a passagem do fluido, devido ao menor volume livre disponível para difusão. A flexibilidade contribui para a permeabilidade, enquanto que as estabilidades térmica e mecânica contribuem para o prolongamento da vida útil da membrana (Osada & Nakagawa, 1992).

Atualmente, são utilizadas na indústria apenas membranas sintéticas. Por outro lado, as membranas naturais constituem os envoltórios celulares que separam o citoplasma da matriz extracelular, o que as torna essenciais à sobrevivência das células de organismos vivos. Membranas naturais são compostas de fosfolipídios e proteínas e têm a habilidade de absorver fluidos extracelulares de maneira seletiva, retendo e absorvendo apenas nutrientes específicos, necessários para cada etapa de seu metabolismo (Osada & Nakagawa, 1992).

Membranas sintéticas podem ser formadas a partir de diversos materiais, tais como metais, cerâmicas e, principalmente, polímeros. Essas membranas são classificadas de acordo com sua composição e morfologia. Em termos de composição, são classificadas em homogêneas e heterogêneas e, em relação à morfologia, em simétricas e

assimétricas. As características morfológicas de uma membrana são determinantes na sua seletividade. Membranas simétricas tem porosidade uniforme ao longo de toda a espessura, enquanto que membranas assimétricas possuem gradiente de porosidade ao longo de sua seção transversal (Osada & Nakagawa, 1992).

As membranas simétricas estão subdivididas em três grupos majoritários: densas, porosas (poros na forma de canais) e esponjosas (ou bicontínuas). A morfologia típica de uma membrana assimétrica é composta por uma fina camada filtrante, ou pele, e uma subestrutura altamente porosa. A camada filtrante pode ser densa, ligeiramente porosa ou compósita. A Figura 2 trás uma representação esquemática das principais morfologias de membranas poliméricas simétricas e assimétricas. Atualmente, as membranas assimétricas são as mais utilizadas comercialmente, uma vez que possuem elevada seletividade, devido à presença da camada filtrante, e elevada vazão de fluido permeado, atribuída à subcamada porosa. A espessura e morfologia da subcamada determinam a resistência mecânica da membrana (Strathmann, 2001).



**Figura 2 - Representação esquemática das principais morfologias de membranas simétricas (acima) e assimétricas (abaixo).**

Existem diferentes métodos de obtenção de membranas poliméricas porosas, sendo o principal deles o de inversão de fases. Este método é muito versátil e permite que sejam produzidas membranas com as mais diversas morfologias. Na inversão de fases, uma solução polimérica homogênea e viscosa é induzida a uma transição de fases, que pode ser promovida por variação de temperatura, por evaporação controlada do

solvente ou por imersão em banho coagulante contendo um não solvente, miscível ao solvente.

Nos diversos processos de inversão de fases parte-se de uma solução polimérica termodinamicamente estável e homogênea, onde é induzida uma mudança gradual de composição ao longo do tempo de exposição ao agente de inversão de fases. Em um dado ponto deste processo, a solução passa por uma transição de fases do tipo líquido-sólido (L-S). Essa transição pode ser devido à cristalização do polímero, à transição sol-gel, à vitrificação do polímero, ou ainda, a uma combinação desses fenômenos.

Em muitos casos, a transição L-S é precedida de uma separação de fases líquido-líquido (L-L), que produz duas fases: uma rica em polímero (pobre em solvente) e outra rica em solvente (pobre em polímero). Nestes casos, a transição L-S, que consolida a membrana, ocorre fora do equilíbrio e antes que as duas fases líquidas encontrem o equilíbrio termodinâmico, formando duas fases macroscopicamente separadas. A transição L-S ocorre na fase rica em polímero, e dá origem à matriz da membrana. A solidificação da fase rica aprisiona a fase pobre em polímero, que dá origem aos poros (Han & Bhattacharyya, 1995).

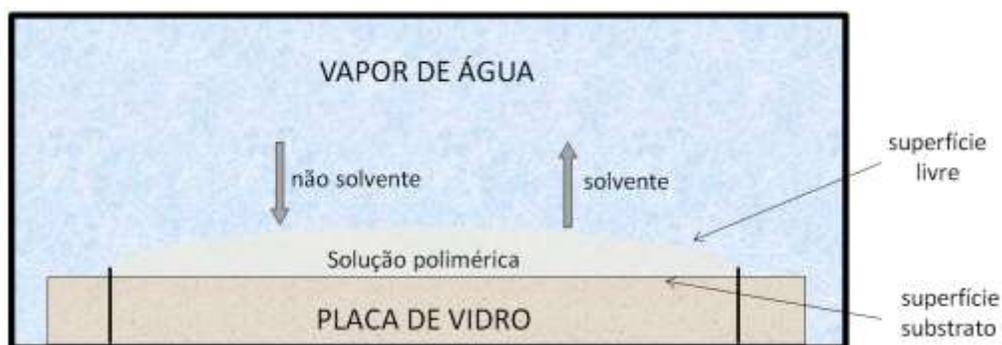
O controle da extensão da separação L-L e, conseqüentemente, da composição das fases, bem como o controle do tipo de transição L-S permite que sejam obtidas membranas com as mais diversas morfologias. Fatores como concentração e viscosidade da solução polimérica, temperatura de processo, composição do sistema solvente e também do sistema não-solvente, determinam essas propriedades.

Na tentativa de controlar simultaneamente esses e outros parâmetros, diversas estratégias para promover a inversão de fases foram desenvolvidas nas últimas décadas. A mais comum, e mais largamente utilizada comercialmente, é a inversão de fases induzida por não solvente, ou *nonsolvent induced phase separation* (NIPS). Um não solvente é uma substância miscível com o solvente utilizado na preparação da solução polimérica, que diminui o limite de solubilidade do polímero no solvente, levando à separação de fases na solução (Mulder, 1996).

No método NIPS a mudança de composição é devido à saída de solvente, por difusão e evaporação, e também à entrada de não solvente, que ocorre majoritariamente por difusão. Esses fenômenos são governados pela diferença de

potencial químico, não só do meio externo com a solução polimérica, mas também ao longo da seção transversal da solução polimérica. Esse gradiente de potencial químico na solução, que representa um gradiente de composição ao longo da espessura da membrana, é o principal responsável pela obtenção de membranas assimétricas (Mulder, 1996).

Nesse processo, em geral, o não solvente é utilizado no estado líquido, mas pode ser utilizado no estado gasoso, onde a inversão de fases passa a denominar-se inversão de fases induzida por vapor, ou *vapour induced phase separation* (VIPS). O não solvente mais utilizado na forma gasosa é o vapor de água. O processo VIPS, apresentado na Figura 3, apesar de muito similar ao NIPS, é mais lento e por isso tem sido amplamente utilizado para estudar a influência da termodinâmica e da cinética de inversão de fases na morfologia das membranas. Porém, ainda é pouco utilizado comercialmente (Peng *et al.*, 2012). Alguns exemplos de estudos sobre tecnologia de membranas estão apresentados a seguir.



**Figura 3 - Representação esquemática de um processo de inversão de fases induzido por vapor (VIPS).**

Han & Bhattacharyya (1995) utilizaram a polisulfona (Psf) para preparar membranas por NIPS e VIPS e comprovaram que NIPS produz membranas com poros na forma de canais, enquanto VIPS produz poros esféricos e isolados. Também puderam comprovar a existência de separação de fases L-L no processo VIPS e demonstraram a influência da morfologia na permeabilidade e seletividade das membranas.

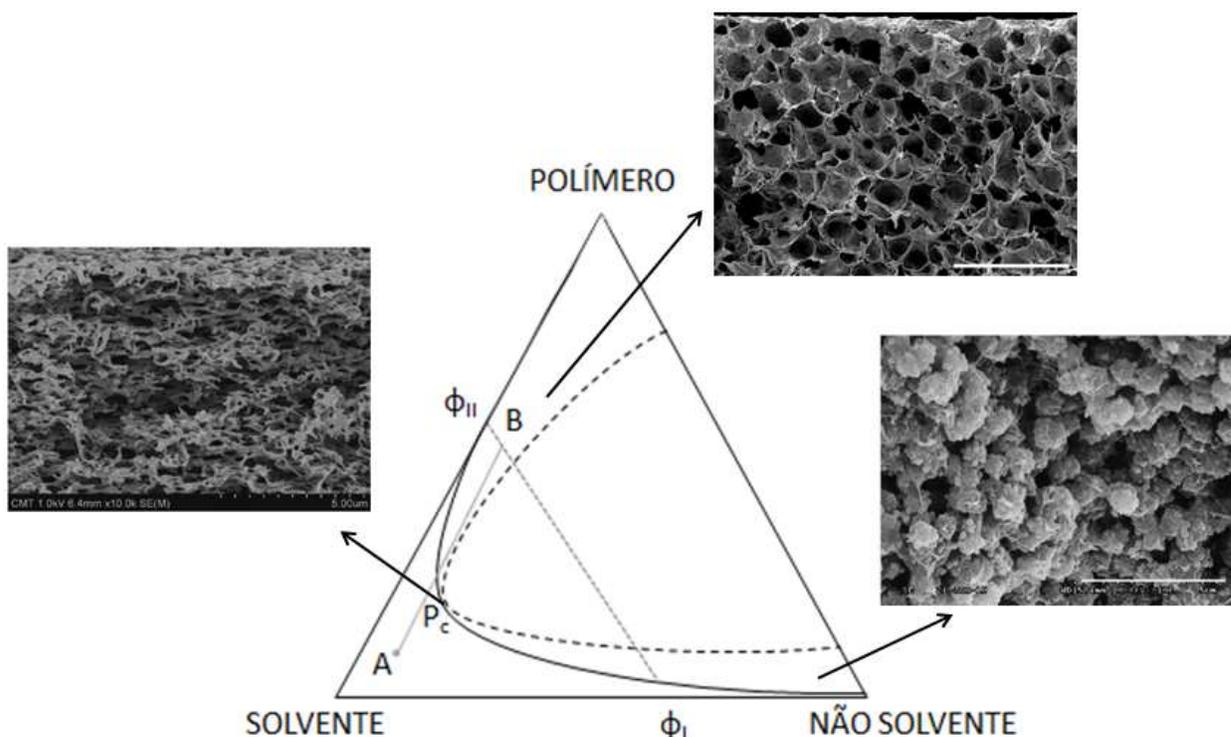
Liu, Zhao e colaboradores (2010) avaliaram a superfície livre de membranas de poliétersulfona (PES). A superfície livre é sempre aquela que se consolida em contato

com o não solvente (Figura 3). Neste trabalho, foi observado que quanto maior a massa molar do polímero e menor a concentração da solução, maior o diâmetro dos poros formados. Além disso, foi observado que existe uma faixa útil de umidade relativa da atmosfera de inversão de fases pelo método VIPS. Quando a umidade é muito baixa (menor que 50%) não ocorre inversão de fases e quando é muito alta (maior que 90%) a superfície da membrana torna-se muito heterogênea, interferindo na permeabilidade.

Frequentemente é necessário utilizar uma combinação de NIPS e VIPS para ajustar a morfologia da superfície livre da membrana. Nesses casos, em geral, a solução precursora inicialmente é exposta a uma atmosfera de umidade controlada (VIPS) e, em seguida, imersa em um banho de coagulação (NIPS). Peng e colaboradores (2012) utilizaram esse método para estudar o sistema ternário poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF), dimetilacetamida e água. Neste trabalho, os autores observaram mudanças drásticas na morfologia e nas características de permeabilidade e seletividade da membrana, variando apenas o tempo de exposição da solução precursora à atmosfera controlada.

Finalmente, não se pode deixar de mencionar trabalhos como o de Khare e colaboradores (2005), no qual foi desenvolvido um modelo matemático para explicar o processo de inversão de fases. Nesse trabalho, foram avaliadas membranas de PES e poli(vinil pirrolidona) (PVP) feitas por VIPS. Essas membranas assimétricas tem porosidade mínima no centro da espessura e máxima nas superfícies. Essa morfologia é comumente chamada de *hour-glass*. O modelo matemático desenvolvido nesse trabalho considera fatores termodinâmicos e de transferência de massa para prever o gradiente de porosidade da membrana formada.

É importante descrever de maneira mais detalhada o comportamento de fases típico de um processo de inversão de fases. Para isso, a Figura 4 trás uma representação esquemática de um diagrama de fases ternário de um sistema constituído por um polímero, um solvente e um não solvente, que é submetida a uma inversão de fases do tipo VIPS, representado na Figura 3. Esse diagrama possivelmente se assemelha ao diagrama de fases do sistema em estudo neste trabalho, mas este ainda não foi determinado experimentalmente.



**Figura 4 - Representação esquemática de um diagrama de fases ternário para um processo de inversão de fases induzido por vapor (VIPS).**

Quando a inversão de fases é realizada por VIPS, em uma única etapa, geralmente utiliza-se água como não solvente, tendo em vista que o controle de umidade de ambientes confinados pode ser facilmente reproduzido. A escolha do solvente é feita com base na sua volatilidade, tendo em vista que a mesma controla a velocidade e duração da separação de fases.

No processo de inversão de fases apresentado na Figura 4, parte-se de uma solução de composição A, que contém frações conhecidas dos três componentes: polímero, solvente e não solvente. Essa solução é inicialmente homogênea e termodinamicamente estável. A solução, após ser espalhada sobre um substrato adequado, é exposta a uma atmosfera saturada em vapor de água. Devido à diferença de potencial químico entre a solução e a atmosfera, há a lenta difusão de água para dentro da solução e, simultaneamente, o solvente evapora. A combinação desses fenômenos causa uma mudança lenta e gradual na composição da membrana. Na Figura 4 essa mudança de composição é dada pela linha AB.

Quando a linha AB atinge a curva de separação de fases binodal (linha contínua), essa solução entra em uma região de equilíbrio metaestável, onde ocorre a separação de fases L-L. Essa região de equilíbrio metaestável está localizada entre as curvas de separação de fases binodal e spinodal (linha pontilhada). Nessa região há a nucleação e o crescimento de gotículas de uma fase dispersas na outra.

O que determina se a fase que nucleia e cresce é a rica ou a pobre em polímero é o ponto crítico ( $P_c$ ). Quando a separação de fases L-L ocorre em um ponto acima de  $P_c$ , há a nucleação da fase pobre em polímero, dispersa na matriz da fase rica. Mas quando a separação de fases ocorre abaixo de  $P_c$ , é a fase rica que nucleia e cresce. Se a separação de fases L-L ocorre diretamente no ponto crítico, a separação é do tipo spinodal, originando membranas simétricas esponjosas. No exemplo da Figura 4, assim como na maioria dos sistemas que utilizam VIPS, a separação L-L ocorre acima do ponto crítico, o que significa que há nucleação e crescimento de uma fase pobre em polímero ( $\phi_I$ ) dispersa em uma matriz da fase rica em polímero ( $\phi_{II}$ ). Esse tipo de separação L-L, em geral, dá origem a membranas assimétricas com poros esféricos, ou celulares, pouco conectados (Mulder, 1996).

No processo VIPS a composição das fases é aproximadamente a mesma ao longo de toda a espessura da membrana, o que elimina a existência do gradiente de composição característico da formação de membranas assimétricas. Isso é devido à lenta difusão do vapor de água para dentro da solução polimérica. Mesmo assim, as membranas obtidas são geralmente assimétricas, mas não apresentam a camada densa de polímero (pele filtrante) na superfície livre (Park *et al.*, 1999). Por outro lado, membranas preparadas por VIPS apresentam caracteristicamente poros grandes, da ordem de dezenas de  $\mu\text{m}$ . Este tipo de morfologia tem sido citada como muito útil para a confecção de membranas para aplicações biomédicas (Lee *et al.*, 2004).

Atualmente as principais aplicações de membranas na área biomédica são na fabricação de sistemas externos de filtração de sangue e na liberação controlada de fármacos (Strathmann, 2001). Mas, além disso, existe também uma série de membranas implantáveis disponíveis comercialmente que são utilizadas em cirurgias dentárias (Fujihara *et al.*, 2005), enxertos de pele (Khor *et al.*, 2003) e outros tipos de tecido (Yeong *et al.*, 2010, Mangindaan *et al.*, 2012).

O processo de fabricação de membranas mais explorado na literatura para a área biomédica é a eletrofiliação. Embora a eletrofiliação ainda não seja disponível comercialmente para produção em larga escala, ela produz membranas de morfologia peculiar e altamente porosas, porém com baixa resistência mecânica. Os principais fatores que limitam sua aplicação comercial atualmente são o elevado gasto energético e sua pouca produtividade (Vaquette & Cooper-White; 2013).

Apesar do número crescente de estudos sobre membranas eletrofiadas, nos últimos anos tem crescido também o número de trabalhos que buscam outras formas, mais economicamente viáveis, de produzir membranas implantáveis. As alternativas mais estudadas incluem métodos de prototipagem rápida, como a sinterização seletiva a laser, utilizada por Yeong e colaboradores (2010), ou uma combinação de evaporação controlada de solvente e prototipagem, como fizeram Khor e colaboradores (2003). No entanto, a prototipagem rápida envolve equipamentos caros que limitam não só a produtividade, mas também o tamanho do dispositivo produzido. Assim, alguns autores têm optado por utilizar a inversão de fases na preparação de membranas biomédicas, uma vez que essa tecnologia já está estabelecida em sua área.

Nesses casos, NIPS já é muito utilizado, seja como método exclusivo de preparo, como nos casos de Kim e colaboradores (2012) e Hong e colaboradores (2007), seja associado a outras técnicas. Guarino e colaboradores (2009) utilizaram NIPS combinado com *salt leaching*, que é a remoção brusca de um sal, o qual atua como agente porogênico. De forma análoga, Mangindaan e colaboradores (2012) utilizaram o *PEG leaching*, que é a remoção brusca de polietilenoglicol (PEG), associada ao NIPS. Yen e colaboradores (2009) combinaram NIPS com a inversão de fases induzida por temperatura, ou *thermally induced phase separation* (TIPS). NIPS também foi combinado com eletrofiliação (Diban *et al.*, 2013).

Yeong e colaboradores (2010) prepararam membranas de PCL a partir da técnica de sinterização seletiva com laser de CO<sub>2</sub>. As membranas produzidas foram semeadas com mioblastos do tipo C2C12, que aderiram e recobriram completamente o dispositivo em menos de quatro dias. Neste trabalho, as células suportadas se mantiveram viáveis por mais de 21 dias, indicando que o material tem boa aplicabilidade na produção de enxertos cardiovasculares.

Hong e colaboradores (2007) prepararam, por uma combinação de NIPS e VIPS, membranas assimétricas de quitosana utilizando uma solução de ácido acético como solvente, e uma solução de hidróxido de sódio como não solvente. As membranas obtidas apresentaram uma morfologia assimétrica incomum: uma camada densa na superfície livre, uma camada de porosidade intermediária no centro e uma camada altamente porosa na outra superfície. Os autores denominaram essa morfologia como “assimétrica gradual”. Mostraram que a espessura da camada densa governa as propriedades mecânicas do material e é dependente do tempo de exposição à atmosfera saturada prévia à imersão no banho de coagulação e também da concentração da solução. Essas membranas apresentam excelente biocompatibilidade e são completamente degradadas após 60 dias de implante, o que as torna interessantes para a aplicação na periodontia.

Mangindaan e colaboradores (2012) prepararam membranas de PCL para liberação controlada de fármacos utilizando um procedimento combinado de NIPS e *PEG leaching*. Essas membranas foram tratadas superficialmente com plasma de O<sub>2</sub> e recobertas, na sua face mais porosa, com um sistema sol-gel contendo cetoprofeno e/ou sulfadiazina de prata. Neste estudo, foi avaliada a biocompatibilidade da membrana, com e sem as drogas, bem como a taxa de liberação de cada droga. Uma das observações mais interessantes desse trabalho é a existência de uma diferença de adesão celular entre as duas faces da membrana, mesmo na ausência dos fármacos impregnados. Os autores atribuem essa adesão preferencial em uma das faces à diferença de porosidade e rugosidade entre elas. A face consolidada em contato com o banho de coagulação é menos porosa, apresentando menor adesão celular.

Yen e colaboradores (2009) prepararam membranas de PCL nanoporosas, para liberação controlada de enzimas, a partir de uma combinação de TIPS e NIPS. A membrana obtida por essa combinação tem poros esféricos interconectados, enquanto que a membrana obtida por TIPS é bicontínua. A morfologia bicontínua é inadequada para liberação controlada, pois não oferece resistência à difusão da enzima sintética ao tecido. Por essa razão os autores utilizaram a combinação de NIPS e TIPS para a produção de membranas.

Diban e colaboradores (2013) prepararam fibras ocas de PCL para produzir dispositivos de regeneração de tecido vascular (veias e artérias). Para isso, utilizaram N-metil pirrolidona como solvente e avaliaram três não solventes: água, etanol e isopropanol. As melhores propriedades mecânicas foram obtidas com o uso de etanol como não solvente. As fibras obtidas suportam condições de elevada pressão transmembrana (2 bar), por períodos prolongados, sem apresentar evidências de fratura. Os materiais também foram testados quanto à adesão e proliferação de células adiposas humanas e apresentaram adesão satisfatória após sete dias de cultivo. A morfologia obtida nesse processo consiste em uma superfície altamente porosa na face exterior, que promove a penetração celular, e uma superfície densa na face interior, adequada para impedir o extravasamento de sangue. A morfologia diferenciada nas duas faces permite que as células aderidas se diferenciem de maneiras distintas em cada uma delas, permitindo a produção de tecidos diferentes.

Mesmo com o crescente interesse pela inversão de fases no desenvolvimento de membranas biomédicas, ainda não há relatos do uso de VIPS para este fim. No entanto, no trabalho de Ye e colaboradores (2013) foi utilizado um processo similar, a partir de gotículas de água formadas por um atomizador ultrassônico (nebulizador). As membranas de poliuretana (PU) produzidas nesse trabalho apresentam poros esféricos, característicos de VIPS, com diâmetro e grau de conectividade dependente da concentração da solução polimérica. Neste trabalho, a membrana é consolidada pela exposição da solução precursora a uma atmosfera contendo gotículas de água, por um período de 6 horas. O NIPS é necessário para remover solvente residual ao final do processo. A nebulização de gotículas de água em um ambiente fechado mimetiza uma atmosfera saturada em vapor de água acima do ponto de orvalho, por isso a cinética de inversão de fases é análoga à das membranas produzidas por VIPS em atmosfera saturada.

Membranas produzidas por VIPS e correlatos são altamente porosas e preservam a resistência mecânica do polímero de partida. Isso ocorre porque durante a separação de fases L-L a matriz é a fase rica em polímero e governa as propriedades mecânicas. VIPS é um método onde a inversão de fases ocorre lentamente, porém pode ser aplicado industrialmente de forma a obter boa produtividade e reprodutibilidade, visto

que os parâmetros de processamento são facilmente controláveis. É uma técnica bastante barata e limpa, já que o único resíduo gerado é vapor de solvente, o qual é manejado facilmente com carvão ativo (Li *et al.*, 2010).

Esses fatores tornam VIPS uma alternativa bastante promissora frente a eletrofição. Além disso, os polímeros usualmente empregados na confecção de membranas biomédicas são hidrofóbicos e, portanto, adequados para serem utilizados em VIPS, uma vez que a fraca interação com água reduz o tempo necessário para a inversão de fases, produzindo materiais porosos (Mulder, 1996).

## 1.2. Poli( $\epsilon$ -caprolactona)

Neste trabalho, membranas assimétricas de PCL foram preparadas pelo método VIPS e, posteriormente, recobertas com CaP pelo método de imersão sequencial. Nas revisões bibliográficas realizadas durante a realização deste trabalho não foi possível encontrar relatos de membranas de PCL produzidas pelo método VIPS, no entanto, o método apresentou resultados satisfatórios e não prejudicou as características da PCL.

A PCL é um poliéster sintético, produzido a partir da polimerização por abertura de anel da  $\epsilon$ -caprolactona. É linear e contém cinco unidades metilênicas entre os grupos ésteres. Como todo poli( $\alpha$ -hidroxiácido), a PCL é biodegradável e bioreabsorvível (Fabbri *et al.* 2010). Sua degradação em meio corpóreo em geral ocorre via hidrólise, mas em alguns casos pode ocorrer por meio enzimático, dependendo do tecido em que é implantado (Eldsäter *et al.*, 2000). Em ambos os casos, a degradação ocorre pela quebra das ligações ésteres, que gera grupos terminais carboxilato e álcool, como está apresentado na Figura 5.

Na literatura são reportados dois mecanismos majoritários de degradação hidrolítica da PCL, e a predominância de um ou outro depende da morfologia do dispositivo (Guarino *et al.*, 2009). A degradação hidrolítica superficial é preferencial em dispositivos espessos e pouco porosos, onde é dificultada a penetração da água no interior do dispositivo. Nela há uma diminuição gradual do tamanho do dispositivo à medida que a degradação avança. Já a degradação volumétrica ocorre preferencialmente em dispositivos muito porosos, onde é mais fácil a penetração de água. Neste caso, as



desafios que devem ser superados. A hidrofobicidade dificulta a molhabilidade e a adesão celular sendo assim desejável modificar esse caráter hidrofóbico para melhorar o desempenho do dispositivo quando implantado (Fabbri *et al.*, 2010).

### 1.3. Características de membranas para periodontia

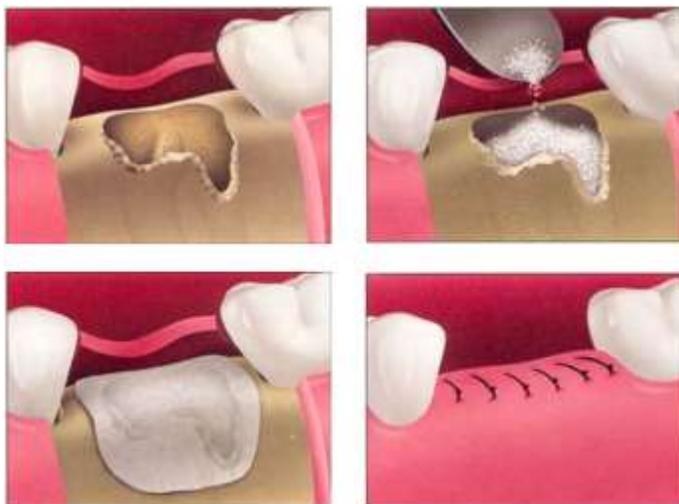
O elevado número de estudos disponíveis na literatura sobre a fabricação e avaliação *in vitro* da viabilidade de membranas e outros dispositivos implantáveis mostram que há uma demanda significativa para esse tipo de material. Entretanto, a dificuldade de se obter materiais economicamente viáveis, que sejam atóxicos e tenham desempenho satisfatório *in vivo* tornam esse mercado ainda bastante restrito.

Neste sentido, a periodontia é pioneira. A justificativa para isso é que a região bucal possui uma elevada taxa de renovação de fluidos corpóreos, o que facilita a irrigação do tecido lesionado, que contribui para acelerar processos de degradação hidrolítica de implantes bioreabsorvíveis. Além disso, a constante renovação do fluido evita a concentração local de produtos de degradação, que alteram a composição química, em especial o pH da região do implante. Essa concentração local altera a cinética de degradação do polímero, sendo que, mesmo no caso de produtos de degradação atóxicos, provoca respostas inflamatórias ou formação de trombos.

A elevada taxa de renovação de fluidos corpóreos, aliada à boa acessibilidade da região e à pouca solitação mecânica do implante favoreceram o uso de membranas na periodontia. Assim, já existem muitas opções disponíveis comercialmente, sendo as mais comuns as fabricadas a partir de poli(tetrafluoreto de etileno) expandido (ePTFE) (Gore-Tex<sup>®</sup>) ou poli(ácido láctico) (PLA) (Epi-Guide<sup>®</sup>).

A Figura 6 é uma representação esquemática do procedimento de reparo de uma lesão óssea na região bucal (canto superior esquerdo). Todos os tecidos do corpo humano são capazes de se regenerar, mas o tecido ósseo o faz em uma taxa muito inferior aos outros. Desta forma, para que seja possível garantir a regeneração completa do tecido, frequentemente é necessário introduzir dispositivos para acelerar essa regeneração. Em geral, na periodontia esse dispositivo, ou enxerto ósseo, consiste de um pó de fosfato de cálcio (canto superior direito, Figura 6). No entanto, mesmo com a inserção do enxerto, a regeneração total do tecido ainda pode levar

algumas semanas. Nesse período, o elevado fluxo de saliva pode lixiviar o enxerto, deixando o tecido ósseo exposto ao risco de infecção bacteriana. Uma forma bastante difundida para impedir essa exposição é a inserção de uma membrana com a finalidade de recobrir a lesão (canto inferior esquerdo, Figura 6). Esse processo, chamado regeneração óssea guiada, ou *guided bone regeneration* (GBR), foi desenvolvido na década de 50 (Gentile *et al.*, 2011).



**Figura 6 – Representação esquemática de uma cirurgia dentária. Extraído de [www.geistlich.com](http://www.geistlich.com).**

A membrana GBR, mesmo atuando como barreira física para manter o enxerto na região desejada, não pode impedir a irrigação da lesão, pois a ausência de irrigação pode ocasionar morte celular. Por esse motivo é importante que membranas GBR sejam altamente permeáveis e porosas. Assim, o enxerto, que é pouco solúvel em água e tem tamanho de partículas superior ao diâmetro dos poros, fica retido enquanto que o fluido corpóreo atravessa a membrana livremente. Além disso, membranas GBR atuam também na redução do risco de infecção bacteriana, impedindo o acesso das bactérias à lesão e, principalmente, fornecendo a sustentação mecânica necessária para o crescimento do tecido epitelial (gengiva) que recobre o osso.

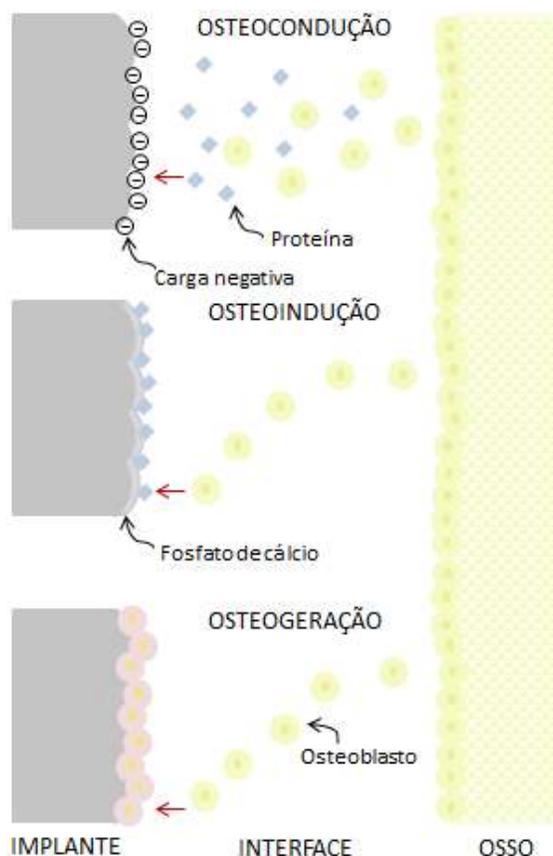
Em lesões mais extensas também ocorre, concomitantemente ao tecido epitelial, o crescimento do tecido conjuntivo fibroso. Para impedir que o crescimento acelerado

desses tecidos venha a invadir, ou colapsar sobre a região onde o tecido ósseo deve ser renovado, é importante delimitar a região do crescimento ósseo, o que é, de fato, a principal função das membranas GBR.

O tecido ósseo é dividido em trabecular e cortical. O osso trabecular é altamente poroso (50-90%) e frágil mecanicamente. Seu teor de inorgânicos (fosfatos de cálcio) é de aproximadamente 65% (Vallet-Regi & González-Calbet, 2004). É responsável pelo armazenamento de sais minerais e nutrientes, que são enviados para a corrente sanguínea conforme a necessidade. O osso cortical o envolve, para protegê-lo e contém aproximadamente 80% de fosfato de cálcio (CaP). É o responsável pela resistência mecânica ao órgão como um todo e é também pouco poroso (5-12%). Essa pequena porosidade do osso cortical permite a troca de fluidos entre o osso trabecular e os tecidos adjacentes. Tanto o osso trabecular quanto o cortical são constituídos de fibrilas de colágeno com cristais de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) depositados ao longo de sua espessura (Karageorgiou & Kaplan, 2005).

A fração orgânica de ossos e dentes é constituída de três tipos de células: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Osteoblastos atuam na formação da matriz inorgânica extracelular, os osteócitos na manutenção dessa matriz e os osteoclastos na reabsorção do tecido morto e da matriz inorgânica. (Karageorgiou & Kaplan, 2005; Ratner *et al.*, 1996; Surmenev *et al.*, 2014). Ao longo de sua vida útil essas células se diferenciam progressivamente e assim completam os ciclos de formação e absorção da matriz extracelular.

Fibroblastos se diferenciam em osteoblastos, que após proliferar, delimitando a região de formação do tecido ósseo, se diferenciam em osteócitos, que consolidam o tecido e fixam a matriz extracelular. Após cumprir suas funções, os osteócitos se diferenciam a osteoclastos, que absorvem a matriz extracelular, permitindo que ions como  $\text{Ca}^{+2}$ , essenciais para diversas outras funções do corpo, sejam enviados à corrente sanguínea (Vallet-Regi & González-Calbet, 2004). Tendo em mente que os osteoblastos são as células responsáveis pelo crescimento do tecido ósseo, para que um biomaterial participe ativamente da regeneração óssea, este deve conduzir (osteocondutor), induzir (osteoindutor) ou criar novos pontos (osteogerador) de crescimento de osteoblastos, conforme apresentado na Figura 7.



**Figura 7 - Representação esquemática da ação de diferentes dispositivos em implantes ósseos.**

O material osteoindutor é aquele que é passível mineralização, ou seja, permite a deposição de uma camada de CaP na superfície e dessa forma orienta, ou conduz, a proliferação dos osteoblastos. O material osteoindutor não só conduz a proliferação celular, como também induz células de tecidos vizinhos a migrarem e diferenciarem para formar osteoblastos. Como a proliferação de células ósseas é muito lenta, a habilidade de induzir a diferenciação de fibroblastos, que são células curinga, a osteoblastos, é a chave para reduzir o tempo de reparo de uma lesão. Essa indução da diferenciação celular, em geral, é feita pela imobilização de fatores de crescimento (proteínas) na superfície do biomaterial. Finalmente, um material osteogerador é aquele que já contém células ósseas, semeadas *in vitro*, previamente ao implante, e por isso agem como novos pontos de proliferação celular (Karageorgiou & Kaplan, 2005).

Contudo, essas definições ainda não são plenamente aceitas. Alguns autores ainda consideram a osteogênese como uma habilidade intrínseca do tecido, porém atualmente é atribuída ao dispositivo implantado. Muitos autores consideram a GBR como um quarto mecanismo de aceleração de regeneração óssea, enquanto que a definição mais aceita atualmente é que GBR é uma forma de osteocondução ou osteoindução. Para alguns, a GBR é específica da periodontia, enquanto para outros o único impedimento para utilizar GBR em outros tecidos ósseos é obter membranas com resistência mecânica adequada.

Recentemente, com o advento da engenharia tecidual, foi observado que é possível preparar membranas GBR que, além de osteocondutoras, sejam também osteoindutoras (ou osteogeradoras) o que permite reparar regiões lesionadas mais extensas. Kikuchi e colaboradores (2002), Yang e colaboradores (2009) e Ji e colaboradores (2013) mostraram, a partir de testes *in vivo* e *in vitro*, maneiras de conferir essas propriedades às membranas GBR, como mostrado a seguir.

Ji e colaboradores (2013) prepararam membranas eletrofiadas de uma blenda de PCL e gelatina. Após preparadas, as membranas passaram por um processo de reticulação utilizando glutaraldeído, seguida de adsorção química de SDF-1 $\alpha$ , um fator de crescimento para células estromais. Essas membranas osteogeradoras foram implantadas na calota craniana de ratos por oito semanas e, independente do teor de SDF-1 $\alpha$  incorporado e liberado, apresentam um aumento de seis vezes na taxa de regeneração óssea, sem aparição de trombos, tecido fibroso ou respostas inflamatórias.

Yang e colaboradores (2009) fabricaram membranas eletrofiadas compósitas de PCL e nanohidroxiapatita (nHA). Foram testadas a biocompatibilidade, as propriedades mecânicas e a viabilidade celular dessas membranas. A presença da nHA proporciona um aumento na taxa de mineralização, comprovando a biocompatibilidade. Teores de até 25% de nHA aumentam a resistência mecânica das membranas, mas tornam o material muito frágil acima desse limite. Finalmente, pela sementeação de osteoblastos os autores comprovaram a citocompatibilidade de todas as membranas. A presença de nHA foi eficiente em adiantar o processo de diferenciação celular, ou seja, tornar o material osteoindutor.

Os melhores resultados apresentados na literatura até hoje foram obtidos por Kikuchi e colaboradores (2002). A membrana GBR desse estudo é capaz de reparar totalmente uma área de 10x10x10 mm<sup>3</sup> de mandíbulas de cachorros em apenas 12 semanas. Para isso, os autores utilizaram uma membrana compósita de trifosfato de cálcio (TCP) e um copolímero de PLA, que foi preparada por evaporação controlada de solvente, seguida de compressão. A superfície desses materiais foi polida previamente ao implante. Apesar do sucesso no reparo da lesão, essa membrana apresenta instabilidade mecânica durante o período de ensaio e provoca alterações locais de pH. Entretanto, nenhum desses aspectos negativos foi suficiente para provocar rejeição.

#### **1.4. Compatibilidade implante/tecido hospedeiro.**

Para produzir um biomaterial, absorvível ou não, o primeiro fator a ser considerado é a biocompatibilidade das matérias-primas. Biocompatibilidade é a habilidade de um material de interagir com o tecido sem produzir respostas imunogênicas inflamatórias (Nair & Laurencin, 2007). Entretanto, existem muitos outros fatores, tão importantes quanto esse, que também devem ser considerados no desenvolvimento de biomateriais. Como os tecidos do corpo humano são muito diferentes entre si e a boa integração do tecido com o biomaterial depende da semelhança física destes, os biomateriais são estudados e fabricados visando sempre uma aplicação em uma região específica do corpo. Nesse sentido, fatores como porosidade, resistência mecânica e características de superfície, essenciais para a integração do dispositivo ao tecido, são manipulados extensivamente.

A porosidade é avaliada no sentido de controlar a velocidade de permeação de fluido corpóreo e a extensão da penetração celular no dispositivo. Poros com diâmetros na ordem de 100 µm possibilitam crescimento celular no interior do dispositivo, enquanto que poros interconectados, com diâmetros na faixa de 50 µm, são responsáveis pela irrigação e transporte de nutrientes (Coombes *et al.*, 2004; Karageorgiou & Kaplan, 2005).

As propriedades mecânicas, em especial a resistência ao impacto e à ruptura e também a flexibilidade, são projetadas de modo a combinar com as do tecido implantado. Implantes incapazes de suportar solicitações mecânicas locais podem

fraturar, demandando uma nova intervenção cirúrgica. Já dispositivos muito rígidos colocados em tecidos flexíveis podem provocar a ruptura do tecido (Nair & Laurencin, 2007).

Ajustar a porosidade e a resistência mecânica de biomateriais por si só é um grande desafio, acrescenta-se ainda a necessidade de permitir uma boa integração deste com o tecido. Desde a década de 90, vem sendo publicados diversos artigos de revisão da literatura específicos dessa área. Para citar alguns, Ma e colaboradores (2007) trataram de questões como hidrofiliabilidade e rugosidade de superfícies e sua influência na adesão celular e Elbert & Hubbell (1996) descreveram detalhadamente os processos de adesão celular e fizeram uma extensa revisão de métodos de tratamento superficial utilizados para promover essa adesão.

No desenvolvimento de dispositivos para regeneração óssea, o tratamento superficial mais comumente utilizado é o recobrimento com fosfato de cálcio. Existem dois métodos bem estabelecidos para produzir esses recobrimentos, os métodos físicos e os métodos químicos. Os métodos físicos são aplicados geralmente aos metais e consistem na aplicação de métodos eletroquímicos de deposição dessas partículas, de tratamentos térmicos, ou ainda em métodos de deposição por spray (Kim, Kokubo *et al.*, 2000; Hata *et al.*, 1995). Em geral, esses métodos são agressivos, o que muitas vezes pode degradar o implante ou influenciar negativamente a adesão. Além disso, os métodos físicos não são adequados aos implantes poliméricos, uma vez que esses materiais não são estáveis nas condições de tratamento superficial. Assim, surgiram os métodos químicos na década de 90.

O método químico consiste na deposição de íons cálcio ou fosfato, ou até mesmo de cargas negativas, na superfície do material. Esses íons ou cargas permitem a nucleação de CaP aderido à superfície quando o material é imerso em soluções ricas nesses íons, como o fluido corpóreo simulado (*simulated body fluid* - SBF). Os métodos de formação de cargas negativas superficiais mais utilizados atualmente para promover a adesão do CaP à superfície, tem sido o tratamento por plasma (Yang *et al.*, 2008), que gera cargas negativas instáveis, e a hidrólise (Choong *et al.*, 2011), que gera cargas aniônicas. Em geral, cargas aniônicas são mais eficientes na promoção de núcleos. Alguns autores, como Madurantakam e colaboradores (2009); e Oyane e

colaboradores (2003) desenvolveram metodologias criativas para produzir cargas negativas numa superfície polimérica.

Choong e colaboradores (2011) avaliaram a eficiência de diversos tratamentos hidrolíticos sobre a superfície de filmes de PCL na nucleação de partículas de CaP. A nucleação foi feita por ciclos de imersão sequencial seguida de imersão em SBF por 24 horas. Foi observado que a extensão do recobrimento de CaP na superfície é dependente da extensão da hidrólise, o que mais uma vez comprova a eficiência de grupos aniônicos na nucleação de CaP.

Yang e colaboradores (2008) aplicaram um tratamento de plasma de argônio na superfície de membranas eletrofiadas de PCL antes de mineralizá-las em uma solução de SBF contendo 10 vezes as concentrações iônicas habituais (10 SBF). Nas condições utilizadas, as fibras são completamente recobertas por CaP biomimético em 2 horas de imersão à temperatura ambiente. Em seguida os materiais são imersos em SBF a 37°C e o recobrimento progride de fosfato de dicálcio dihidratado (DCPD) para apatita. DCPD é tido como precursor biológico para a nucleação de apatitas, que são os fosfatos de cálcio mais similares ao tecido ósseo.

Já Madurantakam e colaboradores (2009) avaliaram de forma sistemática a influência da composição do SBF na mineralização de membranas eletrofiadas de polidioxanona (PDO) e poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA). Para promover a nucleação do CaP incorporaram até 50% de nHA comercial na matriz polimérica. A informação mais relevante desse trabalho é que a formação de núcleos estáveis de fosfatos de cálcio é o fator limitante da cinética de mineralização e, surpreendentemente, a presença de grupos carboxilato terminais do polímero tem um efeito mais significativo na nucleação do que a presença de nHA comercial.

Dos trabalhos apresentados, o de Choong e colaboradores (2011) é o mais recente e apresenta um procedimento de nucleação das partículas de CaP que é bastante inovador. No entanto, Taguchi e colaboradores (1998) foram os primeiros a reporta-lo. Esse procedimento de ciclos de imersão sequencial para gerar núcleos de CaP na superfície ainda é pouco conhecido mas tem se difundido rapidamente, uma vez que é mais efetivo na adesão química de partículas de CaP na superfície, apesar de não eliminar a necessidade de um pré-tratamento como a hidrólise ou o plasma para criar

cargas negativas na superfície. Além disso, reduz sensivelmente o tempo necessário de tratamento superficial, que passa de semanas para apenas algumas horas (Oyane *et al.*, 2005).

Araujo e colaboradores (2008) realizaram um trabalho similar ao de Choong e colaboradores (2011). Nele prepararam membranas eletrofiadas de PCL que foram submetidas a tratamento hidrolítico alcalino e, em seguida, mergulhadas em uma solução de cloreto de cálcio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  por 24 horas e, posteriormente, em uma solução de hidrogenofosfato de cálcio por 15 min. Finalmente as membranas foram imersas em 1,5 SBF por períodos pré-determinados. As membranas que tiveram tratamento hidrolítico, mas não passaram pelo processo de nucleação, não apresentam deposição de CaP em sete dias de imersão. As demais apresentam volume de CaP depositado dependente do tempo de imersão. As membranas com quatro dias de imersão foram utilizadas para ensaios de viabilidade celular, utilizando células pré-osteoblásticas do tipo Saos-2. Foi observado que a presença do recobrimento de células pré-osteoblásticas, ao contrário do esperado, reduz a adesão celular no período de sete dias, por outro lado, mantém a membrana estável no período de 14 dias.

Taguchi e colaboradores (2001) utilizaram ciclos de imersão sequencial (até 100 ciclos) para recobrir filmes de polietileno (PE) enxertado em sua superfície com hidrogéis. A influência do tempo de ciclo, número de ciclos e a densidade de hidrogel na superfície do filme foram avaliados por gravimetria e expressos em  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Não foi utilizada a imersão em SBF. No XRD foram identificados picos de hidroxiapatita (HA) no recobrimento formado. Independente da duração de cada ciclo, quanto maior o número de ciclos e maior a densidade do recobrimento de hidrogel na superfície, maior a quantidade de CaP depositado.

Um novo método de geração de cargas negativas na superfície, visando o recobrimento de um dispositivo polimérico com fosfato de cálcio, está sendo proposto neste trabalho. Este método envolve o uso de pequenas concentrações de compostos que atuam como agentes promotores da nucleação e crescimento de CaP. Moléculas orgânicas aniônicas tem mobilidade em soluções poliméricas e também são capazes de migrar quando dispersas em uma matriz polimérica sólida. Assim, essas moléculas podem funcionar como agentes de nucleação quando o dispositivo polimérico é exposto

a soluções ricas em íons cálcio e fosfato. Neste trabalho, foram avaliadas 3 moléculas como agentes de nucleação: ácido esteárico, hidrogenofosfato de bis(2-etilhexila) e hidrogenofosfato de bis(metacrilóiloxietila).

Independente do método utilizado para produzir CaP, do ponto de vista estrutural este é um material extremamente complexo, pois possui inúmeras composições, morfologias e arranjos cristalinos. Um desafio nessa área é a caracterização de fosfatos de cálcio depositados em superfícies. Fatores como temperatura de síntese, concentração das soluções precursoras, tempo de exposição, disponibilidade de cargas geradoras de núcleos na superfície e muitos outros, influenciam significativamente o tipo de CaP formado.

Até o momento, os estudos sobre o recobrimento de superfícies com CaP têm concentrado esforços em comprovar sua formação e determinar a influência desta nas propriedades globais do material e no seu comportamento quando implantado. No entanto até agora, poucos foram bem sucedidos em determinar a composição do CaP formado. Provavelmente, isso é devido ao fato da identificação desses fosfatos, que em geral é feita por espectroscopia infravermelho (FT-IR), XRD ou microscopia eletrônica de transmissão (TEM), ser dificultada pela presença do substrato ou pela pequena quantidade presente. Desenvolver formas de caracterizar o CaP presente na superfície de implantes abrirá uma nova perspectiva para esses materiais, pois pode fornecer algumas respostas sobre o comportamento *in vitro* e *in vivo* de biomateriais revestidos. Nesse sentido, alguns avanços foram feitos por Mavis e colaboradores (2009); Serizawa e colaboradores (2001); Lebourg e colaboradores (2010) e Hata e colaboradores (1995).

Mavis e colaboradores (2009) avaliaram a habilidade de diferentes soluções de SBF de induzir o crescimento de CaP na superfície de membranas eletrofiadas de PCL sem nenhum tratamento prévio. Fatores como pH, concentração de íons fosfato e carbonato no SBF influenciam diretamente o tipo de fosfato formado e também o tipo de recobrimento das membranas. Foi demonstrado que é possível controlar o CaP formado na superfície e comprovar que a adesão, proliferação e diferenciação celular são dependentes do tipo de CaP formado devido à sua cristalinidade, porosidade e, principalmente, solubilidade.

Serizawa e colaboradores (2001) caracterizaram a composição das partículas por espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) e XRD. Neste caso, são formadas partículas de hidroxiapatita (HA) na superfície de filmes de polietileno (PE) enxertado com poli(álcool vinílico) (PVA) após 30 ciclos de imersão sequencial a 37°C sem imersão posterior em SBF.

O desenvolvimento de métodos versáteis e confiáveis para determinar a classe de CaP depositado em uma superfície permitirá determinar com maior precisão a composição do CaP depositado nas superfícies. Existem dois grupos principais de CaP conhecidos: os solúveis e os insolúveis. A solubilidade e cristalinidade são características determinadas pela síntese do CaP, as quais influenciam diretamente os processos de adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos em substratos (Mavis *et al.*, 2009).

Fosfatos de cálcio precipitados em temperatura corpórea (37°C), como fosfato de cálcio amorfo (ACP), fosfato de cálcio dihidratado (DCPD), fosfato de tricálcio (TCP) e fosfato de octacálcio (OCP) são solúveis e pouco cristalinos. Quando o CaP é consolidado em elevadas temperaturas (>900°C), ou sofre tratamentos hidrotérmicos após precipitação, são formados CaP pouco solúveis e altamente cristalinos, como a HA ou hidroxiapatita carbonatada (CHA). Em geral as formas mais solúveis de CaP são também mais porosas.



### 2.1. Objetivos gerais

Preparar, pelo método de inversão de fases induzida por vapor, membranas assimétricas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) contendo os agentes de nucleação: ácido esteárico, hidrogenofosfato de bis(2-etilhexila) ou hidrogenofosfato de bis(metacrilóioxietila). O uso desses agentes visa promover a nucleação e o crescimento de partículas de fosfato de cálcio na superfície das membranas. Utilizar ciclos de imersão sequencial para gerar partículas de fosfato de cálcio e avaliar a eficiência dos três agentes de nucleação utilizados na nucleação, crescimento e adesão das partículas de fosfato de cálcio na superfície da membrana de poli( $\epsilon$ -caprolactona).

### 2.2. Objetivos Específicos

- Aplicar o planejamento experimental *Box-Behnken* para otimizar o processo de preparação das membranas por inversão de fases induzida por vapor.
- Aplicar um planejamento fatorial  $2^{4-1}$  para otimizar o processo de imersão sequencial de crescimento de partículas de fosfato de cálcio na superfície das membranas.
- Avaliar a influência dos três agentes de nucleação utilizados no revestimento formado em termos de porcentagem de recobrimento, hidrofiliicidade, adesão e cristalinidade das partículas.
- Caracterizar os materiais obtidos, com e sem tratamento superficial por ciclos de imersão sequencial, em termos de propriedades físico-químicas.
- Caracterizar morfologicamente as membranas obtidas, com e sem tratamento superficial por ciclos de imersão sequencial, para correlacionar sua morfologia com as propriedades mecânicas e seu comportamento nos ensaios *in vitro*.

- Caracterizar as partículas de fosfato de cálcio depositadas na superfície quanto à morfologia e cristalinidade.
- Realizar ensaios *in vitro* de mineralização, degradação hidrolítica e citocompatibilidade, para avaliar o potencial de utilização desse material como membrana de regeneração óssea guiada.

## Capítulo 3 – Procedimento Experimental

### 3.1. Materiais utilizados

Para o preparo das soluções poliméricas precursoras que deram origem às membranas foi utilizado o polímero poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) (Scientific Polymer) e o solvente tetrahidrofurano (THF) (LabSynth). A PCL utilizada possui  $M_w$  158.000 g mol<sup>-1</sup>, polidispersidade 1,6 (quantificados por GPC) e densidade 1,145 g cm<sup>-3</sup> (especificada pelo fabricante). Sua estrutura química está representada na Figura 8.

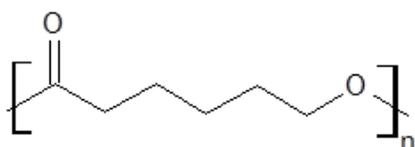


Figura 8 - Estrutura química da poli( $\epsilon$ -caprolactona).

Foram avaliados 3 agentes de nucleação, que foram adicionados separadamente nas soluções precursoras, quando necessário: ácido esteárico (285,5 g mol<sup>-1</sup>) (LabSynth), hidrogenofosfato de bis(2-etilhexila) (322,4 g mol<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich) e hidrogenofosfato de bis(metacrilóioxietila) (322,2 g mol<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich). As estruturas químicas desses compostos estão apresentadas na Figura 9.

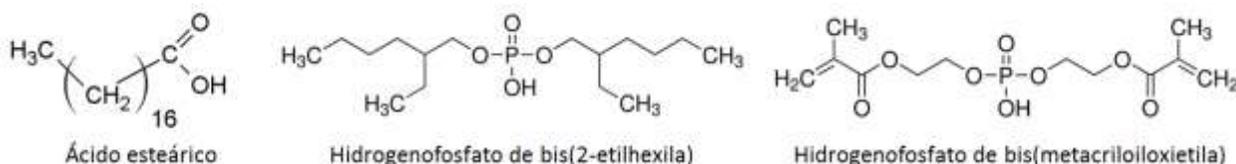


Figura 9 - Estrutura química dos agentes de nucleação utilizados.

Foram preparadas soluções aquosas de hidrogenofosfato de diamônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (LabSynth) e nitrato de cálcio (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) (LabSynth) para realizar o tratamento superficial das membranas. Nos ensaios de mineralização foi utilizado o tampão fosfato salino (PBS) (Sigma-Aldrich), solubilizado em 250 mL de água

deionizada. Para o preparo de amostras para microscopia foram empregados o corante alaranjado de acridina ( $C_{12}H_{19}N_3$ ) (Sigma-Aldrich) e álcool isopropílico ( $C_3H_8O$ ) (LabSynth). Todos os materiais foram utilizados conforme recebidos.

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Preparações**

#### **3.2.1.1. Preparo das membranas (VIPS)**

Em uma câmara acrílica com três prateleiras foi inserido um béquer com 200 mL de água deionizada, no qual foi borbulhado gás nitrogênio ininterruptamente na vazão de 200 mL  $\text{min}^{-1}$ . Durante todo o funcionamento da câmara sua temperatura e umidade relativa foram acompanhadas, utilizando um termohigrômetro Incoterm com precisão de 1 °C e 5% umidade. Outra medida da umidade relativa da câmara foi feita com o uso de outro higrômetro, de mesma precisão, posicionado na prateleira superior. A umidade relativa dentro da câmara apresentou-se entre 75% e 99%, sendo 75% no higrômetro superior e 99% no termohigrômetro inferior, mantido ao lado do béquer com água. A temperatura de trabalho permaneceu na faixa de 19 °C a 24 °C. O borbulhamento de nitrogênio foi mantido constante ao longo de toda a operação da câmara, e iniciado 12 horas antes do início do processo de preparação das membranas.

Para o preparo da solução polimérica precursora das membranas, 2,2 g de PCL foram dissolvidos em 15 g de THF por aproximadamente 3 horas, ou até a completa dissolução do polímero. O agente de nucleação, quando utilizado, foi dissolvido separadamente em 1 g de THF. A concentração de agente de nucleação utilizada, referente à massa final da membrana, foi de aproximadamente 0,2% (em massa), ou 4,4 mg, para o ácido esteárico, e 4,9 mg para hidrogenofosfato de bis(2-etilhexila) ou de hidrogenofosfato de bis(metacrilóioxietila). A solução de agente de nucleação em THF foi adicionada à solução de PCL após ser imersa em banho de ultrassom por 5 min. Na ausência do agente de nucleação, 1 g de THF foi adicionado após a completa dissolução do polímero, para manter a concentração da solução constante. Finalmente,

foram adicionados, gota-a-gota, 1,8 g de água deionizada com o auxílio de uma seringa descartável.

Após a adição de todos os componentes, a solução precursora, contendo 11% (em massa) de PCL, 9% (em massa) de água de ionizada e, quando necessário, 0,2% (em massa) de agente de nucleação, foi homogeneizada por 1 hora e deixada em repouso por 30 min, antes do preparo da membrana para eliminação de bolhas de ar. Todas as concentrações aqui apresentadas foram obtidas a partir dos resultados das otimizações experimentais realizadas no desenvolvimento deste trabalho e serão melhor discutidas no capítulo 4.

A Figura 10 apresenta um esquema do preparo das membranas. Sobre a superfície de uma placa de vidro, limpa com THF, contendo lateralmente dois fios esticados de níquel-cromo de 0,71 mm de espessura, foi espalhada a solução de polímero com o auxílio de um bastão de vidro. A placa de vidro contendo a solução espalhada foi colocada imediatamente na câmara de vapor, onde permaneceu por 5 horas. Após esse período, a membrana formada foi removida da placa de vidro e seca à temperatura ambiente por 24 horas. Os fios de níquel cromo esticados foram utilizados para promover o controle da uniformidade de espessura da membrana.

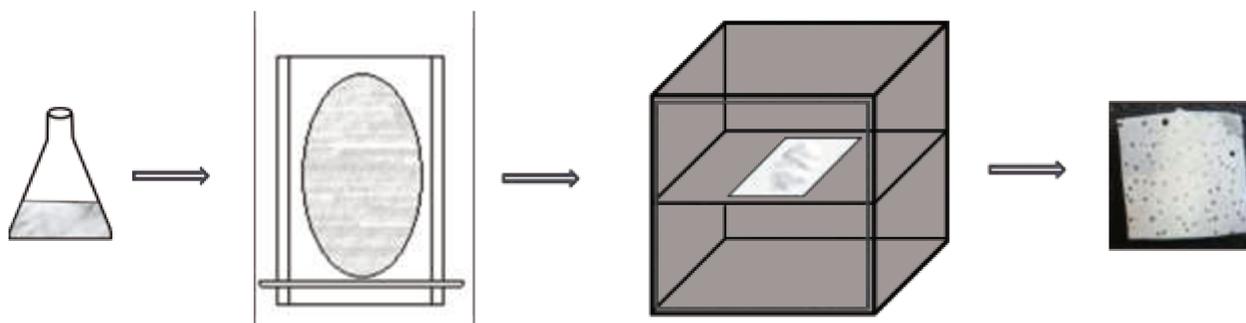


Figura 10 – Representação esquemática da metodologia de preparo das membranas assimétricas de PCL por inversão de fases induzida por vapor (VIPS).

### 3.2.1.2. Tratamento superficial – ciclos de imersão sequencial

O procedimento de imersão sequencial, ou *alternating soaking*, utilizado para promover a deposição de partículas de fosfato de cálcio na superfície das membranas,

foi adaptado de Serizawa e colaboradores (2001) e baseia-se em ciclos de imersão alternada do material de interesse em soluções ricas em íons cálcio e íons fosfato.

Inicialmente, foram preparadas as soluções de imersão em água deionizada para evitar contaminação de outros íons. Foi utilizada a concentração de  $400 \text{ mmol L}^{-1}$  para nitrato de cálcio, e a concentração de  $240 \text{ mmol L}^{-1}$  para hidrogenofosfato de diamônio. O pH foi ajustado para 7,4 em ambas as soluções. Para possibilitar o controle da temperatura, as soluções foram imersas em um banho termostaticado Quimis modelo 214 D2, a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  por 1 hora antes dos ciclos de imersão sequencial.

A Figura 11 apresenta esquematicamente o procedimento utilizado para completar um ciclo de imersão. No total, foram realizados 10 ciclos de imersão sequencial, com renovação das soluções de imersão, tanto de cálcio quanto de fosfato, a cada dois ciclos. Para um ciclo de imersão, primeiramente a membrana de interesse é mergulhada por 30 s na solução de nitrato de cálcio e, em seguida, lavada com água deionizada. Para evitar a diluição das soluções de imersão, o excesso de água é removido com um papel de filtro. A seguir a membrana é mergulhada, também por 30s, na solução de hidrogenofosfato de diamônio, e posteriormente lavada novamente com água deionizada e seca em papel de filtro. Após o término dos 10 ciclos de imersão sequencial a membrana foi seca por 12 horas à temperatura ambiente.

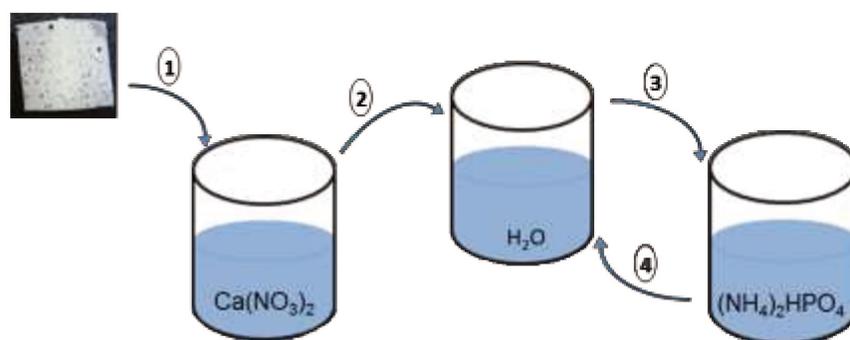


Figura 11 – Representação esquemática do procedimento experimental de um ciclo de imersão sequencial.

### 3.2.1.3 Filmes obtidos por *spin coating*

Os filmes preparados pelo método de *spin coating* foram utilizados para as análises de ângulo de contato, visto que a rugosidade da superfície das membranas interfere nessa medida. Esses filmes também foram utilizados para a preparação de amostras para microscopia eletrônica de transmissão, devido à sua pequena espessura.

Foram preparadas soluções precursoras de 6% (em massa) de PCL em THF filtrado, para eliminar possíveis materiais particulados que interferissem na análise de microscopia eletrônica de transmissão. Quando necessário, foi adicionado 0,1% (em massa) do agente de nucleação de interesse. A concentração de PCL utilizada foi menor do que a utilizada para o preparo das membranas, devido à necessidade de utilizar uma menor viscosidade da solução polimérica nesse método.

Lamínulas de vidro de 4 cm<sup>2</sup> foram utilizadas como substrato suporte. Essas lamínulas foram lavadas com água e detergente e enxaguadas com água destilada antes de serem imersas em THF filtrado por 15 minutos. Em seguida, foram recobertas com uma fina camada de carbono, utilizando metalizador Balzers modelo Bal-Tec MD20, para facilitar a posterior remoção dos filmes finos.

O equipamento de marca Laurell modelo WS-650 series de *spin coating* possui um suporte, onde o substrato foi posicionado e fixado por sucção a vácuo. A preparação do filme nesse substrato consistiu da adição de 0,75 mL da solução precursora sobre o substrato, que foi imediatamente rotacionado em um processo em 3 etapas: 500 rpm por 5 s; 2000 rpm por 3 s e 4000 rpm por 55 s. Durante as etapas de rotação houve a evaporação do solvente, e conseqüente formação de um filme extremamente fino e liso. Foi mantido um fluxo constante de nitrogênio seco durante todo o experimento. Em alguns casos foi necessário avaliar os filmes produzidos por *spin coating* após o seu tratamento superficial. Nestes casos, após a preparação dos filmes sobre a lamínula, esta foi submetida aos ciclos de imersão sequencial, descritos no item 3.2.1.2.

## **3.2.2. Caracterizações**

### **3.2.2.1. Microscopia laser confocal (LSCM)**

A microscopia laser confocal é um tipo de microscopia de fluorescência. Logo foi necessário realizar o tingimento prévio das membranas com um corante fluorescente, para contrastar as regiões que contém ácido esteárico. Para isso foi utilizada uma solução de alaranjado de acridina  $1 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. O comprimento de onda de excitação desse corante é 470 nm e o de emissão é 530 nm (Lakowicz, 2006).

Para simular o tempo de exposição das membranas às soluções de cálcio e fosfato, durante os ciclos de imersão sequencial, as membranas foram imersas por 30 s na solução de corante, lavadas e secas em papel de filtro. Esse processo foi realizado 20 vezes, sem trocar a solução de corante. As membranas coradas foram secas a vácuo por 24 horas.

Após o coramento, as membranas foram fixadas em uma lâmina de microscópio, com o auxílio de uma lamínula, e inseridas em um microscópio Confocal Leica modelo TCS SP5X. Foi utilizado o laser de 488 nm para excitação do corante e, para digitalização da intensidade de emissão, para reproduzir a imagem digitalmente, foi utilizado um fotomultiplicador selecionado na faixa de 520 nm a 540 nm.

Cada imagem apresentada neste trabalho é a composição de 76 seções de 1,33 µm de espessura, obtidas em diferentes distâncias focais obtidas utilizando o software Las AF para compor uma única imagem 2D que corresponde à uma região 3D de aproximadamente 100 µm de espessura, sendo que a espessura total de uma membrana é aproximadamente 700 µm.

### **3.2.2.2. Porosidade**

#### **3.2.2.2.1. Porosidade relativa**

A porosidade relativa foi calculada a partir do procedimento descrito por Liao e colaboradores (2012). Foram recortadas três seções, de aproximadamente 15 mg cada, de regiões diferentes da membrana. Essas seções foram mantidas imersas em água deionizada por 8 horas com o auxílio de um fio de níquel-cromo amarrado à tampa do frasco. A temperatura foi controlada utilizando um banho termostaticado a 25°C.

Após as 8h de imersão, as seções foram cuidadosamente secas com papel de filtro, para remover o excesso de água na superfície, e pesadas em balança analítica recém calibrada. Em seguida, foram secas a vácuo por 24 horas e pesadas novamente. A partir das massas obtidas, a porosidade foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\varepsilon = \frac{(M_{\text{molhada}} - M_{\text{seca}})/0,997}{(M_{\text{molhada}} - M_{\text{seca}})/0,997 + M_{\text{seca}}/1,145}$$

onde  $M_{\text{molhada}}$  é a massa da membrana após 8 horas de imersão em água;  $M_{\text{seca}}$  é a massa da membrana após a secagem; 0,997 é a densidade da água (em  $\text{g cm}^{-3}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ ), e 1,145 é a densidade da PCL a  $25^{\circ}\text{C}$  (especificada pelo fabricante), também em  $\text{g cm}^{-3}$ . A partir dos valores obtidos para a triplicata das medidas foi calculada a média e o desvio padrão.

### 3.2.2.2. Porosidade volumétrica

A porosidade volumétrica foi calculada a partir do procedimento descrito por Li e colaboradores (2010) e é baseada na variação do volume ocupado por uma mesma matriz quando preparada na forma densa (teórico) ou porosa. Três seções de aproximadamente  $3 \text{ cm}^2$ , de diferentes regiões da membrana, pesando aproximadamente 30 mg, tiveram suas massas aferidas em microbalança Perkin-Elmer modelo AD-6, suas áreas aferidas com paquímetro e suas espessuras em um micrômetro. O volume das membranas foi obtido por multiplicação da área pela espessura da membrana e a porosidade total foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\varepsilon = \frac{V_m - M_m/1,145}{V_m}$$

onde  $V_m$  é o volume da membrana, em  $\text{cm}^3$ ; 1,145 é a densidade do polímero em  $\text{g cm}^{-3}$  (fornecida pelo fabricante); e  $M_m$  é a massa da membrana. A partir dos valores obtidos para a triplicata das medidas foi calculada a média e o desvio padrão.

### 3.2.2.3. Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

A análise de DSC foi realizada em um DSC TA Instruments modelo Q100. Foram utilizados aproximadamente 2 mg de amostra. A rampa de aquecimento foi realizada de acordo com a norma ASTM D3418-12: primeiro aquecimento de 10 °C a 100 °C, resfriamento de 100 °C a -40 °C e segundo aquecimento de -40 °C a 100 °C, todos na taxa de 20 °C min<sup>-1</sup>. A isoterma utilizada entre os aquecimentos e o resfriamento foi de 5 min.

Para os materiais preparados fora do planejamento de experimentos foram utilizados aproximadamente 5 mg de amostra e a seguinte rampa de aquecimento: primeiro aquecimento de 10 °C a 100 °C, sob uma taxa de 20 °C min<sup>-1</sup>, resfriamento de 100 °C a -90 °C, na velocidade de 10 °C min<sup>-1</sup>, e segundo aquecimento de -90 °C a 100 °C, na taxa de 20 °C min<sup>-1</sup>. Todas as análises foram realizadas em atmosfera inerte com 5 min de isoterma entre as rampas de aquecimento e resfriamento.

A partir dos valores de entalpia de fusão obtidos no segundo aquecimento, foi calculado o grau de cristalinidade dos materiais de interesse, utilizando a seguinte equação, descrita por Liu, Han e colaboradores (2010):

$$X_c = \frac{\Delta H_f}{136,0} \times 100 \%$$

onde  $\Delta H_f$  (J g<sup>-1</sup>) é a entalpia de fusão obtida no DSC, 136,0 J g<sup>-1</sup> é a entalpia de fusão da PCL 100% cristalina. Este valor é estimado e tabelado, e também foi utilizado no trabalho de Liu, Han e colaboradores (2010).

### 3.2.2.4. Análise dinâmico-mecânica (DMA)

Tiras de 5 mm x 20 mm das membranas foram ensaiadas no modo de tensão em um DMTA Rheometric Scientific Instrument modelo V, utilizando frequência de 1 Hz e amplitude de 0,3%. A temperatura variou de -150 °C a 80 °C sob uma taxa de aquecimento de 5 °C min<sup>-1</sup>.

### 3.2.2.5. Ângulo de contato

O ângulo de contato dos filmes preparados por *spin coating* foi determinado em um tensiômetro Attesion modelo Theta Lite Optical. Foram realizadas medidas de cinco regiões diferentes de cada lamínula contendo a amostra, utilizando gotas de água deionizada de aproximadamente 2,5  $\mu\text{L}$ . Para cada amostra foram avaliadas pelo menos duas lamínulas, o que produziu um mínimo de 10 medidas para cada filme fino avaliado.

O ângulo de contato de cada gota foi acompanhado ao longo de 90 s. Para cada medida foi calculada a média dos ângulos dos lados direito e esquerdo da gota. Essas médias foram plotadas em um gráfico, em função do tempo, em conjunto com a variação do volume da gota, também em função do tempo, conforme representado na Figura 12.

Para obter o ângulo de contato, a partir da Figura 12, foi realizado um ajuste linear na curva de ângulo de contato x tempo. Foi delimitada para o ajuste linear a região da curva entre o ponto de estabilização do volume da gota e o ponto final em 90 s, conforme representado pela linha vermelha da Figura 12. Foi considerado o valor de ângulo de contato como sendo o coeficiente linear da reta ajustada. Este método de obtenção do ângulo de contato, a partir do coeficiente linear, foi desenvolvido neste trabalho. Não foram encontrados relatos similares na literatura.

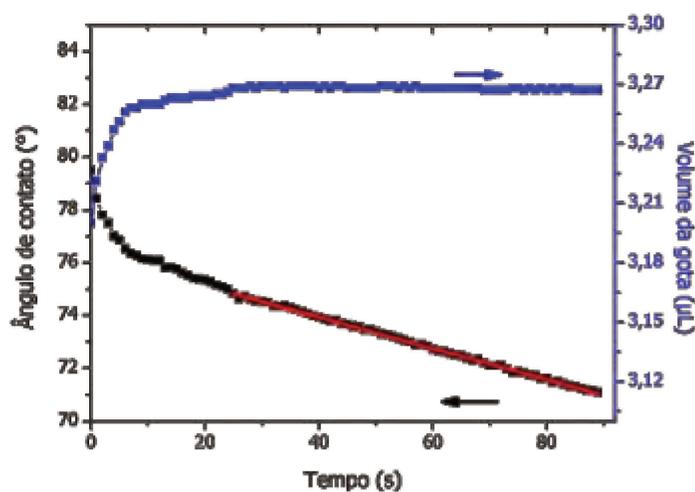


Figura 12 – Exemplo de medida do ângulo de contato.

### 3.2.2.6. Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

As amostras de seção transversal das membranas foram previamente preparadas por fratura criogênica em nitrogênio líquido, após congelamento por 45 min. As seções transversais, bem como as duas superfícies das membranas foram metalizadas com liga ouro-paládio em metalizador Balzers modelo Bal-Tec MD20. As microscopias foram realizadas em microscópio JEOL modelo JSM-6360 em uma voltagem de aceleração de 5 kV.

### 3.2.2.7. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada inicialmente para verificar a morfologia dos esferulitos e a influência do agente de nucleação nessa morfologia. Para isso, as membranas avaliadas foram recobertas, somente na face do substrato, por uma fina camada de carbono, e embutidas em resina Eponate 12 de dureza média. Após cura de 72 horas a 40 °C foram cortadas a -120 °C, em um crioultramicrotomo Leica modelo EM UC6 utilizando faca de diamante Diatome de 45°, para obtenção de cortes ultrafinos de 25 nm de espessura. As micrografias foram obtidas em microscópio Zeiss modelo EM 902, sob voltagem de aceleração de 80 kV, utilizando um espectrômetro de filtro de energia Castaing-Henry acoplado à coluna. As imagens foram gravadas utilizando uma câmera CCD Proscan de alta resolução e processadas no software Analysis.

Além da avaliação das membranas em si, também foi avaliada por TEM a morfologia das partículas de fosfato de cálcio formadas. Para isso, dois tipos de amostras foram preparados. Para avaliar a morfologia das partículas aderidas à matriz polimérica, os filmes preparados por *spin coating* foram seccionados com o auxílio de um bisturi e imersos em água deionizada para retirada das pequenas seções aderidas à superfície da lamínula. As seções de tamanho e transparência adequados foram transferidas para grades de 400 mesh com auxílio de uma pinça.

Para analisar as partículas adsorvidas sobre as membranas, telas de 600 mesh recobertas com filme de parlódio foram postas em contato com as membranas. As partículas aderidas na tela foram fixadas com isopropanol. As micrografias dessas partículas foram obtidas em microscópio Zeiss modelo Libra 120, operando sob

voltagem de aceleração de 120 kV. Neste caso, as partículas também foram analisadas por difração de elétrons e espectroscopia de perda de energia de elétrons (EELS).

### **3.3 Ensaios *in vitro***

#### **3.3.1. Degradação hidrolítica**

O procedimento utilizado para a avaliação da degradação hidrolítica foi adaptado da norma ASTM F1635-11. Foram cortadas quatro seções de aproximadamente 6 mg e 0,25 cm<sup>2</sup> de área de cada uma das membranas. A massa inicial dessas membranas foi aferida em microbalança. As amostras foram colocadas, separadamente, em frascos contendo 12,5 g de água deionizada, os quais foram acondicionados a 37 °C em um banho ultratermostatizado Marconi modelo MA184. Após 24 horas de degradação, duas seções de cada amostra foram retiradas da água e secas a vácuo por mais 24 horas. As outras duas seções de cada amostra foram retiradas com 30 dias de ensaio e também secas a vácuo por 24 horas. O pH da água de cada frasco foi acompanhado periodicamente, utilizando pHmetro Metrohm modelo 827 pH lab recém calibrado.

O acompanhamento da degradação foi feito pela aferição da massa após degradação, tanto em 24 horas quanto em 30 dias. Além disso, foram realizadas análises de SEM e cromatografia de permeação em gel (GPC) das membranas após 30 dias de degradação e também das membranas não degradadas, para comparação.

O procedimento utilizado para SEM foi o mesmo descrito anteriormente. Para análise de GPC, 6 mg de amostra foram dissolvidos em 2 mL de THF filtrado. Após a completa dissolução do polímero, a solução resultante foi filtrada em filtro Watchman de PVDF 0,21 µm. Finalmente, 700 µL dessa solução foram injetados em um cromatógrafo Viscotek GPCmax modelo VE2001, com detectores de índice de refração Viscotek modelo VE 3580 e UV detector 2500. O equipamento foi calibrado utilizando padrões de poliestireno e os dados processados no software OMNISec.

#### **3.3.2. Mineralização**

Seções de aproximadamente 6 mg e 0,25 cm<sup>2</sup> das membranas tiveram suas massas aferidas em microbalança. Em seguida, foram mantidas imersas em PBS a 37

°C, em banho termostatzado por 1 hora. Após esse período, foram lavadas com água deionizada e secas a vácuo por 24 horas. Finalmente, a massa das membranas foi aferida novamente e sua morfologia avaliada por SEM, de acordo com o procedimento já descrito.

### 3.3.3. Citocompatibilidade

A avaliação da citocompatibilidade por meio do ensaio metabólico do MTT foi realizada no laboratório da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Duek na Pontifícia Universidade Católica - campus Sorocaba. Neste ensaio foram utilizadas células osteoblásticas primárias, obtidas de fragmentos ósseos da calvária de ratos Wistar com 20 dias de idade. Essas células foram semeadas sobre as membranas na concentração de  $1 \times 10^3$  células mL<sup>-1</sup>. Após 1, 5 e 12 dias, que são os tempos pré-determinados de cultivo, os poços de cultura contendo as amostras aderidas ao fundo, foram esgotados do meio de cultivo e lavados 3 vezes com solução tampão PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Em seguida, 100 µL de meio de cultivo contendo 10 µL de MTT (5 mg mL<sup>-1</sup>) foram inseridos aos poços e deixados reagir no escuro por 4 horas a 37 °C. Novamente, os poços foram esgotados e 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados para dissolver os cristais. As soluções obtidas foram transferidas para uma nova placa de poços de poliestireno, onde sua absorbância foi avaliada a 570 nm em um leitor de microplacas Bio-Tek Instruments modelo Elx-800-UV. Esses ensaios foram realizados em triplicata, e os valores obtidos submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey, com 95% de confiança, para determinar a significância das variações.

## Capítulo 4 – Resultados Preliminares

---

### 4.1. Evidências da geração de cargas negativas na superfície

Existem diversos fatores que devem ser levados em consideração ao se preparar membranas assimétricas por inversão de fases. Uma etapa chave na preparação desses materiais é a preparação da solução precursora, já que a interação entre o polímero e o solvente na solução interfere significativamente na cinética de inversão de fases. O tipo de solvente, a temperatura de dissolução e a concentração de polímero são apenas alguns dos muitos fatores que determinam a qualidade dessas interações (Li *et al.*, 2010).

As principais interações intramoleculares e intermoleculares presentes nas cadeias poliméricas da PCL são do tipo van der Waals. Além disso, existem também interações do tipo dipolo-dipolo (devido aos grupos ésteres). Esse conjunto de interações produz um polímero de baixa temperatura de fusão, insolúvel em água, mas que se solubiliza facilmente em solventes oxigenados apolares. A literatura reporta o uso de diclorometano, trifluoretanol, benzeno, 1,4-dioxano, clorofórmio e THF para solubilizar PCL.

Para selecionar o solvente para esse trabalho, foram excluídos benzeno, trifluoretanol, clorofórmio e diclorometano, devido à elevada toxicidade dos mesmos. Como reportado por Li e colaboradores (2010), a temperatura de dissolução do polímero pode alterar a morfologia da membrana. Então, como PCL funde a 60°C, todos os solventes foram testados em temperatura ambiente. Foram utilizados 1,4-dioxano, acetona, acetato de etila e THF para produzir soluções 20% (em massa) de PCL. Exceto a solução de acetona, que não ficou homogênea após 24 horas de agitação magnética, todas as soluções foram espalhadas sobre uma placa de vidro e deixadas evaporar, com o objetivo de verificar a qualidade do filme formado.

O filme formado a partir de acetato de etila ficou muito quebradiço, enquanto que THF e 1,4-dioxano produziram filmes mais flexíveis. Como no processo VIPS a volatilidade do solvente determina o tempo de inversão de fases, foi escolhido o THF que, por ser mais volátil, produziu membranas altamente porosas em um menor período de tempo.

Após selecionar o solvente, foi necessário verificar se a câmara de preparação seria adequada para promover a inversão de fases induzida por vapor. Usualmente, para obter uma atmosfera de umidade controlada, gás nitrogênio é borbulhado lentamente em água até sua saturação e, em seguida, misturado com o mesmo gás seco em proporções variáveis, antes de ser inserido ao ambiente. Como não havia no laboratório disponibilidade de um sistema com tal controle, foi inserido um béquer com água diretamente dentro da câmara.

A câmara foi mantida em operação por sete dias consecutivos para verificar sua estabilidade. Nesse período, a umidade foi mantida nos seguintes valores: na parte inferior da câmara, mais próximo do béquer, em torno de 100%, e na parte superior em torno de 75%. Esse gradiente de umidade mostrou-se estável ao longo dos sete dias de ensaio. Foi observado que a atmosfera encontrava-se acima do ponto de orvalho, devido ao embaçamento da câmara. Com o intuito de verificar se esse gradiente de umidade ocasionaria alterações significativas na morfologia da membrana, diversas membranas foram preparadas, em diversas regiões da câmara e em dias diferentes. A morfologia das membranas, bem como o diâmetro médio dos poros (avaliado por SEM), não apresentaram nenhuma alteração. Portanto, o sistema foi considerado adequado.

Depois de estabelecidas as condições experimentais em relação ao solvente e ao sistema para a produção das membranas porosas, foi avaliada uma forma de criar cargas negativas na superfície dessas membranas. Como já dito anteriormente, e evidenciado no trabalho de Tanahashi e colaboradores (1997), cargas negativas são eficazes em promover a nucleação e crescimento de partículas CaP. Em seu trabalho, Tanahashi e colaboradores (1997) comprovaram a influência de cargas superficiais na deposição de CaP, por ciclos de imersão sequencial, em uma superfície. Demonstraram que não é possível depositar CaP em superfícies neutras ou carregadas positivamente, enquanto que em superfícies carregadas negativamente a taxa de deposição depende da polaridade dos grupos aniônicos disponíveis.

Neste trabalho, a inspiração para promover a criação de grupos aniônicos na superfície dessas membranas foi encontrada em um processo amplamente utilizado pela indústria. Em seu livro, Fink (2010) descreve o uso de compostos anfifílicos de baixa massa molar como aditivos *antifog*, na indústria de embalagens alimentícias.

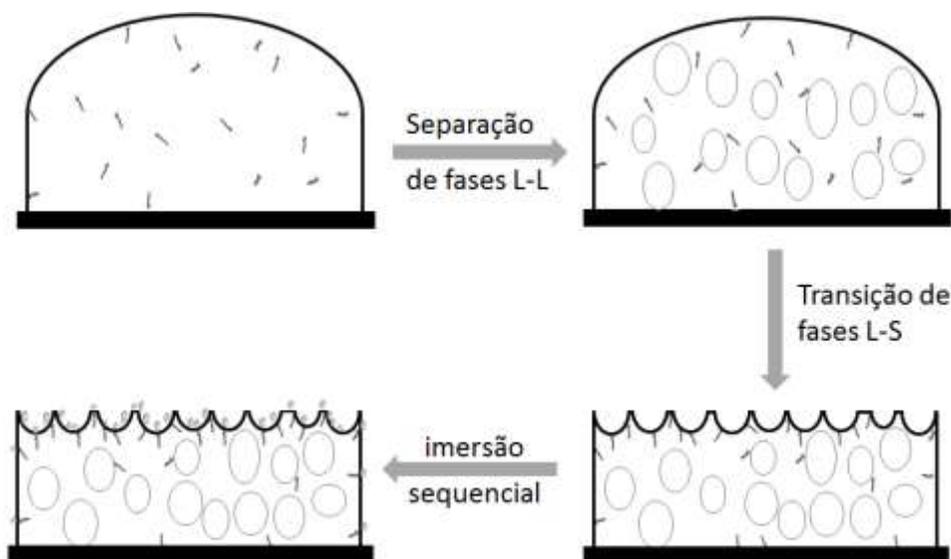
Aditivos *antifog* são utilizados principalmente na produção de filmes transparentes para embalagem de produtos refrigerados. *Fog* significa neblina. Logo, um aditivo *antifog* é aquele que elimina a neblina, ou seja, impede que a embalagem se torne embaçada com o decorrer do tempo de armazenamento refrigerado do produto.

Polímeros hidrofóbicos interagem fracamente com água, sendo assim, quando esta se condensa em sua superfície ocorre a formação de gotículas. Esta é a origem do embaçamento. Para impedir que isso ocorra, é necessário tornar a superfície mais hidrofílica. A função do agente *antifog* é migrar para a superfície do polímero, voltando sua cabeça polar à atmosfera saturada em água. Com a inserção de uma quantidade suficiente de cabeças polares na superfície do filme polimérico, o seu caráter hidrofílico aumenta, permitindo que a água se espalhe sobre essa superfície. O *antifog* mais utilizado atualmente é o estearato de zinco, cuja cabeça polar é um grupo carboxilato. Em geral é adicionado em torno de 2% em massa desse composto ao polímero.

Partindo-se da hipótese de migração de moléculas anfifílicas, ou que contenham grupos suficientemente polares, dispersas em soluções de polímeros em solventes apolares e expostas a uma atmosfera hidrofílica, é proposto o mecanismo de formação das membranas apresentado esquematicamente na Figura 13.

Uma molécula orgânica aniônica (daqui por diante denominada agente de nucleação) é adicionada à solução polimérica. Em seguida, também se adiciona água, gota-a-gota, à solução. O objetivo de adicionar água à solução é controlar a inversão de fases e aumentar a porosidade da membrana obtida.

Essa solução é então espalhada sobre um substrato e exposta à atmosfera saturada de vapor de água para que ocorra a separação de fases L-L. Nesta condição, o agente de nucleação, pouco solúvel em água, permanece na fase rica em PCL, e pode migrar para a interface polímero-atmosfera saturada, orientando seu grupo polar aniônico para a fase rica em água.



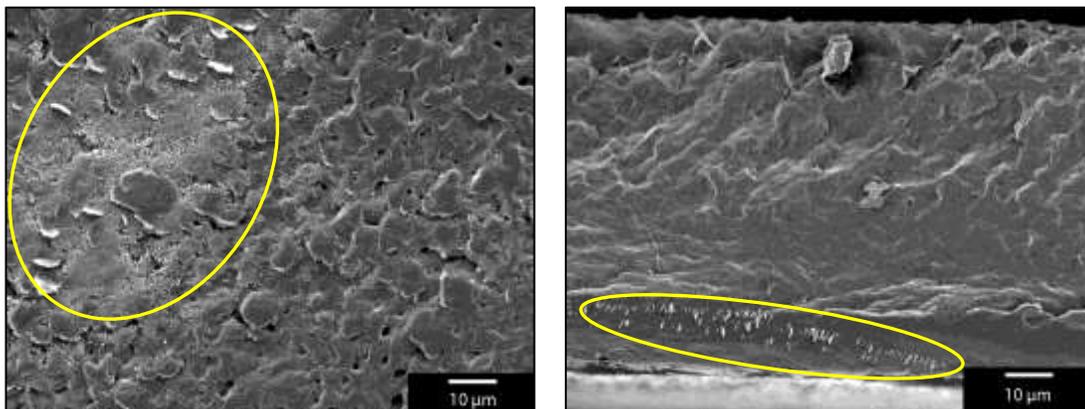
**Figura 13 - Representação esquemática do método de obtenção de membranas com íons aprisionados na superfície.**

Conforme a inversão de fases progride, a fase rica em polímero pode solidificar por cristalização, consolidando a membrana e fixando o agente de nucleação não só na superfície da membrana, mas também na superfície dos poros. Assim, os ânions presentes na superfície servirão de sítios de nucleação para a formação das partículas de fosfato de cálcio em uma etapa posterior de ciclos de imersão sequencial.

O aditivo *antifog* mais utilizado na indústria é o estearato de zinco que é bastante insolúvel. Neste trabalho, o primeiro agente de nucleação avaliado foi o estearato de amônio. O íon amônio foi escolhido por ser um íon lábil, que pode ser trocado pelo íon  $\text{Ca}^{+2}$  fixando-o na superfície da membrana e permitindo a nucleação de CaP. No entanto, conforme pode ser observado na Figura 14, não foi possível obter uma dispersão uniforme deste aditivo na membrana. Mesmo em concentrações muito pequenas, como 0,2% (em massa), foi possível observar a formação de cristais e agregados de estearato de amônio distribuídos na membrana.

Na tentativa de melhorar a solubilização do agente de nucleação, foram testados diferentes solventes, diferentes concentrações de polímero, de estearato de amônio e de água, mas não foi possível eliminar a agregação do estearato de amônio, possivelmente devido à baixa solubilidade deste em THF e também na PCL. Após vários testes, o procedimento que resultou na menor extensão de agregação foi o de

solubilizar, em concentrações reduzidas, estearato de amônio em THF a 50°C e adicionar a solução aquecida à solução polimérica, à temperatura ambiente, antes de espalhar a solução no substrato.



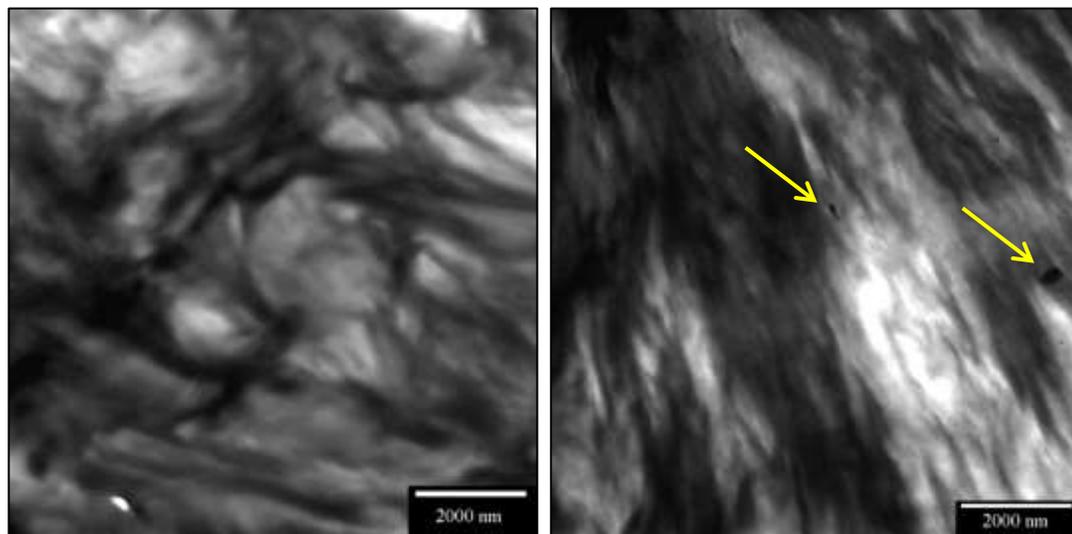
**Figura 14 - Micrografias eletrônicas de varredura da superfície livre (esquerda) e da seção transversal (direita) de uma membrana densa contendo 1,0% (em massa) de estearato de amônio.**

Mesmo sem a completa dispersão do agente de nucleação, foram realizados os ciclos de imersão sequencial, de acordo com o procedimento adaptado de Serizawa e colaboradores (2001). Foi observado que, mesmo ocorrendo em uma distribuição não uniforme, houve deposição de fosfato de cálcio na superfície da membrana. Além disso, foi verificado que os aglomerados de estearato de amônio modificaram as propriedades térmicas e mecânicas do polímero. Contudo, o principal aspecto negativo dessas aglomerações seria a possibilidade de produzirem concentrações locais de íon amônio no meio corpóreo ou alterações no pH local quando implantadas, o que poderia levar a uma resposta inflamatória indesejável no tecido implantado. A citotoxicidade desse agente de nucleação foi confirmada em um ensaio de citocompatibilidade pelo método do ensaio metabólico do MTT, e por esse motivo foram utilizados outros agentes de nucleação.

Durante o preparo do estearato de amônio foi observado que o seu precursor, o ácido esteárico é solúvel em THF à temperatura ambiente dentro da faixa de concentrações utilizadas no trabalho. O ácido esteárico contém um grupo carboxílico em sua estrutura. É razoável esperar que durante o processo de inversão de fases este

grupo polar migre para a superfície. Além disso, é razoável esperar também que quando a membrana, contendo grupos carboxílicos aprisionados em sua superfície, for imersa nas soluções aquosas, esta disponha de grupos aniônicos para nucleação de CaP, devido a formação de grupos carboxilato pela desprotonação dos grupos carboxílico. Portanto, o ácido esteárico também foi avaliado como um possível agente de nucleação.

Diversos testes foram realizados utilizando ácido esteárico como agente de nucleação e foi possível observar que abaixo de 0,5% (em massa) de ácido esteárico não havia aglomerados visíveis por SEM. Para confirmar a solubilização do ácido esteárico na matriz polimérica, as membranas obtidas foram analisadas por TEM. A Figura 15 apresenta uma membrana porosa preparada por VIPS e outra densa, preparada por evaporação controlada de solvente.



**Figura 15 - Micrografias eletrônicas de transmissão de membranas contendo 0,5% (em massa) de ácido esteárico, preparadas por VIPS (esquerda) e por evaporação controlada de solvente (direita).**

É possível observar que não há nenhum cristal ou aglomerado de ácido esteárico na membrana preparada por VIPS, enquanto que na membrana densa é possível identificar nanocristais de ácido esteárico (evidenciados por flechas amarelas). Observa-se também que as lamelas dos esferulitos de PCL na membrana densa são alongadas e orientadas. Esse resultado indica que possivelmente o ácido esteárico

solubilizado esteja alojado na região interlamelar, e não na superfície, como era esperado. É provável que isso tenha ocorrido na membrana densa devido à menor área superficial, como também ao fato de ter sido obtida por evaporação controlada, e não por VIPS, o que limitou a migração do agente de nucleação para a superfície.

Como só o método VIPS é utilizado para preparar as membranas deste trabalho, considerou-se que o uso do ácido esteárico em uma concentração máxima de 0,5% (em massa), seria uma alternativa mais adequada. No entanto, devido à evidência de que o ácido esteárico pudesse se concentrar na região interlamelar das membranas densas, foi realizado um estudo sobre a dispersão do mesmo nas membranas VIPS. Algumas evidências experimentais, como a ausência de contraste suficiente que permitisse visualizar, por TEM ou SEM, esses cristais nas membranas preparadas por VIPS, indicaram que o ácido esteárico não cristalizou nesses casos. Para buscar uma nova confirmação, foi realizada a microscopia confocal (LSCM) dessas membranas. Para que fosse possível contrastar aglomerados ou cristais de ácido esteárico neste tipo de microscopia, essas membranas foram coradas com alaranjado de acridina, um corante fluorescente cuja estrutura química apresenta um nitrogênio central parcialmente positivo capaz de interagir eletronicamente com grupos carboxilatos (Figura 16).

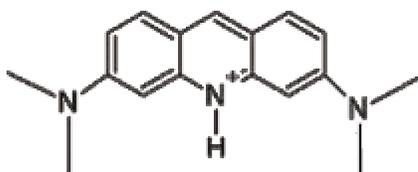
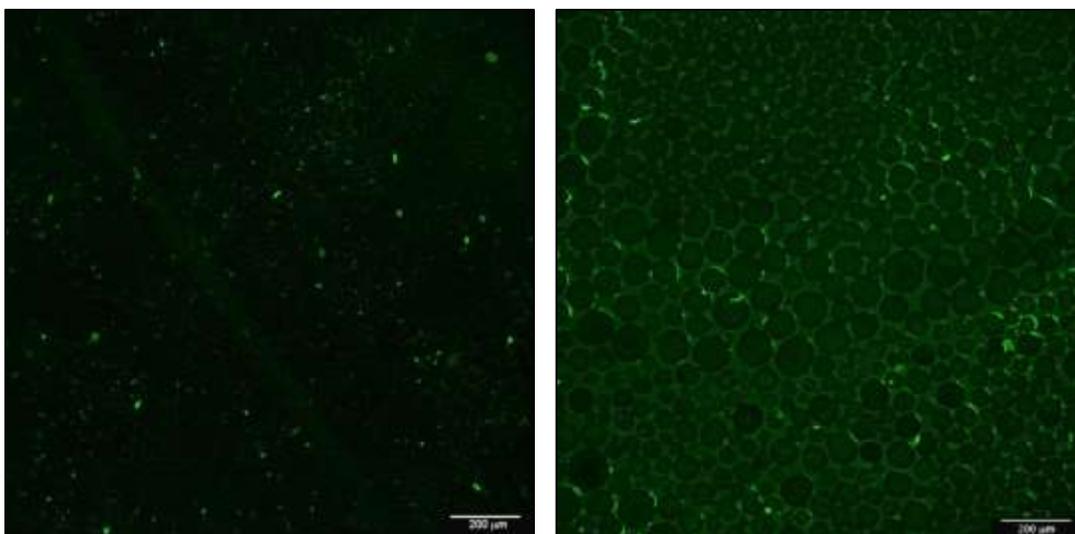


Figura 16 - Estrutura química do corante fluorescente, alaranjado de acridina.

A Figura 17 apresenta as micrografias da superfície livre de uma membrana de PCL pura e de uma contendo 0,5% (em massa) de ácido esteárico, obtidas a partir da reconstrução 3D realizada por LSCM. A PCL possui uma discreta autofluorescência na região de comprimentos de onda avaliada, sendo assim ambas imagens apresentaram fluorescência suficiente para serem visualizadas por esta técnica (Yeong *et al.*, 2010).

Os pontos mais brilhantes presentes nas duas amostras podem ser atribuídos a regiões onde ocorreu hidrólise parcial da superfície e houve adsorção preferencial de corante.

O brilho na imagem de LSCM é linearmente dependente da concentração de agente cromóforo na região analisada. A membrana contendo 0,5% (em massa) de ácido esteárico apresentou maior intensidade de cor, bem como maior definição dos poros, o que comprova a maior concentração de corante. Esta, por sua vez, confirma a existência de cargas negativas distribuídas principalmente na superfície dos poros, devido à presença do ácido esteárico e, portanto, comprova a hipótese ilustrada na Figura 13.



**Figura 17 -** Projeção 2D de reconstruções 3D da superfície livre de uma membrana pura (esquerda) e uma membrana contendo 0,5% (em massa) de ácido esteárico (direita), ambas coradas com alaranjado de acridina.

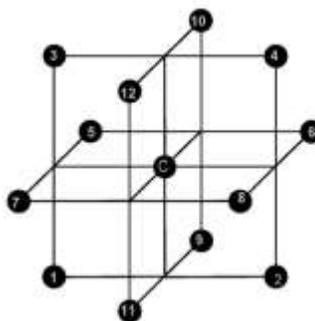
## 4.2. Otimização do método VIPS

Mesmo com as comprovações preliminares de que o método proposto seria efetivo em produzir membranas porosas com cargas negativas na superfície, ainda é necessário otimizar esse processo, no sentido de obter uma membrana com máxima porosidade e máxima disponibilidade de cargas na superfície. Inicialmente, foi observado que os fatores que mais influenciam a morfologia da membrana são a concentração do polímero e a concentração de água. Ao contrário do que é frequentemente descrito na literatura, inclusive por Liu, Zhao e colaboradores (2010), foi

observado que a umidade na câmara de preparação das membranas poderia sofrer variações dentro de uma ampla faixa sem alterar significativamente a morfologia e o tamanho dos poros. Uma hipótese pra explicar esse comportamento atípico é que a adição de água na solução precursora aproxima a composição inicial da linha binodal de separação L-L, alterando sua cinética e, portanto, minimizando a importância da umidade relativa (Tsai *et al.*, 2010).

Para otimizar os parâmetros relativos à concentração de ácido esteárico, concentração de água e concentração de polímero, foi utilizado um planejamento experimental do tipo *Box-Behnken* (BBD) com 3 fatores em 3 níveis e triplicata no ponto central, totalizando 15 experimentos, que foram realizados de forma aleatória (Ferreira *et al.*, 2007). Todas as demais condições experimentais, não incluídas no planejamento foram controladas de acordo com o descrito no item 3.2.1.1. (capítulo anterior).

O planejamento BBD é um planejamento de segunda ordem, baseado em um planejamento fatorial fracionário, podendo envolver três ou mais níveis. A principal vantagem dessa classe de planejamentos é que, além de avaliar um grande número de variáveis (fatores) utilizando um número bastante reduzido de experimentos, a avaliação é bastante segura, mesmo em uma ampla faixa de valores para cada um dos fatores. Esse tipo de planejamento tem se tornado cada vez mais popular na ciência de biomateriais. Um exemplo é seu uso em processos de produção de microesferas encapsuladoras de fármacos (Feczko *et al.*, 2011; Biró *et al.*, 2009). A Figura 18 trás uma representação esquemática do espaço amostral de um planejamento BBD de três fatores em três níveis.



**Figura 18 - Representação esquemática do espaço amostral de um planejamento de experimentos do tipo *Box-Behnken* (Ferreira, et al., 2007).**

A Tabela 1 apresenta os fatores estudados no planejamento BBD, bem como seus respectivos níveis. Conforme comentado anteriormente, além das concentrações de PCL e de água, a concentração de ácido esteárico também foi incluída no planejamento, com o intuito de maximizar a distribuição das cargas negativas na superfície.

**Tabela 1- Parâmetros avaliados no planejamento *Box-Behnken* para otimizar o preparo de membranas assimétricas de PCL por inversão de fases induzida por vapor (VIPS).**

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
PCL*	11	13	15
Água*	5	8	11
Ácido**	0,1	0,3	0,5

\* Porcentagens mássicas.

\*\* Porcentagem mássica de ácido esteárico em relação à massa de PCL.

Para a realização dos cálculos estatísticos envolvidos em um planejamento de experimentos, após selecionados os fatores e níveis de interesse é necessário determinar o fator resposta. O fator resposta é o fator dependente, que determina a composição ótima, ou o ponto ótimo de qualquer planejamento. É desejável que esse fator resposta seja quantitativo, para facilitar os cálculos, mas não é obrigatório.

Para otimizar as concentrações (fatores independentes) frente à máxima porosidade (fator dependente), foi utilizado o método de porosidade relativa (item 3.2.2.2.1.) para obter a porosidade de cada membrana. Esse método de cálculo de porosidade não é tão exato quanto o método da porosidade volumétrica, mas produz medidas mais precisas, com menor desvio padrão. A grande precisão das medidas de porosidade pelo método relativo garante que os resultados relativos sejam confiáveis desde que todos os ensaios sejam conduzidos nas mesmas condições. A Figura 19 apresenta as membranas obtidas no planejamento BBD com menor e maior porosidade, respectivamente.

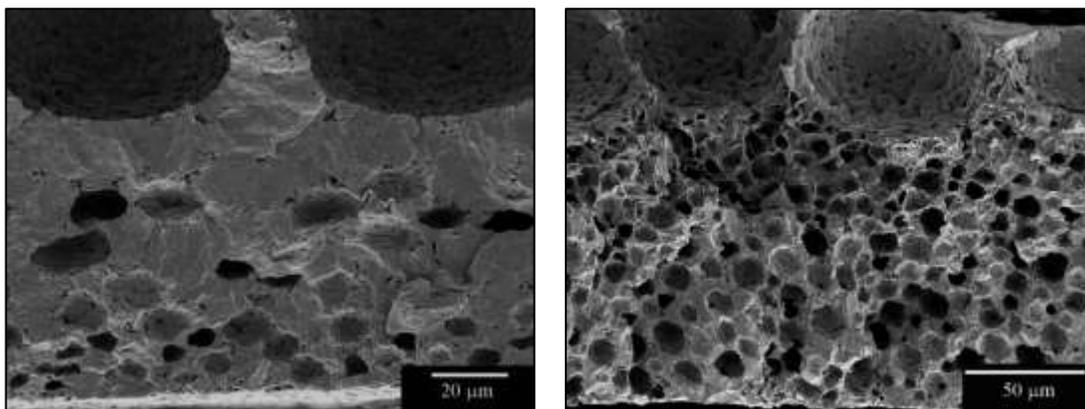


Figura 19 - Micrografias eletrônicas de varredura da membrana de menor (esquerda) e maior (direita) porosidade, obtidas no planejamento de experimentos BBD.

Para otimizar as concentrações avaliadas quanto à máxima disponibilidade de ácido esteárico na superfície, foi necessário selecionar outro fator de resposta, que permitisse detectar um possível excesso de ácido esteárico. Para isso, foram realizadas análises de DSC das membranas. A Figura 20 mostra as curvas de resfriamento no DSC para uma membrana de PCL puro, e membranas contendo 0,1% e 0,5% de ácido esteárico. Para comparação, há também a curva obtida para o ácido esteárico puro.

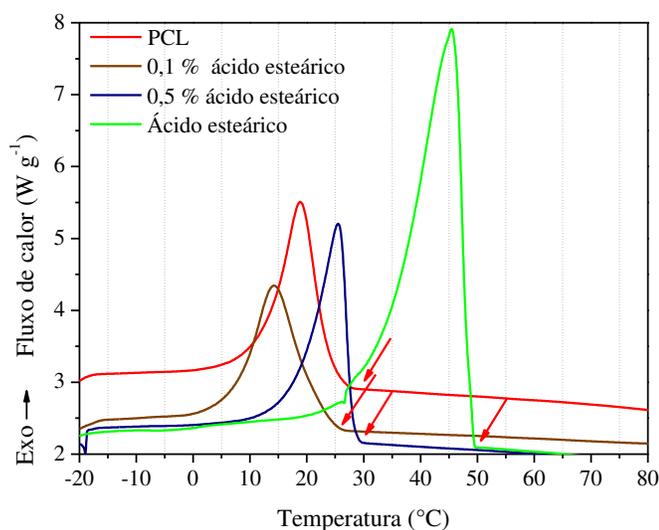


Figura 20 - Perfil de cristalização no resfriamento da calorimetria exploratória diferencial da PCL, do ácido esteárico e de membranas obtidas no planejamento *Box-Behnken*.

Comparando os resultados de DSC, foi possível observar que o aumento da concentração de ácido esteárico (0,5% em massa) provoca uma mudança na forma do pico de cristalização que adquire um formato similar ao do ácido esteárico puro. Além disso, a cristalização do polímero é antecipada, deslocando a temperatura de cristalização para valores maiores. Porém, quando a concentração é menor (0,1% em massa), o pico mantém o mesmo perfil simétrico da PCL pura, e a cristalização ocorre em temperatura próxima ou, em alguns casos, em temperatura um pouco menor.

A cristalização de polímeros é dada por dois processos que ocorrem em taxas diferentes: a nucleação e o crescimento. A temperatura do pico de cristalização,  $T_c$ , representa a temperatura onde a combinação da nucleação e do crescimento dos cristais provoca a máxima variação de entalpia. No entanto, para verificar alterações na cinética de nucleação de cristais poliméricos é necessário observar a temperatura de início do processo,  $T_{onset}$  (Canevarolo, 2006). Essa temperatura está indicada por setas vermelhas nas curvas da Figura 20.

Como a mudança em  $T_{onset}$  com a concentração de ácido esteárico mostrou-se significativa, a variação de  $T_{onset}$  das membranas, frente à  $T_{onset}$  de uma membrana de PCL pura foi utilizada como um segundo fator de resposta no planejamento. O parâmetro quantitativo utilizado para representar esta mudança foi:

$$\Delta T = T_{onset \text{ PCL}} - T_{onset}$$

onde  $T_{onset \text{ PCL}}$  refere-se à temperatura de início de cristalização da PCL pura e  $T_{onset}$  à temperatura de início de cristalização da membrana contendo agente de nucleação preparada nos experimentos realizados para o planejamento BBD.

Provavelmente, a variação observada em  $T_{onset}$  está relacionada ao fato da concentração de ácido estar acima do seu limite de solubilidade na membrana polimérica, ocasionando a cristalização do agente de nucleação na forma de cristais nanométricos (Figura 15 à direita) que atuam como pontos de nucleação para a cristalização do polímero. Essa situação é desfavorável porque, além de aumentar a cristalinidade do material, o que o torna mais frágil mecanicamente, confina os cristais de ácido esteárico na estrutura cristalina do polímero, impedindo a sua difusão para a

superfície da membrana. Por outro lado, quando o ácido está completamente dissolvido na matriz polimérica, este pode difundir e concentrar-se preferencialmente na superfície, sem alterar a cinética de cristalização do polímero. Neste caso, é esperado que  $T_{\text{onset}}$  se mantivesse próximo ao valor obtido para a membrana de PCL pura. Assim na avaliação de  $\Delta T$  no planejamento BBD, buscou-se obter valores próximos a zero. Na Tabela 2 estão apresentados os níveis utilizados nos experimentos do planejamento BBD para cada um dos diferentes fatores, bem como as respostas obtidas, tanto de porosidade quanto de  $\Delta T$ .

**Tabela 2 – Condições experimentais utilizadas nas preparações segundo o planejamento experimental *Box-Behnken* e suas respectivas respostas.**

<b>Experimento</b>	<b>PCL*</b>	<b>Água*</b>	<b>Ácido*</b>	<b>Porosidade (%)</b>	<b><math>\Delta T</math> (°C)</b>
1	-1	-1	0	04,5	1
10	1	-1	0	11,1	0
4	-1	1	0	12,8	1
13	1	1	0	05,7	0
2	-1	0	-1	17,1	1
11	1	0	-1	02,6	0
3	-1	0	1	15,0	-1
12	1	0	1	07,6	1
5	0	-1	-1	07,4	-1
8	0	1	-1	11,9	-4
6	0	-1	1	00,7	0
9	0	1	1	14,3	0
7	0	0	0	12,0	1
14	0	0	0	12,6	2
15	0	0	0	10,0	2

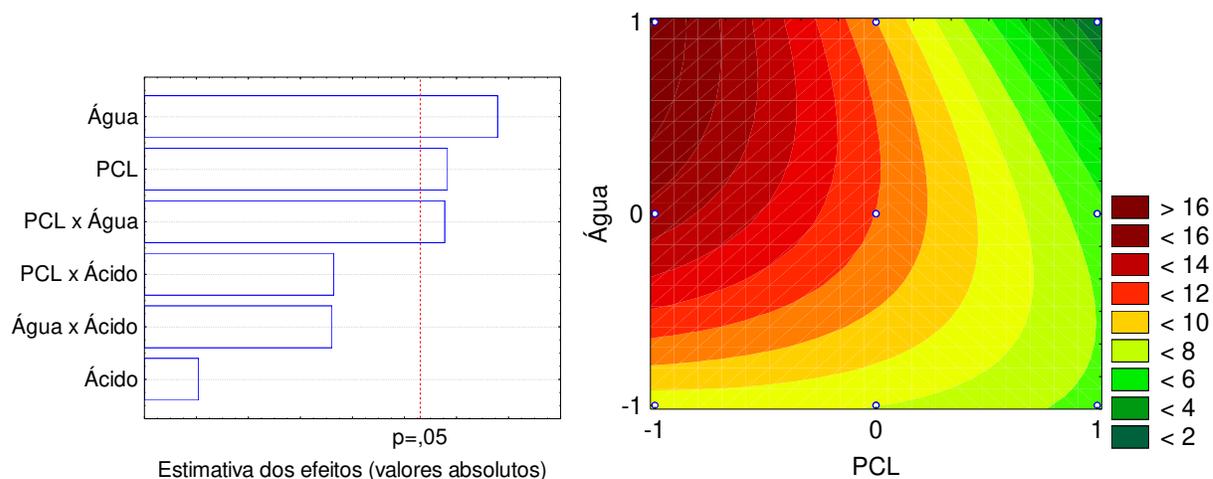
\* Valores referentes aos níveis apresentados na Tabela 1.

A partir desses resultados foi utilizado o software Statistica 6.0<sup>®</sup> para realizar os cálculos estatísticos necessários. Para tal, foi aplicado o modelo de cálculo linear com

interações, ou *linear one-way interactions*, uma vez que a quantidade de fatores e replicatas não fornecem graus de liberdade suficientes para utilizar o método quadrático. No entanto, esse modelo apresentou falta de ajuste, que é um parâmetro estatístico, utilizado para quantificar o desvio que os resultados reais apresentam em relação aos resultados teóricos obtidos por um determinado modelo matemático. A comprovação de falta de ajuste impede que seja obtida uma equação matemática significativa que correlacione todos os fatores, dependentes e independentes. A falta de ajuste não invalida o planejamento de experimentos, mas diminui a sua exatidão, pois requer que a determinação do ponto ótimo seja feita empiricamente, a partir da avaliação criteriosa dos resultados obtidos. A avaliação empírica é, na verdade, a mais utilizada no planejamento de experimentos, uma vez que é muito comum que os resultados experimentais apresentem falta de ajuste.

Determinar o ponto ótimo, a partir de análises empíricas de dois fatores simultaneamente é extremamente complexo. Neste caso, obtêm-se melhores resultados avaliando-se as respostas separadamente e cruzando-se os dados posteriormente. A Figura 21 apresenta as principais informações obtidas com o planejamento BBD frente à porosidade. O gráfico de pareto, apresentado à esquerda, permite visualizar a importância relativa de cada efeito e também dizer quais são significativos dentro do intervalo de confiança de 95% (determinado pela linha vermelha pontilhada). Observa-se que apenas a concentração de PCL, a concentração de água e a interação entre ambas são efeitos significativos para a porosidade.

O gráfico de pareto sozinho não é suficiente para determinar o ponto ótimo, mas é a partir dele que se determinam os parâmetros necessários para a elaboração do mapa de contorno. O mapa de contorno é uma representação 2D do comportamento de dois fatores dependentes frente ao fator independente que está sendo avaliado. Neste caso, como a concentração de ácido não tem efeito significativo na porosidade, optou-se por mantê-la no nível -1 e avaliar o mapa de contorno de PCL x água, apresentado na Figura 21 à direita. A partir do mapa de contorno é possível verificar que a porosidade é máxima quando a concentração de PCL é mínima e a concentração de água é máxima.

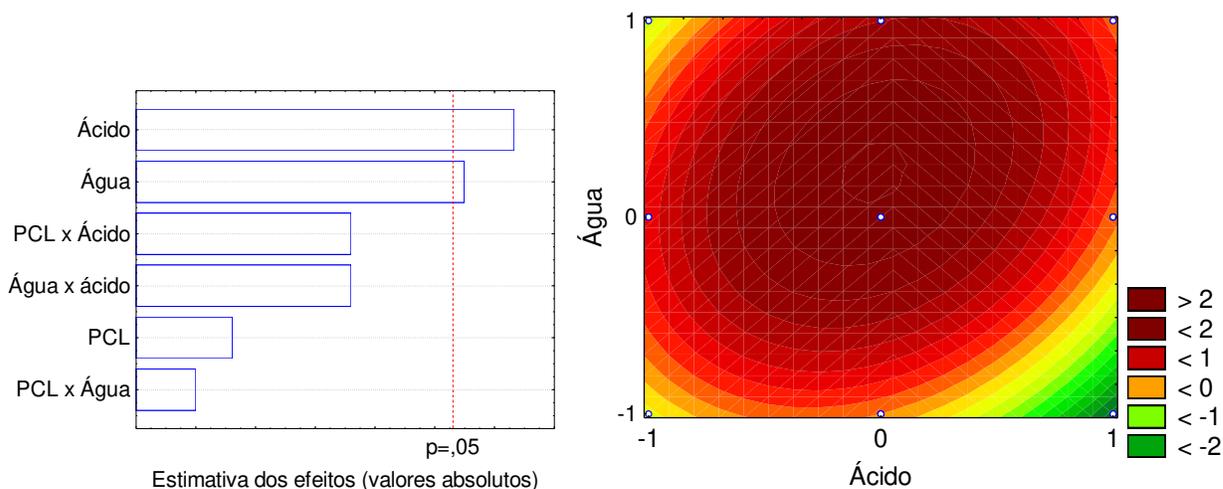


**Figura 21 - Gráfico de Pareto (esquerda) e mapa de contorno obtido com concentração de ácido no nível -1 (direita) obtidos no planejamento *Box-Behnken* para a resposta porosidade.**

Tendo em vista que um dos fatores que determina a estrutura de poros é a viscosidade da solução, o uso de soluções com menor concentração de polímero deve favorecer o crescimento da fase dispersa, isto é, a formação de poros (Park *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2004). O aumento na concentração de água tem o efeito de antecipar a separação de fases e diminuir a viscosidade da solução e, portanto, aumentar a porosidade.

A Figura 22 apresenta os principais resultados do planejamento BBD para  $\Delta T$ . O gráfico de Pareto mostra que a concentração de ácido e a concentração de água são os efeitos significativos. Assim, para determinar a concentração ótima de ácido esteárico, optou-se por avaliar o mapa de contorno de água x ácido, mantendo PCL no nível -1, como foi definido pelo mapa de contorno de porosidade.

A partir do mapa da Figura 22 observa-se que uma menor concentração de água resulta em valores mais positivos de  $\Delta T$ , possivelmente devido ao fato do ácido esteárico ser insolúvel em água. Quanto maior o teor de água na solução, menor a solubilidade desse composto. Dessa forma, analisando os principais resultados obtidos na avaliação dos dois fatores resposta, a melhor condição para o preparo das membranas foi definida pelas seguintes composições dos componentes: 11% (em massa) de PCL, 9% (em massa) de água e 0,2% (em massa) de ácido esteárico.



**Figura 22 - Gráfico de pareto (esquerda) e mapa de contorno no nível -1 de PCL (direita) obtidos no planejamento *Box-Behnken* para a resposta  $\Delta T$ .**

As concentrações dos agentes de nucleação hidrogenofosfato de bis(2-etilhexila) e hidrogenofosfato de bis(metacrilóioxietila) não foram otimizadas, visando permitir a comparação da eficiência dos agentes de nucleação. Desta forma, optou-se por manter constante a concentração molar de grupos negativos inseridos na membrana, ou seja, enquanto para ácido esteárico a concentração em massa foi de 0,20% (ou 4,4 mg), para os hidrogenofosfatos a concentração em massa foi de 0,22% (ou 4,9 mg).

### 4.3. Otimização do tratamento superficial

Mecanismos que elucidem a cinética de deposição de CaP na superfície de um biomaterial ainda são pouco explorados na ciência de superfície de biomateriais. Sabe-se que a nucleação uniforme de CaP na superfície de um biomaterial é a etapa limitante para obtenção de um recobrimento uniforme e que os pré-requisitos para a nucleação são: a disponibilidade de cargas negativas na superfície e a supersaturação de íons  $\text{Ca}^{+2}$  na interface solução-biomaterial (Madurantakam *et al.*, 2009).

O trabalho mais promissor realizado no sentido de elucidar o mecanismo de deposição de CaP é o de Hata e colaboradores (1995). Neste trabalho os autores utilizaram uma aproximação da lei de Arrhenius para propor um modelo matemático para a cinética de cristalização de CaP sobre biocerâmicas inertes de alumina,

considerando as concentrações iônicas do SBF, a taxa de renovação dessas soluções, o tempo e a temperatura de imersão.

Além disso, ainda não existem relatos sobre a utilização de agentes de nucleação para nuclear o crescimento dessas partículas, o que torna o mecanismo desse processo um tema a ser explorado. Neste trabalho pretende-se desenvolver um método para promover o recobrimento uniforme de CaP na superfície de uma membrana, de tal forma que promova a biocompatibilidade da mesma sem impedir a degradação *in vivo* do polímero. Assim, é necessário otimizar também esse procedimento.

Devido ao elevado número de variáveis possíveis, foi realizado um planejamento fatorial fracionário do tipo  $2^{4-1}$  com triplicata no ponto central, que totalizou 11 experimentos, que foram realizados de forma aleatória. A

Tabela 3 apresenta os fatores e níveis que foram avaliados nesse planejamento. São eles: temperatura de trabalho, número de ciclos, tempo de imersão da membrana em cada solução (denominado tempo de ciclo) e concentrações iônicas das soluções. As concentrações de nitrato de cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) e hidrogenofosfato de diamônio ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) foram avaliadas como uma única variável, uma vez que foi mantida constante a razão Ca/P em 1,67, que é considerada a razão ótima para o crescimento de CaP insolúvel.

**Tabela 3 – Parâmetros avaliados no planejamento  $2^{4-1}$  para otimizar o procedimento do tratamento superficial por ciclos de imersão sequencial.**

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	25	31	37
Número de Ciclos	4	6	10
Tempo de ciclo (s)	30	45	60
Concentrações* $\text{Ca}^{+2}/\text{PO}_4^{-3}$	100/60	200/120	400/240

\* Concentrações em  $\text{mmol L}^{-1}$  referentes à solução de nitrato de cálcio e de hidrogenofosfato de diamônio respectivamente.

A variável dependente escolhida para esse planejamento foi a variação de massa ( $\Delta_m$ ). Apesar da variação de massa não ser sensível a mudanças na estrutura cristalina do fosfato de cálcio, esta é uma medida quantitativa útil para o planejamento fatorial. Como a massa de fosfato obtida nesse tratamento é muito pequena, foram utilizadas membranas de PCL densas e finas de 200  $\mu\text{m}$  de espessura cortadas em esferas de 6 mm de diâmetro, para aumentar a razão mássica CaP/PCL e, portanto, os valores de  $\Delta_m$ . As amostras foram pesadas antes do tratamento superficial e, após os ciclos de imersão, foram secas a vácuo por 24 horas e pesadas novamente. A partir desses dados  $\Delta_m$  foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$\Delta m = \left( \frac{(m_f - m_i)}{m_i} \right) \times 100$$

onde  $m_f$  é a massa após os ciclos de imersão sequencial, e  $m_i$  é a massa antes do tratamento.

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos nesse planejamento. Mesmo após diversas tentativas de otimização destes e outros parâmetros, as variações mássicas obtidas foram relativamente pequenas. Assim, as membranas com maior e menor  $\Delta_m$  foram analisadas por SEM para comparação. A Figura 23 apresenta as micrografias das amostras com maior (B) e menor (A) deposição de fosfato de cálcio, que encontram-se destacadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições experimentais utilizadas nas preparações segundo o planejamento experimental 2<sup>4-1</sup> e suas respectivas respostas.

Experimento	Número de Ciclos *	Temperatura *	Tempo de ciclo *	Concentrações*	$\Delta_m$ (%)
7	-1	-1	1	1	0,0
8	1	1	1	1	1,4
4	-1	1	1	-1	0,0
B 5	1	-1	-1	1	3,1
11	0	0	0	0	0,4
1	-1	-1	-1	-1	0,2
3	1	-1	1	-1	0,8
2	1	1	-1	-1	1,0
A 6	-1	1	-1	1	0,0
10	0	0	0	0	0,0
9	0	0	0	0	0,0

\* Valores referentes aos níveis apresentados na Tabela 3.

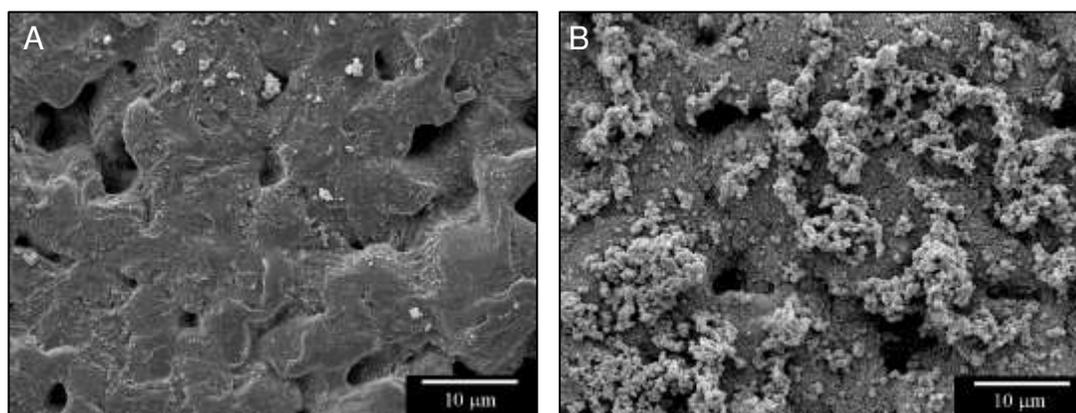
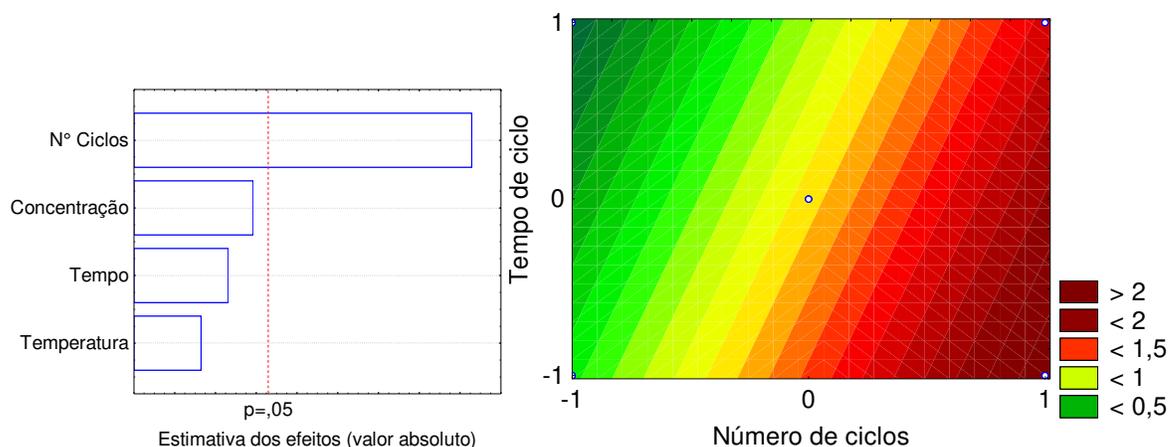


Figura 23 - Micrografias eletrônicas de varredura de filmes de PCL após o tratamento superficial por ciclos de imersão sequencial nas condições A (esquerda) e B (direita), destacadas na Tabela 4.

Utilizando mais uma vez o software Statistica 6.0<sup>®</sup> para realizar os cálculos estatísticos, foram obtidos os resultados apresentados na Figura 24. Este planejamento também apresentou falta de ajuste para o modelo *linear one-way interactions* e neste caso, também não há graus de liberdade suficientes para utilizar o modelo quadrático, logo este planejamento também foi avaliado empiricamente.



**Figura 24 - Gráfico de Pareto (esquerda) e mapa de contorno obtido utilizando temperatura no nível -1 e concentrações no nível 1.**

De acordo com gráfico de Pareto, na Figura 24 à esquerda, observa-se que apenas o número de ciclos tem um efeito significativo na quantidade de CaP depositada sobre a superfície do filme. A observação está de acordo com o que foi encontrado por Serizawa e colaboradores (2001), Choong e colaboradores (2011) e Oyane e colaboradores (2003). Assim, com base na composição da membrana B, fixou-se a temperatura no nível -1 (25°C) e as concentrações no nível 1 (400/240 mmol L<sup>-1</sup>) para obter o mapa de contorno à direita da Figura 24. Nele observa-se que o recobrimento é máximo quando o número de ciclos é máximo e o tempo de imersão é mínimo. Isso mostra que, de fato, o procedimento B é o mais adequado. Essa avaliação foi confirmada não só em outros mapas de contorno, mas também em experimentos comprobatórios. Logo, foram determinados os seguintes parâmetros para o tratamento superficial por ciclos de imersão sequencial: temperatura de 25°C e 10 ciclos de imersão sequencial alternada durante 30 s em cada uma das soluções (400 mmol L<sup>-1</sup> de Ca<sup>2+</sup> e 240 mmol L<sup>-1</sup> de PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>).

## Capítulo 5 – Caracterizações Físico-Químicas

---

### 5.1. Caracterizações físico-químicas

Após o estudo sobre a habilidade do ácido esteárico de gerar cargas negativas, otimizar o método de preparo do dispositivo polimérico e também comprovar a viabilidade e otimizar o procedimento dos ciclos de imersão sequencial, levantou-se a seguinte questão: o uso de qualquer outra orgânica aniônica é capaz de reproduzir esse comportamento? A nucleação e o crescimento de CaP nessa superfície é dependente da estrutura química do agente de nucleação? Para que fosse possível responder essas questões, foram testados dois outros agentes de nucleação: hidrogenofosfato de bis(2-etilhexila) e hidrogenofosfato de bis(metacrilóiloxietila).

A principal vantagem desses agentes de nucleação é que seus grupos aniônicos são fosfato, que tem maior afinidade pelo íon  $\text{Ca}^{+2}$  que carboxilatos. A nucleação de CaP numa superfície depende da disponibilidade, carga formal e afinidade pelo íon  $\text{Ca}^{+2}$  do grupo negativo disponível na superfície (Kokubo, 2005). Esses organofosfatos são aprovados pelo FDA para uso em embalagens alimentícias, o que comprova sua biocompatibilidade. Além disso, tem massa molar próxima à do ácido esteárico, o que permite a comparação entre eles.

Um potencial efeito adverso desses compostos é que, por conterem duas cadeias orgânicas ligadas ao grupo aniônico, podem estar menos disponíveis na superfície, uma vez que têm menor polaridade e melhor interação com a PCL. Por um lado, isso pode dificultar o lixiviamento do agente de nucleação durante os ciclos de imersão sequencial, por outro, pode diminuir a mobilidade do agente nucleante na matriz. O lixiviamento do agente de nucleação durante os ciclos de imersão ou em meio corpóreo foi uma preocupação constante no desenvolvimento deste trabalho, visto que os agentes *antifog* são lixiviados com o tempo, mas nenhuma evidência disso foi encontrada.

As alterações na estrutura química do agente de nucleação podem proporcionar mudanças significativas na interação agente de nucleação-polímero, o que indica que a estrutura química de fato influencia significativamente a nucleação e crescimento de CaP na superfície de um biomaterial. Comprovar a viabilidade de utilizar diversos

agentes de nucleação para este fim é de grande interesse para a biotecnologia, uma vez que permitiria desenvolver uma série de novos biomateriais. Atualmente há uma vasta disponibilidade de moléculas orgânicas aniônicas que poderiam ser combinadas com os diversos polímeros que são utilizados na biomedicina, independentemente da hidrofobicidade ou da biodegradabilidade dos mesmos. Qualquer composto de baixa massa molar é passível de migração dentro de uma matriz polimérica. Quando o polímero está uma temperatura acima da sua  $T_g$ , mas abaixo da  $T_f$ , sua fase amorfa tem elevada mobilidade, e é através dela que o composto de baixa massa molar se difunde (Canevarolo, 2006). No entanto, quando o polímero contendo um composto de baixa massa molar está em solução, a mobilidade desse composto é significativamente aumentada, uma vez que o próprio polímero tem maior mobilidade. A elevada mobilidade de um agente de nucleação durante a transição de fases L-L no processo de inversão de fases é o princípio que rege a hipótese levantada na Figura 13, não só para o ácido esteárico, mas também para qualquer agente de nucleação disperso numa matriz polimérica.

A Tabela 5 trás um resumo das abreviações utilizadas para identificar as membranas preparadas neste trabalho e que serão utilizadas daqui por diante, para identificá-las na descrição dos resultados de caracterização físico-química e morfológica e também descrição da avaliação de sua biocompatibilidade. PCL refere-se à membrana pura; PCL-A, PCL-E e PCL-M referem-se às membranas contendo ácido esteárico, hidrogenofosfato de bis(2-etilhexila) e hidrogenofosfato de bis(metacrilóioxietila) respectivamente. A sigla “/t” significa que a membrana passou pelo tratamento superficial otimizado isto é, a membrana passou por 10 ciclos de imersão sequencial alternada durante 30 s em soluções de  $Ca^{+2}$  (400 mmol L<sup>-1</sup>) e de  $PO_4^{-3}$  (240 mmol L<sup>-1</sup>). A concentração do agente de nucleação foi otimizada para o par ácido esteárico/PCL (0,2% em massa, em relação ao PCL) e mantida para os demais.

Tabela 5 - Resumo das nomenclaturas utilizadas.

<b>Legenda</b>	<b>Agente de nucleação</b>	<b>Imersão sequencial</b>
<b>PCL</b>	-----	Não
<b>PCL/t</b>	-----	Sim
<b>PCL – A</b>	ácido esteárico	Não
<b>PCL – A/t</b>	ácido esteárico	Sim
<b>PCL – E</b>	hidrogenofosfato de bis(2-etilhexila)	Não
<b>PCL – E/t</b>	hidrogenofosfato de bis(2-etilhexila)	Sim
<b>PCL – M</b>	hidrogenofosfato de bis(metacrilóioxietila)	Não
<b>PCL – M/t</b>	hidrogenofosfato de bis(metacrilóioxietila)	Sim

Os resultados apresentados neste e nos próximos capítulos são referentes a membranas preparadas em triplicata. Essa medida foi tomada para garantir a reprodutibilidade dos processos de preparação das membranas. A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos nas medidas de porosidade volumétrica e de ângulo de contato.

Para medir a porcentagem de poros nos materiais resultantes, foi utilizado o método de porosidade volumétrica. O método da porosidade relativa permite medir a porosidade das membranas com baixo desvio padrão (em torno de 0,5%, quando feita em triplicata). Porém, no caso da PCL que é um polímero bastante hidrofóbico, pode não corresponder ao valor real da porosidade. Sendo assim, para calcular a porosidade das membranas otimizadas foi utilizado o método da porosidade volumétrica, uma vez que esse que permite obter valores mais exatos, porém com maiores desvios padrão (da ordem de 2%).

O ângulo de contato foi avaliado pelo método estático, no entanto foi observado que após a estabilização do volume da gota, o ângulo de contato continuou variando com o tempo. Araujo e colaboradores (2008) reportam o mesmo tipo de comportamento e atribuíram ao fato de que a PCL é molhada muito lentamente pela água, devido à sua hidrofobicidade e cristalinidade. Dessa forma, neste trabalho optou-se por reportar os valores de ângulo de contato a partir do coeficiente linear de uma reta ajustada Figura

12, uma vez que estes valores refletem um comportamento global e independente do tempo de medida.

**Tabela 6 - Porosidade volumétrica e ângulo de contato das membranas, com e sem tratamento que foram avaliadas.**

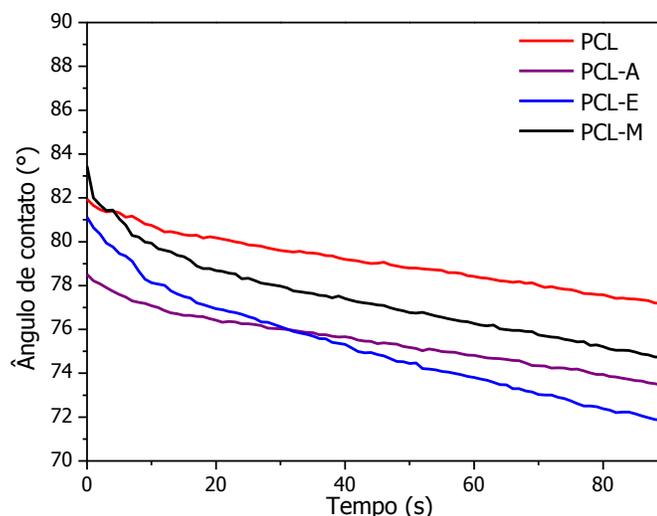
	<b>Porosidade (%)</b>	<b>Ângulo de Contato (°)</b>
<b>PCL</b>	50 ± 1	80 ± 2
<b>PCL – A</b>	50 ± 1	78 ± 1
<b>PCL – A/t</b>	-----	89 ± 6
<b>PCL – E</b>	52 ± 1	78 ± 2
<b>PCL – E/t</b>	-----	79 ± 3
<b>PCL – M</b>	54 ± 2	79 ± 2
<b>PCL – M/t</b>	-----	81 ± 3

Analisando a Tabela 6, é possível observar que, estatisticamente, a porosidade de PCL, PCL- A e PCL-E são iguais, enquanto que PCL-M é ligeiramente mais porosa. Essa observação é confirmada pelo fato que PCL-M é mais frágil quando manipulada, enquanto que as outras são mais resistentes ao rasgo. A porosidade das membranas tratadas não foi avaliada, uma vez que não foram observadas evidências de variação de porosidade por SEM.

O ângulo de contato, também apresentado na Tabela 6, mostra que não há diferença estatística entre as membranas. Todas apresentam ângulo de contato em torno de 80°. Na literatura é possível encontrar valores de ângulo de contato de PCL desde 68° até 140° (Araujo *et al.*, 2008; Choong *et al.*, 2011; Tiaw *et al.*, 2005). Essa grande variação pode ser justificada pelo fato de serem utilizadas diferentes formas de realizar essa medida e também por variações em rugosidade, cristalinidade e massa molar do polímero.

Seria esperada uma diminuição do ângulo de contato das membranas contendo agentes de nucleação, visto que superfícies carregadas apresentam maior afinidade com a água e, portanto, maior molhabilidade. No entanto, isso não foi observado. Possivelmente o método de *spin coating*, utilizado para preparar os filmes utilizados para avaliar o ângulo de contato, produziu filmes muito rugosos, ou a evaporação

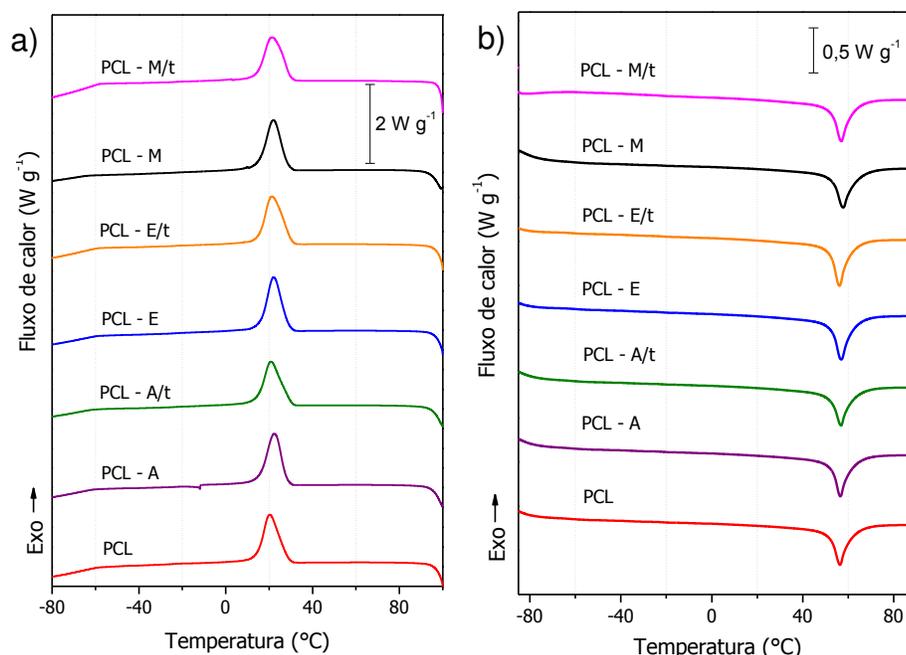
rápida do solvente inibiu a migração das cabeças polares para a superfície. A Figura 25 apresenta as curvas de ângulo de contato x tempo das membranas sem tratamento.



**Figura 25 - Variação do ângulo de contato em função do tempo das membranas sem tratamento.**

É evidente que as regiões lineares das curvas de PCL-E e PCL-M apresentam maior inclinação que as curvas de PCL e PCL-A, o que sugere que a taxa de espalhamento da gota de água é maior ou, por outro lado, que a superfície é mais lisa (Araujo *et al.*, 2008). Finalmente, voltando à Tabela 6 pode-se observar que as membranas tratadas com os ciclos de imersão sequencial têm desvios padrão maiores. Isso sugere que essas membranas têm uma superfície mais heterogênea, ou rugosa, o que pode ser uma evidência da deposição não uniforme de CaP.

Na Figura 26 estão as curvas de DSC utilizadas para avaliar as propriedades térmicas das membranas. Essas propriedades estão diretamente relacionadas às propriedades mecânicas e à cristalinidade dos materiais. Como é possível observar, não há mudanças significativas entre as membranas, exceto por um discreto aumento na cristalinidade de PCL-E e PCL-M, com e sem tratamento, comparada às demais membranas.



**Figura 26 - Curvas de DSD dos materiais avaliados. a) resfriamento e b) segundo aquecimento.**

A Tabela 7 apresenta os valores absolutos obtidos na análise de DSC. A ausência de mudanças significativas nos parâmetros térmicos das membranas indica que as propriedades térmicas estão sendo governadas pelo polímero, e que a concentração de agente de nucleação é insuficiente para provocar mudanças na termodinâmica ou na cinética de nucleação e crescimento da fase cristalina do polímero.

Finalmente, para completar as caracterizações físico-químicas dessas membranas, é necessário ter uma avaliação do seu comportamento mecânico. Para isso, foram realizadas análises de DMA. Esta técnica correlaciona propriedades macroscópicas do material, como propriedades mecânicas, com relaxações e rearranjos moleculares que ocorrem nas cadeias poliméricas. A Figura 27 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 7 - Propriedades térmicas das membranas avaliadas.

	$T_c$ (°C)*	$T_{onset}$ (°C)*	$T_g$ (°C)**	$T_f$ (°C)**	$X$ (%)**
<b>PCL</b>	20	29	-61	56	52
<b>PCL - A</b>	22	28	-61	57	53
<b>PCL - A/t</b>	21	30	-61	57	52
<b>PCL - E</b>	22	29	-61	57	57
<b>PCL - E/t</b>	21	29	-61	56	56
<b>PCL - M</b>	22	30	-61	58	56
<b>PCL - M/t</b>	21	30	-58	57	54

\* Temperatura de cristalização e temperatura de início de cristalização, respectivamente, obtidas no resfriamento do DSC.

\*\* Temperatura de transição vítrea, temperatura de fusão e grau de cristalinidade, respectivamente. Obtidos no segundo aquecimento do DSC.

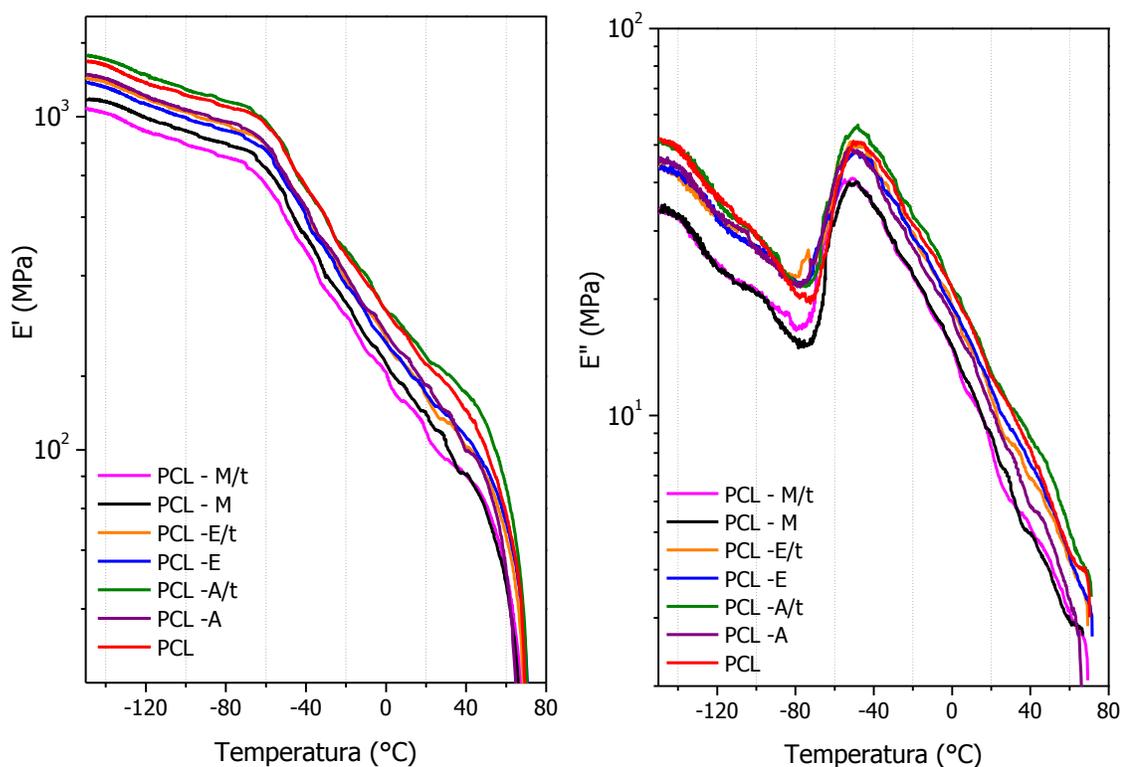


Figura 27 - Módulo de armazenamento (esquerda) e módulo de perda (direita) obtidos no DMA das membranas com e sem tratamento por ciclos de imersão sequencial.

O perfil obtido para os módulos de armazenamento (à esquerda) e de perda (à direita) são característicos de materiais semicristalinos. Em temperaturas inferiores à  $T_g$ , o material apresenta elevado módulo elástico, comportando-se como um material vítreo. Acima da transição vítrea, a fase amorfa do polímero ganha mobilidade apresentando uma queda pouco acentuada do módulo de armazenamento. Como esse polímero é altamente cristalino, quando sua temperatura de fusão é atingida, há uma queda brusca de módulo (Cassu & Felisberti, 2005).

O comportamento do módulo de perda também é característico de materiais semicristalinos e apresenta apenas um pico, correspondente à  $T_g$  na faixa de  $-50^\circ\text{C}$ . Na região de  $-100^\circ\text{C}$  alguns dos materiais apresentam também uma discreta queda de módulo, devido à presença de uma relaxação  $\beta$  relacionada à mobilidade adquirida pelas metilas sequenciais localizadas entre dois grupos ésteres (Koleske & Lundberg, 1969). Os perfis das curvas obtidas para todos os materiais são muito semelhantes, o que mostra que não há mudanças nas propriedades termomecânicas, com a adição dos agentes de nucleação, ou com os ciclos de imersão sequencial. Este resultado é uma evidência de que esses fatores não deverão alterar as propriedades mecânicas da PCL. Em temperatura ambiente, o módulo de armazenamento desses materiais é da ordem de 150 MPa, e o módulo de perda da ordem de 10 MPa. Esses valores são muito superiores ao que geralmente é reportado na literatura para membranas de PCL, reportado como sendo 5 MPa para o módulo de armazenamento (Salgado *et al.*, 2012). Vale observar que a maior porosidade de PCL-M e PCL-M/t é refletida nas propriedades mecânicas, através da obtenção de valores discretamente inferiores aos das demais membranas, em especial para o módulo de perda, antes da  $T_g$ .

## Capítulo 6 – Caracterizações Morfológicas

### 6.1. Morfologia das membranas

No capítulo 4 foram apresentadas todas as etapas da preparação das membranas de PCL estudadas, e o capítulo anterior apresentou a caracterização físico-química desses materiais. Os resultados apresentados comprovaram que a presença do agente de nucleação, bem como a realização dos ciclos de imersão sequencial não alteraram significativamente os comportamentos termomecânicos da PCL. A única propriedade que apresentou alterações significativas para o comportamento *in vitro* foi o grau de cristalinidade, uma vez que este altera as taxas de biodegradação e as propriedades mecânicas. Nesse caso, as variações observadas não foram suficientes para impactar nas propriedades mecânicas da membrana, mas podem vir a influenciar a taxa de biodegradação do material. Essa propriedade será avaliada no próximo capítulo, que trata do comportamento *in vitro*.

Como já comentado no capítulo 1, é necessário caracterizar a morfologia dessas membranas, uma vez que as características da superfície de um biomaterial controlam sua integração com o tecido, enquanto que a porosidade é essencial para a penetração de fluidos corpóreos na região lesionada. Assim, para caracterizar a morfologia dos materiais obtidos, todos foram extensamente avaliados por SEM. A Figura 28 apresenta de forma panorâmica, em micrografias de baixa ampliação, a morfologia típica das membranas obtidas.

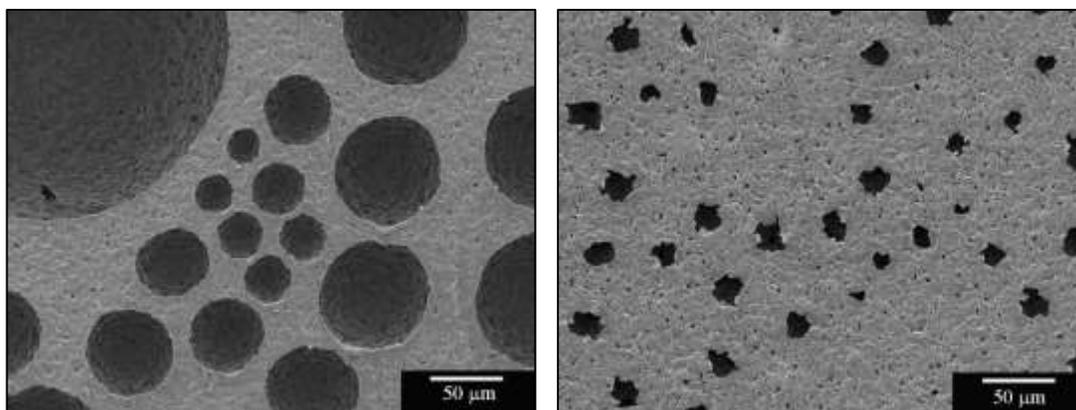


Figura 28 - Micrografias eletrônicas de varredura apresentando visões panorâmicas típicas da superfície livre (à esquerda) e da superfície do substrato (à direita) das membranas preparadas neste trabalho.

A Figura 29 apresenta micrografias representativas das membranas PCL (esquerda) e PCL/t (direita). A Figura 30 apresenta as micrografias das membranas PCL-A (esquerda) e PCL-A/t (direita). A Figura 31 apresenta as micrografias das membranas PCL-E (esquerda) e PCL-E/t (direita). Finalmente, a Figura 32 apresenta as micrografias das membranas PCL-M (esquerda) e PCL-M/t (direita). Comparando essas imagens, é possível observar que a morfologia de todas as membranas é muito semelhante, sendo as membranas PCL-M e PCL-M/t as mais porosas. A morfologia dessas membranas é característica de membranas assimétricas, pois possuem um gradiente de porosidade.

Os poros esféricos e pouco conectados, observados na seção transversal (imagens centrais), são um forte indício de que a inversão de fases desse sistema ocorre por nucleação e crescimento da fase pobre em polímero, como é característico da maioria das membranas formadas por VIPS. A característica mais interessante da morfologia dessas membranas, na realidade, está na presença de cavidades na superfície livre (imagens superiores). Essas cavidades têm diâmetros que variam desde algumas dezenas de  $\mu\text{m}$ , como as apresentadas nas imagens, até da ordem de alguns mm.

Como já mencionado, o método utilizado para obter umidade controlada em 100% produz uma atmosfera acima do ponto de orvalho, portanto contendo gotículas de água dispersas que condensam na superfície da solução polimérica (que dará origem à membrana). As gotículas de água condensadas sobre essa solução podem coalescer, resultando na formação das cavidades observadas. O fato dessas gotículas condensarem rapidamente sobre a superfície do filme, antes da solução passar pela transição L-S, é o que dá origem a essa morfologia superficial.

Enquanto que a face livre dessas membranas tem uma morfologia particular, a face em contato com o vidro, ou substrato, (imagens inferiores) é bastante comum. A superfície é plana e porosa, com poros de dimensões médias menores e fronteiras irregulares. O fato das duas faces da membrana possuírem morfologias tão distintas é interessante, pois pode ocorrer em uma delas adesão celular preferencial, como reportado no trabalho de Mangindaan e colaboradores (2012). Espera-se que a adesão celular seja mais acentuada na face livre, devido à elevada rugosidade.

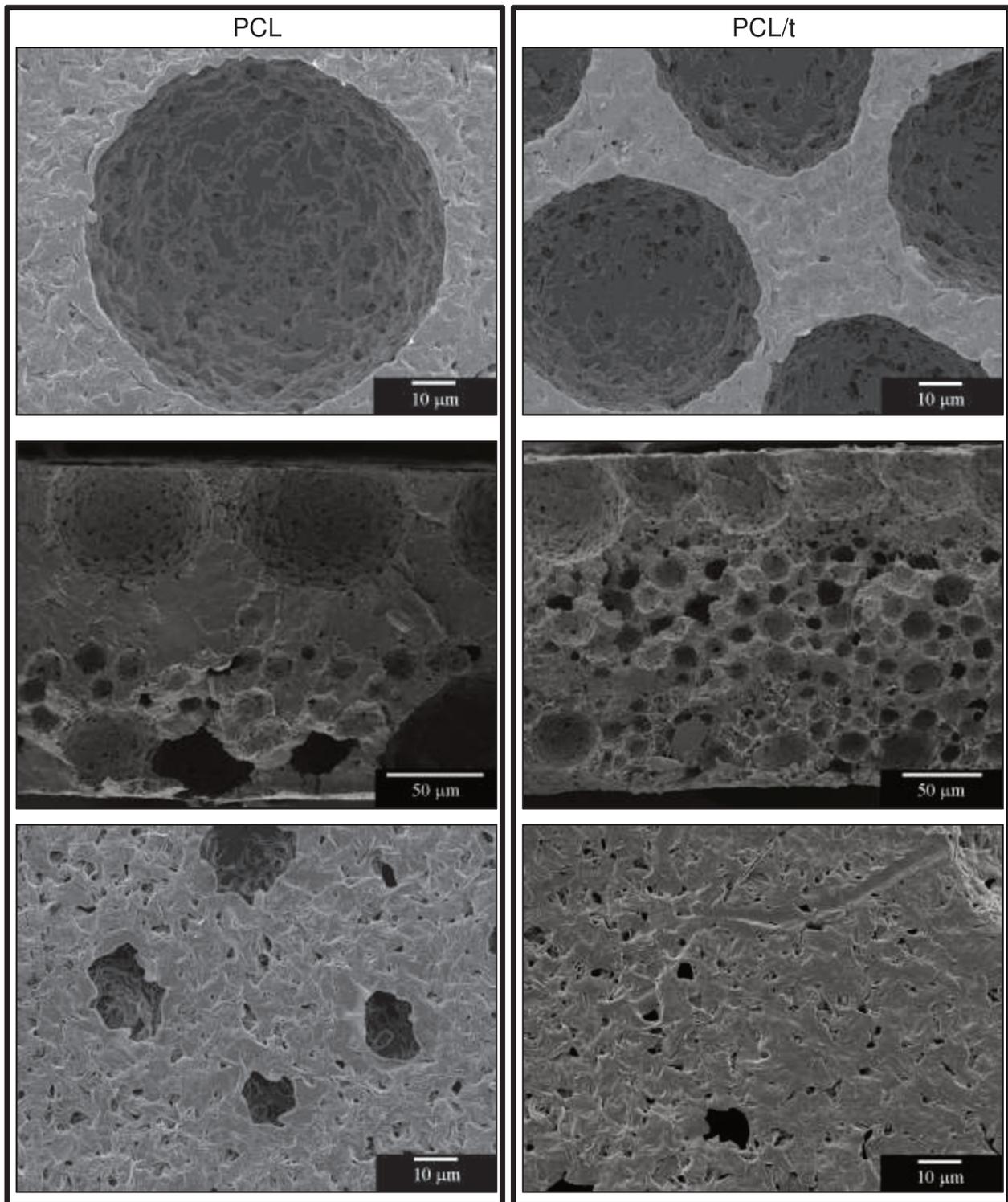


Figura 29 - Micrografias eletrônicas de varredura das membranas de PCL pura, com (direita) e sem (esquerda) tratamento por ciclos de imersão sequencial. Acima estão apresentadas as superfícies livres, ao centro a seção transversal e abaixo as superfícies do substrato.

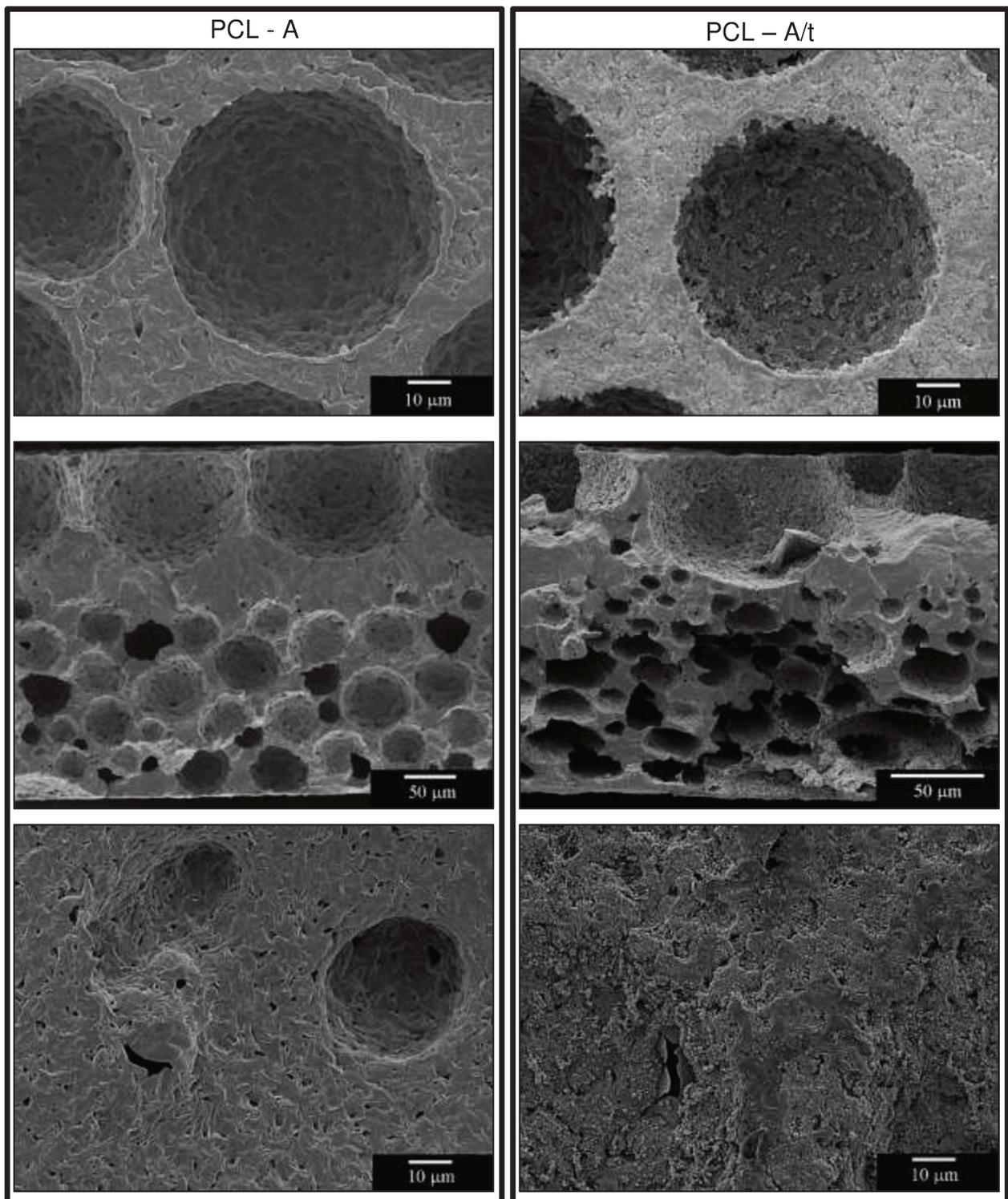


Figura 30 - Micrografias eletrônicas de varredura das membranas de PCL contendo ácido esteárico, com (direita) e sem (esquerda) tratamento por ciclos de imersão sequencial. Acima estão apresentadas as superfícies livres, ao centro a seção transversal e abaixo as superfícies do substrato.

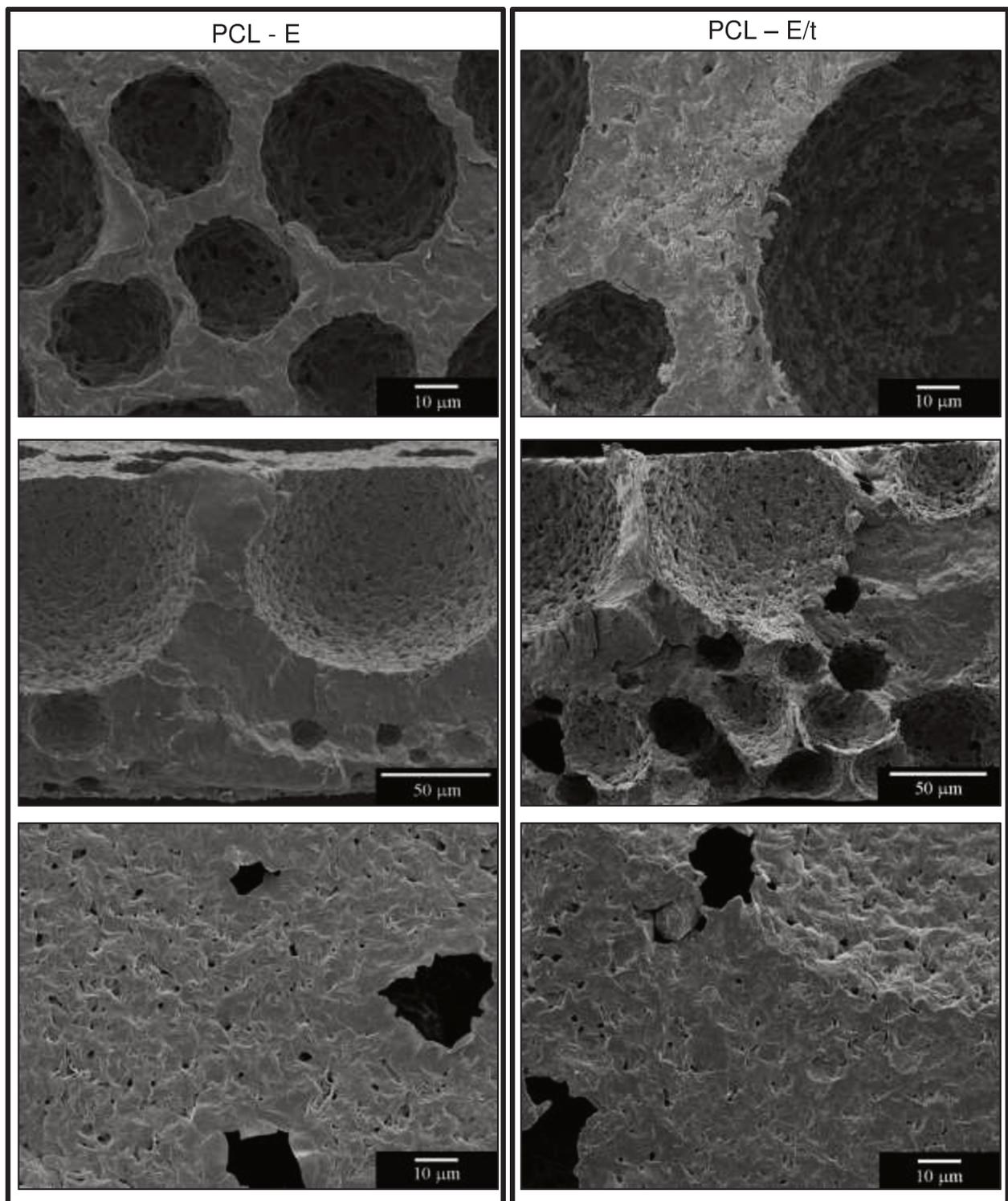


Figura 31 - Micrografias eletrônicas de varredura das membranas de PCL contendo hidrogenofosfato de bis(2-etilhexila), com (direita) e sem (esquerda) tratamento por ciclos de imersão sequencial. Acima estão apresentadas as superfícies livres, ao centro a seção transversal e abaixo as superfícies do substrato.

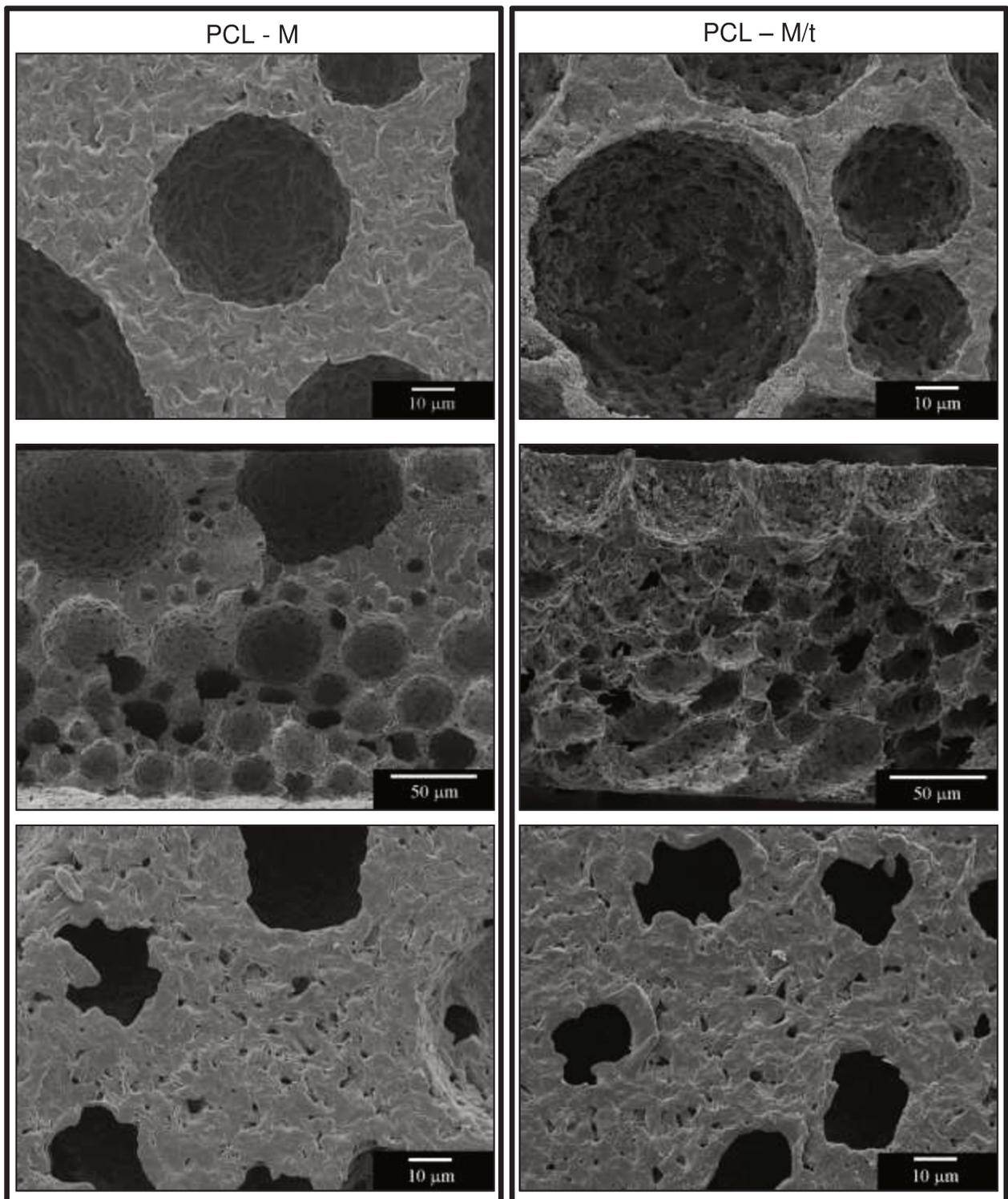
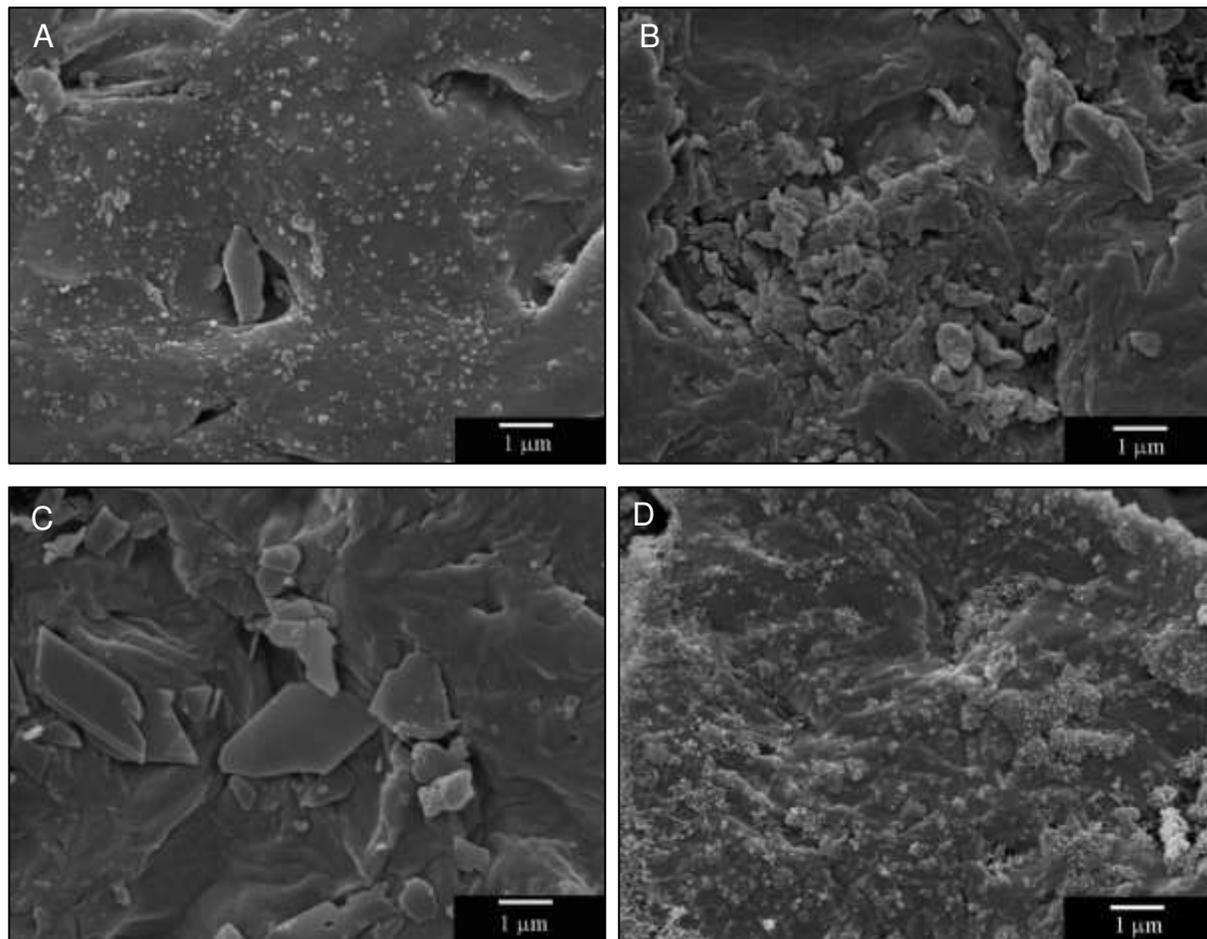


Figura 32 - Micrografias eletrônicas de varredura das membranas de PCL com hidrogenofosfato de bis(metacrilóioxietila), com (direita) e sem (esquerda) tratamento por ciclos de imersão sequencial. Acima estão apresentadas as superfícies livres, ao centro a seção transversal e abaixo as superfícies do substrato.

Para avaliar a deposição do CaP na superfície dessas membranas e também a influência do agente de nucleação nesse procedimento, é conveniente avaliar detalhadamente a membrana otimizada (PCL-A/t) e compará-la com a PCL/t. Espera-se que PCL/t não apresente núcleos ou cristais de CaP, pois não contém nenhum pré-tratamento, ou agente de nucleação. Essa ausência de CaP de fato é confirmada nas imagens panorâmicas (Figura 29, imagem superior à direita) mas, ao observarmos a Figura 33A, que é uma imagem ampliada dessa face, é possível verificar a presença de nanopartículas de CaP. A pequena nucleação observada em PCL/t pode ser causada pela hidrólise superficial do polímero. Choong e colaboradores (2011) obtiveram as mesmas evidências no seu estudo, como apresentado anteriormente.



**Figura 33-** Micrografias ampliadas da face livre das membranas após tratamento superficial por ciclos de imersão sequencial. (A) PCL/t; (B) PCL - A/t; (C) PCL - E/t e (D) PCL - M/t.

Acredita-se que em ambientes biológicos o fosfato de dicálcio dihidratado (DCPD) seja responsável pela formação dos núcleos, prévios à mineralização (Yang *et al.*, 2008). A partir dos núcleos pré-existentes, a calcificação do tecido (ou implante) *in vivo* é dada pela formação de fosfato de tricálcio (TCP) e/ou fosfato de cálcio amorfo (ACP). Esses núcleos são então gradualmente dissolvidos e rearranjados resultando em CHA, que é o fosfato de cálcio principal dos tecidos ósseos consolidados. (Madurantakam *et al.*, 2009).

*In vitro*, a calcificação, ou mineralização é dada pela nucleação de ACP que se modifica a fosfato de octacálcio (OCP), seguida da transição de OCP para carbonato de hidroxiapatita (CHA) ou HA, dependendo do ambiente químico. Quando a mineralização ocorre em pH ácido, em geral a fase intermediária é de DCPD (Vallet-Regi & González-Calbet, 2004). Já na mineralização *in vitro*, a formação dos núcleos que permitem a deposição da camada inicial de ACP é promovida pelas cargas negativas da superfície, ou por ciclos de imersão sequencial, conforme já mencionado. A formação de núcleos é governada, principalmente, por dois fatores: a disponibilidade de sítios de nucleação, como os carboxilatos e as hidroxilas; e a concentração local de íons  $\text{Ca}^{+2}$ , a qual deve ser suficiente para vencer a elevada barreira energética para a formação de núcleos estáveis (Madurantakam *et al.*, 2009).

Lebourg e colaboradores (2010) realizaram trabalho similar ao de Choong e colaboradores (2011), mas ao invés de promover a criação de grupos aniônicos na superfície optaram por criar cargas negativas, que são menos estáveis, utilizando um tratamento de plasma de oxigênio. No entanto, o mais interessante desse trabalho foi a comprovação do mecanismo de mineralização *in vitro* de superfícies poliméricas com cargas negativas. *In vitro*, a fase OCP é a que nucleia e cresce, no entanto, conforme o tempo de mineralização aumenta, há a desidratação dessa fase de CaP, que se transforma em HA.

Ao compararmos as micrografias de PCL/t e PCL-A/t fica evidente que o ácido esteárico está atuando na nucleação e crescimento das partículas de fosfato de cálcio, pois o recobrimento superficial na membrana PCL-A/t é abundante e facilmente observável, mesmo nas imagens com baixa ampliação. Não há evidências de que o crescimento dessas partículas seja preferencial em alguma das faces, mas observa-se,

pela análise da seção transversal, que não há crescimento de partículas no interior dos poros da seção transversal. Mesmo que haja ácido esteárico na superfície dos poros e que haja conectividade entre eles, o tempo de exposição da membrana às soluções iônicas não foi suficiente para que estas penetrassem e atingissem uma concentração iônica local adequada à nucleação de CaP.

A presença de CaP também na superfície dos poros poderia ser interessante para aumentar não só a molhabilidade do polímero, mas também a osteointegração. Em geral, membranas hidrofóbicas aplicadas comercialmente em microfiltração de soluções aquosas passam por um processo de pré-molhagem, onde são imersas em água por um período pré-determinado para que esta penetre nos poros (Mulder, 1996). Do mesmo modo, seria possível obter o recobrimento dos poros imergindo a membrana em água deionizada por um tempo pré-definido, antes dos ciclos de imersão sequencial.

Comparando as imagens da PCL-E/t e PCL-M/t com a PCL-A/t, é possível perceber uma redução significativa na porcentagem da área superficial que foi recoberta por CaP e, apesar de não ser possível verificar visualmente se a porcentagem de recobrimento dessas membranas (PCL-E/t e PCL-M/t) é equivalente, observa-se que a morfologia das partículas depositadas é bastante diferente (Figura 33). Este resultado confirma claramente que a fase de CaP que nucleia sobre a superfície da membrana realmente depende do agente de nucleação, ou seja, do ânion disponível na superfície, bem como da interação do agente de nucleação com o polímero.

A adição de hidrogenofosfato de bis(2-etilhexila) (membrana PCL-E/t) favorece o crescimento de partículas maiores de CaP, em geral na forma de placas, mas resulta em um recobrimento da superfície do polímero menos uniforme, na forma de ilhas ou aglomerados de CaP que deixam uma boa porcentagem da superfície do polímero exposta. Por outro lado, a adição de hidrogenofosfato de bis(metacrilóioxietila) (membrana PCL-M/t) produz um recobrimento mais uniforme, composto majoritariamente de nanopartículas, similares às encontradas na PCL/t.

A análise do recobrimento de CaP por XRD (não apresentado) e SEM não foi suficiente para determinar com precisão a fase de CaP depositada na superfície das membranas, mas baseado nas informações disponíveis na literatura é possível supor que o CaP formado na PCL-A/t é majoritariamente do tipo amorfo (ACP), visto que não

tem morfologia definida nem mostra picos de difração em XRD, mesmo presente em abundância (aproximadamente 3% em massa, Tabela 4). Já no caso de PCL-E/t, possivelmente foi formado o fosfato de octacálcio (OCP), uma vez que a morfologia de placas só é observada nas formas mais instáveis e menos solúveis de fosfatos de cálcio. Finalmente, na membrana PCL-M/t, supõe-se que a forma majoritária seja o fosfato de dicálcio dihidratado (DCPD), que é a composição de núcleos estáveis precursores da mineralização biomimética (Surmenev *et al.*, 2014). A obtenção de morfologias tão distintas motivou a tentativa de caracterização dessas partículas por TEM. Esses resultados estão apresentados no próximo subcapítulo.

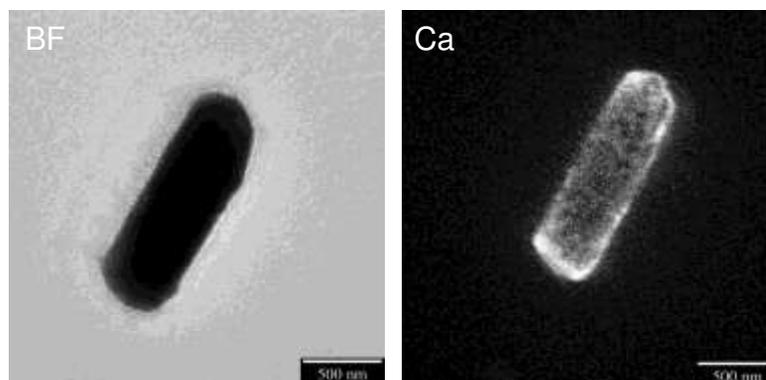
Em resumo pode-se afirmar, baseado nas observações e comparações das morfologias das partículas formadas com os diferentes agentes de nucleação, que hidrogenofosfato de bis(2-etilhexila) e hidrogenofosfato de bis(metacriloiloxietila) migram para a superfície numa taxa inferior ao ácido esteárico e que o mecanismo de nucleação e crescimento de CaP na superfície é dependente do agente de nucleação.

## 6.2. Morfologia do fosfato de cálcio

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) é hoje a principal técnica de caracterização de nanopartículas, pois permite realizar não só imagens, mas também análises químicas e cristalográficas das amostras, bem como uma combinação dessas técnicas. A caracterização por TEM de fosfatos de cálcio tem sido amplamente explorada desde a década de 60, com o início da ciência dos biomateriais. Entretanto, o preparo de amostras ainda é fator limitante para que seja possível obter informações adequadas e confiáveis. Os CaP, em especial os amorfos ou solúveis, são muito sensíveis ao feixe de elétrons e se desintegram, ou reorganizam, mudando sua estrutura cristalina quando expostos ao feixe por períodos prolongados. Além disso, neste trabalho, deseja-se obter informações sobre a morfologia de partículas aderidas à superfície de um polímero, o que acrescenta um novo desafio ao preparo de amostras, que é produzir um filme polimérico suficientemente fino.

As Figuras 34, 35, 36 e 37 apresentam micrografias obtidas por TEM da morfologia típica de partículas aderidas a um filme fino de PCL-A (produzido por *spin coating*). De uma forma geral é possível observar que existem três populações distintas

de partículas com diferentes formatos: bastões (Figura 34), placas (Figura 35) e irregulares (Figura 36 e Figura 37).



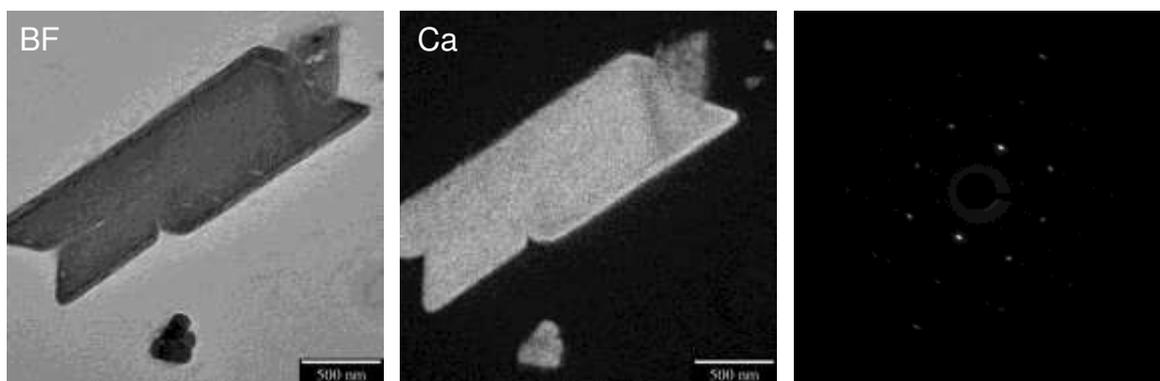
**Figura 34 - Micrografia eletrônica de transmissão de campo claro de uma partícula amorfa de fosfato de cálcio desprendida da superfície de PCL-A/t e o respectivo mapa de cálcio (direita).**

As partículas apresentadas nas Figuras 34 e 35 foram obtidas por remoção mecânica de partículas, a partir da superfície livre da membrana PCL-A/t. A literatura reporta que quando a fase ACP de CaP é formada por auto organização e nucleação espontânea, em geral sua morfologia é de bastão, como a apresentada na Figura 34 à esquerda (Zhang *et al.*, 2009).

A Figura 35 apresenta a imagem de campo claro, o mapa elementar de cálcio e o respectivo padrão de difração de uma placa retirada mecanicamente da membrana PCL-A/t. A comprovação da cristalinidade dessa partícula confirma o que já é amplamente discutido na literatura: CaP na forma de placas possui elevada organização cristalina, enquanto que na forma de bastões é amorfo (Wei *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2011). Possivelmente, a formação dessas partículas grandes, adsorvidas à matriz, é devido à supersaturação de íons  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{PO}_4^{-3}$  nas cavidades da face livre.

Enquanto que na Figura 34 e na Figura 35 as partículas observadas foram removidas mecanicamente da superfície livre da membrana, a partícula apresentada na Figura 36 está aderida a um filme fino de PCL-A produzido por *spin coating*. Nessa micrografia, bem como na micrografia apresentada na Figura 37, é possível perceber que as partículas bem aderidas à matriz polimérica não têm morfologia definida. Além

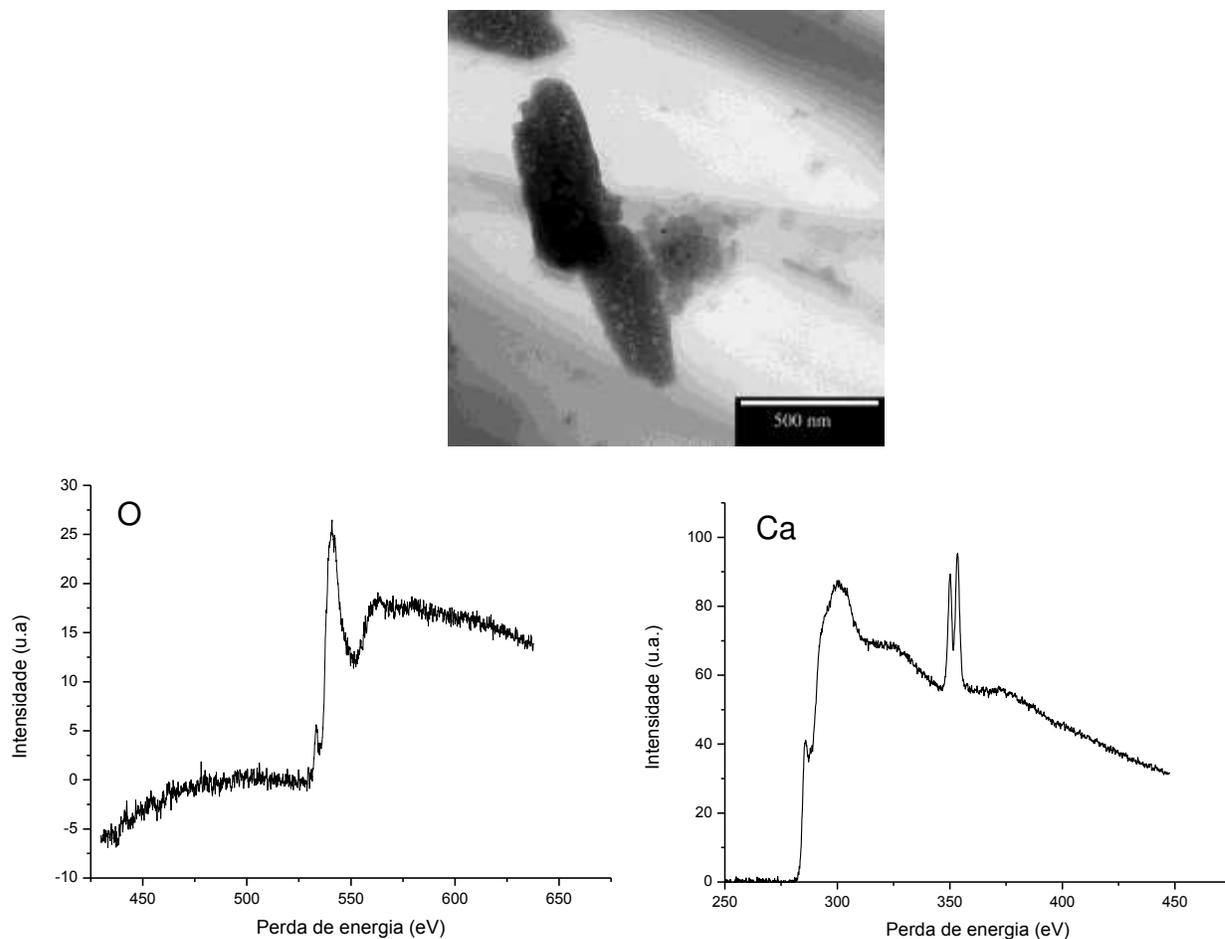
disso, na Figura 36 há indícios da degradação da partícula pelo feixe de elétrons, uma vez que é possível observar a formação de cavidades claras e esféricas na região menos espessa da partícula.



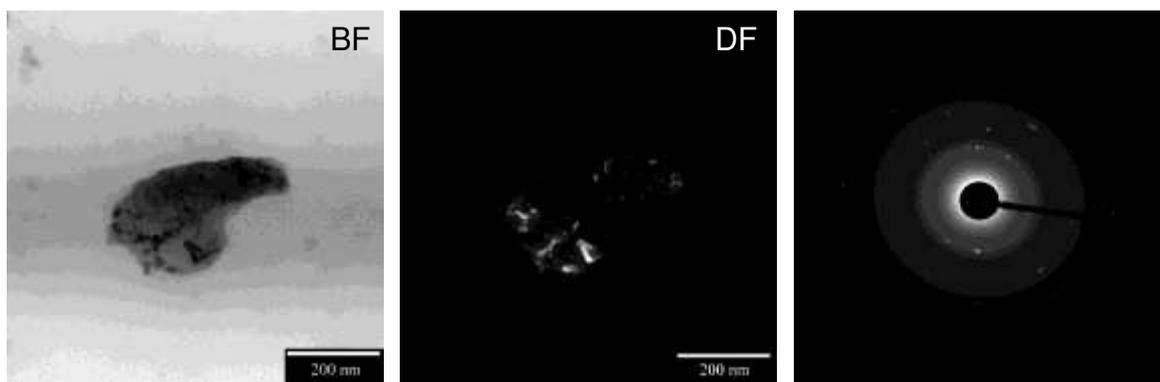
**Figura 35 - Micrografia eletrônica de transmissão de campo claro de uma partícula semi-cristalina de fosfato de cálcio desprendida da superfície de PCL-A/t, seu mapa de cálcio (centro) e seu padrão de difração (direita).**

A Figura 36 apresenta também os espectros EELS obtidos dessa partícula, que identificam cálcio (direita) e oxigênio (esquerda), comprovando a existência destes íons nessa região. Nesse tipo de análise, cálcio tipicamente apresenta um pico duplo e oxigênio um pico simples. A existência de um pequeno pico extra no espectro de oxigênio indica que este elemento está distribuído em dois ambientes químicos diferentes. Possivelmente os dois ambientes químicos diferentes são o íon  $\text{PO}_4^{-3}$  da partícula irregular de CaP (pico de menor intensidade, em 530 eV) e o da ligação éster da PCL da matriz polimérica onde a partícula está aderida (pico mais intenso, em 535 eV).

Finalmente, a Figura 37 apresenta as imagens de campo claro e campo escuro, bem como o padrão de difração de uma partícula de CaP aderida à PCL. Essa sequência de imagens, em especial o halo amorfo do padrão de difração, mostra que de fato o CaP obtido em PCL-A/t é majoritariamente amorfo, mas possui uma fração cristalina (Vallet-Regi & González-Calbet, 2004).



**Figura 36 - Micrografia eletrônica de transmissão (acima) de uma partícula de fosfato de cálcio aderida a um filme fino de PCL. Abaixo os espectros de perda de energia que caracterizam a presença de oxigênio (esquerda) e cálcio (direita).**



**Figura 37 – Micrografias eletrônicas de transmissão de campo claro (esquerda) e campo escuro (direita) de uma partícula semicristalina de fosfato de cálcio aderida à matriz de PCL-A/t e seu respectivo padrão de difração (direita).**



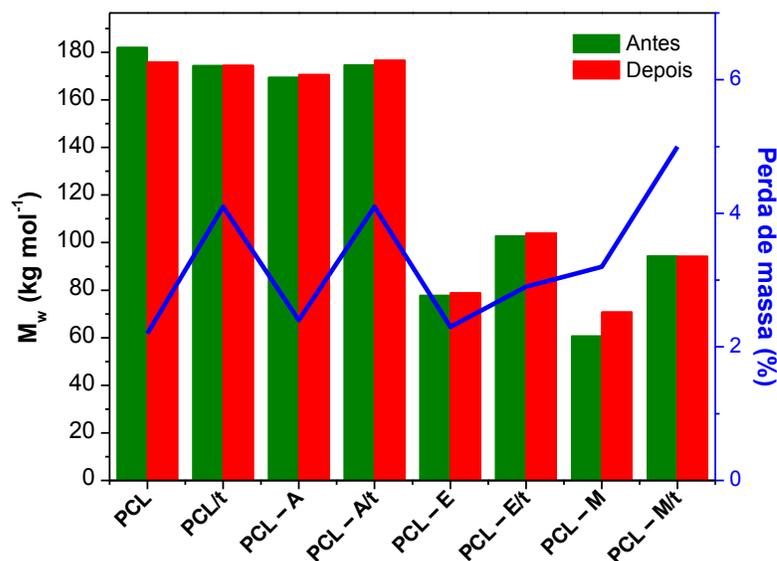
## Capítulo 7 – Avaliação da biocompatibilidade

---

Os resultados obtidos até este ponto indicam que todos os materiais preparados apresentaram características bastante semelhantes. Em termos das propriedades físico-químicas, há indícios de que as membranas PCL-E, PCL-E/t, PCL-M e PCL-M/t sejam menos hidrofóbicas e também mais cristalinas que as demais. Em relação à morfologia, foi observado que as membranas apresentam morfologias similares, independentemente do agente de nucleação utilizado. Entretanto, o tipo de CaP formado, bem como a taxa de nucleação e crescimento dessas partículas, é fortemente dependente do tipo de agente de nucleação utilizado.

A morfologia, a composição e as propriedades físico-químicas de dispositivos implantáveis precisam ser cuidadosamente controladas, uma vez que sua integração com o tecido em que será implantado é bastante afetada pelas mais discretas variações nessas propriedades (Roach *et al.*, 2007). A principal dificuldade em se produzir um dispositivo bioreabsorvível de PCL é ajustar a taxa de degradação do polímero à taxa de regeneração do tecido implantado (Barbanti *et al.*, 2005). A literatura reporta que, em geral, dispositivos de PCL são completamente absorvidos em aproximadamente 48 meses (Coombes *et al.*, 2004), enquanto que é esperado que uma membrana GBR seja completamente absorvida em apenas 24 meses (Kikuchi *et al.*, 2002).

Para avaliar o efeito da presença do agente de nucleação e/ou do CaP na taxa de degradação das membranas, foi realizado um ensaio de degradação hidrolítica em 30 dias. A norma ASTM F1635-11 para ensaios de degradação hidrolítica de dispositivos implantáveis bioreabsorvíveis determina que se utilize o tampão PBS para avaliar a degradação *in vitro*. No entanto, esse tampão também é responsável pela mineralização do dispositivo. Dessa forma, para avaliar a mineralização e a biodegradação separadamente optou-se substituir o tampão PBS por água deionizada neste ensaio. A Figura 38 mostra a perda de massa e variação de massa molar média ponderal ( $M_w$ ) das membranas após 30 dias de ensaio, com relação às características iniciais do material. A análise da morfologia das membranas foi realizada após 1 e 30 dias de degradação. Na Figura 39 são apresentadas as micrografias das membranas sem tratamento que foram degradadas, e na Figura 40 as micrografias das membranas com tratamento por imersão sequencial que também foram degradadas.



**Figura 38 - Perda de massa e variação de massa molar média ponderal durante o ensaio de degradação hidrolítica. As barras verdes referem-se à M<sub>w</sub> antes da imersão das membranas em PBS, enquanto que as barras vermelhas referem-se a M<sub>w</sub> após 30 dias de imersão em PBS.**

Após 1 dia de degradação não é possível verificar variações significativas na massa das membranas nem no pH do meio de degradação ( $\Delta\text{pH} \approx -0,5$ ), mas as micrografias já apresentam evidências de degradação na superfície desses dispositivos. As membranas PCL, PCL-A, PCL-M, PCL/t e PCL-A/t mostram fissuras e regiões escuras. Essas regiões escuras ocorrem devido à hidrólise superficial e local do polímero. Na análise de SEM estas regiões formam uma concentração local de cargas negativas que repelem o feixe de elétrons e se destacam como regiões mais escuras (Reimer, 1998). A membrana PCL-E, não apresentou evidências de degradação após 1 dia de ensaio. Na Figura 40 é possível verificar também que o CaP depositado nas membranas PCL-A/t, PCL-E/t e PCL-M/t foi parcialmente dissolvido, uma vez que a dispersão de partículas de CaP na superfície dessas membranas é menor em relação às membranas originais (Figura 30, Figura 31 e Figura 32).

Com 30 dias de degradação, observa-se um valor médio de perda de massa de aproximadamente 2% para todas as membranas. No entanto, aquelas que passaram pelos ciclos de imersão sequencial, apresentam uma perda de massa maior, provavelmente devido à dissolução parcial do CaP. As membranas PCL-M e PCL-M/t

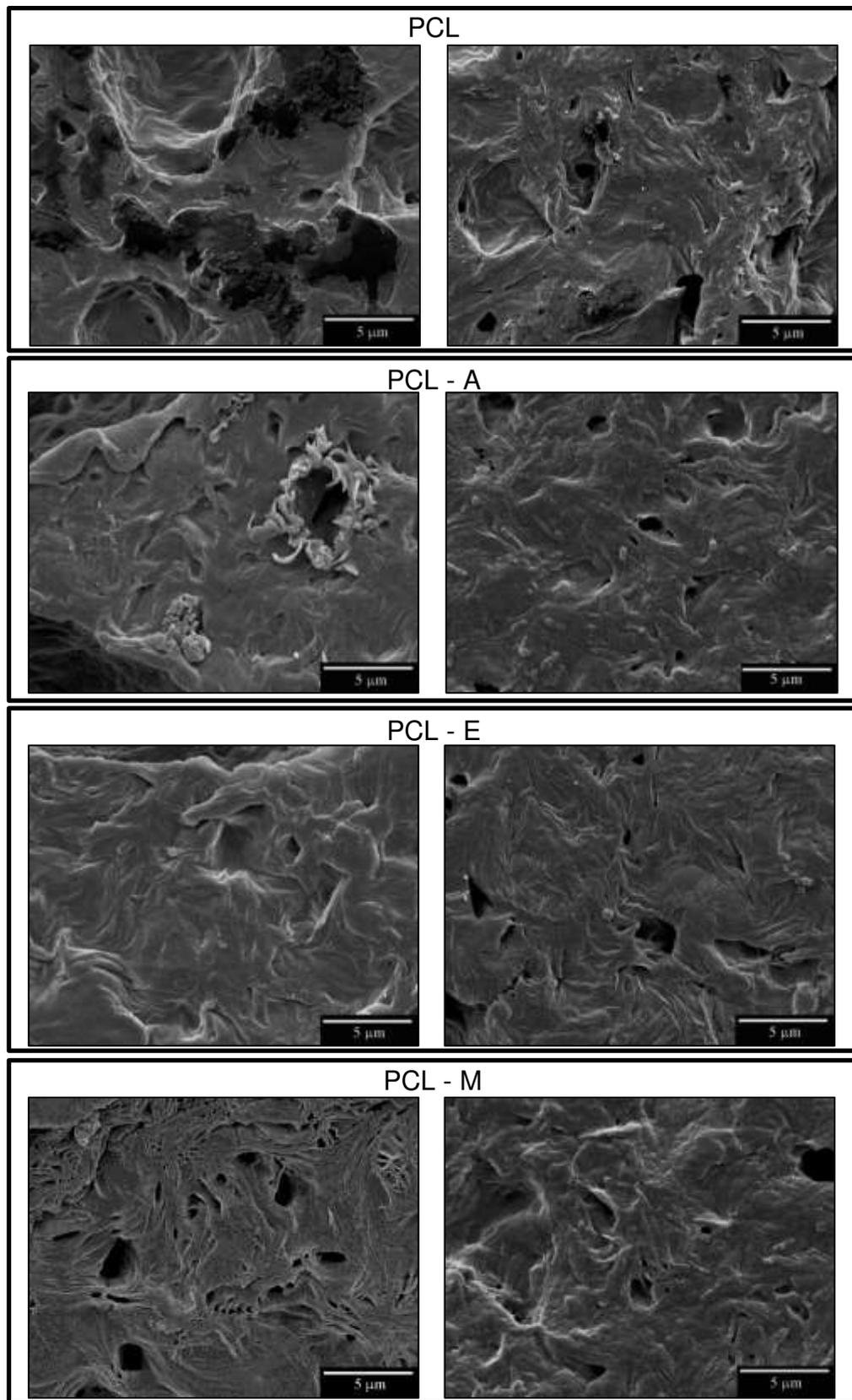


Figura 39 - Micrografias eletrônicas de varredura das membranas sem tratamento por ciclos de imersão sequencial após 24 horas (esquerda) e 30 dias (direita) de degradação hidrolítica.

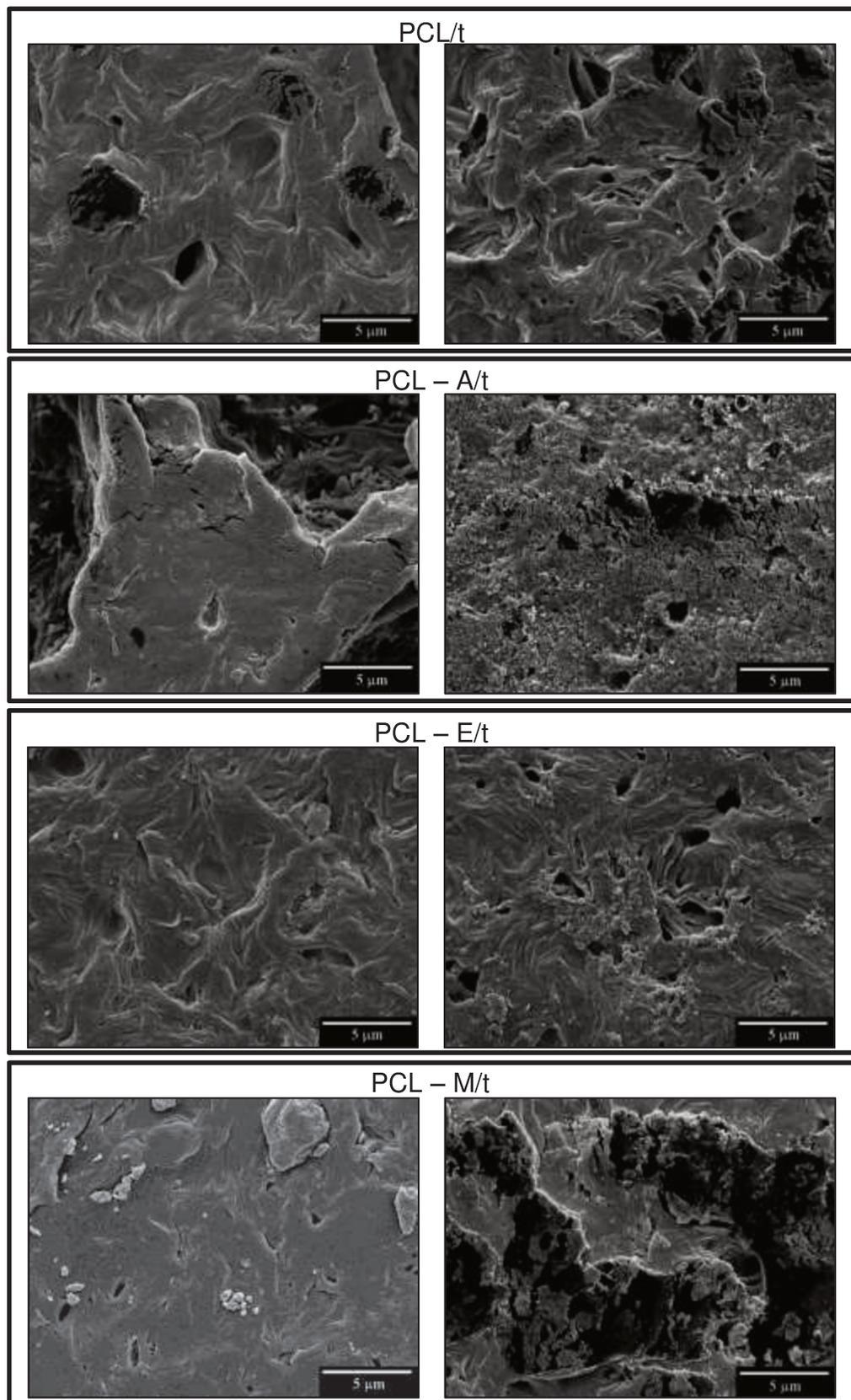


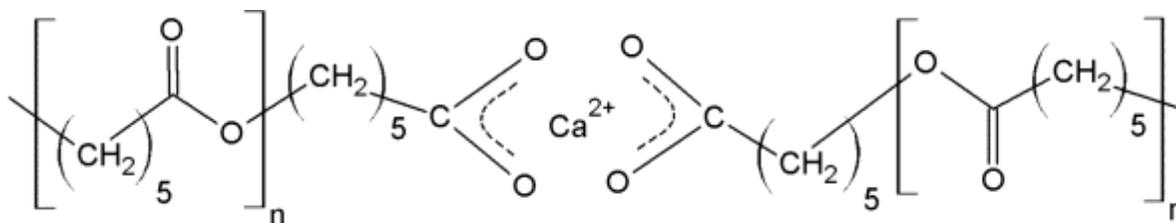
Figura 40 – Micrografias eletrônicas de varredura das membranas tratadas com os ciclos de imersão sequencial após 24 horas (esquerda) e 30 dias (direita) de degradação hidrolítica.

apresentaram os maiores valores de perda de massa. Além disso, foi verificado que o meio de degradação apresentou uma pequena diminuição do pH ( $\Delta\text{pH} \approx -1,5$ ), característica da hidrólise de poli( $\alpha$ -hidroxiácidos). Essa acidificação do meio de degradação é devido à liberação de oligômeros ácidos durante a hidrólise (Figura 5) (Castilla-Cortázar *et al.*, 2012).

A redução de massa molar durante a preparação das membranas é observada para todas as membranas que contém agente de nucleação, mas nas membranas contendo hidrogenofosfato de bis(2-etilhexila) ou hidrogenofosfato de bis(metacrilóioxietila) esta redução massa molar é mais acentuada (de  $182 \text{ kg mol}^{-1}$  para  $77,8 \text{ kg mol}^{-1}$  e  $60,7 \text{ kg mol}^{-1}$  respectivamente). Os resultados obtidos indicam que, possivelmente, a presença de hidrogenofosfato de bis(2-etilhexila), ou hidrogenofosfato de bis(metacrilóioxietila) na solução precursora acelera a biodegradação do polímero. Outros autores também reportaram mudanças nos mecanismos e taxas de biodegradação devido a mudanças na composição do meio de biodegradação (Barbanti *et al.*, 2005; Castilla-Cortázar *et al.*, 2012).

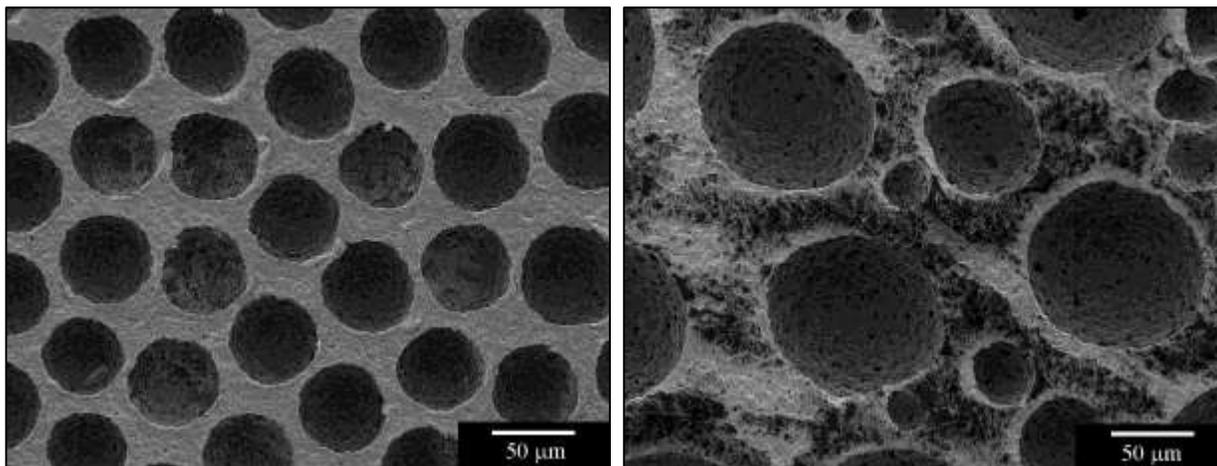
No caso das membranas contendo hidrogenofosfato de bis(2-etilhexila), ou hidrogenofosfato de bis(metacrilóioxietila), que passaram pelo tratamento superficial por ciclos de imersão sequencial, pode ser observada uma menor redução de massa molar (de  $174,4 \text{ kg mol}^{-1}$  para  $102,8 \text{ kg mol}^{-1}$  e  $94,4 \text{ kg mol}^{-1}$  respectivamente). Possivelmente, esse resultado indica que a presença de CaP, combinado com o agente de nucleação, altera o mecanismo de degradação do polímero, possivelmente devido à uma associação dos grupos iônicos terminais resultantes da degradação hidrolítica da PCL, formando complexos com o íon  $\text{Ca}^{+2}$  (Figura 41).

Além disso, a redução da massa molar média do polímero, em todos os casos, foi acompanhada pelo aumento de polidispersidade, como seria esperado. Vale destacar que a redução observada na massa molar da PCL nas membranas PCL-E, PCL-E/t, PCL-M e PCL-M/t não alterou significativamente as propriedades dinâmico-mecânicas da membrana. Por outro lado, justifica o aumento da cristalinidade desses materiais, como observado nos resultados de DSC (Tabela 7), e o aumento da molhabilidade, como observado nas medidas de ângulo de contato (Figura 25).



**Figura 41 - Mecanismo proposto para a recombinação de oligômeros de poli( $\epsilon$ -caprolactona) durante solubilização em THF após 30 dias de degradação hidrolítica.**

A Figura 42 (à esquerda) mostra uma micrografia de baixa ampliação da superfície livre da PCL-A/t. É possível verificar que praticamente todo o CaP foi solubilizado durante o ensaio de degradação hidrolítica, restando apenas algumas cavidades contendo partículas depositadas após 30 dias de ensaio. No entanto, nas cavidades que de fato contém CaP depositado, o volume e a densidade de partículas é maior do que na membrana antes da degradação (Figura 30).



**Figura 42 – Micrografias eletrônicas de varredura das superfícies livres de PCL-A/t (esquerda) e PCL-M/t (direita) após 30 dias de degradação hidrolítica.**

Nas micrografias da Figura 39 também pode-se notar que todas as membranas sem tratamento apresentam um aumento da rugosidade superficial em 30 dias de degradação. A literatura reporta que essa mudança de rugosidade pode ser atribuída à mudança na cristalinidade superficial do polímero ou à absorção de água pelo dispositivo (Castilla-Cortázar *et al.*, 2012). O mesmo não foi observado nas micrografias

da Figura 40, o que é mais um indício de que o CaP dificulta o acesso de água ao interior do dispositivo. No entanto, verifica-se também que todas as membranas que passaram pelos ciclos de imersão sequencial apresentaram redeposição de CaP, mas esse novo CaP tem morfologia e área de recobrimento distintas do CaP inicial.

Finalmente, os resultados obtidos na avaliação da biodegradação desses materiais mostram que a única membrana que apresentou perda de massa mais significativa e também extensa degradação da superfície livre foi a PCL-M/t (Figura 42, à direita). Logo esta seria a mais indicada para um implante de rápida degradação. No entanto, há a necessidade de se confirmar esses resultados em ensaios *in vitro*, uma vez que a literatura reporta que os mecanismos de degradação de um poli( $\alpha$ -hidroxiácido) podem ser muito diferentes *in vitro* e *in vivo* (Castilla-Cortázar *et al.*, 2012; Eldsäter *et al.*, 2000; Barbanti *et al.*, 2005).

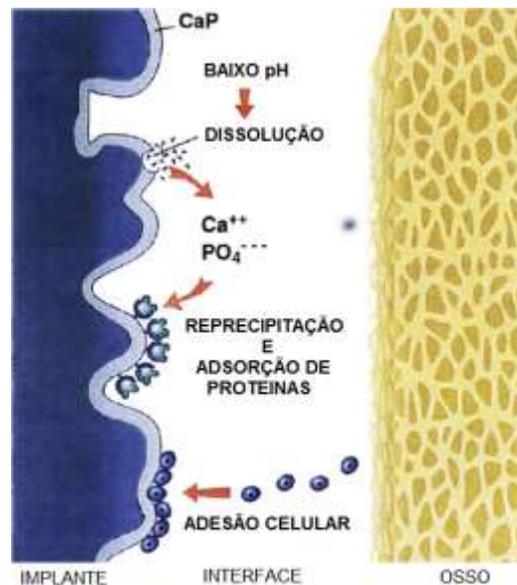
## 7.2. Mineralização

O processo de mineralização *in vitro* de biomateriais, para avaliar sua biocompatibilidade, foi desenvolvido por Kokubo e colaboradores (1990). Neste trabalho, os autores desenvolveram soluções tampão que simulavam o plasma sanguíneo. Estas são comumente chamadas de *simulated body fluid* (SBF). A metodologia desenvolvida utilizando SBF promoveu um crescimento expressivo da pesquisa de dispositivos para implante ósseo, uma vez que esta permite simular e acompanhar *in vitro* o desenvolvimento da matriz extracelular de tecidos duros.

Surmenev e colaboradores (2014) fizeram uma revisão da literatura apresentando o que já é conhecido até o momento sobre o mecanismo osteoindução de implantes recobertos com CaP, representado esquematicamente na Figura 43.

Com o advento da engenharia tecidual, a mineralização em SBF deixou de ser apenas um método de avaliação da viabilidade de um dispositivo e passou a ser também um método de tratamento superficial, visando aumentar a biocompatibilidade de determinados dispositivos. O próprio Kokubo (2005) fez uma revisão da literatura na qual resumiu os principais métodos de recobrimento de superfícies com CaP, que surgiram após a descoberta do SBF. Nesse artigo, são discutidos os pré-requisitos para a formação do CaP em superfícies, bem como os pré-requisitos para a boa

osteointegração dos dispositivos recobertos. Além disso, o trabalho aborda hipóteses interessantes que elucidam o mecanismo de formação desse recobrimento em metais, cerâmicas e polímeros.



**Figura 43 - Representação esquemática do mecanismo de osteoindução de implantes recobertos com fosfato de cálcio (Surmenev *et al.*, 2014).**

Apesar da mineralização biomimética hoje em dia ser uma forma muito comum de adequar superfícies de implantes ao meio corpóreo, o ensaio de mineralização *in vitro* nunca deixou de ser essencial para a avaliação da biocompatibilidade de dispositivos implantáveis, em especial, para aqueles direcionados à regeneração óssea. A principal questão que deve ser considerada na realização desses ensaios é o tempo requerido para formação de núcleos estáveis de CaP, uma vez que estes são precursores da mineralização total do dispositivo. Tipicamente, a literatura reporta tempos entre dois e sete dias para que isso ocorra, mas todos os trabalhos visam reduzir esse tempo, uma vez que quando o dispositivo é implantado, a mineralização concorre com a formação do tecido fibroso, que é bastante rápida. Se o tempo necessário para a formação dos núcleos de CaP e sua consequente mineralização e adesão de osteoblastos for superior ao tempo necessário para a formação da cápsula fibrosa pelo tecido conectivo fibroso, o dispositivo perderá suas funções.

Baseado nas evidências experimentais da existência de ânions na superfície das membranas produzidas neste trabalho, provenientes dos agentes de nucleação, bem como nas evidências da presença de núcleos estáveis de CaP formados previamente ao ensaio de mineralização em SBF, optou-se por realizar o ensaio em um período de 1 hora, para verificar se os ciclos de imersão sequencial são eficientes para acelerar a mineralização. As micrografias dos materiais, após o ensaio, estão apresentadas na Figura 44.

É possível observar que, exceto PCL-M, todas as membranas apresentam núcleos de CaP, o que comprova que a criação de cargas negativas, neste caso devido à presença de grupos ionizáveis provenientes dos agentes de nucleação, é essencial para a mineralização. A ausência de núcleos de CaP na PCL-M é mais uma comprovação de que o hidrogenofosfato de bis(metacrilóiloxietila) está menos disponível superficialmente que os outros agente de nucleação para agir na formação de núcleos estáveis de CaP. Já na PCL-M/t há mineralização extensa, possivelmente devido à excelente dispersão e estabilidade dos núcleos de CaP formados durante o tratamento superficial por ciclos de imersão sequencial (Figura 32).

A PCL pura apresenta também núcleos de CaP, devido a hidrólise superficial do polímero em contato com meio aquoso, que gera oligômeros aniônicos na superfície. Na PCL/t a extensa mineralização observada possivelmente é devido à existência de núcleos estáveis formados durante os ciclos de imersão sequencial, e também à presença de grupos carboxílicos formado na hidrólise da PCL. A literatura atribui a dispositivos espessos de poli( $\alpha$ -hidroxiácidos) como a PCL um mecanismo autocatalítico de degradação hidrolítica que acelera a taxa de biodegradação desses materiais (Barbanti *et al.*, 2005).

A membrana PCL-E apresenta poucos núcleos dispersos de mineralização, semelhante ao observado na Figura 31, o que comprova a pequena disponibilidade de cargas negativas nessa superfície. O hidrogenofosfato de bis(2-etilhexila) é mais apolar que o ácido esteárico, apresentando menos afinidade com a água e, portanto, menor tendência de migração para a superfície da membrana. Além disso, é possível notar que membrana de PCL-E/t apresenta mudança da morfologia das partículas de CaP depositadas, que deixam de ser na forma de placas e passam a ser na forma de um

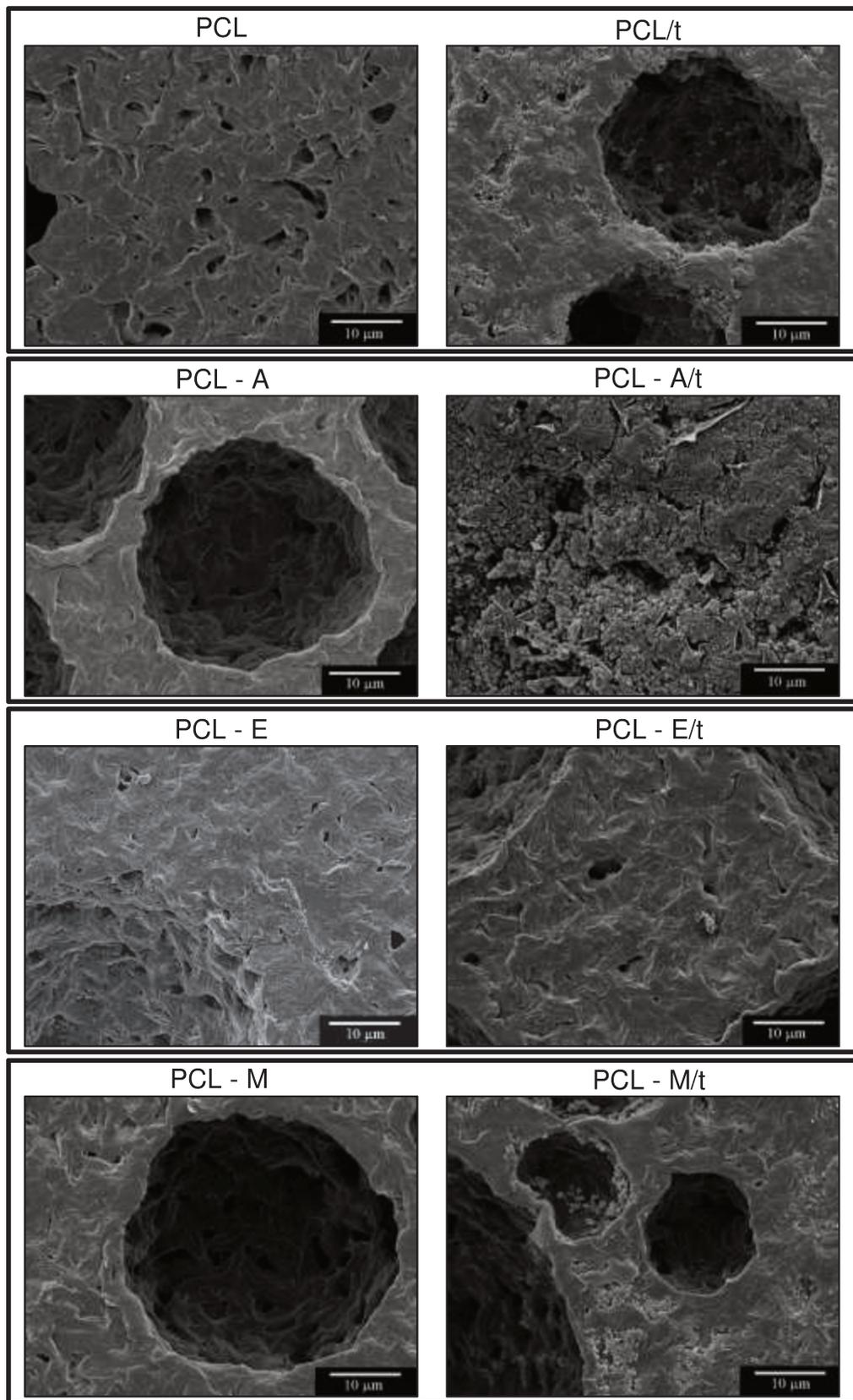
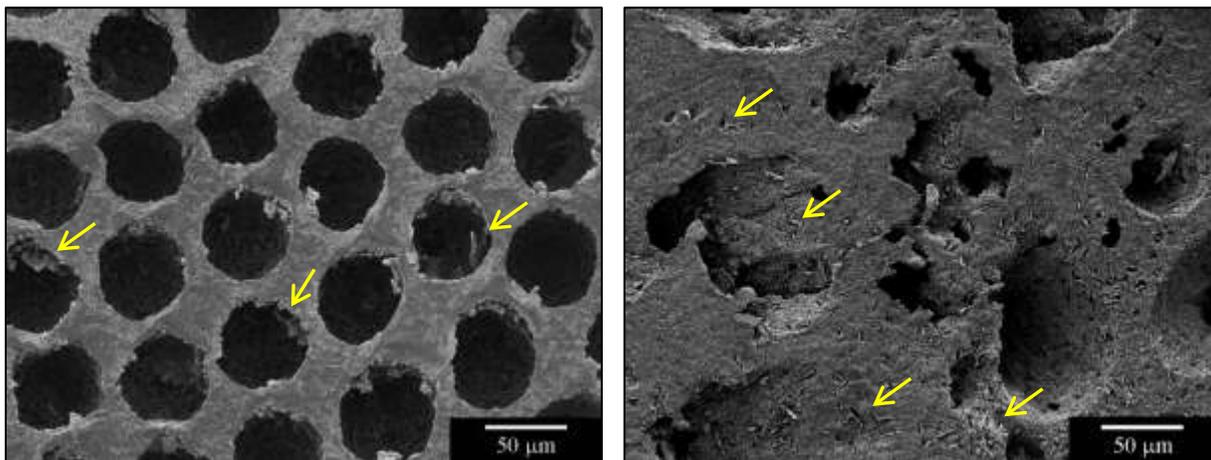


Figura 44 - Micrografias eletrônicas de varredura das membranas, com e sem o tratamento por ciclos de imersão sequencial, após 1 hora de mineralização em tampão PBS a 37°C.

filme fino contínuo. A morfologia das partículas de CaP desta membrana é muito similar à observada por Kim, Kim e colaboradores (2000).

A Figura 45 apresenta micrografias de baixa ampliação das superfícies livre e do substrato da PCL-A/t após a mineralização. Observa-se que a rugosidade da superfície é bastante diminuída pela mineralização, o que aponta para a formação de um filme mais coeso de CaP. Na superfície livre (à esquerda) nota-se também a formação de placas de CaP pouco aderidas à superfície do polímero (indicadas por flechas amarelas). Na superfície do substrato (à direita) observa-se a formação de fissuras (indicadas por flechas amarelas) em diversas regiões, possivelmente originadas pela contração desta camada de partículas.



**Figura 45 - Micrografias eletrônicas de varredura da superfície livre (esquerda) e do substrato (direita) da membrana PCL - A/t, após 1 hora mineralização.**

Finalmente, a membrana PCL-A também apresenta poucos núcleos de CaP, provavelmente devido à acidez local provocada pela presença do ácido esteárico que reduz a taxa de deposição. Já a membrana PCL-A/t, ao contrário do que foi observado na biodegradação, não apresentou evidências de dissolução do CaP previamente depositado.

Todas essas observações sugerem que PCL/t e PCL-M/t são as membranas mais eficientes em induzir a mineralização, pois apresentam extensa deposição de CaP em apenas uma hora de imersão. Isto, aliado ao fato de PCL-M/t ter apresentado também o melhor desempenho na biodegradação, sugere que este material seja mais útil em

termos de adesão celular. No entanto, vale ressaltar que tão importante quanto a adesão celular é a diferenciação celular, que permite que fibroblastos e osteoblastos se diferenciem a osteoclastos, consolidando o tecido ósseo. No ensaio de biodegradação comprovou-se que o CaP formado em PCL-A/t é bastante solúvel. Isto sugere que esta membrana seja capaz de produzir elevadas concentrações locais de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{PO}_4^{-3}$ , o que é favorável à diferenciação celular (Figura 43). Assim, este também é um material bastante promissor.

### 7.3. Viabilidade celular MTT

O fenômeno da adesão celular é uma etapa fundamental no processo de interação biomaterial-célula, sendo usualmente associado à capacidade das células em reconhecer, se ligar e interagir com um substrato, ou seja, à afinidade celular. Somente depois de aderidas é que as células iniciam os processos de espraiamento, proliferação, produção de matriz extracelular e manutenção do fenótipo celular necessários para a formação de um novo tecido (Jian, 2002).

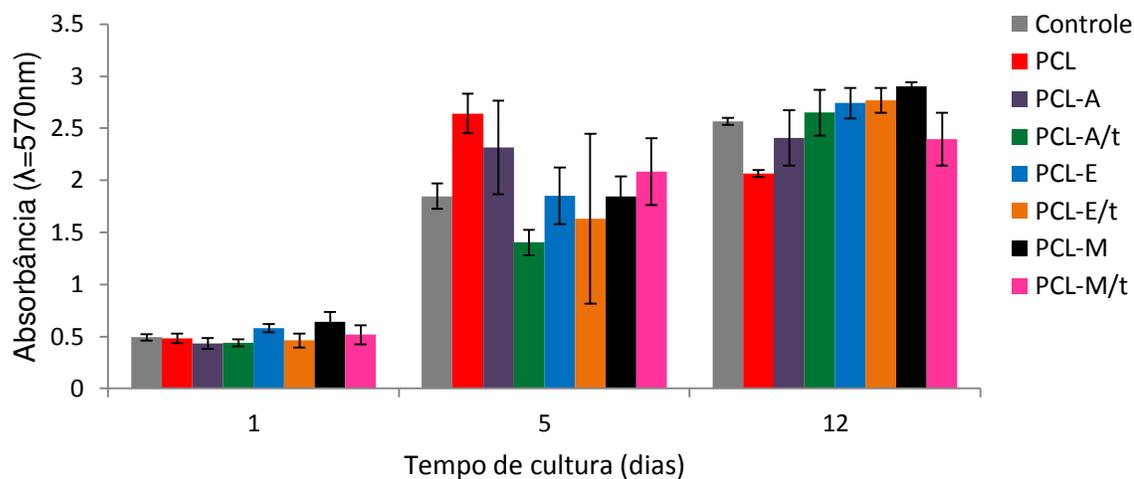
Sabe-se que a morfologia e composição química da superfície do dispositivo são fundamentais para que uma série de reações, a nível molecular e celular, ocorram na interface dos biomateriais com tecidos receptores (Jiao & Cui, 2007).

Roach e colaboradores (2007) descrevem, em detalhes, o processo de adesão celular. A primeira etapa envolve a adsorção de água na superfície do dispositivo quando o mesmo é implantado, o que ocorre em questão de alguns minutos. Essa adsorção ocorre preferencialmente em superfícies contendo cargas negativas. A formação desse filme fino de água permite que proteínas sinalizadoras se aproximem e também sejam aderidas à superfície do dispositivo. Como as proteínas são moléculas frequentemente carregadas positivamente, a presença de cargas negativas, em geral, favorece esse processo. A qualidade da adsorção dessas proteínas é dada, não só pela uniformidade dessa adsorção ao longo de toda a área superficial do dispositivo, mas também pela conformação estrutural da proteína.

Para que a célula reconheça a proteína e ligue-se a ela é necessário que sítios específicos sejam preservados. A preservação, ou não, desses sítios é dada pela interação da proteína com o dispositivo. Esse processo pode levar algumas horas.

Finalmente, após formada a camada de proteínas aderidas à superfície do polímero, as células são capazes de aproximar-se da superfície dos dispositivos e ligar-se às proteínas nela adsorvidas. Na prática, a adesão celular é feita por uma ligação química entre a parede celular e as proteínas sinalizadoras adsorvidas na superfície do implante. Esse processo pode levar desde minutos até dias para se completar, dependendo do tecido em que o dispositivo foi implantado (Roach *et al.*, 2007).

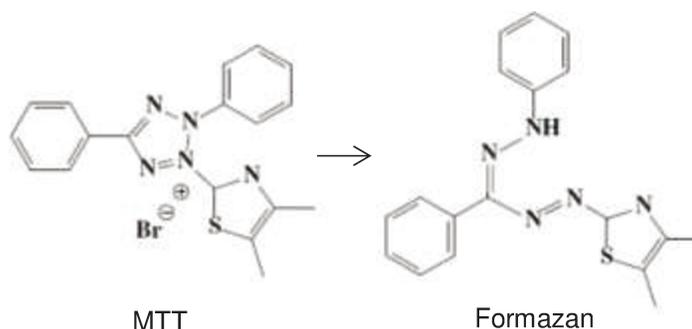
Portanto, a biocompatibilidade é muito dependente de fatores como o tipo de tecido implantado, tamanho e geometria do dispositivo bem como das características da superfície. Logo, mesmo materiais muito similares, como os apresentados neste trabalho, podem ter performances *in vitro* e *in vivo* muito diferentes. A Figura 46 apresenta os resultados do ensaio de viabilidade celular até 12 dias, realizado pelo método metabólico do MTT.



**Figura 46 - Viabilidade celular pelo método do ensaio metabólico do MTT das membranas estudadas em 1, 5 e 12 dias de cultivo celular.**

O teste de viabilidade celular do tipo MTT é amplamente utilizado em estudos que visam avaliar a citocompatibilidade de biomateriais, além de sua capacidade de sustentar o crescimento celular. Este método baseia-se na redução do [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil] brometo de tetrazólio (MTT) a formazan, conforme a Figura 47.

Esse processo ocorre somente nas mitocôndrias de células metabolicamente ativas. Assim, a habilidade celular de reduzir o MTT indica integridade e viabilidade mitocondrial e, portanto, viabilidade celular. Neste ensaio, a quantificação da viabilidade celular é dada pela determinação colorimétrica do formazan por espectrofotometria (Mossmann, 1983).



**Figura 47 - Redução química do MTT a formazan.**

A partir da análise estatística dos dados apresentados, observa-se que após 1 dia de cultivo, todas as amostras apresentam adesão celular significativa e comparável entre si e o controle. Não há diferença estatística entre as membranas.

Após 5 dias de cultivo todas as membranas foram capazes de sustentar a adesão celular iniciada na etapa anterior e promover a proliferação celular, uma vez que todas apresentaram crescimento celular estatisticamente significativo (de 1 a 5 dias) e comparável ao controle. No entanto, a comparação estatística entre as membranas mostra que, com 95% de confiança, PCL-A/t e PCL-E/t apresentaram menor crescimento celular que as demais. No caso da PCL-A/t possivelmente isso ocorre devido à dissolução do CaP superficial, que pode causar uma mudança do ambiente químico local, desfavorável à proliferação celular. Já no caso de PCL-E/t, a proliferação celular reduzida pode ser atribuída à grande heterogeneidade da superfície, evidenciada pela pronunciada barra de erro. Possivelmente, a heterogeneidade de superfície é devido a presença de ilhas de CaP na superfície dessa membrana.

Finalmente, em 12 dias de cultivo todas as amostras se mostraram igualmente viáveis em termos de citocompatibilidade, com comportamento similar ao controle. No entanto, apenas PCL-A/t, PCL-E/t e PCL-M apresentaram crescimento significativo

entre 5 e 12 dias. Provavelmente, o crescimento na PCL-A/t foi significativo em 12 dias de cultivo, devido a trocas frequentes de meio de cultura que permitiram eliminar possíveis perturbações no ambiente químico da região de crescimento celular devido a dissolução de CaP. No caso da PCL-E/t, pode-se propor que o crescimento não significativo após 5 dias deve-se a um retardamento de crescimento, devido à não uniformidade da superfície. Assim, é natural que em tempos mais longos o crescimento volte a ser significativo, como de fato ocorreu.

Surmenev e colaboradores (2014) reportam que altas concentrações locais, próximas à superfície do implante, de íons  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{PO}_4^{-3}$  promovem a diferenciação de fibroblastos a osteoblastos e destes a osteoclastos. A diferenciação celular é um processo independente da proliferação e ambos não podem ocorrer simultaneamente, devido ao alto gasto energético de cada processo celular. O CaP que recobre PCL-A/t é altamente solúvel, como comprovado nos ensaios de biodegradação e mineralização, portanto existe a hipótese que em 5 dias de cultivo este material estivesse passando por um processo de diferenciação celular, e por isso não apresentou crescimento significativo em 5 dias, mas voltou a apresentar crescimento significativo em 12 dias de ensaio. No entanto, essa hipótese só pode ser confirmada com a realização de testes específicos para a diferenciação celular, como o da fosfatase alcalina.

Em longos tempos de cultivo, devido à limitação espacial, dispositivos bidimensionais em geral apresentam confluência das células, o que inibe o crescimento, ou mesmo, provoca morte celular. Neste trabalho, a membrana PCL-M, apresentou crescimento significativo em todas as etapas de cultivo e por isso é a mais promissora em termos de adesão celular, uma vez que não tem evidências de confluência celular. O comportamento diferenciado da PCL-M pode ser devido ao fato desta ser mais porosa (Tabela 6) que as demais e possuir menor  $M_w$ , o que favorece a degradação e também a lixiviação de oligômeros resultantes de sua degradação. Ambos fatores contribuem para aumentar a área superficial da membrana, favorecendo o crescimento celular prolongado.



## 8.1 Conclusões

Neste trabalho foram preparadas membranas assimétricas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) com superfícies modificadas pelo crescimento de fosfato de cálcio. As membranas foram preparadas pelo método de inversão de fases induzida por vapor e o crescimento de fosfato de cálcio na superfície das membranas foi realizado por ciclos de imersão sequencial. Os métodos de preparo foram otimizados, utilizando planejamentos experimentais. Foi avaliada a influência da estrutura molecular do agente de nucleação de fosfato de cálcio na morfologia do material, nas propriedades físico-químicas e também na biocompatibilidade das membranas.

A inversão de fases induzida por vapor produziu membranas com aproximadamente 50% de porosidade, contendo cavidades esféricas na superfície livre, com diâmetros variando entre dezenas de  $\mu\text{m}$  até alguns mm. Foram testados três agentes de nucleação: ácido esteárico, hidrogenofosfato de bis(2-etilhexila) e hidrogenofosfato de bis(metacrilóioxietila). Apenas o hidrogenofosfato de bis(metacrilóioxietila) provocou uma discreta mudança na morfologia, aumentando a porosidade da membrana consolidada.

Os agentes de nucleação foram avaliados na concentração molar de 0,2% (em massa) com relação à massa total da membrana. Essa concentração foi suficiente para permitir a nucleação e o crescimento de fosfato de cálcio, mas não foi suficiente para provocar mudanças significativas no ângulo de contato e nas propriedades térmicas e mecânicas do material.

A estrutura química do agente de nucleação mostrou ter forte influência no tipo de fosfato de cálcio formado, uma vez que é determinante em termos de número e força dos grupos polares ionizáveis disponíveis na superfície e, por sua vez, na área total da superfície que será efetivamente recoberta e na estabilidade dos núcleos de fosfato de cálcio e tipo de cristal formado.

Foi verificado que o hidrogenofosfato de bis(2-etilhexila), assim como o hidrogenofosfato de bis(metacrilóioxietila), promove a aceleração da hidrólise da matriz de poli( $\epsilon$ -caprolactona) quando em solução. Esse efeito resultou na redução da massa

molar média ponderal do polímero de  $182 \text{ kg mol}^{-1}$  para  $77 \text{ kg mol}^{-1}$  e  $102 \text{ kg mol}^{-1}$ , para as membranas contendo hidrogenofosfato de bis(2-etilhexila) e para  $60 \text{ kg mol}^{-1}$  e  $94 \text{ kg mol}^{-1}$  para as membranas contendo hidrogenofosfato de bis(metacrilóioxietila) sem e com, respectivamente, o tratamento superficial por ciclos de imersão sequencial. Essa redução de massa molar foi responsável pelo aumento no grau de cristalinidade dessas membranas.

No ensaio de biodegradação foi observado que membranas contendo hidrogenofosfato de bis(metacrilóioxietila), com e sem tratamento por ciclos de imersão sequencial, apresentaram a maior perda de massa, de 5,0% e 3,2%, respectivamente, e também a maior extensão de degradação superficial em 30 dias de degradação hidrolítica em água deionizada.

No ensaio de mineralização, todas as membranas preparadas promoveram a nucleação e o crescimento de fosfato de cálcio após uma hora de imersão em fluido corpóreo simulado a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , exceto a membrana contendo hidrogenofosfato de bis(metacrilóioxietila) sem tratamento superficial. Este resultado comprova que o método desenvolvido nesse trabalho é eficiente em acelerar a deposição de fosfato de cálcio na superfície de dispositivos poliméricos bioreabsorvíveis. Os materiais mais promissores nesse sentido foram as membranas tratadas superficialmente por ciclos de imersão contendo ácido esteárico ou hidrogenofosfato de bis(metacrilóioxietila).

Os resultados de biocompatibilidade, avaliados pelo ensaio metabólico do MTT em até 12 dias, indicaram citocompatibilidade de todas as membranas preparadas, e ausência de potencial efeito tóxico ou confluência celular. As membranas que podem ser consideradas mais promissoras nesse aspecto são novamente aquelas contendo hidrogenofosfato de bis(metacrilóioxietila) e ácido esteárico, ambas após 10 ciclos de imersão sequencial a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

A metodologia desenvolvida neste trabalho, envolvendo o preparo de membranas poliméricas modificadas superficialmente, ainda não havia sido reportada na literatura, porém mostrou-se bastante promissora. A combinação do processo de inversão de fases induzido por vapor com a adição de agentes de modificação superficial, que promovem a nucleação e crescimento de fosfato de cálcio sobre a superfície de filmes

porosos, mostrou-se útil para a produção de membranas bioreabsorvíveis e citocompatíveis, com superfícies adequadas à integração com o tecido ósseo.



## Referências Bibliográficas

---

Araujo, J. V., Martins, A., Leonor, I. B., Pinho, E. D., Reis, R. L., & Neves, N. M. (2008). Surface controlled biomimetic coating of polycaprolactone nanofiber meshes to be used as bone extracellular matrix analogues. *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition*, 19 (10), 1261–1278.

Barbanti, S. H., Zavaglia, C. A. C., & Duek, E. A. R. (2005). Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. *Polímeros*, 15 (1), 13-21.

Biró, E., Németh, A. Sz., Feczko, T., Tóth, J., Sisak, Cs., & Gyenis, J. (2009). Three-step experimental design to determine the effect of process parameters on the size of chitosan microspheres. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48 (3), 771-779.

Canevarolo, S. V. (2006). *Ciência de polímeros* (2<sup>a</sup> ed.). São Carlos, Brasil: Artiber.

Castilla-Cortázar, I., Más-Estellés, J., Meseguer-Dueñas, J. M., Escobar Ivirico, J. L., Marí, B., & Vidaurre, A. (2012). Hydrolytic and enzymatic degradation of a poly( $\epsilon$ -caprolactone) network. *Polymer Degradation and Stability*, 97 (8), 1241-1248.

Cassu, S. N., & Felisberti, M. I. (2005). Comportamento dinâmico-mecânico e relaxações em polímeros e blendas poliméricas. *Química Nova*, 28 (2), 255-263.

Choong, C., Yuan, S., Thian, E. S., Oyane, A., & Triffitt, J. (2011). Optimization of poly( $\epsilon$ -caprolactone) surface properties for apatite formation and improved osteogenic stimulation. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, 100A (1), 353-361.

Coombes, A. G. A., Rizzi, S. C., Williamson, M., Barralet, J. E., Downes, S., & Wallace, W. A. (2004). Precipitation casting of polycaprolactone for applications in tissue engineering and drug delivery. *Biomaterials*, 25 (2), 315-325.

Diban, N., Haimi, S., Bolhuis-Versteeg, L., Teixeira, S., Miettinen, S., Poot, A., Grijpma D., & Stamatialis D. (2013). Development and characterization of poly( $\epsilon$ -caprolactone) hollow fiber membranes for vascular tissue engineering. *Journal of Membrane Science*, 438 (1), 29-37.

Elbert, D. L., & Hubbell, J. A. (1996). Surface treatments of polymers for biocompatibility. *Annual Reviews for Materials Science*, 26 (1), 365-394.

Eldsäter, C., Erlandson, B., Renstad R., Albertsson, A.-C., & Karlsson, S. (2000). The biodegradation of amorphous and crystalline regions in film-blown poly( $\epsilon$ -caprolactone). *Polymer*, 41 (4), 1297-1304.

- Fabbri, P., Bondioli, F., Messori, M., Bartoli, C., Dinucci, D., & Chiellini, F. (2010). Porous scaffolds of polycaprolactone reinforced with in situ generated hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21 (1), 343–351.
- Feczkó, T., Tóth, J., Dósa, Gy., & Gyenis, J. (2011). Optimization of protein encapsulation in PLGA nanoparticles. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 50 (8), 757-765.
- Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., Silva, E. G. P., Portugal, L. A., dos Reis P. S., Souza A. S., & dos Santos W. N. L. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597 (2), 179-186.
- Fink, J. K. (2010). *A concise introduction to additives for thermoplastic polymers* (1<sup>a</sup> ed.). Beverly: Scrivener Publisher LLC.
- Fujihara, K., Kotaki, M., & Ramakrishna, S. (2005). Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers. *Biomaterials*, 26 (19), 4139–4147.
- Gentile, P., Chiono, V., Tonda-Turo, C., Ferreira, A. M., & Ciardelli, G. (2011). Polymeric membranes for guided bone regeneration. *Biotechnology Journal*, 6 (10), 1187-1197.
- Guarino, V., Taddei, P., Di Foggia, M., Fagnano, C., Ciapetti, L. A., & Ambrosio L. (2009). The Influence of Hydroxyapatite Particles on *In vitro* Degradation Behavior of Poly  $\epsilon$ -caprolactone–Based Composite Scaffolds. *Tissue Engineering: Part A*, 15 (11), 3655- 3667.
- Han, M.-J., & Bhattacharyya, D. (1995). Changes in morphology and transport characteristics of polysulfone membranes prepared by different demixing conditions. *Journal of Membrane Science*, 98 (3), 191-200.
- Hata, K., Kokubo, T., Nakamura T., & Yamamuro T. (1995). Growth of a Bonelike Apatite Layer on a Substrate by a Biomimetic Process. *Journal of the American Ceramic Society*, 78 (4), 1049-1053.
- Hong, H., Wei, J., & Liu, C. (2007). Development of asymmetric gradational-changed porous chitosan membrane for guided periodontal tissue regeneration. *Composites Part B: Engineering*, 38 (3), 311–316.
- Ji, W., Yang, F., Ma, J., Bouma, M. J., Boerman, O. C., Chen, Z., van den Beuken J. J. J. P., & Jansen J. A. (2013). Incorporation of stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  in PCL/gelatin electrospun membranes for guided bone regeneration. *Biomaterials*, 34(3), 735-745.

Jian Y., Bei J., & Wang S. (2002). Enhanced cell affinity of poly (D,L-lactide) by combining plasma treatment with collagen anchorage. *Biomaterials*, 23 (12), 2607–2614.

Jiang J., Fan Y., Zhang, L., Yang, H., Chen, Y., Zhao, C., & Zhang, P. (2011). Synthesis and characterization of multi-lamellar mesostructured hydroxyapatites using a series of fatty acids. *Journal of Materials Science*, 46 (11), 3828 – 3834.

Jiao, Y. P., & Cui, F. Z. (2007). Surface modification of polyester biomaterials for tissue engineering. *Biomedical Materials*, 2 (4), R24-R37.

Kampf, G. (1986). *Characterization of plastics by physical methods* (1<sup>a</sup> ed.). Munich, Germany: Hanser Publishers.

Karageorgiou, V., & Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26 (27), 5474–5491.

Khare, V. P., Greenberg, A. R., & Krantz, W. B. (2005). Vapor-induced phase separation—effect of the humid air exposure step on membrane morphology. Part I. Insights from mathematical modeling. *Journal of Membrane Science*, 258 (1), 140-156.

Khor, H. L., NG, K. W., Htay, A. S., Schantz, J.-H., Teoh, S. H., & Hutmacher, D. W. (2003). Preliminary study of a polycaprolactone membrane utilized as epidermal substrate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 14 (1), 113-120.

Kikuchi, M., Koyama, Y., Takakuda, K., Miyairi, H., Shirahama, N., & Tanaka, J. (2002). *In vitro* change in mechanical strength of  $\beta$ -tricalcium phosphate/copolymerized poly-L-lactide composites and their application for guided bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research*, 62 (2), 265-272.

Kim, H. M., Kim, Y., Park, S.-J., Rey, C., Lee, H. M., Glimcher, M. J., & Jo J. S. (2000). Thin film of low-crystalline calcium phosphate apatite formed at low temperature. *Biomaterials*, 21 (11), 1129-1134.

Kim, H. M., Kokubo, T., Fujibayashi, S., Nishiguchi, S., & Nakamura, T. (2000). Bioactive macroporous titanium surface layer on titanium substrate. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52 (3), 553-557.

Kim, T. H., Oh, S. H., Na, S. Y., Chun, S. Y., & Lee, J. H. (2012). Effect of biological/physical stimulation on guided bone regeneration through asymmetrically porous membrane. *Journal of Biomedical Materials Research*, 100A, 1512–1520.

Kokubo, T. (2005). Design of bioactive bone substitutes based on biomineralization process. *Materials Science and Engineering C*, 25 (1), 97-104.

- Kokubo, T., Kushitani, H., Sakka, S., Kitsugi, T., & Yamamuro, T. (1990). Solutions able to reproduce *in vivo* surface-structure changes in bioactive glass ceramic A-W<sup>3</sup>. *Journal of Biomedical Materials Research*, 24 (6), 721-734.
- Koleske, J. V., & Lundberg, R. D. (1969). Lactone Polymers I. Glass Transition Temperature of Poly- $\epsilon$ -caprolactone by Means of Compatible Polymer Mixtures. *Journal of Polymer Science: Part A*, 7 (1), 795-807.
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (3<sup>a</sup> ed.). Maryland, USA: Springer.
- Lebourg, M., Suay Antón, J., & Gomez Ribelles, J. L. (2010). Characterization of calcium phosphate layers grown on polycaprolactone for tissue engineering purposes. *Composites Science and Technology*, 70 (13), 1796–1804.
- Lee, H. J., Jung, B., Kang, Y. S., & Lee, H. (2004). Phase separation of polymer casting solution by nonsolvent vapor. *Journal of Membrane Science*, 245 (1), 103-112.
- Li, C.-L. , Wang, D.-M. , Deratani, A., Quémener, D., Bouyer, D., & Lai, J.-Y. (2010). Insight into the preparation of poly(vinylidene fluoride) membranes by vapor-induced phase separation. *Journal of membrane science*, 361 (1), 154-166.
- Liao, C., Zhao, J., Yu, P., Tong, H., & Luo, Y. (2012). Synthesis and characterization of low content of different SiO<sub>2</sub> materials composite poly(vinylidene fluoride) ultrafiltration membranes. *Desalination*, 285 (1), 117-122.
- Liu, H., Han, C., & Dong, L. (2010). Study of the biodegradable poly( $\epsilon$ -caprolactone)/clay nanocomposite foams. *Journal of applied polymer science*, 115 (5), 3120-3129.
- Liu, W., Zhao Z., Sun, L., & Wang M. (2010). Formation of Polyethersulfone Film with Regular Microporous Structure by Water Vapor Induced Phase Separation. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 18 (3), 529-532.
- Ma, Z., Mao, Z., & Gao, C. (2007). Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 60 (1), 137-157.
- Madurantakam, P. A., Rodrigues, I. A., Cost, C. P., Viswanathan, R., Simpson, D. G., Beckman, M. J., Moon, P. C., & Bowlin, G. L. (2009). Multiple factor interactions in biomimetic mineralization of electrospun scaffolds. *Biomaterials*, 30 (29), 5456–5464.
- Mangindaan, D., Chen, C.-T., & Wang, M.-J. (2012). Integrating sol–gel with cold plasmas modified porous polycaprolactone membranes for the drug-release of silver-sulfadiazine and ketoprofen. *Applied Surface Science*, 262 (1), 114-119.

Mavis, B., Demirtas, T. T., Gumusderelioglu, M., Gunduz, G., & Çolak, U. (2009). Synthesis, characterization and osteoblastic activity of polycaprolactone nanofibers coated with biomimetic calcium phosphate. *Acta Biomaterialia*, 5 (8), 3098–3111.

Mossmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 (1), 55-63.

Mulder, M. (1996). *Basic principles of membrane technology* (1<sup>a</sup> ed.). Dordrecht, Holland: Kluwer Academic Publishers.

Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, 32 (8), 762-798.

Neppalli, R., Causin, V., Marega, C., Saini, R., Mba, M., & Marigo, A. (2011). Structure, Morphology, and Biodegradability of Poly( $\epsilon$ -caprolactone)-Based Nanocomposites. *Polymer Engineering & Science*, 51 (8), 1489 - 1496.

Norma ASTM D3418 (2012). Standard test method for transition temperatures and enthalpies of fusion and crystallization of polymers by differential scanning calorimetry. ASTM International.

Norma ASTM F1635 (2011). Standard test method for in vitro degradation testing of hydrolytically degradable polymer resins and fabricated forms for surgical implants. ASTM International.

Osada, Y., & Nakagawa, T. (1992). *Membrane Science and Technology* (1<sup>a</sup> ed.). New York, USA: Marcel Dekker Inc.

Oyane, A., Kawashita, M., Nakanishi, K., Kokubo, T., Minoda, M., Miyamoto, T., & Nakamura T. (2003). Bonelike apatite formation on ethylene-vinyl alcohol copolymer modified with silane coupling agent and calcium silicate solutions. *Biomaterials*, 24 (10), 1729–1735.

Oyane, A., Uchida, M., Yokoyama, Y., Choong, C., Triffitt, J., & Ito, A. (2005). Simple surface modification of poly( $\epsilon$ -caprolactone) to induce its apatite-forming ability. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 75 (1), 138-145.

Park, H. C., Kim, Y. P., Kim, H. Y., & Kang, Y. S. (1999). Membrane formation by water vapor induced phase inversion. *Journal of Membrane Science*, 156 (2), 169-178.

Peng, Y., Fan, H., Dong, Y., Song, Y., & Han H. (2012). Effects of exposure time on variations in the structure and hydrophobicity of polyvinylidene fluoride membranes prepared via vapor-induced phase separation. *Applied Surface Science*, 258 (20), 7872-7881.

Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., & Lemons, J. E. (1996). *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine*. (1<sup>a</sup> ed.) San Diego, USA: Academic Press.

Reimer L. (1998). *Scanning Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis*. (2<sup>a</sup> ed.) Berlin, Germany: Springer.

Roach, P., Eglin, D., Rohde, K., & Perry, C. C. (2007). Modern biomaterials: a review—bulk properties and implications of surface modifications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18 (7), 1263–1277.

Saier, H.-D., & Strathmann, H. (1975). Asymmetric Membranes: Preparation and Applications. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 14 (7), 452-459.

Salgado, C. L., Sanchez, E. M. S., Zavaglia, C. A. C., & Granja, P. L. (2012). Biocompatibility and biodegradation of polycaprolactone-sebacic acid blended gels. *Journal of Biomedical Materials Research*, 100A, 243-251.

Serizawa, T., Kawanishi, N., & Akashi, M. (2001). Hydroxyapatite deposition by alternating soaking technique on poly(vinyl alcohol)-coated polyethylene films. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 12 (12), 1293-1331.

Strathmann, H. (2001). Membrane Separation Processes: Current Relevance and Future Opportunities. *AIChE Journal*, 47 (5), 1077 - 1087.

Surmenev, R. A., Surmeneva, M. A., & Ivanova, A. A. (2014). Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis – A review. *Acta Biomaterialia*, 10 (2), 557-579.

Taguchi, T., Kishida, A., & Akashi, M. (1998). Hydroxyapatite Formation on/in Poly(vinyl alcohol) Hydrogel Matrices Using a Novel Alternate Soaking Process. *Chemistry Letters*, 27 (8), 711-712.

Taguchi, T., Muraoka, Y., Matsuyama, H., Kishida, A., & Akashi, M. (2001). Apatite coating on hydrophilic polymer-grafted poly(ethylene) films using an alternate soaking process. *Biomaterials*, 22 (1), 53-58.

Tanahashi, M., & Matsuda, T. (1997). Surface functional group dependence on apatite formation on self-assembled monolayers in a simulated body fluid. *Journal of Biomedical Materials Research*, 34 (3), 305-315.

Tiaw, K. S., Goh, S. W., Hong, M., Wang, Z., Lan, B., & Teoh, S. H. (2005). Laser surface modification of poly(epsilon-caprolactone) (PCL) membrane for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 26 (7), 763-769.

- Tsai, J. T., Su, Y. S., Wang, D. M., Kuo, J. L., Lai, J. Y., & Deratani, A. (2010). Retainment of pore connectivity in membranes prepared with vapor-induced phase separation. *Journal of Membrane Science*, 362 (1), 360-373.
- Vallet-Regi, M., & González-Calbet, J. M. (2004). Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Progress in Solid State Chemistry*, 32 (1), 1-31.
- Vaquette C., & Cooper-White J. (2013). *A simple method for fabricating 3-D multilayered composite scaffold*. *Acta Biomaterialia*, 9 (1), 4599-4608.
- Wei, K., Wang, Y., Lai, C., Ning, C., Wu, D., Wu, G., Zhao, N., Chen, X., & Ye, J. (2005). Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanobelts and nanoparticles. *Materials Letters*, 59 (2), 220-225.
- Yang, F., Both, S. K., Yang, X., Frank Walboomers, X., & Jansen, J. A. (2009). Development of an electrospun nano-apatite/PCL composite membrane for GTR/GBR application. *Acta Biomaterialia*, 5 (9), 3295–3304.
- Yang, F., Wolke, J. G. C., & Jansen, J. A. (2008). Biomimetic calcium phosphate coating on electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds for bone tissue engineering. *Chemical Engineering Journal*, 137 (1), 154–161.
- Ye, Q., Xiang, Y., Chen, F., Xu, W., & Yang, H. (2013). The formation of regular porous polyurethane membrane via phase separation induced by water droplets from ultrasonic atomizer. *Materials letters*, 100 (1), 23-25.
- Yen, C., He, H., Lee, L. J., & Ho, W. S. W. (2009). Synthesis and characterization of nanoporous polycaprolactone membranes via thermally- and nonsolvent-induced phase separations for biomedical device application. *Journal of Membrane Science*, 343 (1), 180–188.
- Yeong, W. Y., Sudarmadji, N., Yu, H. Y., Chua, C. K., Leong, K., Venkatraman, S. S., Boey, Y. C. F., & Tan, L. P. (2010). Porous polycaprolactone scaffold for cardiac tissue engineering fabricated by selective laser sintering. *Acta Biomaterialia*, 6 (6), 2028–2034.
- Zhang, Y., Lu, J., Wang, J., Yang, S., & Chen, Y. (2009). Synthesis of nanorod and needle-like hydroxyapatite crystal and role of pH adjustment. *Journal of Crystal Growth*, 311 (23), 4740 – 4746.