UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

RICARDO BENTINI

**Produção de suportes poliméricos para o
crescimento de células-tronco mesenquimais e sua
aplicação em regeneração óssea**

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

07/11/2013

RICARDO BENTINI

**Produção de suportes poliméricos para o
crescimento de células-tronco mesenquimais e sua
aplicação em regeneração óssea**

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

Orientador: Prof . Dr. Luiz Henrique Catalani

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bentini, Ricardo
B476p Produção de suportes poliméricos para o crescimento de células-
tronco mesenquimais e sua aplicação em regeneração óssea /
Ricardo Bentini. -- São Paulo, 2013.
146p.

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

1. Polímeros 2. Ciência dos materiais 3. Engenharia de
tecidos 4. Regeneração óssea I. T. II. Catalani, Luiz Henrique,
orientador.

547.84 CDD

Ricardo Bentini

Produção de suportes poliméricos para o crescimento de células-tronco mesenquimais e sua aplicação em regeneração óssea

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

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

***Aos meus pais Antonio Bentini e Michelina Belli Bentini,
a minha irmã Kátia Bentini,
ao meu sobrinho Waldir Bentini de Lima
que sempre me incentivaram e me deram forças para
enfrentar os desafios transformados hoje em vitória.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por sempre estar ao meu lado, me ajudando a enfrentar as decepções, as derrotas e os desânimos, mesmo quando duvidei da sua existência.

Agradeço ao meu orientador, Luiz Henrique Catalani, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, por confiar a execução deste projeto a mim e por ajudar no meu amadurecimento científico.

Agradeço a professora Maria Rita Passos Bueno pela colaboração neste trabalho e aos seus alunos Roberto e Felipe que me ajudaram nos experimentos *in vivo*. À professora Ana Campa que sempre abriu as portas do seu laboratório, e os seus alunos Fabíola e Edson por sempre estarem dispostos a nos ajudar. Aos professores Roberto Torresi, Susana Torresi, Massuo Jorge Kato, Denise Petri, Willy e Vera Constantino que permitiram o uso de seus respectivos laboratórios.

Agradeço aos funcionários da Central Analítica, em especial: Luzia, Marcio, Alessandra, Cris, Giovana que além de cuidar das nossas amostras com carinho nos ofereceram a amizade.

Agradeço aos funcionários da CPG: Milton, Emiliano, Marcelo e Paulo que faziam de tudo para nos ajudar. Agradeço em especial a Cibele, que além de resolver nossos problemas, sempre tinha paciência para ouvir nossas lamentações e acabava nos acolhendo como filhos.

Agradeço aos meus queridos amigos do laboratório e agregados: Antônio, Patrícia, Janaina, Guilhermino, Silvinha, Alliny, Renata, Vânia, Ana Paula, Mariana, Fernando (Fefucho), Diego, Romeu, Danielle, Vitor, aos queridos ICs: Daniel Minatelli (Piru), Flavia Cara (Miss), Mayara (Gusttavete), Natália (Perva), Henrique, Guilherme (Tropeço), Costelinha e Carol, aos técnicos Luiz e Marcos (Bigão). Além

da eterna gratidão por toda ajuda, jamais esquecerei os bons momentos que passamos juntos, nossos cafés, nossos almoços, nossas risadas, as besteiras que falávamos, as músicas que fizemos juntos, acho que tudo seria mais difícil sem vocês, muito obrigado por tornarem meus dias mais felizes, eu era feliz e sabia. Mais uma vez devo agradecer a Deus por colocá-los em minha vida.

Agradeço aos meus grandes amigos Thiago, Najela e Raphael pela convivência, pelos bons momentos e por sempre estarem ao meu lado.

Agradeço também aos amigos que fazem parte da minha vida: Rafael Boemo, Alessandro, Leo, Glaucia, Daniel, Claudio, Camyla, William, Marcio Gutierrez, Patrícia Rocha, Priscila Moreira, Ana Tereza, Claudia Dias, Adriana Soldera, Marta.

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

Agradeço a todos a quem esqueci de citar e que contribuíram para que este trabalho fosse possível.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original.”*

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

Resumo	12
Abstract.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	16
LISTA DE FIGURAS.....	19
LISTA DE TABELAS	25
LISTA DE ESQUEMAS	26
1 INTRODUÇÃO	27
1.1 <i>Engenharia de Tecidos</i>	29
1.1.1 <i>Engenharia de tecido ósseo</i>	34
1.1.2 <i>Células-Tronco</i>	39
1.1.2.1 <i>Células-tronco de polpa de dente</i>	41
1.2 <i>Biomateriais Poliméricos</i>	43
1.2.1 <i>Hidroxiapatita</i>	45
1.2.2 <i>Compósitos e nanocompósitos</i>	48
1.3 <i>Eletrofiação</i>	50
2 OBJETIVOS.....	55
2.1 <i>Objetivos gerais</i>	55
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	55
3 Materiais e métodos.....	57
3.1 <i>Materiais</i>	57
3.2 <i>Métodos</i>	58
3.2.1 <i>Produção do poli(succinato de isorbila-b-L-lactídeo)</i>	58

3.2.2	<i>Produção de nanopartículas funcionalizadas</i>	59
3.2.2.1	Enxertia de PLLA na superfície da HAP	59
3.2.2.2	Funcionalização da superfície da HAP com laurato	60
3.2.2.3	Caracterização das partículas funcionalizadas.....	61
3.2.3	<i>Produção de nanocompósitos de poli(L–ácido láctico) com HAP-CL, PLLA-g-HAP, HAP e poli(succinato de isosorbídeo-b-L-lactídeo) com HAP-CL</i>	62
3.2.3.1	Produção e caracterização de filmes de compósitos.....	62
3.2.3.2	Produção e caracterização das malhas eletrofiadas de compósitos ..	63
3.2.3.3	<i>Estudo da degradação in vitro das fibras de PLLA-co-PIS com HAP-CL</i>	65
3.2.4	<i>Ensaio de crescimento celular in vitro e in vivo</i>	65
3.2.4.1	Ensaio in vitro.....	65
3.2.4.1.1	<i>Teste de adesão e proliferação celular</i>	66
3.2.4.1.2	<i>Ensaio da atividade de Fosfatase Alcalina (ALP)</i>	66
3.2.4.1.3	<i>Ensaio com Vermelho de Alizarina (ARS)</i>	67
3.2.4.1.4	<i>Imunofluorescência para Osteocalcina (OSC) e Osteopontina (OSP)</i>	68
3.2.4.2	Ensaio in vivo	69
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	71
4.1	<i>Síntese e Caracterização das Nanopartículas de Hidroxiapatita</i>	71
4.1.1	<i>Síntese e caracterização da HAP-CL</i>	71
4.1.1.1	Caracterização da HAP-CL.....	72
4.1.2	<i>Caracterização da PLLA-g-HAP</i>	80
4.2	<i>Produção dos Nanocompósitos</i>	81
4.2.1	<i>Filmes de nanocompósitos de poli(L–ácido láctico)</i>	82

4.2.2 Malhas eletrofiadas dos nanocompósitos de poli(L–ácido láctico)	88
4.2.3 Filmes de Nanocompósitos de poli(succinato de isosorbídeo-b-L-lactídeo)	96
4.2.4 Malhas eletrofiadas dos nanocompósitos de poli(succinato de isosorbídeo- b-L-lactídeo)	99
4.2.5 Estudo de degradação in vitro do poli(succinato de isosorbídeo-b-L- lactídeo) com HAP-CL	101
4.3 Aplicação dos nanocompósitos produzidos como suportes para o crescimento de células e sua aplicação em regeneração óssea	105
4.3.1 Estudos in vitro com fibroblastos	106
4.3.2 Estudos in vitro com células-tronco mesenquimais de polpa de dente ..	107
4.3.3 Estudos in vivo.....	120
5 CONCLUSÕES.....	124
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126

RESUMO

Bentini, R. **Produção de suportes poliméricos para o crescimento de células-tronco mesenquimais e sua aplicação na regeneração óssea**. 2013. 146p. Tese de doutorado - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Um novo método de modificação da superfície de nanopartículas de hidroxiapatita (HAP) por reação com cloreto de lauroíla foi desenvolvido, gerando a nanopartícula funcionalizada por laurato (HAP-CL). A superfície modificada da HAP foi confirmada por infravermelho, termogravimetria, ressonância magnética nuclear e análise elementar. Provamos por testes mecânicos a capacidade de criar compósitos com alto teor de HAP-CL em matrizes poliméricas de poli(L-ácido láctico) (PLLA) e poli(succinato de isosorbídeo-*b*-L-lactídeo) (PLLA-co-PIS) sem perda significativa de propriedades mecânicas. Diferentes quantidades de HAP-CL, HAP enxertado com PLLA (PLLA-*g*-HAP) e HAP puro foram dispersadas em soluções de PLLA para formar fibras eletrofiadas. Para comparar a dispersão destas nanopartículas nas fibras e a sua morfologia, análise de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão foram empregadas. A HAP-CL exibiu melhor dispersão na matriz polimérica do que o PLLA-*g*-HAP e HAP, e permitiu a produção de fibras com grande quantidade de HAP-CL (até 30% massa da fase mineral em relação à massa do polímero(m_m/m_p)), tanto para o PLLA como para o PLLA-co-PIS. Células tronco mesenquimais derivadas de polpa de dente foram cultivadas em fibras de PLLA com alto teor de HAP-CL, resultando em um aumento significativo da atividade de

fosfatase alcalina (ALP), nos dias 14 e 21 ($p < 0,001$) quando comparados com conteúdos mais baixos de HAP-CL, assim como um melhor processo de mineralização apresentado pelos teste de vermelho de alizarina depois de 21 dias ($p < 0,001$). As células cultivadas nas fibras de PLLA-co-PIS contendo 30% de HAP-CL (m_m/m_p) apresentaram maior atividade de ALP após 21 dias ($p < 0,05$), e melhor processo de mineralização, depois de 14 e 21 dias ($p < 0,05$) do que as fibras de PLLA com 30% de HAP-CL (m_m/m_p). PLLA e PLLA-co-PIS, ambos contendo 30% de HAP-CL (m_m/m_p) induziram uma maior expressão de osteocalcina e osteopontina, dois marcadores de diferenciação osteoblástica, quando comparados ao PLLA e PLLA-co-PIS (controle). Finalmente, em experimentos *in vivo*, as fibras de PLLA-co-PIS contendo 30% de HAP-CL (m_m/m_p) apresentaram um desempenho superior no processo de neoformação óssea do que as fibras de PLLA com o mesmo conteúdo de nanopartículas. Em conclusão, os nossos resultados *in vitro* demonstraram que os suportes construídos de compósitos de PLLA-co-PIS contendo 30% de HAP-CL (m_m/m_p) se mostraram superiores tanto na adesão e proliferação quanto na diferenciação de células mesenquimais de polpa de dente em osteoblastos. Além disso, experimentos *in vivo* confirmaram estes resultados, demonstrando que estes nanocompósitos são excelentes modelos para implantes destinados a regeneração óssea.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais, regeneração óssea, suportes poliméricos, eletrofiação, hidroxiapatita.

ABSTRACT

Bentini, R. **Polymer scaffolds production for stem cell growing and their application in bone regeneration.** 2013. 146p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A new method of surface modification of hydroxyapatite nanoparticles (HAP) by reaction with lauroyl chloride was developed, producing the laurate functionalized nanoparticle (HAP-CL). The surface modified HAP was confirmed by infrared, thermogravimetric analysis, nuclear magnetic resonance and elemental analysis. We proved by mechanical tests the ability to create composites with high HAP-CL content in poly(*L*-lactic acid) (PLLA) and poly(isosorbide succinate-*b*-*L*-lactide) (PLLA-co-PIS) polymeric matrixes without significant loss of mechanical properties. Different amounts of HAP-CL, HAP grafted with PLLA (PLLA-*g*-HAP) and HAP were dispersed in pure PLLA solutions to form nanofibers. To compare the dispersion of these nanoparticles in the fibers and their morphology, scanning and transmission electron microscopies were employed. HAP-CL showed better dispersion in the polymer matrix than the PLLA-*g*-HAP and HAP, and allowed fiber production with large amounts of HAP-CL (up to 30% mineral to polymer weight (w_m/w_p)) for both PLLA and PLLA-co-PIS. Mesenchymal stem cells derived from dental pulp were cultured in PLLA fibers with high levels of HAP-CL, resulting in a significant increase in alkaline phosphatase activity (ALP), on days 14 and 21 ($p < 0.001$) as compared to those with lower content HAP-CL, as well as a better mineralization process shown

by alizarin red test after 21 days ($p < 0.001$). Cells grown in PLLA-co-PIS fibers containing 30% of HAP-CL showed higher ALP activity after 21 days ($p < 0.05$) and a better mineralization process, after 14 and 21 days ($p < 0.05$) than fibers of PLLA with 30% HAP-CL. PLLA and PLLA-co-PIS, both containing 30% of HAP-CL (w_m/w_p) induced a higher expression of osteocalcin and osteopontin, two osteoblast differentiation markers when compared with PLLA and PLLA-co-PIS (control). Finally, in the *in vivo* experiments, the PLLA-co-PIS fibers containing 30% HAP-CL (w_m/w_p) outperformed the process of bone formation than PLLA fibers with the same content of nanoparticles. In conclusion, our *in vitro* results demonstrated that scaffolds from composites of PLLA-co-PIS containing 30% HAP-CL (w_m/w_p) were superior both in adhesion and in the differentiation and proliferation of dental pulp stem cells in osteoblasts. Furthermore, *in vivo* experiments confirmed these results, demonstrating that these nanocomposites are excellent models for implants for bone regeneration.

Keywords: mesenchymal stem cells, bone regeneration, polymer Scaffolds, electro-spinning, hydroxyapatite

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP – Fosfatase Alcalina

ARS – Vermelho de Alizarina

ATB – Antibiótico

AFT - Anfotericina

BFP1 - peptídeos formadores de osso 1

BMP-7 – Proteína Morfogenética Óssea-7

CL – Cloreto de lauroíla

DAPI - 4,6-Diamidino-2-fenilindol

DLS – Espalhamento de Luz Dinâmico

DMEM – *Dubelco's Modified Eagle Medium*

DMF - *N,N*-Dimetilformamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPSCs - Células-tronco derivadas de polpa de dente

ECM – Matriz Extracelular

FTIR - *Fourier transform infrared spectroscopy*

HAP – nanopartículas de hidroxiapatita

HAP-CL – nanopartículas de hidroxiapatita funcionalizadas com laurato

hESC – células-tronco embrionárias humanas

hMSCs – células-tronco mesenquimais humanas

HMDI - 1,6-Hexametileno diisocianato

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

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

m_m/m_p - massa do mineral/massa do polímero

m_p/m_s - massa do polímero/massa do solvente

$\bar{M}_w$ - Massa Mola Média Ponderal

NIH – 3T3 – Células de fibroblasto de camundongo albino

OSC – Osteocalcina

OSP – Osteopontina

PBS – Tampão Fosfato Salino

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

PLLA - Poli(L-ácido láctico)

PLLA/HAP-30 – PLLA com 30% (m_m/m_p) de HAP pura

PLLA/HAP-CL-30 – PLLA com 30% (m_m/m_p) de HAP-CL

PLLA/HAP-CL-21 – PLLA com 21% (m_m/m_p) de HAP-CL

PLLA/HAP-CL-10 – PLLA com 10% (m_m/m_p) de HAP-CL

PLLA/HAP-CL-05 – PLLA com 05% (m_m/m_p) de HAP-CL

PLLA/TCP-30 – PLLA com 30% (m_m/m_p) de β -trifosfato de cálcio

PLLA-co-PIS - Poli(succinato de isorbila-*b*-L-lactídeo)

PLLA-co-PIS/HAP-CL-30 - Poli(succinato de isorbila-*b*-L-lactídeo) com 30% (m_m/m_p) de HAP-CL

PLLA-*g*-HAP – PLLA enxertado na superfície das nanopartículas de hidroxiapatita

PLLA-*g*-HAP-30 – PLLA com 30% (m_m/m_p) de PLLA-*g*-HAP

PIS - Poli(succinato de isosorbídeo)

RMN ^{13}C sólido – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (estado sólido)

SEC – Cromatografia de Exclusão por Tamanho

SFB – Soro Fetal Bovino

Sn(Oct) $_2$ - 2-etil-hexanoato de estanho (II)

TCP – Nanopartículas de β -trifosfato de cálcio

TEBAC - Cloreto de benziltriethylamônio

TGA – Análise termogravimétrica

TG/MS - Análise termogravimétrica acoplada com espectrômetro de massa

TRIS - Tris(hidroximetil)aminometano

E – Módulo de Young

σ - Tensão ruptura

ϵ - Deformação elástica

θ – ângulo de contato

θ_A – ângulo de avanço

θ_B - ângulo de recesso

$\Delta\theta$ - ângulo de histerese

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplo da aplicação de alguns materiais usados no corpo humano. Figura obtida de Silver e Doillon ¹	28
Figura 2. Representação esquemática da engenharia de tecidos.....	31
Figura 3. Exemplos de modelos estruturais de biomaterias mais utilizados como suporte para crescimento celular: (a) microestampas quadradas, (b) microestampas estriadas, (c, d) superfícies porosas e (e,f) superfícies fibrosas. Figura obtida de Martino <i>et al</i> ¹⁶	32
Figura 4. Estrutura interna do osso.....	34
Figura 5. Criação do defeito. (a, b) O osso é exposto e o defeito é criado. Primeiramente uma incisão é feita, depois uma retração da pele (a) e do periósteo; (b) a seta branca indica a calvária, a seta preta indica a linha sagital mediana no osso da calvária. (c) Com uma broca trefina um defeito de 8 mm é criado na calvária. (d) Posteriormente a calvária fica pontuada. Figura obtida de Spicer <i>et al</i> ⁴⁴	38
Figura 6. Esquema do isolamento das DPSCs. As polpas dentais são isoladas a partir de dentes recém extraídos e são digeridas com 0,3% de collagenase do tipo I para preparar uma única suspensão de célula. Esta suspensão é filtrada através de um filtro de 20 mm para a obtenção de células mais pequenas. A suspensão de células contendo células mais pequenas é carregada sobre um crivo poroso de 3 mm para recolher as células relativamente maiores na superfície do prato superior. Assim, as DPSCs podem ser preliminarmente purificadas. Figura obtida de Yan <i>et al</i> ⁶⁹	42
Figura 7. Estrutura de alguns polímeros biodegradáveis.....	44

Figura 8. Estrutura do poli(succinato de isosorbídeo- <i>b</i> - <i>L</i> -lactídeo).....	45
Figura 9. Estrutura cristalina da HAP. Figura obtida de Rivera-Muñoz.....	46
Figura 10. Esquema experimental para eletrofição.....	51
Figura 11. Espectro de Infravermelho do CL, HAP e HAP-CL.....	73
Figura 12. RMN ^{13}C sólido da HAP.....	74
Figura 13. RMN ^{13}C do CL puro.....	74
Figura 14. RMN ^{13}C sólido da HAP-CL.....	75
Figura 15. Curvas de TG e DTG da decomposição da HAP-CL e do MS (resposta para $m/z = 18$ e $m/z = 44$).....	77
Figura 16. Distribuição do diâmetro médio das nanopartículas de (A) HAP e (B) HAP-CL, obtidas por espalhamento de luz utilizando isopropanol como solvente dispersante.....	79
Figura 17. Espectro de Infravermelho da HAP, PLLA e PLLA- <i>g</i> -HAP.....	80
Figura 18. Curva de TGA da HAP e do PLLA- <i>g</i> -HAP.....	81
Figura 19. Filmes de PLLA contendo (A) 30% (m_m/m_p) de HAP-CL, (B) 30% (m_m/m_p) de PLLA- <i>g</i> -HAP e (C) 30% (m_m/m_p) de HAP.....	83
Figura 20. Efeito do teor de nanopartículas sobre as propriedades mecânica dos compósitos em filme. (a) módulo de Young, (b) tensão aplicada.....	85
Figura 21. Imagens de MEV obtidas para malhas eletrofiadas de (A) PLLA; (B) PLLA/HAP-CL-30; (C) PLLA/PLLA- <i>g</i> -HAP-30 e (D) PLLA/HAP-30.....	90
Figura 22. Estrutura interna das nanofibras eletrofiadas dos compósitos observadas por MET. PLLA/HAP (A) 5% (m_m/m_p) e (B) 30% (m_m/m_p); PLLA/PLLA- <i>g</i> -HAP (C) 5% (m_m/m_p) e (D) 30% (m_m/m_p); PLLA/HAP-CL (E) 5% (m_m/m_p) e (F) 30% (m_m/m_p).....	91

Figura 23. Tamanho médio das fibras de PLLA/HAP-CL nas seguintes concentrações (m_m/m_p): a) 5%, b) 10%, c) 21% d) 30%.....	92
Figura 24. Efeito do teor de HAP-CL sobre as propriedades mecânica dos compósitos em filme de PLLA-co-PIS. (a) módulo de Young e (b) tensão aplicada..	98
Figura 25. A – Imagem de MEV da fibra de PLLA-co-PIS eletrofiada, B – Imagem de MEV da fibra de PLLA-co-PIS eletrofiada com HAP-CL 5% (m_m/m_p), C – Imagem de MEV da fibra de PLLA-co-PIS eletrofiada com HAP-CL 10% (m_m/m_p), D E - Imagem de MEV da fibra de PLLA-co-PIS eletrofiada com HAP-CL 30% (m_m/m_p).....	100
Figura 26. Imagens de MET mostrando a estrutura interna das fibras dos compósitos. (a) PLLA-co-PIS pura (b) PLLA-co-PIS contendo HAP-CL 30% (m_m/m_p).....	101
Figura 27. Perda de massa das fibras de PLLA-co-PIS e PLLA-co-PIS/HAP-CL: 05, 10, 21 e 30% (m_m/m_p) em função da degradação pelo tempo em PBS.....	102
Figura 28. MEV das malhas eletrofiadas antes (1) e após (2) o ensaio de degradação (120 dias). (A) PLLA-co-PIS, (B) PLLA-co-PIS/HAP-CL-5, (C) PLLA-co-PIS/HAP-CL-10, (D) PLLA-co-PIS/HAP-CL-21 e (E) PLLA-co-PIS/HAP-CL-30.....	103
Figura 29. Medidas de pH no meio da cultura durante o processo de degração das fibras de PLLA-co-PiS e PLLA-co-PIS com HAP-CL: 05, 10, 21 e 30% (m_m/m_p)....	105
Figura 30. Ensaio de MTT nas fibras de PLLA e PLLA com HAP-CL 05, 10, 21 e 30% (m_m/m_p) de HAP-CL utilizando células NIH-3T3 de fibroblasto. Teste Anova: diferença significativa * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).....	107
Figura 31. Atividade da ALP nas fibras de PLLA e PLLA com HAP-CL 05, 10, 21 e 30% (m_m/m_p) utilizando células de DPSCs. Teste Anova: diferença significativa * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).....	109

Figura 32. Atividade da ALP nas fibras de PLLA e PLLA com HAP 30, PLLA-g-HAP-30, TCP-30 e HAP-CL-30 utilizando as células DPSC. Teste Anova: diferença significativa * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).....110

Figura 33. Atividade da ALP nas fibras de PLLA, PLLA/HAP-CL-30, PLLA-co-PIS e PLLA-co-PIS/HAP-CL-30 utilizando DPSCs. Teste Anova: diferença significativa * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).....111

Figura 34. Análise da deposição mineral nas fibras de PLLA, PLLA com HAP-CL 05, 10, 21 e 30% (m_m/m_p) pelo teste de ARS utilizando as células DPSCs. (A) Fotografia da coloração ARS mostrando uma maior deposição de cálcio nas fibras de PLLA/HAP-CL-30 durante 14 dias (B) Fotografia da coloração ARS mostrando uma maior deposição de cálcio nas fibras de PLLA/HAP-CL-30 durante 21 dias (C) O resultado mostrou a quantificação mais elevada da coloração para PLLA/HAP-CL-30 durante os dias 14 e 21. Teste Anova: diferença significativa * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).....113

Figura 35. Análise da deposição mineral nas fibras de PLLA, PLLA/HAP-30, PLLA/PLLA-g-HAP-30, PLLA/TCP-30 e PLLA/HAP-CL-30 pelo teste de ARS utilizando DPSCs. (A) Fotografia da coloração ARS mostrando uma maior deposição de cálcio nas fibras de PLLA/HAP-CL-30 durante 14 dias (B) Fotografia da coloração ARS mostrando uma maior deposição de cálcio nas fibras de PLLA/HAP-CL-30 durante 21 dias (C) O resultado mostrou a quantificação mais elevada da coloração ARS para a amostra de PLLA/HAP-CL-30 durante os dias 14 e 21. Teste Anova: diferença significativa * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).....115

Figura 36. Análise da deposição mineral nas fibras de PLLA, PLLA/HAP-CL-30, PLLA-co-PIS, PLLA-co-PIS/HAP-CL-30 pelo teste de ARS utilizando DPSC. (A) Fotografia da coloração ARS mostrando uma maior deposição de cálcio nas fibras

de PLLA-co-PIS/HAP-CL-30 durante 14 dias (B) Fotografia da coloração ARS mostrando uma maior deposição de cálcio nas fibras de PLLA-co-PIS/HAP-CL-30 durante 21 dias (C) O resultado mostrou a quantificação mais elevada da coloração ARS para a amostra de PLLA-co-PIS/ HAP-CL-30 durante os dias 14 e 21. Teste Anova: diferença significativa * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).....116

Figura 37. Imagens de imunofluorescência de OSC (esquerda) e DAPI (direita) nas células de DPSCs cultivadas sobre os suportes: (A) PLLA; (B) PLLA/HAP-CL-30; (C) PLLA-co-PIS e (D) PLLA-co-PIS/HAP-CL-30..... 118

Figura 38. Imagens de imunofluorescência de OSP (esquerda) e DAPI (direita) nas células de DPSCs cultivadas sobre os suportes: (A) PLLA; (B) PLLA/HAP-CL-30; (C) PLLA-co-PIS e (D) PLLA-co-PIS/HAP-CL-30..... 119

Figura 39. Modelo de defeito craniano bilateral. (a) Espessura do defeito de 5 mm x 5 mm. (b) Preenchimento do defeito com suportes de PLLA/HAP-CL-30 e PLLA-co-PIS/HAP-CL-30 (na esquerda suporte sem célula, na direita suporte com $1,0 \times 10^6$ DPSCs).....120

Figura 40. Micro-CT mostrando o defeito na calota craniana após 16 semanas do implante *in vivo*. a) Implante com PLLA-co-PIS/HAP-CL-30, a esquerda suporte sem DPSCs, a direita suporte com DPSCs, flechas amarelas indicam neoformação óssea. b) Implante com PLLA/HAP-CL-30, a esquerda suporte sem DPSCs, a direita suporte com DPSCs.....121

Figura 41. Histologia da calota craniana reparada após 16 semanas do implante *in vivo*. Coloração de hematoxilina e eosina da calota reparada implantada com PLLA-co-PIS/HAP-CL-30: suporte sem DPSCs (a, b), suporte com DPSCs (c,e) aumento de 10 X, suporte com DPSCs (d,f) aumento de 20 X. Coloração de hematoxilina e eosina da calota reparada implantada com PLLA/HAP-CL-30: suporte sem DPSCs

(g), suporte com DPSCs, ambas com aumento de 20 X. Flechas amarelas indicam o osso antigo, flechas verdes indicam osso novo.....123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem de carbono (C), hidrogênio (H), nitrogênio (N) e a porção estimada de laurato funcionalizada na superfície das HAP por AE e por TG (N_f).....	78
Tabela 2. Medidas de ângulo de contato realizadas em filmes de PLLA com diferentes conteúdos de HAP-CL e PLLA- <i>g</i> -HAP em <i>wafer</i> de silício.....	87
Tabela 3. Ângulo de histerese realizado em filmes de PLLA com diferentes conteúdos de HAP-CL e PLLA- <i>g</i> -HAP determinado pela diferença do ângulo de avanço (θ_A) e ângulo de recesso (θ_B).....	88
Tabela 4. Densidade aparente (r) e porosidade das malhas eletrofiadas dos compósitos de PLLA.....	93
Tabela 5. Medidas de ângulo de contato realizadas em malhas eletrofiadas de PLLA com diferentes conteúdos de HAP-CL e PLLA- <i>g</i> -HAP.....	95

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Síntese do PLLA-co-PIS (1 ^a .etapa). Extensão de cadeia do PLLA-co-PIS (2 ^a . etapa).....	59
Esquema 2. Enxertia de PLLA na superfície das nanopartículas de hidroxiapatita..	60
Esquema 3. Funcionalização de laurato na superfície da HAP.....	61

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida, devido a diversos fatores que vão desde melhorias na qualidade dos alimentos até os crescentes avanços na medicina, os seres humanos se depararam com diversos problemas relacionados à idade avançada, antes não vislumbrados, como problemas degenerativos e dificuldades de recuperação em acidentes como fraturas ou perdas teciduais.

Entre a população mais jovem, o grande problema vem sendo os traumas causados em acidentes de trânsito. Segundo dados do Departamento Nacional de Trânsito (Denatran) a cada ano tem aumentado o número de mortos e feridos devido a acidentes de trânsito entre pessoas de 18 a 29 anos nas estradas e rodovias. Devido a este aumento no número de traumas, perdas de tecidos, ou doenças degenerativas, vem crescendo a necessidade de implantes para a substituição de partes danificadas do corpo, que perderam total ou parcialmente suas funções. A utilização de novas técnicas de análises clínicas tais como ressonância magnética e tomografia computadorizada, auxilia na identificação das causas que levaram à perda das funções. Entretanto, identificar a causa (ou causas) do problema não é suficiente. É preciso que se tome uma ação corretiva que permita a recuperação da função perdida, de tal forma que o paciente possa voltar a viver uma vida normal.

Com isso as inovações produzidas dentro da engenharia biomédica trouxeram benefícios às pessoas como o desenvolvimento de alguns materiais que podem substituir quadris, joelhos, válvulas cardíacas, cartilagens e outros que podem ser usados como próteses mamárias, ocular, vascular, tubo para regeneração e até pele artificial^{1,2} (Figura 1).

Figura 1. Exemplo da aplicação de alguns materiais usados no corpo humano. Figura obtida de Silver e Doillon¹.

Nesse contexto a busca por novas formas terapêuticas tem se intensificado de maneira a se encontrar tratamentos que consigam sanar esses “novos” problemas citados anteriormente. Até hoje o auto-enxerto ósseo (enxerto autólogo) é a técnica mais utilizada pelos médicos em casos (traumas severos, má formações, tumores, etc) onde é necessária uma fonte provedora de tecido ósseo, como por exemplo, osso ilíaco ou mandíbula (enxertia dentária). Porém, dependendo da extensão do trauma, a fonte é limitada, e a abertura de um segundo campo cirúrgico (doador) provoca mais dor ao paciente, e aumentam as chances de complicações. Assim, novas terapias têm sido desenvolvidas, dentre elas a engenharia de tecidos ósseos^{3,4}. Uma dessas novas terapias é a utilização de células-tronco, que tem por objetivo acelerar e induzir a reconstituição óssea. No entanto células-tronco não podem ser utilizadas sozinhas, necessitando de um suporte que as permitam se

desenvolver e formar o tecido novo⁵. Para que seja possível essa abordagem, o desenvolvimento de suportes adequados para o crescimento e diferenciação celular é crucial⁴.

1.1 Engenharia de Tecidos

Como em quase todo campo da pesquisa biomédica, a pesquisa em transplante de órgãos foi desenvolvida graças ao uso de células e técnicas de cultura de tecido. A primeira cultura de tecido foi realizada na Universidade Johns Hopkins em 1907, quando Ross Harrison demonstrou que o tecido neural do sapo poderia ser mantido do lado de fora do organismo⁶. Com isso alguns métodos de coleta, purificação, armazenagem, caracterização e o uso de doadores de sangue melhoraram continuamente ao longo dos séculos, particularmente depois da descoberta da tipagem sanguínea por Landsteiner. As primeiras células geneticamente modificadas foram introduzidas em pacientes na década de 80. Nestes pacientes as células foram manipuladas para expressar marcadores de genes que permitam sua identificação no corpo⁷.

As últimas décadas trouxeram grandes progressos em transplantes, principalmente por causa da melhoria das técnicas cirúrgicas e agentes imunossupressores. Infelizmente, todos os procedimentos de transplantes sofrem um problema comum: a demanda por tecidos viáveis, ou doadores de órgão que estão distantes. De fato, alguns pacientes sofrem deficiência em algum órgão ou tecido, e transplantes, transfusões, e enxertos são a única esperança para a sobrevivência em muitos casos. Além disso, os dilemas éticos devido a disponibilidade de órgãos humanos são frequentemente discutidos. Uma possível

solução para muitas deficiências de órgãos e tecidos é o desenvolvimento de melhores métodos para a engenharia de tecido⁸.

A engenharia de tecidos é um campo multidisciplinar que envolve a aplicação dos conhecimentos da engenharia e da ciências da vida para os entendimentos estruturais e funcionais de tecidos normais e patológicos de mamíferos e o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função do tecido^{8,9}. O conceito fundamental da engenharia de tecidos é combinar um suporte com células vivas para formar a estrutura de um novo tecido¹⁰. Um suporte adequado deve possuir: (i) uma rede de poros interligados com propriedades que são otimizadas para a fixação, migração, proliferação e diferenciação dos tipos de células de interesse e permitir o transporte do fluxo de nutrientes e resíduos metabólicos e (ii) ser compatível e biodegradável, com taxa controlável para o crescimento da célula ou tecido e maturação¹¹ (Figura 2). Além disso, o tamanho externo e o formato são importantes na construção de um suporte e, normalmente, a construção deve ser personalizada para um determinado paciente¹².

Outra questão importante no desenvolvimento de um suporte é a sua biodegradabilidade, necessária para a absorção do suporte pelo tecido ao redor do implante, dispensando a necessidade de remoção cirúrgica. É preferível que a velocidade de degradação do suporte se adapte a velocidade de formação do novo tecido¹³. Por isso, a maioria dos suportes são feitos de polímeros biodegradáveis, produzidos para se degradarem lentamente no corpo, desaparecendo quando as células começarem o processo de regeneração. A biocompatibilidade é outra questão importante, pois o material de que é composto o suporte não deve ser tóxico para as células, tanto na sua forma original quanto na sua forma degradada¹⁴.

Figura 2. Representação esquemática da engenharia de tecidos.

A morfologia dos biomateriais usados como suportes para crescimento celular também tem um aspecto relevante, pois deve fornecer um microambiente informativo que imite um nicho fisiológico e permita que as células-tronco interpretem as instruções dos biomateriais. Com base na sua estrutura, o biomaterial transmitirá sinais específicos para as células que serão decodificados em sinais bioquímicos, sendo parâmetros críticos para o sucesso da adesão e proliferação celular¹⁵. Existem modelos estruturais bastante utilizados como suportes para crescimento de células-tronco como: (a) superfícies microestampadas (quadradas ou estriadas) (b) superfícies porosas e (c) fibrosas¹⁶, ilustrados na Figura 3.

Figura 3. Exemplos de modelos estruturais de biomaterias mais utilizados como suporte para crescimento celular: (a) microestampas quadradas, (b) microestampas estriadas, (c, d) superfícies porosas e (e,f) superfícies fibrosas. Figura obtida de Martino *et al*¹⁶.

Os avanços na área de produção de biomateriais para a engenharia de tecido estão voltados para o desenvolvimento de materiais que imitem a matriz extracelular celular nativa (ECM)⁹. As proteínas da ECM regulam o comportamento das células através das interações com receptores da superfície celular, tais como as integrinas,

resultando na ligação entre as células, ou entre as células e a matriz, exercendo um papel importante para a adesão e proliferação celular¹⁷.

Como foi observado até agora, o comportamento das células pode ser altamente dependente do substrato em que são cultivadas, e a compreensão das interações celulares com substratos nanoestruturados poderiam fornecer informações valiosas que permitam a criação de melhores suportes para a engenharia de tecidos. Suportes de nanofibras são nanoestruturadas e imitam os componentes fibrosos do tecido natural, permitindo que as configurações tridimensionais forneçam estímulos químicos e biológicos para as células¹⁸. A fim de obter uma melhor compreensão do efeito da arquitetura das nanofibras no comportamento celular, os resultados experimentais são apresentados de acordo com a morfologia das células, o alinhamento, a viabilidade, a produção de ECM, diferenciação e a migração.^{18,19}

Até agora, relativamente poucos polímeros foram utilizados para produzir nanofibras²⁰. Ao mesmo tempo, a bioatividade, as propriedades mecânicas, a taxa de degradação, e distribuição de fases dentro das nanofibras constituída de blendas poliméricas precisam de mais investigações antes de qualquer aplicação prática. Interação dinâmica entre célula e nanofibras, bem como o mecanismo para a liberação controlada também requererem um estudo aprofundado, especialmente por meio de ensaios *in vivo*. Com interesse em terapias minimamente invasivas para a regeneração do tecido, o ideal é adaptar as nanofibras tornando-as injetáveis, mantendo as propriedades mecânicas das nanofibras¹⁸.

1.1.1 Engenharia de tecido ósseo

Alguns distúrbios ósseos são de grande preocupação devido ao aumento na idade média da nossa população. Tradicionalmente, os enxertos ósseos têm sido utilizados para restaurar ossos danificados²¹. Os biomateriais sintéticos já estão sendo utilizados como substitutos ósseos²². Estes biomateriais foram inicialmente selecionados para a restauração estrutural com base em suas propriedades biomecânicas. Depois, os suportes foram projetados para ser bioativos ou bioabsorvíveis para aumentar o crescimento do tecido²³. Uma outra classe de suportes são projetados para induzir a formação do osso e da vascularização²⁴.

Seguindo a abordagem dos suportes para crescimento celular, como forma de reproduzir temporariamente a matriz extracelular do osso, é necessário olhar para a sua estrutura (Figura 4).

Figura 4. Estrutura interna do osso.

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e uma matriz extracelular calcificada, a matriz óssea. Todos os ossos são

revestidos em suas superfícies externas e internas por membranas conjuntivas que possuem células osteogênicas (ou seja, células que atuam na formação óssea), o periósteo e o endósteo, respectivamente. O osso é um tecido altamente dinâmico, que experimenta remodelação constante durante toda a vida. A homeostase é alcançada através das ações combinadas de células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos, bem como osteoclastos²⁵. Em geral, a formação do osso é efetuada através da proliferação de células osteoprogenitoras, e na diferenciação em osteoblastos, que são responsáveis pela regulação da produção do colágeno e na mineralização por meio da expressão de proteínas funcionais, tais como osteocalcina (OSC), osteopontina (OSP) e fosfatase alcalina (ALP)²⁶. A ALP é uma enzima periplasmática (encontrada na membrana das células e na vesícula), que provoca a hidrólise do pirofosfato (inibidor da mineralização), e assim os íons (PO_4^{3-}) ficam disponíveis para promover a mineralização²⁷. A OSC regula a velocidade e o tamanho da formação dos cristais durante a mineralização²⁸, enquanto a OSP influencia no tipo de cristal formado²⁹.

É importante compreender as propriedades biológicas e biomecânicas do osso, a fim de obter informações sobre a escolha dos tipos de materiais que podem ser melhores utilizados para reconstruir as funções regenerativas do osso. Em comparação com os tecidos moles, o osso é fisicamente duro, rígido e forte, e microscopicamente contém poucas células com matriz intercelular abundante, sob a forma de fibras colagenosas e substâncias inorgânicas como reforço³⁰. Assim, suportes para a regeneração e ou substituição óssea são geralmente feitos de metal, cerâmica, polímeros, compósitos, e mais recentemente, nanocompósitos. Esta utilização é devido a sua grande resistência mecânica, porosidade,

biocompatibilidade, o que permite a adesão celular, migração e proliferação resultando numa boa integração com o tecido ao redor³¹.

Atualmente, embora os materiais para suportes facilitem a fixação das células-tronco, fornecendo uma estrutura de poros interligados para suportar a migração, proliferação e diferenciação, as limitações da primeira geração de suportes de cerâmica bioabsorvíveis, que são ainda usados, são devido às propriedades mecânicas deficientes e seu comportamento frágil^{32,33}. Compósitos de polímero-cerâmica estão sendo explorados como uma alternativa para resolver as limitações mecânicas da primeira geração³⁴. Polímeros permitem propriedades reológicas adequadas, enquanto a fase cerâmica contribui para a melhoria das propriedades mecânicas, osteoindução e osteocondução³³.

Em um trabalho recente, Park *et al.*³⁵ elaboraram um suporte de fibras orientadas criando microcanais orientados perpendicularmente para controlar melhor a infiltração do tecido formado e restaurar grandes defeitos ósseos. No outro estudo, Zhang *et al.*³⁶ conseguiriam melhorar em 280% a força dos compósitos de PLLA com 10% m/m de nanodiamantes funcionalizados com octadecilamina.

A medicina regenerativa e as abordagens da engenharia de tecido ósseo incluem uma ampla gama de aplicações que visam reparar, aumentar, substituir o tecido danificado. A formação do novo osso depende do recrutamento, modulação das células progenitoras ou na diferenciação celular³⁷. Estas células requerem um substrato adequado para desempenhar a sua função biológica através da adesão, proliferação e diferenciação em um ambiente controlado, dando origem a um tecido maduro, com propriedades biomecânicas apropriadas³⁸.

Os ensaios *in vitro* dão grandes contribuições para a compreensão dos mecanismos biológicos fundamentais (transcrição, tradução, eventos de sinalização

intracelular, regulação do ciclo celular e a interação ligante e receptor), análise da atividade biológica, toxicidade, imunogenicidade ou a avaliação direta ou indireta das repostas das células semeadas sobre um material³⁹. Além disso, os modelos *in vitro* de maior complexidade estão sendo desenvolvidos, englobando a utilização de biorreatores para um acesso mais rápido às respostas biológicas em suportes tridimensionais e modelos de co-cultura com diferentes populações celulares^{39,40}. Mesmo assim, os ensaios *in vitro* revelam limitações significativas na sua capacidade de recriar as complexidades no ambiente *in vivo*, e são incapazes de prever o desempenho e a evolução clínica⁴¹.

Muitas estratégias diversificadas estão sendo investigadas para enfrentar os desafios apresentados pelas doenças relacionadas com o tecido ósseo⁴². Porém, testes adequados destas estratégias são necessários antes da sua aplicação em humanos. Historicamente, a experimentação de produtos farmacêuticos, dispositivos médicos e estratégias médicas em modelos animais tiveram um papel fundamental na introdução de muitas terapias em clínicas⁴³. Apesar das preocupações éticas e os esforços para desenvolver alternativas à experimentação animal, modelos animais padronizados são componentes cruciais para o desenvolvimento da tecnologia médica⁴⁴. Muitas espécies são usadas como modelos animais de defeitos ósseos, incluindo camundongos, ratos, coelhos, cães, porcos, ovelhas e cabras, mas grande parte da pesquisa centrou-se em modelos de roedores por causa da reprodutibilidade, rendimento e economia^{45,46,47}. Descrito pela primeira vez em 1973, a calota craniana do rato permite um defeito reprodutível, que pode ser feito rapidamente e não requer a fixação para estabilização do esqueleto, tal como é geralmente necessário nos defeitos femorais²⁴. Assim, tendo em consideração o objetivo da estratégia do biomaterial ou da regeneração óssea, o defeito na calota

craniana pode servir como um método rápido para a avaliação da regeneração óssea *in vivo*⁴⁸.

Spicer *et al.*⁴⁴ descreveram um protocolo para um modelo de defeito de calvaria em ratos, que permite a avaliação de biomateriais e abordagens de engenharia de tecidos ósseos permitindo uma boa reprodutibilidade (Figura 5). Esta técnica tem sido bem utilizada nas pesquisas atuais para avaliar a capacidade de formação óssea *in vivo* após implantes realizados com diferentes tipos de suportes^{49,50}.

Figura 5. Criação do defeito. (a, b) O osso é exposto e o defeito é criado. Primeiramente uma incisão é feita, depois uma retração da pele (a) e do periósteo; (b) a seta branca indica a calvária, a seta preta indica a linha sagital mediana no osso da calvária. (c) Com uma broca trefina um defeito de 8 mm é criado na calvária. (d) Posteriormente a calvária fica pontuada. Figura obtida de Spicer *et al.*⁴⁴.

1.1.2 Células-Tronco

Células-tronco são células auto-renováveis e diferenciáveis, ou seja, são capazes de produzir novas células com as mesmas características de si mesmas ou produzir novas células com propriedades específicas de certos tecidos⁵¹.

Há dois tipos de células-tronco, as chamadas células-tronco embrionárias (*embryonic stem cells* – ESCs), que são células-tronco derivadas da massa celular de embriões e que, teoricamente, podem se diferenciar em qualquer tipo de célula, e as células-tronco “adultas” ou mesenquimais (*mesenchymal stem cell* – MSCs), que são derivadas de órgãos e tecidos adultos, como músculos, tecido adiposo e medula óssea⁵². Essas células possuem sua diferenciação limitada a certos tipos de tecidos, o que restringe seu potencial terapêutico⁵³.

Devido a conflitos éticos, células-tronco embrionárias humanas (hESC) têm seu estudo restrito e algumas vezes até proibido em diversos países, enquanto o uso terapêutico e a pesquisa com células tronco mesenquimais humanas (hMSCs) são mais amplamente aceitos pela sociedade. No Brasil a Lei de Biossegurança aprovada em 2005 e que permite o uso de ESCs tem sido contestada no Supremo Tribunal Federal, através de uma ADIN (Ação Direta de Inconstitucionalidade) impetrada pelo Ministério Público da República.

Células-tronco têm seu potencial terapêutico visto como virtualmente ilimitado uma vez que podem se diferenciar em qualquer tecido humano, tendo como alvo seu estudo no tratamento de diversas doenças como doenças neurodegenerativas⁵⁴, diabetes tipo-1⁵⁵ e traumas ósseos⁵⁶. Destes, os traumas ósseos foram escolhidos como alvo do estudo desenvolvido neste trabalho.

Os ossos são compostos de um tecido dinâmico com uma ampla capacidade regenerativa que, em condições normais, é capaz de manter a homeostase e de reparar pequenas fissuras⁵⁷. No entanto esta capacidade regenerativa não é suficiente em casos de defeitos mais severos, como os causados por traumas mais violentos, má formação e infecções mais graves⁵. Para situações como estas intervenções cirúrgicas são freqüentemente requeridas⁵⁸.

Os métodos cirúrgicos de reparo ósseo tradicionais normalmente são eficazes, mas em sua maioria dependem de uma fonte provedora de tecido ósseo. Dessa forma, para lesões onde esta fonte de tecido ósseo está comprometida ou indisponível, há uma grande vantagem no uso de terapias celulares, nas quais uma fonte de tecido é transferida para o local do trauma de forma a reparar o dano⁵. Nesse contexto o uso de células-tronco em cirurgia de reparo ósseo tem sido vastamente estudado^{49,50,59,60}.

Células-tronco são utilizadas para acelerar e induzir a reconstituição óssea de áreas afetadas por traumas ósseos severos, como fonte de tecido. No entanto células-tronco não podem ser utilizadas sozinhas, necessitando de um suporte que as permitam se desenvolver e formar o tecido novo. Como suporte, diversos materiais podem ser utilizados como: colágeno, hidroxiapatita e polímeros bioabsorvíveis^{61,62}. Por exemplo, Daculsi *et al.*⁶³ averiguaram a proporção entre HAP e TCP em um suporte promotor da indução da formação óssea utilizando hMSCs, determinando a proporção ótima em 20/80 HAP/TCP. Em outro estudo, Yang *et al.*⁶⁴ investigaram o comportamento das células-tronco de polpa de dente (DPSCs) cultivadas em fibras eletrofiadas de PCL/Gelatina com e sem HAP, e concluíram que a incorporação de HAP nas nanofibras aumentou a expressão das DPSCs em fenótipos do tipo odontoblastos tanto *in vitro* como *in vivo*.

As células-tronco utilizadas na engenharia de tecido podem ser extraídas de polpa de dente^{65,66,67}. A seguir, será detalhada a importância das células tronco de polpa de dente neste trabalho.

1.1.2.1 Células-tronco de polpa de dente

As primeiras DPSCs foram isoladas a partir de terceiros molares permanentes e exibiu maior proliferação e alta frequência de formação de colônias que produziram nódulos calcificados⁶⁵. As DPSCs podem ser encontradas dentro da zona rica celular da polpa dental, tanto em adultos como crianças⁶⁶. Sua origem embrionária das cristas neurais (grupo de células embrionárias, derivadas do revestimento do tubo neural) explica o seu amplo potencial terapêutico⁶⁶⁻⁶⁷. A grande vantagem das DPSCs é que a sua extração a partir da polpa dentária é uma prática não invasiva, que pode ser realizada no adulto, durante a vida, nos jovens, após a extração cirúrgica dos dentes do siso, e de crianças, a partir de dentes decíduos (dente-de-leite), uma prática cirúrgica comum. Além disso, as DPSCs são ideais para a engenharia de tecidos e para uso clínico em diversas patologias que requerem o crescimento do tecido ósseo para a reparação⁶⁸. A Figura 6 mostra um esquema de isolamento das DPSCs⁶⁹.

A diferenciação das DPSCs a uma linhagem celular específica é determinada principalmente pelos componentes do microambiente local, tais como: fatores de crescimento; moléculas receptoras; moléculas de sinalização; fatores de transcrição e proteínas de matriz extracelular⁷⁰. As DPSCs podem ser reprogramadas em várias linhagens celulares, como: odontoblastóides, osteoblastos, condrócitos, miócitos,

células neurais, adipócitos, células do epitélio da córnea, células de melanoma e células-tronco pluripotentes induzidas (células iPS)⁷⁰⁻⁷¹.

Figura 6. Esquema do isolamento das DPSCs. As polpas dentais são isoladas a partir de dentes recém extraídos e são digeridas com 0,3% de colagenase do tipo I para preparar uma única suspensão de célula. Esta suspensão é filtrada através de um filtro de 20 µm para a obtenção de células menores. A suspensão de células contendo células menores é carregada sobre um crivo poroso de 3 µm para recolher as células relativamente maiores na superfície do prato superior. Assim, as DPSCs podem ser preliminarmente purificadas. Figura obtida de Yan *et al*⁶⁹.

Um indutor bastante usado para a diferenciação osteogênica das DPSCs é a dexametasona, que é um indutor sintético da classe dos corticosteroides⁷². Nas culturas celulares essa substância é combinada com β -glicerolfosfato e ácido ascórbico⁷²⁻⁷³. Um outro indutor que também tem sido usado é a Vitamina D₃^{73b}. Khanna-Jain *et al*⁷⁴ fizeram uma comparação entre os dois indutores mais usados e verificaram que a Vitamina D₃ apresentou um maior potencial osteogênico. As DPSCs, quando submetidas a pré-diferenciação em osteoblastos, formam uma matriz extracelular que se torna um tecido ósseo, tecido calcificado⁷⁵.

1.2 Biomateriais Poliméricos

Um biomaterial é definido como qualquer substância concebida para interagir com o sistema biológico para tratamento médico⁷⁶. Os biomateriais devem ser biocompatíveis, ou seja, devem desempenhar sua função sem causar reação inflamatória. Para encontrar as necessidades das diferentes aplicações, a composição dos materiais geralmente pesquisados são: metal, cerâmica, polímeros (sintéticos e naturais) e suas combinações. Os polímeros possuem um potencial significativo nesta área devido a diversos fatores como: baixa densidade, facilidade de fabricação em diversos formatos, elevada eficiência dos processos de fabricação permitindo elevada produtividade, baixo consumo energético para o processamento, comportamento elastomérico, possibilidade de polimerização *in situ* e resistência à corrosão⁹. Alguns polímeros biodegradáveis tem recebido grande atenção por serem bioabsorvíveis^{3,77}.

Os polímeros são as principais matérias primas para a fabricação de suportes em aplicações na engenharia de tecidos e diversos tipos de materiais poliméricos biodegradáveis têm sido já utilizados neste campo. Eles podem ser classificados como: (1) os materiais de base natural, incluindo os polissacarídeos (amido, alginato, quitina/quitosana, derivados do ácido hialurônico) ou proteínas (soja, o colágeno, a fibrina, géis, seda), (2) os polímeros sintéticos, tais como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), policaprolactona (PCL), poli(ácido γ -hidroxibutírico) (PHB)^{78,79}. A Figura 7 mostra as estruturas dos biopolímeros mais utilizados como suportes para crescimento celular⁷⁷.

Figura 7. Estrutura de alguns polímeros biodegradáveis.

Uma classe de poliésteres biodegradáveis pouco explorada é a de derivados de deidroalditóis e diácidos alquílicos⁸⁰. Os deidroalditóis são substâncias com grande potencial para serem utilizadas na produção de polímeros biodegradáveis, por apresentarem dois grupos hidroxilas (um diol alifático), estabilidade térmica e química, não-toxicidade e provirem de recursos naturais (derivados de amido)^{81,82}. Em um trabalho de revisão Fenouillot *et al.*⁸² mostraram o uso do 1,4:3,6-dianidroexitol: isosorbídeo, isomanídeo e isoidídeo como monômeros na síntese de polímeros biodegradáveis. Casarano *et al.*⁸³ demonstraram uma superioridade na adesão celular de fibroblastos em suportes eletrofiados de copolímeros em bloco contendo succinato de isosorbídeo e L-lactídeo, poli(succinato de isosorbídeo-*b*-L-lactídeo) (PLLA-co-PIS), em comparação com fibras de PLLA puro. A Figura 8 ilustra a estrutura do PLLA-co-PIS.

Figura 8. Estrutura do poli(succinato de isosorbídeo-*b*-*L*-lactídeo)

Materiais poliméricos com uma vasta gama de propriedades mecânicas e de degradação são necessários para reproduzir as propriedades dos diferentes tecidos a serem tratados.

Para a engenharia de tecido ósseo, polímeros de alta resistência geralmente são empregados como material para osso lamelar, tais como o fêmur⁸⁴. Polímeros com baixa resistência podem ser empregados em áreas como tornozelos, falanges e na fabricação de parafusos fixos³. Porém, com a motivação de melhorar as propriedades mecânicas do biopolímero e aumentar a integridade estrutural para suportar a carga durante o implante, é crescente o interesse no desenvolvimento de compósitos e nanocompósitos para a regeneração óssea através da combinação de um biopolímero e um material inorgânico como a hidroxiapatita^{31, 84-85}.

1.2.1 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HAP) é um material biocompatível, que é amplamente utilizado na substituição de materiais para a regeneração óssea⁸⁶, pois a HAP nanoestruturada é o principal componente presente em tecidos duros⁸⁷. Existem diferentes tecidos calcificados no corpo humano, divididos em várias categorias, porém todos têm algo em comum: um componente proteico (colágeno) e um componente inorgânico (HAP)²⁵. A HAP cristaliza-se no sistema hexagonal, grupo

espacial $P6_3/m$ e dimensões de célula unitária $a=b=9,42 \text{ \AA}$ e $c= 6,88 \text{ \AA}$. A célula unitária hexagonal da HAP contém 10 íons cálcio localizados em sítios não equivalentes, quatro no sítio I (Ca_I) e seis no sítio II (Ca_{II}). Os íons cálcio no sítio I estão alinhados em colunas, enquanto os íons cálcio do sítio II estão em triângulos equiláteros perpendiculares ao eixo principal da estrutura. Os cátions do sítio I estão coordenados a 6 átomos de oxigênio pertencentes a diferentes tetraedros de PO_4 e também a 3 outros átomos de oxigênio relativamente distantes. Os átomos de oxigênio dos íons hidroxila estão situados a $0,9 \text{ \AA}$ abaixo do plano formado pelos triângulos de cálcio e a ligação O-H forma um ângulo de aproximadamente 30° na direção do eixo principal (Figura 9).

Figura 9. Estrutura cristalina da HAP. Figura obtida de Rivera-Muñoz⁸⁸.

A HAP possui propriedades bioativas em relação as células e tecidos ósseos, devido à sua presença em tecidos duros do corpo^{86, 89}. Pesquisas atuais lidam com novas formulações da HAP visando aplicações biomédicas mais eficazes, produzindo este material com propriedades mais próximas às do osso vivo, como estruturas nanométricas e monolíticas⁸⁹.

Métodos sustentáveis de produzir nanopartículas de HAP sintética foram desenvolvidos, a fim de atender a crescente demanda por esses materiais e progredir no que diz respeito à regeneração do tecido rígido, especialmente em aplicações ortopédicas e dentárias⁹⁰.

As nanopartículas de HAP podem ter sua superfície modificada, a fim de melhorar a sua compatibilidade em nanocompósitos⁹¹. Além disso, as modificações na superfície de nanopartículas de HAP também modulam a sua estabilidade coloidal, previnem sua dissolução, previnem a inflamação, e provê uma camada intermediária que permite a formação de uma ligação forte entre as matrizes HAP-polímero, e, potencialmente, aumentam a sua bioatividade ou melhoram a sua capacidade de conjugação com grupos funcionais especiais^{92,93}. Zakaria *et al.*⁸⁷ mostrou em um recente trabalho de revisão várias técnicas de fabricação e modificação da HAP. Entre as técnicas de obtenção da HAP que abordaram estão: o método hidrotérmico, o método sol-gel e o método químico em meio aquoso^{91, 94}. Entre as técnicas para as modificações de superfície estão: a radiação a laser, acoplamento de grupos silanos e acoplamento de polieletrólitos em meio aquoso⁹⁵.

Silva *et al.*⁹⁶ funcionalizaram a superfície das HAP com agentes organossilano com o objetivo de aumentar sua capacidade de adsorção. Kumar *et al.*⁹⁷ fizeram uma modificação na superfície da HAP polarizando-a eletricamente com vapor de água e ar, criando assim uma carga positiva e negativa na superfície, o que aumentou a adesão e proliferação de osteoblastos nos suportes com HAP^{97,98}.

1.2.2 Compósitos e nanocompósitos

Compósitos podem ser definidos como materiais formados por dois ou mais componentes com distintas composições, estruturas e propriedades, que mantêm suas características iniciais durante sua produção e seu processamento^{9, 99}. O principal objetivo da produção de compósitos é combinar diferentes materiais, que possuam diferentes características, para produzir um dispositivo com propriedades superiores às propriedades dos materiais unitários¹⁰⁰. A combinação de materiais poliméricos com materiais cerâmicos permitiu a produção de novos materiais que apresentam propriedades específicas superiores ao aço, alumínio e outros⁹.

Alguns compósitos formados a partir da combinação de biopolímeros com biocerâmicas podem gerar materiais com propriedades mecânicas comparáveis às propriedades de alguns tecidos humanos⁸⁶, ajustando as proporções de seus componentes para obter as propriedades desejadas¹⁰¹. Além desta versatilidade, compósitos também apresentam outras vantagens frente a outros tipos de materiais para aplicações biomédicas como: menor densidade, menor suscetibilidade à fratura por fadiga, menor suscetibilidade à corrosão, ausência de magnetismo, viabilizando sua avaliação por técnicas como ressonância magnética nuclear e tomografia, tenacidade à fratura superior às cerâmicas e possibilidade de ser moldados de acordo com as necessidades da aplicação⁹⁹.

Com o advento da nanotecnologia, o desenvolvimento de nanocompósitos orgânicos-inorgânicos, muitas vezes obtidos por enxerto de polímeros sintéticos em nanopartículas inorgânicas ou pela adição de nanopartículas modificadas em matrizes poliméricas, permitiu a produção de materiais com melhores propriedades⁷⁸. Os nanocompósitos constituídos de nanopartículas de polímeros orgânicos e

inorgânicos representam uma nova classe de materiais que apresentam um melhor desempenho quando comparados com os seus homólogos de micropartículas¹⁰².

Para que o compósito ou o nanocompósito apresentem as propriedades desejadas é necessário que as fases estejam homogeneamente distribuídas. Para isso, uma das maneiras utilizadas é a modificação superficial de um dos componentes do compósito que possibilite essa compatibilização⁴. Uma abordagem para a modificação das superfícies de materiais inorgânicos e orgânicos baseia-se na enxertia de polímeros sintéticos na superfície do substrato inorgânico, o que melhora a funcionalidade química e altera a topologia da superfície de materiais nativo inorgânico e orgânico⁸⁷. As nanopartículas inorgânicas enxertadas com polímeros são considerados nanocompósitos orgânico-inorgânico¹⁰³.

Kumar e Jouault¹⁰⁴ abordaram várias estratégias sintéticas para a funcionalização de nanopartículas e a discussão de vários métodos para dispersões controladas destas nanopartículas na matriz polimérica, e seus reflexos nas propriedades mecânicas e óticas.

Suportes para crescimento celular formados por compósitos ou nanocompósitos têm sido amplamente explorados para a regeneração óssea⁸⁶. A adição de um mineral não só contribui para a integridade estrutural do suporte, mas pode também ser ativamente osteocondutor¹⁰⁵. Hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) é comumente usada porque é próximo aos minerais naturais encontrados nos ossos, mas outras variantes de fosfato de cálcio são igualmente utilizados devido sua biocompatibilidade¹⁰⁶.

Compósitos de HAP e vários polímeros, incluindo o PLA¹⁰⁷, PLGA¹⁰⁸, gelatina¹⁰⁹, quitosana¹¹⁰, e colágeno¹¹¹ foram fabricados com sucesso e demonstraram aumento da formação óssea *in vitro* e/ou *in vivo*. Estes materiais são

considerados biomiméticos e estimulam a formação, precipitação e deposição de fosfato de cálcio a partir de fluidos corporais simulados (SBF), resultando num aumento da força na interface osso-matriz¹¹². Além disso, Ma *et al.*¹¹³ demonstraram que suportes porosos de compósitos de PLLA/HAP possuem uma propriedade de osteocondutividade superior e promovem uma melhor sobrevivência celular osteoblástica, proliferação e expressão de marcadores específicos do osso (isto é, uma sialoproteína do osso e osteocalcina) em comparação com suportes puros de PLLA durante 6 semanas de cultura *in vitro*.

1.3 Eletrofiação

A eletrofiação ganhou popularidade nos últimos 10 anos devido, em grande parte, a um aumento do interesse em propriedades e tecnologias em nanoescala. Também recebeu grande atenção na comunidade de engenharia de tecidos como um potencial meio para a produção de suportes para crescimento celular^{114,115}. Esta técnica de processamento tem recebido especial atenção^{106,116}, pois possui baixo custo, relativa simplicidade operacional e permite a produção de fibras de diâmetro muito pequeno e com estreita distribuição de tamanho, o que permite a mimetização de matrizes extracelulares de tecidos, entre eles o tecido ósseo³⁰.

O princípio da eletrofiação consiste no uso de um campo elétrico para controlar a formação de fibras e a deposição de polímero. Trata-se de um processo bastante rápido e eficiente, que gera fibras com diâmetros da ordem de 20 a 500 nm¹¹⁷. Neste processo, a solução ou o fundido de polímero é injetado através de um orifício submetido a um potencial elétrico em relação à base de depósito aterrada. A uma determinada voltagem crítica, o desbalanço de carga supera a tensão

superficial da solução ou do fundido gerando um jato carregado eletricamente dirigido à base aterrada. Durante o trajeto, o solvente evapora (ou ocorre a solidificação do fundido) formando uma fibra contínua de diâmetro reduzido¹¹⁷. O diâmetro final das fibras varia de dezenas a centenas de nanômetros e depende de vários fatores como: voltagem aplicada, distância entre a agulha e a base aterrada da agulha, orifício do bocal, sistema de solventes, sistema polimérico, entre outros¹⁸. A Figura 10 exemplifica o arranjo experimental da eletrofiação.

Figura 10. Esquema experimental para eletrofiação.

Nanofibras poliméricas possuem propriedades extraordinárias, como arquitetura favorável ao crescimento celular e grande área superficial que favorecem a adsorção de proteínas⁴. Por exemplo, nanofibras eletrofiadas de PLGA imobilizam peptídeos formadores de osso 1 (BFP1) derivados da região imatura da proteína morfogênica óssea 7 (BMP7)⁴⁹. Esses suportes de PLGA com BFP1 promovem uma regeneração óssea mais efetiva nos defeitos em calotas cranianas de ratos⁴⁹.

Fibras eletrofiadas também podem ser orientadas ou dispostas de forma

aleatória, conferindo controle sobre as propriedades mecânicas e a resposta biológica do suporte. Um exemplo é o uso de fibras eletrofiadas alinhadas que podem ser aplicadas na confecção de suportes para substituir um tecido altamente orientado como uma artéria ou tecido nervoso¹¹⁵.

Conforme já visto, a confecção de suportes para engenharia de tecido ósseo é baseado nas propriedades físicas do tecido ósseo, tais como a resistência mecânica, porosidade, tamanho do poro, dureza e a estrutura 3D. Para a engenharia de tecido ósseo, com um tamanho de poro no intervalo de 100-350 nm e porosidade superior a 90% são preferidos para melhorar a adesão celular e aumentar a regeneração óssea¹¹⁴

A combinação de polímeros biodegradáveis com materiais inorgânicos bioativos durante a eletrofiação é considerada uma forma fascinante e razoável de gerar nanofibras com as propriedades adequadas e orientadas para a regeneração óssea¹¹⁴. A fase inorgânica pode melhorar as propriedades biológicas das nanofibras poliméricas, tais como a compatibilidade das células e o processo de formação óssea, envolvendo a diferenciação osteogênica e a calcificação da matriz óssea¹¹⁸. Além disso, uma vez que a fragilidade do material inorgânico é uma limitação importante à sua utilização como substratos adequados para células, a introdução de uma fase polimérica deve proporcionar um certo grau de flexibilidade mecânica. Basicamente, a matriz extracelular óssea é um tipo de compósito constituído de fibras de colágeno incorporado com nanocristalitos de hidroxiapatita, o que destaca a necessidade do desenvolvimento de nanocompósitos que imitem a estrutura óssea^{30, 119}.

Por exemplo, Prabhakaran *et al.*¹²⁰ criaram um suporte de PLLA/HAP/Colágeno para imitar a ECM. Neste estudo demonstraram o efeito

sinérgico, e a superioridade da HAP e do colégeno na proliferação e mineralização dos osteoblastos, tornando este biocompósito um excelente substrato para a regeneração óssea. A fabricação de nanofibras misturando proteínas naturais como o colágeno acredita ser uma grande abordagem para induzir a diferenciação de células-tronco e a regeneração do tecido *in vitro*¹⁸.

A diferenciação das hMSCs para células epidérmicas *in vitro* nas nanofibras de poli(L-Lactídeo-co- ϵ -caprolactona) (PLCL) e colágeno foram pesquisadas pelo grupo do Professor Ramakrishna, e mostraram melhor diferenciação neste tipo de suporte¹²¹. A incorporação de cimentos de fosfato de cálcio e HAP nas nanofibras de PLGA melhorou substancialmente a diferenciação osteogênica e mineralização de células-tronco em relação as nanofibras de PLGA pura^{122,122b}. A diferenciação de células-tronco cultivadas em suportes de nanofibras também foram confirmadas por outro grupo¹²³.

Outros modelos de suportes eletrofiados abordados atualmente são os combinados com ECM descelularizadas. Um exemplo bem comum é um compósito de PLLA com pó de osso desmineralizado em escala nanométrica (NBM) para melhorar as propriedades mecânicas e osteoindutoras do material¹²⁴. Neste contexto, as fibras eletrofiadas de PLLA com 20% de NBM tiveram um aumento do módulo de Young em relação ao PLLA puro. Estes nanocompósitos de fibras eletrofiadas de PLLA/NBM exibiram propriedades similares à matriz óssea mineralizada rica em colágeno e, por tanto, podem ser usadas como um substrato temporário para facilitar o isolamento e a mineralização das células formadoras de osso¹²⁵.

Embora as abordagens de suportes eletrofiados para a regeneração óssea aqui descritos são bem investigadas, assim como os benefícios da adição de HAP e fatores de crescimento, ainda há muito espaço para a melhoria desses sistemas. O

maior desafio é a compatibilização desses materiais de forma mais eficaz, a fim de controlar as propriedades desejadas de um suporte para o crescimento de um tecido ósseo. Além disso, fatores como custo e tempo de produção do suporte são limitantes no que diz respeito à aplicação em larga escala dos mesmos, e deve ser considerada no seu desenvolvimento.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivos gerais*

O objetivo do presente trabalho é a produção de suportes celulares otimizados para regeneração tecidual óssea. Como abordagens originais, oferecemos duas novas soluções a serem desenvolvidas e testadas: (i) uso de um copolímero derivado de lactídeo e succinato de isosorbila e (ii) modificação de hidroxiapatita nanoparticulada de forma a permitir a produção de compósitos contendo altas cargas de conteúdo mineral e (iii) combinação de ambas as anteriores.

2.2 *Objetivos específicos*

- (i) Síntese do PLLA-co-PIS. A técnica de síntese deste polímero em tamanho que varia de 8.000 a 30.000 ($\bar{M}_w$) foi desenvolvida no laboratório de Biomateriais Poliméricos do IQ USP.
- (ii) Utilização de nova metodologia para modificação na superfície de nanopartículas de HAP; comparação com uma metodologia já conhecida na literatura (enxertia de PLLA na superfície da HAP gerando a PLLA-g-HAP); caracterização das NPs por meio de FTIR, RMN¹³C sólido, TG/MS, análise elementar e espalhamento de luz dinâmico.
- (iii) Produção e caracterização dos compósitos de PLLA e PLLA-co-PIS contendo HAP com superfície modificada e HAP nativa em filmes obtidos por evaporação de solvente e em malhas de nanofibras eletrofiadas;

estudo da distribuição das partículas no material e dos reflexos em suas propriedade mecânica.

- (iv) Estudo da adesão e proliferação celular utilizando fibroblastos (NIH-3T3) sobre as malhas eletrofiadas de PLLA contendo HAP-CL e estudo da diferenciação celular com as DPSCs sobre as malhas eletrofiadas de PLLA e PLLA-co-PIS com HAP-CL, PLLA-*g*-HAP, HAP e testando as diferentes porções minerais para verificar o melhor suporte para regeneração óssea.
- (v) Avaliação *in vivo* de implantes em calvária de ratos utilizando modelo de indução de defeito crítico com os suportes que apresentaram melhor resultado *in vitro*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Materiais*

O L-lactídeo foi gentilmente doado pela Purac. O Xileno (Vetec) foi seco utilizando sódio metálico seguidos por destilação simples. O Clorofórmio (Synth) usado no preparo das soluções poliméricas e nas sínteses foi purificado da seguinte forma: seco com CaCl_2 (Synth) durante 24 horas, filtrado e destilado, adicionou-se P_2O_5 (Vetec) submetido a refluxo por uma hora, destilado novamente e estocado em frasco com peneira molecular de 3 Å. O Diclorometano (Synth) também foi tratado com CaCl_2 durante 24 horas, filtrado, destilado e estocado em frasco com peneira molecular de 3 Å. A *N,N*-Dimetilformamida (DMF; Mallinckrodt) foi utilizada sem purificação prévia. O 2-etilexanoato de estanho (II) ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$), as nanopartículas de hidroxiapatita (HAP) (tamanho < 200 nm), as nanopartículas de β -trifosfato de cálcio (tamanho < 200 nm) (TCP), o cloreto de lauroíla (CL), o 1,6-hexametileno-diisocianato (HMDI), o L-ácido ascórbico, o β -glycerofosfato de sódio e o cloreto de cetilpiridínio foram obtidos da Sigma-Aldrich. A dexametasona foi obtida da Aché. O poli(L-ácido láctico) (PLLA) ($\bar{M}_w = 157.000$ D) utilizado no preparo das soluções poliméricas foi adquirido da Purac. Os materiais usados na cultura das células como o Soro Fetal Bovino (SFB), a Tripsina (TRP), a penicilina – estreptomicina (ATB), a anfotericina (AFT) e o *Dubelco's Modified Eagle Medium* (DMEM) foram obtidos da marca GIBCO. Para o ensaio da fosfatase alcalina (ALP) foi usado um kit de teste colorimétrico (Labtest, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil). A osteocalcina (OSC), a osteopontina (OSP), o conjugado fluorescente do Alexa Fluor® 488 com anticorpo secundário anti-IgG e o 2-(4-aminofenil)-1H-indol-6-carboxamida (DAPI) foram

adquiridos da Life.

3.2 Métodos

3.2.1 Produção do poli(succinato de isorbila-*b*-L-lactídeo)

O copolímero poli(succinato de isorbila-*b*-L-lactídeo) (PLLA-co-PIS) contendo 30% de poli(succinato de isosorbídeo) (PIS) e 70% de *L*-Lactídeo foi sintetizado em duas etapas: copolimerização por abertura de anel a partir do *L*-Lactídeo e PIS na presença do Sn(Oct)₂ como catalisador, seguida pela extensão de cadeia em solução usando o HMDI segundo os procedimentos descrito a seguir⁸³ (Esquema 1).

Primeiramente o PIS foi sintetizado em massa: dentro da câmara seca, 5,16 g (0,052 mol) de anidrido succínico, 7,53 g (0,052 mol) de isosorbídeo e 0,54 g (1,3×10⁻³ mol) de Sn(Oct)₂ foram adicionados em um balão de fundo redondo de uma boca. Fora da câmara seca, o balão fechado foi mantido sob agitação magnética por 1 h em um banho de óleo de silicone a 110-130 °C e por mais 7 h a 140-150 °C. Então, a temperatura foi aumentada para 150-160 °C, aplicado vácuo e a reação deixada prosseguir por mais 2 h a 30-40 mmHg e 22 h a 1 mmHg. O polímero obtido foi precipitado em metanol, separado por filtração e seco em um dessecador a vácuo.

Para a síntese do PLLA-co-PIS, 7,00 g (4,9×10⁻² mol) de *L*-Lactídeo, 3,02 g de PIS e 15 mg (3,7×10⁻⁵ mol) de Sn(Oct)₂ foram adicionados a uma ampola sob atmosfera de argônio. A ampola foi depois selada sob vácuo, a 1 mmHg e colocada num banho de óleo mantido a 120-130 °C durante 165 h. As extensões de cadeia do PLLA-co-PIS foram realizadas em solução (20 mL de clorofórmio para cada 4 g do

produto e HMDI): dentro da câmara seca, PLLA-co-PIS e HMDI e clorofórmio foram transferidos em quantidades predefinidas para um balão de fundo redondo de uma boca. Fora da câmara seca, o balão foi colocado em um banho de óleo de silicone a 62-73°C e deixado em refluxo por 20-24 h sob agitação magnética e fluxo de N₂. Então, o balão foi removido do banho, fechado e a reação deixada prosseguir a temperatura ambiente durante o repouso por um período típico de 7 a 14 dias. Após a extensão de cadeia, o rendimento calculado foi de 82,7% e o $\bar{M}_w = 112.000$ determinado por Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC).

Esquema 1. Síntese do PLLA-co-PIS (1ª etapa). Extensão de cadeia do PLLA-co-PIS (2ª. etapa).

3.2.2 Produção de nanopartículas funcionalizadas

3.2.2.1 Enxertia de PLLA na superfície da HAP

O PLLA foi diretamente enxertado no grupo hidroxila na superfície da HAP pela polimerização de abertura do anel do *L*-lactídeo na presença de um catalisador

$\text{Sn}(\text{Oct})_2$ segundo método de Hong *et al*¹²⁶. O processo de enxertia é representado no Esquema 2.

Esquema 2. Enxertia de PLLA na superfície das nanopartículas de hidroxiapatita.

Todos os reagentes foram manipulados no Glove-Box. 2,1 g de *L*-lactídeo ($1,5 \times 10^{-2}$ mol) foi dissolvido em 10 mL de xileno a 120°C , seguido da adição de 20 μL de $[\text{Sn}(\text{Oct})_2]$ ($6,2 \times 10^{-8}$ mol) em um balão fundo redondo de duas bocas. A seguir, uma suspensão de 2,0 g de HAP (seca a 120°C durante 24 horas na estufa a vácuo) em 20 mL de xileno seco foi aquecida a 90°C e gotejada através de um funil de adição na solução de *L*-Lactídeo sob atmosfera de nitrogênio e agitação magnética. A mistura foi agitada durante 18 horas e resfriada a temperatura ambiente. O PLLA enxertado na superfície das HAP (PLLA-*g*-HAP) foi separado por centrifugação a 20.000 rpm e lavado com clorofórmio seco por 5 vezes para remover completamente o PLLA não enxertado. O produto foi separado e seco a 60°C em estufa a vácuo por 24 horas para remover o resíduo de clorofórmio. A massa obtida depois de seca foi de 1,53 g.

3.2.2.2 Funcionalização da superfície da HAP com laurato

Em um balão de 50 mL de fundo redondo adicionou-se 0,2 g de HAP seca e 10 mL de xileno seco, seguido de aquecimento a 90°C até completa dispersão das NPs. Em outro balão de 50 mL de duas bocas adicionou-se 2,05 mL ($8,8 \times 10^{-3}$ mol) de CL seguido de aquecimento a 120°C . A solução de HAP foi adicionada por

gotejamento utilizando-se um funil de adição. A solução permaneceu sob aquecimento a 120°C e agitação por seis horas à pressão ambiente e quatorze horas à pressão reduzida para remoção de HCl. A HAP funcionalizada com laurato (HAP-CL) foi lavada cinco vezes com diclorometano e centrifugada a 20.000 rpm para a remoção do CL que não reagiu. O processo de funcionalização é representado no Esquema 3.

Esquema 3. Funcionalização de laurato na superfície da HAP.

3.2.2.3 Caracterização das partículas funcionalizadas

As análises espectroscópicas de absorção no infravermelho foram realizadas em um equipamento *FTIR Bomen MB100* com faixa de operação entre 350-4000 cm^{-1} em pastilhas de KBr.

Para fins de determinação estrutural, as análises de ressonância magnética nuclear de ^{13}C de sólido foram obtidas em um equipamento Bruker 300 MHz utilizando o adamantano como referência externa, experimento realizado na Central Analítica do Instituto de Química da Unicamp. O RMN ^{13}C do CL foi feito em um equipamento Bruker DPX 300 MHz que continha tetrametilsilano (TMS) como referência interna, análise realizada na Central Analítica do IQ USP.

As medidas de TG/MS foram realizadas utilizando a termobalança Netzsch STA 409 PC Luxx para a análise simultânea de TG-DSC, sendo este equipamento

acoplado ao detector Netzsch QMS 403C Aëolos, para identificação dos gases liberados da amostra.

A análise elementar das partículas da HAP e HAP-CL foi realizada no equipamento Elemental Analyzer 2400 CHN – PerkinElmer para avaliar a porção de laurato presente na HAP-CL. O cálculo foi feito baseando-se na quantidade de carbono encontrada na análise elementar; descontando-se o branco, obteve-se 1,5 g de carbono ou 0,01 mol de laurato para cada 100 g de HAP-CL.

Para a medida do diâmetro médio das HAP-CL e HAP por DLS, utilizou-se um equipamento da Brookhaven Instruments, com laser em 532,0 nm e análise da luz espalhada em $\theta = 90^\circ\text{C}$, com o programa ZetaPALS Particle Sizing Software Version 2.29.

3.2.3 Produção de nanocompósitos de poli(L–ácido láctico) com HAP-CL, PLLA-g-HAP, HAP e poli(succinato de isosorbídeo-b-L-lactídeo) com HAP-CL.

3.2.3.1 Produção e caracterização de filmes de compósitos

As partículas de HAP-CL, PLLA-g-HAP e HAP pura foram suspensas em clorofórmio com ajuda de um banho de ultrassom. Posteriormente as partículas suspensas foram adicionadas a uma solução de 10% (massa do polímero/massa do solvente) (m_p/m_s) de PLLA e PLLA-co-PIS em clorofórmio para atingir o conteúdo de 5-10% (massa do mineral/massa do polímero) (m_m/m_p) no compósito. As soluções de PLLA/HAP-CL, PLLA/PLLA-g-HAP, PLLA/HAP e PLLA-co-PIS/HAP-CL foram despejadas em placas de Petri silanizadas com cloreto de trimetil silano, e os filmes

foram formados pela evaporação do solvente.

As propriedades mecânicas foram avaliadas utilizando-se filmes fabricados pela evaporação de solvente através de soluções poliméricas de PLLA com diferentes concentrações de HAP-CL, PLLA-*g*-HAP e HAP usando CHCl₃ seco como solvente. A mesma metodologia foi usada para os filmes de PLLA-co-PIS com HAP-CL. As análises foram realizadas em filmes retangulares, nas mesmas dimensões (3×0,6 cm) com espessura média de 0,45 mm, e as medidas foram feitas no aparelho DMA Q800 da TA Instruments. Os resultados do módulo de Young (E) foram obtidos através da curva da tensão na ruptura (σ) vs deformação observada (ϵ).

Os filmes de PLLA com as diferentes inclusões de HAP-CL e PLLA-*g*-HAP foram feitos em *wafer* de silício pela técnica de revestimento de rotação de substrato (*spin coating*). As medidas de ângulo de contato (θ) com água foram realizadas pelo método da gota séssil em uma aparelhagem de construção caseira que consiste de uma fonte de luz fria, suporte para a amostra, lente de aumento, anteparo sobre o qual é projetada a imagem da gota e uma câmera digital.

3.2.3.2 Produção e caracterização das malhas eletrofiadas de compósitos

Para o preparo das soluções poliméricas para a produção das malhas, as nanopartículas HAP-CL, PLLA-*g*-HAP, HAP e TCP foram secas em estufa a vácuo a 50°C, suspensas em clorofórmio e dispersas utilizando banho de ultrasom. A suspensão obtida de nanopartículas foi adicionada a uma solução de 10% (m_p/m_s) de PLLA em clorofórmio/DMF (9:1) para alcançar um conteúdo de 5-30% (m_m/m_p) da

fase mineral no compósito. O mesmo procedimento foi adotado para o PLLA-co-PIS com HAP-CL. Os parâmetros utilizados para a produção das malhas foram: voltagem de 25 kV; distância de trabalho de 18 cm, fluxo de alimentação de 4,0 mL/hora e agulha de 0,4 de diâmetro interno. O processo de eletrofiação foi realizado sob controle de umidade ($\leq 40\%$) e temperatura (22°C).

A análise da morfologia das fibras contendo as fases minerais nas diferentes concentrações foram feitas por microscopia eletrônica varredura (MEV) em microscópio equipado com canhão eletrônico de emissão de campo (FEG-SEM, modelo FEG 7401F, da Jeol).

Microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para investigar a distribuição das partículas HAP, PLLA-g-HAP e HAP-CL na fibra de PLLA e PLLA-co-PIS. As microscopias foram feitas por um TEM-MSA (JEOL 2100) e as amostras foram depositadas em grades de cobre recobertas com carbono.

Os materiais eletrofiados tiveram seus diâmetro medidos (100-200 fibras/amostra) obtendo-se curvas gaussianas das medidas de diâmetro.

A porosidade da malha eletrofiada foi calculada com base na Equação 1.

$$\text{Porosidade} = \left[1 - \left(\frac{\text{Densidade aparente}}{\text{Densidade absoluta}} \right) \right] \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde a densidade aparente foi calculada a partir da massa e dimensões da malha eletrofiada, densidade absoluta do PLLA e densidade absoluta das HAP-CL e do PLLA-g-HAP.

O ângulo de contato dinâmico realizado nas fibras foi determinado com um tensiômetro de precisão Krüss K100 (Hamburg Germany), através da massa de

água adsorvida, a 25°C. As fibras de PLLA com HAP-CL e PLLA-g-HAP foram cortadas em retângulos (1cm×2 cm) e presos por uma garra modelo SH0602. Um recipiente com água, colocado sobre uma plataforma movida até que a água toca a amostra. O ângulo de contato foi determinado pelas medidas de tensão superficial.

3.2.3.3 Estudo da degradação *in vitro* das fibras de PLLA-co-PIS com HAP-CL

Para os estudos de degradação *in vitro*, fibras eletrofiadas de PLLA-co-PIS, com espessura de aproximadamente 0,2 mm foram cortadas em pedaços de 10x10 mm². As fibras foram colocadas em tubos falcon de 15 mL contendo solução de tampão fosfato (PBS, pH 7,4), e incubadas a 37°C por vários períodos de tempo. No final de cada período as fibras serão secas em um liofilizador até a observação da massa constante. O percentual de perda de massa (*PM*) é calculada utilizando a seguinte equação:

$$PM = \frac{m_0 - m_d}{m_0} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

onde m_0 é a massa inicial antes da incubação e m_d é a massa final.

3.2.4 Ensaios de crescimento celular *in vitro* e *in vivo*

3.2.4.1 Ensaios *in vitro*

As células-tronco humanas de polpa de dente (DPSCs) foram cedidas pela professora Dra. Maria Rita dos Santos Passos Bueno, do Departamento de Genética

e Biologia Evolutiva, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Antes da cultura celular, as fibras foram esterilizadas com luz UV por 30 minutos, depois incubadas em DMEM suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB), 1% de ATB e 2,5 µg/mL de AFT B durante a noite. Em seguida, as DPSCs foram semeadas sobre as fibras, numa suspensão de 2×10^4 células por poço e cultivadas em DMEM suplementado com 15% SFB, 10 mM β-glicerofosfato, 50 µg/mL ácido ascórbico e 50 µg/mL de dexametasona.

3.2.4.1.1 Teste de adesão e proliferação celular

A capacidade de adesão e proliferação celular sobre as fibras de PLLA e PLLA com HAP-CL (5, 10, 21 e 30%) foi estudada com o uso de células de fibroblasto de camundongo albino (NIH–3T3) do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A quantificação celular foi feita através do uso do teste de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolina) que mede a atividade mitocondrial presente. As fibras com as células foram lavadas duas vezes com PBS e colocadas numa nova placa com 24 poços; em cada poço foi adicionado uma solução de 80% de DMEM (sem SFB) e 20% de uma solução de MTT. Depois de 3 horas na estufa, a solução foi removida, 200 µL de dimetilsufóxido (DMSO) foi adicionado em cada poço e a placa foi agitada durante 20 min. Alíquotas de 200 µL foram recolhidas e verteu-se em novas placas de 96 poços de cultura de células, de modo a medir a absorbância a 570 nm (SLT-Spectra, Salzburg, Áustria). Os dados apresentados são as médias calculadas a partir de três amostras de cada uma das condições. A significância dos resultados foi analisada pelo teste de duas vias ANOVA.

3.2.4.1.2 Ensaio da atividade de Fosfatase Alcalina (ALP)

A diferenciação celular das células tronco mesenquimais em osteoblastos pode ser testada através de medidas de atividade de ALP. As culturas celulares das DPSCs cultivadas sobre os suportes poliméricos por 7, 14 e 21 dias foram lisadas em tampão de lise contendo 1% de Triton X-100, 0,9% de NaCl e 0,5 M de Tris pH 9,0. Os lisados foram centrifugados a 12000 rpm durante 15 min a 4°C, e os sobrenadantes foram recolhidos. O ensaio da atividade de ALP foi realizado da seguinte forma: 50 µL do sobrenadante foi incubado com o substrato durante 10 minutos, e a reação foi então parada com um reagente colorimétrico (timolftaleína) antes da leitura da absorbância a 590 nm e o cálculo da atividade de ALP foi normalizado pelo número de células. A significância dos resultados foi analisada pelo teste ANOVA.

3.2.4.1.3 Ensaio com Vermelho de Alizarina (ARS)

Osteoblastos maduros tem capacidade de produção de depósitos calcificados em sua matriz extracelular. A adsorção de ARS sobre estes depósitos foi utilizada para quantificar a mineralização das DPSCs cultivadas nas fibras de PLLA e PLLA-co-PIS com diferentes inclusões minerais e diferentes conteúdos, durante 14 e 21 dias. Uma malha de fibra eletrofiada contendo alta inclusão de HAP sem células foi usada como controle. As fibras eletrofiadas com as culturas celulares foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com formaldeído a 10% durante 10 minutos. Depois de ter sido lavada com PBS, as fibras foram incubadas em uma solução 1% de ARS

em etanol a 2% durante 5 minutos. Subsequentemente, a solução foi removida e as fibras foram lavadas três vezes com água. Para quantificar a mineralização, as fibras foram dessorvidas utilizando 10% de cloreto de cetilpiridínio durante 1 hora. A solução foi recolhida e a leitura foi realizada em triplicata a 570 nm em um espectrofotômetro Shimadzu Multispec-1501. A significância dos resultados foi analisada pelo teste ANOVA.

3.2.4.1.4 Imunofluorescência para Osteocalcina (OSC) e Osteopontina (OSP)

A produção de OSC e OSP pelas células foram testadas através de ensaios imunofluorescência, utilizando-se anticorpos comerciais específicos para as mesmas, seguidos de revelação com anti-IgG marcado com sonda fluorescente (Alexa Fluor® 488). Depois de 21 dias de cultura das DPSCs sobre os suportes poliméricos de PLLA, PLLA/HAP-CL-30, PLLA-co-PIS e PLLA-co-PIS/HAP-CL-30, os suportes foram retirados do meio de cultura, lavados três vezes com PBS, e as DPSCs foram removidas do suporte polimérico com Tripsina 0,5 % por 1,5 hora. As DPSCs foram plaqueadas sobre lâminas com polilisina por 30 minutos, depois foram adicionados 100 µL de formalina em cada lâmina por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a remoção, adicionou-se 100 µL de metanol 90% por 5 minutos, e lavou-se 2 vezes com PBS, e 100 µL da solução bloqueio (3% SFB em PBS) foi colocada e deixada por 30 minutos. Em seguida, retirou-se a solução bloqueio e adicionou-se o anticorpo Anti-Osteocalcina e Anti-Osteopontina em lâminas separadas. O anticorpo foi diluído na solução bloqueio 1:100 e deixado por uma hora a temperatura ambiente. Em seguida, lavou-se 3 vezes com PBS, colocou-se a solução bloqueio por 30 minutos e adicionou-se o anticorpo secundário com marcador fluorescente

Alexa Fluor® 488, diluído em solução bloqueio (1:200) e deixou-se por 1 hora a temperatura ambiente protegido de luz. Posteriormente, 300 μ L da solução DAPI foram adicionados, permanecendo por 3 minutos, seguida de remoção da solução e lavagem com PBS. Utilizou-se o meio de montagem para selar as lâminas, que foram armazenadas protegidas da luz. As imagens foram obtidas usando um filtro apropriado (488 nm para o anticorpo secundário e 461 nm para o DAPI) em um Zeiss LSM 510 Meta.

3.2.4.2 *Ensaios in vivo*

A capacidade de regeneração óssea *in vivo* induzida pelas construções polímero-mineral-DPSCs foi estudada utilizando-se um modelo de defeito ósseo induzido. Foram utilizados 10 ratos Wistar, de 2 meses de idade do sexo masculino provenientes do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. A Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA), do IQ-USP, aprovou o protocolo de estudos. Sob anestesia geral, o crânio foi exposto através de uma incisão mediana. Dois defeitos circulares, de espessura total de 5 mm×5 mm em simetria com a sutura sagital foram gerados por uma broca de dentista. Em um grupo, no lado esquerdo foi implantado o suporte de PLLA com 30 % (m_m/m_p) de HAP-CL sem célula como controle, no lado direito foi implantado o mesmo suporte com $1,0 \times 10^6$ de DPSCs. No outro grupo, no lado esquerdo foi implantado o suporte de PLLA-co-PIS com 30 % (m_m/m_p) de HAP-CL sem célula, e no lado direito o mesmo suporte com $1,0 \times 10^6$ de DPSCs. A ferida foi irrigada e a pele suturada. Após a cirurgia os ratos foram

levados ao biotério e foram isolados e mantidos em ambiente com controle de temperatura.

Micro-CT (Skyscan 1172, Bruker-microCT, Bélgica) foi utilizada para observar a morfologia tridimensional do crescimento ósseo por um método não invasivo. Para o procedimento os ratos foram anestesiados.

As amostras colhidas durante 16 semanas foram imediatamente fixadas em 10% (v/v) de formalina tamponada neutra, durante 24 h, e descalcificadas em solução de EDTA em pH 10,3 por vinte dias. Em seguida, as amostras foram desidratadas por meio de um gradiente de álcool, limpas, e incluídas em blocos de parafina. Os cortes histológicos (6 mm) foram preparados utilizando um micrótomo e, posteriormente, corados com hematoxilina e eosina (HE). Os cortes corados foram fotografados digitalmente em um microscópio ZEISS.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A seção “Resultados e Discussões” está dividida em três partes principais. A primeira diz respeito à síntese e caracterização das nanopartículas funcionalizadas pela reação com cloreto de lauroíla (HAP-CL), uma nova alternativa proposta neste trabalho para a funcionalização de HAP. O PLLA foi enxertado na superfície da HAP (PLLA-*g*-HAP) conforme a literatura para estudos comparativos com a HAP-CL. A segunda parte diz respeito à obtenção de nanocompósitos das nanopartículas obtidas com PLLA e PLLA-*co*-PIS, cujos filmes e malhas eletrofiadas foram caracterizados. A terceira parte refere-se à aplicação dos materiais obtidos como suporte para crescimento celular, em que são descritos os testes *in vitro* e *in vivo*, e a viabilidade do uso desses materiais é avaliada.

4.1 Síntese e Caracterização das Nanopartículas de Hidroxiapatita

4.1.1 Síntese e caracterização da HAP-CL

Como a HAP possui hidroxilas posicionadas abaixo do plano formado pelos três átomos de cálcio no seu arranjo cristalino, estas hidroxilas se tornam ideais pontos de ancoragem para as modificações na superfície da HAP. Assim, foi proposto modificar a HAP colocando cadeias hidrofóbicas de laurato em sua

superfície por meio da reação com cloreto de lauroíla (CL). Cloretos de acila são extremamente reativos frente a presença de nucleófilos, em especial os derivados de oxigênio, dispensando o uso de catalisadores.

Após a reação da HAP com CL, a coloração branca característica da HAP tornou-se amarela opaca. Seguindo-se de etapas de purificação e secagem, a comprovação da modificação na superfície da HAP foi possível com as seguintes caracterizações: FTIR, RMN ^{13}C em sólidos, TG-MS, análise elementar e espalhamento de luz dinâmico.

4.1.1.1 Caracterização da HAP-CL

A funcionalização da HAP com CL foi analisada por FTIR (Figura 11). No espectro IR da HAP-CL é possível observar as bandas referentes às vibrações de estiramento assimétricas e simétricas de C-H da porção hidrocarboneto de laurato em 2923,8 e 2844,7 cm^{-1} , respectivamente e hidroxila em 3456,1 cm^{-1} . As bandas de fosfato foram detectadas a 1108,8 e 1026,0 $\text{cm}^{-1}(\nu_3)$, 605,7 e 568,1 $\text{cm}^{-1}(\nu_4)$ e carbonato em 1416,8 cm^{-1} . A banda referente ao estiramento da carbonila presente em HAP-CL (1717,2 cm^{-1}) apresenta um deslocamento batocrômico em relação à banda da carbonila do cloreto de lauroíla (1805,2 cm^{-1}), indicando a conversão do derivado de cloreto de acila em uma ligação de carboxilato¹⁰¹. Qiu *et al.*¹²⁸ observaram formação similar do grupo carboxilato no enxerto de lactídeo na superfície de HAP.

Figura 11. Espectro de Infravermelho do CL, HAP e HAP-CL.

O RMN ^{13}C em sólidos é uma ferramenta importante para a caracterização de nanopartículas com superfícies modificadas¹²⁹, sendo esta uma técnica valiosa para a caracterização da funcionalização da HAP-CL. As figuras a seguir (Figura 12, Figura 13 e Figura 14) mostram espectros de RMN ^{13}C sólido para HAP nativa, cloreto de lauroila e HAP-CL (respectivamente). No espectro da HAP nenhum pico de ^{13}C foi observado, conforme esperado (Figura 12). No espectro do cloreto de lauroila observa-se um pico em 173,8 ppm, relativo ao carbono da carbonila, e outros picos na região de 10-50 ppm referentes aos carbonos de grupos metilenos e metila da cadeia carbônica (Figura 13). No espectro da HAP-CL observa-se um pico a 184,3 ppm, que pode ser atribuído ao carbono do carboxilato formado (Figura 14)¹³⁰. Além disso, outros picos referentes aos carbonos de grupos metilenos e da

metila da cadeia carbônica estão também presentes neste espectro, o que indica que a HAP foi de fato modificada.

Figura 12. RMN ^{13}C sólido da HAP.

Figura 13. RMN ^{13}C do CL puro.

Figura 14. RMN ^{13}C sólido da HAP-CL.

A TG/DTG é uma ferramenta importante para determinar a perda de massa da amostra em função da variação de temperatura. Além disso, é possível o seu acoplamento com outras técnicas analíticas, como a espectrometria de massas (TG/MS), o que permite identificar os gases resultantes da combustão dos componentes presentes na amostra¹³¹. Essas técnicas foram utilizadas para avaliar a porção de laurato presente na HAP-CL. Os resultados estão dispostos na Figura 15. Observa-se na curva de TG de HAP-CL (Figura 15, verde) uma perda de massa

total de cerca de 7%, dividida em quatro grandes eventos de perda de massa (Figura 15, DTG, gráfico azul) em 100, 211, 437 e 626°C. A técnica de MS acoplada à análise permitiu elucidar a quais eventos se referem essas perdas. A primeira e a segunda etapas de perda de massa ocorrem a 100 e 211 °C, respectivamente, e são causadas principalmente por perda de água de adsorção^{132,132b}, que pode ser claramente observada na curva vermelha da figura 15, em que foram registrados íons de $m/z = 18$ (observa-se picos mais intensos de $m/z = 18$ em 100°C e 211°C).

As duas etapas seguintes, que ocorrem em 437 e 626°C, estão relacionadas com a decomposição do grupo laurato que funcionaliza a superfície da HAP. Esta consideração foi feita com base na formação de CO_2 ($m/z = 44$), que resulta da decomposição de compostos orgânicos^{133,134}. Além disso, a ausência de HCl, fragmento ($m/z = 36$), confirma que o CL não estava presente, o que exclui um evento de adsorção simples, porém não isenta a possibilidade de uma porção de ácido láurico estar presente, pois o ponto de ebulição do ácido é 299°C e do cloreto é de 267 °C. As experiências de controle a partir da análise de TG bruto da HAP (Anexo 1) exibiram uma perda de água a 106°C como esperado, enquanto a CL mostra apenas a evaporação a cerca de 200°C (Anexo 2).

Figura 15. Curvas de TG e DTG da decomposição da HAP-CL e do MS (resposta para $m/z = 18$ e $m/z = 44$).

Ainda utilizando a técnica de TG, é possível calcular aproximadamente a quantidade de laurato presente na amostra de HAP-CL. Isso foi feito baseando-se na perda de massa de laurato através da curva da TG, que foi de aproximadamente 2,5 g (0,01 mol) considerando 100 g de HAP-CL (Tabela 1). Esses resultados podem ser comparados aos calculados a partir de uma análise elementar (AE) da amostra.

A análise elementar (AE) realizada nas amostras de HAP e HAP-CL estão listadas na Tabela 1. Através desta análise a fração de laurato incorporada foi calculada baseando-se no conteúdo de carbono presente na amostra de HAP-CL. Cada 0,01 mol de carbono encontrado em 100 g de HAP equivalem a 0,1 mmol de laurato por grama de HAP, presente na superfície das HAP-CL. Este método foi utilizado por Da Silva *et al.*⁹⁶ para calcular a porção de agentes silanizantes na superfície da HAP a partir dos resultados encontrados de nitrogênio na análise

elementar. Comparando-se os valores com os dados obtidos por TG, observa-se que a porção de laurato foi similar a AE.

Tabela 1. Porcentagem de carbono (C), hidrogênio (H), nitrogênio (N) e a porção estimada de laurato funcionalizada na superfície das HAP determinado por AE e por TG (N_f).

Técnica	Amostra	C(%)	H(%)	N_f (mmol g⁻¹)
TG	HAP	-	-	0
	HAP-CL	-	-	0,1
AE	HAP	0,28 ± 0,06	0,54 ± 0,01	0
	HAP-CL	1,80 ± 0,03	0,76 ± 0,01	0,1 ± 0,01

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) foi utilizada para a determinação do tamanho da HAP após a funcionalização com CL. Os diâmetros médios obtidos numa distribuição bimodal em isopropanol para a HAP-CL foram de 190 e 460 nm (Figura 16). Comparando-se com o diâmetro médio da HAP (173,1 nm), verifica-se que o tamanho mais que dobrou após a funcionalização, isso pode ser devido a aglomeração das partículas. Quando Hong *et al.* fizeram a enxertia do PLLA na superfície da HAP a partícula passou de um tamanho de 100 nm para 200 nm,¹²⁶ possivelmente devido a formação de aglomerados, assim como observado neste trabalho. Os efeitos da porção hidrofóbica de laurato no tamanho das partículas determinados por medidas de DLS foram tentativamente estudados utilizando-se alguns solventes de polaridades diferentes como clorofórmio e hexano. Entretanto, a determinação não foi possível uma vez que para comparar a HAP com a HAP-CL seria necessário que ambos tivessem uma boa dispersão em um mesmo solvente. Apesar de aparentemente o isopropanol apresentar boa dispersão para ambos, o resultado para o HAP-CL mostrou exatamente o contrário. Além disso, a

agitação mecânica, como a sonicação, foi uma técnica importante como metodologia para diminuir a aglomeração das partículas¹³⁵. Outro aspecto relevante é o formato da HAP, que não é esférico, por isso o tamanho das partículas via DLS não é real.

Figura 16. Distribuição do diâmetro médio das nanopartículas de (A) HAP e (B) HAP-CL, obtidas por espalhamento de luz utilizando isopropanol como solvente dispersante.

4.1.2 Caracterização da PLLA-g-HAP

A enxertia do PLLA na superfície da HAP foi analisada por FTIR (Figura 17). O espectro é caracterizado pela absorção das bandas características presentes na HAP, no PLLA e no PLLA-g-HAP. Os resultados encontrados para a HAP foram os mesmos obtidos na literatura¹²⁶: $3422,7\text{ cm}^{-1}$ (grupo hidroxila), $1033,7$ e $1105,1\text{ cm}^{-1}$ (ν_3), $601,3$ e $562,3$ (ν_4) (grupos fosfato), $1417,8\text{ cm}^{-1}$ (carbonato). O sinal da carbonila em $1735,0\text{ cm}^{-1}$ correspondente ao PLLA foi observado em $1749,3\text{ cm}^{-1}$ no PLLA-g-HAP após a enxertia, desta forma verifica-se a existência do PLLA enxertado na superfície da HAP. Este resultado deixa clara a presença das novas ligações de carboxilato formadas, que são originadas pela polimerização do PLLA na superfície da HAP¹⁰¹.

Figura 17: Espectro de Infravermelho da HAP, PLLA e PLLA-g-HAP.

A comprovação do mecanismo de produção de PLLA enxertado na superfície da HAP foi possível através de análises comparativas de TGA, do PLLA-*g*-HAP e da HAP pura, como pode ser visto na Figura 18. A curva de TGA da HAP mostrou uma pequena perda de massa referente a água (106°C), enquanto o PLLA-*g*-HAP obteve uma notável perda de massa. Isto é atribuído a porção de PLLA enxertado na superfície da HAP.

Figura 18. Curva de TGA da HAP e do PLLA-*g*-HAP.

4.2 Produção dos Nanocompósitos

Nesta seção será descrita a obtenção de nanocompósitos das nanopartículas obtidas com PLLA e PLLA-*co*-PIS, cujos filmes e malhas eletrofiadas foram caracterizados. Primeiramente serão abordados a obtenção dos filmes e os estudos das propriedades mecânicas e de superfície. Posteriormente serão abordados a

produção de malhas eletrofiadas, o estudo morfológico por MEV e MET, de superfície e porosidade.

4.2.1 Filmes de nanocompósitos de poli(L-ácido láctico)

Visando a aplicação destes nanocompósitos como suporte para crescimento celular, foi importante estudar a interação da HAP-CL na matriz polimérica em um polímero bem conhecido na literatura, como o PLLA. Diferentes concentrações das partículas de HAP-CL foram testadas: 05, 10, 21 e 30% (m_m/m_p), para avaliar o desempenho.

Para os estudos das propriedades mecânicas, os filmes foram obtidos pela evaporação do solvente. Após a preparação dos compósitos foi visível a diferença na distribuição das partículas de HAP-CL, PLLA-*g*-HAP e HAP nos filmes de PLLA com o aumento da concentração das partículas. As partículas de PLLA-*g*-HAP acima de 10% (m_m/m_p) e o HAP acima de 5% (m_m/m_p) já apresentaram aglomerações, enquanto o HAP-CL até mesmo em altas concentrações, até 30% (m_m/m_p), apresentaram uma melhor dispersão.

A figura 19A mostra os filmes dos nanocompósitos de PLLA com 30% (m_m/m_p) de: HAP-CL, PLLA-*g*-HAP e HAP. Verifica-se uma distribuição mais homogênea das partículas no compósito contendo HAP-CL (Figura 19A) do que PLLA-*g*-HAP (Figura 19B), sendo que a distribuição (visual) deste último é bastante semelhante à da HAP (Figura 19C), cujos agregados aparecem com maior intensidade ao longo do filme. Isto ocorre devido a melhor compatibilidade da HAP-CL no PLLA.

Figura 19. Filmes de PLLA contendo (A) 30 % (m_m/m_p) de HAP-CL, (B) 30 % (m_m/m_p) de PLLA-*g*-HAP e (C) 30 % (m_m/m_p) de HAP.

Sabe-se que a inclusão de uma carga inorgânica a um polímero, formando um compósito, produz melhorias nas propriedades mecânicas do material¹³⁶. Decidiu-se, portanto, verificar os efeitos dos três tipos de nanopartículas nas propriedades mecânicas de filmes, através de uma análise tensão *versus* deformação exemplificada no Anexo 3, realizado a temperatura ambiente. A relação entre as propriedades mecânicas e o teor de nanopartículas nos filmes de PLLA está disposta na Figura 20. Como esperado, observou-se um aumento do módulo de Young (E) e tensão na ruptura (σ) para os filmes de PLLA contendo as nanopartículas HAP-CL e PLLA-*g*-HAP, o que mostra uma boa compatibilidade, enquanto HAP induziu uma diminuição das propriedades mecânicas de PLLA. No entanto, utilizando HAP-CL, foi possível produzir e manusear amostras contendo até 50% (m_m/m_p) de fase mineral.

Os materiais que constituem o reforço (HAP, PLLA-*g*-HAP e HAP-CL) são envolvidos pela matriz, neste caso o PLLA, devem suportar os esforços aplicados ao compósito e, em geral, apresentam elevada resistência e rigidez.

Entretanto, a inclusão de partículas com baixa compatibilidade em matrizes poliméricas, quando utilizadas como agentes de reforço, resultam em agregação das mesmas (Figuras 19b e 19c), o que leva a um menor ganho das propriedades

mecânicas, como ocorreu com os compósitos de PLLA com PLLA-*g*-HAP e HAP. Partículas agregadas geram pontos de fragilidade no compósito, devido uma descolagem interfacial entre as partículas e o polímero e, neste caso, as nanopartículas podem provocar uma perda da capacidade de carga^{137,138,139}. No entanto, partículas com alta compatibilidade não apresentam agregação, devido a boa dispersão na matriz polimérica¹³⁸ e, portanto, melhoram as propriedades mecânicas. As nanopartículas de HAP-CL desenvolvidas neste trabalho apresentam esta característica, isto é, produzem nanocompósitos com excelente dispersão e ótimas propriedades mecânicas. Em um recente trabalho, os autores Johnson e Herschler¹³⁶ afirmam que há apenas alguns exemplos da literatura do aumento da resistência da matriz polimérica pela adição de HAP em diversas formas (isoformas e compostos inorgânicos). De fato, além dos trabalhos de Chen *et al.*^{101,126,128} usando PLLA-*g*-HAP, nenhum outro exemplo é conhecido.

A quantidade de HAP-CL incluída, que produziu uma melhoria máxima, foi 100% maior do que PLLA-*g*-HAP: para ambos, o módulo de Young e a tensão de ruptura, chegou a 40% para HAP-CL contra 20% para PLLA-*g*-HAP, quando diminui para valores inferiores ao PLLA puro, mostrando a função deles como reforço.

Figura 20. Efeito do teor de nanopartículas sobre as propriedades mecânica dos compósitos em filme de PLLA. (a) módulo de Young, (b) tensão na ruptura.

As propriedades de superfície são fatores muito importantes que devem ser caracterizados em um material cuja aplicação final será a de suporte para crescimento celular. Fatores como energia de superfície, molhabilidade e rugosidade são cruciais para favorecer a adesão celular¹⁴⁰.

A molhabilidade da superfície dos filmes e fibras de PLLA com diferentes conteúdos de HAP-CL e PLLA-*g*-HAP foi determinada pelas medidas de ângulo de contato com água, e os resultados estão resumidos nas tabelas 2 e 5 respectivamente.

Nas medidas realizadas nos filmes em *wafer* de silício, pelo método da gota sésil, (Tabela 2) é possível visualizar uma redução do ângulo de contato com a inclusão de HAP-CL em relação ao PLLA puro, porém não há diferença nas medidas com o aumento de 5 a 30% (m_m/m_p) de HAP-CL. Para o PLLA-*g*-HAP também houve um comportamento parecido com o HAP-CL, uma diminuição dos valores de ângulo de contato em relação ao PLLA puro, e as medidas não mudaram até 21% (m_m/m_p), mas ao contrário do HAP-CL, acima deste valor observa-se uma maior redução do ângulo de contato. Apesar da redução do ângulo de contato, mesmo com a inclusão da HAP-CL, um material com $\theta > 65^\circ$ pode ainda ser considerado hidrofóbico¹⁴¹. De fato espera-se uma redução maior do ângulo de contato para o PLLA-*g*-HAP do que HAP-CL pelo maior caráter hidrofílico de suas partículas devido as hidroxilas terminais nas partículas, porém a superfície rugosa decorrente da maior agregação das partículas, principalmente a 30% (m_m/m_p), também deve ser levada em consideração (Figura 19b).

Tabela 2. Medidas de ângulo de contato realizadas em filmes de PLLA com diferentes conteúdos de HAP-CL e PLLA-*g*-HAP em *wafer* de silício

Conteúdo	$\theta_{\text{H}_2\text{O}}$ (°)	$\theta_{\text{H}_2\text{O}}$ (°)
de NPs (%)	HAP-CL	PLLA-<i>g</i>-HAP
0	81±2	81±2
05	73,6±0,5	70,3±4
10	74,5±0,4	72±4
21	73±2	74±4
30	74,2±0,7	63,3±0,4

A medida de ângulo de histerese, que é a diferença entre o ângulo de avanço e o ângulo de recasso (Tabela 3), é uma ferramenta utilizada para medir a rugosidade do filme, onde filmes considerados lisos devem possuir $\Delta\theta < 10$. Como pode ser visto na Tabela 3, os filmes de PLLA contendo HAP-CL apresentaram uma rugosidade menor que os filmes contendo PLLA-*g*-HAP, mesmo com o aumento da concentração. Assim, apesar da rugosidade mais alta, o PLLA-*g*-HAP mostrou-se mais hidrofílico, o que sugere que as nanopartículas de HAP-CL estão melhor dispersas no interior do polímero, e menos na superfície.

Tabela 3. Histerese de ângulo de contato de filmes de PLLA com diferentes conteúdos de HAP-CL e PLLA-g-HAP

Conteúdo de NPs (%)	HAP-CL			PLLA-g-HAP		
	$\theta_A (^{\circ})$	$\theta_B (^{\circ})$	$\Delta \theta$	$\theta_A (^{\circ})$	$\theta_B (^{\circ})$	$\Delta \theta$
05	73,6±0,5	66±1	7±1	70,3±0,4	60±4	7±2
10	74,5±0,4	66,6±0,3	7,9±0,2	72±4	51±6	21±1
21	73±2	66,5±0,2	6±2	74±4	51±1	21±5
30	74,2±0,7	65,0±0,3	9,2±0,4	63,3±0,4	47±1	17±2

4.2.2 Malhas eletrofiadas dos nanocompósitos de poli(L–ácido láctico)

Na produção das malhas eletrofiadas, as nanopartículas de HAP, PLLA-g-HAP e HAP-CL foram suspensas em clorofórmio com ajuda de um banho de ultrassom. Foi observado que as partículas de HAP-CL tinham uma maior facilidade para dispersarem em clorofórmio do que a HAP e PLLA-g-HAP, devido a hidrofobicidade do material. As suspensões foram adicionadas a uma solução polimérica de 10% (m_p/m_s) de PLLA, e o conteúdo mineral no compósito variou de 5 a 30% (m_m/m_p). Para estudar a morfologia das fibras dos compósitos produzidos acima foram empregadas o MEV e MET, e também outras propriedades como porosidade e molhabilidade.

O MEV é uma ferramenta importante que permite a visualização nítida das fibras que estão presentes nas malhas eletrofiadas, permitindo avaliar seu diâmetro e a presença de artefatos, como, por exemplo, gotas.

A Figura 21 mostra imagens obtidas por MEV das fibras eletrofiadas de PLLA e dos compósitos produzidos com 30% (m_m/m_p) de HAP-CL, PLLA-g-HAP e HAP

pura. Pode-se observar que, mesmo a altas concentrações do mineral as fibras foram eletrofiadas com sucesso e de forma contínua, sem a formação de gotas (exceto no caso do compósito PLLA/HAP-30). Porém, foi observado que o aumento da quantidade de PLLA-*g*-HAP nas fibras eletrofiadas provoca descontinuidade das fibras (“quebras”). O mesmo foi observado por Xu *et al.*¹⁴² em seu trabalho com PLLA-*g*-HAP. Isto pode ser atribuído à aglomeração excessiva das nanopartículas de PLLA-*g*-HAP, gerando pontos frágeis nas fibras. Lao *et al.*¹⁴³ também verificaram em seus estudos que acima de 2,5% (m_m/m_p) de HAP, a aglomeração tornou-se mais crítica e as partículas chegaram a superfície das fibras de PLGA, tornando-as mais rugosas. Song *et al.*¹⁴⁴ produziram fibras de PLGA com diferentes concentrações de PLLA-*g*-HAP e destacam em seus trabalhos o problema da descontinuidade das fibras devido à aglomeração das partículas de PLLA-*g*-HAP, conforme observado no caso do PLLA/HAP-30 e o PLLA/PLLA-*g*-HAP-30 descritos aqui.

Assim, ressalta-se mais uma vez a dificuldade de produzir fibras eletrofiadas com maior concentração de fase mineral sem comprometer as propriedades intrínsecas ao material como aglomeração das partículas, diminuição da porosidade, tamanhos irregulares das fibras, etc. Nesse sentido, a funcionalização das nanopartículas pela reação com cloreto de lauroíla, conforme proposto nesta tese, traz benefícios pelo fato da possibilidade de produzir fibras com alta concentração de HAP, sem comprometer as propriedades descritas acima.

Figura 21. Imagens de MEV obtidas para malhas eletrofiadas de (A) PLLA; (B) PLLA/HAP-CL-30; (C) PLLA/PLL-g-HAP-30 e (D) PLLA/HAP-30.

Para a aplicação em engenharia de tecidos, a distribuição da hidroxiapatita tanto no interior quanto na superfície da fibra tem uma importante influência para a adesão e proliferação celular¹⁴³. Comparando-se as fibras de PLLA com a inclusão de HAP, PLLA-g-HAP e HAP-CL, foram as partículas de HAP-CL que tiveram melhor distribuição da hidroxiapatita ao longo das fibras conforme pode ser observado por microscopia eletrônica de transmissão (MET), que mostra a estrutura interna da nanofibra com mais clareza (Figura 22).

No compósito com HAP não modificada, a aglomeração é evidente, mesmo em baixo teor de nanopartículas (Figura 22A-B). No compósito com PLLA-g-HAP, em baixo teor de nanopartículas (Figura 22C) as partículas permaneceram

aparentemente bem distribuídas. Porém, com teor de nanopartículas em 30% (m_m/m_p) a agregação tornou-se mais intensa, deformando a superfície da fibra (Figura 22D). Já no compósito com as partículas de HAP-CL a situação foi diferente. As partículas permaneceram uniformemente dispersas mesmo a 30% (m_m/m_p) (Figura 22E-F).

Figura 22. Estrutura interna das nanofibras eletrofiadas dos compósitos observadas por MET. PLLA/HAP (A) 5% (m_m/m_p) e (B) 30% (m_m/m_p); PLLA/PLLA-g-HAP (C) 5% (m_m/m_p) e (D) 30% (m_m/m_p); PLLA/HAP-CL (E) 5% (m_m/m_p) e (F) 30% (m_m/m_p).

A homogeneidade na dispersão das nanopartículas contribuiu para a formação de fibras mais lisas sem grande variação de diâmetro, mesmo variando a quantidade de HAP-CL, como mostram as curvas de distribuição de diâmetros mostradas na Figura 23. Fibras mais finas (e homogêneas) são indicativos de uma melhor distribuição das partículas ao longo da malha⁶⁴. Assim como no caso dos filmes, esta melhor distribuição da HAP-CL é devido ao recobrimento da partícula com o laurato, formando uma superfície hidrofóbica na HAP, e prevenindo a aglomeração de partículas.

Figura 23. Tamanho médio das fibras de PLLA/HAP-CL nas seguintes concentrações (m_m/m_p): a) 5%, b) 10%, c) 21% d) 30%.

Outro parâmetro relevante nas fibras é a porosidade. O aumento da porosidade e da área superficial podem auxiliar a adesão e proliferação celular no

suporte polimérico^{91, 114, 145}. A Tabela 4 mostra as medidas de porosidade das malhas eletrofiadas de PLLA com HAP-CL e PLLA-*g*-HAP com diferentes quantidades, calculadas segundo a Equação 1.

As fibras de PLLA puro possuem uma porosidade elevada¹⁴⁶, porém verificou-se uma diminuição da porosidade quando as partículas foram adicionadas. Porém, isto era esperado como reflexo da variação de diâmetro das fibras. Entretanto, observou-se um aumento da porosidade com 30% (m_m/m_p) de HAP-CL comparada com as menores porções de HAP-CL na fibra. Isto pode ser explicado devido os diâmetros das fibras serem muito próximos (Figura 21B), contrariamente a inclusão de PLLA-*g*-HAP a 30% (m_m/m_p) diminuiu a porosidade em relação aos conteúdos de 05 e 10% (m_m/m_p). Isto ocorreu devido a maior aglomeração de PLLA-*g*-HAP ao longo da fibra, devido o aumento do seu conteúdo como exibiu as imagens de MEV e MET (Figuras 21 e 22), provocando uma grande variação no tamanho das fibras. Em um recente estudo Zhang *et al.*¹⁴⁷ também provaram que a alta porosidade no suporte de PCL melhorou a adesão celular. Os poros permitem uma melhor difusão de nutrientes ao longo do suporte favorecendo a cultura celular¹⁴⁸.

Tabela 4. Porosidade das malhas eletrofiadas dos compósitos de PLLA.

Conteúdo de NPs (%)	Porosidade (%)	
	PLLA- <i>g</i> -HAP	HAP-CL
0	92±1	
5	84±3	80±0
10	85±2	80±2
21	82±3	83±1
30	82±2	89±2

Nas medidas de ângulo de contato dinâmico realizadas nas fibras através das medidas de água adsorvida (Tabela 5) é possível observar um aumento do ângulo de contato nas amostras com 5% (m_m/m_p) de HAP-CL comparado ao PLLA puro, porém não ocorreu grande variação do ângulo de contato de 5 a 30% (m_m/m_p) do conteúdo de HAP-CL. Já para amostras contendo PLLA-*g*-HAP pouca diferença é observada até 10% (m_m/m_p) em relação ao PLLA puro; somente acima desta concentração verifica-se um pequeno aumento no ângulo de contato. O aumento do caráter hidrofóbico para o HAP-CL era esperado como reflexo da inclusão de partículas revestidas com uma porção hidrofóbica de laurato. A pequena variabilidade do ângulo de contato com o aumento do conteúdo de HAP-CL pode ser explicada pela boa dispersão e incorporação das partículas nas fibras como observado nas imagens de MET (Figura 22). As partículas de PLLA-*g*-HAP possuem um caráter mais hidrofílico devido as terminações de hidroxila, revelando comportamento diferente. Assim, não foram observadas grandes diferenças nas medidas de ângulo de contato entre o PLLA puro e a inclusão em até 10% (m_m/m_p) de PLLA-*g*-HAP. Nos trabalhos de Xu *et al.*¹⁴² abaixo de 10% (m_m/m_p) do conteúdo

de PLLA-*g*-HAP também não foram observadas diferenças distintas entre as medidas de ângulo de contato, porque quase todas as partículas são incorporadas nas fibras. Já em amostras contendo concentrações acima de 10% (m_m/m_p) de PLLA-*g*-HAP, ocorreram aglomerações de partículas que atingiram a superfície das fibras tornando-as mais rugosas (Figura 21). Além disso, as aglomerações produzem fibras grossas e finas, com grande variação de tamanho. Com isso as fibras mais finas ocupam os espaços entre as outras fibras mais grossa (Figura 21C) causando uma diminuição dos poros, esta diminuição aprisionam mais o ar, que é hidrofóbico, provocando um aumento do ângulo de contato em relação ao PLLA puro. Por este motivo não foi possível determinar o ângulo de contato utilizando esta técnica nas malhas eletrofiadas.

Tabela 5. Medidas de ângulo de contato de água realizadas em malhas eletrofiadas de PLLA com diferentes conteúdos de HAP-CL e PLLA-*g*-HAP.

Conteúdo de	θ_{H_2O} (°)	θ_{H_2O} (°)
NPs(%)	HAP-CL	PLLA- <i>g</i> -HAP
0	77±3	77±3
5	86,8±0,2	78±5
10	85±2	79±3
21	87±1	82±1
30	89±2	82±2

4.2.3 Filmes de Nanocompósitos de poli(succinato de isosorbídeo-*b*-L-lactídeo)

A seguir, será descrita a produção dos nanocompósitos de PLLA-co-PIS com hidroxiapatita. Dados publicados pelo grupo do Laboratório de Biomateriais Poliméricos mostram que este polímero é amorfo (dependendo da proporção de PIS), e na proporção de (70:30) apresentou uma maior energia de superfície frente ao PLLA devido a incorporação de isosorbídeo na cadeia polimérica favorecendo a proliferação celular de fibroblastos⁸³. Neste caso, serão abordados mais profundamente apenas os resultados com as malhas eletrofiadas, que serão utilizadas como suporte para o crescimento celular, e as nanopartículas de HAP-CL, que, conforme visto anteriormente, mostraram-se superiores em comparação às comumente utilizadas na literatura.

Assim como para o PLLA, a funcionalização das partículas de HAP com laurato permitiu uma fácil dispersão das mesmas em uma matriz de PLLA-co-PIS para formar um compósito de PLLA-co-PIS/HAP-CL.

Para o estudo das propriedades mecânicas foram produzidos filmes de PLLA-co-PIS/HAP-CL pela evaporação de solvente variando a concentração de HAP-CL de 5 a 30% (m_m/m_p). Assim como com o PLLA, mesmo com 30% (m_m/m_p) de HAP-CL, houve uma boa dispersão das partículas, sem a formação de aglomerados, podendo serem facilmente manuseados. Porém os filmes de PLLA-co-PIS eram mais frágeis do que os de PLLA. Uma possível explicação para este fato é a diminuição da cristalinidade do PLLA pela inserção de unidades IS como verificado nos estudos de Casarano *et al.*⁸³

Conforme já citado, para o sucesso na fabricação de um suporte polimérico são fundamentais os aspectos das propriedades mecânicas, que desempenharão

um papel importante para enxertos ósseos e na formação de novos tecidos¹²⁷. As propriedades mecânicas dos filmes de PLLA-co-PIS com diferentes porções de HAP-CL, incluindo módulo de Young e tensão na ruptura, também foram avaliadas e estão dispostos na Figura 24. É possível observar que até a inclusão de 21% (m_m/m_p) de HAP-CL não houve alteração significativa no módulo de Young (Figura 24A) e tensão na ruptura (Figura 24B). Com 30% (m_m/m_p) de HAP-CL verificou-se um aumento brusco de 100% no módulo de Young e de 12% na tensão na ruptura. O comportamento do compósito PLLA-co-PIS/HAP-CL foi diferente do PLLA/HAP-CL, em que o módulo de Young foi aumentando gradualmente com o aumento da porção mineral (Figura 20). A quantidade de partículas de HAP-CL para o PLLA-co-PIS não fizeram diferença notável no módulo de elasticidade quando o teor foi inferior a 30% (m_m/m_p), somente nesta concentração a HAP-CL tiveram o efeito de reforço e contribuíram para o aumento da rigidez do material. Mesmo tendo ocorrido uma boa interação entre as partículas de reforço e a matriz polimérica, somente com maior conteúdo de agentes de preenchimento, é possível obter melhoras nas propriedades mecânicas⁹³. Mesmo assim, tanto para o PLLA como para o PLLA-co-PIS, a porção de laurato na superfície das HAP tornou possível a inclusão de grande conteúdo de mineral no polímero.

Figura 24. Efeito do teor de HAP-CL sobre as propriedades mecânica dos compósitos em filme de PLLA-co-PIS. (a) módulo de Young e (b) tensão na ruptura.

4.2.4 Malhas eletrofiadas dos nanocompósitos de poli(succinato de isosorbídeo-*b*-L-lactídeo)

Para a produção das malhas eletrofiadas dos compósitos de PLLA-co-PIS/HAP-CL, o procedimento adotado foi o mesmo para a produção do PLLA/HAP-CL. Para estudar a morfologia das fibras dos compósitos produzidos foram empregados o MEV e MET. O objetivo era avaliar se a mesma dispersão da HAP-CL no PLLA seria observada para o PLLA-co-PIS, e se as partículas também se dispersariam tão bem nas fibras mesmo com altas concentrações de HAP-CL.

As malhas de fibras uniformes de PLLA-co-PIS e PLLA-co-PIS com diferentes conteúdos de HAP-CL, fabricadas por eletrofiação foram analisadas por MEV (Figura 25). Os resultados revelam que o aumento do conteúdo de HAP-CL não provocou mudanças na morfologia das fibras. Nas imagens de MET (Figura 26) do nanocompósito PLLA-co-PIS/HAP-CL-30 observa-se que as partículas permaneceram no interior da fibra. Dessa forma, conclui-se que, assim como ocorreu com o PLLA, as HAP-CL tiveram uma boa integração com o PLLA-co-PIS e consequentemente melhor distribuição ao longo da fibra.

Figura 25. **A** – Imagem de MEV da fibra de PLLA-co-PIS eletrofiada, **B** – Imagem de MEV da fibra de PLLA-co-PIS eletrofiada com HAP-CL 5% (m_m/m_p), **C** – Imagem de MEV da fibra de PLLA-co-PIS eletrofiada com HAP-CL 10% (m_m/m_p), **D** – Imagem de MEV da fibra de PLLA-co-PIS eletrofiada com HAP-CL 30% (m_m/m_p).

Figura 26. Imagens de MET mostrando a estrutura interna das fibras dos compósitos. (a) PLLA-co-PIS pura (b) PLLA-co-PIS contendo HAP-CL 30% (m_m/m_p).

4.2.5 Estudo de degradação *in vitro* do poli(succinato de isosorbídeo-*b*-L-lactídeo) com HAP-CL

Como o PLLA-co-PIS é ainda pouco conhecido na literatura, e visando a aplicação dos compósitos de PLLA-co-PIS/HAP-CL para a engenharia de tecido, é importante o estudo da degradação destes materiais, pois o tempo de degradação deve coincidir com o processo de regeneração do tecido⁷⁷. Para este teste as fibras foram cortadas nas mesmas dimensões e colocadas em PBS (pH 7,4), a 37 °C e com agitação periódica. A perda de massa foi calculada de acordo com a Equação 2.

A Figura 27 mostra a variação da massa do polímero PLLA-co-PIS e dos compósitos com HAP-CL, em diferentes concentrações. Todas as amostras exibiram aproximadamente a mesma cinética de degradação. Nos primeiros 15 dias ocorreu uma pequena perda de massa devido à dissolução de alguns oligômeros solúveis. Após essa primeira perda, a massa permaneceu praticamente inalterada durante os 120 dias de experimento. Após os ensaios de degradação, as amostras foram

analisadas por MEV, e nenhuma alteração estrutural ficou evidente nas fibras após os 120 dias (Figura 28).

Figura 27. Perda de massa das fibras de PLLA-co-PIS e PLLA-co-PIS/HAP-CL: 05, 10, 21 e 30% (m_m/m_p) em função da degradação pelo tempo em PBS.

Figura 28. MEV das malhas eletrofiadas antes (1) e após (2) o ensaio de degradação (120 dias). (A) PLLA-co-PIS, (B) PLLA-co-PIS/HAP-CL-5, (C) PLLA-co-PIS/HAP-CL-10, (D) PLLA-co-PIS/HAP-CL-21 e (E) PLLA-co-PIS/HAP-CL-30.

Mesmo com a inclusão de grande conteúdo de HAP-CL nas fibras, as partículas permaneceram no interior da fibra. Já no trabalho de Xu *et al.*¹⁴², em seu estudo de degradação das fibras de PLLA com PLLA-*g*-HAP, eles observaram um processo inverso: com o aumento da concentração de PLLA-*g*-HAP no polímero, as partículas se posicionaram preferencialmente na superfície da fibra. Um processo mais rápido de degradação foi obtido devido a melhor molhabilidade do compósito, desta forma mais partículas de PLLA-*g*-HAP migraram da fibra para a solução de PBS. As medidas de ângulo de contato da HAP-CL com o PLLA (Tabela 3), já sugerem um compósito com caráter mais hidrofóbico.

Medidas de pH foram realizadas durante o ensaio de degradação (Figura 29), uma vez que os produtos da degradação podem alterar os valores de pH, induzindo processos inflamatórios⁷⁹. Conforme pode ser observado na Figura 29, ocorreu apenas uma pequena queda de pH (7,35 a 7,20), reflexo da liberação de produtos ácidos solúveis resultante da hidrólise do PLLA-co-PIS sem, contudo, atingir valores abaixo de 7,0. Caso houvesse uma variação maior de pH este material poderia apresentar problemas com a resposta inflamatória em aplicações *in vivo* como já mencionado. No caso aqui exposto a resposta inflamatória, resultante dos produtos ácidos da degradação do PLLA-co-PIS, não seria preocupante .

Figura 29. Medidas de pH no meio da cultura durante o processo de degradação das fibras de PLLA-co-PIS e PLLA-co-PIS com HAP-CL: 05, 10, 21 e 30% (m_m/m_p).

4.3 Aplicação dos nanocompósitos produzidos como suportes para o crescimento de células e sua aplicação em regeneração óssea

Para avaliar a viabilidade de aplicação dos suportes poliméricos em regeneração óssea, foram realizados estudos *in vitro* e *in vivo* dos nanocompósitos PLLA/HAP-CL, PLLA/PLLA-g-HAP, PLLA/HAP e PLLA-co-PIS/HAP-CL frente ao seu comportamento quando em contato com sistema biológico. Em especial procurou-se avaliar o efeito sobre as três fases principais do processo de desenvolvimento osteogênico: proliferação, maturação e mineralização da nova ECM gerada, como resultado de sua capacidade de suportar e induzir diferenciação celular.

4.3.1 Estudos *in vitro* com fibroblastos

Inicialmente, foram feitos ensaios de adesão e proliferação celular com fibroblastos. Os fibroblastos são células constituintes do tecido conjuntivo e sua função é formar a substância fundamental amorfa. Fibroblastos apresentam um citoplasma ramificado e rodeado de um núcleo elíptico contendo 1-2 nucléolos. Os fibroblastos ativos podem ser reconhecidos pela abundante ocorrência de retículo endoplasmático, transformando-se em um fibrócito após amadurecimento. Fibroblastos são células responsáveis pela biossíntese de colágeno do tipo 1, além de toda substância intercelular que origina células de outros tecidos conjuntivos, sendo, portanto, os principais responsáveis pela regeneração tecidual²⁵. A linhagem escolhida foi a NIH-3T3, de fibroblastos murinos. Para os ensaios de adesão e proliferação celular escolheu-se um modelo celular mais simples como o fibroblasto para posteriormente prosseguir os estudos com as DPSCs.

O teste de MTT foi realizado para verificar a viabilidade celular nas malhas eletrofiadas dos compósitos de PLLA/HAP-CL (Figura 30). Dentre as amostras testadas destaca-se a PLLA/HAP-CL-30, em que houve um aumento estatisticamente significativo em relação às demais e ao controle (PLLA), a partir do dia 5 ($p < 0,001$). No dia 11 observamos que mesmo as amostras contendo menor porção mineral em sua composição apresentou um aumento significativo ($p < 0,001$) em relação ao PLLA.

A alta viabilidade celular nas fibras de PLLA/HAP-CL-30 demonstra que é possível acelerar a proliferação das células neste tipo de suporte eletrofiado, utilizando maior inclusão de fase mineral. O fato das partículas de HAP-CL ficarem melhor dispersas nas fibras de PLLA mesmo a 30% (m_m/m_p) parece ser um fator

importante para a boa proliferação celular. Para a engenharia de tecidos a distribuição homogênea da hidroxiapatita tanto dentro como fora da fibra influenciará a citocompatibilidade e a proliferação celular^{143,149}.

Figura 30. Ensaio de MTT nas fibras de PLLA e PLLA com HAP-CL 05, 10, 21 e 30% (m_m/m_p) de HAP-CL utilizando células NIH-3T3 de fibroblasto. Teste Anova: diferença significativa * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

4.3.2 Estudos *in vitro* com células-tronco mesenquimais de polpa de dente

ALP é uma glicoproteína da membrana celular que catalisa a hidrólise de diversas biomoléculas fosforiladas tais como nucleotídeos e proteínas, e também desempenha um papel importante no processo de mineralização da matriz óssea. Assim, os ensaios de ALP foram utilizados para investigar se a incorporação da HAP-CL em grandes quantidades poderia modular a diferenciação osteogênica e a

mineralização das DPSCs, pois um aumento da ALP durante a maturação da matriz extracelular representa um marcador da diferenciação osteogênica^{122b}.

Primeiramente, foram testados os nanocompósitos eletrofiados de PLLA/HAP-CL, com diferentes teores de HAP-CL. A atividade da ALP foi medida após 7, 14 e 21 dias de cultura, como mostra a Figura 31. Pode-se observar que, nos dias 14 e 21, a ALP secretada pelas células nas amostras de PLLA/HAP-CL-30 aumentou significativamente em relação ao PLLA ($p < 0,001$) e aos nanocompósitos com menor teor de HAP-CL (5%, $p < 0,001$ e 10%, $p < 0,001$). Isso indica que o aumento do conteúdo de HAP-CL nas fibras favoreceu o processo de diferenciação das DPSCs, tendo maior influência na mineralização. McCullen *et al.*¹⁵⁰ e Takahashi *et al.*¹⁵¹ evidenciaram em seus trabalhos o benefício do aumento da porção mineral no compósito na diferenciação osteogênica, corroborando os resultados aqui apresentados.

Figura 31. Atividade da ALP nas fibras de PLLA e PLLA com HAP-CL 05, 10, 21 e 30% (m_m/m_p) utilizando células de DPSCs. Teste Anova: diferença significativa * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

Para comparar a influência do método de funcionalização das nanopartículas de HAP, também foi medida a atividade da ALP para os nanocompósitos eletrofiados de PLLA/HAP, PLLA/PLLA-g-HAP, PLLA/Trifosfato de Cálcio (PLLA/TCP) e PLLA/HAP-CL, todos com 30% (m_m/m_p) de teor de fase mineral (Figura 32). Verificou-se que, tanto para o dia 14 como para o dia 21, a atividade de ALP do nanocompósito PLLA/HAP-CL foi significativamente maior que dos outros nanocompósitos (PLLA/HAP, $p < 0,001$; PLLA/PLLA-g-HAP, $p < 0,001$ e PLLA/TCP, $p < 0,001$).

Partículas de HAP sem aglomeração e com melhor dispersão apresentarão uma área superficial maior, que favorecerá a dissolução dos íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} , aumentando a sua disponibilidade. Isto induzirá maior atividade da ALP *in vitro* e aumentará a concentração de moléculas osteoindutoras, que causam a

diferenciação das células-tronco em células de linhagem osteogênica¹⁵². Ngiam *et al.*¹⁵³ abordaram nos seus estudos a importância da deposição controlada de HAP no material, não só para a proliferação celular mas também para orientação na diferenciação celular. Hong *et al.*⁹³ relataram que a compatibilidade celular é melhor no compósito com distribuição uniforme da porção mineral na matriz polimérica. Assim, no caso do compósito PLLA/HAP-CL estudado, que apresenta excelente compatibilidade e dispersão, tem-se que, além do teor mineral influenciar na maior atividade da ALP (Figura 31), a boa dispersão das partículas de HAP-CL ao longo da fibra também colaboraram para o aumento da ALP.

Figura 32. Atividade da ALP nas fibras de PLLA e PLLA com HAP 30, PLLA-g-HAP-30, TCP-30 e HAP-CL-30 utilizando as células DPSC. Teste Anova: diferença significativa * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

Sabe-se que as malhas eletrofiadas de PLLA-co-PIS apresentam maior adesão e proliferação celular que o PLLA eletrofiado, o que foi atribuído à maior energia de superfície do copolímero, associada à incorporação de isosorbídeo na cadeia

polimérica⁸³. É evidente que, além da natureza química do polímero, outros fatores influenciam na adesão celular como rugosidade e cristalinidade^{143,154}.

Para testar a influência do polímero na diferenciação celular com as partículas de HAP-CL, foi avaliada a atividade de ALP nas malhas eletrofiadas de PLLA-co-PIS e PLLA e nos compósitos PLLA-co-PIS/HAP-CL-30 e PLLA/HAP-CL-30 (Figura 33). O PLLA-co-PIS/HAP-CL-30 apresentou uma atividade da ALP maior em relação ao PLLA, o PLLA-co-PIS e o PLLA/ HAP-CL-30 ($p < 0,05$) no dia 21.

Figura 33. Atividade da ALP nas fibras de PLLA, PLLA/HAP-CL-30, PLLA-co-PIS e PLLA-co-PIS/HAP-CL-30 utilizando DPSCs. Teste Anova: diferença significativa * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

O corante ARS liga-se a sais de cálcio de forma seletiva e é amplamente utilizado para histoquímica mineral de cálcio, em tecido ósseo, onde manchas vermelhas (nódulos ósseos) são observadas como resultado da quelação do ARS com o cálcio¹⁵⁵. Portanto, esse reagente foi usado para caracterizar a formação *in vitro* de nódulos ósseos a partir das DPSCs cultivadas em malhas eletrofiadas de

PLLA e PLLA contendo 5, 10, 21 e 30% (m_m/m_p) de HAP-CL aos 14 dias e aos 21 dias de cultura. Na Figura 34A e B estão os registros fotográficos das malhas aos 14 dias e aos 21 dias de cultura, coradas com ARS. Pode-se observar que as membranas de PLLA/HAP-CL-30 apresentam um vermelho mais intenso em ambos os tempos de cultura (o controle sem células mostrado na fotografia consiste de uma malha de PLLA/HAP-CL-30 submetida às mesmas condições de cultura, porém sem a adição de células), o que mostra claramente a maior mineralização da matriz do que o PLLA puro e os compósitos com menor teor de HAP-CL.

A quantificação da mineralização foi feita através da dessorção do ARS das malhas em 10% de cloreto de cetilpiridínio por 1 hora, e determinando-se a absorbância em 570 nm ($n=3$) (Figura 34C). Os resultados das análises de absorbância confirmam quantitativamente o aumento da fixação de cálcio nas malhas de PLLA/HAP-CL-30 aos 14 dias ($p < 0,05$) e aos 21 dias ($p < 0,001$) em relação ao controle (a malha de PLLA/HAP-CL-30 sem a adição de células apresentou absorbância nula) e em relação aos compósitos com menor teor de HAP-CL.

Figura 34. Análise da deposição mineral nas fibras de PLLA, PLLA com HAP-CL 05, 10, 21 e 30% (m_m/m_p) pelo teste de ARS utilizando as células DPSCs. (A) Fotografia da coloração ARS mostrando uma maior deposição de cálcio nas fibras de PLLA/HAP-CL-30 durante 14 dias (B) Fotografia da coloração ARS mostrando uma maior deposição de cálcio nas fibras de PLLA/HAP-CL-30 durante 21 dias (C) O resultado mostrou a quantificação mais elevada da coloração para PLLA/HAP-CL-30 durante os dias 14 e 21. Teste Anova: diferença significativa * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

Assim, pode-se dizer que o aumento da inclusão de HAP-CL nos compósitos com PLLA influenciou na etapa de mineralização durante a diferenciação celular, conforme também foi observado por Chuenjitkuntaworn *et al.*¹⁵⁶, que mostrou que o

aumento de 0,5% de HAP (m_m/m_p) nos compósitos de PLLA/HAP causa um aumento na mineralização após 21 dias. Da mesma forma, estudos *in vivo* feitos por Seyedjafari *et al.*¹⁵⁷ sobre a produção de suportes poliméricos eletrofiados de PLLA revestido com hidroxiapatita para diferenciação de células-tronco de cordão umbilical mostraram que após 10 semanas do implante os suportes sem HAP não mostraram deposição de cálcio e apresentaram resposta inflamatória crônica granulomatosa, enquanto os suportes com HAP apresentaram mineralização significativa com pouca resposta inflamatória.

Visando avaliar a variação da mineralização em função do método de funcionalização das partículas, o teste de ARS também foi realizado nas diferentes formas de inclusão mineral (HAP, PLLA-g-HAP, TCP e HAP-CL) em fibras de PLLA, todos com teor de HAP de 30% (m_m/m_p), aos 14 dias (Figura 35A) e 21 dias de cultura (Figura 35B). Pode-se ver que a coloração vermelha mais intensa, indicando maior mineralização da malha foi novamente observada para o compósito PLLA/HAP-CL, tanto em 14 quanto em 21 dias de cultura.

Quantitativamente, em 21 dias, a mineralização da PLLA/HAP-CL-30 foi maior que o PLLA, PLLA/HAP-30, PLLA/PLLA-g-HAP-30 ($p < 0,001$) e PLLA/TCP-30 ($p < 0,01$) (Figura 35C). Isso demonstra que houve um ganho no processo de mineralização das malhas de PLLA com a utilização de HAP-CL. Este ganho pode ser novamente explicado pela melhor dispersão das partículas em comparação com os outros métodos de funcionalização, conforme já visto. Além disso, uma superfície mais rígida pode facilitar a adesão e a proliferação celular sobre um determinado suporte¹⁵⁸. Para a carga de um tecido como o osso, o suporte polimérico deve ser forte o suficiente para resistir às deformações, evitando assim o colapso do tecido em desenvolvimento⁹.

Figura 35. Análise da deposição mineral nas fibras de PLLA, PLLA/HAP-30, PLLA/PLLA-g-HAP-30, PLLA/TCP-30 e PLLA/HAP-CL-30 pelo teste de ARS utilizando DPSCs. (A) Fotografia da coloração ARS mostrando uma maior deposição de cálcio nas fibras de PLLA/HAP-CL-30 durante 14 dias (B) Fotografia da coloração ARS mostrando uma maior deposição de cálcio nas fibras de PLLA/HAP-CL-30 durante 21 dias (C) O resultado mostrou a quantificação mais elevada da coloração ARS para a amostra de PLLA/HAP-CL-30 durante os dias 14 e 21. Teste Anova: diferença significativa * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

Comparando-se agora os compósitos PLLA/HAP-CL-30 e PLLA-co-PIS/HAP-CL-30, observa-se novamente a coloração mais intensa do ARS nas malhas produzidas a partir do PLLA-co-PIS (Figura 36A e B). Quantitativamente, o PLLA-co-PIS/HAP-CL-30 foi significativamente maior que PLLA-co-PIS nos dias 14 ($p < 0,001$) e 21 ($p < 0,05$) (Figura 36C).

Figura 36. Análise da deposição mineral nas fibras de PLLA, PLLA/HAP-CL-30, PLLA-co-PIS, PLLA-co-PIS/HAP-CL-30 pelo teste de ARS utilizando DPSC. (A) Fotografia da coloração ARS mostrando uma maior deposição de cálcio nas fibras de PLLA-co-PIS/HAP-CL-30 durante 14 dias (B) Fotografia da coloração ARS mostrando uma maior deposição de cálcio nas fibras de PLLA-co-PIS/HAP-CL-30 durante 21 dias (C) O resultado mostrou a quantificação mais elevada da coloração ARS para a amostra de PLLA-co-PIS/HAP-CL-30 durante os dias 14 e 21. Teste Anova: diferença significativa * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

Da mesma forma, o PLLA-co-PIS/HAP-CL-30 também apresentou maior mineralização do que o PLLA/HAP-CL-30 para o dia 14 ($p < 0,05$) e o dia 21 ($p < 0,05$), o que corrobora a superioridade do PLLA-co-PIS na diferenciação das DPSCs. A maior energia de superfície e a composição química do PLLA-co-PIS favorece desde a etapa de proliferação até a etapa de maturação.

Osteocalcina (OSC) e osteopontina (OSP) são proteínas envolvidas na mineralização da matriz extracelular¹⁵⁹. OSC indica a presença fenotípica de osteoblastos maduros¹⁶⁰, já que é secretada exclusivamente por este tipo celular. Igualmente, OSP, uma glicoproteína multifuncional responsável pela regulação da deposição mineral¹⁶¹ é também considerada um marcador de diferenciação em osteoblastos, apesar de ser expressa em outros tipos celulares.

A OSC e OSP foram detectadas após 21 dias por imunofluorescência nas células cultivadas sobre os suportes poliméricos de PLLA, PLLA/HAP-CL-30, PLLA-co-PIS e PLLA-co-PIS/HAP-CL-30. As proteínas são marcadas na coloração verde, tanto para OSC como para OSP, enquanto que os núcleos celulares são marcados em azul (DAPI) (Figura 37 e Figura 38). O aumento da intensidade dos pontos brilhantes nas amostras contendo HAP-CL indicam uma produção mais elevada das duas proteínas em relação ao PLLA e PLLA-co-PIS (controles). Os pontos brilhantes aumentam quando ocorrem mais ligações do substrato, que são provavelmente relacionados com a produção de OSC e OSP¹⁶². Estes resultados estão de acordo com os mostrados anteriormente, a presença da HAP-CL colaborou para a diferenciação osteogênica, e promoveu maior deposição mineral sobre os suportes poliméricos. O aumento de marcadores osteogênicos provocado pela presença da HAP-CL é importante, pois, em um recente trabalho, Kasper *et al.*¹⁶³ destacam que o aumento de marcadores osteogênicos em culturas *in vitro* favorecem o reparo ósseo

in vivo, enquanto a diminuição pode levar um desempenho menos favorável do suporte.

Figura 37. Imagens de imunofluorescência de OSC (esquerda) e DAPI (direita) nas células de DSPCs cultivadas sobre os suportes: (A) PLLA; (B) PLLA/HAP-CL-30; (C) PLLA-co-PIS e (D) PLLA-co-PIS/HAP-CL-30.

Figura 38. Imagens de imunofluorescência de OSP (esquerda) e DAPI (direita) nas células de DPSCs cultivadas sobre os suportes: (A) PLLA; (B) PLLA/HAP-CL-30; (C) PLLA-co-PIS e (D) PLLA-co-PIS/HAP-CL-30.

4.3.3 Estudos *in vivo*

Finalmente, os materiais descritos acima foram submetidos a testes *in vivo*. Uma vez que nos estudos *in vitro* foi verificado uma melhor diferenciação osteogênica nos materiais de PLLA e PLLA-co-PIS, ambos com 30% (m_m/m_p) de HAP-CL, resolveu-se avaliar a habilidade regenerativa destes materiais *in vivo*.

O teste *in vivo* foi conduzido da a partir da geração cirúrgica de defeito craniano bilateral em ratos Wistar. Os defeitos foram preenchidos com suportes de PLLA/HAP-CL-30 e PLLA-co-PIS/HAP-CL-30; no defeito da direita o suporte havia sido cultivado com as DPSCs e, como controle, no defeito da esquerda foi colocado apenas o material sem células. Cada material foi testado em um grupo de 5 ratos (Figura 39).

Figura 39. Modelo de defeito craniano bilateral. (a) Espessura do defeito de 5 mm×5 mm. (b) Preenchimento do defeito com suportes de PLLA/HAP-CL-30 e PLLA-co-PIS/HAP-CL-30 (na esquerda suporte sem célula, na direita suporte com $1,0 \times 10^6$ DPSCs).

A formação do osso novo nos locais de defeito foram tridimensionalmente analisados por tomografia (Micro-CT) em uma amostra de cada grupo após 16 semanas (Figura 40). Na amostra de PLLA-co-PIS/HAP-CL-30 pode-se observar

uma neoformação óssea do lado direito na borda superior e em alguns pontos ao longo do defeito como indicam as setas amarelas (Figura 40A), enquanto no lado esquerdo (controle) não foram vistas neoformações ósseas. Na amostra de PLLA/HAP-CL-30 não foram evidenciados sinais de neoformação óssea comparado com o controle (Figura 40B).

Figura 40. Micro-CT mostrando o defeito na calota craniana após 16 semanas do implante *in vivo*. a) Implante com PLLA-co-PIS/HAP-CL-30, a esquerda suporte sem DPSCs, a direita suporte com DPSCs, flechas amarelas indicam neoformação óssea. b) Implante com PLLA/HAP-CL-30, a esquerda suporte sem DPSCs, a direita suporte com DPSCs.

As cobais foram sacrificadas após 16 semanas e o exame histológico (Figura 41) revelou a formação de osso regenerado com uma estrutura típica de osso neoformado, sem a presença de lamelações características de osso maduro, nos

defeitos implantados com PLLA-co-PIS/HAP-CL-30, como mostram as flechas verdes, enquanto o osso antigo é indicado pelas flechas amarelas. Em contraste, nenhuma neoformação óssea foi verificada no implante de PLLA/HAP-CL-30, constatando-se apenas a presença de tecido fibroso.

Nos estudos *in vivo*, uma neoformação somente foi observada no PLLA-co-PIS/HAP-CL 30. Seguindo o protocolo criado por Spicer *et al.*⁴⁴, que descreve uma pontuação para avaliar o grau de regeneração óssea, que vai de 0 (sem regeneração) a 4 (regenerado por completo), obteve-se com o PLLA-co-PIS/HAP-CL-30 uma regeneração óssea com pontuação 2, que representa um tecido mineralizado somente na borda do defeito. Isto indica uma modesta regeneração quando comparado com alguns trabalhos da literatura^{49,50}.

Estes resultados revelaram também a importância do componente celular para a neoformação óssea e mostraram a inabilidade dos suportes sem células, usados como controle, na formação de osso novo (Figura 40). Apesar da regeneração óssea no defeito preenchido com PLLA-co-PIS/HAP-CL-30 ter sido modesta após 16 semanas, recentes pesquisas mostram que uma regeneração mais robusta é possível com fatores de crescimento^{50,164,105} pois alguns fatores de indução óssea tais como as proteínas morfogênicas dos ossos se esgotam com o tempo de cultura⁵⁹. Portanto, a presença de alguns fatores de crescimento nos suportes de PLLA-co-PIS/HAP-CL podem favorecer uma regeneração óssea mais rápida e com maior proporção.

Figura 41. Histologia da calota craniana reparada após 16 semanas do implante *in vivo*. Coloração de hematoxilina e eosina da calota reparada implantada com PLLA-co-PIS/HAP-CL-30: suporte sem DPSCs (a, b), suporte com DPSCs (c,e) aumento de 10 X, suporte com DPSCs (d,f) aumento de 20 X. Coloração de hematoxilina e eosina da calota reparada implantada com PLLA/HAP-CL-30: suporte sem DPSCs (g), suporte com DPSCs, ambas com aumento de 20 X. Flechas amarelas indicam o osso antigo, flechas verdes indicam osso novo.

5 CONCLUSÕES

Na busca por novos suportes eletrofiados para melhorar a regeneração óssea agregando os benefícios da HAP, propusemos uma nova metodologia para a inclusão deste mineral de uma forma mais eficaz do que o método existente na literatura de enxertia de PLLA na superfície da HAP. Além disso, conseguimos incluir elevados teores de HAP, preservando suas propriedades mecânicas. Isto foi possível devido a funcionalização da superfície da HAP com grupos lauratos, a partir da reação direta da HAP com CL.

A funcionalização da superfície da HAP com CL foi comprovada pelas técnicas de FTIR, RMN ^{13}C sólido, TG/MS e análise elementar. Por FTIR e RMN ^{13}C sólido conseguimos mostrar a ligação carboxilato formada entre HAP e o laurato. A análise de TG/MS serviu como ferramenta para determinar a massa dos gases produzidas decorrentes das perdas de massa. O sinal de $m/z=44$ foi produzido devido à decomposição da matéria orgânica, neste caso a porção de laurato presente na HAP. Pela análise elementar e termogravimetria foi possível determinar a porção de laurato na superfície da HAP.

Provamos por análise mecânica a possibilidade de criar compósitos com grandes quantidades de HAP-CL com PLLA e PLLA-co-PIS sem a perda das propriedades mecânicas. O MEV e o MET mostraram a melhor distribuição da HAP-CL com o conteúdo de 30% (m_m/m_p) nas fibras de PLLA em comparação ao PLLA-g-HAP, e a boa dispersão da HAP-CL nas fibras de PLLA-co-PIS.

Nos experimentos *in vitro*, o PLLA/HAP-CL 30 exibiu melhor proliferação celular com NIH – 3T3 em relação as menores inclusões de HAP-CL. Na cultura das DPSCs nas fibras de PLLA com HAP-CL 30 apresentou um aumento significativo da

ALP nos dias 14 e 21, e um maior processo de mineralização pelo teste de ARS. O PLLA-co-PIS/HAP-CL-30 apresentou maior atividade da ALP no dia 21 e maior processo de mineralização nos dias 14 e 21 quando comparado ao PLLA/HAP-CL-30. O PLLA e PLLA-co-PIS, ambos com HAP-CL-30, induziram uma produção mais elevada da OSC e OSP em relação ao PLLA e PLLA-co-PIS (controle).

Nos experimentos *in vivo* mostramos uma neoformação óssea nos implantes de PLLA-co-PIS/HAP-CL 30 por Micro-CT e exame histológico. Neste estudo destacamos o potencial dos suportes de PLLA-co-PIS com grande inclusão de HAP-CL para a aplicação na engenharia de tecido ósseo.

De maneira geral, este estudo ressalta o grande potencial de compósitos com HAP-CL para o desenvolvimento de novos suportes para engenharia de tecido ósseo, e a contribuição desses materiais para o aumento da regeneração óssea.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Silver, F. H. D., C., *Biocompatibility: Interaction of Biological and Implantable Materials*. VCH Publisher Inc.: New York, 1989.
2. Saltzman, M. W., *Biomedical engineering: bridging medicine and technology*. Cambridge University Press: New York, 2009.
3. Tan, L. Y., X.; Wan, P.; Yang, K., Biodegradable Materials for Bone Repairs: A Review. *Journal Material Science and Technology* **2013**, 29(6), 503-513.
4. Ravichandran, R.; Sundarrajan, S.; Venugopal, J. R.; Mukherjee, S.; Ramakrishna, S., Advances in Polymeric Systems for Tissue Engineering and Biomedical Applications. *Macromol Biosci* **2012**, 12 (3), 286-311.
5. Waese, E. Y. K., R. R.; Stanford, W. L., *Application of stem cells in bone repair*. In: Skeletal Radiol online ed.; 2007.
6. Harrison, R. G., Observations on the living developing nerve fiber. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **1907**, 4, 140-143.
7. Rosenberg, S. A., Gene Transfer into Humans — Immunotherapy of Patients with Advanced Melanoma, Using Tumor-Infiltrating Lymphocytes Modified by Retroviral Gene Transduction. *New England Journal of Medicine* **1990**, 323, 570-578.
8. Saltzman, W. M., *Tissue engineering: engineering principles for the design of replacement organs and tissue*. Oxford University Press, Inc.: New York, 2004.
9. Ratner D. B., H. S. A., Schoen J. F., Lemons E. J., *Biomaterials Science*. 2a. ed.; 2004.
10. Woodruff, M. A.; Lange, C.; Reichert, J.; Berner, A.; Chen, F. L.; Fratzl, P.; Schantz, J. T.; Hutmacher, D. W., Bone tissue engineering: from bench to bedside. *Mater Today* **2012**, 15 (10), 430-435.

11. Holzapfel, B. M. C., P. M.; Petrus, F.; Melchels, W.; Holzapfel, N. P.; Prodinger, M. P.; Eisenhart-Rothe, R.; Griensven, M.; Schantz, T.; Rudert, M.; Hutmacher, W. D. , Can Bone Tissue Engineering Contribute to Therapy Concepts after Resection of Musculoskeletal Sarcoma? *Sarcoma* **2013**, 2013, 10.
12. Melchels, F. P. W.; Domingos, M. A. N.; Klein, T. J.; Malda, J.; Bartolo, P. J.; Hutmacher, D. W., Additive manufacturing of tissues and organs. *Prog Polym Sci* **2012**, 37 (8), 1079-1104.
13. Higuchi, A.; Ling, Q. D.; Hsu, S. T.; Umezawa, A., Biomimetic Cell Culture Proteins as Extracellular Matrices for Stem Cell Differentiation. *Chem Rev* **2012**, 112 (8), 4507-4540.
14. Agarwal, S.; Wendorff, J. H.; Greiner, A., Progress in the Field of Electrospinning for Tissue Engineering Applications. *Adv Mater* **2009**, 21 (32-33), 3343-3351.
15. Kumari, A.; Yadav, S. K.; Yadav, S. C., Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloid Surface B* **2010**, 75 (1), 1-18.
16. Martino, S.; D'Angelo, F.; Armentano, I.; Kenny, J. M.; Orlacchio, A., Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine. *Biotechnol Adv* **2012**, 30 (1), 338-351.
17. Dvir, T.; Timko, B. P.; Kohane, D. S.; Langer, R., Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat Nanotechnol* **2011**, 6 (1), 13-22.
18. Kai, D.; Jin, G. R.; Prabhakaran, M. P.; Ramakrishna, S., Electrospun synthetic and natural nanofibers for regenerative medicine and stem cells. *Biotechnol J* **2013**, 8 (1).
19. Beachley, V.; Wen, X. J., Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. *Prog Polym Sci* **2010**, 35 (7), 868-892.

20. Dahlin, R. L.; Kasper, F. K.; Mikos, A. G., Polymeric Nanofibers in Tissue Engineering. *Tissue Eng Part B-Re* **2011**, 17 (5), 349-364.
21. Zhang, L. J.; Webster, T. J., Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nano Today* **2009**, 4 (1), 66-80.
22. Dimitriou, R.; Jones, E.; McGonagle, D.; Giannoudis, P. V., Bone regeneration: current concepts and future directions. *Bmc Med* **2011**, 9.
23. Li, L. H.; Kommareddy, K. P.; Pilz, C.; Zhou, C. R.; Fratzl, P.; Manjubala, I., In vitro bioactivity of bioresorbable porous polymeric scaffolds incorporating hydroxyapatite microspheres. *Acta Biomater* **2010**, 6 (7), 2525-2531.
24. Puppi, D.; Chiellini, F.; Piras, A. M.; Chiellini, E., Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Prog Polym Sci* **2010**, 35 (4), 403-440.
25. Junqueira, C. L. C., Jose, *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 2008.
26. Hollinger, O. J. E., A. T.; Doll, A. B.; Sfeir, C., *Bone Tissue Engineering*. Taylor e Francis e-Library ed.; 2005.
27. Orimo, H., The Mechanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in Health and Disease. *Journal of Nippon Medical School* **2010**, 77, 4-12.
28. Meyer, U.; Meyer, T.; Vossians, J.; Joos, U., Decreased expression of osteocalcin and osteonectin in relation to high strains and decreased mineralization in mandibular distraction osteogenesis. *J Cranio Maxill Surg* **1999**, 27 (4), 222-227.
29. Rosenthal, A. K.; Gohr, C. M.; Uzuki, M.; Masuda, I., Osteopontin promotes pathologic mineralization in articular cartilage. *Matrix Biol* **2007**, 26 (2), 96-105.

30. Jang, J. H.; Castano, O.; Kim, H. W., Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering. *Adv Drug Deliver Rev* **2009**, *61* (12), 1065-1083.
31. Depan, D.; Misra, R. D. K., Processing-structure-functional property relationship in organic-inorganic nanostructured scaffolds for bone-tissue engineering: The response of preosteoblasts. *J Biomed Mater Res A* **2012**, *100A* (11), 3080-3091.
32. Reichert, C. J. H., D. W., Bone Tissue Engineering. In *Tissue Engineering* , Springer Berlin Heidelberg: 2011; p 643.
33. Zanetti, A. S.; Sabliov, C.; Gimble, J. M.; Hayes, D. J., Human adipose-derived stem cells and three-dimensional scaffold constructs: A review of the biomaterials and models currently used for bone regeneration. *J Biomed Mater Res B* **2013**, *101B* (1), 187-199.
34. Antolini, E., Composite materials An emerging class of fuel cell catalyst supports. *Appl Catal B-Environ* **2010**, *100* (3-4), 413-426.
35. Park, C. H.; Rios, H. F.; Jin, Q. M.; Sugai, J. V.; Padial-Molina, M.; Taut, A. D.; Flanagan, C. L.; Hollister, S. J.; Giannobile, W. V., Tissue engineering bone-ligament complexes using fiber-guiding scaffolds. *Biomaterials* **2012**, *33* (1), 137-145.
36. Zhang, Q. W.; Mochalin, V. N.; Neitzel, I.; Hazeli, K.; Niu, J. J.; Kontsos, A.; Zhou, J. G.; Lelkes, P. I.; Gogotsi, Y., Mechanical properties and biomineralization of multifunctional nanodiamond-PLLA composites for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2012**, *33* (20), 5067-5075.
37. Yu, Y. Y.; Lieu, S.; Lu, C. Y.; Colnot, C., Bone morphogenetic protein 2 stimulates endochondral ossification by regulating periosteal cell fate during bone repair. *Bone* **2010**, *47* (1), 65-73.

38. Giannoudis, P. V.; Pountos, I., Tissue regeneration - The past, the present and the future. *Injury* **2005**, 36, S2-S5.
39. Kirkpatrick, C. J.; Fuchs, S.; Hermanns, M. I.; Peters, K.; Unger, R. E., Cell culture models of higher complexity in tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials* **2007**, 28 (34), 5193-5198.
40. Yu, X. J.; Botchwey, E. A.; Levine, E. M.; Pollack, S. R.; Laurencin, C. T., Bioreactor-based bone tissue engineering: The influence of dynamic flow on osteoblast phenotypic expression and matrix mineralization. *P Natl Acad Sci USA* **2004**, 101 (31), 11203-11208.
41. Gomes, P. S.; Fernandes, M. H., Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim-Uk* **2011**, 45 (1), 14-24.
42. Ward, B. B.; Brown, S. E.; Krebsbach, P. H., Bioengineering strategies for regeneration of craniofacial bone: a review of emerging technologies. *Oral Dis* **2010**, 16 (8), 709-716.
43. Nelson, R. R.; Buterbaugh, K.; Perl, M.; Gelijns, A., How medical know-how progresses. *Res Policy* **2011**, 40 (10), 1339-1344.
44. Spicer, P. P.; Kretlow, J. D.; Young, S.; Jansen, J. A.; Kasper, F. K.; Mikos, A. G., Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc* **2012**, 7 (10), 1918-1929.
45. Pearce, A. I.; Richards, R. G.; Milz, S.; Schneider, E.; Pearce, S. G., Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. *Eur Cells Mater* **2007**, 13, 1-10.

46. Bodde, E. W. H.; Spauwen, P. H. M.; Mikos, A. G.; Jansen, J. A., Closing capacity of segmental radius defects in rabbits. *J Biomed Mater Res A* **2008**, *85A* (1), 206-217.
47. Reichert, J. C.; Epari, D. R.; Wullschleger, M. E.; Saifzadeh, S.; Steck, R.; Lienau, J.; Sommerville, S.; Dickinson, I. C.; Schutz, M. A.; Duda, G. N.; Hutmacher, D. W., Establishment of a Preclinical Ovine Model for Tibial Segmental Bone Defect Repair by Applying Bone Tissue Engineering Strategies. *Tissue Eng Part B-Re* **2010**, *16* (1), 93-104.
48. Muschler, G. F.; Raut, V. P.; Patterson, T. E.; Wenke, J. C.; Hollinger, J. O., The Design and Use of Animal Models for Translational Research in Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Tissue Eng Part B-Re* **2010**, *16* (1), 123-145.
49. Lee, J. Y. L., H. J.; Cho, J. H.; Kim, K. H.; Yoon, R. T.; Shin, H., Electrospun fibers immobilized with bone forming peptide-1 derived from BMP7 for guided bone regeneration. *Biomaterials* **2013**, *34*, 5059-5069.
50. Liu, H. H.; Peng, H. J.; Wu, Y.; Zhang, C.; Cai, Y. Z.; Xu, G. W.; Li, Q.; Chen, X.; Ji, J. F.; Zhang, Y. Z.; OuYang, H. W., The promotion of bone regeneration by nanofibrous hydroxyapatite/chitosan scaffolds by effects on integrin-BMP/Smad signaling pathway in BMSCs. *Biomaterials* **2013**, *34* (18), 4404-4417.
51. Grompe, M., Tissue Stem Cells: New Tools and Functional Diversity. *Cell Stem Cell* **2012**, *10* (6), 685-689.
52. Illich, D. J.; Demir, N.; Stojkovic, M.; Scheer, M.; Rothamel, D.; Neugebauer, J.; Hescheler, J.; Zoller, J. E., Concise Review: Induced Pluripotent Stem Cells and Lineage Reprogramming: Prospects for Bone Regeneration. *Stem Cells* **2011**, *29* (4), 555-563.

53. Guillot, P. V.; Cui, W.; Fisk, N. M.; Polak, D. J., Stem cell differentiation and expansion for clinical applications of tissue engineering. *J Cell Mol Med* **2007**, *11* (5), 935-944.
54. Joyce, N.; Annett, G.; Wirthlin, L.; Olson, S.; Bauer, G.; Nolte, J. A., Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen Med* **2010**, *5* (6), 933-946.
55. Godfrey, K. J.; Mathew, B.; Bulman, J. C.; Shah, O.; Clement, S.; Gallicano, G. I., Stem cell-based treatments for Type 1 diabetes mellitus: bone marrow, embryonic, hepatic, pancreatic and induced pluripotent stem cells. *Diabetic Med* **2012**, *29* (1), 14-23.
56. Jones, E.; Yang, X. B., Mesenchymal stem cells and bone regeneration: Current status. *Injury* **2011**, *42* (6), 562-568.
57. Jakob, M.; Saxer, F.; Scotti, C.; Schreiner, S.; Studer, P.; Scherberich, A.; Heberer, M.; Martin, I., Perspective on the Evolution of Cell-Based Bone Tissue Engineering Strategies. *Eur Surg Res* **2012**, *49* (1), 1-7.
58. Djouad, F.; Guerit, D.; Marie, M.; Toupet, K.; Jorgensen, C.; Noel, D., Mesenchymal Stem Cells: New Insights into Bone Regenerative Applications. *J Biomater Tiss Eng* **2012**, *2* (1), 14-28.
59. Schubert, T.; Lafont, S.; Beaurin, G.; Grisay, G.; Behets, C.; Gianello, P.; Dufrane, D., Critical size bone defect reconstruction by an autologous 3D osteogenic-like tissue derived from differentiated adipose MSCs. *Biomaterials* **2013**, *34* (18), 4428-4438.
60. Zhang, P. H. Z. Y., T.; Chen, X.; Jing, X., In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly (lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly(L-lactide). *Biomaterials* **2009**, *30*, 58-70.

61. Furth, M. E.; Atala, A.; Van Dyke, M. E., Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials* **2007**, 28 (34), 5068-5073.
62. Olivier, V.; Faucheux, N.; Hardouin, P., Biomaterial challenges and approaches to stem cell use in bone reconstructive surgery. *Drug Discov Today* **2004**, 9 (18), 803-811.
63. Arinzech, T. L.; Tran, T.; Mcalary, J.; Daculsi, G., A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. *Biomaterials* **2005**, 26 (17), 3631-3638.
64. Yang, X. C.; Yang, F.; Walboomers, X. F.; Bian, Z. A.; Fan, M. W.; Jansen, J. A., The performance of dental PCL/gelatin/nHA scaffolds pulp stem cells on nanofibrous. *J Biomed Mater Res A* **2010**, 93A (1), 247-257.
65. Gronthos, S. M., M.; Brahimi, J.; Robey, P. G.; Shi, S. , Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and invivo. *P Natl Acad Sci USA* **2000**, 97, 13625-13630.
66. Volponi, A. A.; Pang, Y.; Sharpe, P. T., Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends Cell Biol* **2010**, 20 (12), 715-722.
67. Szpalski, C.; Barbaro, M.; Sagebin, F.; Warren, S. M., Bone Tissue Engineering: Current Strategies and Techniques-Part II: Cell Types. *Tissue Eng Part B-Re* **2012**, 18 (4), 258-269.
68. d'Aquino, R.; De Rosa, A.; Laino, G.; Caruso, F.; Guida, L.; Rullo, R.; Checchi, V.; Laino, L.; Tirino, V.; Papaccio, G., Human Dental Pulp Stem Cells: From Biology to Clinical Applications. *J Exp Zool Part B* **2009**, 312B (5), 408-415.
69. Yan, M.; Yu, Y.; Zhang, G. D.; Tang, C. B.; Yu, J. H., A Journey from Dental Pulp Stem Cells to a Bio-tooth. *Stem Cell Rev Rep* **2011**, 7 (1), 161-171.

70. Atari, M.; Gil-Recio, C.; Fabregat, M.; Garcia-Fernandez, D.; Barajas, M.; Carrasco, M. A.; Jung, H. S.; Alfaro, F. H.; Casals, N.; Prosper, F.; Ferres-Padro, E.; Giner, L., Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells. *J Cell Sci* **2012**, *125* (14), 3343-3356.
71. (a) Gronthos, S.; Brahimi, J.; Li, W.; Fisher, L. W.; Cherman, N.; Boyde, A.; DenBesten, P.; Robey, P. G.; Shi, S., Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* **2002**, *81* (8), 531-535; (b) Batouli, S.; Miura, M.; Brahimi, J.; Tsutsui, T. W.; Fisher, L. W.; Gronthos, S.; Robey, P. G.; Shi, S., Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res* **2003**, *82* (12), 976-981.
72. Liu, M. Y.; Sun, Y.; Liu, Y.; Yuan, M. T.; Zhang, Z. H.; Hu, W. P., Modulation of the Differentiation of Dental Pulp Stem Cells by Different Concentrations of beta-Glycerophosphate. *Molecules* **2012**, *17* (2), 1219-1232.
73. (a) Mori, G.; Brunetti, G.; Oranger, A.; Carbone, C.; Ballini, A.; Lo Muzio, L.; Colucci, S.; Mori, C.; Grassi, F. R.; Grano, M., Dental pulp stem cells: osteogenic differentiation and gene expression. *Ann Ny Acad Sci* **2011**, *1237*, 47-52; (b) Kadar, K.; Kiraly, M.; Porcsalmy, B.; Molnar, B.; Racz, G. Z.; Blazsek, J.; Kallo, K.; Szabo, E. L.; Gera, I.; Gerber, G.; Varga, G., Differentiation Potential of Stem Cells from Human Dental Origin - Promise for Tissue Engineering. *J Physiol Pharmacol* **2009**, *60*, 167-175.
74. Khanna-Jain, R. M., B.; Vourinen, A.; Sándor, K. B. G.; Suuronen, R.; Miettinen, S., Osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells on β -tricalcium phosphate/poly (l-lactic acid/caprolactone) three-dimensional scaffolds. *Journal of Tissue Engineering* **2012**, *3*.
75. Tziafas, D.; Kodonas, K., Differentiation Potential of Dental Papilla, Dental Pulp, and Apical Papilla Progenitor Cells. *J Endodont* **2010**, *36* (5), 781-789.

76. Williams, F. D., On the nature of biomaterials. *Biomaterials* **2009**, *30*, 5897-5909.
77. Nair, L. S.; Laurencin, C. T., Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci* **2007**, *32* (8-9), 762-798.
78. Armentano, I.; Dottori, M.; Fortunati, E.; Mattioli, S.; Kenny, J. M., Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. *Polym Degrad Stabil* **2010**, *95* (11), 2126-2146.
79. Shoichet, M. S., Polymer Scaffolds for Biomaterials Applications. *Macromolecules* **2010**, *43* (2), 581-591.
80. Okada, M.; Tsunoda, K.; Tachikawa, K.; Aoi, K., Biodegradable polymers based on renewable resources. IV. Enzymatic degradation of polyesters composed of 1,4 : 3,6-dianhydro-D-glucitol and aliphatic dicarboxylic acid moieties. *J Appl Polym Sci* **2000**, *77* (2), 338-346.
81. Thiem, J.; Luders, H., Synthesis and Properties of Polyurethanes Derived from Diaminodianhydroalditols. *Makromol Chem* **1986**, *187* (12), 2775-2785.
82. Fenouillot, F.; Rousseau, A.; Colomines, G.; Saint-Loup, R.; Pascault, J. P., Polymers from renewable 1,4:3,6-dianhydrohexitols (isosorbide, isomannide and isoidide): A review. *Prog Polym Sci* **2010**, *35* (5), 578-622.
83. Casarano, R.; Bentini, R.; Bueno, V. B.; Iacovella, T.; Monteiro, F. B. F.; Iha, F. A. S.; Campa, A.; Petri, D. F. S.; Jaffe, M.; Catalani, L. H., Enhanced fibroblast adhesion and proliferation on electrospun fibers obtained from poly(isosorbide succinate-b-L-lactide) block copolymers. *Polymer* **2009**, *50* (26), 6218-6227.
84. Spadaccio, C.; Rainer, A.; Trombetta, M.; Vadala, G.; Chello, M.; Covino, E.; Denaro, V.; Toyoda, Y.; Genovese, J. A., Poly-L-Lactic Acid/Hydroxyapatite

Electrospun Nanocomposites Induce Chondrogenic Differentiation of Human MSC. *Ann Biomed Eng* **2009**, 37 (7), 1376-1389.

85. Lalwani, G.; Henslee, A. M.; Farshid, B.; Lin, L. J.; Kasper, F. K.; Qin, Y. X.; Mikos, A. G.; Sitharaman, B., Two-Dimensional Nanostructure-Reinforced Biodegradable Polymeric Nanocomposites for Bone Tissue Engineering. *Biomacromolecules* **2013**, 14 (3), 900-909.

86. Zhou, H.; Lee, J., Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomater* **2011**, 7 (7), 2769-2781.

87. Zakaria, M. S. Z., S. H. S.; Othman, R. M.; Yang, F.; Jansen, A. J. , Nanophase hydroxyapatite as a biomaterial in advanced hard tissue engineering: A review. *Tissue Engineering Part B* **2013**.

88. Rivera-Muñoz, M. E., Hydroxyapatite-Based Materials: Synthesis and Characterization. In *Biomedical Engineering Frontiers and Challenges*, Fazel-Rezai, R., Ed. 2011.

89. Ferraz, P. M. M., J. F.; Manuel, M. C., Hydroxyapatite nanoparticles: A review of preparation methodologies. *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics* **2004**, 2, 74-80.

90. Rivera-Munoz, E. M.; Velazquez, R.; Cabrera-Torres, J. L., Morphological Analysis of Hydroxyapatite Particles Obtained by Different Methods. *Thermec 2009, Pts 1-4* **2010**, 638-642, 681-686.

91. Venugopal, J.; Low, S.; Choon, A. T.; Ramakrishna, S., Interaction of cells and nanofiber scaffolds in tissue engineering. *J Biomed Mater Res B* **2008**, 84B (1), 34-48.

92. Wilson, O. C.; Hull, J. R., Surface modification of nanophase hydroxyapatite with chitosan. *Mat Sci Eng C-Bio S* **2008**, 28 (3), 434-437.
93. Hong, Z. K.; Zhang, P. B.; He, C. L.; Qiu, X. Y.; Liu, A. X.; Chen, L.; Chen, X. S.; Jing, X. B., Nano-composite of poly(L-lactide) and surface grafted hydroxyapatite: Mechanical properties and biocompatibility. *Biomaterials* **2005**, 26 (32), 6296-6304.
94. Tredwin, J. C. Y., M. A.; Georgiou, G.; Shin, S-H.; Kim, H-W.; Knowles, C. J., Hydroxyapatite, fluor-hydroxyapatite and fluorapatite produced via the sol-gel method. Optimisation, characterisation and rheology . *Dental Materials* **2013**, 29, 166-173.
95. Rajesh, P. M., V. C.; Komath, M.; Varma, H., Laser surface modification of titanium substrate for pulsed laser deposition of highly adherent hydroxyapatite . *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2011**, 22, 1671-1679.
96. da Silva, O. G.; da Silva, E. C.; da Fonseca, M. G.; Arakaki, L. N. H.; Airoidi, C., Hydroxyapatite organofunctionalized with silylating agents to heavy cation removal. *J Colloid Interf Sci* **2006**, 302 (2), 485-491.
97. Kumar, D.; Gittings, J. P.; Turner, I. G.; Bowen, C. R.; Hidalgo-Bastida, L. A.; Cartmell, S. H., Polarization of hydroxyapatite: Influence on osteoblast cell proliferation (vol 6, pg 1549, 2010). *Acta Biomater* **2010**, 6 (11), 4456-4456.
98. Shiels, S. O., S.; Bae, C.; Singleton, B.; Dean, D. D.; Wenke, C. J.; Appleford, R. M.; Ong, L. J., Evaluation of BMP-2 tethered polyelectrolyte coatings on hydroxyapatite scaffolds in vivo. *J Biomed Mater Res B* **2012**, 100B (7), 1782-1791.
99. Strong, B. A., *Fundamentals of Composites Manufacturing: Materials, Methods and Applications*. 2a. ed.; Society of Manufacturing Engineers: USA, 2008.
100. Marinucci, G., *Materiais Compósitos Poliméricos - Fundamentos e Tecnologia*. 1a. ed.; 2011.

101. Qiu, X. Y.; Hong, Z. K.; Hu, J. L.; Chen, L.; Chen, X. S.; Jing, X. B., Hydroxyapatite surface modified by L-lactic acid and its subsequent grafting polymerization of L-lactide. *Biomacromolecules* **2005**, 6 (3), 1193-1199.
102. Jeon, I. Y.; Baek, J. B., Nanocomposites Derived from Polymers and Inorganic Nanoparticles. *Materials* **2010**, 3 (6), 3654-3674.
103. Kango, S. K., S.; Celli, A.; Njuguna, J.; Habibi, Y.; Kumar, R., Surface modification of inorganic nanoparticles for development of organic–inorganic nanocomposites—A review. *Prog Polym Sci* **2013**, 38 (8), 1232-1261.
104. Kumar, S. K.; Jouault, N.; Benicewicz, B.; Nelly, T. Nanocomposites with Polymer Grafted Nanoparticles. *Macromolecules* **2013**, 46 (9), 3199-3214.
105. Deplaine, H. R., G. L. J.; Ferrer, G. F., Effect of the content of hydroxyapatite nanoparticles on the properties and bioactivity of poly(L-lactide) – Hybrid membranes. *Compos Sci Technol* **2010**, 70, 1805-1812.
106. Holzwarth, J. M.; Ma, P. X., Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2011**, 32 (36), 9622-9629.
107. Wei, G. B.; Ma, P. X., Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2004**, 25 (19), 4749-4757.
108. Kim, S. S.; Park, M. S.; Gwak, S. J.; Choi, C. Y.; Kim, B. S., Accelerated bonelike apatite growth on porous polymer/ceramic composite scaffolds in vitro. *Tissue Engineering* **2006**, 12 (10), 2997-3006.
109. Kim, H. W.; Kim, H. E.; Salih, V., Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin-hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* **2005**, 26 (25), 5221-5230.

110. Chesnutt, B. M.; Yuan, Y. L.; Buddington, K.; Haggard, W. O.; Bumgardner, J. D., Composite Chitosan/Nano-Hydroxyapatite Scaffolds Induce Osteocalcin Production by Osteoblasts In Vitro and Support Bone Formation In Vivo. *Tissue Eng Pt A* **2009**, *15* (9), 2571-2579.
111. Rodrigues, C. V. M.; Serricella, P.; Linhares, A. B. R.; Guerdes, R. M.; Borojevic, R.; Rossi, M. A.; Duarte, M. E. L.; Farina, M., Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2003**, *24* (27), 4987-4997.
112. Krogman, N. R.; Weikel, A. L.; Kristhart, K. A.; Nukavarapu, S. P.; Deng, M.; Nair, L. S.; Laurencin, C. T.; Allcock, H. R., The influence of side group modification in polyphosphazenes on hydrolysis and cell adhesion of blends with PLGA. *Biomaterials* **2009**, *30* (17), 3035-3041.
113. Ma, P. X.; Zhang, R. Y.; Xiao, G. Z.; Franceschi, R., Engineering new bone tissue in vitro on highly porous poly(alpha-hydroxyl acids)/hydroxyapatite composite scaffolds. *J Biomed Mater Res* **2001**, *54* (2), 284-293.
114. Vasita, R.; Katti, D. S., Nanofibers and their applications in tissue engineering. *Int J Nanomed* **2006**, *1* (1), 15-30.
115. Teo, W. E.; Ramakrishna, S., A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology* **2006**, *17* (14), R89-R106.
116. Sundararaghavan, H. G.; Metter, R. B.; Burdick, J. A., Electrospun Fibrous Scaffolds with Multiscale and Photopatterned Porosity. *Macromol Biosci* **2010**, *10* (3), 265-270.
117. Ramakrishna, S. F., K.; Teo, W-E.; Lim, T-C.; Ma, Z., *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.: 2005.

118. Zhang, Z. P.; Hu, J.; Ma, P. X., Nanofiber-based delivery of bioactive agents and stem cells to bone sites. *Adv Drug Deliver Rev* **2012**, *64* (12), 1129-1141.
119. Agarwal, S.; Wendorff, J. H.; Greiner, A., Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer* **2008**, *49* (26), 5603-5621.
120. Prabhakaran, M. P.; Venugopal, J.; Ramakrishna, S., Electrospun nanostructured scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater* **2009**, *5* (8), 2884-2893.
121. Jin, G. R.; Prabhakaran, M. P.; Ramakrishna, S., Stem cell differentiation to epidermal lineages on electrospun nanofibrous substrates for skin tissue engineering. *Acta Biomater* **2011**, *7* (8), 3113-3122.
122. (a) Bao, C. Y.; Chen, W. C.; Weir, M. D.; Thein-Han, W.; Xu, H. H. K., Effects of electrospun submicron fibers in calcium phosphate cement scaffold on mechanical properties and osteogenic differentiation of umbilical cord stem cells. *Acta Biomater* **2011**, *7* (11), 4037-4044; (b) Lee, J. H.; Rim, N. G.; Jung, H. S.; Shin, H., Control of Osteogenic Differentiation and Mineralization of Human Mesenchymal Stem Cells on Composite Nanofibers Containing Poly [lactic-co-(glycolic acid)] and Hydroxyapatite. *Macromol Biosci* **2010**, *10* (2), 173-182.
123. Lim, S. H.; Mao, H. Q., Electrospun scaffolds for stem cell engineering. *Adv Drug Deliver Rev* **2009**, *61* (12), 1084-1096.
124. Traphagen, S.; Yelick, P. C., Reclaiming a natural beauty: whole-organ engineering with natural extracellular materials. *Regen Med* **2009**, *4* (5), 747-758.
125. Pramanik, S.; Pingguan-Murphy, B.; Abu Osman, N. A., Progress of key strategies in development of electrospun scaffolds: bone tissue. *Sci Technol Adv Mat* **2012**, *13* (4).

126. Hong, Z. K.; Qiu, X. Y.; Sun, J. R.; Deng, M. X.; Chen, X. S.; Jing, X. B., Grafting polymerization of L-lactide on the surface of hydroxyapatite nano-crystals. *Polymer* **2004**, 45 (19), 6699-6706.
128. Qiu, X. Y.; Han, Y. D.; Zhuang, X. L.; Chen, X. S.; Li, Y. S.; Jing, X. B., Preparation of nano-hydroxyapatite/poly(L-lactide) biocomposite microspheres. *J Nanopart Res* **2007**, 9 (5), 901-908.
129. Limapichat, W.; Basu, A., Reagentless functionalization of gold nanoparticles via a 3 + 2 Huisgen cycloaddition. *J Colloid Interf Sci* **2008**, 318 (1), 140-144.
130. Turki, T.; Aissa, A.; Bac, C. G.; Rachdi, F.; Debbabi, M., Study of mixed Ca-Zn hydroxyapatite surface modified by lactic acid. *Appl Surf Sci* **2012**, 258 (18), 6759-6764.
131. Statheropoulos, M.; Kyriakou, S.; Tzamtzis, N., Performance evaluation of a TG/MS system. *Thermochim Acta* **1998**, 322 (2), 167-173.
132. (a) Thomas, P. S.; Simon, P.; Smallwood, A.; Ray, A. S., Estimation of the diffusion coefficient of water evolved during the non-isothermal dehydration of Australian sedimentary opal. *J Therm Anal Calorim* **2007**, 88 (1), 231-235; (b) Deviese, T.; Colombini, M. P.; Regert, M.; Stuart, B. H.; Guerbois, J. P., TGMS analysis of archaeological bone from burials of the late Roman period. *J Therm Anal Calorim* **2010**, 99 (3), 811-813.
133. Karayildirim, T.; Yanik, J.; Yuksel, M.; Bockhorn, H., Characterisation of products from pyrolysis of waste sludges. *Fuel* **2006**, 85 (10-11), 1498-1508.
134. Qu, H. Q.; Wu, W. H.; Li, N.; Xu, J. Z., Thermal Analysis Method for Studying the Effects of a Series of Stannates on Flame Retardancy of Wood by Thermogravimetry Mass-Spectrometry. *New and Advanced Materials, Pts 1 and 2* **2011**, 197-198, 1447-1451.

135. Nelson, A.; Cosgrove, T., Dynamic light scattering studies of poly(ethylene oxide) adsorbed on laponite: Layer conformation and its effect on particle stability. *Langmuir* **2004**, *20* (24), 10382-10388.
136. 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 Biomater* **2011**, *7* (1), 16-30.
137. Yamadi, S.; Kobayashi, S., Effects of strain rate on the mechanical properties of tricalcium phosphate/poly(L-lactide) composites. *J Mater Sci-Mater M* **2009**, *20* (1), 67-74.
138. Kobayashi, S.; Yamadi, S., Strain rate dependency of mechanical properties of TCP/PLLA composites after immersion in simulated body environments. *Compos Sci Technol* **2010**, *70* (13), 1820-1825.
139. Barbieri, D. d. B., D. J.; Luo, X.; Silvia, F.; Grijpma, W. D.; Yuan, H., Controlling dynamic mechanical properties and degradation of composites for bone regeneration by means of filler content. *J Mech Behav Biomed* **2013**, *20*, 162–172.
140. Bleek, K.; Taubert, A., New developments in polymer-controlled, bioinspired calcium phosphate mineralization from aqueous solution. *Acta Biomater* **2013**, *9* (5), 6283-6321.
141. Vogler, E. A., Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Adv Colloid Interfac* **1998**, *74*, 69-117.
142. Xu, X. L.; Chen, X. S.; Liu, A. X.; Hong, Z. K.; Jing, X. B., Electrospun poly(L-lactide)-grafted hydroxyapatite/poly(L-lactide) nanocomposite fibers. *Eur Polym J* **2007**, *43* (8), 3187-3196.

143. Lao, L. H.; Wang, Y. J.; Zhu, Y.; Zhang, Y. Y.; Gao, C. Y., Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for bone tissue engineering. *J Mater Sci-Mater M* **2011**, 22 (8), 1873-1884.
144. Song, X. F.; Ling, F. G.; Ma, L. L.; Yang, C. G.; Chen, X. S., Electrospun hydroxyapatite grafted poly(L-lactide)/poly(lactic-co-glycolic acid) nanofibers for guided bone regeneration membrane. *Compos Sci Technol* **2013**, 79, 8-14.
145. Nie, H. M.; Wang, C. H., Fabrication and characterization of PLGA/HAp scaffolds for delivery of BMP-2 plasmid composite DNA. *J Control Release* **2007**, 120 (1-2), 111-121.
146. Garcia, M. G.; Marchese, J.; Ochoa, N. A., Effect of the Particle Size and Particle Agglomeration on Composite Membrane Performance. *J Appl Polym Sci* **2010**, 118 (4), 2417-2424.
147. Yoshimoto, H.; Shin, Y. M.; Terai, H.; Vacanti, J. P., A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2003**, 24 (12), 2077-2082.
148. Wang, X. J.; Song, G. J.; Lou, T., Fabrication and characterization of nano composite scaffold of poly(l-lactic acid)/hydroxyapatite. *J Mater Sci-Mater M* **2010**, 21 (1), 183-188.
149. Zhang, Q.; Jiang, Y.; Zhang, Y.; Ye, Z.; Tan, W.; Lang, M., Effect of porosity on long-term degradation of poly (ϵ -caprolactone) scaffolds and their cellular response. *Polym Degrad Stabil* **2013**, 98, 209-218.
150. Lutolf, M. P.; Hubbell, J. A., Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol* **2005**, 23 (1), 47-55.

151. Sui, G.; Yang, X. P.; Mei, F.; Hu, X. Y.; Chen, G. Q.; Deng, X. L.; Ryu, S., Poly-L-lactic acid/hydroxyapatite hybrid membrane for bone tissue regeneration. *J Biomed Mater Res A* **2007**, *82A* (2), 445-454.
152. McCullen, S. D.; Zhu, Y.; Bernacki, S. H.; Narayan, R. J.; Pourdeyhimi, B.; Gorga, R. E.; Lobo, E. G., Electrospun composite poly(L-lactic acid)/tricalcium phosphate scaffolds induce proliferation and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biomed Mater* **2009**, *4* (3).
153. Takahashi, Y.; Yamamoto, M.; Tabata, Y., Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials* **2005**, *26* (17), 3587-3596.
154. Chai, Y. C.; Carlier, A.; Bolander, J.; Roberts, S. J.; Geris, L.; Schrooten, J.; Van Oosterwyck, H.; Luyten, F. P., Current views on calcium phosphate osteogenicity and the translation into effective bone regeneration strategies. *Acta Biomater* **2012**, *8* (11), 3876-3887.
155. Ngiam, M.; Liao, S.; Patil, A. J.; Cheng, Z. Y.; Yang, F. Y.; Gubler, M. J.; Ramakrishna, S.; Chan, C. K., Fabrication of Mineralized Polymeric Nanofibrous Composites for Bone Graft Materials. *Tissue Eng Pt A* **2009**, *15* (3), 535-546.
156. Dulgar-Tulloch, A. J.; Bizios, R.; Siegel, R. W., Human mesenchymal stem cell adhesion and proliferation in response to ceramic chemistry and nanoscale topography. *J Biomed Mater Res A* **2009**, *90A* (2), 586-594.
157. Ni, P. Y.; Fu, S. Z.; Fan, M.; Guo, G.; Shi, S. A.; Peng, J. R.; Luo, F.; Qian, Z. Y., Preparation of poly(ethylene glycol)/polylactide hybrid fibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Int J Nanomed* **2011**, *6*, 3065-3075.

158. Chuenjitkuntaworn, B.; Supaphol, P.; Pavasant, P.; Damrongsri, D., Electrospun poly(L-lactic acid)/hydroxyapatite composite fibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Polym Int* **2010**, *59* (2), 227-235.
159. Seyedjafari, E.; Soleimani, M.; Ghaemi, N.; Shabani, I., Nanohydroxyapatite-Coated Electrospun Poly(L-lactide) Nanofibers Enhance Osteogenic Differentiation of Stem Cells and Induce Ectopic Bone Formation. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (11), 3118-3125.
160. Miller, N. D.; Williams, D. F., The Invivo and Invitro Degradation of Poly(Glycolic Acid) Suture Material as a Function of Applied Strain. *Biomaterials* **1984**, *5* (6), 365-368.
161. Zhang, C., Transcriptional regulation of bone formation by the osteoblast-specific transcription factor Osx. *J Orthop Surg Res* **2010**, *5*.
162. Hosseinkhani, H.; Hosseinkhani, M.; Tian, F.; Kobayashi, H.; Tabata, Y., Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in self-assembled peptide-amphiphile nanofibers. *Biomaterials* **2006**, *27* (22), 4079-4086.
163. de Oliveira, P. T.; Nanci, A., Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials* **2004**, *25* (3), 403-413.
164. Porter, J. R.; Henson, A.; Popat, K. C., Biodegradable poly(epsilon-caprolactone) nanowires for bone tissue engineering applications. *Biomaterials* **2009**, *30* (5), 780-788.
165. Thibault, R. A.; Mikos, A. G.; Kasper, F. K., Scaffold/Extracellular Matrix Hybrid Constructs for Bone-Tissue Engineering. *Adv Healthc Mater* **2013**, *2* (1), 13-24.

166. Sawyer, A. A.; Song, S. J.; Susanto, E.; Chuan, P.; Lam, C. X. F.; Woodruff, M. A.; Hutmacher, D. W.; Cool, S. M., The stimulation of healing within a rat calvarial defect by mPCL-TCP/collagen scaffolds loaded with rhBMP-2. *Biomaterials* **2009**, *30* (13), 2479-2488.

ANEXOS

Anexo 1: Curvas da TG e DTG da decomposição da HAP.

Anexo 2: Curvas da TG e DTG da decomposição do CL e os resultados de MS (MS resposta de $m/z = 36$)

Anexo 3: Curva de tensão na ruptura *versus* deformação obtida nas análises mecânicas realizadas nos filmes de PLLA e PLLA-co-PIS com HAP-CL.

Anexo 4 - Súmula Curricular do Autor

Ricardo Bentini

Nascimento 28/02/1981 – Campo Limpo Paulista/SP- Brasil

Formação Acadêmica/ Titulação

2008 – Presente

Doutorado em Ciências

Universidade de São Paulo, USP, São Paulo - SP, Brasil

Título: Produção de Suportes Poliméricos para o Crescimento de Células-Tronco Mesenquimais para a Aplicação em Regeneração Óssea.

Orientador: Luiz Henrique Catalani

Bolsista do: CNPq

2003 – 2007

Bacharel em Química com atribuições tecnológicas

Universidade Federal de Alfenas, Alfenas – MG, Brasil

Pesquisa de Iniciação Científica em Bioquímica

Projeto: Avaliação da atividade antioxidante da bebida de de café *in vitro* e *in vivo*.

Orientador: Stella Maris da Silveira Duarte

Projeto financiado pela FAPEMIG

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo – SP

Vínculo institucional

2008 – Atual Aluno de Doutorado, Carga horaria: 40, Regime: Dedicação Exclusiva, bolsista CNPq.

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. Casarano, R ; **BENTINI, R.** ; Bueno, B. V. ; Iacovella, T.; Iha, A. S. F. ; Ana Campa, A. ; Petri, D. F. S. ; Jaffe, M. ; Catalani, L. H. . Enhanced fibroblast adhesion and proliferation on electrospun fibers obtained from poly(isosorbide succinate-b-L-lactide) block copolymers, *Polymer*, V. 50, p. 6218-6227, 2009.
2. Bueno, B. V. ;**BENTINI, R.**; Catalani, L.H. ; Petri, D.F.S. Synthesis and Swelling Behaviour of Xanthan-based Hydrogels, *Carbohydrate Polymers*, V. 92, p. 1091-1099, 2013.

Resumos publicados em Congresso

1. **BENTINI, R.** ; Magnani, M.; Passos-Bueno, M. R. ; Catalani, L.H. Hydroxyapatite nanoparticles modified by lauroyl chloride: a very

efficiente method for mineral dispersion in PLLA scaffolds. In: TERMIS, 2012, Viena. Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Londres: Wiley-Blackwell, 2012. v. 6. p. 213-213.

Trabalhos publicados em anais de eventos

1. **BENTINI, R.** ; Magnani, M. ; Passos-Bueno, M. R. ; Catalani, L.H. Hydroxyapatite nanoparticles modified by lauroyl chloride: a very efficient method for mineral dispersion in PLLA scaffolds, TERMIS, Viena, Austria, 2012.
2. **BENTINI, R.** ; Catalani, L. H. Poly(isosorbide succinate-co-lactide) nanofibers with high content of hydroxyapatite, 2nd Conference in Hybrid Materials, Estrasburgo, França, 2011.
3. **BENTINI, R.** ; Zamarion, V. M. ; Hiulia, M. F. G. ; Toma, H. E. ; Catalani, L. H. Caracterização por Microscopia Raman Confocal da Enxertia de Nanopartículas de Hidroxiapatita em Fibras de PLLA Eletrofiadas, 32^a. Reunião Anual da SBQ, Fortaleza, Brazil, 2009.
4. **BENTINI, R.** ; Duarte, S. M. Da S.; Paula, F. B de A.; Rodrigues, M. R. Evaluation of the antioxidant effect of caffeinated and decaffeinated soluble coffee brew *in vitro* and *in vivo*, 6th International Conference of Pharmaceutical Sciences, Ribeirão Preto, Brazil, 2007.