UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

DIEGO CLEMENTE DE SOUZA

Biocompósitos eletrofiados de PLLA com alto conteúdo de partículas de fosfatos de cálcio funcionalizados para regeneração óssea

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

30/11/2017

DIEGO CLEMENTE DE SOUZA

Biocompósitos eletrofiados de PLLA com alto conteúdo de partículas de fosfatos de cálcio funcionalizados para regeneração óssea

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Química.

Orientador: Prof Dr. Luiz Henrique Catalani

São Paulo
2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação: Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

d729b

de Souza, Diego
Biocompósitos eletrofiados de PLLA com alto conteúdo de partículas de fosfatos de cálcio funcionalizados para regeneração óssea / Diego de Souza. - São Paulo, 2017.
150 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Catalani, Luiz Henrique

1. biomateriais. 2. hidroxiapatita. 3. fosfatos de cálcio. 4. eletrofiação. 5. regeneração óssea. I. T. II. Catalani, Luiz Henrique, orientador.

DIEGO CLEMENTE DE SOUZA

Biocompósitos eletrofiados de PLLA com alto conteúdo de partículas de fosfatos de cálcio funcionalizados para regeneração óssea

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Química.

Aprovado em:_____

Banca Examinadora:

Prof(a). Dr(a).:_____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).:_____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).:_____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).:_____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).:_____
Instituição: _____
Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Em primeiro, agradeço ao meu Deus e amado Pai por ter me abençoado durante esse doutorado. Me capacitou para que eu desse o meu melhor na prova de ingresso do programa, me sustentou durante todo esse período suprindo todas as minhas necessidades, e, finalmente, me conduziu a finalizar o projeto com êxito. Isso tudo, porém, é pequeno comparado com a suprema grandeza de poder conhecer a Cristo Jesus, meu Senhor. “Que diremos, pois, diante dessas coisas? Aquele que não poupou a seu próprio Filho, mas o entregou por todos nós, como não nos dará juntamente com ele, e de graça, todas as coisas?”

Quero agradecer ao professor Luiz Henrique Catalani, por sua orientação neste projeto de pesquisa. Agradeço pela confiança em meu trabalho e pela liberdade que sempre me deu. Sobretudo, agradeço pelas correções feitas ao decorrer deste doutorado, as quais me ajudaram a aprender e a me aprimorar.

Agradeço à professora Maria Rita Passos Bueno e ao seu aluno Gerson por terem me recebido em seu laboratório e por todo auxílio que me deram durante meus ensaios *in vitro*.

Agradeço à professora Luciane Portas Capelo pela parceria estabelecida para a execução dos experimentos *in vivo*. Sua colaboração foi de grande valor para o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

Agradeço aos meus colegas do grupo de Biomateriais Poliméricos do IQ-USP: Alliny, Fernando, Mariana, Ricardo, Ana Paula, Flávia, Henrique, Isabela, Giovanne, Daniel, Denisse, Laura, Gabriela e Yanirys. Alguns foram fundamentais para meu desenvolvimento como pesquisador, em especial, agradeço toda a ajuda e ensinamentos da Alliny Naves. Outros fizeram os meus dias mais divertidos e

alegres durante a desafiadora jornada dessa pesquisa científica. Também agradeço ao Joca, nosso estimado técnico, que com muita dedicação sempre providenciou todos os materiais necessários para meus experimentos. Ainda agradeço a todos os funcinários da Central Analítica do IQ-USP, em especial a Vânia, pela disposição em atender minhas solicitações com alegria.

Também agradeço a minha família: minha mãe e meu pai, Izilda e Orival, minha irmã Vanessa e minha tia Elça pelo apoio, torcida e, em especial, pelo amor a mim dedicados.

Em especial quero muito agradecer a minha noiva, Barbara, por ser minha companheira amada e fiel. Tive de abdicar muitas horas que poderia estar com ela para poder me dedicar na redação desta tese. Ela, sempre muito compreensiva, me apoiou, e me esperou. Além disso, me cobriu de palavras incentivadoras.

Agradeço à Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Pois dele, por ele e para ele são todas as coisas. A ele seja a glória para sempre. Amém! Maranatha.

(Paulo de Tarso, apóstolo de Cristo Jesus)

RESUMO

SOUZA, D. C. **Biocompósitos eletrofiados de PLLA com alto conteúdo de partículas de fosfatos de cálcio funcionalizados para regeneração óssea**. 2017. 140 p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Este trabalho visou a produção de suportes para crescimento celular constituídos de compósitos de poli(L-lactídeo) (PLLA) e diversos tipos de fosfatos de cálcio (CaP). A hidroxiapatita deficiente em cálcio (HA_D) e o fosfato octacálcico (OCP) em tamanhos submicrométricos foram sintetizados. Hidroxiapatita (HA) e o β-fosfato tricálcico (β-TCP) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Uma mistura de HA_D:β-TCP (7:3) também foi preparada. Para melhorar a dispersão da fase mineral em uma matriz polimérica de PLLA, utilizou-se cloreto de lauroíla para funcionalizar a superfície dos CaP. Os espectros de infravermelho e a análise termogravimétrica confirmaram a presença de laurato na superfície de partículas de CaP. As partículas de HA pura também foram funcionalizadas com cloreto de lauroíla para fins comparativos. Compósitos de PLLA/CaP-laurato foram fabricados utilizando a técnica de eletrofiação. A funcionalização da superfície do CaP com laurato resultou em uma melhoria significativa na dispersão de partículas de CaP na matriz polimérica, permitindo a inclusão de até 40% da fase mineral sem comprometer as propriedades mecânicas. Microscopia eletrônica de varredura (SEM) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foram utilizadas para investigar a morfologia da fibra. A perda de massa e a liberação de cálcio dos suportes durante a degradação em uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) foram medidas. HA_D e OCP se mostraram ser mais solúveis do que HA e HA_D:β-TCP (7:3). A bioatividade dos compósitos foi investigada por imersão das fibras em um fluido corporal simulado (SBF) a 37 °C e pH 7.4. Embora todos os suportes de PLLA/CaP-laurato foram capazes de formar

uma camada de apatita em sua superfície após a exposição em SBF, os resultados demonstraram um aumento significativo na mineralização quando HA_D, OCP e HA_D:β-TCP (7:3) são a fase mineral no compósito em vez da HA. Além disso, malhas produzidas a partir das fibras eletrofiadas de PLLA/CaP-laurato, utilizadas como suporte para crescimento celular, favoreceram a adesão e proliferação de células de fibroblastos de camundongo (NIH-3T3) e células tronco mesenquimais de dentes decíduos humanos (SHED). Finalmente, suportes a partir das malhas PLLA/HA_D-laurato e PLLA/OCP-laurato apresentaram melhor desempenho para acelerar a calcificação *in vitro* como resultado da osteoindução de células SHED e de células pré-osteoblásticas derivadas de calvária de rato (MC3T3-E1) se comparados aqueles contendo HA e HA_D:β-TCP (7:3). Esses novos materiais são propostos como biocompósitos de rápida degradação de CaP, para serem utilizados em aplicações de regeneração óssea em ortodontia e ortopedia.

Palavras-chave: poli (L-lactideo) (PLLA), hidroxiapatita deficiente em cálcio, fosfato octacálcico, hidroxiapatita, eletrofiação, osso.

ABSTRACT

SOUZA, D. C. **Electrospun PLLA biocomposites with high content of calcium phosphates functionalized for bone regeneration.** 2017. 140 p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

This work aimed at the generation of scaffolds for cellular growth constituted by poly(L-lactide) (PLLA) and several types of calcium phosphate (CaP). Calcium deficient hydroxyapatite (HA_D) and octacalcium phosphate (OCP) were synthesized in submicrometer sizes. Hydroxyapatite (HA) and β-tricalcium phosphate (β-TCP) were purchased from Sigma-Aldrich. A mixture of HA_D:β-TCP (7:3) also was prepared. In order to improve the dispersion of the mineral phase in a PLLA polymeric matrix, lauroyl chloride was used to functionalize the surface of CaP. Infrared spectra and thermal gravimetric analysis confirmed the presence of laurate on the surface of CaP particles. Neat HA particles were also functionalized with lauryl chloride for comparative purposes. Composites of PLLA/CaP-laurate were fabricated by electrospinning method. The functionalization of CaP surfaces resulted in significant improvement of the dispersion of CaP particles into the polymeric matrix, allowing inclusion of up to 40% of mineral phase without compromising its mechanical properties. Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) were employed to investigate the morphology of the fibers. The mass loss and calcium release of the scaffolds during degradation in phosphate buffered saline (PBS) were measured. HA_D and OCP are more soluble than HA and HA_D:β-TCP (7:3). The bioactivity of the composites was investigated by immersing the fibers in a simulated body fluid (SBF) at 37°C and pH 7.4. Although all PLLA/CaP-laurate can form apatite precipitation on their surface after exposition to SBF, the results demonstrate a significant enhancement in the mineralization when

HA_D, OCP and HA_D:β-TCP (7:3) are the mineral phase in the composite instead of HA. Furthermore, mats obtained from PLLA/CaP-laurate electrospun fibers favored the mouse fibroblast cells (NIH-3T3) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) attachment and proliferation. Finally, PLLA/HA_D-laurate and PLLA/OCP-laurate meshes showed better performance in accelerate the calcium phosphate mineralization on its surface as a result of the *in vitro* osteoinduction of SHEDs and calvaria derived mouse preosteoblastic cells (MC3T3-E1) if compared of those containing HA and HA_D:β-TCP (7:3). These new materials are proposed as fast degradation CaP biocomposites to be used in bone regeneration applications in orthodontics and orthopedics.

Keywords: poly(L-lactide) (PLLA), calcium deficient hydroxyapatite, octacalcium phosphate, hydroxyapatite, electrospinning, bone.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP - Fosfato de Cálcio Amorfo

ALP - Fosfatase alcalina

ARS - Coloração vermelha de alizarina

BCP - Fosfato de cálcio bifásico (mistura de HA com β-TCP)

BMP - Proteína morfogenética osséa

CaP - Fosfatos de cálcio

DMEM - *Dubelco's Modified Eagle Medium*

DMEM/F-12 - Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12

DMF- N,N-Dimetilformamida

ECM - Matriz extracelular

FTIR - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

HA - Hidroxiapatita

HA_D - Hidroxiapatita deficiente em cálcio

ICP-OES - Espectrômetro ótico de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado

MC3T3-E1 - Células pré-osteoblásticas derivadas de calvária de rato

MSCs - Células tronco mesenquimais

MTT - Brometo de metiltiazoltetrazólio

NIH-3T3 - Células de fibroblastos de camundongos

OCP - Fosfato octacálcico

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PLGA - Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)

PLLA - poli (L-lactideo)

PLLA/CaP - Biocompósitos formados por uma mistura de PLLA com fosfatos de cálcio

PLLA/CaP-L - Biocompósitos formados por uma mistura de PLLA com fosfatos de calcio funcionalizados com laurato

PLLA/HA-L - Biocompósitos formados por uma mistura de PLLA com HA funcionalizada com laurato

PLLA/ HA_D-L - Biocompósitos formados por uma mistura de PLLA com HA_D funcionalizada com laurato

PLLA/ HA_D: β-TCP-L - Biocompósitos formados por uma mistura de PLLA com HA_D: β-TCP (7:3) funcionalizada com laurato

PLLA/ OCP:HA (9:1)-L - Biocompósitos formados por uma mistura de PLLA com OCP:HA (9:1) funcionalizada com laurato

SBF - *Simulated Blood Fluid*

SEM - Microscopia eletrônica de varredura

SFB - Soro fetal bovino

SHED - Células-tronco mesenquimais de dentes decíduos humanos

TEM - Microscopia Eletrônica de Transmissão

TGA - Análise termogravimétrica

TGA/MS - Análise gravimétrica acoplada com espectrometria de massas

XRD - Difratometria de raios X

α-MEM - *Minimum Essential Medium Eagle, α modification*

β-TCP - β-fosfato tricálcico

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

1 BIOMATERIAIS 19
1.1 Classificação dos Biomateriais 21
1.2 Requisitos de um Biomaterial 22
1.3 Biomateriais Poliméricos 23
1.3.1 Poli(ácido lático) (PLA) 26
1.4 Biomateriais cerâmicos - Fosfatos de cálcio 29
1.4.1 Hidroxiapatita (HA) 31
1.4.2 Fosfato Tricálcico (TCP) 32
1.4.3 Hidroxiapatita deficiente em cálcio (HA_D) 33
1.4.4 Fosfato Octacálcico (OCP) 34
1.5 Biomateriais Compósitos 35
1.5.1 Biocompósitos de PLLA com HA 37
1.5.2 Modificação da superfície da HA 38
2 ELETROFIAÇÂO 39
2.1 Aplicações 40
2.1.1 Engenharia de Tecido Ósseo 41

JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

3 OBJETIVO GERAL 43
3.1 Objetivos Específicos 43
3.1.1 Síntese de fosfatos de cálcio 43
3.1.2 Funcionalização dos fosfatos de cálcio 43
3.1.3 Fabricação e caracterização de biocompósitos eletrofiados 44
3.1.4 Estudo da bioatividade dos compósitos 44

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS 45
5 SÍNTESE DE FOSFATOS DE CÁLCIO 46
5.1 Síntese 1: Hidroxiapatita deficiente em cálcio (HA_D) 46
5.2 Síntese 2: Fosfato octacálcico (OCP) 46
5.3 Caracterização das biocerâmicas obtidas 46
5.4 Fosfato de Cálcio Bifásico HA_D/β-TCP (7:3) 47
6 FOSFATOS DE CÁLCIO FUNCIONALIZADOS COM LAURATO 47
6.1 Ensaio de Sedimentação 48

6.2 Ensaio Mecânico 48
7 FABRICAÇÃO DE MALHAS ELETROFIADAS 49
7.1 Preparação da amostra 50
7.2 Parâmetros da solução - viscosidade 50
7.3 Parâmetros da eletrofiação 50
7.4 Caracterização das malhas eletrofiadas 51
7.4.1 *Morfologia* 51
7.4.2 *Porosidade* 51
7.4.3 *Medidas de ângulo de contato* 52
8 ENSAIO DE DEGRADAÇÃO 53
9 ENSAIO DE BIOATIVIDADE EM SBF 54
10 ENSAIO DE CULTURA CELULAR 55
10.1 Teste de Citotoxicidade 55
10.2 Cultura de Células 56
10.2.1 *Células de fibroblastos de camundongos NIH-3T3* 56
10.2.2 *Células-tronco mesenquimais de dentes decíduos humanos (SHED)* 56
10.2.3 *Células pré-osteoblásticas derivadas de calvária de rato (MC3T3-E1)* 57
10.3 Teste de Adesão e Proliferação Celular 57
10.4 Diferenciação Osteoblástica *in vitro* 58
11 ENSAIO *IN VIVO* 59
12 ANÁLISE ESTATÍSTICA 60

RESULTADOS E DISCUSSÕES

13 CARACTERIZAÇÃO DAS FASES DE FOSFATOS DE CÁLCIO 61
13.1 Síntese 1: hidroxiapatita deficiente em cálcio (HA_D) 61
13.2 Síntese 2: fosfato octacálcico (OCP) 65
14 FOSFATOS DE CÁLCIO FUNCIONALIZADOS COM LAURATO 68
14.1 Caracterização das partículas funcionalizadas 68
14.2 Ensaio de Sedimentação 73
14.3 Ensaio Mecânico 75
15 FABRICAÇÃO DE MALHAS ELETROFIADAS 79
15.1 Viscosidade das soluções 80
15.2 Morfologia 81
15.3 Porosidade 88
15.4 Medidas de ângulo de contato 89
16 ENSAIO DE DEGRADAÇÃO 91
17 ENSAIO DE BIOATIVIDADE EM SBF 97
18 ENSAIO DE CULTURA CELULAR 104

18.1 Teste de Citotoxicidade 104
18.2 Teste de Adesão e Proliferação Celular 106
18.2.1 *Células de fibroblastos de camundongos NIH-3T3* 106
18.2.2 *Células-tronco mesenquimais de dentes decíduos humanos (SHED)* 108
18.3 Diferenciação Osteoblástica *In Vitro* 110
18.3.1 *Ensaio de Atividade de Fosfatase Alcalina (ALP)* 111
18.3.2 *Ensaio de Coloração com Vermelho de Alisarina (ARS)* 115
19 ENSAIO *IN VIVO* 119

CONCLUSÕES

20 CONCLUSÕES 129
21 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS 130

REFERÊNCIAS

22 REFERÊNCIAS 133

ANEXOS 145

Introdução

1 BIOMATERIAIS

Os órgãos e tecidos do corpo podem se desgastar devido ao envelhecimento e/ou por razões patológicas. Ossos ficam frágeis e quebram, os poderes de visão e audição diminuem, o sistema circulatório mostra sinais de bloqueio, tumores aparecem quase aleatoriamente em ossos, seios, pele e órgãos vitais. E além destes processos naturais, ainda existem outros fatores que podem contribuir para isso, tais como acidentes com veículos motores, armas, ferramentas ou como consequência de práticas esportivas[1,2]. Em especial, os distúrbios musculo-esqueléticos são a causa mais comum de dor severa a longo prazo e afetam centenas de milhões de pessoas ao redor do mundo[3]. A magnitude dos problemas de saúde relacionados à estrutura óssea tem levado pesquisadores à procura de materiais que possam substituir de forma apropriada os ossos danificados. Devido a isso, as Nações Unidas e a Organização Mundial de Saúde declararam os anos 2000-2010 como a década do osso e articulações[3,4]. A década do osso e juntas foi aprovada por quinze países, incluindo o Reino Unido, a Áustria, a Suécia, o Brasil, a Tanzânia e a Holanda; e em mais de 650 organizações em todo o mundo[4]. Apenas em 2004, mais de 1.100.000 procedimentos cirúrgicos envolvendo a excisão parcial de osso, enxerto ósseo e reparação de fratura foram realizados nos EUA com um custo total estimado em mais de US$ 5 bilhões[5].

O reparo de defeitos ósseos de tamanhos críticos ainda é desafiador nos campos de implantologia, cirurgia maxilofacial e ortopedia. Algumas terapias, como autoenxertos (tecidos removidos do próprio indivíduo) e aloenxertos (tecidos e órgãos de outros indivíduos da mesma espécie ou de cadáveres humanos), estão associadas a várias limitações[6]. Os autoenxertos podem fornecer todos os elementos osteogênicos necessários para a regeneração óssea, como suportes tridimensionais osteocondutivos, células osteogênicas e fatores de crescimento osteoindutivo[7]. No entanto, o autoenxerto está associado a uma série de limitações, como a dor e a morbidade do sitio doador, cirurgia prolongada e volume disponível limitado, por essa razão, fica restrito ao preenchimento de pequenas áreas afetadas[5]. Além disso, é difícil reproduzir a curvatura anatômica em locais específicos, por exemplo, defeitos da órbita óssea, mesmo com o corte cuidadoso dos enxertos[8]. A alternativa convencional a um autoenxerto é um enxerto ósseo alogênico. Embora forneça um bom e natural suporte ósseo, o osso alogênico comporta certos riscos, tais como transmissão de doenças, tal como a AIDS, reações imunológicas, toxicidade associada à esterilização e suprimentos limitados[5]. Este último, acaba por gerar a necessidade de longos períodos de espera para obtenção dos implantes. Além de todas essas limitações, dogmas éticos e religiosos também limitam o uso de aloenxertos[6].

Visto as dificuldades intrínsecas das estratégias citadas anteriormente, os biomateriais se destacam como alternativa versátil e promissora. Biomaterial é definido como qualquer substância ou combinação de substâncias que não sejam drogas ou fármacos, de origem natural ou sintética, que podem ser usadas por qualquer que seja o período de tempo, como parte ou como todo de sistemas que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do

corpo[9,10,11]. De fato, os biomateriais são normalmente associados aos materiais colocados em contato com o tecido humano com o objetivo de recompor alguma parte danificada[2]. As vantagens significativas desses implantes em relação aos transplantes são a disponibilidade e a reprodutibilidade. Boas práticas de fabricação, padrões internacionais e testes de garantia de qualidade minimizam a probabilidade de falha mecânica de implantes[6].

Há cerca de 60 anos, uma revolução na assistência médica começou com a substituição bem sucedida de tecidos danificados utilizando-se biomateriais. Durante as décadas de 1960 e 1970, uma primeira geração de biomateriais foi desenvolvida para uso dentro do corpo humano. O objetivo de todos os biomateriais era alcançar uma combinação adequada de propriedades físicas para combinar as do tecido substituído com uma resposta tóxica mínima no hospedeiro[12]. Em 1980, cerca de 2 a 3 milhões de peças artificiais ou próteses foram implantadas em indivíduos nos Estados Unidos a cada ano. Na época, havia um pouco mais de 50 dispositivos feitos de 40 materiais diferentes disponíveis para serem implantados[1]. A substituição bem sucedida de tecidos originou uma revolução na assistência médica; entretanto, ainda assim, a necessidade de um substituto ósseo apropriado é significativamente crescente.

1.1 Classificação dos Biomateriais

De acordo com os diferentes tipos de interação implante-tecido, os biomateriais podem ser classificados em tres categorias, que estão resumidas na Tabela 1[13]. A resposta do tecido a um implante biologicamente inativo, quase inerte, é a formação de uma cápsula fibrosa não aderente, impossibilitando a interação

direta destes materiais com o tecido ósseo. São utilizados predominantemente para reparar defeitos osseos de consideravel proporção por causa de sua excelente resistência à compressão[7]. Por outro lado, os biomateriais bioativos permitem uma resposta biológica específica na interface com o tecido vivo, possibilitando a formação de uma ligação química entre o tecido e o próprio material, também chamada por bioadesão, resultando em formação rápida de cristais de apatita carbonatada ao longo da superfície[7]. Neste caso, o tecido é capaz de interagir intimamente com o material, sem a intervenção de tecido fibroso.

Os biomateriais reabsorvíveis são projetados para se degradar gradualmente com o tempo e serem substituídos por tecidos hospedeiros naturais. Por exemplo, suturas reabsorvíveis compostas de poli(ácido láctico) e poli(ácido glicólico) são metabolizadas em dióxido de carbono e água. As cerâmicas de fosfato tricálcico se degradam em sais de cálcio e fosfato[13].

Tabela 1

Classificação de biomateriais[13].

Tipo de implante	Inserção de Tecido	Exemplos
Quase-bioinertes	Mecânica	Metais, Alumina, Zircônia, Polietileno (PE)
Bioativos	Ligação interfacial	Hidroxiapatita (HA), vitrocerâmicas
Bioreabsorvíveis	Substituição pelos tecidos	Fosfato tricálcico, ácido poliláctico (PLA)

1.2 Requisitos de um Biomaterial

A condição fundamental para que qualquer material possa ser utilizado como biomaterial é não causar processos inflamatórios e, tampouco propiciar qualquer

reação indesejável ao corpo. Esta propriedade elementar é conhecida como Biocompatibilidade[14]. Adicionalmente, um biomaterial deve resistir/suportar solicitações químicas, térmicas e mecânicas sem substancial deterioração (reação, fratura, abrasão) e, também, não deve alterar o meio biológico nem reagir com o sangue (desnaturação de proteínas), propriedade esta denominada de Biofuncionalidade. E por último apresentar durabilidade, que está relacionada à capacidade de degradação de um implante no meio biológico[2].

1.3 Biomateriais Poliméricos

Dentre os materiais utilizados como biomateriais, os polímeros apresentam grande potencial de utilização, pois são, geralmente, fáceis de produzir e manusear e apresentam propriedades mecânicas semelhantes às dos materiais biológicos. Em engenharia de tecidos, o uso de polímeros tem crescido muito nos últimos anos, onde suportes poliméricos, também chamados de arcabouçous, têm sido utilizados na regeneração tridimensional de tecidos e substituição de órgãos.

Na Figura 1 são apresentados vários dos mais importantes polímeros utilizados como biomateriais, bem como suas respectivas aplicações junto aos tecidos e partes do corpo[2].

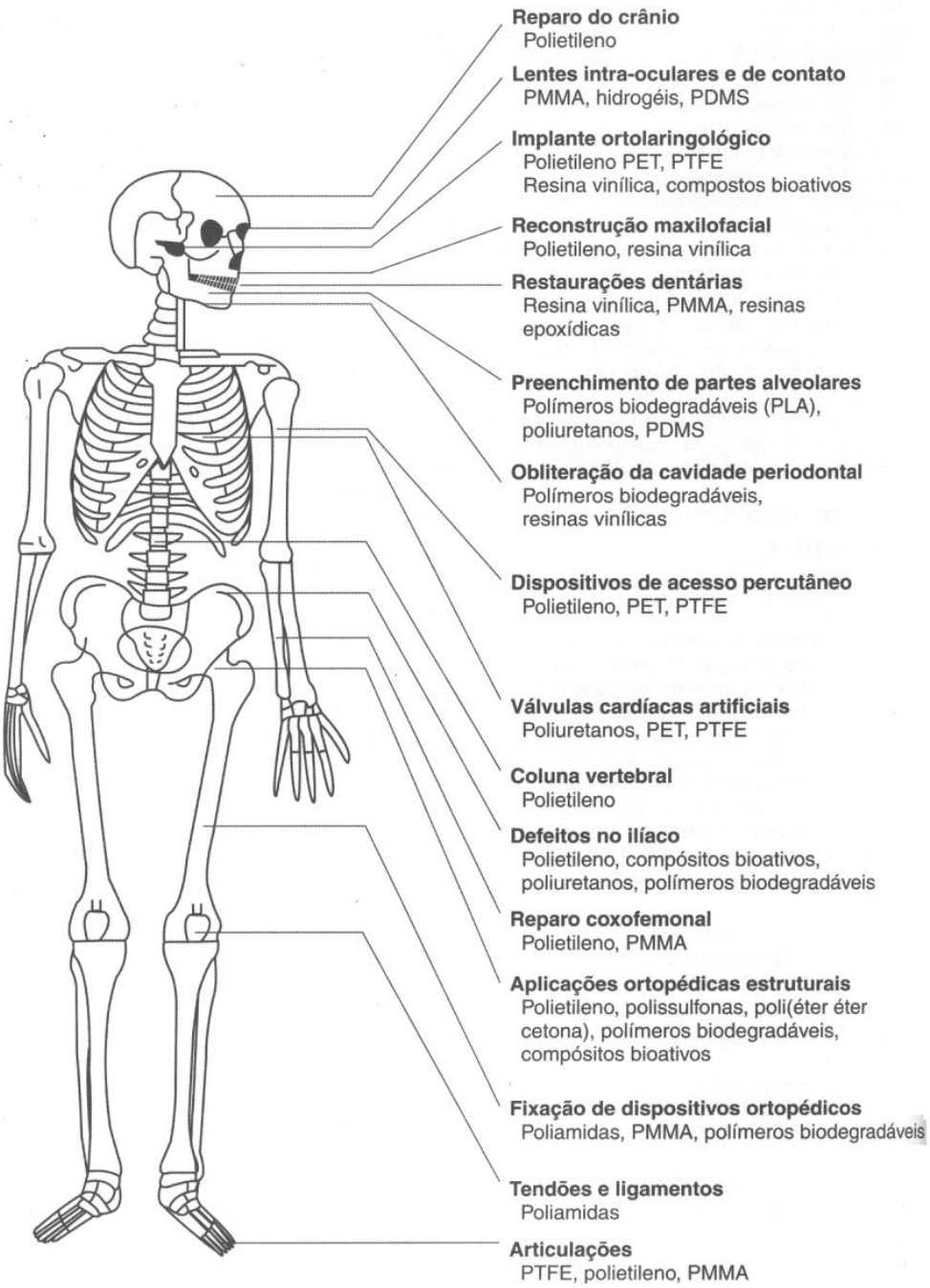


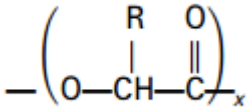
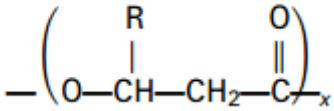
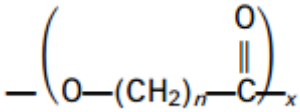
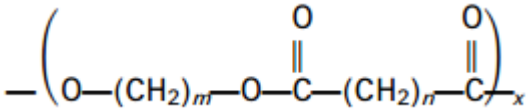
Figura 1 – Polímeros utilizados como biomateriais. Fonte: ORÉFICE, 2006[2].

O arcabouço polimérico deve fornecer um ambiente adequado para induzir a regeneração do tecido no local do defeito, atuando como um substrato transitório, imitando a matriz extracelular (ECM) para suportar temporariamente a adesão celular e posterior proliferação e diferenciação. Uma vez que o novo tecido tenha sido regenerado, o arcabouço deve se degradar completamente. O remanescente (detritos) pode causar obstáculos físicos contra a regeneração efetiva dos tecidos, portanto os biopolímeros usados como arcabouços em engenharia de tecidos devem ser biodegradáveis[15].

Vários polímeros biodegradáveis (naturais e sintéticos) estão sendo estudados para uso como arcabouços em engenharia de tecidos. Sínteses e propriedades de polímeros degradáveis para aplicações biomédicas estão disponíveis em literatura especializada[14,15,16]. Os polímeros degradáveis são de grande valor em aplicações de curto prazo e podem contornar alguns dos problemas relacionados à segurança a longo prazo de dispositivos implantados permanentemente em engenharia de tecidos, uma vez que os arcabouços não precisam ser removidos cirurgicamente, já que não são mais necessários. Os polímeros biodegradáveis são usados para reparar nervos, pele, sistema vascular e osso e uma grande proporção dos polímeros degradáveis sintéticos atualmente investigados como arcabouços em engenharia de tecidos são poliésteres, como mostrado na Tabela 2[15].

Tabela 2

Classificação de poliésteres alifáticos[15].

Estrutura química	Poliester	Exemplos
	Poli(α-hidroxiácidos)	Poli(ácido glicólico) Poli(L-ácido lático)
	Poli(β-hidroxialcanoatos)	Poli(β-hidroxibutirato)
	Poli(ω-hidroxibutirato)	Poli(caprolactona)
	Poli(alquileno dicarboxilato)	Poli(succinato de etileno) Poli(succinato de Butileno)

Poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA) e copolímeros de poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) estão entre os polímeros sintéticos mais utilizados na engenharia de tecidos[14,17,18].

1.3.1 Poli(ácido lático) (PLA)

Dentre os biomateriais poliméricos, o Poli(ácido lático) (PLA) destaca-se devido às suas propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidadel. O poli(ácido lático) possui moléculas quirais, devido a isso o PLA existe de quatro formas: poli (L-ácido lático) (PLLA), poli (D-ácido lático) (PDLA), poli(D, L-ácido lático) (PDLLA) - uma mistura racémica de PLLA e PDLA, e meso-poli(ácido lático). Para a síntese do PLA existem dois métodos: policondensação direta do ácido lático e polimerização por abertura do anél láctico.

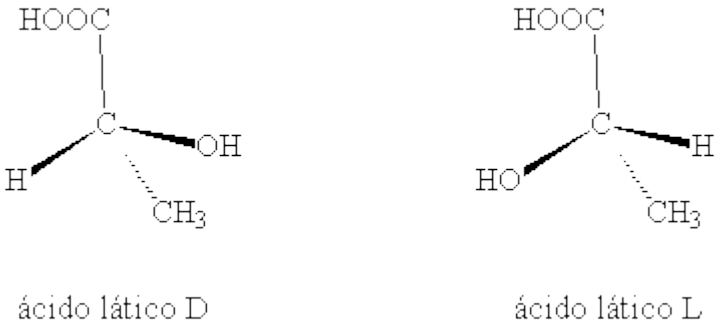


Figura 2 – Estrutura do ácido lático dextrógiro e levógiro.

O PLLA e o PDLA são enantioméricos, sendo ambos opticamente puros e cristalinos. O PLLA possui as mesmas propriedades que o PDLA, exceto para rotação óptica. Por outro lado, o PDLLA é racêmico e amorfo[19]. No que diz respeito ao uso na pesquisa biomédica, apenas PLLA e PDLLA mostraram ser promissores e tem sido estudados extensivamente[14]. O PLLA é produzido a partir de recursos renováveis e, além disso, não apresenta toxicidade para o meio ambiente e nem para o corpo humano. Além disso, tem alto desempenho mecânico se comparado com polietileno, polipropileno e poliestireno. O PLLA é hidrolisável na presença de água por formar oligômeros e monômeros solúveis em água de baixo peso molecular[20]. O PLLA possui uma temperatura de transição vítrea (Tg) entre 60-65 °C e uma temperatura de fusão de cerca de 175 °C. O grupo metileno adicional no PLLA faz com que o polímero seja muito mais hidrofóbico e estável contra a hidrólise do que em comparação a outros poliesteres, tal como o PLGA. Em geral, o PLGA degrada-se mais rápido do que o PLLA. A Tabela 3 apresenta algumas das propriedades comuns dos polímeros sintéticos na engenharia de tecidos mencionados acima em comparação com as do PLLA.

Tabela 3

Propriedades físicas de polímeros sintéticos, biocompatíveis e biodegradáveis utilizados como arcabouços[15].

	PDLLA	PLLA	PLGA
Temperatura de fusão (ºC)	nd	173-178	nd
Temperatura de transição vítrea (ºC)	55-60	60-65	45-55
Módulo de Young (GPa)	1,9-2,4	1,2-3,0	1,4-2,8
Deformação (%)	3-10	5-10	3-10
Ângulo de contato da água (º)	60-70	70-80	
Cristalinidade (%)	0	37	0
Período de degradação (meses)	12-16	>24	1-12

Em comparação com os enxertos autólogos e alogênicos, polímeros sintéticos, como poli(L-ácido láctico) (PLLA) ou copolímeros de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) não são limitados em termos de volume disponível e são amplamente aceitos para a reconstrução de um defeito ósseo. No entanto, eles não são altamente osteocondutores para facilitar a migração adequada de células osteogênicas nem são intrinsecamente osteoindutivos[5]. Estes são os dois principais obstáculos para suas aplicações como arcabouços em regeneração óssea. Este dilema pode ser superado por uma por processo de revestimento dos polímeros sintéticos com uma camada de fosfatos de cálcio[21].

1.4 Biomateriais cerâmicos - Fosfatos de cálcio

Durante as últimas décadas, as biocerâmicas de fosfatos de cálcio (CaP) foram usadas em muitas aplicações médicas, ortopédicas e dentárias. Os materiais de CaP, como a Hidroxiapatita (HA), não formam tecidos fibrosos, mas sim uma camada de ligação epitaxial extremamente fina com o osso existente, dessa forma, possui habilidade em se ligar ao tecido hospedeiro[22]. Portanto, os CaP são candidatos ideais para serem usados como substitutos ósseos. Os CaP estão disponíveis em diferentes composições de fase, tais como hidroxiapatita (HA) e fosfato tricálcico (TCP). Estas diferentes fases apresentam propriedades diferentes, isto é, solubilidade, densidade, cristalinidade, etc., o que implica diferentes reações *in vivo*[23,24].

Albee[25], em 1920, relatou a primeira aplicação bem sucedida de um reagente de fosfato de cálcio (descrito como "fosfato de cálcio triplo") para o reparo de defeito ósseo em humanos. Mais de 50 anos depois, o uso clínico de uma preparação de "fosfato tricálcico" em defeitos periodontais e o uso de hidroxiapatita densa (HA) como substituições imediatas da raiz do dente foram reportados[26]. No início dos anos 80, a HA sintética e o fosfato β-tricálcico (β-TCP) tornaram-se comercialmente disponíveis como materiais de substituição óssea para aplicações odontológicas e médicas[27]. Os fosfatos de cálcio são hoje utilizados numa variedade de diferentes aplicações para o tratamento do sistema ósseo, incluindo o emprego do material isolado, como recobrimento de próteses e na associação com materiais poliméricos.

Uma forma conveniente de classificar os fosfatos de cálcio é através da razão molar entre os átomos de cálcio e fósforo - Ca/P, a qual varia de 0,5 a 2,0, conforme mostra a Tabela 4. É importante conhecer a estreita relação entre a razão Ca/P, acidez e solubilidade. Assim, quanto menor for a razão Ca/P, maior a acidez e a

solubilidade da mistura. Para Ca/P <1, tanto a acidez quanto a solubilidade são extremamente elevadas, e ambos os parâmetros diminuem substancialmente para razões Ca/P próximas de 1,67, que é o valor da hidroxiapatita estequiométrica, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$[28].

Tabela 4

Relação de Ca/P dos diferentes tipos de fosfatos de cálcio[28].

Fosfato de Cálcio	**Fórmula Química**	**Ca/P**
Fosfato Tetracálcico (TeCP)	$Ca_4O(PO_4)_2$	2,0
Hidroxiapatita (HA)	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	1,67
Fosfato de Cálcio Amorfo (ACP)	$Ca_3(PO_4)_2 \cdot nH_2O$	1,5
Fosfato tricálcico (α, α', β, γ) (TCP)	$Ca_3(PO_4)_2$	1,5
Fosfato octacálcico (OCP)	$Ca_8H_2(PO_4)_6.5H_2O$	1,33
Monohidrogênio fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)	$CaHPO_4.2H_2O$	1,0
Monohidrogênio fosfato de cálcio (DCP)	$CaHPO_4$	1,0
Pirofosfato de cálcio (CPP)	$Ca_2P_2O_7$	1,0
Pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD)	$Ca_2P_2O_7.2H_2O$	1,0
Fosfato Heptacálcico (HCP)	$Ca_7(P_5O_{16})_2$	0,7
Dihidrogênio fosfato tetracálcico (TDHP)	$Ca_4H_2P_6O_{20}$	0,67
Fosfato Monocálcico Monohidratado (MCPM)	$Ca(H_2PO_4)_2.H_2O$	0,5
Metafosfato de cálcio (α, β, γ) (CMP)	$Ca(PO_3)_2$	0,5

1.4.1 Hidroxiapatita (HA)

Devido à sua similaridade com a parte mineral de ossos e dentes, a HA é amplamente utilizada como biomaterial para a substituição/reparação do tecido ósseo[29]. É bem aceito que a hidroxiapatita em tecido duro, como o esmalte ósseo e dentário, é um tipo de apatita carbonatada deficiente em cálcio[30]. Apatita é um nome geral para compostos com estrutura pertencente basicamente ao grupo espacial hexagonal $P6_3/m$ como mostrado na Figura 3 e com composição química geral $M_{10}(ZO_4)_6X_2$, onde M representa cátions de valência de 1 - 3, Z equivale a ânios de valência 3 - 7 e X equivale a ânions de valência 0 – 3[31].

M: Ca, Pb, Cd, Sr, Ni, Al, Y, La, Ce, Na, K
Z: P, As, V, Cr, Si, C, Al, S, Re
X: OH, F, Cl, Br, I, O, N, CO_3, H_2O, vacâncias

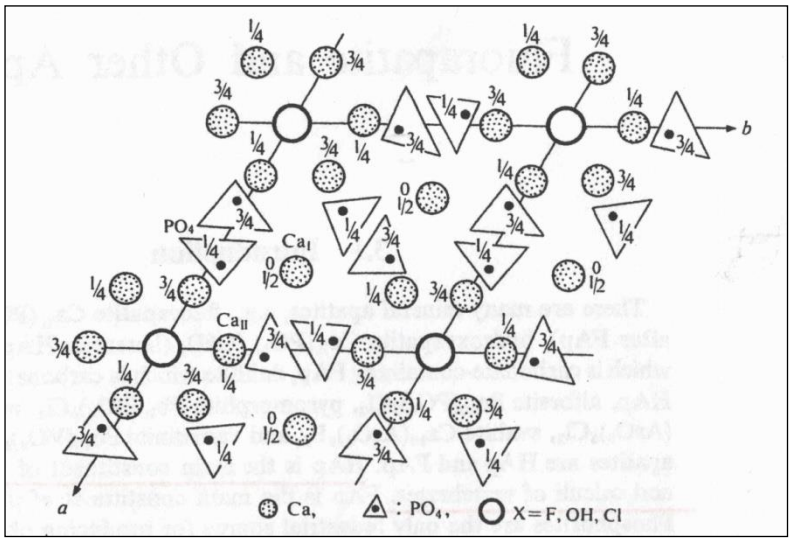


Figura 3 –Estrutura cristalina de apatita**.** Fonte: KANAZAWA, 1989[31].

HA com uma fórmula química de $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, tem uma composição teórica de 39,68% em massa de Ca, 18,45% em massa de P; Ca/P em massa de

2,151 e razão molar Ca/P de 1,667. Possui a maior estabilidade em meios aquosos se comparada a outras cerâmicas de fosfato de cálcio dentro de uma faixa de pH de 4,2-8,0[29].

A estrutura cristalina da HA lhe confere umas de suas mais importantes propriedades, a facilidade de substituições catiônicas e aniônicas, sendo referida como capaz de incorporar metade dos elementos da tabela periódica em sua estrutura. Íons Ca^{2+} podem ser substituídos por um grande número de cátions metálicos mono e divalentes, tais como K^{+}, Na^{+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2}+, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+}, Pb^{2+}, Cd^{2+}, Fe^{2+}, e íons trivalentes de elementos terra-rara. A diferença de valência causada por qualquer substituição requer uma redução na carga aniônica para manter o balanço de carga. Íons PO_4^{3-} podem ser substituídos por íons AsO_4^{3-}, SO_4^{2-}, CO_3^{2-}, SiO_4^{4-}, VO_4^{3-} e os íons OH^{-} por íons CO_3^{2-}, F^{-}, Cl^{-}[29,31]. Todas as substituições catiônicas e aniônicas podem alterar a cristalinidade, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a textura superficial, a estabilidade e a solubilidade da HA, que por sua vez alteram a degradação e o comportamento *in vivo*.

Apesar da HA possuir boas propriedades como biomaterial, como biocompatibilidade, bioatividade, osteocondutividade e fazer ligação direta ao osso, ela não é adequada para o preenchimento de grandes defeitos ósseos devido à sua baixa taxa de degradação e também à sua fragilidade[32].

1.4.2 Fosfato Tricálcico (TCP)

Entre os materiais que apresentam velocidade de reabsorção apreciável um dos mais estudados é o fosfato tricálcico, com razão Ca/P igual a 1,5. O TCP é uma biocerâmica biodegradável com a fórmula química, $Ca_3(PO_4)_2$. Pode

ocorrer em 4 formas alotrópicas (α, α', β, γ), sendo as mais comuns as formas α e β, onde as temperaturas de transição e seqüência de ocorrência são[31]:

$$\beta\text{-TCP} \xrightarrow{1120\text{-}1180^{o}C} \alpha\text{-TCP} \xrightarrow{1430\text{-}1470^{o}C} \alpha'\text{-TCP}$$

Os dados do sistema cristalino das formas alotrópicas do TCP são dados: β-TCP - sistema romboédrico, R3c, a=b=10,439, c=37,375Å (eixos hexagonais); α-TCP – sistema monoclínico, $P2_1/a$, a= 12,887, b= 27,280, c= 15,219Å; γ-TCP – sistema romboédrico, R3m, a= 5,2487, c= 18,674Å.

Este material é biodegradável e biocompatível, sendo parcialmente reabsorvido entre 6 e 15 semanas após o implante, dependendo da porosidade[33]. O TCP é reabsorvido 10-20 vezes mais rápido do que a HA, outra cerâmica de fosfato de cálcio[7]. A ausência de reações inflamatórias e a capacidade de ligação óssea também são consideradas propriedades importantes dos implantes de TCP como substituto ósseo[34].

A maioria das cerâmicas de fosfato de cálcio atualmente investigadas são compósitos sintéticos de HA, β-TCP ou ambos. Devido à grande diferença nas taxas de reabsorção e na porosidade entre β-TCP e HA, uma mistura dos dois é considerada clinicamente favorável[7]. As misturas de HA e β-TCP, conhecidas como fosfato de cálcio bifásico (BCP), foram investigadas como substitutos ósseos e quanto maior o teor de β-TCP no BCP, maior a taxa de dissolução[29].

1.4.3 Hidroxiapatita deficiente em cálcio (HA_D)

Enquanto que a HA estequiométrica tem sido amplamente estudada durante as últimas décadas, poucos trabalhos foram dedicados a compostos não

estequiométricos. Somente alguns autores relataram resultados na síntese de hidroxiapatita não estequiométrica, muitas vezes chamada de hidroxiapatita deficiente em cálcio (HA_D), $Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$[35]. A hidroxiapatita deficiente em cálcio pode ter uma razão molar Ca/P variando de 1,50 a 1,67, e algumas vezes até fora dessa margem[36]. A solubilidade da HA_D aumenta com uma diminuição da razão molar Ca/P, da cristalinidade e do tamanho do cristal. A HA_D decompõe-se quando submetida a aquecimento em uma mistura de β-TCP e HA (1,67> Ca/P> 1,50), ou em HA puro (Ca/P = 1,67)[31].

A maior solubilidade da HA_D em comparação a HA torna-se uma característica importante para a sua utilização como biomaterial, pois lhe confere maior velocidade de degradação no meio biológico. A velocidade de degradação de um material está fortemente relacionada à osteocondutividade e desempenha papel importante na fixação inicial de implantes com o tecido ósseo. Um material solúvel possibilita a troca de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} com o meio biológico, facilitando o crescimento ósseo.

1.4.4 Fosfato Octacálcico (OCP)

O fosfato octacálcio (OCP), de razão molar Ca/P=1,33 e fórmula $Ca_8H_2(PO_4)_6.5H_2O$ é conhecido como sendo precursor da hidroxiapatita[36]. Possui sistema cristalino triclinico[31]. Sob condição fisiológica, fosfato de cálcio amorfo (ACP) converte-se em uma fase cristalina semelhante a OCP que posteriormente é hidrolisado para formar hidroxiapatita[30]. Além disso, OCP também é biocompatível, biodegradável e osteocondutivo[36].

Dekker et al.[37] analisaram o comportamento *in vitro*, mediante cultura de células da medula óssea, e *in vivo*, mediante implantação em ratos, de amostras de

titânio recobertas com HA carbonatada e OCP. Os resultados mostraram que a proliferação e adesão celular foram maiores nas amostras recobertas por OCP. Além disso, o recobrimento de OCP ocasionou a formação de maior volume de tecido ósseo na superfície do Ti, sendo este osso mais organizado que o formado sobre o recobrimento de HA carbonatada. Estudo semelhante foi realizado por Imaizumi et al.[38], confirmando os resultados mencionados anteriormente. Os autores atribuíram o melhor comportamento do OCP à sua maior velocidade de reabsorção que é seguida pela formação de novo tecido ósseo. Esses resultados indicam que o OCP é um substituto ósseo mais adequado que a HA em aplicações onde se requer rápida formação óssea.

Suzuki et al.[30] implantaram cinco compostos de CaP sintéticos na área subperióstica da calvária de camundongos BALB/c. Os compostos sintéticos foram fosfato dicálcico (DCP), OCP, ACP, HA_D e HA. O resultado sugeriu que os precursores sintéticos, tal como o OCP, se converteram em apatita *in vivo* e a formação óssea nos precursores sintéticos se formou mais rapidamente do que na HA. A formação de osso foi aparentemente observada em torno do implante de OCP após 5 semanas. No caso de implantação de HA_D e HA, a formação óssea foi observada apenas após 11 e 15 semanas, respectivamente. Com isso, a descoberta mais interessante no estudo mencionado é que a formação óssea nos precursores sintéticos ocorreu mais cedo do que na própria HA.

1.5 Biomateriais Compósitos

Um material compósito consiste em dois ou mais componentes com distintas composições (metálicas, cerâmicas ou poliméricas) que são separadas por uma interface. O objetivo principal em se produzir compósitos é de combinar diferentes

materiais para produzir um único dispositivo com propriedades superiores às dos componentes unitários[2].

Os grandes defeitos ósseos devido a trauma ou doença são muito difíceis de reparar através do crescimento natural do tecido hospedeiro. Os biomateriais de escolha para o desenvolvimento de arcabouços são aqueles que exibem propriedades bioativas. As cerâmicas de fosfatos de cálcio são altamente atraentes em aplicações de restauração óssea como resultado de sua capacidade de formar ligações com o osso[6]. Entretanto, a principal desvantagem das cerâmicas bioativas é a sua baixa resistência à fratura (isto é, fragilidade). Por essa razão, tais cerâmicas são frequentemente utilizadas de forma combinada com polímeros, tanto os polímeros estáveis, como o poli(metacrilato de metila) (PMMA) e polietileno (PE) e, especialmente para aplicações de engenharia de tecidos, em combinação com os polímeros biodegradáveis, como os poliésteres alifáticos, por exemplo o PLLA[15,39,40,41]. A formação de compósitos de fosfatos de cálcio, tal como a HA, com polímeros naturais ou sintéticos combinaria as propriedades osteocondutoras (bioatividade) da fase inorgânica com a resistência mecânica dos polímeros.

Além disso, a adição de fases bioativas a polímeros biorreabsorvíveis também pode alterar o comportamento de degradação do polímero, tamponando o pH da solução próxima e, portanto, controlando a rápida degradação ácida do polímero, em particular no caso do PLLA. Os aditivos inorgânicos demonstram influenciar o mecanismo de degradação dos polímeros impedindo o efeito autocatalítico dos grupos ácidos resultantes da hidrólise das cadeias poliméricas[15].

1.5.1 Biocompósitos de PLLA com HA

Nas últimas decadas, biocompósitos contendo HA e polímeros biodegradáveis têm atraído muita atenção[42]. Especialmente, compósitos de PLLA/HA tem sido investigados por vários grupos de pesquisa para regeneração óssea[43,44,45,46]. Laurencin et al.[47,48] fabricaram arcabouços porosos tridimensionais feitos de PLLA e HA. Os biocompósitos de PLLA/HA exibiram propriedades mecânicas mais elevadas do que as dos suportes de PLLA puros. Além disso, uma maior taxa de crescimento celular uniforme foi obtida quando as células osteoblásticas foram semeadas e cultivadas *in vitro* no biocompósito em comparação com os arcabouços de PLLA puros. Rizzi et al.[49] mostraram, por exemplo, que partículas de HA proporcionaram locais de ancoragem de osteoblastos humano na superfície de filmes compostos de PLA/HA , auxiliando na proliferação celular. Sui et al.[50] mostraram que a viablidade celular de osteoblastos cultivados utilizando membrana híbrida de PLLA/HA foi maior do que a do PLLA puro. Chuenjitkuntaworn et. al.[51] demonstraram que malhas de PLLA/HAp 0,50% (m/v) apresentaram desempenho melhor para suportar a adesão e proliferação das células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 em comparação às malhas de PLLA puro. Zhang et al.[52] relataram que compósitos de PLLA/HA mostraram uma melhora significativa nas propriedades mecânicas sobre as do polímero puro. E mais recentemente, Xie et al.[53] também comprovaram o potencial bioativo que suportes compósitos feitos de PLLA e HA apresentam *in vitro* e *in vivo*.

1.5.2 Modificação da superfície da HA

Para a fabricação de um biocompósito, a interação entre o aditivo mineral e a matriz polimérica é um fator crítico devido à falta de adesão entre ambos os constituintes. O material bioativo deve estar homogeneamente disperso na matriz polimérica. Diversas pesquisas têm buscado sanar as dificuldades na obtenção de uma adequada união interfacial entre o componente bioativo e a matriz inerte, evitando a concentração de defeitos na interface que conduziria à falha do material. O aumento da ligação na interface é um desafio e pode ser conseguido usando surfactantes na superfície da partícula antes do processamento do compósito. O uso de partículas funcionalizadas na superfície pode aumentar a força de ligação interfacial e, portanto, as propriedades mecânicas do arcabouço compósito podem ser efetivamente aprimoradas[54].

Especialmente, as partículas de HA podem ter sua superfície modificada, a fim de melhorar a sua compatibilidade com a matriz polimérica. A superfície da hidroxiapatita contem sitios contendo grupos hidroxila, Ca-OH[55]. Vários trabalhos foram desenvolvidos para modificar a superfície da hidroxiapatita usando reagentes orgânicos tais como ácido aspartico, ácido glutâmico, ácido lático, polácidos, flavanóides, entre outros[56,57,58,59]. Qiu et al.[43] modificaram com sucesso a superfície da HA através do enxerto de ácido L-láctico e PLLA. As partículas modificadas dispersaram-se mais uniformemente na matriz de PLLA do que as partículas de HA puro, pois a superfície das partículas de HA modificadas melhorou a compatibilidade com a matriz polimérica. Como resultado, os compósitos contendo HA modificadas com ácido L-láctico apresentaram melhores propriedades mecânicas do que os compósitos contendo HA não modificada. De forma igual, Hong et al.[45] prepararam nanocompositos uniformes de PLLA/HA modificada com L-lactídeo, as quais

exibiram propriedades mecânicas melhoradas em comparação com os materiais correspondentes de PLLA/HA não modificada. Os autores atribuiram essas melhorias em primeiro lugar às moléculas de L-lactídeo enxertadas nas superfícies da HA, que desempenharam um papel de moléculas de amarração entre os aditivos inorgânicos e a matriz de PLLA e, em segundo lugar, as partículas HA modificadas que foram uniformemente distribuídas nos compósitos.

Diante do exposto, observa-se que a utilização de HA modificada como fase bioativa para o desenvolvimento de compósitos análogos ao osso possibilita a obtenção de bioatividade satisfatória sem o comprometimento das propriedades mecânicas do polímero.

2 ELETROFIAÇÃO

Nos últimos anos, a eletrofiação ganhou grande interesse como técnica de processamento de polímeros para aplicações na liberação de fármacos e na engenharia de tecidos. Este interesse pode ser atribuído à relativa facilidade de uso, adaptabilidade e a capacidade de fabricar fibras com diâmetros na escala de tamanho nanométrico[60].

Fibras convencionais de grande diâmetro envolvem a extração de polímeros fundidos através de uma fieira. A massa fundida de polímero estirada resultante esfria para formar um fio de fibra individual. Esta técnica é denominada fiação por fusão ou fiação do fundido. Alternativamente, a fibra pode ser resultante da remoção do solvente por secagem de uma solução que é ejetada pela fieira, denominada fiação via seca. Da mesma forma, a eletrofiação também envolve a formação de fios através de um fluido, seja na forma do polímero fundido ou solução polimérica[61]. No

entanto, ao contrário do método convencional, a eletrofiação faz uso de uma fonte de alta tensão para aplicar cargas ao fluido e, quando submetidos a um campo elétrico de alta intensidade, proporcionar uma força de estiramento na direção de um coletor aterrado. Quando é aplicada uma alta tensão suficiente, uma solução de jato de polímero é ejetada a partir de uma gota da solução polimérica. O jato de fibra viaja através da atmosfera permitindo que o solvente se evapore, levando assim à deposição de fibras de polímero sólido no coletor, Figura 4. As fibras produzidas usando este processo têm diâmetros na ordem de alguns micrômetros até dezenas de nanômetros[62]. Os parâmetros da solução, tais como, viscosidade, condutividade elétrica e tensão superficial influenciam diretamente nas morfologias e diâmetros das fibras[63]. Os parâmetros do processo também podem afetar a formação da fibra e sua estrutura. Esses parâmetros são: tensão aplicada, fluxo de injeção e distância de trabalho (distância da agulha até o coletor).

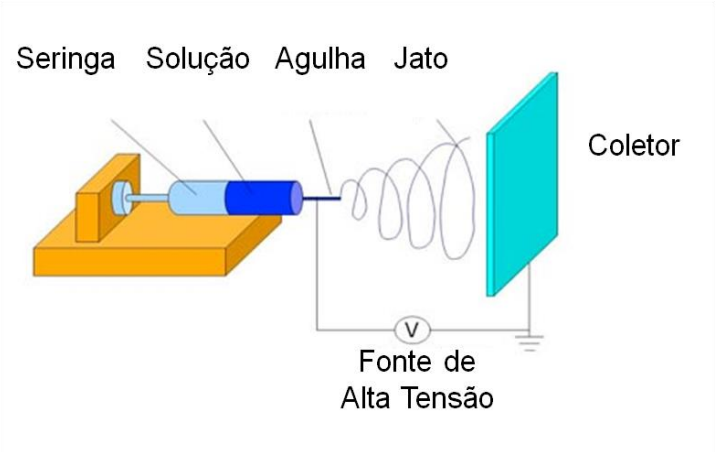


Figura 4 – Esquema experimental da eletrofiação.

2.1 Aplicações

Nas últimas decadas, a eletrofiação vem sido utilizada por pesquisadores para fabricar nanofibras de polímeros para encapsular fármacos[64,65,66]. Para esse

sistema, o componente químico do fármaco é misturado com a solução polimérica e, em seguida, as nanofibras são submetidas a eletrofiação.

A técnica de eletrofiação possui, ainda, um grande potencial na engenharia de tecidos, incluindo: vasos sanguíneos[67,68], sistema neural[69], tendão/ligamentos[70] e, finalmente, ossos e cartilagem[44,71].

2.1.1 Engenharia de Tecido Ósseo

As malhas geradas pelo processo de eletrofiação ganharam enorme interesse na engenharia de tecido ósseo, principalmente devido à semelhança estrutural com a matriz extracelular (ECM). O osso é um tecido conjuntivo complexo e altamente organizado, formado por fibras colágenas e substâncias inorgânicas mutuamente incorporadas. Dessa forma, os ossos de todos os vertebrados são materiais compósitos naturais, onde o sólido inorgânico (a hidroxiapatita carbonatada) corresponde a 65% da massa óssea total e o restante da massa é devido a matéria orgânica (sendo a maior parte o colágeno) e água[28]. Existem três tipos de células que compreendem o osso: osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Sendo assim, os materiais que imitam os ossos devem desempenhar papéis ativos na assistência a tais células direcionando-as para reconhecer e responder adequadamente, formando, assim, matriz extracelular (ECM) óssea a qual será análoga à matriz óssea nativa[72]. Por exemplo, Ni, et al.[73] fabricaram fibras eletrofiadas de PLA/polietilenoglicol(PEG) e observaram que esse arcabouço favoreceu a adesão e proliferação de células estaminais mesenquimais (MSC), fornecendo um ambiente extracelular poroso interconectado. As MSCs penetraram no arcabouço eletrofiado através dos poros intersticiais e se integraram bem às fibras circundantes, o que é

muito importante para uma aplicação favorável na engenharia de tecidos. Mais importante ainda, constataram que as malhas eletrofiadas híbridas de PLA/PEG favoreceram as MSCs para se diferenciar em células associadas ao osso. Shin et al.[74] produziram por eletrofiação um arcabouço de poli(caprolactona) (PCL) altamente poroso e degradável com uma topografia semelhante a matriz extracelular. MSCs derivados da medula óssea de ratos neonatais foram cultivados, expandidos e semeados nos suportes eletrofiados. Os arcabouços, então, foram implantados em ratos. Como resultado, matriz extracelular se formou e as células migraram para dentro do arcabouço. Os autores justificaram essas observações com base na topografia eletrofiada do arcabouço, a qual ajudou no desenvolvimento do osso. A arquitetura altamente porosa do arcabouço facilita a migração celular e o transporte de nutrientes e resíduos. Os resultados são encorajadores, pois indicam o potencial regenerativo de arcabouços eletrofiados semeados com osteoblastos para a formação de novos ossos.

Justificativa e Objetivo

3 OBJETIVO GERAL

Apesar do uso crescente de produtos de CaP em medicina, especialmente HA e β-TCP, ainda há poucos artigos na literatura médica que descrevem compostos de CaP diferentes daqueles usados tradicionalmente. O objetivo geral deste trabalho de pesquisa é o estudo comparativo de diversos tipos de fosfato de cálcio na produção de compósitos com poli(L-lactídeo) para uso em regeneração óssea. Adicionalmente, pretendemos demonstrar uma melhor dispersão da fase mineral na matriz polimérica e a produção de compósitos eletrofiados com alta carga de fase mineral.

3.1 Objetivos Específicos

3.1.1 Síntese de fosfatos de cálcio

Sendo assim, um dos objetivos específicos deste trabalho é sintetizar e estudar diversas partículas de CaP além de HA e β-TCP, tais como HA_D e OCP, os quais foram escolhidos pela importância biológica e suas diferentes velocidades de degradação.

3.1.2 Funcionalização dos fosfatos de cálcio

Como a interação entre os CaP e a matriz PLLA é um fator crítico devido a falta de adesão entre as duas fases, outro objetivo específico do presente trabalho é

melhorar sua dispersão através da funcionalização das superfícies dos fosfatos de cálcio pela reação com cloreto de lauroíla, a fim de obter-se biocompósitos com alta carga mineral sem o comprometimento das propriedades mecânicas do PLLA.

3.1.3 Fabricação e caracterização de biocompósitos eletrofiados

Utilizando-se a eletrofiação como técnica básica de processamento dos materiais propostos, o outro objetivo é a produção e caracterização dos suportes de PLLA/CaP na forma de malhas eletrofiadas, contendo alto teor de fase inorgânica.

3.1.4 Estudo da bioatividade dos compósitos

Além disso, pretendeu-se estudar a:

i. bioatividade frente a ação de *simulated blood fluid* (SBF);
ii. adesão e proliferação celular *in vitro* utilizando fibroblastos de camundongos (NIH-3T3) e células-tronco mesenquimais de dentes decíduos humanos (SHED);
iii. diferenciação celular *in vitro* de células pré-osteoblásticas derivadas de calvária de rato (MC3T3-E1) e SHED.

No intuito, ainda, de avaliar a eficácia desses materiais eletrofiados tem-se outro objetivo específico: a aplicação *in vivo* das fibras poliméricas, associadas ou não a células tronco mesenquimais, no dorso, subcutâneamente, em camundongos BALB/c nude.

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS

O hidróxido de cálcio, acetato de cálcio, hidrogenofosfato dissódico e o fosfato monossódico utilizados na síntese dos fosfatos de cálcio foram obtidos da Merck e utilizados sem prévia purificação. As nanopartículas de hidroxiapatita (HA) (tamanho < 200 nm) e as partículas de β-trifosfato de cálcio (β-TCP) foram obtidas da Sigma-Aldrich. Ácido fosfórico, dimetilformamida e clorofórmio foram adquiridos da Synth. O clorofórmio usado no preparo das soluções poliméricas foi purificado da seguinte forma: seco com $CaCl_2$ (Synth) durante 24 horas, filtrado, destilado, e refluxado com P_2O_5 (Vetec) por uma hora, destilado novamente e estocado em frasco com peneira molecular de 3 Å. O cloreto de lauroíla e o-xileno utilizados na funcionalização das partículas de CaP foram obtidos da Sigma-Aldrich. Cloreto de lauroíla foi purificado por destilação a pressão reduzida (p= 1,5 mmHg, PE = 93ºC). O-Xileno foi seco utilizando-se sódio metálico e seguido por destilação simples. O poli(L–Lactídeo) (PLLA) (M_W =157.000) foi adquirido da Purac. Os materiais usados na cultura das células como o *Dubelco's Modified Eagle Medium* (DMEM), Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12), Minimum Essential Medium Eagle, α modification (α-MEM), soro fetal bovino (SFB), tripsina, anfotericina B, penicilina e estreptomicina foram obtidos da marca GIBCO. Para o ensaio da fosfatase alcalina (ALP) foi usado o fosfato de p-nitrofenila (Sigma-Aldrich, CAS number 333338-18-4). O indicador ácido alizarin sulfônico foi adquirido da Merck.

5 SÍNTESE DE FOSFATOS DE CÁLCIO

5.1 Síntese 1: Hidroxiapatita deficiente em cálcio (HA_D)

Partículas de hidroxiapatita deficiente em cálcio (HA_D) foram obtidas por via úmida, por precipitação à partir de uma suspensão de hidróxido de cálcio, $Ca(OH)_2$, e de solução de ácido fosfórico, H_3PO_4, ambas na concentração de 2,0 mol/L e sem prévia purificação. O experimento foi conduzido adaptando-se metodologia previamente descrita na literatura[75]. A suspensão de $Ca(OH)_2$ foi mantinda sob agitação constante a 80°C por 30 minutos seguida da adição de solução de H_3PO_4 com uma taxa de 5mL/min. O produto da reação foi lavado com água destilada e seco a 40°C por 24 horas.

5.2 Síntese 2: Fosfato octacálcico (OCP)

Fosfato octacálcico foi sintetizado gotejando-se 0,04 M de acetato de cálcio, $Ca(CH_3COO)_2$, em uma solução contendo ions fosfato (5 mmol Na_2HPO_4 e 5 mmol NaH_2PO_4). Os reagentes mencionados foram utilizados sem purificação prévia. OCP foi preparado mantendo-se a solução em 60ºC e pH 5,0, seguindo metódo previamente publicado[76]. O produto da reação foi mantido em contato com com a solução mãe por 15 minutos, lavado com água destilada e seco 40°C por 24 horas.

5.3 Caracterização das biocerâmicas obtidas

Caracterização dos pós sintetizados: (i) a morfologia dos produtos foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (SEM) utilizando um microscópio FESEM JEOL Modelo JSM-7401F após recobrimento com uma camada fina de

platina (5nm); (ii) o pó obtido foi misturado com brometo de potássio (KBr), e pressionado até a formação de finas pastilhas transparentes para análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) utilizando um espectrômetro Perkin Modelo Elmer Frontier; (iii) As amostras produzidas foram analizadas por difratometria de raios X (XRD) (radiação Cu*K*α, λ = 1.54183 Å, filtro Ni) com um difratômetro Rigaku, modelo Miniflex®. A identificação da fase de CaP foi determinada comparando-se os dados experimentais obtidos com os formulários padrões da base de dados mantida por JCPDS - Joint Committee for Powder Diffraction Studies (HA_D #46-905 e OCP #26-1056) e (iv) os conteúdos de Ca e P foram determinados utilizando-se um espectrômetro ótico de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) da marca Spectro, modelo Arcos.

5.4 Fosfato de Cálcio Bifásico HA_D/β-TCP (7:3)

Preparou-se uma mistura de HA_D/β-TCP com 70% em massa da primeira fase, misturando-se o pó do produto da síntese 1 com o β-fosfato tricálcico adquirido da Sigma-Aldrich. Assim, obteve-se uma mistura de HA_D/ β -TCP na proporção 7:3 (m/m).

6 FOSFATOS DE CÁLCIO FUNCIONALIZADOS COM LAURATO

Os fosfatos de cálcio (CaP) obtidos das sínteses 1 e 2 (tópicos 4.1 e 4.2), o pó resultante da mistura HA_D/β-TCP (7:3) (tópico 4.4) e a HA pura obtida da Sigma-Aldrich foram individulamente funcionalizados utilizando-se cloreto de lauroíla seguindo-se metodologia adaptada[77]. A modificação da superfície foi obtida pela dispersão de 0,5 g de CaP em 10 mL de o-xileno seco a 90ºC. 2 mL de cloreto de

lauroila previamente purificado foi adicionado lentamente na suspensão de CaP/o-xileno. A suspensão foi aquecida a 120ºC sob atmosfera de N_2 e agitação magnética por 18 horas. A mistura reacional foi resfriada até a temperatura ambiente e as partículas funcionalizadas foram separadas por centrifugação a 11.000 rpm e lavadas com clorofórmio por 3 vezes para remover completamente o laurato que não foi enxertado na superfície das partículas de CaP. Finalmente, o sedimento foi seco em uma estufa à vácuo a 60ºC por 24 horas para remover o clorofórmio residual.

A caracterização das partículas funcionalizadas foi feita por: (i) espectroscopia FTIR e (ii) análise gravimétrica acoplada com espectrometria de massas (TGA/MS) utilizando equipamento Netzsch STA 409 PC (TG/DSC).

6.1 Ensaio de Sedimentação

As partículas de CaP não funcionalizadas e CaP-laurato foram dispersas em clorofórmio. Para comprovar a estabilidade maior das suspensões com partículas funcionalizadas, todas foram submetidas à avaliação de espalhamento de luz. As medidas foram realizadas em um espectrofotômetro Shimadzu Modelo Multispec-1501. Através desse equipamento é possível determinar a ocorrência de fenômenos como sedimentação e até mesmo a homogeneidade da amostra. O ensaio foi realizado a temperatura ambiente por 30 minutos.

6.2 Ensaio Mecânico

A fim de melhor compreender a influência da modificação da superíficie das diferentes fases de CaP nas propriedades de uma matriz polimérica, tal como a resistência mecânica, foi realizado um ensaio de tensão-deformação. A preparação das soluções poliméricas foi feita como se segue: partículas de CaP (HA, HA_D, HA_D/β-TCP e OCP) e CaP-laurato (HA-laurato, HA_D-laurato, HA_D/β-TCP-laurato e

OCP-laurato) foram suspensas em uma solução de clorofórmio e, com o auxílio de um banho de ultrasom, os pós foram uniformemente dispersos. A suspensão homogênea foi adicionada em uma solução de PLLA/clorofórmio 5%(m/m) e agitada magneticamente por 30 minutos. Foram produzidos filmes de PLLA/CaP e PLLA/CaP-laurato pela evaporação do solvente (clorofórmio). Em todos os casos, a concentração da fase mineral na matriz polimérica foi de 40% (m/m). Filmes de PLLA puro também foram fabricados como controle.

Os ensaios mecânicos de resistência à tração foram realizados utilizando-se um equipamento DMA da TA Instruments Modelo Q800. Os testes foram realizados à temperatura de 30 ^{o}C. Utilizou-se corpos de prova com as seguintes dimensões: 3x0,5 cm com espessura média de 0,05 mm. Os testes foram realizados com uma taxa de força de 1,0 N/min. Três corpos de prova de cada amostra foram testados. O ensaio permitiu obter uma curva tensão-deformação para cada material e representa o comportamento do amostra sob tração. O coeficiente de proporcionalidade (E) entre a tensão e deformação é o módulo de elasticidade ou módulo de Young. Seu valor corresponde à inclinação da reta na região de deformação elástica linear e pode ser representado por[2]:

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon},$$

onde σ é a tensão e Ɛ é a deformação.

7 FABRICAÇÃO DE MALHAS ELETROFIADAS

A eletrofiação foi utilizada como técnica de processamento dos materiais propostos para a produção dos suportes[60,61,62].

7.1 Preparação da amostra

O polímero PLLA foi dissolvido em $CHCl_3$/DMF (9:1) para formar uma solução uniforme de 5% (m/m). A mistura resultante foi magneticamente agitada *overnight* à temperatura ambiente. Os CaP modificados com laurato foram suspensos em clorofórmio utilizando-se um sonicador de ponteira Vibra Cell Sonics™, depois adicionadas na suspensão PLLA/$CHCl_3$/DMF para obter um teor mineral de 40% em massa no compósito. Soluções de PLLA puro sem adição de partículas de CaP também foram preparadas.

7.2 Parâmetros da solução - viscosidade

Medidas de viscosidade das soluções preparadas foram realizadas a 20ºC utilizando-se um reômetro Anton-Paar Modelo Physica MCR 300. Este instrumento pode determinar a viscosidade de fluidos newtonianos e não-newtonianos. As viscosidades das soluções foram medidas com taxas de cisalhamento entre 0,1 e 100 s^{-1}.

7.3 Parâmetros da eletrofiação

As suspensões preparadas de PLLA e PLLA/CaP-laurato foram adicionadas a uma seringa equipada com uma agulha com um diâmetro interno de 0,4 mm. Os parâmetros de eletrofiação foram fixados como: (i) tensão aplicada de 25 kV; (ii) taxa de fluxo de solução de 3 mL/h e (iii) distância entre a agulha e a placa coletora foi de 17 cm. O procedimento foi realizado sob umidade controlada (≤50%) e temperatura (24ºC). Para remover o clorofórmio residual, as fibras foram secas sob vácuo à 40 ºC durante 24 h.

7.4 Caracterização das malhas eletrofiadas

7.4.1 Morfologia

SEM e a Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) foram empregadas para determinar a morfologia das fibras produzidas. Após serem recobertas por uma fina camada de platina (5nm), as malhas eletrofiadas foram observadas por MEV e o diâmtero médio das fibras foi determinado (100-300 fibras/amostra). TEM foi utilizada para investigar a distribuição das partículas inorgânicas nas fibras de PLLA, as quais foram coletadas em grades de cobre recobertas com carbono. As microscopias foram feitas em um microscópio da marca JEOL Modelo JEM 2100**.**

7.4.2 Porosidade

A porosidade das malhas eletrofiadas de PLLA e PLLA/CaP-laurato foi medida através de suas densidades aparente (d) e absoluta (D) de acordo com a equação[78,79]:

porosidade = (1 - d / D) x 100%.

A densidade aparente (d) foi calculada a partir da massa e dimensões da malha eletrofiada. As densidades absolutas (D) foram determinadas usando um kit de medição de densidade (Mettler Toledo density kit) com base no conhecimento das massas das amostras medidas em ar (A) e em etanol (B), segundo a equação:

$$D = \frac{A}{A - B}(\rho_0 - \rho_L) + \rho_L ,$$

onde ρ_0 = densidade do etanol (0,78506 g/cm^3 a 25ºC) e ρ_L = densidade do ar (0,0012 g/cm^3).

7.4.3 Medidas de ângulo de contato

As fibras eletrofiadas de PLLA e PLLA/CaP-laurato preparadas foram redissolvidas novamente em clorofórmio e as películas foram preparadas por centrifugação (*spin-coating*) em uma placa de silício, Si/SiO_2. O método de gota séssil foi empregado usando 10 µl de água deionizada sobre cada superfície de amostra para determinar a hidrofilicidade das superfícies. As imagens das gotas formadas foram tomadas usando um goniômetro de ângulo de contato (Dataphysics OCA 20). Todas as medidas foram realizadas em 20ºC. Geometricamente (Figura 5) o ângulo de contato pode ser calculado medindo o diâmetro da gota e a altura do ápice[80]:

$$\frac{\theta}{2} = \tan^{-1}\left(\frac{h}{d}\right)$$

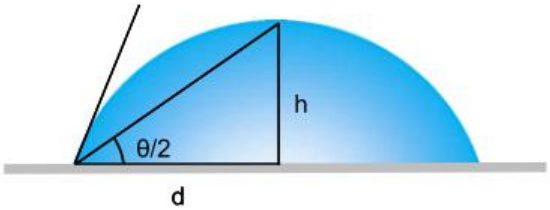


Figura 5 – Demonstração do método θ/2 . Fonte: Y. YUAN e T.R. LEE, 2013[80].

Durante os primeiros anos de medição do ângulo de contato, o método θ/2 foi amplamente utilizado para analisar o perfil de uma gota séssil. Entretanto, este método só pode ser assumido caso a gota de líquido seja extremamente pequena, do contrário, a forma esférica da gota pode ser afetada pela gravidade[80]. Por essa razão, o volume da gota utilizado foi de 10µL, dessa forma, evitando o achatamento da gota pela gravidade. Sabe-se que para gotas de água com volume de 10 µL, a

forma esférica permanece dentro de um intervalo de ângulo de contato entre 10º a 140º[81].

8 ENSAIO DE DEGRADAÇÃO

As malhas eletrofiadas de PLLA e PLLA/CaP-laurato foram cortadas em peças circulares (15 mm de diâmetro), pesadas e incubadas a 37 ºC em uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) (pH 7,2) por diferentes períodos de tempo (7, 14, 21, 28, 42, 56 e 84 dias). Durante todo o tempo de ensaio, a solução tampão PBS utilizada não foi substituída (chamada de ensaio de degradação *in vitro* estático). Estudos mostram que amostras submetidas a testes de degradação *in vitro* em modo estático estão em boa aproximação com os dados obtidos em estudos *in vivo*[82]. No final de cada período, as amostras úmidas foram pesadas afim de se medir o índice de intumescimento (inchaço), e após serem secas foram pesadas novamente afim de se medir a perda de massa resultante da degradação. O grau de absorção de água e a perda de massa para todas as amostras foram calculados pelas seguintes equações, respectivamente[83]:

$$\mathrm{WU} = \frac{(\mathrm{m_w} - \mathrm{m_d})}{\mathrm{m_i}} \mathrm{x}\ 100\%\,,$$

$$\mathrm{WL} = \frac{(\mathrm{m_d} - \mathrm{m_i})}{\mathrm{m_i}} \mathrm{x}\ 100\%\,,$$

onde m_i era a massa seca inicial, m_w era a massa úmida após a degradação, e m_d era a massa seca após a degradação.

A liberação de cálcio de cada compósito de PLLA/CaP-laurato foi medida por um espectrômetro Analytik Jena AG de absorção atômica com atomização por chama (F AAS), modelo AAS vario 6. Dessa forma, sendo possível avaliar a taxa de

dissolução das partículas de CaP em solução PBS. Finalmente, as alterações morfológicas foram investigadas usando micrografias eletrônicas por varredura após revestimento com platina. As imagens das malhas antes e após os 84 dias de degradação foram comparadas.

9 ENSAIO DE BIOATIVIDADE EM SBF

A bioatividade foi avaliada pela imersão das malhas eletrofiadas em uma solução com composição iônica e pH semelhantes ao plasma sanguíneo, denominada *Simulated Blood Fluid* (SBF). Quando amostras são imersas em solução SBF uma camada de hidroxiapatita é formada e o modo como isso ocorre poderia ser correlacionada com a atividade da amostra *in vivo*. Isto significa que a bioatividade de um material *in vivo* pode ser prevista a partir da formação de apatita em sua superfície em SBF[84,85]. A solução foi preparada adotando-se a metodologia da norma padrão internacional ISO/FDIS 23317 (142,0 mM Na^+, 5,0 mM K^+, 1,5 mM Mg^{2+}, 2,5 mM Ca^{2+}, 147,8 mM Cl^-, 4,2 mM HCO_3^-, 1,0 mM HPO_4^{2-}, 0,5 mM SO_4^{2-}, Tris and 1 M HCl, pH 7.4). As malhas eletrofiadas de PLLA e PLLA/CaP-laurato foram cortadas em peças circulares de 15 mm de diâmetro, pesadas, incubadas em 25 mL de solução SBF e mantidas a 37 °C durante 28 dias. A solução não foi reabastecida por todo este período. As amostras foram lavadas cuidadosamente com água destilada para remover os sais inorgânicos solúveis, secas durante 48 horas num forno a 40 °C e pesadas novamente. A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) foi utilizada para examinar a superfície das malhas após o período de incubação.

10 ENSAIO DE CULTURA CELULAR

As malhas eletrofiadas de PLLA e PLLA/CaP-laurato foram cortadas em peças circulares de 15 mm de diâmetro e colocadas em uma placa de cultura de poliestireno (PS) de 24 poços. As malhas foram então esterilizadas sob luz ultravioleta (UV) por 30 minutos. Para evitar a flutuação das malhas, colocou-se um anel de aço inoxidável esterilizado (12 mm de diâmetro) em cada amostra. Depois disso, as malhas foram submetidas a diferentes tipos de cultura celular para fins comparativos.

10.1 Teste de Citotoxicidade

O teste para medir a viabilidade celular e, consequentemente, a citotoxicidade dos biomateriais eletrofiados de PLLA e PLLA/CaP-laurato foi realizado seguindo a norma padrão internacional ISO 10993-5. Malhas eletrofiadas de PLLA com até 40% em massa das diferentes fases de CaP (HA, HA_D, HA_D/*β-TCP(7:3)* e OCP) foram incubadas por 21 dias em DMEM suplementado com 10% de SFB. Não houve troca do meio durante o período de incubação. Células de fibroblastos de camundongos NIH-3T3 foram plaqueadas diretamente sobre placas de PS de 24 poços ($5x10^3$ células/poço) e depois incubadas (37 ºC / 5% CO_2) por 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi removido de cada poço e em seu lugar foi adicionado o extrato das soluções resultantes da incubação das malhas. Passadas mais 24 horas, os extratos das malhas foram retirados e a viabilidade celular foi medida usando o método de brometo de metiltiazoltetrazólio (MTT). Depois de 3 horas na estufa (37 ºC / 5% CO_2), a solução foi removida, 1mL de isopropanol foi adicionado em cada poço para dissolver os cristais de formazan formados e a placa foi agitada durante

20 min. Alíquotas dessas soluções foram recolhidas e tiveram suas absorbâncias medidas em 570 nm utilizando um equipamento da marca Tecan modelo Infinite® 200 PRO. Os dados relatados são médias calculadas a partir de três amostras de cada biomaterial.

10.2 Cultura de Células

10.2.1 Células de fibroblastos de camundongos NIH-3T3

As malhas esterilizadas foram pré-incubadas em DMEM durante 24 horas antes da cultura das células. Fibroblastos foram cultivados até a passagem 5 e semeados nos suportes de PLLA e PLLA/CaP-L para ensaios de adesão e proliferação celular a uma concentração de células de $2x10^4$ e $1x10^4$ células/amostra, respectivamente. As células foram cultivadas em DMEM com 10 % de SFB, 0,25 µg/mL anfotericina B, 100 U/mL de penicilina e 100 U/mL estreptomicina. Para assegurar que havia um fornecimento adequado de nutrientes presentes, o meio foi trocado a cada dois dias. A cultura celular foi mantida em uma atmosfera umidificada 95% ar e 5 % CO_2 a 37ºC.

10.2.2 Células-tronco mesenquimais de dentes decíduos humanos (SHED)

As malhas esterilizadas foram pré-incubadas em DMEM/F-12 durante 24 horas antes da cultura das células. SHED foram semeadas nos suportes de PLLA e PLLA/CaP-laurato a uma concentração de células de $5x10^4$ células/amostra. As células foram cultivadas em DMEM/F-12 com 10 % de SFB, 0,25 µg/mL anfotericina B, 100 U/mL de penicilina e 100 U/mL estreptomicina. Para assegurar que havia um fornecimento adequado de nutrientes presentes, o meio foi trocado a cada dois dias.

A cultura celular foi mantida em uma atmosfera umidificada 95% ar e 5 % CO_2 a 37ºC.

10.2.3 Células pré-osteoblásticas derivadas de calvária de rato (MC3T3-E1)

As malhas esterilizadas foram pré-incubadas em α-MEM durante 24 horas antes da cultura das células. MC3T3-E1 foram semeadas nos suportes de PLLA e PLLA/CaP-laurato a uma concentração de células de $1x10^4$ células/amostra. As células foram cultivadas em α-MEM com 10 % de SFB, 0,25 µg/mL anfotericina B, 100 U/mL de penicilina e 100 U/mL estreptomicina. Para assegurar que havia um fornecimento adequado de nutrientes presentes, o meio foi trocado a cada dois dias. A cultura celular foi mantida em uma atmosfera umidificada 95% ar e 5 % CO_2 a 37ºC.

10.3 Teste de Adesão e Proliferação Celular

A capacidade de adesão celular sobre as fibras de PLLA e PLLA/CaP-laurato foi estudada com o uso de células NIH-3T3. Escolheu-se um modelo celular mais simples como o fibroblasto para posteriormente prosseguir os estudos com as SHED. Para o ensaio com NIH-3T3, avaliou-se a aderência celular após 4 horas de ensaio, enquanto que a proliferação celular foi observada em um período de 10 dias. Para o ensaio com SHED, a proliferação celular foi observada em um período de 15 dias. A quantificação celular foi feita através do uso do teste MTT que mede a atividade mitocondrial presente. As fibras com as células foram lavadas duas vezes com PBS e transferidas para uma nova placa com 24 poços; em cada poço foi adicionada uma solução de 80% DMEM não suplementado com SFB e 20 % de uma solução de MTT (1 mg/mL em PBS), então as amostras foram incubadas a 37ºC

durante 4 horas. Após a remoção cuidadosa do meio, os cristais roxos de formazan gerados pelas desidrogenases mitocondriais de células viáveis foram solubilizados por adição de 1 mL de isopropanol. Alíquotas dessas soluções foram recolhidas e tiveram suas absorbâncias medidas a 570 nm. O ensaio foi realizado em triplicata por biomaterial.

10.4 Diferenciação Osteoblástica *in vitro*

Para ensaios de diferenciação osteoblástica, células de MC3T3-E1 e SHED foram cultivadas, separadamente, nas malhas eletrofiadas de PLLA e PLLA/CaP-laurato durante 7 dias conforme metodologia descrita anteriormente. Passado este período, os meios de cultura foram suplementados com dexametasona (100 nM), ácido ascórbico (50 µg / mL) e β-glicerofosfato (10 mM). Após a adição dos meios osteogênicos, os biomateriais fibrosos foram recolhidos nos dias 10, 14 e 21 e ensaio para medir a atividade da fosfatase alcalina (ALP). As células foram tratadas com fosfato de p-nitrofenila, e o p-nitrofenol resultante foi quantificado colorimetricamente a 405 nm[86].

A coloração vermelha de alizarina (ARS) também foi utilizada para caracterizar a formação de mineralização de MC3T3-E1 e SHED nas superfícies dos biocompósitos durante 14 e 21 dias. As malhas eletrofiadas foram lavadas 3 vezes com PBS, fixadas com metanol por 30 minutos e incubadas com vermelho de alizarina (1%, pH 4,2) durante 5 min, após isso, as malhas foram submetidas a sucessivas lavagens com água para remoção do corante em excesso. Para quantificar esta mineralização, os nódulos ósseos foram dessorvidos usando 10% de cloreto de cetilpiridínio e a absorbância da solução foi medida em 570 nm. A quantidade de cálcio depositado na superfície das malhas eletrofiadas foi medida

usando um método previamente relatado [87]. A quantificação da mineralização foi feita subtraindo-se o valor da absorbância do branco (malhas eletrofiadas sem células que foram submetidas às mesmas condições de cultura e igualmente coradas por ARS).

11 ENSAIO *IN VIVO*

Para os experimentos *in vivo*, SHED foram semeadas em malhas eletrofiadas de PLLA e PLLA/CaP-L ($5x10^4$ células/amostra) e pré-diferenciadas em meio de diferenciação osteogênico por 14 dias antes da implantação. Sabe-se que células pré-diferenciadas devem garantir adequada formação de osso *in vivo,* especialmente se estiverem combinadas com proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), o que não é o caso do trabalho presente[88]. Para o teste de potencial celular osteogênico *in vivo*, utilizou-se 8 camundongos Balb/c Nude (fêmeas de 8 semanas de idade). Os camundongos Balb/c Nude foram escolhidos para evitar uma possível resposta imunológica as células humanas ou aos biomateriais que foram utilizados[89].

Em cada animal foram inseridos no dorso, subcutâneamente, 4 amostras de biomateriais, seguindo a metodologia descrita por Krebsbach et al.[90]. Malhas eletrofiadas de PLLA e PLLA/CaP-L sem SHED também foram implantadas no dorso dos camundongos como controle. As operações foram realizadas sob anestesia utilizando-se isofluorano inalado. Quatro incisões de aproximadamente 0,5 cm foram feitas no dorso dos animais em regiões diferentes (dois bolsos subcutâneos foram criados em cada lado da coluna), e, após as incisões, os biomateriais foram colocados nos bolsos subcutâneos (um disco de biomaterial foi inserido em cada

bolso). As incisões foram fechadas com pontos cirúrgicos para finalização do procedimento.

As amostras dos implantes subcutâneos foram coletadas após 60 dias, fixadas com paraformaldeído 4% por sete dias e descalcificadas com EDTA 4,17% por mais duas semanas. Após isso, as amostras foram preparadas adequadamente para análise por microscopia de luz, em cortes em parafina. Foi utilizada a coloração por hetoxilina e eosina (HE) para a visualização das estruturas.

12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada pela análise de variância unidirecional (one-way ANOVA) com teste post-hoc de Fisher LSD. A diferença estatística entre dois conjuntos de dados foi considerada quando $p < 0,05$.

Resultados e Discussões

13 CARACTERIZAÇÃO DAS FASES DE FOSFATOS DE CÁLCIO

13.1 Síntese 1: hidroxiapatita deficiente em cálcio (HA_D)

A biocerâmica obtida apresentou morfologia semelhante a placas finas irregulares (Figura 6). Por XRD (Figura 7), nota-se que o difratograma possuiu a mesma estrutura da hidroxiapatita estequiométrica (HA) e nenhuma outra fase cristalina foi detectada. Os padrões de difração de raios X desta apatita sintética deficiente em cálcio, de fórmula $Ca_9HPO_4(PO_4)_5OH$, são muito semelhantes aos da HA estequiométrica, mostrando que estes compostos não-estequiométricos retêm a estrutura fundamental da hidroxiapatita[91]. O espectro de FTIR (Figura 8) apresentou vibrações características dos grupos fosfato em 565 cm^{-1} (v_4), 602 cm^{-1} (v_4), 961 cm^{-1} (v_1) e 1040 cm^{-1} (v_3). As bandas em 1637 e 3448 cm^{-1} (v_s) são devido à presença de moléculas de água. Além dessas, foi encontrada em 629 cm^{-1} a banda característica do grupo OH^-. O espectro de FTIR é muito útil para mostrar a incorporação do grupo HPO_4^{2-} no lugar do PO_4^{3-}. A vibração em 873 cm^{-1} pode ser atribuída ao grupo HPO_4^{2-}, que é característico da HA_D. Entretanto, a presença de grupos CO_3^{2-} nessa amostra de apatita complica a atribuição da banda em 873 cm^{-1}, pois o íon CO_3^{2-} também possui uma fraca banda de absorção cerca de 870 cm^{-1} (v_2). Uma vez que a apatita deficiente em cálcio preparada neste estudo contêm uma percentagem de CO_3^{2-}, tal como indicado pelas presenças das bandas em 1419 e 1469 cm^{-1} (v_3) , a banda observada em 873 cm^{-1} pode ser atribuída a uma superposição das bandas vibracionais de ambos os íons.

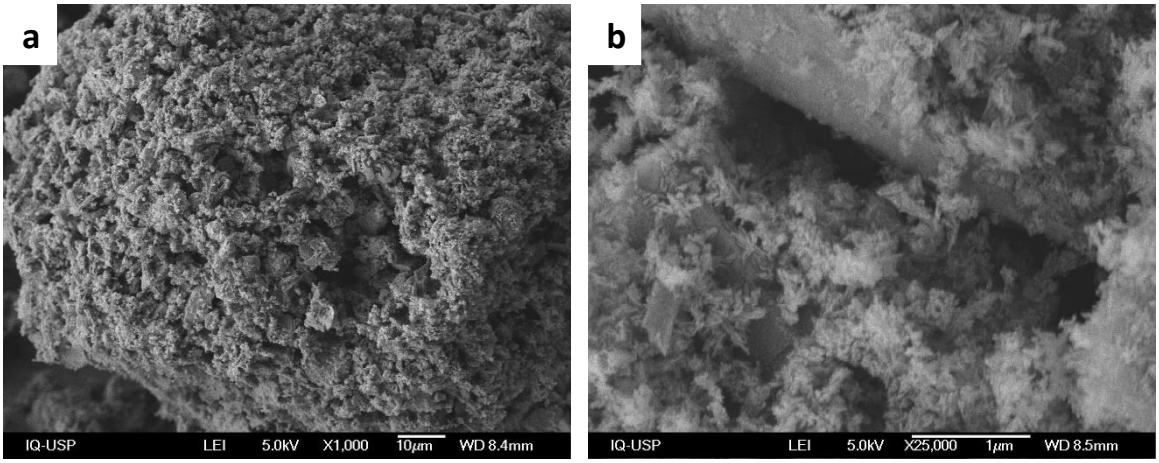


Figura 6 – SEM da cerâmica obtida da síntese 1 revela uma morfologia semelhante a placas finas irregulares: a) magnificação 1kx e b) magnificação 25kx.

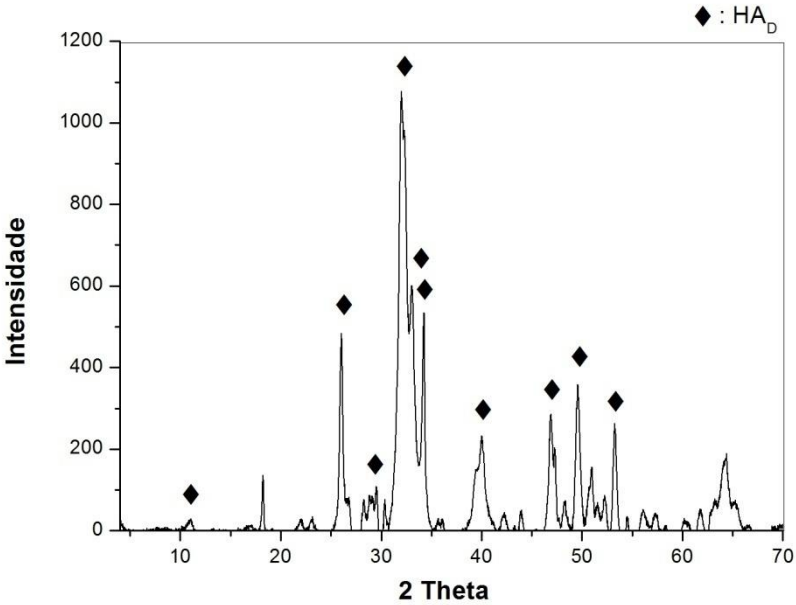


Figura 7 – XRD da apatita não estequiométrica (HA_D) obtida. O difratograma possuiu a mesma estrutura da hidroxiapatita estequiométrica (HA). Os dados experimentais obtidos foram comparados com os formulários padrões da base de dados mantida por JCPDS - Joint Committee for Powder Diffraction Studies (HA_D #46-905).

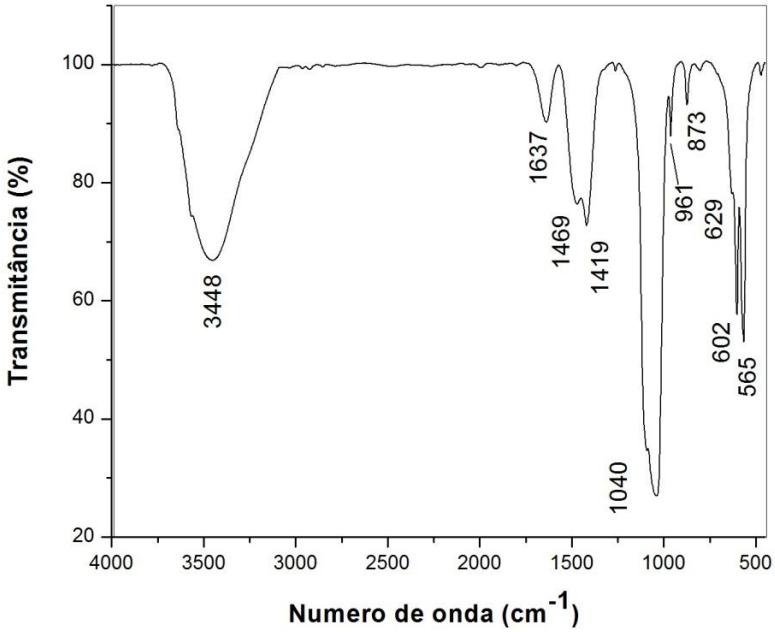


Figura 8 – Espectro de FTIR da apatita não estequiométrica (HA_D) obtida. A banda em 873 cm^{-1} pode ser atribuída ao grupo HPO_4^{2-}, que é característico da HA_D.

As caracterizações mencionadas anteriormente são indícios de que a biocerâmica obtida é a HA_D. Entretanto, como o XRD apresentado também pode ser confundido com o da HA estequiométrica e como a vibração em 873 cm^{-1} do espectro de FTIR, atribuída ao grupo HPO_4^{2-}, também pode ser atribuída ao grupo CO_3^{2-}, se faz necessário uma caracterização mais precisa, no caso, comprovar a existência do grupo HPO_4^{2-}, o qual é característico da HA_D. Vale ressaltar que a HA estequiométrica não possui grupos HPO_4^{2-}, dessa forma, a comprovação de tal grupo certifica que a biocerâmica obtida é a HA_D e não a HÁ (ANEXO 1). Por essa razão, a amostra foi submetida a um tratamento térmico. Da literatura, sabe-se que a hidroxiapatita deficiente em cálcio, após ser submetida a tratamento térmico, se decompõe formando HA e β-TCP[31]. Isso ocorre, pois a HA_D contém HPO_4^{2-} que, em temperaturas acima de 300ºC se transforma em $P_2O_7^{4-}$, como mostrado na Equação 1. Acima de 700ºC a Equação 2 ocorre resultando na decomposição da apatita formando β-TCP, Ca_3PO_4. Assim, a Equação 3 apresenta a reação total[35].

$2\ HPO_4^{2-} \rightarrow P_2O_7^{2} + H_2O$ (1)

$P_2O_7^{2-} + 2\ OH^- \rightarrow 2\ PO_4^{3-} + H_2O$ (2)

$Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x} \rightarrow (1-x)Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + (3x)Ca_3(PO_4)_2 + xH_2O$ (3)

Isso pode ser facilmente detectado por XRD. A Figura 9 apresenta os resultados do difratograma da biocerâmica após ser submetida a um tratamento térmico a 900ºC por 2 horas, com taxa de aquecimento e resfriamento de 5ºC/min. Os picos mais intensos de cada fase são em 2θ = 31,0 e 31,8° correspondentes a β-TCP e HA, respectivamente (JCPDS: β-TCP #70-2065 / HA #74-566). Com isso, a apatita obtida da síntese 1, ao ser submetida a um tratamento térmico, sofreu decomposição formando β-TCP. Isso certifica que a biocerâmica, antes de ser submetida ao tratamento térmico, possuía, de fato, grupos HPO_4^{2-}, característicos da HA_D, mostrando que as caracterizações anteriores estavam corretas, ou seja, a vibração em 873 cm^{-1} do espectro de FTIR com certeza pode ser atribuída ao grupo HPO_4^{2-}[75]. Sendo assim, conclui-se que a biocerâmica obtida é a HA_D.

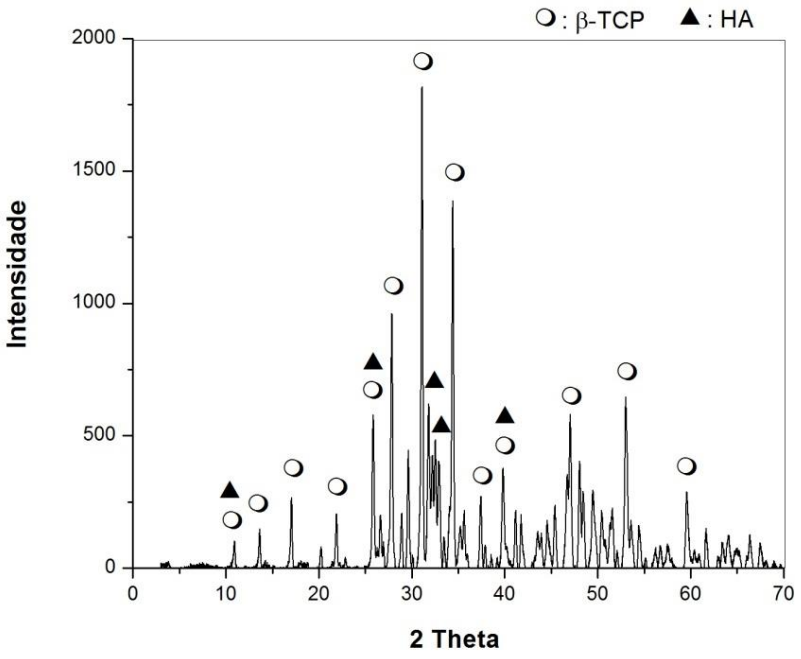


Figura 9 – XRD do pó de HA_D após ser submetido a tratamento térmico a 900ºC. A biocêramica se decompôs formando HA e β-TCP.

13.2 Síntese 2: fosfato octacálcico (OCP)

O pó obtido apresentou cristais com morfologia de pequenos flocos e cristais em formato de pratos na Figura 10, os quais foram previamente descritos como característicos da morfologia de uma mistura de fases de OCP e HA[92]. Isso é confirmado pelos resultados do XRD (Figura 11) que mostraram que uma mistura de fases foi precipitada como produto da síntese. A principal diferença no padrão de difração dessas duas fases é o pico característico do OCP em $2\theta = 4{,}7^{o}$[76].

O espectro de FTIR da Figura 12 mostra bandas caraterísticas dos grupos PO_4^{3-} em 560 cm^{-1} (v_4), 601 cm^{-1} (v_4), 962 cm^{-1} (v_1) e 1037 cm^{-1} (v_3) e bandas de absorção em 860 e 914 cm^{-1} correspondentes ao estiramento P-OH, estas últimas são associadas aos grupos de HPO_4^{2-} do OCP. Além do mais, o espectro contém banda do grupo OH^- da HA em 626 cm^{-1}. A banda em 3440 cm^{-1} (v_s) corresponde a moléculas de água. Dessa forma, conclui-se que o produto da síntese é uma mistura de fases de OCP com HA. Estudos anteriores revelaram que o procedimento de preparação de OCP leva a formação de uma mistura de fases ao invés de OCP puro[93].

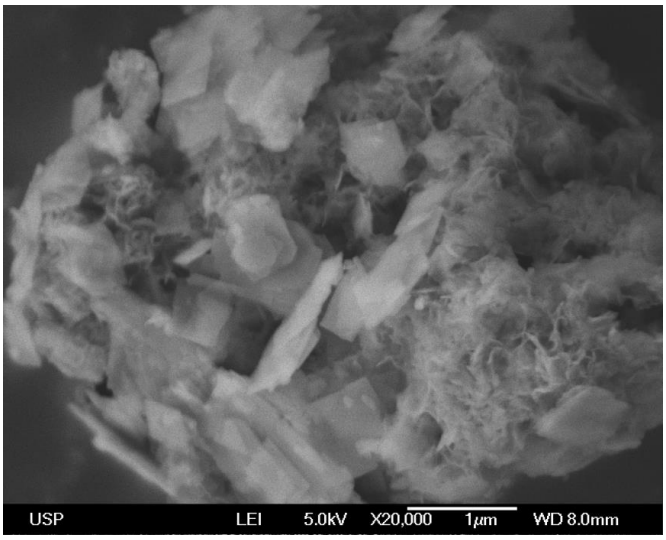


Figura 10 – SEM da cerâmica obtida da síntese 2. Pequenos flocos e cristais em formato de pratos são observados.

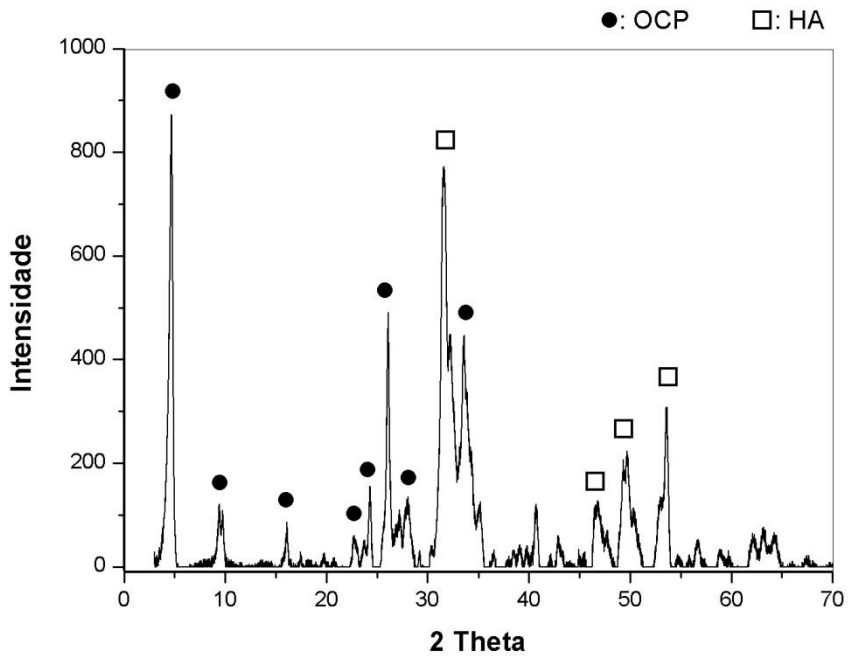


Figura 11 – XRD da biocerâmica obtida: mistura de fases de OCP e HA. Os dados experimentais obtidos foram comparados com os formulários padrões da base de dados mantida por JCPDS - Joint Committee for Powder Diffraction Studies (OCP #26-1056 e HA #74-566).

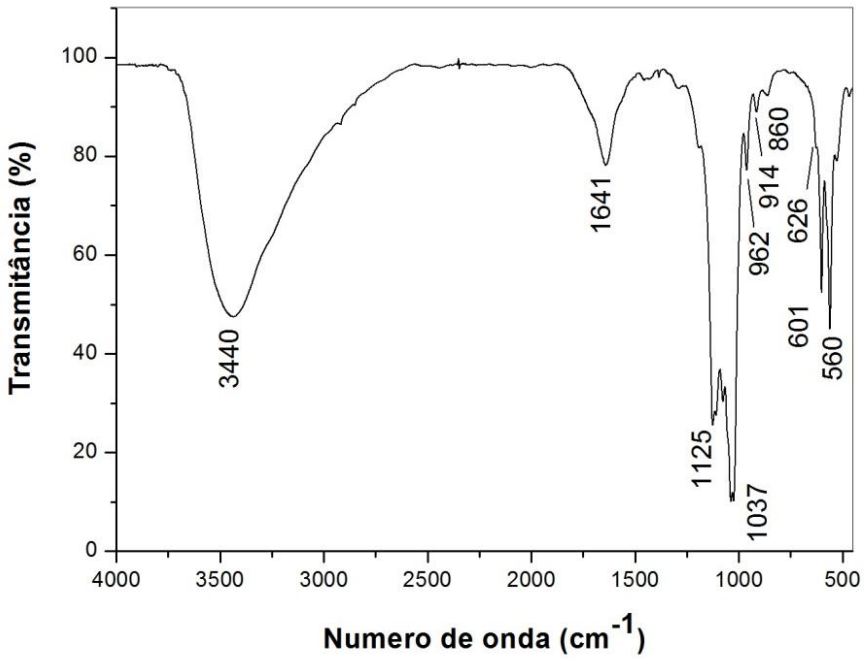


Figura 12 – FTIR da cerâmica contendo OCP/HA. As bandas em 870 e 914 cm^{-1} são associadas aos grupos de HPO_4^{2-} do OCP. A banda do grupo OH^- da HA aparece em 626 cm^{-1}.

Uma vez conhecido que o produto é uma mistura de fases OCP/HA, faz-se necessário quantificar essa proporção. O padrão de XRD com sua correspondente curva de refinamento ajustada pode ser vista na Figura 13. O conteúdo de OCP no produto foi de 90% m/m, isso significa que a biocerâmica obtida é OCP/HA na proporção 9:1. Em conformidade com esse resultado, os conteúdos de cálcio e fósforo foram determinados usando ICP-OES. A porcentagem em massa de cálcio e fósforo foram 30,31 e 18,14 %, respectivamente, e a razão Ca/P foi de 1,3; valor muito próximo da razão Ca/P do OCP que é de1,33. Assim, o produto preparado através da síntese é majoritariamente formado pela fase OCP, tal como indicou o refinamento por Rietveld.

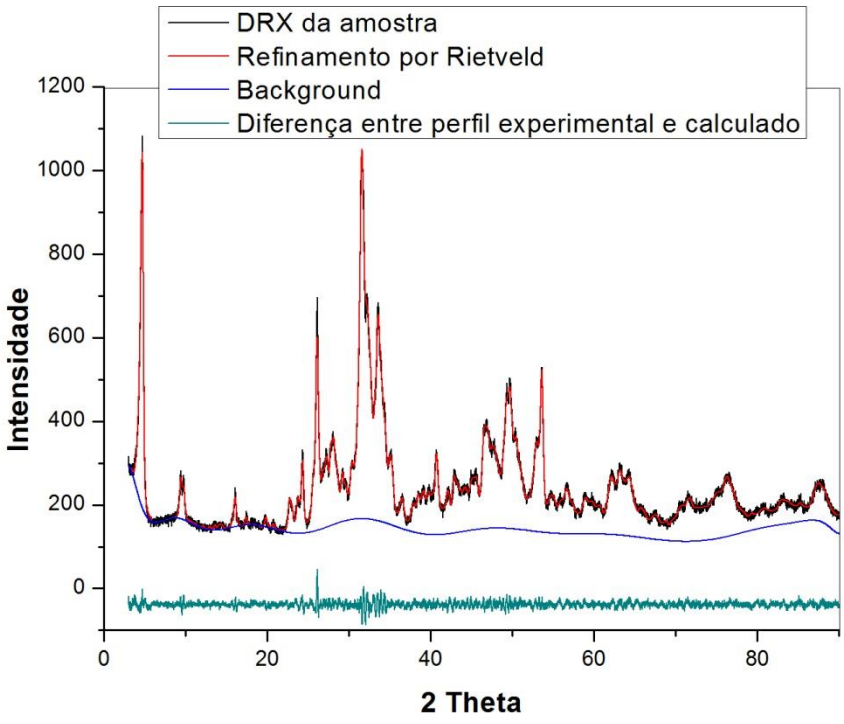


Figura 13 – XRD e refinamento por Rietveld da biocerâmica obtida. A análise revela que o conteudo de OCP no produto foi de 90% m/m.

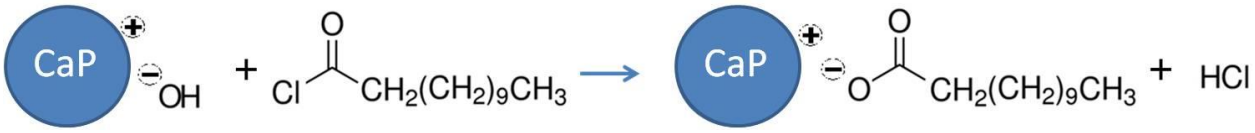
Foi desejável que a síntese tenha gerado uma mistura de fases OCP/HA , pois ao mesmo tempo que o OCP é a fase majoritária e, dessa forma, suas propriedades serão mais evidenciadas, os grupos hidroxila provenientes da HA são necessários para a funcionalização posterior das partículas.

14 FOSFATOS DE CÁLCIO FUNCIONALIZADOS COM LAURATO

14.1 Caracterização das partículas funcionalizadas

A superfície da hidroxiapatita contem sítios contendo grupos hidroxila, Ca-OH[55]. Vários trabalhos foram desenvolvidos para modificar a superfície da hidroxiapatita usando reagentes orgânicos tais como ácido aspártico, ácido glutâmico, ácido lático, polácidos, entre outros[43,56,58]. Essa modificação se faz necessária para melhorar a adesão interfacial entre partículas de HA com uma matriz polimérica na produção de um compósito.

As cerâmicas de fosfatos de cálcio produzidas neste trabalho possuem grupos hidroxila em sua superfície. Com o objetivo de melhorar a dispersão da fase mineral na matriz polimérica, cloreto de lauroila foi utilizado para funcionalizar a superfície dos fosfatos de cálcio (CaP). A reação dos grupos hidroxilas disponíveis na superfície dos CaP geram um íon carboxilato O=C-O$^-$ como estrutura final, conforme mostra a equação abaixo:



Após a funcionalização, algumas novas bandas apareceram como resultado da ligação dos fosfatos de cálcio com o laurato (Figura 14). O surgimento de bandas decorrentes da deformação axial assimétrica (v_{as} CH_2) e da deformação axial simétrica (v_s CH_2) em 2920 e 2851 cm^{-1}, respectivamente, revelam a incorporação de grupos metileno na superfície dos CaP. Além desses grupos, o íon carboxilato formado deu origem a duas bandas, a primeira entre 1550-1500 cm^{-1} e provém da deformação axial assimétrica; a outra em torno de 1400 cm^{-1} provém da deformação axil simétrica[94]. Considerou-se também a similaridade dessas novas bandas com aquelas da absorção do dodecanoato de cálcio (ANEXOS 2-3). Todas essas bandas mencionadas confirmam a incorporação do laurato na superfície das partículas de CaP. Outros autores, mesmo tendo utilizado outros métodos de modificação da superfície de HA, também relacionaram a formação do íon carboxilato e dos grupos alquila como evidência do êxito de sua funcionalização[95,96].

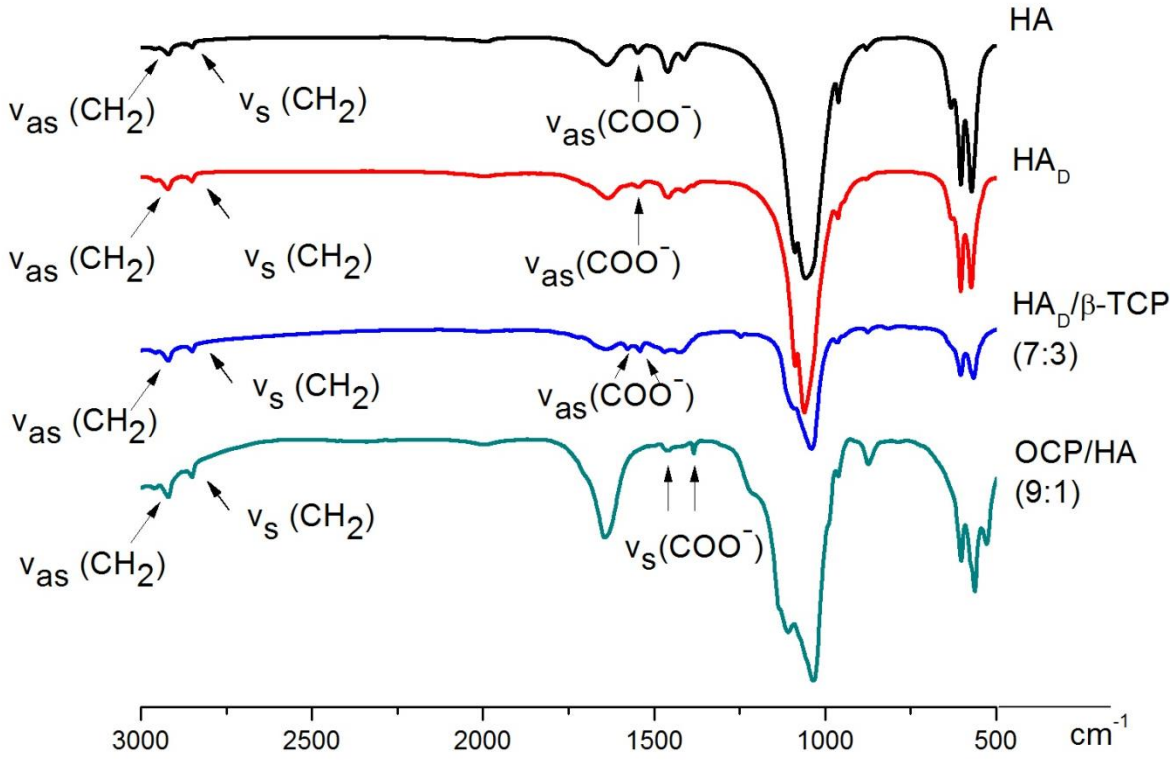


Figura 14 – FTIR de CaP funcionalizados com laurato. A formação do íon carboxílato resultou em bandas entre 1550-1500 cm^{-1} e outra em torno de 1400 cm^{-1}.

Partículas de CaP funcionalizadas apresentaram perda de massa atribuída à decomposição de laurato. Com o acoplamento da técnica de TGA com a espectrometria de massas (TG/MS), permitiu-se identificar os gases resultantes da combustão dos componentes presentes na amostra (Figura 15). Observa-se dois eventos de perda de massa, sendo o primeiro deles entre 100-200ºC, e o segundo em aproximadamente 450ºC. A primeira etapa de perda de massa é causada pela perda de água (curva azul e *m/z* = 18). A decomposição do grupo laurato é evidenciada na ultima etapa de perda de massa. Esta consideração foi feita com base na formação de CO_2 (curva vermelha e *m/z* = 44), resultante da decomposição de compostos orgânicos.

A quantidade de laurato na superfície das partículas de CaP foi determinada pelo método de TGA (Figura 16). A taxa de funcionalização (TF) de laurato foi calculado como se segue[43]:

TF(%) = PM (CaP não funcionalizado) - PM (CaP funcionalizado)

TF (HA-Laurato) = 99,1% - 92,3% = 6,8%

TF (HA_D-Laurato) = 92,9% - 86,3% = 6,6%

TF (HA_D/TCP-Laurato) = 96,2%, - 91,5% = 4,7%

TF (OCP/HA-Laurato) = 92,9% - 84,3% = 8,6%

Hong et al.[57] mesmo utilizando outro método de modificação da superfície da hidroxiapatita, encontrou valores muito proximos as taxas reportadas acima.

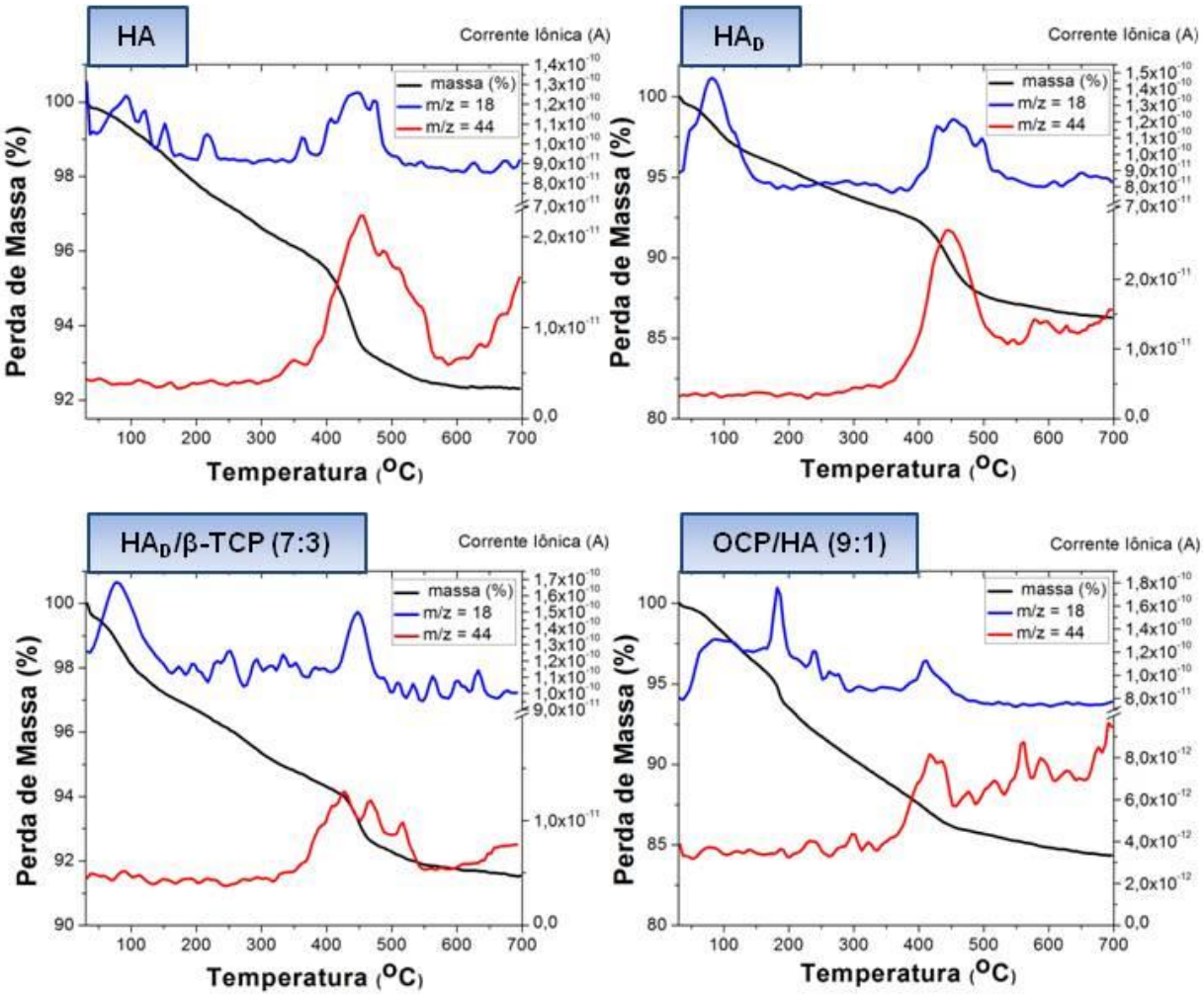


Figura 15 – Curvas de TG/MS: perda de massa atribuída à água e decomposição de laurato com sinal de corrente iônica (*m/z* = 18 e *m/z* = 44). Dois eventos de perda de massa são notados, sendo o primeiro deles entre 100-200ºC, e o segundo em aproximadamente 450ºC.

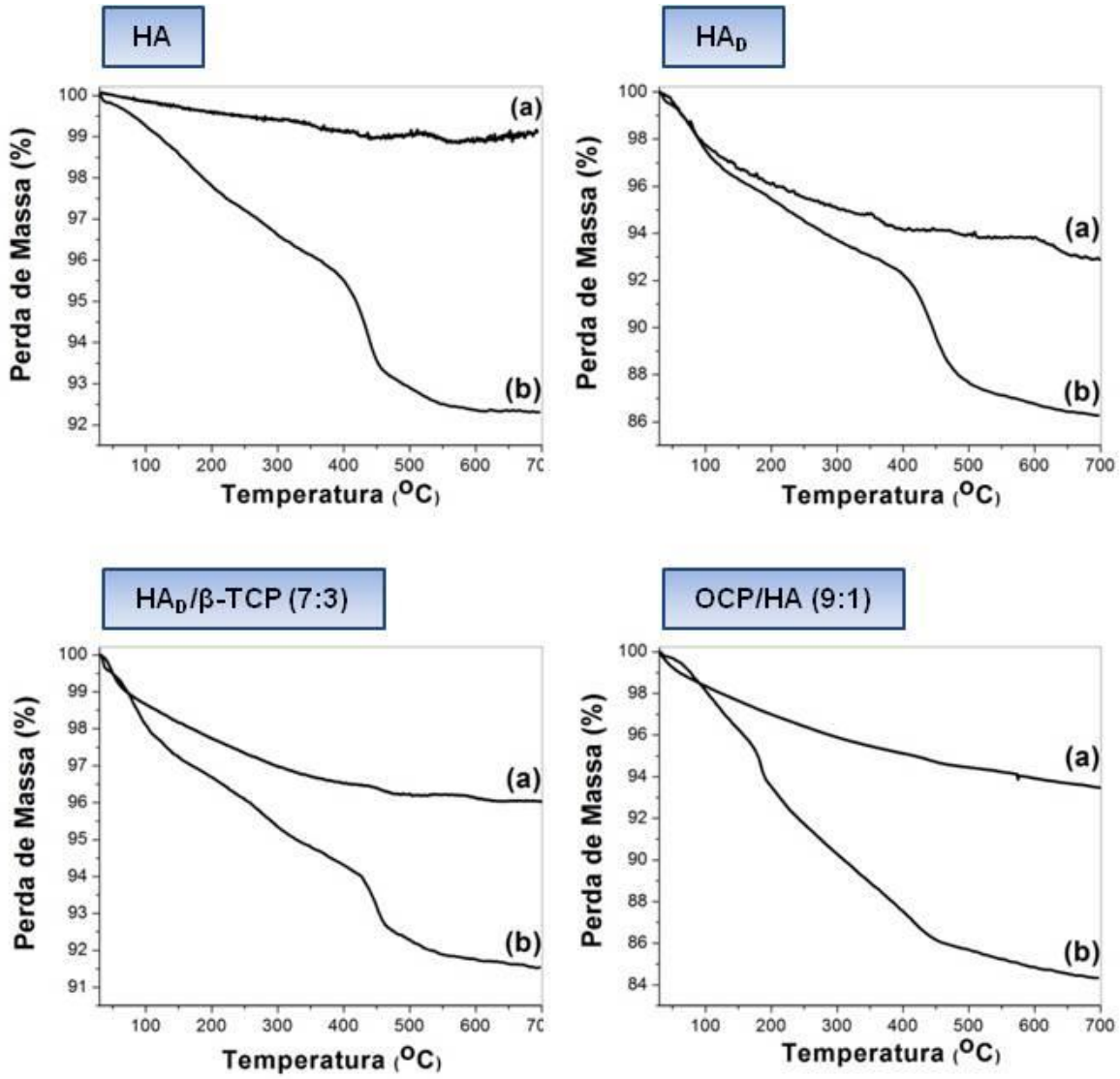


Figura 16 – Curvas de TGA de (a) CaP e (b) CaP funcionalizados com laurato. A diferença da perda de massa entre as duas curvas fornece a taxa de funcionalização (TF). TF: HA-Laurato = 6,8%; HA_D-Laurato = 6,6%; HA_D/TCP-Laurato = 4,7% e OCP/HA-Laurato = 8,6%.

A partir de agora, para simplificar, as partículas HA, HA_D, HA_D/TCP(7:3) e OCP/HA(9:1) funcionalizadas com laurato serão denominadas de HA-L, HA_D-L, HA_D:TCP-L e OCP:HA-L, respectivamente. Do mesmo modo, ao se referir às partículas de CaP funcionalizadas, utilizar-se-á o termo CaP-L.

14.2 Ensaio de Sedimentação

As partículas de CaP não funcionalizadas e CaP-L foram dispersas em clorofórmio, com o intuito de submetê-las a um ensaio de sedimentação (Figura 17). Verifica-se uma distribuição homogênea das partículas na suspensão de CaP funcionalizadas com laurato; suspensões de CaP sem funcionalização apresentaram rápida sedimentação.

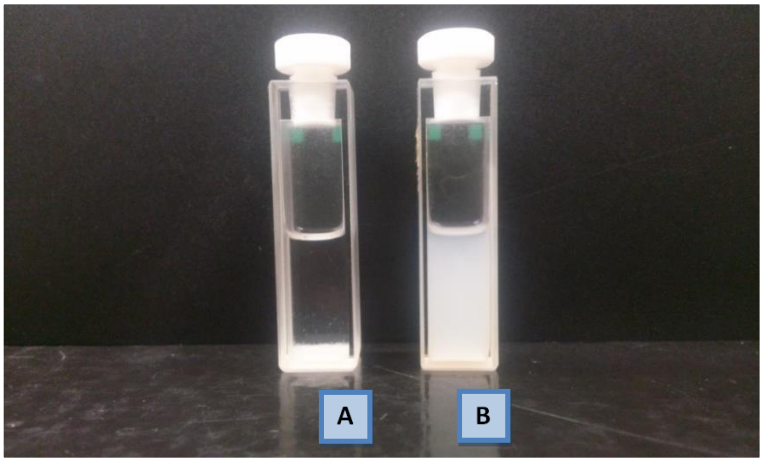


Figura 17 – Suspensões em clorofórmio: (a) HA não funcionalizada e (b) HA-L. Suspensões de CaP sem funcionalização apresentaram rápida sedimentação.

Para comprovar a estabilidade maior das suspensões com partículas funcionalizadas, estas foram submetidas à avaliação de espalhamento de luz. As medidas foram realizadas em um aparelho Multispec-1501 Shimadzu. Através desse equipamento é possível determinar a ocorrência de fenômenos como sedimentação e até mesmo a homogeneidade da amostra. O ensaio foi realizado a temperatura ambiente por 30 minutos. As suspensões preparadas com partículas não funcionalizadas foram completamente precipitadas em menos de 5 minutos (Figura 18). Por outro lado, partículas de CaP-L formaram uma suspensão homogênea com clorofórmio por vários minutos; de fato, por muitas horas após o final do ensaio. Com isso, comprova-se aquilo que foi constatado visualmente na Figura 17: que

partículas funcionalizadas com laurato interagem melhor com solvente orgânico do que àquelas sem funcionalização, mostrando assim a capacidade de dispersar estas partículas altamente hidrofílicas num ambiente mais hidrofóbico. Isso justifica a escolha de se funcionalizar os CaP: a inclusão da cadeia saturada contendo 11 carbonos confere um caráter apolar na superfície dessas partículas, o que possibilitará uma inclusão considerável de fase mineral no compósito polimérico apolar.

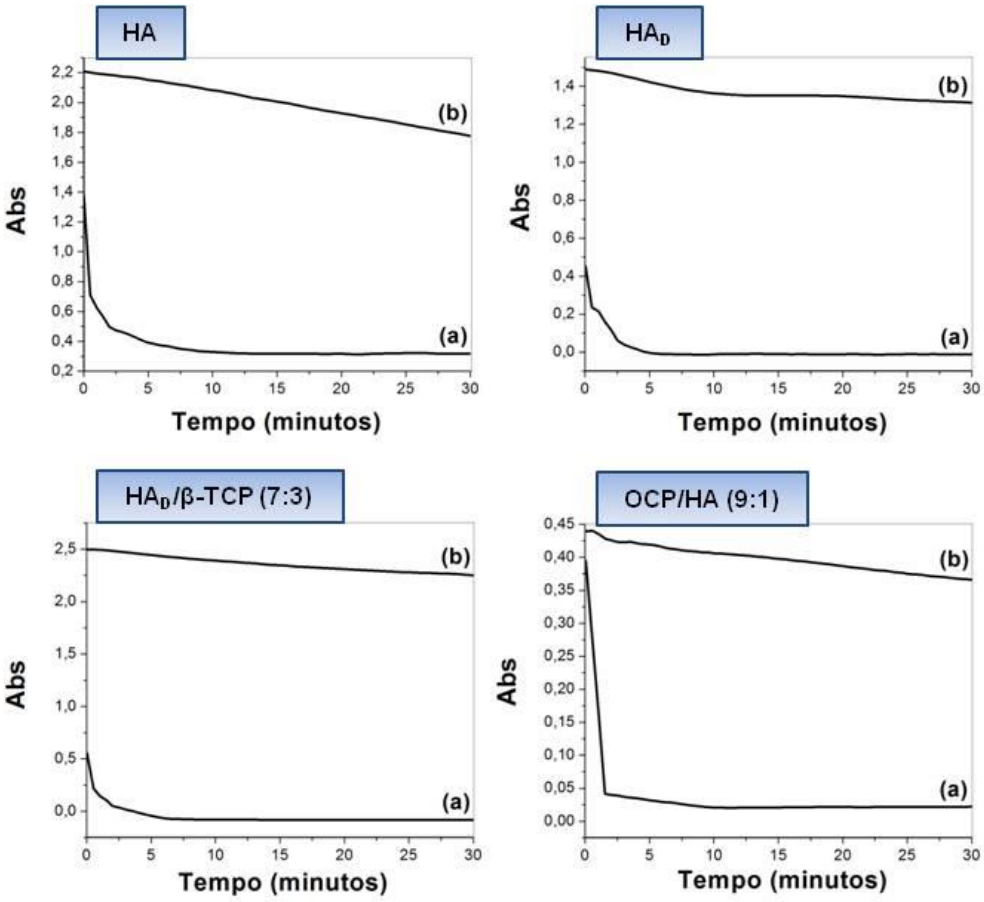


Figura 18 – Tempo de sedimentação em clorofórmio de (a) CaP não funcionalizados e (b) CaP-L. As suspensões preparadas com partículas não funcionalizadas foram completamente precipitadas em menos de 5 minutos.

14.3 Ensaio Mecânico

A fim de melhor compreender a influência da modificação da superfície das diferentes fases de CaP nas propriedades de uma matriz polimérica, tal como a resistência mecânica, foi realizado um ensaio de resistênca à tração. Foram produzidos filmes de PLLA/CaP e PLLA/CaP-L pela evaporação do solvente (clorofórmio). Em todos os casos, a concentração da fase mineral foi de 40 % (m/m). Filmes de PLLA puro também foram fabricados como controle. A Figura 19 apresenta curvas típicas de tensão-deformação de filmes de PLLA, PLLA/CaP e PLLA/CaP-L. Pode ser notado um comportamento mecânico distinto entre os diferentes grupos de filmes. Os filmes de PLLA/CaP, devido a presença das cerâmicas, apresentam elasticidade, sem apreciável deformação plástica antes da fratura. Filmes de PLLA puro apresentaram grande deformação plástica e, dessa forma, se deformaram expressivamente antes da fratura. Os filmes de PLLA/CaP-L apresentaram comportamento intermediário entre os dois últimos grupos. O alongamento no ponto de ruptura de compósitos de PLLA/CaP-L excede, em média, 15 vezes mais em comparação com compósitos de PLLA/CaP.

A deformação inicial é proporcional à tensão aplicada. O coeficiente de proporcionalidade (E) é o módulo de elasticidade ou módulo de Young. Foi observado que filmes compostos de partículas funcionalizadas com laurato são mais rígidas, ou seja, apresentam maior módulo de elasticidade, do que filmes de PLLA puro ou PLLA/CaP (Figura 20). Quanto mais rígido é o material, mais difícil de deformar[2]. Em tensões mais elevadas, a deformação sofrida pelos materiais não foi mais linear. No momento da ruptura, os valores de resistência à tração demonstraram que partículas funcionalizadas não comprometeram as propriedades mecânicas dos filmes compósitos (Figura 21). A relação das propriedades

mecânicas mencionadas anteriormente dos filmes poliméricos de PLLA com as diferentes partículas incluídas estão dispostos Tabela 5.

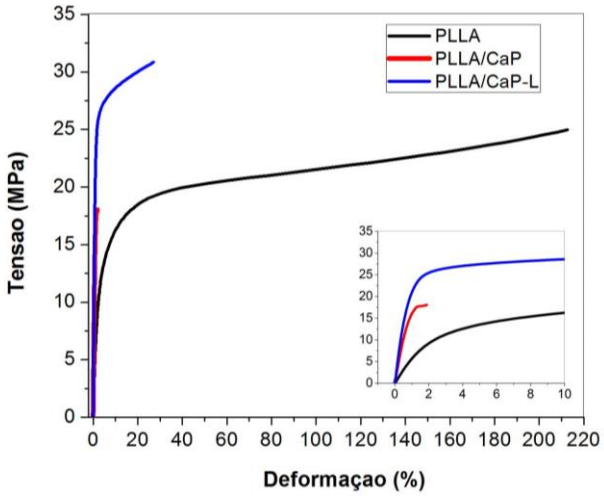


Figura 19 – Curvas típicas de tensão-deformação de PLLA puro, PLLA/CaP e PLLA/CaP-L. A figura interna mostra uma região ampliada do gráfico. A fase de CaP representada é HA_D/TCP.

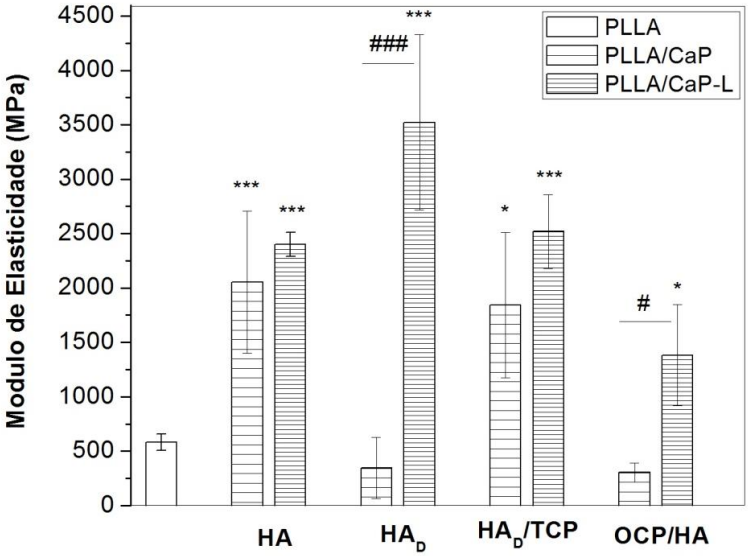


Figura 20 – Módulo de elasticidade dos filmes compósitos fabricados. CaP funcionalizados apresentaram valores médios maiores de módulo de elasticidade do que filmes de PLLA puro ou PLLA/CaP. Diferença significativa em relação ao PLLA: * ($p < 0,05$); *** ($p < 0,001$). Diferença significativa em relação aos biocompósitos de CaP e CaP-L: # ($p < 0,05$); ### ($p < 0,001$). ANOVA (teste de Fisher).

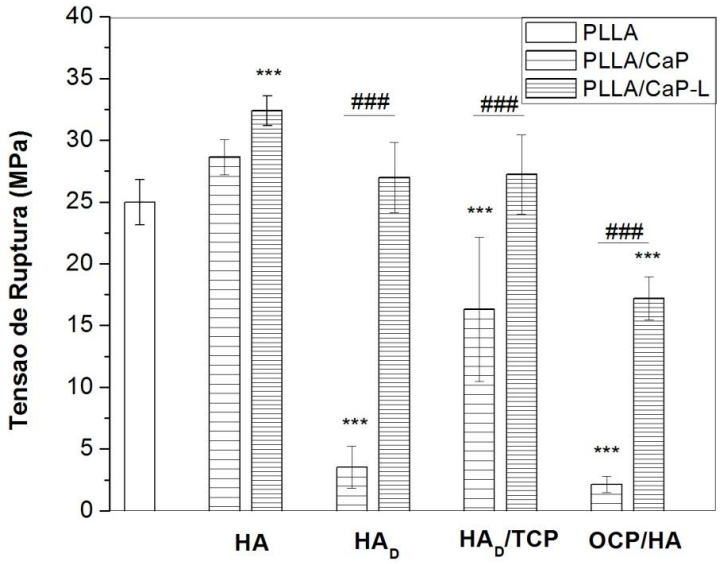


Figura 21 – Tensão de ruptura dos filmes compósitos fabricados. Os valores de resistencia à tração demonstraram que partículas funcionalizadas possuem valores mais altos de tensão de ruptura se comparados com àquelas não funcionalizadas. Além disso, não comprometeram as propriedades mecânicas dos filmes compósitos. Diferença significativa em relação ao PLLA: *** ($p < 0,001$). Diferença significativa em relação aos biocompósitos de CaP e CaP-L: ### ($p < 0,001$). ANOVA (teste de Fisher).

Tabela 5

Sumário de materiais testados em relação as suas propriedades mecânicas.

	PLLA	**Compósitos**	**PLLA/CaP**	**PLLA/CaP-L**
Tensão na Ruptura (MPa)	25,0 ± 1,8	PLLA/HA (40 wt%)	28,6 ± 1,4	32,4 ± 1,2
		PLLA/HA$_D$ (40 wt%)	3,5 ± 1,7	27,0 ± 2,8
		PLLA/HA$_D$:TCP 7:3 (40 wt%)	16,3 ± 5,8	27,2 ± 3,2
		PLLA/OCP:HA 9:1 (40wt%)	2,2 ± 0,7	17,2 ± 1,7
Módulo de Elasticidade (GPa)	0,6 ± 0,1	PLLA/HA (40 wt%)	2,5 ± 0,8	2,4 ± 0,1
		PLLA/HA$_D$ (40 wt%)	0,3 ± 0,3	3,5 ± 0,8
		PLLA/HA$_D$:TCP 7:3 (40 wt%)	1,8 ± 0,7	2,5 ± 0,3
		PLLA/OCP:HA 9:1 (40wt%)	0,3 ± 0,1	1,4 ± 0,5

Estudos anteriores mostram que há uma tendência geral de diminuir a resistência com a inclusão crescente de partículas inorgânicas não funcionalizadas em quase todos os casos[42,43,44,45,57]. Isto é atribuído à falta de ligação interfacial

entre a fase cerâmica e a matriz polimérica. Prabhakaran et al.[44] mostraram que a dispersão de nanopartículas de HA dentro da matriz polimérica PLLA resultou numa diminuição da resistência mecânica das nanofibras de PLLA/HA. Obteve-se uma resistência à tração mais baixa para os arcabouçous de PLLA/HA em comparação com suportes de PLLA puros. Resultados semelhantes também foram mostrados por Venugopal et al.[97], que encontraram uma diminuição na resistência à tração de nanofibras PCL/HA em comparação com nanofibras PCL puras. Hong et al.[45] também relataram que HA não funcionalizada deteriorou as propriedades mecânicas do PLLA. Entretanto, Shikinami e Okuno mostraram que a inclusão de HA não funcionalizada não prejudicou a resistência do compósito. Naquele estudo, os valores de resistência a tração somente foram mais baixos do que o de PLLA puro quando uma fração de HA era superior do que 20% em massa; e mesmo com a adição de até 50% em massa de HA, a resistência foi mantida acima de 100 MPa[46]. Entretanto, de forma geral, as principais observações são mesmo que as propriedades mecânicas diminuem com o aumento da carga inorgânica para quase todos os estudos mostrados, independente da fase cerâmica utilizada[42]. No estudo atual, a inclusão de partículas inorgânicas não funcionalizadas acarretou na diminuição da resistência à tração dos filmes, com exceção daqueles compostos por HA e HA_D/β-TCP. As fases cerâmicas são, em geral, muito hidrofílicas, enquanto que os polímeros são hidrofóbicos. O aumento da ligação na interface é um desafio e pode ser conseguido através de técnicas de funcionalização da superfície da partícula antes do processamento do composto. O uso de partículas funcionalizadas aumenta a adesão interfacial das partículas e, assim, as propriedades mecânicas do arcabouço podem ser efetivamente melhoradas[54]. Hong et al.[57] constataram que a enxertia de L-lactideo na superfície da HA ocasionou que compósitos de

PLLA/PLLA-g-HA apresentassem melhores propriedades mecânicas do que simples compósitos de PLLA/HA. Resultados semelhantes também foram mostrados por Qiu et al.[43]. Liu et al.[98] fabricaram compostos a partir de hidroxiapatita e um copolímero de PEG/PBT (70/30) utilizando-se diisocianato de hexametileno como agente de acoplamento, dessa forma, introduzindo ligações químicas entre as partículas inorgânicas e a matriz polimérica. As propriedades mecânicas dos compósitos, isto é, resistência à tração e módulo de Young, foram melhoradas significativamente pela introdução de uma ligação química entre as partículas inorgânicas e a matriz polimérica em comparação com os compósitos de controle. A mesma tendência de resultados foi observada no estudo corrente - a inclusão de fosfatos de cálcio funcionalizados com laurato produziu melhorias nas propriedades mecânicas do material em todos os casos, comprovando-se uma adesão aprimorada entre as partículas inorgânicas e a matriz de PLLA. E exatamente pelo fato de as partículas estarem funcionalizadas é que se permitiu a inclusão de até 40% de fase mineral no compósito sem comprometer as propriedades mecânicas.

15 FABRICAÇÃO DE MALHAS ELETROFIADAS

Sabe-se que o tamanho e a morfologia de malhas eletrofiadas podem ser influenciados por propriedades intrínsecas da solução tais como viscosidade, tensão superficial, e condutividade, ou por parâmetros da eletrofiação tais como voltagem aplicada, taxa de escoamento e distância de trabalho[62]. Por essa razão, todas as malhas eletrofiadas foram produzidas com os mesmos parâmetros de eletrofiação, para que o tamanho e a morfologia das nanofibras fossem relacionadas exclusivamente à propriedades intrínsecas das soluções eletrofiadas.

15.1 Viscosidade das soluções

A concentração do polímero e a viscosidade da solução estão diretamente relacionadas. Quanto maior a concentração polimérica, mais elevado será o grau de emaranhamento de cadeias na solução, dificultando o escoamento do líquido[62]. A Figura 22 ilustra a viscosidade aparente em função da taxa de cisalhamento para as soluções preparadas. É possível perceber que a viscosidade aparente é maior na solução de PLLA puro; em todas as soluções contendo CaP-L a viscosidade aparente diminui mais intensamente com o aumento da taxa de cisalhamento. Uma possível justificativa para isso é que as partículas funcionalizadas atuam como lubrificantes/surfactantes na solução de PLLA/$CHCl_3$, aprimorando a interação entre solvente-polímero. Sendo assim, com a inclusão dos aditivos inorgânicos, as soluções se tornaram mais fluidas. A Tabela 6 apresenta os valores da viscosidade aparente de todas as soluções preparadas.

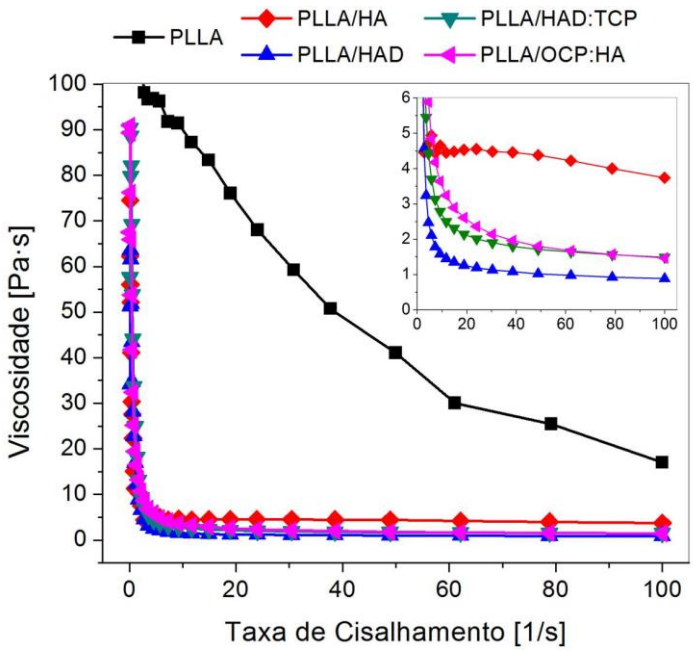


Figura 22 – Variação da viscosidade em função da taxa de cisalhamento para o PLLA e PLLA/CaP-L. A figura interna mostra uma região ampliada do gráfico. A viscosidade aparente é maior na solução de PLLA puro.

Tabela 6

Viscosidades das soluções preparadas para eletrofiação.

Substrato	Viscosidade [a] [Pa.s]
PLLA	17,0
PLLA/HA-L	3,7
PLLA/HAD-L	0,9
PLLA/HAD:β-TCP (7:3)-L	1,5
PLLA/OCP:HA (9:1)-L	1,5

[a] taxa de cisalhamento = 100(s^{-1}).

15.2 Morfologia

As fibras PLLA e PLLA/aCaP-L foram fabricadas por um processo de eletrofiação[60,62]. O conteúdo real de CaP nas malhas eletrofiadas de PLLA foram determinadas usando o método gravimétrico após as amostras terem sido tratadas termicamente a 900 °C. A perda de massa é devida à decomposição do PLLA, sendo a massa residual atribuída aos aditivos inorgânicos. Como resultado da funcionalização, foram produzidos biocompósitos eletrofiados contendo de 30 a 36% em massa de fase mineral (Figura 23). Isso corresponde a cerca de 82% do conteúdo de CaP inicialmente colocados na solução de PLLA. Chuenjitkuntaworn et al.[87] fabricaram fibras eletrofiadas de PLLA/HA (1-2% m/m) e constataram que o conteúdo inicial de HA adiconada na solução de PLLA não foi a mesma daquela encontrada no produto final eletrofiado. No caso deles, apenas 67% da massa da HA incial estava presente na malha. Diferentemente, as partículas do estudo presente foram funcionalizadas com laurato, e o resultado dessa maior interação

entre partículas de CaP com o polímero levou à elevada inclusão de aditivos inorgânicos no produto final.

A Figura 24 apresenta imagens de SEM de fibras eletrofiadas de PLLA e PLLA/CaP-L. As micrografias revelaram uma morfologia superficial porosa sem diferença significativa entre os substratos. Mas podem ser observadas variações no diâmetro da fibra (Figura 25). O diâmetro médio das fibras eletrofiadas de PLLA foi de 2,3 µm, e nos casos de PLLA/HA-L, PLLA/HA_D-L, PLLA/HA_D:TCP (7:3)-L e PLLA/OCP:HA (9:1)-L os diâmetros médios foram de 0,53 µm, 1,23 µm, 1,15 µm e 1,26 µm, respectivamente. Pode-se observar que o diâmetro médio das fibras PLLA é maior do que o dos biocompósitos. As soluções antes da fiação foram preparadas com 40% em massa de fase mineral, diminuindo assim a concentração de polímero. Sabe-se que o diâmetro das fibras aumenta com o aumento da concentração de polímero[62,87,90]. A concentração do polímero influencia a viscosidade da solução; estudos mostram que a diminuição da viscosidade da solução leva à formação de diâmetros de fibras menores[100]. Portanto, a diminuição da viscosidade nas soluções dos biocompósitos favoreceu a formação de fibras com diâmetros menores. De fato, o diâmetro médio das fibras de PLLA/CaP-L diminui de 2,3 µm do PLLA para menos de 1,3 µm para os compósitos.

A Figura 24 ainda mostra que as fibras eletrofiadas, mesmo contendo alto teor de fase inorgânica, estavam desprovidas de quaisquer quebras. Autores reportaram que uma maior concentração de HA, aumenta a aglomeração de partículas resultando na formação de fibras quebradas[101]. Lao et al.[102] também observaram que junto com o aumento da concentração de HA, aglomerados maiores gradualmente cobriam a superfície das fibras. Isso tudo gera pontos frágeis nas fibras deteriorando as propriedades mecânicas do material. No trabalho presente, a

funcionalização das partículas de CaP com laurato resultou na produção de suportes com alta concentração de fase mineral, sem comprometer a qualidade das fibras.

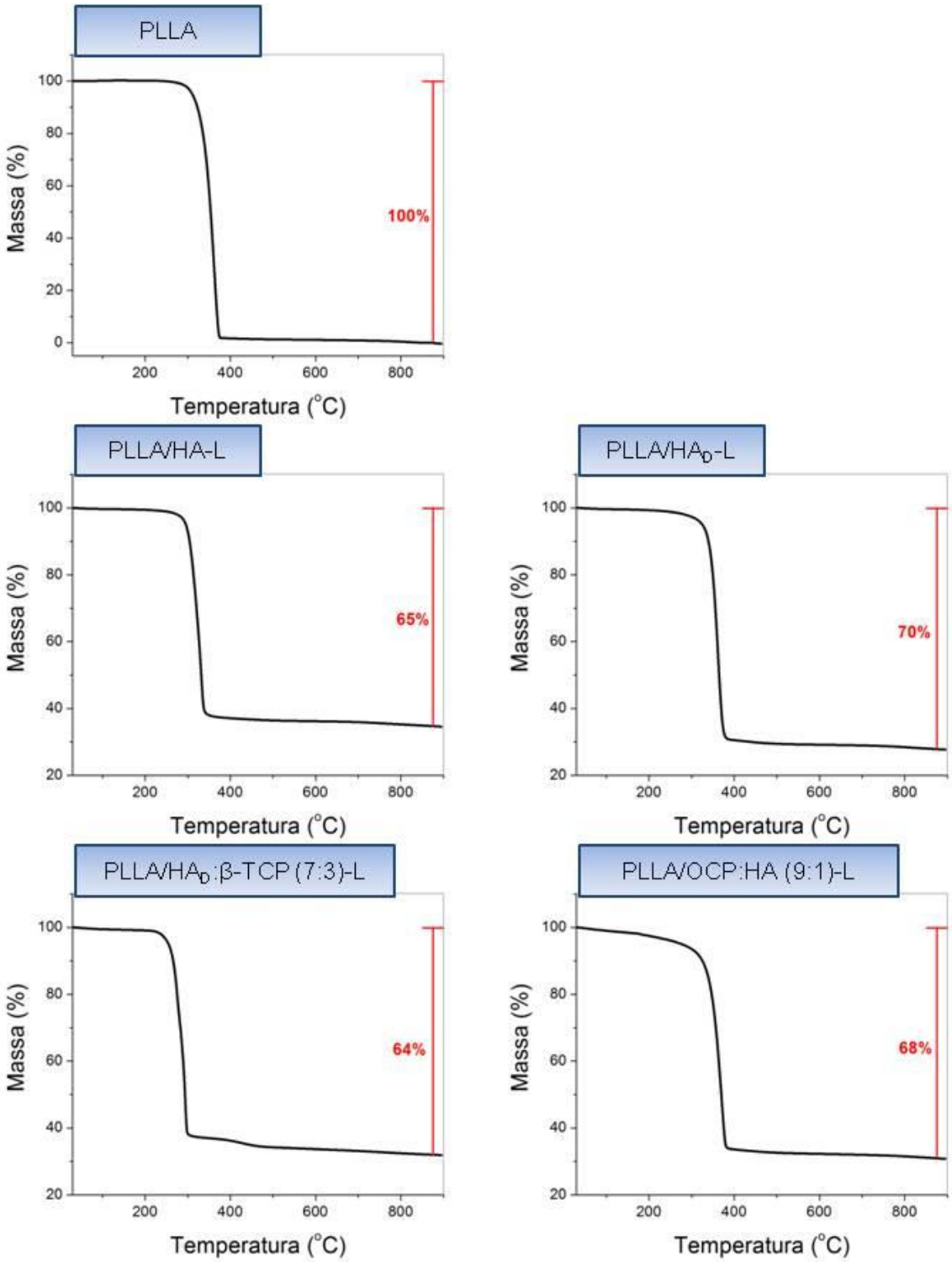


Figura 23 – Curvas de TGA de malhas eletrofiadas de PLLA e PLLA/CaP-L. A perda de massa é devida à decomposição do PLLA, sendo a massa residual atribuida aos aditivos inorgânicos (30 a 36% em massa de fase mineral).

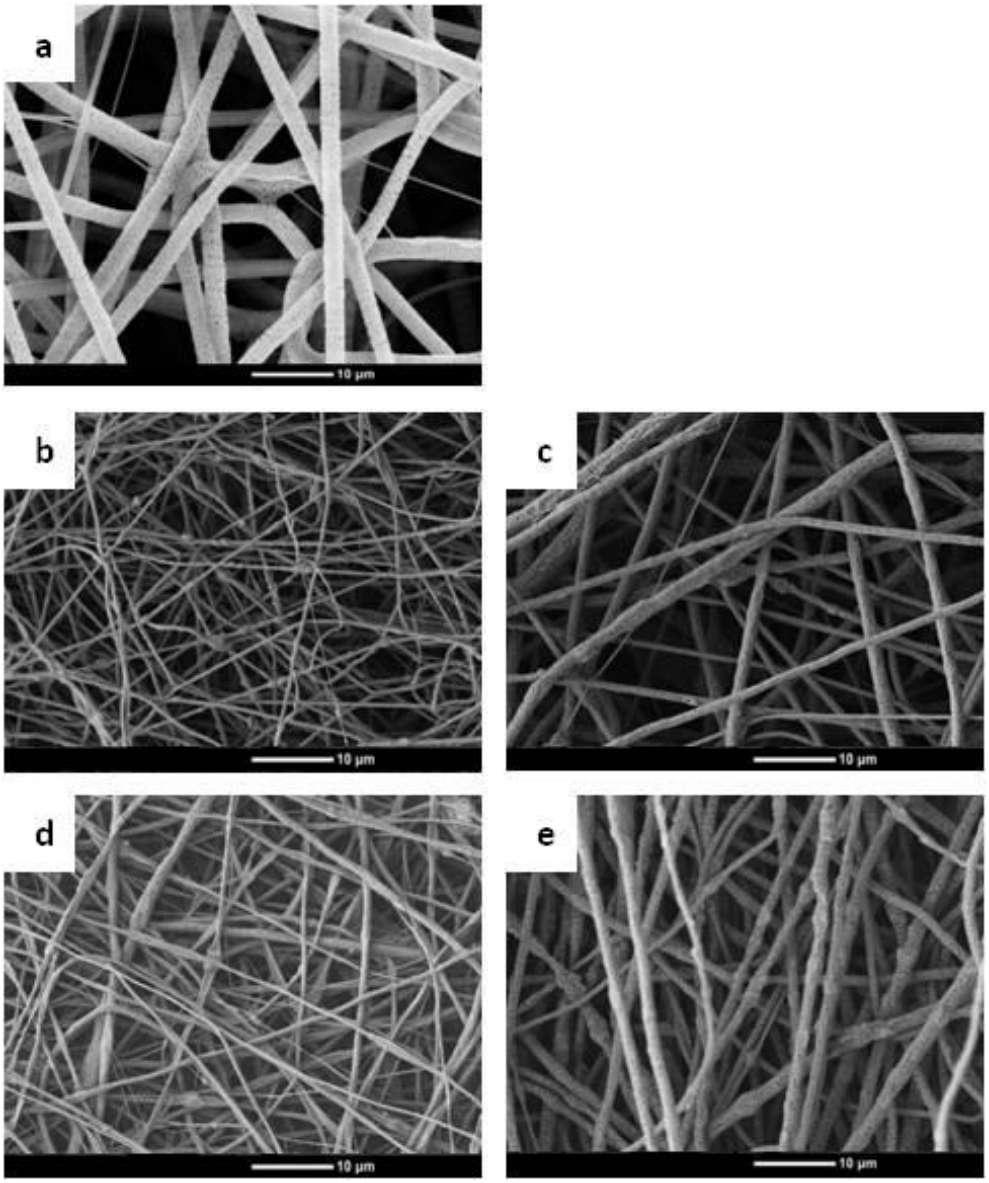


Figura 24 – Microscopia eletrônica de varredura de malhas eletrofiadas (a) PLLA, (b) PLLA/HA-L (35 m/m), (c) PLLA/HA_D-L (30 m/m), (d) PLLA/HA_D:βTCP(7:3)-L (36 m/m) e (e) PLLA/OCP:HA(9:1)-L (32 m/m).

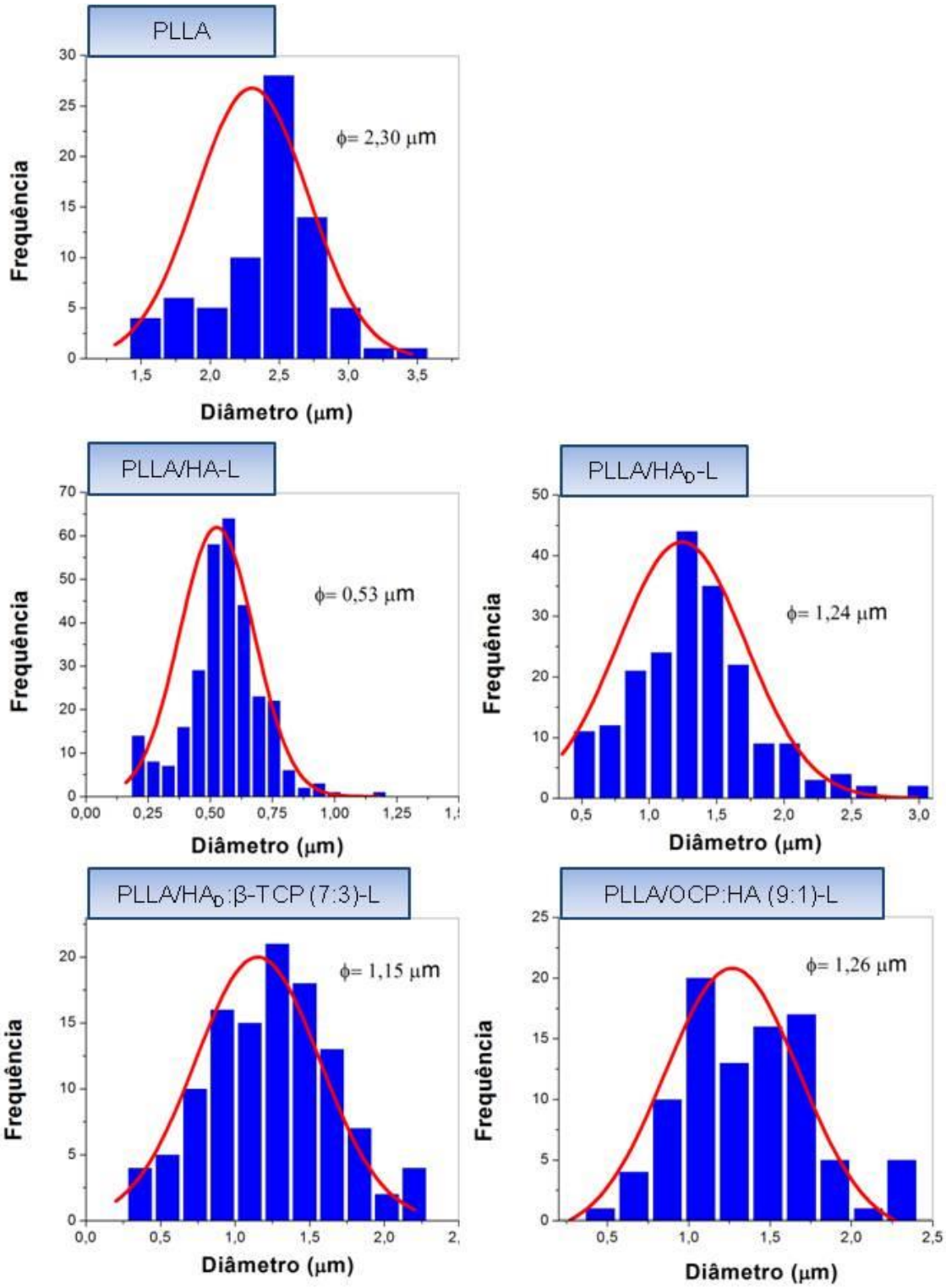


Figura 25 –Tamanho médio das fibras de PLLA e PLLA/CaP-L. Os diâmetros médios foram de 2,3 μm, 0,53 μm, 1,23 μm, 1,15 μm e 1,26 μm para PLLA puro, PLLA/HA-L,PLLA/HA$_D$-L, PLLA/HA$_D$:TCP (7:3)-L e PLLA/OCP:HA (9:1)-L, respectivamente.

As imagens de TEM na Figura 26, mostraram que as fibras PLLA puras são uniformes, enquanto PLLA/CaP-L exibiram partículas dispersas sem aglomerações. Esta observação está em concordância com as micrografias eletrônicas de varredura, (Figura 24). A imagem também mostra uma dispersão aparente inferior de partículas de OCP-L nas fibras de PLLA. Uma vez que as partículas de OCP são menos densas do que as partículas das demais fases de CaP, a mesma composição em massa resultará em composição de volume diferente, que poderia explicar esta observação. De fato, todos os suportes eletrofiados exibiram uma dispersão satisfatória da fase mineral na matriz polimérica como resultado da interação dipolo-dipolo induzido entre os grupos alquil do laurato e os grupos $-CH_3$ de PLLA. Os resultados anteriores do ensaio de sedimentação indicaram uma boa dispersão das partículas de CaP-laurato num solvente orgânico.

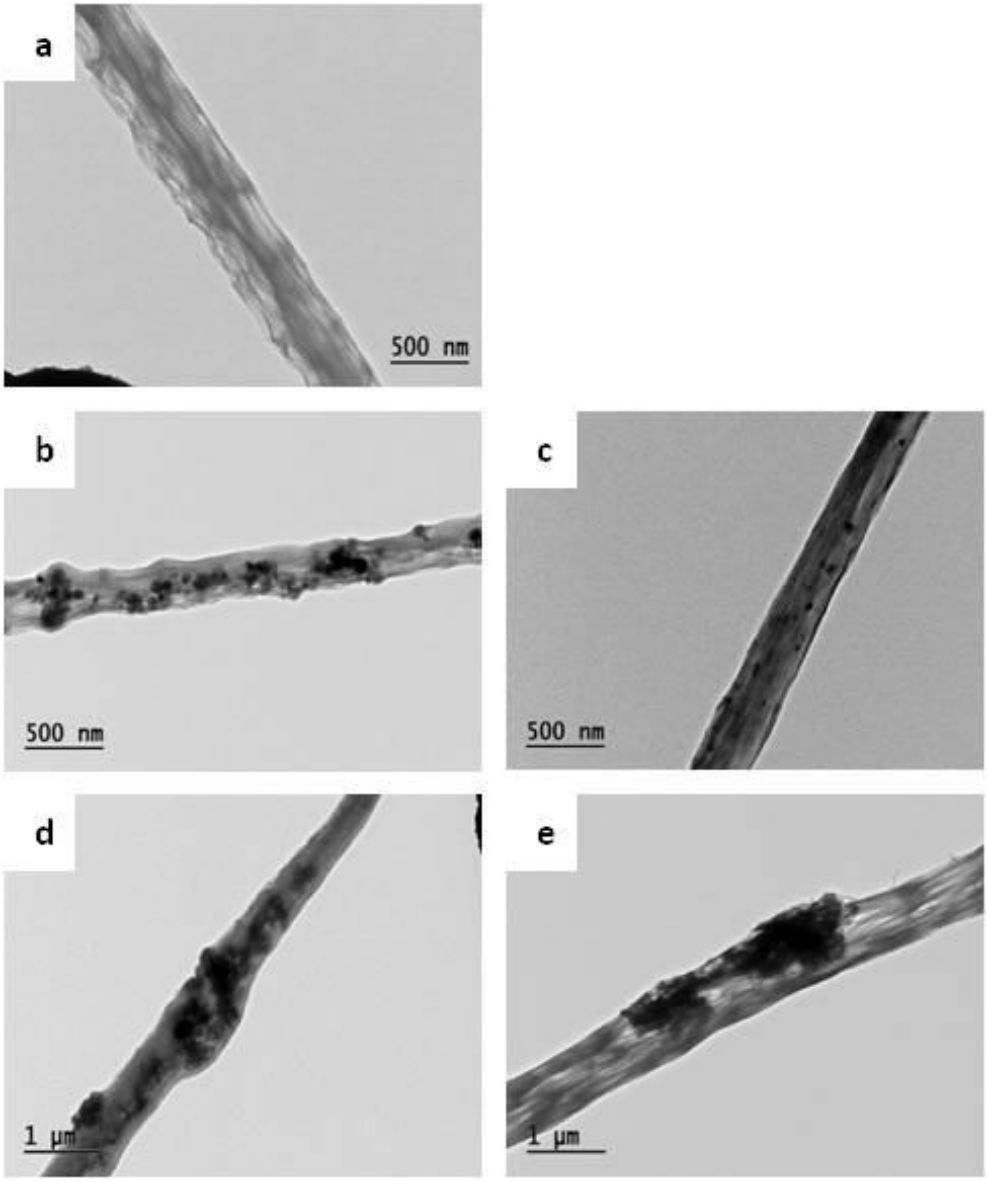


Figura 26 – Microscopia eletrônica de transmissão de malhas eletrofiadas (a) PLLA, (b) PLLA/HA-L (35 m/m), (c) PLLA/HA_D-L (30 m/m), (d) PLLA/HA_D:βTCP(7:3)-L (36 m/m) e (e) PLLA/OCP:HA(9:1)-L (32 m/m). Fibras de PLLA puro são uniformes, enquanto PLLA/CaP-L exibiram partículas dispersas.

15.3 Porosidade

A porosidade das malhas eletrofiadas pode ser calculada através do cálculo das densidades aparente e absoluta dos materiais, e indica o espaço entre as fibras interligadas; os resultados foram resumidos na Tabela 7[78,79]. A porosidade das fibras de PLLA foi de cerca de 89,2%, enquanto a das fibras contendo HA-L, HA_D-L, HA_D:TCP (7:3)-L e OCP:HA (9:1)-L era de cerca de 84,1%, 85,4%, 84,6% e 83,1%, respectivamente. Assim, a adição de partículas minerais no polímero conduz a uma pequena diminuição da porosidade, em linha com a diminuição do diâmetro da fibra. Estudos anteriores mostraram que os valores de porosidade de malhas eletrofiadas de polímero puro não são muito diferentes daquelas de polímero/HA [87,100].

Tabela 7

Densidade aparente, densidade absoluta e porosidade dos compósitos eletrofiados de PLLA e PLLA/CaP-L.

Substrato	Densidade aparente (d, g/cm^3)	Densidade absoluta (D, g/cm^3)	Porosidade (%)
PLLA	0,14 ± 0,01	1,30 ± 0,08	89,2 ± 1
PLLA/HA-L	0,18 ± 0,03	1,13 ± 0,12	84,1 ± 2
PLLA/HAD-L	0,18 ± 0,02	1,27 ± 0,09	85,4 ± 2
PLLA/HAD:β-TCP (7:3)-L	0,17 ± 0,02	1,10 ± 0,05	84,6 ± 2
PLLA/OCP:HA (9:1)-L	0,21 ± 0,02	1,27 ± 0,15	83,1 ± 3

15.4 Medidas de ângulo de contato

No presente estudo, utilizaram-se películas revestidas por centrifugação (*spin coated films*) para determinar a molhabilidade dos substratos. O ângulo de contato de gotas de água foi medido sobre a superfície dos filmes de PLLA, PLLA/CaP não modificadas e PLLA/CaP-L. A partir da Figura 27, observa-se que todos os filmes compósitos apresentaram maior grau de hidrofilicidade em comparação com filme de PLLA puro (84,4º±0,9). Também se nota que a presença de laurato na superfície dos CaP aumenta significativamente a hidrofobicidade da película, como esperado. PLLA/HA-L (78,5º±0,8) apresentou maior ângulo de contato do que PLLA/HA (70,8º±2,9). Do mesmo modo, PLLA/HA_D-L (82,5º±0,2) e PLLA/OCP-L (84,2º±0,8) apresentaram maior ângulo de contato do que seus correspondentes não modificados, PLLA/HA_D (78,9º±1,2) e PLLA/OCP (81,1º±0,7), respectivamente. A única exceção foi no filme composto por HA_D:TCP (7:3). Neste caso, apesar da média numérica da medida do ângulo de contato ser maior no filme contendo CaP funcionalizada (78,1º±2,0), não houve diferença significativa com aquele medido no filme contendo CaP não modificada (77,3º±1,1).

As partículas de CaP presentes na superfície do filme devem ser responsáveis pelo aumento da energia superficial. Além disso, os grupos hidroxila dos CaP parecem desempenhar um papel fundamental, uma vez que o ângulo de contato quando HA é adicionada é menor do que quando a fase mineral é o OCP, por exemplo. Enquanto cada partícula de HA possui dois grupos hidroxila reativos, as partículas de OCP não possuem nenhum, embora neste estudo OCP seja fase conjunta com 10% de HA. Xu et al.[100] também estudaram a molhabilidade das superfícies de filmes preparados por *spin-coating* de PLLA/PLA-g-HA (de 0 a 30% m/m). Em todos os casos, observou-se a diminuição do ângulo de contato quando

comparados com o PLLA puro. Quando o conteúdo de HA foi de 30% em massa, a diferença para o filme de PLLA puro foi aproximadamente 9º menor. Vasita et al.[103] descobriram que a hidrofilicidade de malhas eletrofiadas da blenda de PLGA com o surfactante Pluronic F-108 é maior se comparadas ao PLGA puro. Houve uma queda gradual no ângulo de contato a medida que se aumentava a concentração do surfactante na blenda. Ambos os estudos mencionados também demonstraram que a inclusão de hidroxilas afeta significativamente a hidrofilicidade do material. No estudo presente, não era esperado uma redução pronunciada do ângulo de contato para compósitos com CaP funcionalizados, pois suas hidroxilas terminais foram alteradas pela inclusão do laurato.

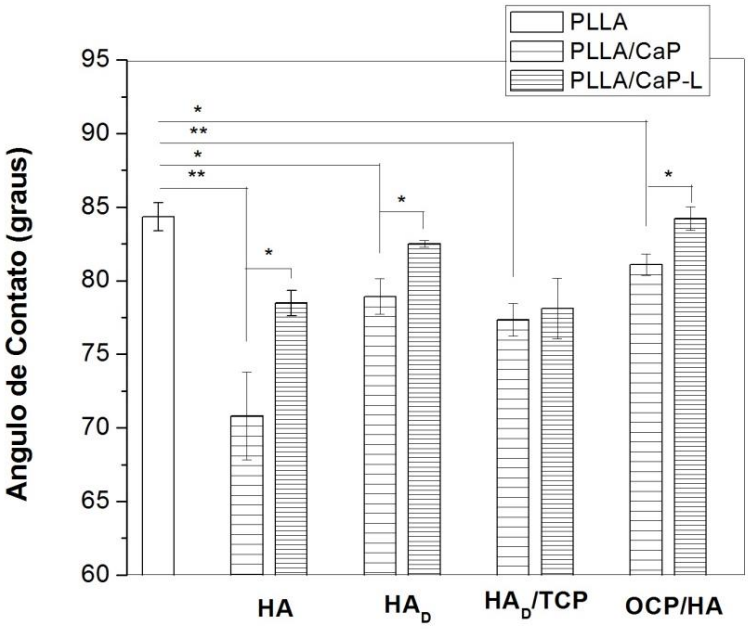


Figura 27 – Molhabilidade superficial: ângulos de contato com água nos filmes de PLLA puro e compósitos. A inclusão do laurato na superfície dos CaP ocasionou a alteração das suas hidroxilas terminais, resultando em uma redução não tão pronunciada do ângulo de contato em comparação com o PLLA puro. Diferenças significativas foram denotadas como: * ($p<0.05$), ** ($p<0.01$) ANOVA (teste de Fisher).

16 ENSAIO DE DEGRADAÇÃO

Os resultados do ensaio mostraram as modificações na morfologia das malhas de PLLA e PLLA/apatias-laurato após 84 dias de degradação em PBS *in vitro*. As fibras de PLLA puro não sofreram alterações morfológicas significativas em relação às malhas antes do ensaio (Figura 28). O que significa que o processo de degradação ainda estava em sua fase inicial. Em contraste, malhas de PLLA/CaP-L apresentaram fibras quebradas, partículas minerais expostas e orifícios na superfície da fibra (Figura 29). Sui et al.[50] também observaram o surgimento de fibras quebradas ao submeterem amostras de PLLA e PLLA/HA a um ensaio de degradação por 8 semanas. Por outro lado, Maquet et al.[104] constataram em seu estudo que todas as estruturas políméricas mantiveram sua integridade estrutural até o final do experimento (16 semanas).

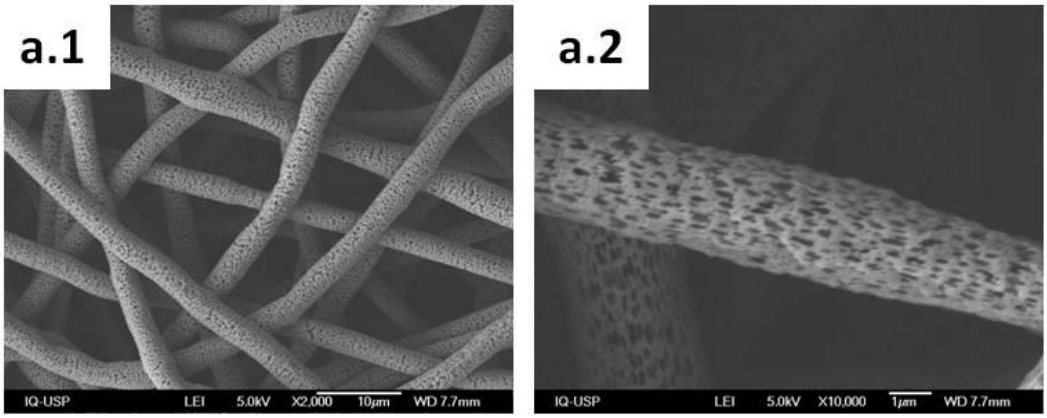


Figura 28 – SEM das fibras eletrofiadas após 84 dias de ensaio de degradação *in vitro*: (a) PLLA puro. Coluna 1: magnificação 2kx. Coluna 2: magnificação 10 kx. Fibras de PLLA puro não sofreram alterações morfológicas significativas em relação às malhas antes do ensaio.

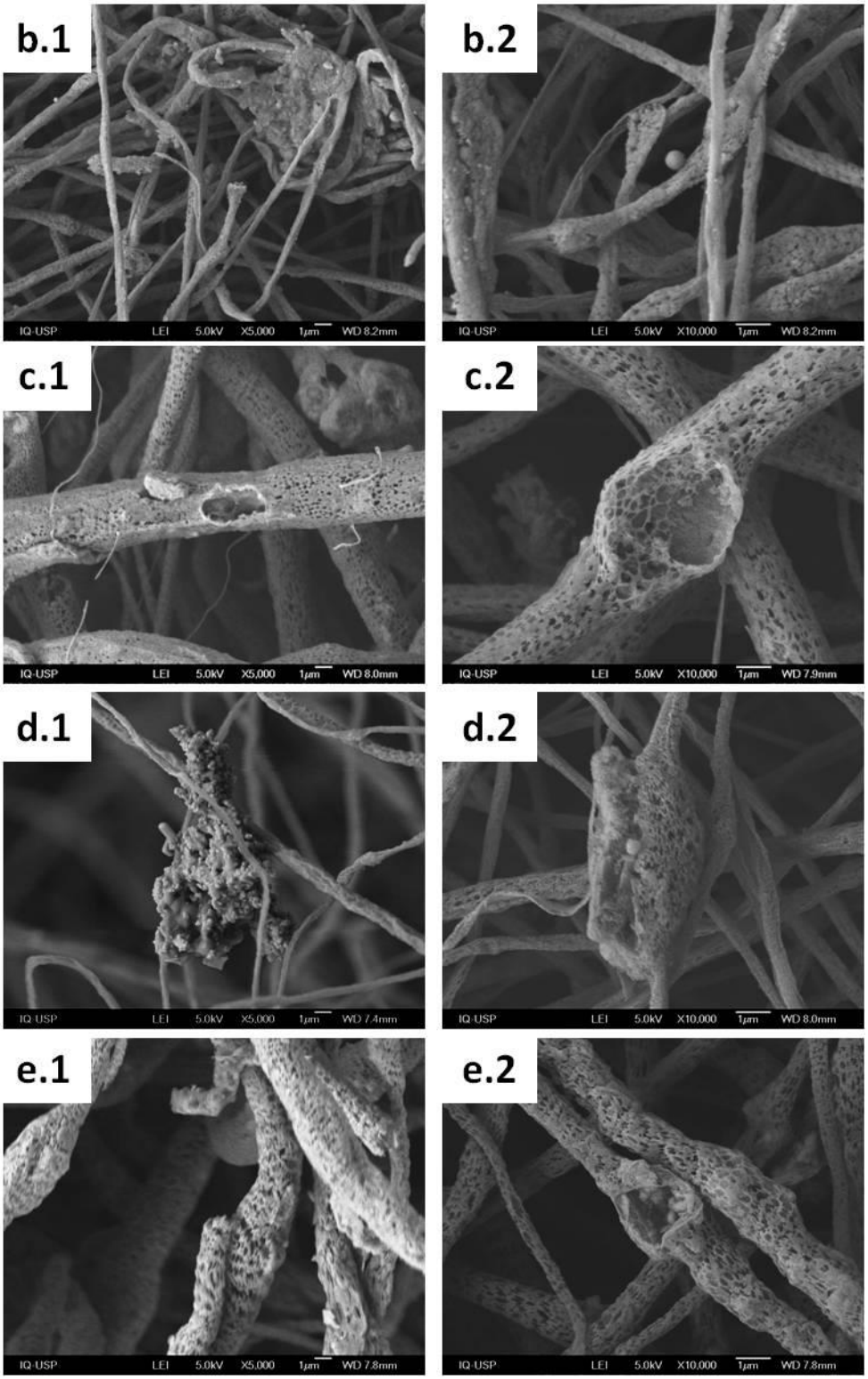


Figura 29 – SEM das fibras eletrofiadas após 84 dias de ensaio de degradação *in vitro*: (b)PLLA/HA-L, (c)PLLA/HA_D-L, (d) PLLA/HA_D:TCP-L e (e)PLLA/OCP:HA-L. Coluna 1: magnificação 5kx. Coluna 2: magnificação 10 kx. Malhas de PLLA/CaP-L apresentaram fibras quebradas, partículas minerais expostas e orifícios na superfície da fibra.

A dissolução de partículas de CaP foi medida na solução de PBS (solução tampão fosfato) em pH 7,4 na qual as malhas foram estocadas. Os resultados (Figura 30) mostraram que durante os 84 dias de análise as malhas contendo HA_D, HA_D:β-TCP e OCP:HA tiveram uma velocidade de lixiviação superior daquelas contendo HA. Sabe-se que a HA tem maior estabilidade em meios aquosos do que outras cerâmicas de fosfato de cálcio dentro de um intervalo de pH entre 4,2-8,0[27,29]. As soluções estoque das malhas de PLLA/HA_D foram aquelas que continham a maior quantidade de cálcio por litro de solução durante todo o período de análise; além disso, em apenas 14 dias de ensaio as malhas contendo HA_D apresentaram máxima dissolução de íons cálcio. Malhas contendo OCP:HA (9:1) foram as segundas que mais dissolveram partículas de cálcio na solução estoque. Com isso, durante os primeiros 21 dias de ensaio, período que desempenha um papel fundamental na viabilidade, crescimento e diferenciação celular, as malhas contendo HA_D e OCP:HA (9:1) foram as que mostraram rápida lixiviação dos fosfatos de cálcio. Esses resultados estão de acordo com os valores de perda de massa das amostras em função do tempo de degradação (Figura 31). Durante todo o perídodo de ensaio, a perda de massa das malhas contendo HA_D e OCP:HA (9:1) foram maiores do que àquelas contendo HA e HA_D:β-TCP.

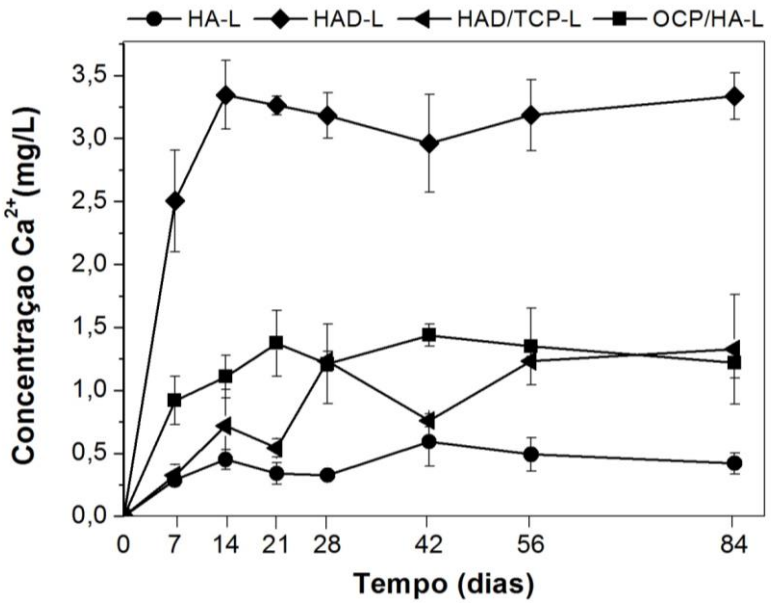


Figura 30 – Liberação de cálcio: comparação da dissolução de fibras eletrofiadas de PLLA/CaP-L em função do tempo em solução tampão fosfato (pH 7,4). Malhas contendo HA_D, HA_D:β-TCP e OCP:HA tiveram uma velocidade de liberação de íons Ca^{2+} superior daquelas contendo HA.

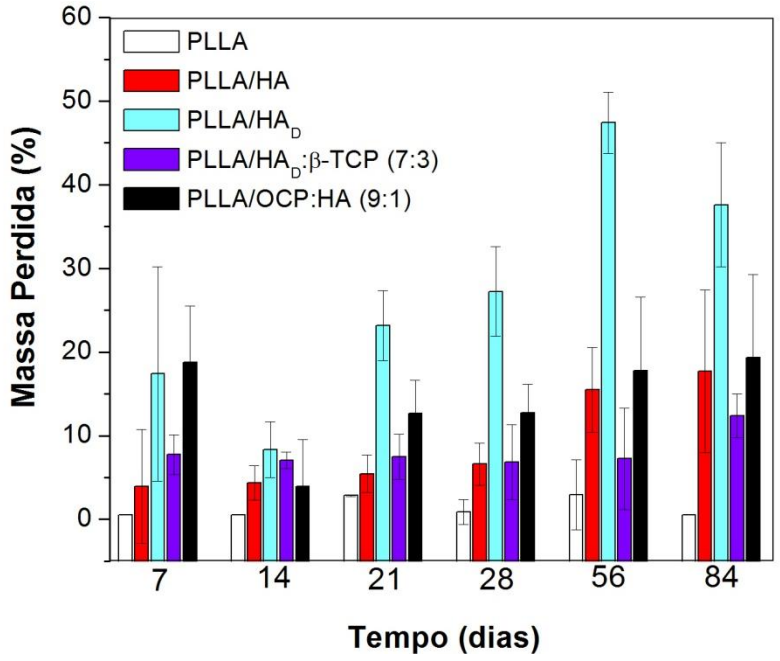


Figura 31 – Massa perdida (%) das amostras de PLLA e PLLA/CaP-L em função do tempo de degradação *in vitro* em PBS (pH 7,4). Durante todo o perídodo de ensaio, as malhas contendo HA_D e OCP:HA (9:1) foram as que mais perderam massa.

Para estudar as alterações na hidrofilicidade, mediu-se o índice de intumescimento dos suportes eletrofiados durante os 84 dias de ensaio de degradação. A taxa de intumescimento (Figura 32) mostra uma absorção de água em todas as amostras; sendo a de menor absorção as malhas de PLLA puro, resultado esperado visto que os CaP conferem maior hidrofilicidade ao compósito. A incorporação de uma fase bioativa mais hidrofílica na matriz polimérica ajuda a absorver a água, proporcionando assim um meio de controle da cinética de degradação do suporte[15]. De modo contrário aos resultados presentes, outros estudos demonstraram que a absorção de água em PLLA puro foi muito maior do que em suportes híbridos (PLLA/HA)[50]. Entretanto, o estudo em questão não menciona qual é o conteúdo de HA no biomaterial. Por outro lado, no estudo presente, a incorporação das partículas minerais (preparadas com até 40 % m/m) auxiliaram na captação de água em todos os casos e durante todo o período de ensaio. Outro estudo também mostra o favorecimento na captação de água em suportes de PLLA puros do que em compósitos com nano fosfatos de cálcio; todavia a fase mineral utilizada não possuía grupos hidroxila em sua estrutura, de modo que não poderia contribuir para aumentar a hidroficilidade do compósito[105]. No estudo presente, todos os biocompósitos possuem grupos hidroxila provenientes dos aditivos inorgânicos, dessa forma, favorecendo a absorção de água. Sabe-se que, para que ocorra a degradação do substrato, a absorção de água é necessária para ocasionar a clivagem da ligação éster do polímero e, assim, iniciar seu processo de degradação[82]. A partir de então, os grupos carboxílicos produzidos da quebra da ligação ester do polímero acelerariam autocataliticamente a reação de degradação do polímero. Entretanto, com a inclusão das partículas inorgânicas alcalinas, este fenômeno deve ser adiado ou mesmo prejudicado como resultado do efeito de

tamponamento do pH da solução e, portanto, controlando a rápida degradação ácida do polímero, bloqueando a ação dos grupos carboxílicos produzidos da quebra da ligação éster do polímero[15]. Esta é uma informação importante, haja visto que os produtos da degradação de polímeros, como os de PLLA e PLGA, foram associados a reações inflamatórias tardias em locais de implantação[106,107].

Durante os primeiros 21 dias de ensaio, as malhas contendo HA_D e OCP:HA (9:1) foram as que mais absorveram água. Uma possível explicação para esse fenômeno talvez seja a rápida dissolução que esses dois compostos apresentaram no mesmo período. A alta taxa de dissolução estaria expondo com mais facilidade os grupos hidroxila dos CaP na superfície das malhas. Nos dias seguintes, essa tendência foi se alterando e as demais malhas contendo as fases HA_D:TCP (7:3) e HA, menos solúveis, passam a apresentar os maiores valores de hidrofilicidade. Para essas duas fases, o ponto máximo de liberação de íons cálcio se deu a partir do dia 28 de ensaio (Figura 30). Ou seja, enquanto as demais fases, a partir do dia 28, já haviam atingido valores praticamente constantes de liberação de Ca^{2+}, as fases HA_D:TCP (7:3) e HA estavam ainda por alcançar os seus valores máximos de liberação, dias 28 e 42, respectivamente, e, somente a partir de então, expondo de forma mais pronunciada seus grupos hidroxila.

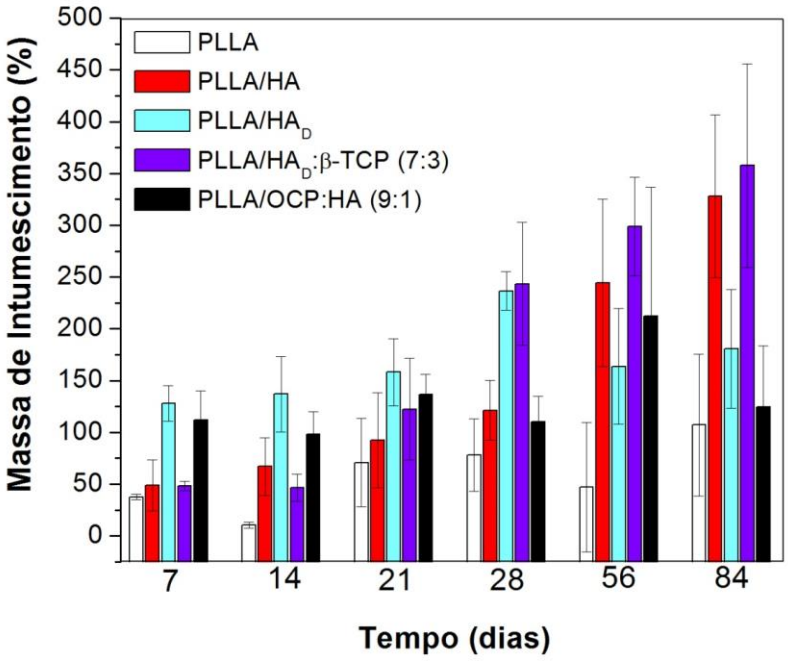


Figura 32 – Massa de intumescimento (inchaço) nas amostras de PLLA e PLLA/CaP-L em função do tempo de degradação *in vitro* em PBS (pH 7,4). Durante os primeiros 21 dias de ensaio, as malhas contendo HA_D e OCP:HA (9:1) foram as que mais absorveram água. Nos dias seguintes, malhas contendo as fases HA_D:TCP (7:3) e HA passam a apresentar os maiores valores de hidrofilicidade.

17 ENSAIO DE BIOATIVIDADE EM SBF

A mineralização *in vitro* em solução de SBF tem sido reportada como um método para predizer o comportamento de mineralização *in vivo*[84]. A capacidade de precipitação pode ser avaliada pela quantidade e tamanho dos grânulos depositados[108]. Depois de atingido o tempo de 28 dias de incubação em SBF, as malhas eletrofiadas foram lavadas com água deionizada, secas e pesadas. A Figura 33 mostra que não houve formação de mineralização sobre a superfície das fibras de PLLA puro. Isso demonstra que o PLLA não é um biomaterial bioativo. Os grupos

carboxila do PLLA poderiam atuar como locais de nucleação eficazes para a formação de apatita devido à sua alta carga negativa. Entretanto, esse fato é limitado pela escassez de grupos finais carboxila nas superfícies das fibras Peng et al.[109] tiveram que pré-tratar as fibras de PLLA com hidróxido de sódio ou hipoclorito de sódio para gerar grupos carboxila nas superfícies das fibras para, somente então, obter resultados satisfatórios de mineralização em SBF. De forma igual, Jiao et al.[110] hidrolisaram a superfície de filmes e arcabouços porosos de PLLA por diferentes períodos de tempo em solução alcalina; como resultado, um revestimento de apatita foi formado no PLLA hidrolisado após imersão em SBF por 3 semanas. As superfícies de PLLA hidrolisadas eram ricas em COOH e OH e, por essa razão, conseguiram a mineralização no PLLA hidrolisado. No estudo corrente, a superfície do PLLA não foi pré-tratada com soluções alcalinas, por isso não houve a formação de revestimento de apatitas em sua superfície. Estudos anteriores de mineralização *in vitro* com SBF apontaram o mesmo comportamento quando a matriz polimérica é o PLGA [102,111,112]. Tanto o PLLA quando o PLGA não possuem habilidade em induzir a deposição de apatitas em sua superfície devido à sua natureza hidrofóbica. De fato, já foi demonstrado que a mineralização através de ensaio com SBF foi mais evidente em superfícies hidrofílicas[112]. Ngiam et. al.[113], por exemplo, incorporaram partículas de HA na matriz polimérica de PLGA para acelerar o crescimento de mineral. Esta superfície mais hidrofílica proporcionou um sítio mais favorável para a nucleação de partículas de apatitas. Sendo assim, a formação de compósitos através da adição de partículas inorgânicas na matriz polimérica torna-se uma alternativa atraente para mudar essas propriedades interfaciais hidrofóbicas que não permitem a mineralização em sua superfície. A morfologia das amostras dos biocompósitos de PLLA/CaP-L após imersão na solução avaliadora de bioatividade

SBF pode ser observada na Figura 34. Embora a precipitação de fosfatos de cálcio ocorreram em todos os compósitos biocoerâmicos, observou-se que a deposição mineral sobre a superfície PLLA/HA-L foi significativamente reduzida, apresentando regiões sem revestimento e baixa cristalinidade. Muitos autores mostraram suportes contendo HA exibindo mineralização satisfatória em sua superfície. Por outro lado, no presente estudo, a precipitação de apatita revelou apenas um estágio inicial de mineralização na superfície das malhas contendo HA. Isso é facilmente justificado, pois o protocolo experimental dos demais estudos informa que os pesquisadores trocavam constantemente a solução SBF para repor os íons de calcio e fósforo praticamente a cada dois dias; além disso, utilizavam a solução SBF cinco vezes mais concentrada (5 x SBF) com o intuito de acelerar o processo de mineralização para um efeito mais aparente[102]. No estudo presente, a solução SBF não foi reposta durante todo o período do experimento. Dessa forma, impedindo que os íons cálcio e fosfato fossem constantemente repostos. Assim, a única forma de repor os íons cálcio e fosfato na solução seria através da dissolução dos próprios CaP provenientes das malhas eletrofiadas. HA possui uma baixa taxa de solubilização, dessa maneira, a camada de Ca-P levaria muito tempo para crescer. Entretanto, nas mesmas condições, os demais substratos foram capazes de induzir a formação de apatita óssea. Bicompósitos formados pelas demais fases, HA_D, HA_D:β-TCP (7:3) e OCP:HA (9:1), revelaram um estágio mais avançado da nucleação do revestimento. A morfologia da apatita depositada sobre os substratos contendo HA_D e HA_D:β-TCP (7:3) pode ser descrita como flocular (flake crystals), e a elevada mineralização levou à formação de um “colar” flocular (necklace). Por último, a deposição de apatita nos biocompósitos contendo a fase OCP:HA (9:1) (Figura 35) indicou um estágio ainda mais avançado da nucleação do revestimento; observou-se o surgimento de uma

deposição mineral na forma de placas (plate shaped) que unidas formam “rosetas” cristalinas, as quais já foram previamente identificadas como sendo a morfologia típica da hidroxiapatita[111,112,114].

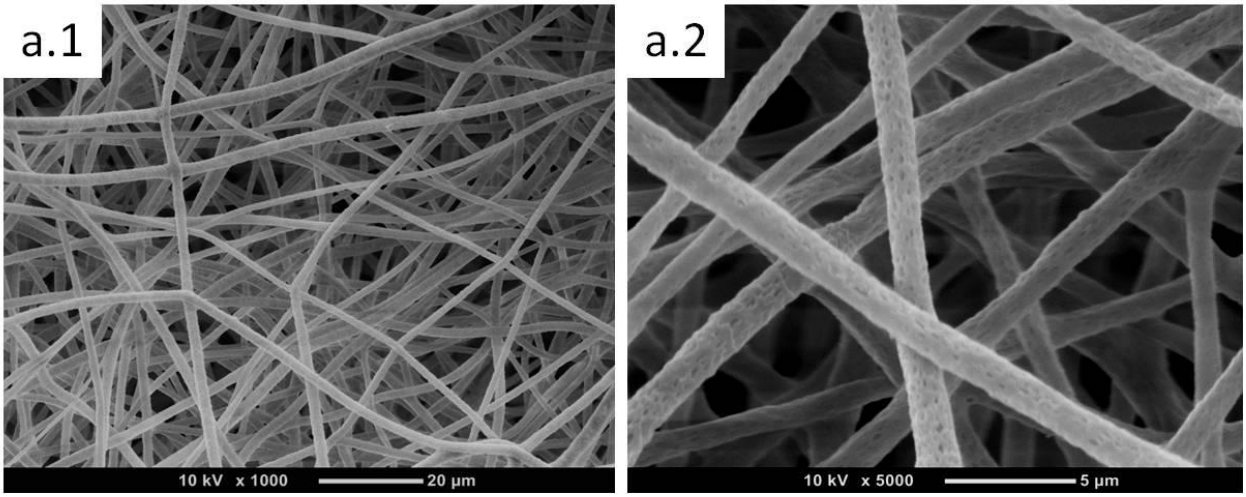


Figura 33 – SEM das fibras eletrofiadas de PLLA puro após 28 dias de imersão em SBF. Coluna 1: magnificação 1kx. Coluna 2: magnificação 5 kx. Não houve formação de mineralização sobre a superfície das fibras de PLLA puro.

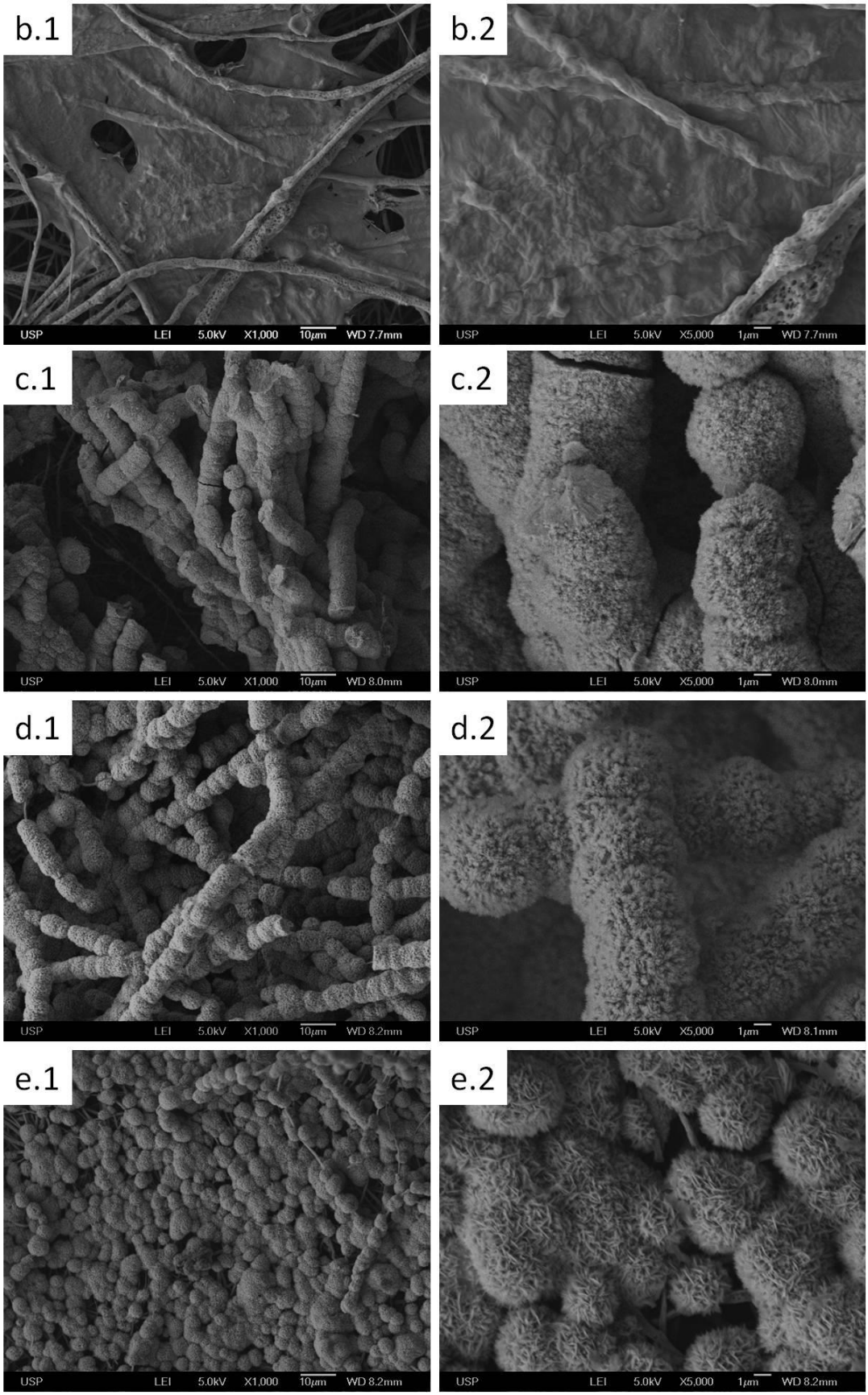


Figura 34 – SEM das fibras eletrofiadas de PLLA/CaP-L após 28 dias de imersão em SBF: (b)PLLA/HA-L, (c)PLLA/HA_D-L, (d) PLLA/HA_D:TCP-L e (e)PLLA/OCP:HA-L. Coluna 1: magnificação 1kx. Coluna 2: magnificação 5 kx. O revestimento em malhas contendo HA-L apresentou regiões sem revestimento e de baixa cristalinidade. Os demais substratos revelaram um estágio mais avançado da nucleação do revestimento.

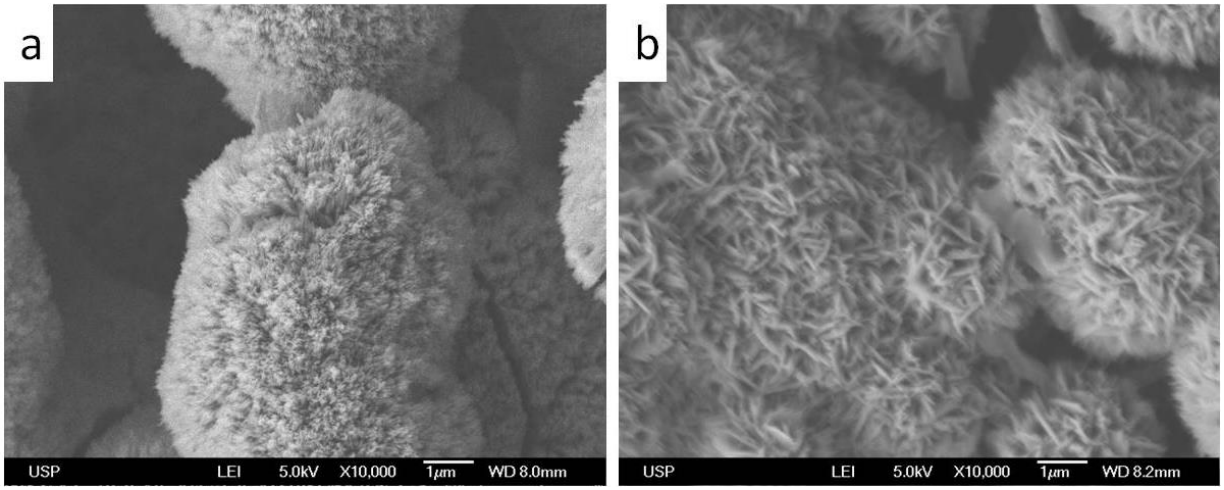


Figura 35 – Comparação do estágio de nucleação entre biocompósitos de PLLA/CaP-laurato após imersão em SBF por 28 dias: (a) HA_D e (b) OCP:HA (9:1). A apatita depositada apresentou morfologia flocular e na forma de placas para malhas contendo HA_D e OCP:HA (9:1), respectivamente.

Sabe-se que a formação de cristais de HA semelhantes aqueles encontrados em ossos, a partir de uma solução aquosa, pode ser descrita segundo o seguinte mecanismo: fosfato de cálcio amorfo (ACP) precipita e subsequentemente se transforma em apatita cristalina[115]. Este mecanismo é descrito como recorrente em mais de uma etapa. Na primeira etapa, a fase de fosfato de cálcio amorfo (ACP) se forma rapidamente nos estágios iniciais da reação[116]. A etapa seguinte corresponde à hidrólise do ACP levando a formação de uma fase intermediária, OCP, e é descrita na reação abaixo[31] :

$$3Ca_3(PO_4)_2.H_2O + 5H_2O + H_3O^+ \rightarrow Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4.5H_2O + Ca^{2+} + OH^- + H_2O$$

OCP tem sido considerado como fase precursora para a formação de HA; o OCP é cineticamente mais favorável do que a HA[117]; além disso, é uma fase metaestável e sua transformação a HA é termodinamicamente favorável, sendo espontânea e irreversível[76,108]. Esta transformação ocorre por hidrólise do OCP,

acompanhada pelo consumo de íons Ca^{2+} da solução ou do fluido biológico[93]. Este estágio tem sido interpretado como a hidrólise do OCP a HA e é descrito pelas reações abaixo :

$$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4.5H_2O + Ca^{2+} + OH^- + H_2O \rightarrow Ca_9(HPO_4)_2(PO_4)_4(OH)_2 + 4H_2O + H_3O^+$$

$$Ca_9(HPO_4)_2(PO_4)_4(OH)_2 + Ca^{2+} + OH^- + H_2O \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + H_2O + H_3O^+$$

Por essas razões, HA não é a única fase de fosfato de cálcio que pode se formar no ambiente fisiológico, sendo precedida pelas fases ACP, OCP e HA_D.

Embora os minerais de Ca-P tenham sido formados em todas as fibras de biocompósitos, apenas o substrato de PLLA/OCP-L promoveu uma precipitação de apatita mineral muito semelhante àquela encontrada no osso. Sabe-se que os biocompósitos contendo HA não são os mais adequados para induzir a precipitação de apatita, porque HA é a menos solúvel entre os fosfatos de cálcio biologicamente importantes. Pode-se supor que, de acordo com os nossos resultados anteriores do ensaio de degradação *in vitro*, a utilização de um fosfato de cálcio mais solúvel, como HA_D ou OCP, conduz ao aumento da concentração de íons cálcio e fosfato perto da superfície das fibras, criando um ambiente favorável para a formação de camadas de apatitas[111,114]. Os íons de cálcio provenientes das malhas eletrofiadas, quando dissolvidos, conduzem ao aumento do nível de supersaturação da apatita no fluido circundante. Uma vez formada uma primeira camada de HA óssea, ela cresce espontaneamente, consumindo íons cálcio e fosfato do fluido supersaturado. Com isso, a hidrofilicidade do material cria um sítio de nucleação; e uma elevada taxa de liberação de cálcio e fósforo pelo biomaterial, favorece o crescimento da camada de apatita. A camada crescente de apatita na superfície do material proporciona um ambiente ideal para as etapas posteriores da ligação entre o arcabouço e o tecido

vivo, as quais incluem colonização por osteoblastos (as células que fazem osso), seguido pela proliferação e diferenciação das células para formar um osso novo[1,12].

Conclui-se, com este experimento, que a HA não é o aditivo inorgânico mais eficiente no que diz respeito à deposição de apatita *in vitro*, por isso outros fosfatos de cálcio explorados nesta pesquisa passam a despertar interesse na utilização como biomateriais, tais como a hidroxiapatita deficiente em cálcio (HA_D), β-fosfato tricálcico (β-TCP) e fosfato octacálcico (OCP).

18 ENSAIO DE CULTURA CELULAR

18.1 Teste de Citotoxicidade

O teste para medir a viabilidade celular dos biomateriais eletrofiados de PLLA e PLLA/CaP-L foi realizado segundo a norma padrão internacional ISO 10993-5. O ensaio foi realizado em triplicata por material. A viabilidade celular em todas as amostras foi medida por ensaio de MTT e calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Viab. \%} = \frac{100 \times DO\ 570_{amostra}}{DO\ 570_{branco}}$$

onde, $DO570_{amotra}$ é o valor da densidade óptica medida a 570 nm dos cristais de formazan provenientes dos poços de células que foram cultivados com DMEM e retirados dos extratos das malhas eletrofiadas; e $DO570_{branco}$ é o valor da densidade óptica medida dos cristais de formazan procedentes dos poços de células que foram cultivados com DMEM fresco. Os resultados são apresentados na Figura 36.

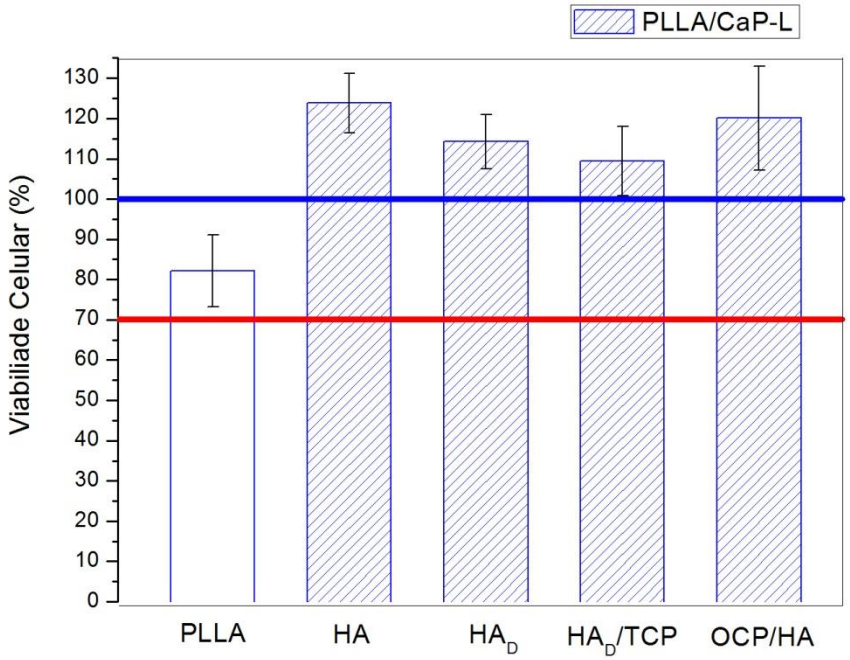


Figura 36 – Viabilidade celular das células de fibroblastos de camundongos NIH-3T3 nas malhas eletrofiadas de PLLA e PLLA/CaP-L. Valores foram calculados comparando-se com as medidas de absorbância do branco (100%; placa de poliestireno). Nenhuma amostra apresentou potencial citotóxico (valores abaixo de 70%).

Sabe-se da norma ISO10993-5 que se a viabilidade for reduzida para <70% (linha vermelha da Figura 36), a amostra apresenta potencial citotóxico. Pode-se observar que nenhum biomaterial analisado apresentou citotoxicidade. Amostras de PLLA puro apresentaram viabilidade celular aproximadamente de 80%. Amostras de biocompósitos de CaP funcionalizados com laurato apresentaram viabilidade celular acima de 100% (linha azul da Figura 36). Isso significa que além de não serem citotóxicos, os fosfatos de cálcio auxiliaram na proliferação celular. LAO et al.[102] também apresentaram resultados de viabilidade celular para fibras de PLGA/HA, entretanto não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre o controle PLGA e os compósitos de PLGA/HA. No estudo mencionado, a inclusão de HA nas fibras era de apenas 5% (m/m), talvez por isso não sendo possível avaliar um efeito

acentuado do fosfato de cálcio em comparação ao PLGA puro. No estudo presente, conseguiu-se alcançar uma quantidade de aproximadamente 35% (m/m) de CaP na matriz polimérica via funcionalização com laurato, dessa forma ficando ainda mais evidente a diferença dos biocompósitos de PLLA/CaP-L em comparação ao controle PLLA puro. Diferentemente do estudo citado acima, Sui et al.[50] mostraram que a viablidade celular de osteoblastos em meio contendo extrato de malhas PLLA/HA (concentração da apatita não informada pelos autores) foi maior do que a do meio com extrato de membrana de PLLA puro. Isto significa que o extrato de membrana híbrida de PLLA/HA contribuiu mais para aumentar a atividade da célula osteoblástica do que o extrato da membrana de PLLA. Entretanto, apesar do melhor desempenho da membrana híbrida se comparada ao PLLA puro, ambos os extratos inibiram o crescimento de células osteoblasticas. De forma contrária, no estudo presente, os fosfatos de cálcio, ao invés de inibirem, favoreceram a proliferação celular (viabilidade >100%).

18.2 Teste de Adesão e Proliferação Celular

O efeito da inclusão de fosfatos de cálcio na matriz de PLLA foi também investigado neste estudo em termos da sua capacidade para adesão e proliferação celular. O ensaio foi realizado em triplicata por biomaterial.

18.2.1 Células de fibroblastos de camundongos NIH-3T3

Fibroblastos de camundongos (NIH-3T3) foram semeados (2 x 10^4 células/poço para ensaio de adesão e 1x10^4 células/amostra para ensaio de proliferação) nas fibras de PLLA e PLLA/CaP-L. O número de células após 4 h

indicam a preferência de adesão no estágio inicial. Como visto na Figura 37, as malhas contendo CaP conseguiram aderir maior número de células se comparadas com as de PLLA puro ($p<0,05$), com exceção das malhas contendo OCP:HA, que, embora possuam médias numéricas maiores de células existentes do que as encontradas nas malhas de PLLA, não apresentam diferença significativa ($p>0,05$).

A proliferação celular foi observada em um período de 10 dias. A Figura 37 ilustra os comportamentos de proliferação celular. O número de células encontradas após 24 horas na malha eletrofiada de PLLA foi de $6X10^3$ células, valor que corresponde a 60% do valor inicial plaqueado. Por comparação, Lee J. et a[118]l encontrou um valor de ≈30% de aderência dos fibroblastos (NIH-3T3) após 24h das células terem sido semeadas em malhas eletrofiadas de poli(L-lactideo-co-capralactona) (PLCL) (50/50).

No primeiro dia de ensaio, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre o controle PLLA e os biocompósitos de PLLA/CaP-L. Todavia, a proliferação celular nos dias seguintes apresentou comportamento diferente: as malhas dos biocompósitos promoveram maior proliferação celular após 7 dias de ensaio do que as malhas de PLLA puro. Entretanto, não existe diferença significativa em termos de proliferação celular entre os biocompósitos contendo CaP. Só se pode afirmar que as malhas mais hidrofílicas (contendo CaP) proporcionaram melhor ambiente para proliferação celular do que a malha mais hidrofóbica de PLLA puro.

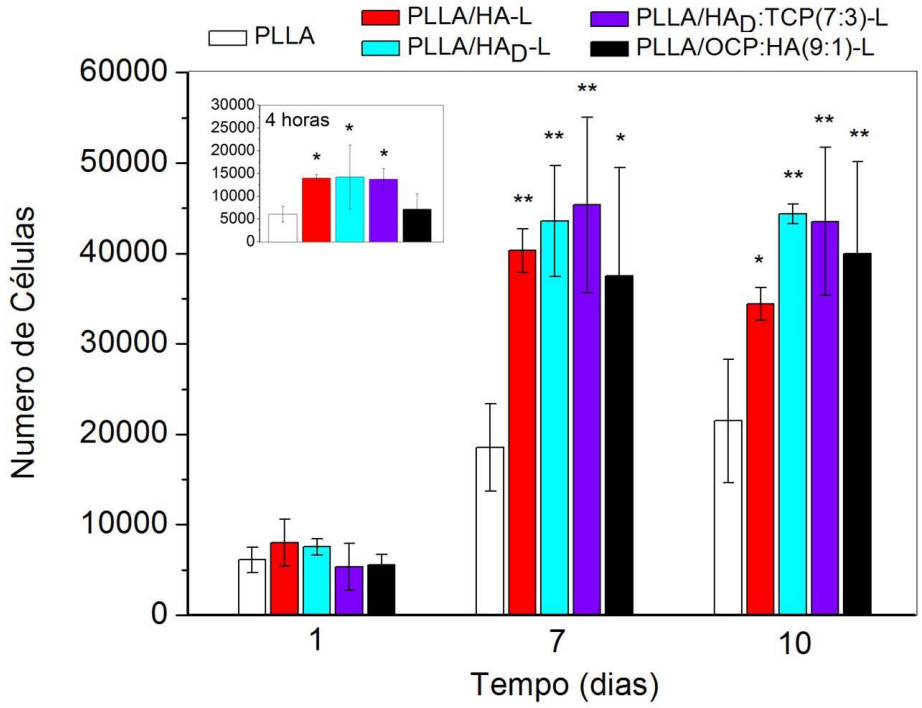


Figura 37 – Adesão e Proliferação das células de fibroblastos de camundongos NIH-3T3 nas malhas eletrofiadas de PLLA e PLLA/CaPs-L. ANOVA (teste de Fisher): Diferenças significativas em relação ao PLLA puro: * ($p<0,05$); ** ($p<0,01$); *** ($p<0,001$).

18.2.2 Células-tronco mesenquimais de dentes decíduos humanos (SHED)

SHED foram semeadas (5 x 10^4 células/poço) nas fibras de PLLA e PLLA/CaP-L. A Figura 38 mostra que não foi encontrada diferença significativa entre o PLLA puro e os biocompósitos ($p> 0,05$). Após 15 dias, embora a média numérica das células contadas nos biocompósitos PLLA/CaP-L seja maior do que a contabilizada nas malhas de PLLA puro, a diferença não é significativa ($p> 0,05$). Neste caso, substratos contendo CaP funcionalizados e malhas de PLLA puro proporcionaram o mesmo ritmo de proliferação celular.

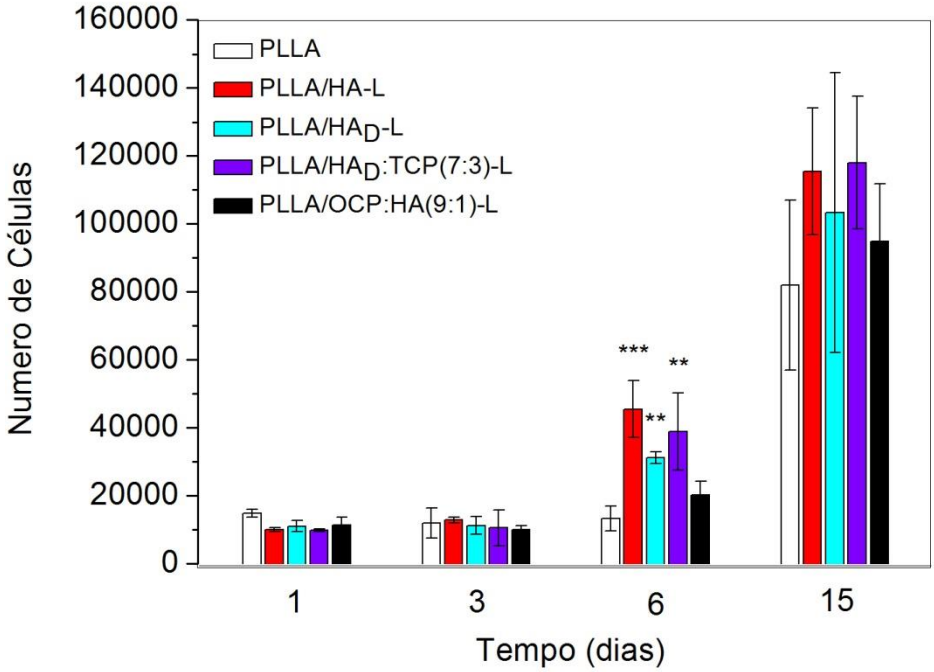


Figura 38 – Proliferação das células-tronco mesenquimais de dentes decíduos humanos (SHED) nas malhas eletrofiadas de PLLA e PLLA/CaP-L. ANOVA (teste de Fisher): Diferenças significativas em relação ao PLLA puro: * ($p<0,05$); ** ($p<0,01$); *** ($p<0,001$).

Alguns autores já relataram que os sistemas biocompósitos contendo HA são biomateriais promissores para a regeneração do tecido ósseo. Chuenjitkuntaworn et al.[51] demonstraram que malhas de PLLA/HAp 0,50% (m/v) apresentaram desempenho melhor para suportar a adesão e proliferação das células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 em comparação às malhas de PLLA puro. Em concordância, Sui et al.[50] também relataram maior capacidade de adesão e proliferação de células osteoblásticas MG-63 nas membranas híbrida de PLLA/HA. Em ambos os estudos, a HA utilizada não foi funcionalizada, resultando no aumento da hidrofilicidade desses bicompósitos em comparação àquelas de polímero puro. Desde a adesão inicial, as células semeadas foram capazes de reconhecer as diferentes energias de superfície desses materiais. Entretanto, Lao et al.[102] não encontraram diferença significativa da proliferação celular de osteoblastos nas

malhas de PLGA/HA em comparação ao controle, malha de PLGA, indicando que a incorporação de partículas de CaP não influenciou na proliferação de osteoblastos. Outros estudos ainda mostraram que compósitos de PLLA e PLGA com HA tiveram uma redução da proliferação celular quando comparadas com seus homólogos não mineralizados[113,119]. Entretanto, esses comportamentos distintos em todos os estudos mencionados acima podem ser justificados pelos diferentes tipos de células e meios de cultura, pela diferente porcentagem da fase mineral na matriz polimérica e, finalmente, pelos diferentes tipos de processamento na fabricação dos arcabouços.

18.3 Diferenciação Osteoblástica *In Vitro*

O efeito da inclusão de CaP de fosfato de cálcio na matriz de PLLA foi também investigado neste estudo em termos da sua capacidade para diferenciação osteoblástica. Utilizou-se duas linhagens diferentes de celulas: células pré-osteoblásticas derivadas de calvária de rato (MC3T3-E1) e células-tronco mesenquimais de dentes decíduos humanos (SHED). Células MC3T3-E1 possuem um processo de diferenciação osteoblástica já bem estabelecido[120]. Sendo assim, escolheu-se primeiro conduzir os ensaios de diferenciação com essa linhagem pré-osteoblástica para certificar que as malhas eletrofiadas desenvolvidas neste projeto não atrapalham a diferenciação ou maturação dos osteoblastos. Uma vez comprovado que as malhas não atrapalham os osteoblastos, fez-se os mesmos ensaios com as células-tronco mesenquimais de dentes decíduos humanos (SHED). Os ensaios foram realizados em quadruplicatas por biomaterial.

18.3.1 Ensaio de Atividade de Fosfatase Alcalina (ALP)

ALP é uma enzima secretada por osteoblastos e atua como um marcador osteogênico para estágios iniciais da diferenciação[121]. Como substrato utilizou-se um composto de *p*-nitrofenil-fosfato que, ao ser hidrolisado pela catálise da ALP, origina um produto, o *p*-nitrofenol, composto de coloração amarelada com uma absorção máxima em 405 nm (Figura 39). A atividade da ALP foi medida nos dias 10,14 e 21 como mostrado nas Figuras 40 e 41.

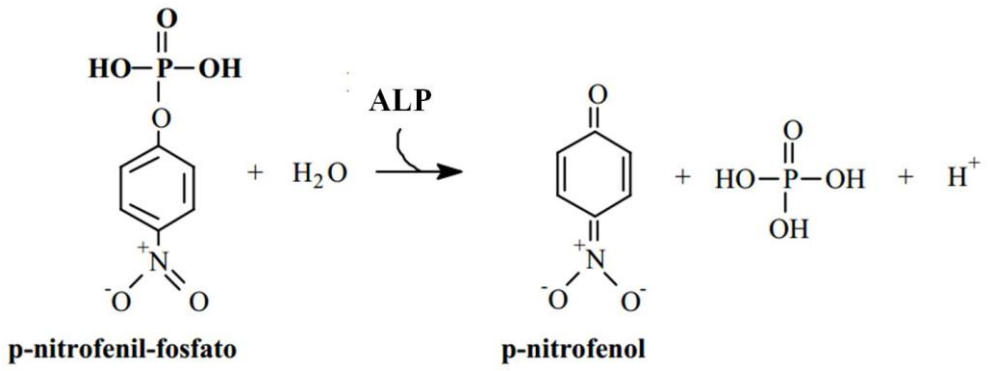


Figura 39 – Reaçao enzimática da ALP.

As células MC3T3-E1 cultivadas em todos os tipos de biomateriais secretaram ALP a partir do 10º dia de cultura. Como visto na Figura 40, no dia 10 do ensaio, a expressão de ALP foi significativamente maior em todos os biocompósitos de CaP-L do que nas malhas eletrofiadas de PLLA puro. No dia 14 de ensaio não foi não foi mais notada diferença significativa entre nenhum biomaterial. E, finalmente, no dia 21, os bicompósitos contendo HA e OCP:HA (9:1) foram os únicos a apresentarem estatisticamente maior atividade de ALP do que as malhas de PLLA puro (<0,01). E, de forma geral, para as células MC3T3-E1, o desempenho de PLLA/HA-L foi igual a PLLA/OCP:HA(9:1)-L, e suas médias numéricas da atividade da ALP foram maiores

em todos os dias de ensaio se comparadas com todos as demais biocompósitos, ainda que, em alguns casos, não sendo uma diferença significativa.

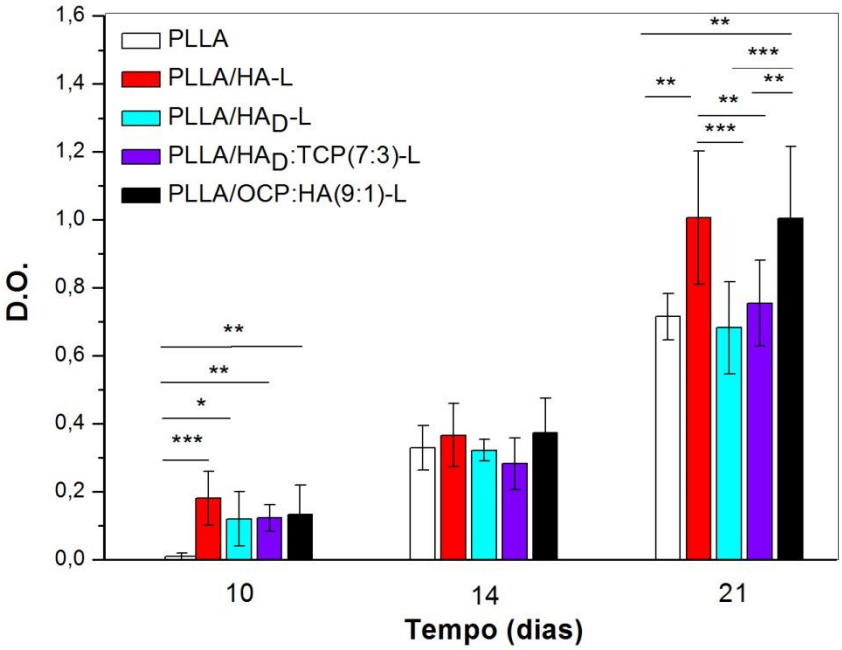


Figura 40 – Expressão de fosfatase alcalina nas malhas eletrofiadas de PLLA e PLLA/CaP-L utilizando MC3T3-E1. ANOVA (teste de Fisher): diferença significativa *($p<0,05$); **($p<0,01$); ***($p<0,001$).

Para as SHED (Figura 41), a expressão de ALP foi um pouco diferente. Nenhuma diferença significativa foi detectada entre o controle PLLA e as malhas contendo CaP-L em todos os dias de ensaio. Apesar disso, a média numérica da atividade de ALP foi maior para as malhas eletrofiadas de PLLA/HA-L durante todo o período de ensaio. Inclusive, no dia 21, a atividade de ALP dos suportes contendo HA foi significativamente maior em comparação com todas as demais fases de fosfato de cálcio.

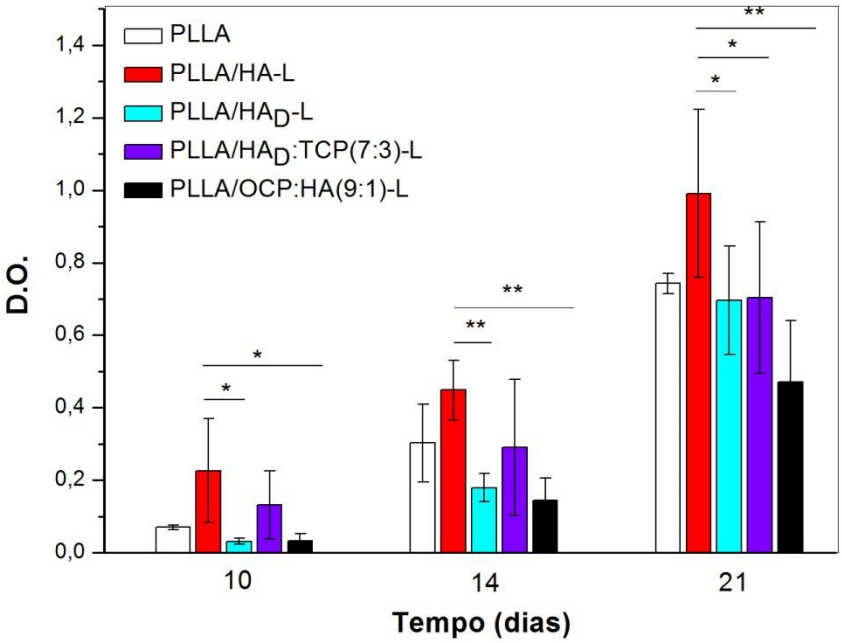


Figura 41 – Expressão de fosfatase alcalina nas malhas eletrofiadas de PLLA e PLLA/CaP-L utilizando SHED. ANOVA (teste de Fisher): diferença significativa *(p<0,05); **(p<0,01); ***(p<0,001).

A expressão de ALP mostrou que, em termos gerais, as fibras eletrofiadas de PLLA/HA-L promoveram maior diferenciação osteogênica *in vitro*. Este resultado é consistente com estudos anteriores que mostraram que compósitos contendo partículas de HA apresentaram maior atividade de ALP do que a matriz polimérica sem HA. Lao et al.[102] mostraram que a expressão de ALP de osteoblastos de MC3T3-E1 semeados em PLGA/HA foi significativamente maior do que nos suportes de PLGA puro durante os 14 dias de cultura. Ngiam et al.[113] também apresentaram resultados de expressão de ALP das células de osteoblasto fetal humano hFOB; concluíram que houve um aumento significativo em ALP nas malhas de PLGA/HA nos dias 4 e 7 de cultura quando comparado com os seus homólogos puros de PLGA. Em concordância, Kim et. al.[122] demonstraram que a atividade de ALP de osteoblastos cultivados em suportes compostos de PLGA/HA aumentou durante o

período de cultura de quatro semanas, enquanto que a atividade de ALP dos osteoblastos crescidos nos suportes de PLGA sem HA foi baixa e não apresentou alterações significativas durante o período de cultura. Tendo em conta estes resultados, nota-se que a HA tem uma influência positiva na atividade de ALP. Estudos realizados com outros tipos de fosfatos de cálcio demonstraram que estes não apresentaram a mesma ascendência na expressão de ALP. Schneider et al.[111] também realizaram testes com células mesenquimais humanas em substrato eletrofiado de PLGA/ATCP (fosfato de cálcio amorfo) 40% (m/m) e constatou que nenhuma diferença significativa foi observada na atividade de ALP após 4 semanas entre a malha de PLGA e PLGA/ATCP, embora PLGA puro tenha apresentado valor médio superior. Popp et al.[123] estudaram a atividade de ALP de células MC3T3-E1 cultivadas em compósitos de PLGA/ZnACP (fosfato de cálcio amorfo com zinco) e verificaram que, embora a ALP das células no PLGA/ZnACP foi significativamente elevada em relação ao controle PLGA no dia 7, nos dias seguintes de cultura não foi mais notada diferença significativa entre eles. Sendo assim, percebe-se que células cultivadas em fosfatos de cálcio, diferentes da HA, apresentam praticamente a mesma ascendência da atividade de ALP do polímero puro. No estudo presente, a única exceção ocorreu nos biocompósitos formados pelas fases OCP:HA(9-1) haja visto que as células MC3T3-E1 exibiram o mesmo desempenho em termos de expressão de ALP tanto nas malhas de PLLA/OCP:HA(9:1)-L quanto nas de PLLA/HA-L. Apesar das diferenças encontradas nos diferentes substratos de fosfatos de cálcio, sabe-se que a ALP por si só não é um marcador definitivo para avaliar a formação óssea, trata-se apenas de um marcador inicial da diferenciação osteoblástica[121,124].

18.3.2 Ensaio de Coloração com Vermelho de Alisarina (ARS)

A mineralização é conhecida por ocorrer em fases posteriores da diferenciação osteoblástica[121]. A coloração com vermelho de alisarina (ARS) foi utilizada para caracterizar as mineralizações das SHED e MC3T3-E1 que foram cultivadas nas malhas eletrofiadas de PLLA e PLLA/CaP-L por 21 dias. O corante vermelho de alizarina se liga aos sais de cálcio seletivamente e é amplamente utilizado para quantificação da mineralização[73,86,112].

A Figura 42 apresenta imagens fotográficas representativas de ARS de MC3T3-E1 cultivadas nas diferentes malhas nos dias 14 e 21 de ensaio. Pode-se observar que a coloração vermelha, resultado do produto corante na presença de cálcio, é mais intensa nas malhas contendo fosfatos de cálcio, indicando uma melhor mineralização da matriz pelas culturas de células nesses compósitos do que em relação ao PLLA puro. Para quantificar essa mineralização, os nódulos ósseos foram dessorvidos usando 10 % de cloreto de cetilpiridínio (Figura 43) e a absorbância da solução foi medida em 570 nm. A quantificação da mineralização foi feita subtraindo-se o valor da absorbância do branco (malhas eletrofiadas sem células que foram submetidas às mesmas condições de cultura e igualmente coradas por ARS)[87]. Conforme mostrado na Figura 44, malhas eletrofiadas PLLA/HA_D-L e PLLA/OCP:HA (9:1)-L apresentaram maiores deposições de cálcio em comparação com os demais biocompósitos de fosfatos de cálcio.

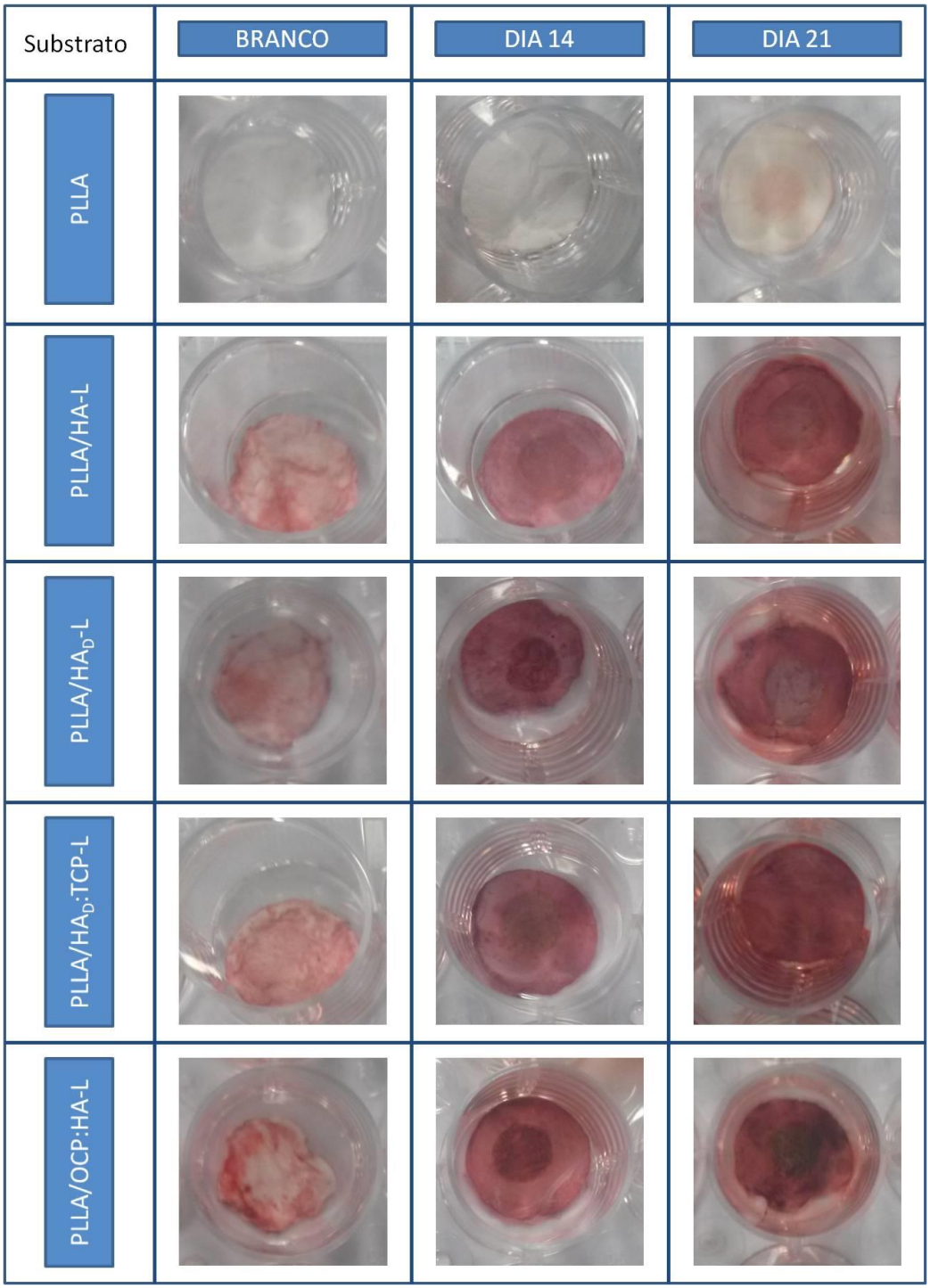


Figura 42 – Imagens fotográficas representativas de amostras coradas por vermelho de alizarina para avaliação de mineralização de malhas de PLLA e PLLA/CaP-L após o cultivo de MC3T3-E1 em suas superfícies nos dias 14 e 21 de ensaio. Branco se refere a amostras sem células que foram submetidas às mesmas condições de cultura.

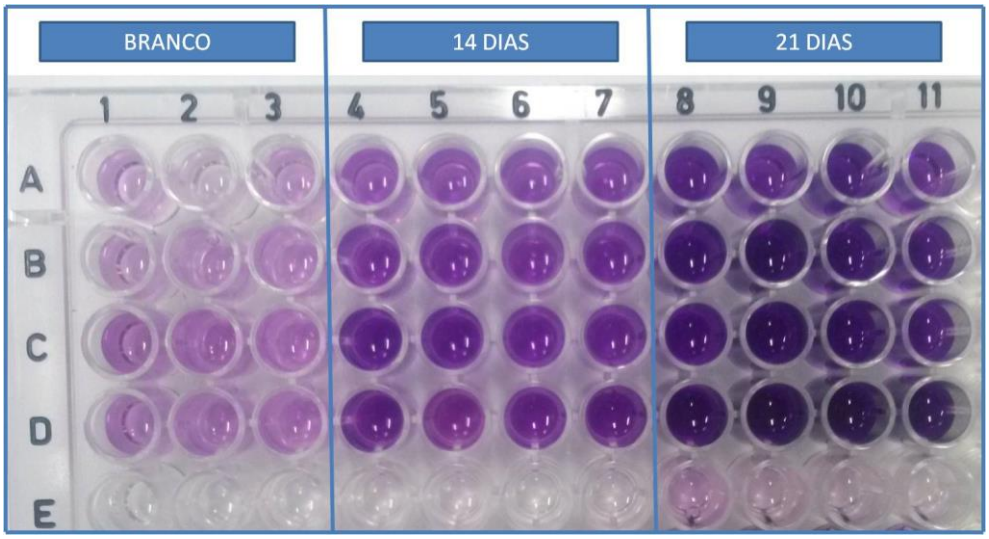


Figura 43 – Mineralização dessorvida em cloreto de cetilpiridínio. Legenda: 1 a 3 = BRANCO, 4 a 7 = Dia 14 do Ensaio, 8 a 11 = Dia 21 do Ensaio, A = PLLA/HA-L, B = PLLA/HA_D-L, C = PLLA/HA_D:TCP (7:3)-L, D = PLLA/OCP:HA (7:3)-L, E = PLLA.

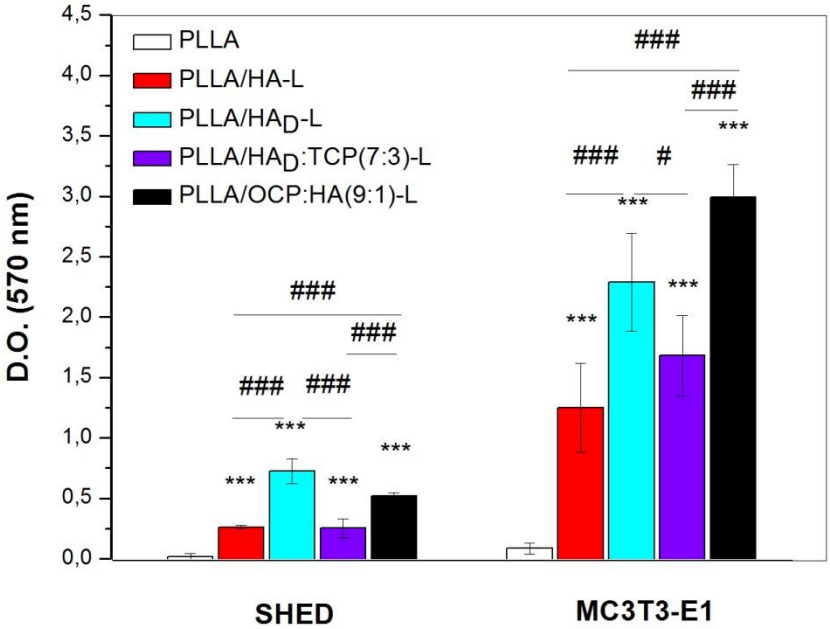


Figura 44 – Quantificação por vermelho de alizarina (ARS) da mineralização do dia 21 de cultura das SHED e MC3T3-E1. Diferença significativa em relação ao PLLA: * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$). Diferença significativa em relação aos biocompósitos de CaP: # ($p < 0,05$); ## ($p < 0,01$); ### ($p < 0,001$).

Estudos anteriores já mostraram que a inclusão de HA aumenta a mineralização nos suportes poliméricos[87,122,125]. No presente estudo, o resultado não foi diferente. Mas, assim como no ensaio de mineralização na solução de SBF, PLLA/HA_D-L e PLLA/OCP:HA (9:1)-L apresentaram melhor capacidade de deposição de cálcio em comparação com PLLA/HA-L. Em ambos os experimentos, isto pode ser atribuído às propriedades do substrato, isto é, a HA_D e OCP são mais solúveis do que a HA *in vitro*. De fato, sabe-se da literatura que a resposta celular não depende apenas da composição química, mas também da solubilidade e cristalinidade dos substratos de CaP[126,127]. Guo et al.[114] investigaram a formação de apatitas em substratos de HA e α-TCP (alfa-fosfato tricálcico), como resultado de suas incubações com cultura de células de mioblastos de rato (C2C12). Foi observado que α-TCP promoveu a melhor mineralização em comparação com a HA devido às quantidades de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} liberados no ambiente fisiológico (α-TCP é mais solúvel do que HA). De fato, a mais importante propriedade dos fosfatos de cálcio é provavelmente sua solubilidade em água, pois o seu comportamento *in vivo* pode ser predito em grande parte pela sua solubilidade[36]. A taxa de degradação *in vivo* de fosfatos de cálcio pode ser prevista na ordem de (em pH 7,0): α-TCP > DCPD > DCP > OCP > β-TCP > HA . Estudos mostram que, utilizando-se fases mais solúveis do que a HA, como BCP (fosfato de cálcio bifásico) por exemplo, aumenta-se a supersaturação de íons cálcio e fosfato no microambiente aumentando a mineralização[27]. Yamada S. et al.[128] estudaram a influência da solubilidade cerâmica de fosfato de cálcio na reabsorção osteoclástica. Células de osso de coelho neonatal foram cultivadas durante 2 dias em hidroxiapatita (HA), β-fosfato tricálcico (β-TCP) e dois tipos de fosfato de cálcio bifásico (BCP) com razão HA / β-TCP de 25/75 e 75/25. Os osteoclastos não reabsorveram na cerâmica de BCP

75/25 ou HA pura. Eles concluíram, então, que a extensão da reabsorção osteoclástica das cerâmicas de fosfato de cálcio pode, até certo ponto, ser proporcional à solubilidade destes. Sendo assim, no estudo presente, o potencial de formação de mineralização nos biocompósitos contendo HA_D e OCP (9:1) é devido à maior liberação de íons de cálcio e de fosfato, os quais são favoráveis para a formação da camada de apatita.

19 ENSAIO *IN VIVO*

O teste *in vivo* foi conduzido através de incisões feitas no dorso, subcutâneamente, de camundongos Balb/c Nude. Biomateriais de PLLA e PLLA/CaP-L associadas a SHED foram colocados nos bolsos subcutâneos, conforme mostra a Figura 45. Malhas eletrofiadas de PLLA e PLLA/CaP-L sem SHED também foram implantadas no dorso dos camundongos como controle. As amostras dos implantes subcutâneos foram coletadas, fixadas e preparadas adequadamente para análise por microscopia de luz, em cortes em parafina. Foi utilizada a coloração por hetoxilina e eosina para a visualização das estruturas.

As SHED foram escolhidas pois possuem elevado potencial de diferenciação e similaridade com células osteoprogenitoras[86]. Esse tipo celular já foi utilizado por outros pesquisadores para reparar defeitos cranianos e reconstruir osso trabecular em camundongos[129,130]. De fato, os biomateriais de última geração estão sendo projetados para estimular respostas celulares específicas ao nível molecular. Como estratégia, células tronco mesenquimais (MSCs), tais como as SHED, tem sido semeadas em arcabouços reabsorvíveis, dessa forma, as células crescem fora do corpo e se diferenciam[12]. MSCs são uma população heterogênea de células

progenitoras pluripotentes que são capazes de se diferenciar em osteoblastos, condrócitos, adipócitos, miócitos, cardiomiócitos, fibroblastos, miofibroblastos, células epiteliais e neurônios[121]. Esse conjunto "arcabouço + MSCs pré-diferenciadas" é, então, implantado nos pacientes para substituir os tecidos doentes ou danificados[12]. Com o tempo, os arcabouços são reabsorvidos e substituídos por tecidos hospedeiros.

Figura 45 – Quatro incisões de aproximadamente 0,5 cm foram feitas no dorso de camundongos Balb/c Nude em regiões diferentes (dois bolsos subcutâneos foram criados em cada lado da coluna). Um disco de biomaterial foi inserido em cada bolso.

Da literatura, sabe-se que os fosfatos de cálcio são materiais osteoindutivos[131]. Um material osteoindutivo é definido por sua capacidade de formar osso em um defeito não ósseo onde o osso não cresceria naturalmente. A capacidade de um enxerto ósseo induzir nova formação óssea em um defeito intraósseo não reflete totalmente o seu verdadeiro potencial osteoindutivo[121]. Existem duas maneiras de testar a osteoindução *in vivo*. Um é implantar por via subcutânea e o outro é implantar em defeitos intramusculares[88,121]. A implantação subcutânea é a mais simples de todos os modelos experimentais de formação óssea

ectópica. O osso ectópico, da palavra grega ektopos ou "longe de um lugar", refere-se à ossificação fora do tecido ósseo.

Nas últimas décadas, um grande número de publicações ilustrou a osteoindução por diversos biomateriais de fosfatos de cálcio[132,133,134,135,136,137]. Compósitos constituídos por PLA e HA também demonstraram ser capazes de induzir a formação óssea heterotópicamente[138,139]. O maior número de estudos foi realizado com implantes constituídos por HA, (α- ou β-) TCP, e as misturas dos dois, BCP[131]. Com base nos conhecimentos atuais, sugere-se que um aumento na velocidade de degradação *in vivo* de materiais de fosfato de cálcio, em geral, seja benéfico para a osteoindução[140]. Além disso, a geometria e as propriedades macroestruturais do arcabouço têm demonstrado desempenhar um papel importante. No caso da macroestrutura, o exemplo mais marcante é a importância da porosidade. A importância dos poros dentro dos arcabouços está relacionada à invasão do material pelos vasos sanguíneos, que trazem nutrientes e oxigênio, sustentando, portanto, o metabolismo das células dentro do suporte[141]. Yamasaki e Sakai[133] estudaram a osteocondutividade da HA *in vivo*. Eles constataram que a formação de osso não foi observada em uma cerâmica de HA densa, enquanto que uma cerâmica com a mesma composição química, mas contendo poros, induziu formação óssea.

Com base no que foi exposto anteriormente, sabe-se que os biomateriais compósitos testados no trabalho presente apresentam requisitos para promover osteogênese: fosfatos de cálcio (incluindo fases com solubilidade maiores do que as da HA), porosidade e incorporação das SHED pré-diferenciadas. Entretanto, apesar das SHED possuirem a habilidade de formar osso em ambientes osteogênicos, em tecidos não ósseos, geralmente necessitam de fatores de crescimento, tais como as

proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), especialmente BMP2[88]. Além disso, a incidência de formação óssea heterotópica, induzida por cerâmicas de fosfatos de cálcio também necessitam estar associadas a BMPs. Por exemplo, Park et al.[142] testaram a osteoindução de BCP na formação de osso ectópico em ratos; a formação de osso apenas foi observada com a combinação do BCP com BMP2.

Ainda assim, no estudo presente, testou-se o potencial osteoindutivo dos fosfatos de cálcio funcionalizados sem a combinação com as BMPs, mesmo estando sujeito de que a ausência de tais proteínas prejudicaria a formação óssea ectópica. Optou-se por essa via, pois do contrário as BMPs, por serem estimuladoras da ossificação, poderiam encobrir o potencial osteoinduindutivo dos CaP-L. De fato, a análise histológica (Figuras 46 – 50) revelou não ter não ter sido observado neoformação óssea em nenhum dos biomateriais testados; entretanto, outras observações importantes a respeito dos arcabouçous puderem ser tomadas.

Em primeiro, a análise histológica revelou que não havia qualquer sinal de necrose na região coletada, mas vale ressaltar que houve resposta imune e inflamatória aos implantes, identificada com a presença de células gigantes de corpo estranho, células de Langenhans e leucócitos, em alguns casos. O encapsulamento dos implantes é comum à todas as amostras, sejam os controles (materiais implantados sem SHED) ou biomateriais com células pré-diferenciadas. O encapsulamento é determinado pela presença de tecido conjuntivo denso modelado circundando as amostras.

Nas amostras de PLLA puro (Figura 46) observou-se vascularização presente na porção média da amostra; entretanto, não há ossificação. Há células gigantes e porções de PLLA não fagocitado ou celularizado, principalmente no controle.

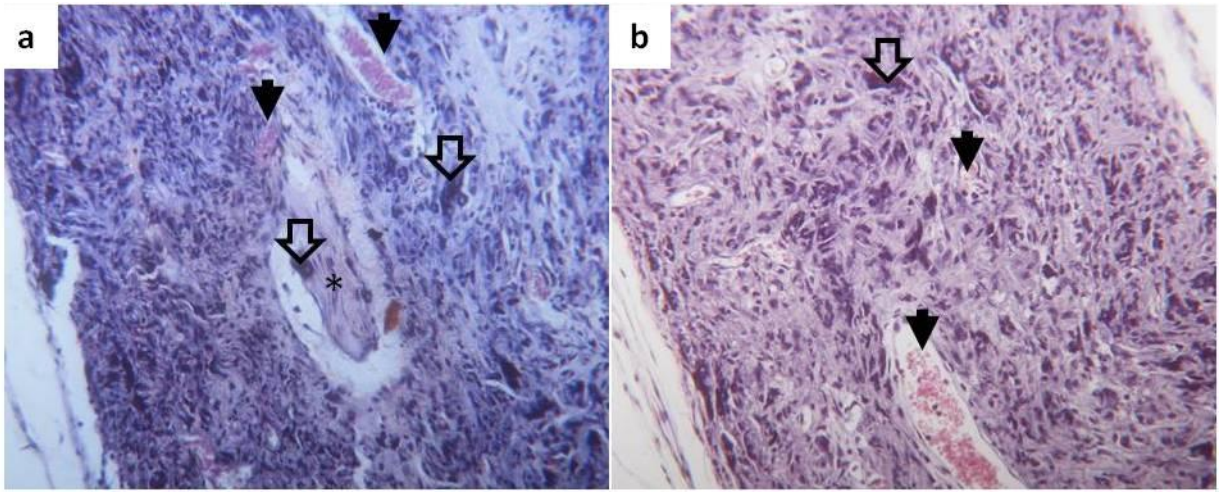


Figura 46 – Fotomicrografias representativas das amostras de PLLA implantadas no compartimento subcutâneo de camundongos, retiradas após 60 dias do implante *in vivo*: (a) PLLA controle (sem células) e (b) SHED pré-diferenciadas transplantadas dentro de um bloco de PLLA. Vasos sanguíneos = cabeça de seta, células de Langerhans = seta vazia e material não celularizado = *. (Coloração de hematoxilina e eosina, × 200).

Tanto nas amostras de PLLA/HA-L quanto nas de PLLA/HA_D-L (Figuras 47 e 48), observa-se o predomínio de infiltrado inflamatório nas amostras de controle. E, como esperado pela ausência das BMPs, não há neoformação óssea em controles ou amostras com SHED pré-diferenciadas, apesar de serem vascularizadas. Observou-se ainda tecido conjuntivo circundando os implantes e áreas de tecido conjuntivo denso (fibrose). Entende-se por tecido conjuntivo o tecido de preenchimento que contém células tais como fibroblastos, macrófagos e mastócitos e fibras (colágenas, elásticas ou reticulares). São raras as células gigantes de corpo estranho.

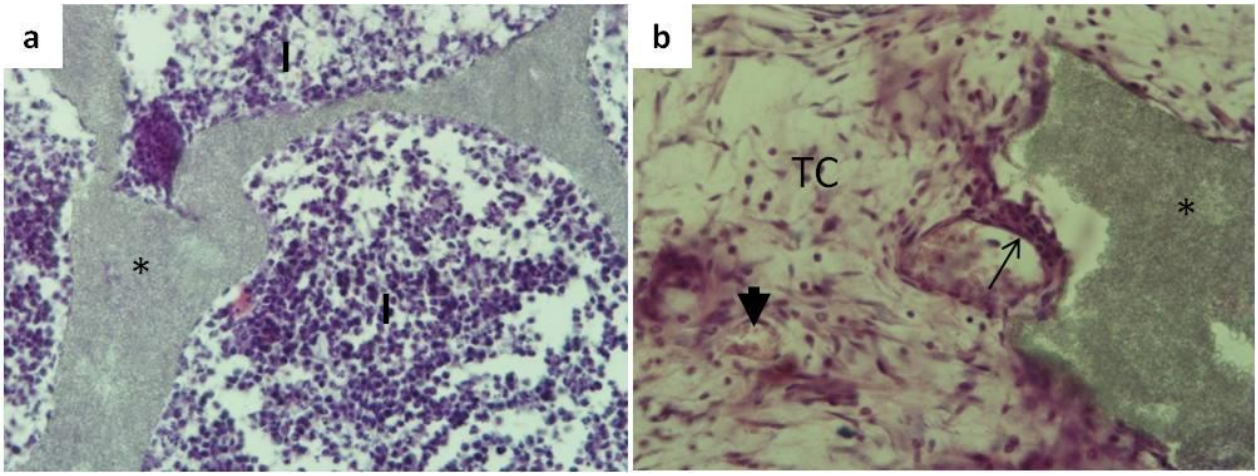


Figura 47 – Fotomicrografias representativas das amostras de PLLA/HA-L implantadas no compartimento subcutâneo de camundongos, retiradas após 60 dias do implante *in vivo*: (a) PLLA/HA-L controle (sem células) e (b) SHED pré-diferenciadas transplantadas dentro de um bloco de PLLA/HA-L. Vasos sanguíneos = cabeça de seta, células gigantes de corpo estranho = seta aberta, tecido conjuntivo = TC, infiltrado inflamatório = I e material não celularizado = *. (Coloração de hematoxilina e eosina, × 200).

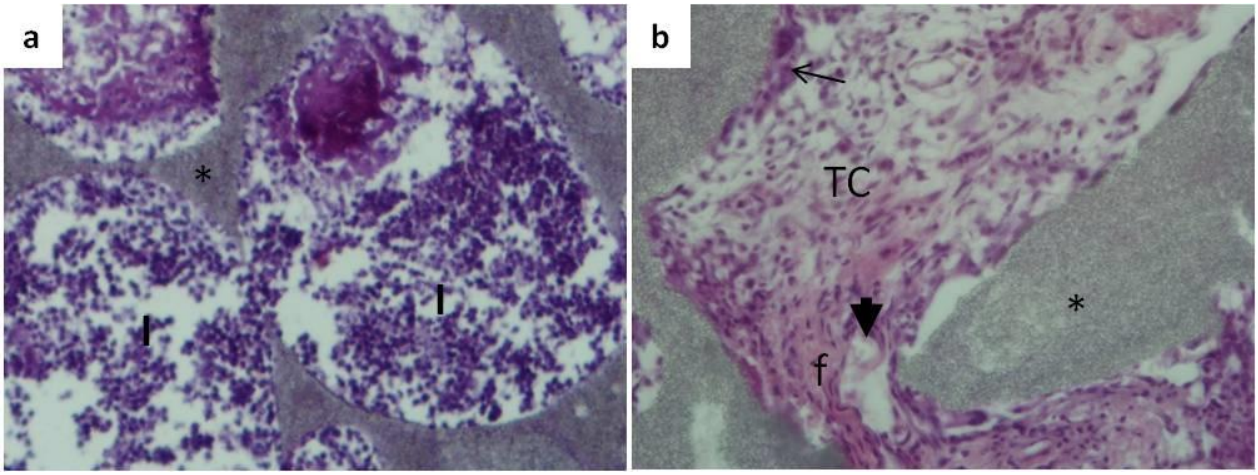


Figura 48 – Fotomicrografias representativas das amostras de PLLA/HA_D-L implantadas no compartimento subcutâneo de camundongos, retiradas após 60 dias do implante *in vivo*: (a) PLLA/HA_D-L controle (sem células) e (b) SHED pré-diferenciadas transplantadas dentro de um bloco de PLLA/HA_D-L. Vasos sanguíneos = cabeça de seta, células gigantes de corpo estranho = seta aberta, tecido conjuntivo = TC, tecido conjuntivo denso (fibrose) = f, infiltrado inflamatório = I e material não celularizado = *. (Coloração de hematoxilina e eosina, × 200).

Biomateriais que continham as fases conjuntas de HA_D:β-TCP (7:3) (Figura 49) apresentam vasos calibrosos na periferia, próximos ao envelope de tecido conjuntivo denso que forma a cápsula. Observou-se ainda que não há sinal de necrose ou inflamação crônica, tanto nas amostras controle como naquelas com SEHD. Entretanto, há células de Langerhans, o que indica uma reação imune local e possível fagocitose do material. Não há formação óssea. Não há fibrose circundando os materiais, mas sim tecido conjuntivo distribuído por todo o implante.

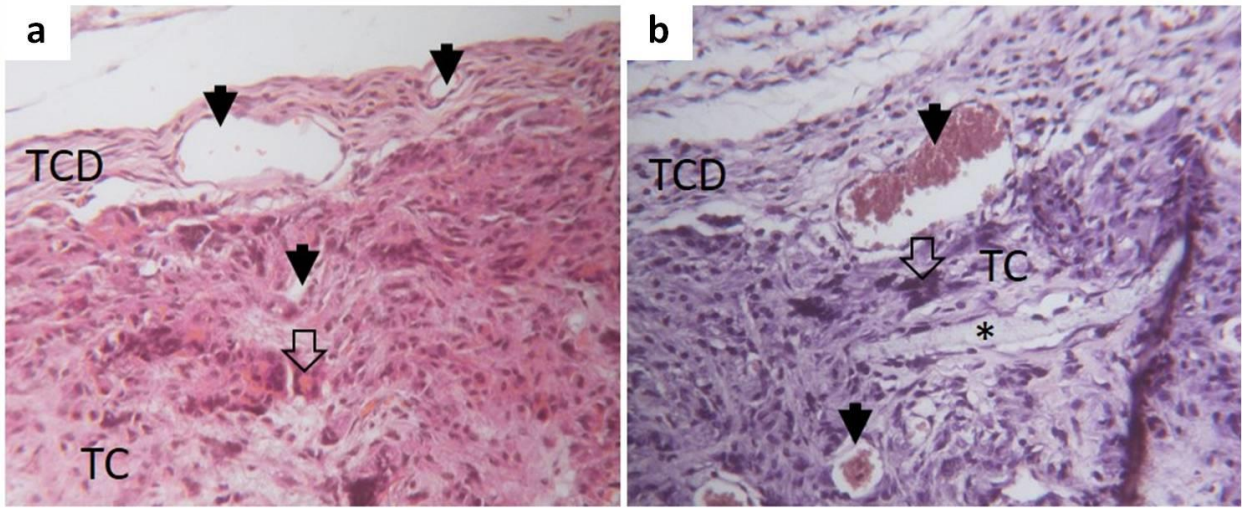


Figura 49 – Fotomicrografias representativas das amostras de PLLA/HA_D:β-TCP-L implantadas no compartimento subcutâneo de camundongos, retiradas após 60 dias do implante *in vivo*: (a) PLLA/HA_D:β-TCP-L controle (sem células) e (b) SHED pré-diferenciadas transplantadas dentro de um bloco de PLLA/HA_D:β-TCP-L. Vasos sanguíneos = cabeça de seta, células de Langerhans = seta vazia, tecido conjuntivo = TC, tecido conjuntivo denso = TCD e material não celularizado = *. (Coloração de hematoxilina e eosina, × 200).

Assim como nos grupos analisados anteriormente, materiais de PLLA/OCP-L, tanto o controle ou aqueles combinados com SHED diferenciadas em pré-osteoblastos, não apresentaram formação óssea (Figura 50). Entretanto, são

observados vasos por toda a amostra e tecido conjuntivo frouxo. São também observadas ilhas de material não celularizado. Outra característica comum é a presença de células de Langerhans, assim como a presença de células residentes do conjuntivo (fibroblasto, macrófagos e mastócitos) e células transientes (leucócitos).

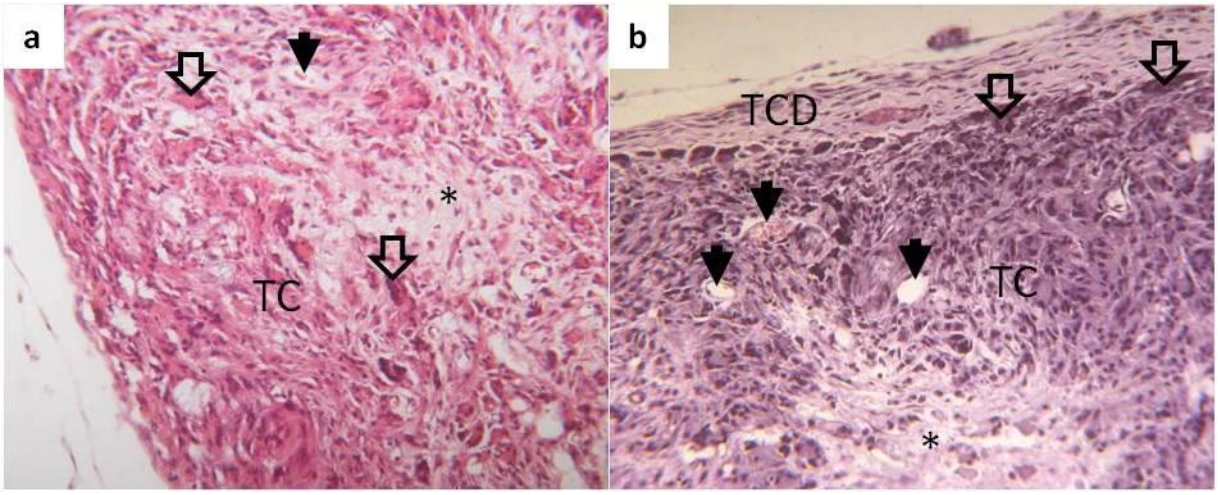


Figura 50 – Fotomicrografias representativas das amostras de PLLA/OCP-L implantadas no compartimento subcutâneo de camundongos, retiradas após 60 dias do implante *in vivo*: (a) PLLA/OCP-L controle (sem células) e (b) SHED pré-diferenciadas transplantadas dentro de um bloco de PLLA/OCP-L. Vasos sanguíneos = cabeça de seta, células de Langerhans = seta vazia, tecido conjuntivo = TC, tecido conjuntivo denso = TCD e material não celularizado = *. (Coloração de hematoxilina e eosina, × 200).

Conforme exposto anteriormente, o fato de não ter sido observado neoformação óssea em nenhum dos biomateriais testados, pode não estar diretamente relacionado às propriedades dos materiais, mas sim com a ausência das BMPs. Uma outra possível razão da não formação óssea talvez seja o modelo animal escolhido. Em vários estudos, os resultados na formação óssea demonstraram depender do modelo animal[131]. Yang et al.[143] testaram o

desempenho da cerâmica BCP em cinco modelos animais diferentes em locais heterotópicos, em um único estudo. Até o dia 120, em ratos, coelhos e cabras, observou-se apenas tecido conjuntivo fibroso denso que encapsulava cerâmica e tecido conjuntivo solto dentro dos poros - sem sinais de formação óssea. No entanto, em cães e porcos, a formação óssea foi encontrada em 45 dias após a implantação. Este estudo mostrou que os animais maiores produziram osso, com exceção da cabra onde não se observou formação óssea. Yuan et al.[144] também constataram a mesma coisa ao analisarem implantes de BCP porosos implantados intramuscularmente após 90 dias de ensaio *in vivo*: formação de osso utilizando cachorro como modelo animal, porém não observaram formação óssea quando o modelo animal era rato. A incidência de modelos animais na experimentação de fosfatos de cálcio, com base na literatura, é como se segue: há poucos estudos envoveldo camundongos, ratos e coelhos, enquanto a maioria dos estudos foi realizada em cabras e cães[131]. Este cenário difere dos estudos feitos para testar o potencial osteoindutivo das proteínas morfogenéticas óssea (BMPs), as quais são principalmente realizadas em ratos, camundongos e coelhos[131]. Com isso, constata-se que a incidência de formação óssea heterotópica, induzida por cerâmicas de fosfatos de cálcio é maior em animais grandes em comparação com pequenos - a não ser que estejam associadas a BMPs[142], o que não é o caso no presente trabalho.

Entretanto, através do ensaio *in vivo*, comprovou-se que foi formada uma matriz com potencial osteogêncio, pois os arcabouçous permitiram a infiltração celular e invasão vascular. Foi notável o fato de todos os biomaterias testatos promoverem a neo-vascularização, o que é benéfico para grandes construções de engenharia de tecidos. Os vasos sanguíneos podem ter a função de levar as células

com a capacidade de se diferenciar em osteoblastos. Sendo assim, um pré-requisito para a osteogênese[141].

Vale ressaltar que os biomateriais produzidos no estudo corrente apresentaram excelente desempenho *in vitro*: ausencia de citotoxicidade, capacidade de aderência, proliferação e, principalmente, diferenciação celular.

Com isso, é possível que a realização de um novo teste *in vivo* através de um defeito intra-ósseo seja mais viável para se conhecer o potencial osteogênico dos arcabouços produzidos no trabalho presente. Além disso, caso se opte em comprovar que a matriz formada possui fatores osteoindutivos, que recruta e induz células mesenquimais para se diferenciarem em células ósseas, sugere-se a troca do modelo animal, de outra forma, teria que ser feito em associação com as BMPs.

Conclusões

21 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho de pesquisa, é possível concluir que a utilização do método por via úmida possibilitou a obtenção das diferentes fases de fosfatos de cálcio de interesse biológico na forma de pó [HA_D e OCP:HA (9:1)], de partículas de tamanhos submicrométricos, os quais foram, posteriormente, funcionalizados em sua superfície com laurato. As partículas CaP-laurato foram mais uniformemente dispersas em clorofórmio do que as não funcionalizadas, provando a maior capacidade de dispersão destas partículas altamente hidrofílicas em ambientes hidrofóbicos. Por essa razão, foi possível a formação de suportes para crescimento celular eletrofiados, com uma distribuição homogênea dos CaP de até 40% (m/m), em uma matriz de PLLA sem fragilizar as propriedades mecânicas do material.

Os experimentos de degradação *in vitro* mostraram que quantidades de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} liberados na solução de PBS foram maiores para os substratos contendo as fases HA_D e OCP:HA (9:1). Essas maiores velocidades de degradação, em comparação com os suportes contendo HA, influenciaram positivamente a bioatividade (associada à formação de uma camada de apatita em superfícies *in vitro*) e a diferenciação osteogênica das células SHED e MC3T3-E1 em termos de mineralização de matriz. Nos primeiros 21 dias de ensaio de degradação, suportes contendo HA_D:β-TCP (7:3), apresentaram valores de degradação superiores aqueles contendo HA, porém inferiores aqueles contendo HA_D e OCP:HA (9:1); por essa

razão, apresentaram comportamento intermediário, ou seja, satisfatória bioatividade em SBF, com um estágio mais avançado da nucleação do revestimento em comparação aos biocompósitos contendo HA; entretanto a diferenciação osteogênica das células SHED e MC3T3-E1 foram inferiores aos suportes contendo HA_D e OCP:HA (9:1).

Além disso, os resultados deste trabalho mostram que os biocompósitos de PLLA contendo alto teor de CaP funcionalizados não são apenas atóxicos, mas podem promover a adesão e proliferação celular, e favorecem a neo-vascularização em experimentos *in vivo.*

Com isso, os objetivos do estudo corrente foram alcançados: (i) foram fabricados arcabouçous eletrofiados com alto teor de aditivos inorgânicos, sem o comprometimento das propriedades mecânicas; (ii) foram produzidos compósitos de CaP contendo as fases de HA_D, HA_D:β-TCP e OCP e suas propriedades foram comparadas com aqueles contendo HA, a qual já é amplamente estudada e utilizada; (iii) comprovou-se que biocompósitos de PLLA/OCP:HA(9:1)-L e PLLA/HA_D-L se mostraram mais interessantes para serem usados como suportes biomiméticos para a regeneração óssea do que o paralelo PLLA/HA-L, pois são mais solúveis e, dessa forma, possibilitam que mais minerias sejam ofertados aos osteoclastos reabsorverem e (iv) os biocompósitos produzidos apresentaram uma rede de poros interconectados, permitindo a neo-vascularização *in vivo*.

22 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O reparo de defeitos ósseos resultantes de doenças ou traumas continua a ser um desafio para a engenharia de tecido ósseo. Os arcabouçous de fosfato de cálcio (CaP) estão entre os mais estudados para esta aplicação. No entanto, os

CaPs são demasiadamente frageis para serem utilizados em tais defeitos e, portanto, são limitados a aplicações que não requerem considerável solicitações mecânicas. Entretanto, o trabalho presente possibilitou uma inclusão considerável dos CaPs em uma matriz polimérica de PLLA sem fragilizar o arcabouço

Existem várias características que são consideradas essenciais para os arcabouços ósseos, como biocompatibilidade, bioatividade, osteocondutividade e porosidade interconectada. Outras considerações incluem biodegradabilidade, permeabilidade e integridade mecânica. A maioria dessas características estão presentes nos arcabouçous de CaP-L produzidos neste trabalho. Sendo assim, formou-se uma matriz promissora para ser utilizada na engenharia de tecidos ósseos.

Levando em conta que as propriedades do arcabouço devem ser semelhantes às do osso natural[146], os biomateriais fabricados neste projeto de pesquisa possuem propriedades mecânicas, tais como módulo de elasticidade e resistência à tração, mais próximas as do osso trabecular (osso esponjoso)[42]. Além das propriedades mecânicas, outra semelhança com o osso trabecular é a porosidade do material. Sabe-se que a porosidade do osso trabecular varia entre 30 a 90%, enquanto que a do osso cortical de 5 a 13%[42].

Os arcabouços de CaP-L destinam-se para auxiliar no crescimento de pequenos defeitos ósseos, tais como ossos da face, mandíbula, carpo, metacarpo entre outros.

Referências

[1] HENCH, L. L. Biomaterials. *Science*, v. 208, p. 826-831, 1980.

[2] OREFICE, R. L. *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações*. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. 538 p.

[3] LIDGREN, L. The bone and joint decade 2000–2010. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 81, p. 629, 2003.

[4] WEINSTEIN, S. L. 2000–2010: the bone and joint decade. *Journal of Bone & Joint Surgery*, v. 82, p. 1-3, 2000.

[5] LIU, Y. Biomimetic coatings for bone tissue engineering of critical-sized defects. *Journal of The Royal Society Interface*,v. 7, p. S631-47, 2010.

[6] HENCH, L. L. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*, v.19, p. 1419-1423, 1998.

[7] CARSON, J. S.; BOSTROM, M. P. Synthetic bone scaffolds and fracture repair. *Injury*, v. 38, p. S33-37, 2007.

[8] BORGHOUTS, J. M.; OTTO, A. J. Silicone sheet and bead implants to correct the deformities of inadequately healed orbital fractures. *British Journal of Plastic Surgery*, v. 31, p. 254-258, 1978.

[9] WILLIAMS, D. F. *Definitions in biomaterials*. Amsterdam: Elsevier; 1987, 72 p.

[10] WILLIAMS, D. F. *The Williams dictionary of biomaterials*. Liverpool: Liverpool University Press, 1999, 343 p.

[11] WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. *Biomaterials*, v. 30, p. 5897-5909, 2009.

[12] HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Third-Generation Biomedical Materials - Larry L. *Science*, v. 295, p. 1014-1017, 2002.

[13] CAO, W.; HENCH, L. L. Bioactive Materials. *Ceramics International*, v. 22, p. 493-507, 1996.

[14] ULERY, B. D. et al. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. *Journal of polymer science part B: polymer physics*, v. 49, p. 832-864, 2011.

[15] KMISRA, S. K.; BOCCACCINI, A, R. Biodegradable and bioactive polymer/ceramic composite scaffolds. *Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers*, p. 72-92, 2007.

[16] HUTMACHER, D, W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, v. 21, p. 2529-2543, 2000.

[17] MA, P.X. Scaffolds for tissue fabrication. *Materials Today*, v. 7, p. 30-40, 2004.

[18] PACHENCE, J.M.; KOHN J. Biodegradable polymers. In: _____ . *Principles of Tissue Engineering*, San Diego: Academic Press, San Diego, 2000. p. 263.

[19] TSUJI, H.; IKADA, Y. Blends of Crystalline and Amorphous Poly(lactide), III: hydrolysis of solution-cast blend films. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 63, p. 855-863, 1997.

[20] TSUJI, H. Poly(L-lactide): XII. Formation, growth, and morphology of crystalline residues as extended-chain crystallites through hydrolysis of poly(L-lactide) films in phosphate-buffered solution. *Polymer Degradation and Stability*, v. 84, p. 515-523, 2004.

[21] MURPHY, W. L. et al. Growth of continuous bonelike mineral within porous poly(lactideco-glycolide) scaffolds in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 50, p. 50-58, 2000.

[22] CAMPBELL, A. A. Bioceramics for implant coatings. *Materials Today*, v. 6, p. 26 31, 2003.

[23] BOHNER, M. et al. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: a critical assessment. Biomaterials, v. 26, p. 6423-6429, 2005.

[24] LOPEZ-HEREDIA, M. A. et al. Processing and in vivo evaluation of multiphasic calcium phosphate cements with dual tricalcium phosphate phases. *Acta Biomaterialia*, v. 8, p. 3500-3508, 2012.

[25] ALBEE, F. H. Studies in bone growth triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. *Annals of Surgery*, v. 71, p. 32-39, 1920.

[26] NERY, E. B. et al. Tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratios of HA/β-TCP in periodontal osseous defects. *Journal of Periodontology*, v. 63, p. 729-735, 1992.

[27] LEGEROS, R. Z. et al. Biphasic calcium phosphate bioceramics preparation, properties and applications. *Journal of materials science: materials in medicine*, v. 14, p. 201-209, 2003.

[28] VALLET-REGI, M.; GONZALEZ-CALBET, J. M. Calcium phosphates as substitution
of bone tissues. *Progress in Solid State Chemistry*, v. 32, p. 1-31, 2004.

[29] BEST, S. M. Bioceramics: past, present and for the future. *Journal of the European Ceramic Society*, n. 28, p. 1319-1327, 2008.

[30] SUZUKI, O. et al. Bone Formation on Synthetic Precursors of Hydroxyapatite. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, v. 164, p. 37-50, 1991.

[31] KANAZAWA, T. *Inorganic phosphate materials*. Tokyo: Elsevier, 1989. 289 p.

[32] BAGAMBISA, F. B. et al. The interaction of osteogenic cells with hydroxyapatite implant materials in vitro and in vivo. *Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v. 5, p. 217-226, 1990.

[33] KAWACHI, E. Y. et al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Química Nova*, v. 23, p. 518-522, 2000.

[34] GAO, T. J. Morphological and biomechanical difference in healing in segmental tibial defects implanted with Biocoral or tricalcium phbsphate cylinders. *Biomaterials*, v. 18, p. 219-223, 1997.

[35] RAYNAUD, S. et al. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I.Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. *Biomaterials*, v. 23, p. 1065-1072, 2002.

[36] BOHNER, M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *International Journal of the Care of the Injured*, v. 31, p. 37-47, 2000.

[37] DEKKER, R. J. et al. Bone tissue engineering on amorphous carbonated apatite and crystalline octacalcium phosphate-coated titanium discs. *Biomaterials*, v. 26, p. 5231-5239, 2005.

[38] IMAIZUMI, H. et al. Comparative study on osteoconductivity by synthetic octacalcium phosphate and sintered hydroxyapatite in rabbit bone marrow. *Calcified Tissue International*, v. 78, p. 45-54, 2006.

[39] KIKUCHI, M. et al. Preparation and mechanical properties of calcium phosphate/copoly-L-lactide composites. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* , v. 8, p. 361-364, 1997.

[40] VERHEYEN, C. C. P. M. et al. Evaluation of hydroxyapatite/poly(L-lactide) composites: physico-chemical properties. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 4, p. 58-65, 1993.

[41] WALSH, D. et al. Preparation of porous composite implant materials by in situ polymerization of porous apatite containing ε-caprolactone or methyl methacrylate. *Biomaterials*, v. 22, p. 1205-1212, 2001.

[42] JOHNSON, A. J. W.; HERSCHLER, B. A. A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair. *Acta Biomaterialia*, v. 7, p. 16-30, 2011.

[43] QIU, X. et al. Hydroxyapatite Surface Modified by L-Lactic Acid and Its Subsequent Grafting Polymerization of L-Lactide. *Biomacromolecules*, v. 6, p. 1193-1199, 2005.

[44] PRABHAKARAN, M. P. et al. Electrospun nanostructured scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, v. 5, p. 2884-2893, 2009.

[45] HONG, Z. et al. Nano-composite of poly(L-lactide) and surface grafted hydroxyapatite: Mechanical properties and biocompatibility. *Biomaterials*, v. 26, p. 6296-6304, 2005.

[46] SHIKINAMI, Y.; OKUNO, M. Bioresorbable devices made of forged composites of hydroxyapatite (HA) particles and poly-L-lactide (PLLA): Part I. Basic characteristics. *Biomaterials*, v. 20, p. 859-877, 1999.

[47] LAURENCIN, C.T. et al. Tissue engineered bone-regeneration using degradable polymers: the formation of mineralized matrices. *Bone*, v. 19, p. S93-99, 1996.

[48] LAURENCIN, C.T. et al. Porous polymer-ceramic systems for tissue engineering support the formation of mineralized bone matrix. *Materials Research Society Symposium Proceedings* , v. 414, p. 157-164, 1996.

[49] RIZZI, S. et al. Biodegradable polymer/hydroxyapatite composites: surface analysis and initial attachment of human osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 55, p. 475-486, 2001.

[50] SUI, G. et al. Poly-L-lactic acid/hydroxyapatite hybrid membrane for bone tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 82, p. 445-454, 2007.

[51] CHUENJITKUNTAWORN, B. et al. Electrospun poly(L-lactic acid)/hydroxyapatite composite fibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Polymer International*, v. 59, p. 227-235, 2010.

[52] ZHANG, R.; MA, P. X. Poly(-hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology. *Journal of Biomedical Materials Research* , v. 44, p. 446-455, 1999.

[53] XIE, L. et al. Preparation, in vitro degradability, cytotoxicity, and in vivo biocompatibility of porous hydroxyapatite whisker-reinforced poly(L-lactide) biocomposite scaffolds. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, v. 27, p. 505-528, 2016.

[54] REZWAN, K. et al. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 27, p. 3413-3431, 2006.

[55] KAY, M. I.; YOUNG, R. A. Crystal Structure of Hydroxyapatite. *Nature*, v. 204, p. 1050-1052, 1964.

[56] BOANINI, E. et al. Nanocomposites of hydroxyapatite with aspartic acid and glutamic acid and their interaction with osteoblast-like cells. *Biomaterials*, v. 27, p. 4428-4433, 2006.

[57] HONG, Z. et al. Grafting polymerization of L-lactide on the surface of hydroxyapatite nano-crystals. *Polymer*, v. 45, p. 6699-6706, 2004.

[58] LIU, Q. et al. Polyacids as bonding agents in hydroxyapatite polyester-ether (PolyactiveTM 30/70) composites. *Journal of materials science : materials in medicine*, v. 9, p. 23-30, 1998.

[59] FORTE, L. et al. Antioxidant and bone repair properties of quercetin-functionalized
hydroxyapatite: An in vitro osteoblast–osteoclast–endothelial cell co-culture study. *Acta Biomaterialia*, v. 32, p. 298-308, 2016.

[60] RENEKER, D. H.; YARIN, A. L. Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer*, v. 49, p. 2387-2425, 2008.

[61] RAMAKRISHNA, S. et al. *An introduction to electrospinning and nanofibers*. World Scientific, 2005. 382 p.

[62] SILL, T. J.; RECUM, H. A. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, v. 29, p. 1989-2006, 2008.

[63] COSTA, R. G. F. et al. Eletrofação de Polímeros em Solução. Parte I: Fundamentação Teórica. *Polímeros*, v. 22, p. 170-177, 2012.

[64] ZENG, J. et al. Biodegradable electrospun fibers for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 92, p. 227-231, 2003.

[65] KENAWY, R. et al. Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend. *Journal of Controlled Release*, v. 81, p. 57-64, 2002.

[66] ZONG, X. et al. Structure and process relationship pf electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer*, v. 43, p. 4403-4412, 2002.

[67] LEE, S. J. et al. In vitro evaluation of electrospun nanofiber scaffolds for vascular graft application. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 83, p. 999-1008, 2007.

[68] HE, W. et al. Fabrication and endothelialization of collagen-blended biodegradable polymer nanofibers: potential vascular graft for blood vessel tissue engineering. *Tissue Engineering*, v. 11, o. 1574-1588, 2011.

[69] YANG, F. et al. Electrospinning of nano/ microscale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials*, v. 26, p. 2603-2610, 2005.

[70] SAHOO, S. et al. Characterization of a novel polymeric scaffold for potential application in tendon/ligament tissue engineering. *Tissue Engineering*, v. 12, p. 91-99, 2006.

[71] LI, C. et al. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 27, p. 3115-3124, 2006.

[72] JANG, J. H. et al. Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 61, p. 1065-1083, 2009.

[73] NI, P. Y. et al. Preparation of poly(ethylene glycol)/polylactide hybrid fibrous scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, v. 6, p. 3065-3075, 2011.

[74] SHIN, M. et al. In vivobone tissue engineering using mesenchymal stem cells on a novel electrospun nanofibrous scaffold. *Tissue Engineering*, v. 10, p. 33-41, 2004.

[75] ISHIKAWA. K. et al. Determination of the Ca/P ratio in calcium deficient hydroxyapatite using X-ray diffraction analysis. *Journal of materials science: materials in medicine*, v. 4, p. 165-168, 1993.

[76] ARELLANO-JIMENEZ, M. J. et al. Synthesis and hydrolysis of octacalcium phosphate and its characterization by electron microscopy and X-ray diffraction. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, v. 70, p. 390-395, 2009.

[77] BENTINI, R. *Produção de suportes poliméricos para o crescimento de células-tronco mesenquimais e sua aplicação em regeneração óssea*. 2013. 146 p. Tese (doutorado em Química) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

[78] MA, Z. et al. Surface modified nonwoven polysulphone (PSU) fiber mesh by electrospinning: A novel affinity membrane. *Journal of Membrane Science*, v. 272, p. 179–187, 2006.

[79] SREEDHARA, S. S.; TATA, N. R. A Novel Method for measurement of porosity in nanofiber mat using pycnometer in filtration. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, v. 8, p. 132-137, 2013.

[80] YUAN, Y.; LEE, T. R. Contact Angle and Wetting Properties. In: _____ . *Surface science techniques*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 3-34.

[81] KOHLI, R.; MITTAL, K. L. *Developments in Surface Contamination and cleaning*. Elsevier, 2015. 894 p.

[82] MAINIL-VARLET, P. et al. Effect of in vivo and in vitro degradation on molecular and mechanical properties of various low-molecular-weight polylactides. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 3, p. 360-380, 1997.

[83] GLAUSER, A. C. R. et al. A degradation study of PLLA containing lauric acid. *Biomaterials*, v. 26, p. 2415-2422, 2005.

[84] KOKUBO, T. How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity. *Biomaterials*, n. 27, p. 2907-2915, 2006.

[85] KOKUBO, T. Formation of biologically active bone-like apatite on metals and polymers by a biomimetic process. *Thermochimica Acta*, 280/281, p. 479-490, 1996.

[86] FANGANIELLO, R. D. et al. Increased in vitro osteopotential in SHED associated with higher IGF2 expression when compared with hASCs. *Stem Cell Reviews and Reports*, v. 11, p. 635-644, 2015.

[87] CHUENJITKUNTAWORN, B. et al. Electrospun poly(L-lactic acid)/hydroxyapatite composite fibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Polymer International*, v. 59, p. 227-235, 2010.

[88] SCOTT, M. A. et al. Brief Review of Models of Ectopic Bone Formation. *Stem cells and development*, v. 21, p. 655-667, 2012.

[89] ANDRADE, A. et al. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002. 388p.

[90] KREBSBACH, P. H. et al. Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation*, v. 63, p. 1059-1069, 1997.

[91] BLUMENTHAL, N. C. et al. Formation and structure of Ca-deficient hydroxyapatite. *Calcified Tissue International*, v. 33, p. 111-117, 1981.

[92] ZHUANG, Z. et al. Synthesis of plate-shaped hydroxyapatite via an enzyme reaction of urea with urease and its characterization. *Powder Technology*, v. 222, p. 193–200, 2012.

[93] KOMLEV, V. S. et al. Synthesis of octacalcium phosphate by precipitation from solution. *Chemical Technology*, v. 432, p. 178-182, Feb. 2010.

[94] SILVERSTEIN, R. M. et al. *Identificação Espectrométrica de compostos orgânicos*. LTC, 2006.

[95] JIANG, J. et al. Synthesis and characterization of multi-lamellar mesostructured hydroxyapatites using a series of fatty acids. The *Journal of Materials Science*, v. 46, p. 3828-3834, 2011.

[96] TURKI, T. et al. Study of mixed Ca‑Zn hydroxyapatite surface modified by lactic acid. *Applied Surface Science*, v. 256, p. 6759-6764, 2012.

[97] VENUGOPAL, J. et al. Electrospun-modified nanofibrous scaffolds for the mineralization of osteoblast cells. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 85, p. 408-417, 2008.

[98] LIU, Q. et al. Composite biomaterials with chemical bonding between hydroxyapatite filler particles and PEG/PBT copolymer matrix. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 40, p. 490-497, 1998.

[99] MEGELSKI, S. Micro- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers. *Macromolecules*, v. 35, p. 8456-8466, 2002.

[100] XU, X. et al. Electrospun poly(L-lactide)-grafted hydroxyapatite/ poly(L-lactide) nanocomposite fibers. *European Polymer Journal*, v. 43, p. 3187-3196, 2007.

[101] JOSE, M. V. et al. Aligned PLGA/HA nanofibrous nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, v. 5, 305-315, 2009.

[102] LAO, L. et al. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for bone tissue engineering. *The Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 22, p. 1873-1884, 2011.

[103] VASITA, R. Surface hydrophilization of electrospun PLGA micro-/nano-fibers by blending with Pluronic F-108. *Polymer*, v. 51, p. 3706-3714, 2010.

[104] MAQUET, V. et al. Preparation, characterization, and in vitro degradation of bioresorbable and bioactive composites based on Bioglass-filled polylactide foams. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 66, p. 335-346, 2003.

[105] JAFARKHANI, M. et al. Fabrication and Characterization of PLLA/Chitosan/Nano Calcium Phosphate Scaffolds by Freeze-Casting Technique. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 51, p. 9241-9249, 2012.

[106] BERGSMA, E. J. et al. Foreign body reaction to resorbable poly(L-lactide) bone plates and screws used for the fixation of unstable zygomatic fractures. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 51, p. 51-66, 1993.

[107] BERGSMA, E. J. et al. Last degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws. *Biomaterials*, v. 16, p. 25-31, 1995.

[108] XIN, R. A comparative study of calcium phosphate formation on bioceramics in vitro and in vivo. *Biomaterials*, v. 26, p. 6477-6486, 2005.

[109] PENG, F. et al. Influence of pretreatment on the surface characteristics of PLLA fibers and subsequent hydroxyapatite coating. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 88B, p. 220-229, 2009.

[110] JIAO, Y. et al. Effect of Hydrolysis Pretreatment on the Formation of Bone-like Apatite on Poly(L-lactide) by Mineralization in Simulated Body Fluids. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v. 22, p. 492–507, 2007.

[111] SCHNEIDER, O. D. et al. Cotton Wool-Like Nanocomposite Biomaterials Prepared by Electrospinning: In vitro Bioactivity and Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 84, p. 350-362, 2008.

[112] THOMAS, M. et al. Surface hydrophilicity of PLGA fibers governs in vitro mineralization and osteogenic differentiation. *Materials Science and Engineering C*, v. 45, p. 320-332, 2014.

[113] NGIAM, M. et al. The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering. *Bone*, v. 45, p. 4-16, 2009.

[114] GUO, L. et al. Structure and Composition Comparison of Bone Mineral and Apatite Layers Formed in Vitro. *Key engineering materials*, v. 192-195, p. 187-190, 2001.

[115] BRETCANU, O. et al. Electrospun nanofibrous biodegradable polyester coatings on Bioglass®-based glass-ceramics for tissue engineering. *Materials Chemistry and Physics*, v. 118, p. 420–426, 2009.

[116] KIM, S. et al. In situ observation of hydroxyapatite nanocrystal formation from amorphous calcium phosphate in calcium-rich solutions. *Materials Chemistry and Physics*, v. 91, p. 500-506, 2005.

[117] BOISTELLE, R.; LOPEZ-VALERO, I. Growth units and nucleation: the case of calcium phosphates. *Journal of Crystal Growth*, v. 102, p. 609-617, 1990.

[118] LEE, J. et al. The effect of gelatin incorporation into electrospun poly(L-lactide-co-Ɛ-caprolactone) fibers on mechanical properties and cytocompatibility. *Biomaterials*, v. 29, p. 1872-1879, 2008.

[119] NGIAM, M. Fabrication of mineralized polymeric nanofibrous composites for bone graft materials. *Tissue Engineering Part A*, v. 15, p. 535-546, 2009.

[120] SUDO, H. et al. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *The Journal of Cell Biology*, v. 96, p. 191-198, 1983.

[121] MIRON, R. J; ZHANG, Y. F. Osteoinduction: A review of Old concepts with New standards. *Journal of Dental Research*, v. 91, p. 736-744, 2012.

[122] KIM, S. S. et al. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 27, p. 1399-1409, 2006.

[123] POPP, J. R. et al. *In vitro* evaluation of osteoblastic differentiation on amorphous calcium phosphate-decorated poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, v. 5, p. 780-789, 2011.

[124] PULEO, D. A. Dependence of Mesenchymal Cell Responses on Duration of Exposure to Bone Morphogenetic Protein-2 In Vitro. *Journal of cellular physiology*, v. 173, p. 93-101, 1997.

[125] WUTTICHAROENMONGKOL, P. et al. Osteoblastic Phenotype Expression of MC3T3-E1 Cultured on Electrospun Polycaprolactone Fiber Mats Filled with Hydroxyapatite Nanoparticles. *Biomacromolecules*, v. 8, 2602-2610, 2007.

[126] SUN, J. S. et al. The effects of calcium phosphate particles on the growth of osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 37, p. 324-334, 1997.

[127] BRUIJN, J.D. et a. Initial bone matrix formation at the hydroxyapatite interface in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 29, p. 89-99, 1995.

[128] YAMADA, S. et al. Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/β-tricalcium phosphate ratios. *Biomaterials*, v. 18, p. 1037-1041, 1997.

[129] YAMAZA, T. et al. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 1, p. 5, 2010.

[130] SEO, B. M. et al. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Diseases*, v. 14, p. 428-434, 2008.

[131] BARRADAS, A. M. C. et al. Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *European Cells and Materials*, v. 21, p. 407-429, 2011.

[132] RIPAMONTI, U. The morphogenesis of bone in replicas of porous hydroxyapatite obtained from conversion of calcium carbonate exoskeletons of coral. *The Journal of Bone and Joint Surgery - American Volume*, v. 73, p. 692-703, 1991.

[133] YAMASAKI, H.; SAKAI, H. Osteogenic Response to Porous Hydroxyapatite Ceramics under the Skin of Dogs. *Biomaterials*, v. 13, p. 308-312, 1992.

[134] MAGAN, A.; RIPAMONTI, U. Geometry of porous hydroxyapatite implants influences osteogenesis in baboons (Papio ursinus). *Journal of Craniofacial Surgery*, v. 7, p. 71-78, 1996.

[135] YUAN, H. et al. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*, v. 20, p. 1799-1806, 1999.

[136] YUAN, H. et al. (2001a) Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissue of dogs: a comparative study between Alpha-TCP and Beta-TCP. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 12, p. 7-13, 2001.

[137] GOSAIN, A. K. et al. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: Part I. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 109, p. 619-630, 2002.

[138] HASEGAWA, S. et al. *In vivo* evaluation of a porous hydroxyapatite/poly-DLlactide composite for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 81, p. 930-938, 2007.

[139] BARBIERI, D. et al. Heterotopic bone formation by nano-apatite containing poly(D,L-lactide) composites. *European Cells & Materials Journal*, v. 19, p. 252-261, 2010.

[140] HABIBOVIC, P. et al. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials*, v. 26, p. 3565-3575, 2005.

[141] MUSCHLER, G. F. et al. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *The Journal of Bone and Joint Surgery - American Volume*, v. 86A, p. 1541-1558, 2004.

[142] PARK, J. C. et al. Induction of bone formation by Escherichia coliexpressed recombinant human bone morphogenetic protein-2 using block-type macroporous biphasic calcium phosphate in orthotopic and ectopic rat models. *Journal of Periodontal Research*, v. 46, p. 682-690, 2011.

[143] YANG, Z. et al. Osteogenesis in extraskeletally implanted porous calcium phosphate ceramics: variability among different kinds of animals. *Biomaterials*, v. 17, p. 2131-2137, 1996.

[144] YUAN, H. et al. Cross-species comparison of ectopic bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) scaffolds. *Tissue Engineering*, v. 12, p. 1607-1615, 2006.

[145] PEREIRA, R. F. P. et al. What drives the precipitation of long-chain calcium carboxylates (soaps) in aqueous solution. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 14, p. 7517-7527, 2012.

[146] LIN, C.Y. et al. A novel method for biomaterial scaffold internal architecture design to match bone elastic properties with desired porosity. *Journal of Biomechanics*, v. 37, p. 623-636, 2004.

ANEXOS

ANEXO 1: Características espectroscópicas da HA

A absorção espectroscópica da HA surge das vibrações de íons fosfato e hidroxila. A Figura A1 mostra o espectro de absorção de infravermelho da HA estequiométrica. Um tetraedro de PO_4^{3-} livre possui modos de vibracionais ativos tais como (A_1, v_1 = 980 cm^{-1}) , (E, v_2 = 363 cm^{-1}), e (F_2, v_3 = 1082 cm^{-1}, v_4 = 515 cm^{-1}). Entretanto, como a simetria é geralmente reduzida em um cristal, os espectros se dividem em bandas mais complexas. As absorções observadas em 3578 cm^{-1} e 635 cm^{-1} são atribuídas aos modos de estiramento de OH.

Ao contrário na HAD, a HA estequiométrica não contem grupos HPO_4^{2-} em sua estrutura, por essa razão, a banda por volta 873 cm^{-1} não aparece.

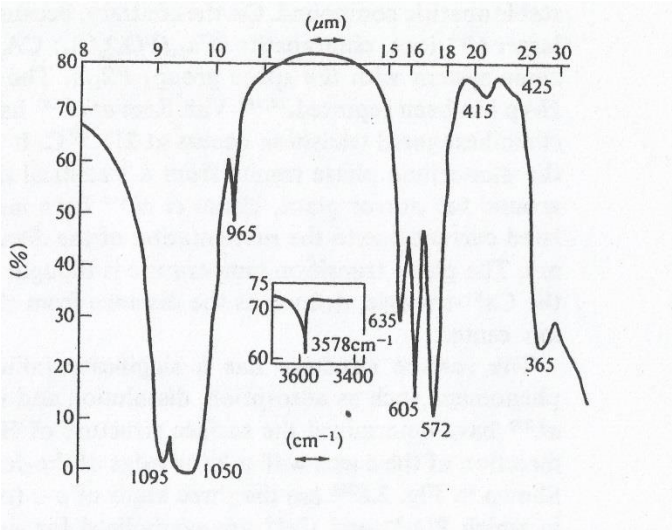


Figura A1 – Espectro de FTIR da hidroxiapatita estequiométrica. Fonte: KANAZAWA, 1989[31].

ANEXO 2: Síntese do Dodecanoato de cálcio

Dodecanoato de cálcio foi preparado em solução alcólica, seguindo-se metodologia previamente descrita na literatura[145]. O ácido correspondente foi neutralizado com hidróxido de potássio em etanol em ebulição. Uma solução contendo acetato de cálcio, dissolvido em mínima quantidade de água, foi adicionado gota a gota na solução alcólica de dodecanoato de potássio. A mistura foi resfriada até a temperatura ambiente com agitação constante. O precipitado foi lavado com água destilada e etanol e seco em uma estufa a vácuo a 40ºC. Orto-xileno foi utilizado para recristalizar o sal de cálcio formado.

O produto foi misturado com brometo de potássio e pressionado até a formação de finas partículas transparentes para análise de FTIR (Figura A2). A Tabela A1 apresenta as principais bandas com as respectivas atribuições vibracionais.

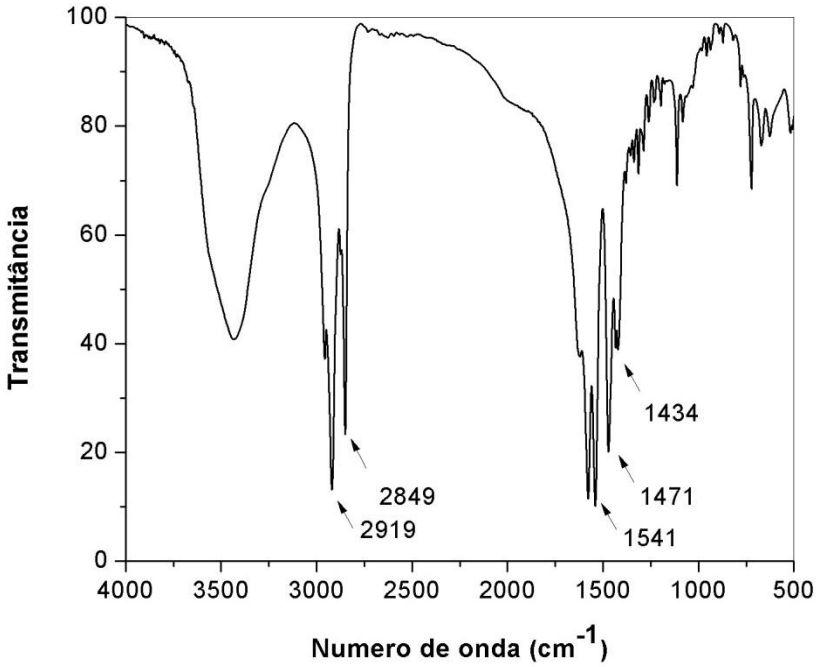


Figura A2 – Espectro de FTIR do dodecanoato de cálcio obtido.

Tabela A1

Principais bandas do dodecanoato de cálcio observadas no FTIR e suas respectivas atribuições vibracionais.

Banda	Atribuição vibracional
2919	v_{as} CH_2
2849	v_s CH_2
1541	v_{as} COO
1471	δ CH_{2def}
1434	v_s COO

Essas bandas em 1541 e 1434 cm^{-1} atribuídas ao íon carboxilato formado também apareceram nos CaP funcionalizados com laurato.

ANEXO 3: Mistura da HAD com Dodecanoato de cálcio (9:1)

Com o intuito de se obter um espectro de FTIR mais similar com aqueles obtidos após a funcionalização dos CaP com laurato, misturou-se uma das fases de CaP (HAD) não funcionalizada com o sal de dodecanoato na proporção de 9:1, dessa forma, obtendo-se um pó com 10% de carboxilato de cálcio, uma vez que a taxa de funcionalização de laurato na superfície dos CaP variou aproximadamente entre 5% a 10%.

O espectro de FTIR (Figura A3) continua apresentando as bandas características dos grupos CH_2 e COO^-; entretanto, devido à diminuição da porcentagem em massa do sal de carboxilato na mistura resultante, essas bandas estavam menores. Esse resultado se assemelhou aos espectros de FTIR dos CaP-L.

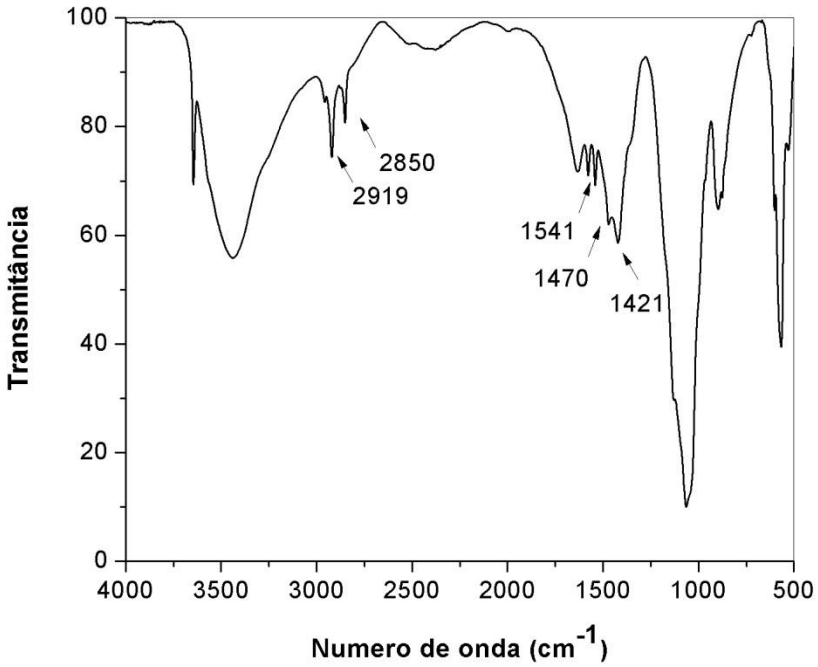


Figura A3 – Espectro de FTIR do pó resultante da mistura de HAD com dodecanoato de cálcio 9:1.

SÚMULA CURRICULAR

Dados Pessoais

Nome: Diego Clemente de Souza
Local e data de nascimento: São Paulo/SP, 26/06/1986

Formação Acadêmica/Titulação

2012 - atual: Pós-graduação – Stricto Sensu – Doutorado em Química.
Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP).
Título da tese: Biocompósitos eletrofiados de PLLA com alto conteúdo de partículas de fosfatos de cálcio funcionalizados para regeneração óssea.
Bolsista CNPq

2010 - 2011: Pós-graduação – Stricto Sensu – Mestrado em Química.
Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP – Campus Araraquara).
Título da dissertação: Desenvolvimento de compósitos de PEUAPM/Apatitas para substituição e regeneração óssea.
Bolsista CAPES

2006 - 2009: Graduação – Bacharelado em Química.
Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP – Campus Araraquara).
Iniciação Científica: Desenvolvimento de biocompósitos de Polietileno de Ultra Alto Peso Molecular (PEUAPM) com diferentes fases de apatita para reposição e regeneração óssea.
Bolsista PIBIC

Participação em Congressos Científicos/ Trabalhos apresentados

1. **10th World Biomaterials Congress -** 2016, Montreal, Canadá. **Publicação em congresso:** Fast Degradation PLLA/Apatites composites with high content of mineral phase for bone regeneration.

2. **37a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química -** 2014, Natal, Brasil. **Apresentação de Trabalho:** Desenvolvimento de compósitos eletrofiados de PLLA/hidroxiapatita deficiente em cálcio para regeneração óssea.

3. **29th Annual Conference of the Canadian Biomaterials Society -** 2011, Vancouver, Canadá.
Publicação em congresso: Development of Polyethylene composites of ultra high molecular weight (UHMWPE) with phases of apatite.

4. **XXI Congresso de Iniciação Científica da UNESP -** 2009, São José do Rio Preto – SP, Brasil.
Apresentação de Trabalho: Desenvolvimento de Compósitos PEUAPM/Apatita para reposição e regeneração óssea.

5. **XX Congresso de Iniciação Científica da UNESP -** 2008, São José dos Campos – SP, Brasil.
Apresentação de Trabalho: Obtenção e Caracterização de Hidroxiapatita (HA) em pó para utilização em compósito com polietileno de ultra alto peso molecular (PEUAPM).