INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**ESTUDO DE HIDROXIAPATITAS REVESTIDAS COM
POLI (ϵ -CAPROLACTONA) ESTRELA:
PROCESSAMENTO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA**

ELENI CRISTINA KAIRALLA

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do Grau de Doutor em Ciências na área
de Tecnologia Nuclear – Materiais

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Bressiani

Coorientador: Prof. Dr. Álvaro A. A. Queiroz

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2013

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Nilton e Gleide,

pelo amor incondicional,

educação, formação, valores

incentivo e apoio constantes

e pela união familiar,

alicerce da minha vida.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Às minhas irmãs, Marcia e Ana Lucia, cunhados, Junior e Marco Aurélio

*e aos meus queridos sobrinhos, Rodrigo, Vinicius e Fernando,
família maravilhosa, sempre presente*

obrigada pela alegria que me proporcionam.

*E aos amigos que acompanharam toda esta trajetória sempre dispostos a ouvir e
incentivar, obrigada pelo carinho e paciência,*

*Ronaldo Ribeiro, Marcos Nunes, Raimundo Vieira, Tânia D'ela Torre, Liciane e Álvaro Chaud,
Marcello e Isa Ferrari, Patrícia Marcondes, Paulo Bach, Andrea Zanni, Ruth Khairallah, Leni Nunes,
Lucy Nunes, Deyse Chibili e Izilda Bezerra.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores

*Prof. Dr. José Carlos Bressiani,
e Prof. Dr. Álvaro Antônio Alencar de Queiroz*

*pela orientação, ensinamentos, apoio e confiança para
o desenvolvimento e realização deste trabalho.*

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos um imenso oceano.”

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não poderia ser concluído sem a ajuda de diversas pessoas as quais presto meus sinceros agradecimentos:

- A Profa. Dra. Ana Helena Bressiani, por disponibilizar as instalações dos laboratórios do CCTM/IPEN e pela inestimável colaboração no desenvolvimento deste estudo.
- Ao Prof. Dr. Marcelo Yoshimoto, pelas discussões científicas e colaboração no delineamento, execução experimental e na interpretação dos resultados.
- A Profa. Dra. Olga Zazuco Higa por disponibilizar as instalações e uso dos laboratórios do Centro de Biotecnologia do IPEN e inestimável colaboração.
- A Profa. Dra. Maria Tereza de Carvalho Pinto Ribela, pela execução da marcação radioativa das proteínas com o I^{125} para o estudo de adsorção proteica.
- A Profa. Dra. Christiane Ribeiro pela discussão científica no desenvolvimento deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. José Luiz Lage Marques pela orientação e apoio nas horas de desalento e dúvidas, estímulo e incentivo constantes e pela amizade de sempre.
- A Profa. Dra. Marília Trierweiler Martins, da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pela orientação no estudo histológico.
- A Maíra F. de Andrade, médica veterinária responsável pelo biotério do IPEN, pelo apoio, e colaboração no experimento *in vivo*.
- Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares–IPEN, representado por seu Superintendente Prof. Dr. José Carlos Bressiani e por seu Diretor de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino, Dr. Marcelo Linardi, pelo apoio a pesquisa e viabilização deste projeto.
- A Universidade Federal de Itajubá – UNIFEI, pela oportunidade de desenvolvimento conjunto deste trabalho.
- Aos pesquisadores e técnicos do Instituto de Pesquisas Tecnológicas – IPT, pela colaboração e troca de informações, Dra. Rosana Richers, Dra. Maria Cecília, Dr. Miguel Papai Jr., Rosana Akiko Hoshino, Adilson Nascimento, Regis Norberto, Antonio F. Montemor.

- A Dra. Nanci do Nascimento, gerente do Centro de Biotecnologia e do Biotério do IPEN, e toda sua equipe administrativa e técnica.
- A Sra. Sueli Casquel, secretária no IPEN, pela enorme paciência e disponibilidade, sempre com um sorriso e disposição a ajudar.
- A Sra. Edna B.S. Gubitoso pela revisão das referências bibliográficas, pelo carinho e paciência.
- A todos os colegas de pós-graduação do IPEN, pela colaboração e troca de experiências, em especial ao Marcio W. D. Mendes, Kalan, Tatiana F. Cunha, João Ezequiel de Oliveira.
- A equipe da Pós-Graduação do IPEN pela dedicação nos serviços prestados.
- Ao Centro de Tecnologia das Radiações e Serviços do IPEN, pela esterilização dos materiais e amostras.
- Aos funcionários da Biblioteca “Terezinha Arantes Ferraz” do IPEN, pela contribuição e apoio técnico.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

muito obrigada.

**ESTUDO DE HIDROXIAPATITAS REVESTIDAS COM
POLI (ϵ -CAPROLACTONA) ESTRELA:
PROCESSAMENTO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA**

Eleni Cristina Kairalla

RESUMO

Para a produção de compósitos multifuncionais crescente atenção tem sido dada a uma homogeneização eficaz de hidroxiapatitas em matrizes poliméricas, buscando uma sintonia fina da concentração entre polímeros biodegradáveis e biocerâmicas. Este trabalho dedicou-se a síntese, caracterização e estudo das propriedades biológicas do híbrido hidroxiapatita / poli(ϵ -aprolactona) estrela. A hidroxiapatita nanométrica (HAPN) foi revestida com o polímero biodegradável poli(ϵ -caprolactona) de topologia em estrela de três braços (PCLE). O uso de um polímero com topologia ramificada visa alterar algumas de suas propriedades mecânicas, a adesão interfacial à cerâmica, a sua viscosidade, o volume hidrodinâmico e sua cinética de degradação. O desempenho do híbrido HAPN/PCLE foi comparado com os materiais: HAP com partículas micrométricas (HAP-91 material comercial), o seu compósito revestido com PCLE (HAP-91/PCLE) e uma cerâmica nanométrica bifásica hidroxiapatita/ β -TCP (HAP-8). Os materiais foram caracterizados por avaliações físico-químicas e biológicas realizadas por estudos de citotoxicidade, adsorção de proteínas, proliferação celular, atividade de fosfatase alcalina. A síntese de PCLE foi verificada por análise espectroscópica (espectroscopia no infravermelho-FTIR; ressonância magnética nuclear de prótons- ^1H -RMN e carbono- ^{13}C -RMN; a matriz assistida por desorção a laser / ionização; MALDI-TOF; e cromatografia de permeação em gel (GPC). O revestimento das biocerâmicas por PCLE foi confirmado por técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de varredura (MEV). Os compósitos mostraram uma melhor trababilidade em relação à cerâmica pura e são menos quebradiços, possivelmente devido à presença do PCLE na interface da biocerâmica. A análise de MEV e MET mostrou um aspecto de continuidade no contorno das partículas de cerâmica, em micro e nano-escala. Os compósitos apresentam comportamento não citotóxico e propiciaram um crescimento de células de mamíferos. A proliferação de células osteoblásticas (MG -63) foi significativamente mais elevada para o compósito HAPN/PCLE em comparação com outros biomateriais, sugerindo influência da área de superfície na adesão e proliferação de células. O estudo do ângulo de contato indicou que o revestimento com PCLE faz com que a superfície da biocerâmica seja mais hidrofóbica. O estudo com radioisótopos indicou que o revestimento da biocerâmica com PCLE altera significativamente a adsorção das proteínas do sangue fibrinogênio e albumina. O processo de regeneração do tecido ósseo foi estudado em condições *in vivo* com a implantação de pastilhas dos materiais estudados em tíbias de coelho. Os resultados mostraram que os compósitos podem ser utilizados como biomaterial, pois houve neoformação óssea ao redor dos implantes.

Palavras chave: biomateriais, hidroxiapatita, poli(ϵ -caprolactona);compósitos

**STUDY COVERED HYDROXYAPATITES
POLY (E-CAPROLACTONE) STAR:
PROCESSING AND BIOLOGICAL EVALUATION**

Eleni Cristina Kairalla

ABSTRACT

For the production of multifunctional composites in the combination of biodegradable polymers and bioceramics, increasing attention has been paid to an effective homogenization of hydroxyapatite within polymer matrices and a fine tuning of the concentration. This work was dedicated to the synthesis, characterization and study of the biological properties of the hybrid star poly(ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite composites. A nanometer hydroxyapatite (HAPN) was coated with the biodegradable polymer poly (ϵ -caprolactone) with three arms star topology (PCLE). The use of polymer branched topology aims to change some of its mechanical properties, the interfacial adhesion to ceramic, its viscosity, the hydrodynamic volume and its degradation kinetics. The performance of the hybrid HAPN/PCLE was compared with the other three materials: HAP commercial micrometric particles (HAP-91), their composite coated with PCLE (HAP-91/PCLE) and a biphasic ceramic nanohydroxyapatite/ β -TCP (HAP-8). All materials were characterized by different physico-chemical and biological evaluations performed by cytotoxicity studies, protein adsorption, cell proliferation, alkaline phosphatase activity and an *in vivo* studies. The synthesis of PCLE was verified by spectroscopic analysis (Fourier-Transform infrared-FTIR and nuclear magnetic resonance- ^1H -NMR/ ^{13}C -NMR), matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI-TOF) and gel permeation chromatography (GPC). The coating of the bioceramics by PCLE was confirmed by microscopy techniques transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM). The composites showed better easy handling in relation to pure ceramic and are less brittle, possibly due to the presence of PCLE at bioceramic interface. The SEM and TEM analysis showed an aspect of continuity in the contour of the ceramic particles, both in micro and nanoscale. The composites exhibit non cytotoxicity behavior and propitiated mammalian cell growth. The proliferation of osteoblastic cells (MG-63) was significantly higher for the composite HAPN/PCLE compared to other biomaterials, suggesting influences of the surface area on the cell adhesion and proliferation. The study of contact angle indicated that the PCLE coating makes the bioceramic surfaces more hydrophobic. The radioisotopic studies indicates that the coating of bioceramics with PCLE significantly alter the adsorption of blood proteins fibrinogen and albumin. The process of regeneration of bone tissue was studied in *in vivo* conditions after implantation of implants manufactured from composites in rabbit's tibias. The results showed that composites can be used as biomaterial since the newly bone grew around the implants.

Keywords: biomaterials, hydroxyapatite, poly (ϵ -caprolactone), composite

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVO.....	3
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3.1 Tecido Ósseo.....	4
3.2 Materiais para Enxerto Ósseo.....	9
3.3 Osteofisiologia.....	10
3.4 Comportamento Biológico dos Materiais Sintéticos.....	12
3.5 Arcabouços Sintéticos e a Engenharia do Tecido Ósseo.....	15
3.6 O PCL na Obtenção de Arcabouços para a Engenharia de Tecido.....	24
3.7 Arquitetura Molecular do PCL.....	27
3.8 PCL com Topologia Estrela (PCLE).....	33
4 TRABALHO EXPERIMENTAL.....	38
4.1 Processamento: Síntese e Caracterização dos Materiais.....	39
4.1.1 Síntese das Cerâmicas nanométricas.....	39
4.1.2 Síntese do PCLE.....	40
4.1.3 Síntese dos Compósitos.....	43
4.2 Técnicas de Caracterização Físico-Química dos Biomateriais.....	45
4.2.1 Difração de raios X (DRX).....	45
4.2.2 Distribuição de tamanho médio de partículas.....	45
4.2.3 Cromatografia de permeação em gel (GPC).....	47
4.2.4 Espectrometria de massa MALDI-TOF.....	48
4.2.5 Ressonância magnética nuclear de prótons (¹ H-RMN) e de carbono (¹³ C-RMN).....	49
4.2.6 Calorimetria Exploratória Diferenciada (DSC).....	49
4.2.7 Espectroscopia no Infravermelho com Transformadas de Fourier (FTIR).....	51
4.2.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	52
4.2.9 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	53
4.2.10 Espectroscopia de Energia Dispersiva de raios X (EDX).....	54
4.2.11 Potencial Zeta.....	55
4.3 Avaliação Biológica <i>in vitro</i>	56
4.3.1 Estudo da Citotoxicidade.....	56
4.3.2 Estudo da Adsorção Proteica por Técnica Radioisotópica.....	58
4.3.3 Estudo da Aderência/Proliferação Celular.....	60
4.3.4 Estudo da Atividade de Fosfatase Alcalina.....	61
4.4 Avaliação Biológica <i>in vivo</i>	62
5 RESULTADOS.....	66
5.1 Caracterização dos materiais.....	66
5.1.1 Difração de raios X (DRX).....	66
5.1.2 Distribuição de tamanho médio de partículas.....	68
5.2 Caracterização Físico-Química do PCLE.....	72
5.2.1 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....	72
5.2.2 Espectroscopia por MALDI-TOF.....	73
5.2.3 Ressonância magnética nuclear de prótons (¹ H-RMN) e carbono (¹³ CRMN).....	73
5.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	75

5.2.5	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	76
5.2.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	77
5.2.7	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	79
5.2.8	Potencial Zeta.....	82
5.2.9	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das pastilhas.....	83
5.3	Avaliação Biológica <i>in vitro</i>	85
5.3.1	Estudo da Citotoxicidade.....	85
5.3.2	Estudo da Adsorção Proteica por Técnica Radioisotópica.....	85
5.3.3	Estudo da Aderência/proliferação celular	89
5.3.4	Estudo da Atividade de Fosfatase Alcalina.....	91
5.4	Avaliação biológica <i>in vivo</i> / Análise Histológica.....	92
6	DISCUSSÃO	95
7	CONCLUSÕES	108
	ANEXOS	109
	I - Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa	
	II - Protocolo do processamento das peças anatômicas – tíbias de coelho – para confecção das lâminas histológicas	
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

LISTAS de FIGURAS e TABELAS

Lista de Figuras

	Pag.
FIG. 1- Osteoblasto.....	5
FIG. 2- Osteócito.....	5
FIG. 3- Osteoclasto.....	6
FIG. 4- Lâmina histológica corada pelo método de (HE).....	6
FIG. 5- Estrutura do tecido ósseo.....	8
FIG. 6- Estrutura unitária cristalina da Hidroxiapatita.....	17
FIG. 7- Diagrama de estabilidade do sistema Ca-P-H ₂ O	19
FIG. 8- Obtenção do poli(ϵ -caprolactona) após polimerização por abertura do anel.....	24
FIG. 9- Síntese do macrômero de PCL e de PCL ramificado a partir de uma molécula de PCL diol.....	28
FIG. 10- Polimerização por abertura do anel de lactonas por iniciadores aniônicos.....	29
FIG. 11- Polimerização aniônica de lactonas.....	29
FIG. 12- Mecanismo de abertura do anel da ϵ -caprolactona.....	30
FIG. 13- Polimerização da lactona por inserção por coordenação.....	31
FIG. 14- Reações de transesterificação intermolecular durante polimerização por abertura de anel.....	31
FIG. 15- Reações de transesterificação intramolecular (back-biting) durante polimerização por abertura de anel.....	31
FIG. 16- Mecanismo de ativação do monômero de lactonas por polimerização por abertura do anel lactônico	32
FIG. 17- Comportamento do novelo polimérico.....	35
FIG. 18- Imagem por Microscopia óptica polarizada do PCL cristalizado.....	37
FIG. 19- Fluxograma do processo de obtenção da hidroxiapatita nanométrica.....	40
FIG. 20- Tubo de Schlenk de polimerização para a síntese do PCLE.....	41
FIG. 21- Esquema que ilustra a rota de síntese do PCLE.....	43
FIG. 22- Rota da síntese dos compósitos.....	44
FIG. 23- Gaiola de armazenamento dos animais no biotério do IPEN.....	62
FIG. 24- Tíbia do coelho durante o procedimento cirúrgico.....	64
FIG. 25- Blocos de parafina contendo cortes transversais da região das lojas ósseas.....	65
FIG. 26- Difratoograma de raios X da Hidroxiapatita micrométrica HAP-91.....	66
FIG. 27- Difratoograma de raios X do compósito HAP-91/PCLE.....	67
FIG. 28- Difratoograma de raios X da cerâmica nanométrica bifásica - HAP-8.....	67
FIG. 29- Difratoograma de raios X do compósito HAPN/PCLE.....	68
FIG. 30- Gráfico da curva média de distribuição em volume - HAP-91.....	69
FIG. 31- Micrografia obtida por MEV das partículas micrométricas da HAP-91.....	69
FIG. 32- Gráfico da distribuição granulométrica HAPN.....	70
FIG. 33- Micrografias da cerâmica nanométrica obtidas por MET das partículas da HAP-8.....	70
FIG. 34- Micrografia por MEV da hidroxiapatita nanométrica onde são observadas partículas da hidroxiapatita aglomerada.....	71
FIG. 35- Micrografia por MEV da Hidroxiapatita nanométrica apresentando partículas da HAP-8 sinterizadas.....	71
FIG. 36- Análise da Cromatografia de Permeação em gel.....	72
FIG. 37- Espectro MALDI-TOF para o PCLE.....	73
FIG. 38- Espectro da Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (¹ H-RMN).....	74
FIG. 39- Espectro da Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (¹³ C-RMN).....	74
FIG. 40- A temperatura de fusão (T _m).....	75

FIG. 41-	A temperatura de transição vítrea (Tg).....	75
FIG. 42-	O espectro vibracional da amostra de PCLE.....	76
FIG. 43-	Micrografias obtida por MEV da Hidroxiapatita micrométrica (HAP-91).....	77
FIG. 44-	Micrografias obtida por MEV da Hidroxiapatita micrométrica (HAP-91).....	77
FIG. 45-	Micrografia obtida por MEV do compósito HAP-91/PCLE.....	78
FIG. 46-	Micrografias obtida por MEV do compósito HAP-91/PCLE.....	78
FIG. 47-	Micrografia por MEV e Eletromicrografia do compósito HAPN/PCLE mostrando a distribuição homogênea dos elementos Ca, P, C e O.....	79
FIG. 48-	Micrografia por Microscopia Eletrônica de Transmissão do compósito HAPN/PCLE; partículas de HAP revestidas com PCLE.....	80
FIG. 49-	Micrografia por Microscopia Eletrônica de Transmissão do compósito HAPN/PCLE; partículas de HAP revestidas com PCLE.....	80
FIG. 50-	Micrografias por MET da HAPN/PCLE onde se observa o PCLE envolvendo as partículas de hidroxiapatita nanométrica esféricas.....	81
FIG. 51-	Micrografia por MET da HAPN/PCLE evidencia a interface orgânica/inorgânica (setas) do compósito.....	81
FIG. 52-	Potencial zeta das partículas.....	82
FIG. 53-	Micrografia por MEV da pastilha de HAP-8.....	83
FIG. 54-	Micrografia por MEV da pastilha de HAPN/PCLE.....	83
FIG. 55-	Micrografia por MEV da pastilha de HAP- 91.....	84
FIG. 56-	Micrografia por MEV da pastilha de HAP- 91/PCLE.....	84
FIG. 57-	Avaliação da citotoxicidade dos materiais <i>in vitro</i>	85
FIG. 58-	Curvas isotérmicas de adsorção para superfícies de HFB para HAP-8 (A) e HAPN/PCLE (B).....	86
FIG. 59-	Curvas isotérmicas de adsorção para HFB sobre as superfícies HAP-91 (A) e HAP-91/PCLE(B).....	86
FIG. 60-	Curvas isotérmicas de adsorção para HSA das superfícies em HAP-8 (A) e HAPN/PCLE(B).....	87
FIG. 61-	Curvas isotérmicas de adsorção para HSA sobre as superfícies HAP-91 (A) e HAP-91/PCLE(B).....	87
FIG. 62-	Níveis de proliferação celular do MG-63.....	89
FIG. 63-	Superfície do ângulo de contato	90
FIG. 64-	Coloração por imunofluorescência de células MG-63, em três dias.....	91
FIG. 65-	Imagem da lâmina histológica do grupo HAP-8.....	92
FIG. 66-	Imagem de uma lâmina histológica do grupo HAPN/PCLE.....	93
FIG. 67-	Imagem da lâmina histológica do grupo HAP-91.....	93
FIG. 68-	Imagem da lâmina histológica do grupo HAP-91/PCLE.....	94

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Principais proteínas do plasma humano.....	pag. 14
Tabela 2 -	Classificação dos fosfatos de cálcio em função da razão molar Ca/P e do produto de solubilidade.....	18
Tabela 3 -	Alguns polímeros biodegradáveis: propriedades e características.....	22
Tabela 4 -	Grupos Experimentais dos Materiais.....	38
Tabela 5 -	Precursos utilizados para a síntese da Hidroxiapatita nanométrica.....	39
Tabela 6 -	Comportamento de estabilidade do coloide em função do potencial zeta.....	56
Tabela 7 -	Grupos experimentais. Distribuição dos animais conforme material de implante ósseo.....	63
Tabela 8 -	Capacidade de adsorção da monocamada, a Γ_{max} e a associação constante k obtidas pelo ajuste das isotermas na equação 2 para a equação de Langmuir.....	88
Tabela 9 -	Capacidade de adsorção da monocamada, a Γ_{max} e a associação constante k obtidas pelo ajuste das isotermas na equação 2 para a equação de Langmuir.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
ALP	atividade de fosfatase alcalina
¹³ C-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
¹ H-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Prótons
2LPCL	PCL linear com 2 braços
4sPCL	PCL estrela com 4 braços
6sPCL	PCL estrela com 6 braços
BSA	Soro albumina bovino
CaP	fosfato de cálcio
CCTM	Centro de Ciência e Tecnologia dos Materiais
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
cpm	contagens por minuto
d	espaçamento
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
d-HAP	hidroxiapatita sintetizada deficiente em cálcio
DCM	diclorometano
DMEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMF	dimetilformamida
dpm	desintegrações por minuto
DRX	difração de Raios-x
DSC	calorimetria exploratória diferenciada
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EDX	espectroscopia de energia dispersiva de raios X
f	número de ramificações de um polímero estrela
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FTIR	espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
g'	grau de ramificação
HAP	hidroxiapatita
HAP-8	cerâmica bifásica β-TCP + hidroxiapatita nanométrica
HAP-8/PCLE	compósito Hidroxiapatita nanométrica + PCLE
HAP-91 -	hidroxiapatita micrométrica (<i>JHS</i> ®)
HAP-91/PCLE	compósito Hidroxiapatita micrométrica (<i>JHS</i> ®) + PCLE
HE	Hematoxilina / Eosina
HPLC	cromatografia líquida de alta <i>performance</i>
i.m.	intramuscular
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
k	constante de cristalização
LPCL	PCL linear com 1 braço
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser- <i>Desorption</i> / <i>Ionization</i> - <i>time-of-fly</i>
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura

Mn	peso molecular
Mw	massa molar
PBS	Solução tampão fosfato
m/z (kDa)	Massa/carga (em quiloDaltons)
MTS	(3-(4-5,-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)2-(4-sulfofenil-2Htetrazólico)
MTT	3-(4,5- dimtiliazol-2-il)-2,5 difeniltetrasódio brometo
PCL	poli (ε-caprolactona)
PCLE	poli (ε-caprolactona) de topologia estrela
PDO	Polidiaxanona
PGA	Poliácido glicólico
PLA	Poliácido láctico
PZ	Potencial Zeta
Rf	radiofrequência
RMN	ressonância magnética nuclear
ROH	composto contendo hidrogênio ativo
ROP	polimerização por abertura do anel
SFB	soro fetal bovino
Sn(Oct) ₂	octanoato de estanho
Tc	temperatura de cristalização
TCP	fosfato tricálcico
Tg	temperatura de transição vítrea
Tm	temperatura de fusão
THF	solvente tetrahidrofurano
UNIFEI	Universidade Federal de Itajubá
UV	ultravioleta
Xc	grau de cristalinidade
β-TCP	beta tricálcio fosfato
ε-CL	ε-caprolactona
ζ-potencial	potencial zeta
θ	ângulo de difração
λ	comprimento de onda do raio X
η	viscosidade intrínseca

1 INTRODUÇÃO

A Bioengenharia é responsável pelo desenvolvimento de próteses e materiais aplicados que satisfaçam os aspectos físico-químicos e mecânicos de elementos e tecidos destinados a cirurgias reparadoras cuja finalidade última é o bem estar humano.

Com a evolução no desenvolvimento de cerâmicas, metais, polímeros e seus compósitos, novos materiais destinados a aplicações em seres vivos tem apresentado um amplo espectro de aplicação. Estes biomateriais devem apresentar boa aceitação por parte do organismo humano sem propiciar reações adversas, caracterizada pela ausência de citotoxicidade e da ativação do sistema imunológico, bem como o não desenvolvimento de tumores e reações inflamatórias que causem a rejeição do material implantado.

Um dos tecidos humanos aptos a receber esse biomaterial é o tecido ósseo, e é de fundamental importância que sua regeneração ocorra de forma completa, fornecendo assim um arcabouço adequado para que o órgão ou prótese nele inserido volte a ter sua funcionalidade.

A hidroxiapatita sintetizada (HAP) é uma biocerâmica largamente empregada como material de enxertia na remodelação do tecido ósseo por apresentar grande similaridade composicional e biológica com este tecido, sendo relevante seu caráter osteocondutor. No entanto, sua apresentação comercial mais comum apresenta partículas em escala micrométrica e o processo de bioerosão desta HAP difere da reabsorção da porção mineral do tecido ósseo, uma vez que os cristais ósseos tem dimensões na ordem de nanômetros, propiciando uma grande área de superfície e uma maior bioatividade em relação a esta HAP.

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de compósitos com fases inorgânicas nanoscópicas revestidas com uma matriz polimérica biodegradável abriu uma série de novas oportunidades para a síntese de materiais com propriedades biológicas controláveis, que podem favorecer a regeneração do tecido ósseo. Estes compósitos tem chamado a atenção de inúmeros pesquisadores devido à sua excelente propriedade de biocompatibilidade e a capacidade de mimetizar tecidos.

Dentre os polímeros biodegradáveis, o poli(ϵ -caprolactona) (PCL) vem sendo aplicado na engenharia de tecido ósseo como matriz para o crescimento celular, funcionando como arcabouço em enxertos aloplásticos.

Na literatura referente à medicina ortopédica observa-se uma extensa aplicação do PCL de estrutura linear, mas são seus derivados de estrutura ramificada, a exemplo da topologia estrela (PCLE), que tem despertado grande interesse, pois as macromoléculas arborescentes do PCL ramificado apresentam capacidade mimetizante de proteínas globulares e um caráter inerte quanto à sua imunogenicidade, além de uma elevada funcionalidade superficial e uma microestrutura que propicia a síntese de sistemas poliméricos que mimetizam tecidos biológicos.

O desenvolvimento, caracterização físico-química e a avaliação das propriedades biológicas de uma hidroxiapatita nanométrica (HAPN) revestida com o polímero biodegradável poli(ϵ -caprolactona) de topologia estrela (PCLE) foi a motivação deste trabalho, na expectativa de colaborar com o desenvolvimento tecnológico de um biomaterial aplicado a área clínica médico-odontológica.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Verificar as propriedades físico-químicas e biológicas da biocerâmica Hidroxiapatita (HAP) revestida com o polímero poli(ϵ -caprolactona) de topologia estrela (PCLE).

2.2 Objetivos Específicos

- a) Sintetizar e caracterizar a hidroxiapatita nanométrica (HAPN), o poli(ϵ -caprolactona) de topologia estrelada (PCLE) e seu compósito inorgânico/orgânico HAPN/PCLE.
- b) Observar a morfologia de Hidroxiapatitas revestidas com PCLE por ensaios de Microscopia Eletrônica de Varredura e Transmissão.
- c) Estudar a micro e nanoestrutura dos compósitos HAP/PCLE.
- d) Avaliar a influência do revestimento do PCLE sobre as Hidroxiapatitas quanto à hidrofobicidade e distribuição de carga superficial.
- e) Estudar a influência do revestimento das HAP com PCLE na adsorção das proteínas fibrinogênio e albumina.
- f) Avaliar a biocompatibilidade das Hidroxiapatitas e de seus compósitos.
- g) Avaliar *in vivo* o processo de neoformação óssea após enxerto dos materiais híbridos em tíbia de coelho.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A evolução tecnológica na concepção e síntese de biomateriais e dispositivos inovadores para a aplicação na medicina regenerativa baseia-se na biomimética do tecido biológico (Heuer, 1992; Mann et al., 1993; Niemeyer, 2001; Hiles; Levitsky, 2005; Ott et al., 2008) e tem sido uma rotina neste século.

Atualmente, os biomateriais são produzidos com uma estrutura molecular altamente organizada em nível de nano-escala apresentando uma arquitetura intrincada o que proporciona seu emprego numa miríade de possibilidades funcionais para tecidos moles e duros (Stupp; Braun, 1997; Hench; Polak, 2002; Tan; Saltzman, 2004).

Um dos tecidos humanos aptos a receber um biomaterial é o tecido ósseo e sua regeneração completa deve fornecer um arcabouço adequado para que o órgão ou prótese nele inserido retorne as suas funções.

O conhecimento de sua estrutura e do processo de regeneração óssea são necessários para o entendimento de sua interação com o biomaterial no que se refere ao comportamento biológico.

3.1 Tecido Ósseo

O tecido ósseo é responsável pela sustentação do sistema musculoesquelético, pela proteção dos órgãos internos vitais e da medula óssea e pela transmissão das forças de contração muscular durante o movimento. Altamente especializado e vascularizado, apresentando um metabolismo ativo e dinâmico capaz de se remodelar em função de fatores físicos e hormonais. Esta remodelação ocorre pela interação das células ósseas: osteoblastos, osteócitos e os osteoclastos (Órefice et al., 2006).

Junqueira e Carneiro (2004) assim descrevem as células do tecido ósseo:

- osteoblastos: as células osteoprogenitoras, originárias do mesênquima perivascular, se diferenciam em pré-osteoblastos e, posteriormente em osteoblastos. Encontrados na superfície óssea são os responsáveis por sintetizar, organizar e transportar diversos componentes da matriz óssea. Sintetizam a parte orgânica da matriz óssea (colágeno tipo I, glicoproteínas e proteoglicanas), concentram fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. Durante a alta atividade sintética, os osteoblastos são cubóides ou piramidais, apresentando um núcleo grande e se destacam por apresentar alta basofilia (afinidade por corantes básicos) (FIG. 1).

FIGURA 1 - Osteoblasto, célula cubóide do tecido ósseo, responsável pela síntese da parte orgânica da matriz

Fonte - Rede de Tecidos, 2011.

- osteócitos: os osteoblastos aprisionados na matriz óssea passam a ser denominados osteócitos. Localizados em lacunas dentro da matriz não apresentam capacidade proliferativa, e tem como função a manutenção da integridade da matriz óssea participando dos processos de formação, absorção e reparação de microfraturas. A difusão dos nutrientes é feita através da comunicação entre os prolongamentos adjacentes (FIG. 2).

FIGURA 2 - Osteócito, célula nutridora do tecido ósseo, os prolongamentos adjacentes fazem a comunicação com outros osteócitos

Fonte - Rede de Tecidos, 2011.

- osteoclastos: células derivadas de monócitos e macrófagos sanguíneos. Móveis, gigantes, multinucleados (de 4 a 50 núcleos) são muito ramificados e responsáveis pela reabsorção da matriz óssea. Os osteoclastos jovens apresentam uma basofilia leve, que diminui progressivamente com o amadurecimento da célula, quando o citoplasma se torna acidófilo (afinidade por corantes ácidos). Localizam-se na superfície óssea e, por ação enzimática, escavam a matriz óssea formando depressões chamadas lacunas de Howship (FIG. 3).

FIGURA 3- Osteoclasto, célula gigante do tecido ósseo, multinucleada que reabsorve o tecido ósseo

Fonte - Rede de Tecidos, 2011.

A FIG. 4 apresenta uma lâmina histológica corada onde podem ser observadas as células do tecido ósseo.

FIGURA 4- Lâmina histológica corada pelo método de Hematoxilina de Harris e Eosina de Lison (HE), onde se pode observar as células do tecido ósseo: osteoblasto, osteócito, osteoclasto e uma lacuna

Fonte – Rede de Tecidos, 2011.

Carvalho e Collares-Buzato (2005) relatam que os osteoclastos são células com um alto metabolismo e de grande porte, e que um único osteoclasto pode reabsorver a matriz óssea depositada por 100 osteoblastos, o que justifica seu reduzido número, mesmo em áreas com intensa atividade de reabsorção.

Órefice et al. (2006), ressaltou que o tecido ósseo é composto por aproximadamente 33% de matriz orgânica (sendo 28% de colágeno tipo I e 5% de proteínas não-colagenosas, como a osteonectina, osteocalcina, proteína morfogênica óssea, proteoglicanos ósseos e sialo-proteína óssea). A matriz inorgânica ou mineralizada permeada por cristais de hidroxiapatita e íons fosfato preenche os 67% restantes da estrutura.

A matriz orgânica do tecido ósseo é responsável pelas características de flexibilidade e elasticidade do tecido ósseo. Esse tecido conjuntivo é composto por fibras colágenas, osteócitos e uma substância fundamental produzida pelos osteócitos que serve de cimentação para o colágeno mineralizado (Watkins, 2001). Já a matriz inorgânica contém grande quantidade de cátions e ânions principalmente o Ca^{2+} , PO_4^{3-} e o CO_3^{2-} e outros íons em pequena quantidade (Mg^{2+} , Fe^{2+} , F^- e Cl^-). Os íons cálcio e fosfato tem papel importante na formação de sais, como fosfato tricálcico e Hidroxiapatita presentes na fração mineral amorfa, já a fração mineral cristalizada é constituída praticamente por Hidroxiapatita (Cachinho, 2006).

A FIG. 5 mostra a estrutura do tecido ósseo, destacando o conjunto formado por um canal central e pelas lamelas concêntricas, denominado sistema de Osteonas. Os canais perfurantes partem da superfície do osso (externa ou interna) e caminham perpendicularmente ao eixo maior. Já os canais centrais tem uma trajetória longitudinal e podem se comunicar por projeções laterais e também com os canais perfurantes. Ao redor do canal central observam-se lamelas concêntricas de substância intercelular, células ósseas e matriz mineralizada.

FIGURA 5- Estrutura do tecido ósseo. Observa-se o sistema de irrigação composto por arteríola e vênula que percorrem o interior do canal central, que juntamente com as lamelas concêntricas formam o sistema de osteonas; os canais perfurantes se interligam com os canais centrais. Externamente observa-se o periosteio e internamente, na região do endosteio, as trabéculas ósseas do osso esponjoso.

Fonte: adaptada de Shared, 2011.

Recobrendo o osso externamente há uma membrana vascularizada, fibrosa e resistente - o periosteio. Revestindo internamente a parede óssea

encontra-se uma camada delgada de tecido conjuntivo especializado, composto por uma monocamada de células osteoprogenitoras e osteoblastos - o endósteo. Ambos são responsáveis pela nutrição e fornecimento de células osteoprogenitoras que permitem a formação do tecido ósseo imaturo no processo de reparo (Junqueira; Carneiro, 2004).

Seibert (1983) observou que mesmo considerando toda a capacidade de regeneração do tecido ósseo, em inúmeros casos, a região receptora de um implante ou uma prótese apresenta dimensões inadequadas (altura e/ou espessura insuficientes) inviabilizando sua imediata instalação.

3.2 Materiais para Enxerto Ósseo

Para se restabelecer esta estrutura perdida ou defeituosa, propõe-se a prévia remodelação desta região empregando um material para enxerto ósseo. Este implante de tecido vivo ou conservado, na dependência da relação genética entre doador e receptor (Enciclopédia Médica Moraes Amato, 2012) pode ser:

Enxerto Autógeno ou auto-enxerto: derivado do próprio paciente. Devido às suas propriedades biológicas e a ausência de rejeição orgânica é considerado o melhor material para enxertia. Principais características: inexistência de incompatibilidade antigênica e de resposta imune; presença de elementos celulares que iniciam o processo de integração ao leito receptor; e, por ser derivado do próprio indivíduo, elimina as incertezas quanto à fonte doadora, fabricação, estocagem e controle de qualidade (Arun, 2001). No entanto, se faz necessário um sítio doador e a morbidade a ele associado. Além disto, um enxerto autógeno passa a compor um monobloco com a área receptora decorrido o período de cicatrização (4 a 6 meses), e só a partir de então estará apto a receber, por exemplo, um implante osseointegrado (Almeida et al., 2004).

Da necessidade de se evitar a abordagem de um sítio doador buscou-se uma fonte substituta para o osso autógeno.

Enxerto Singênico ou isoenxerto: quando doador e receptor são irmãos univitelinos.

Homoenxerto ou aloenxerto ou homogêneo: derivado de cadáveres fica disponível em bancos de tecidos e se dividem em: FDBA (aloenxerto ósseo seco-congelado mineralizado), e DFDBA (aloenxerto ósseo seco-congelado desmineralizado). Ao eliminar a necessidade de um sítio doador reduz o tempo de anestesia/cirurgia, diminuindo a perda sanguínea, minimizando complicações. As desvantagens dizem respeito à qualidade do enxerto ósseo proveniente de outro indivíduo, diretamente relacionada com

o histórico médico do doador. Ainda segundo o autor, há na literatura controvérsias sobre a inatividade do vírus HIV, mesmo após o processamento do enxerto seco e congelado. Pode ainda provocar algum tipo de rejeição, semelhante ao que acontece com transplantes de órgãos (Neves, 2003).

Enxerto Heterógeno, xenoenxerto ou heteroenxerto: de origem de outra espécie que não a humana, como por exemplo, de origem bovina. São tratados quimicamente e tem como características ser um enxerto anorgânico, poroso, biocompatível e esterilizável (Seibert, 1983). Apresentam como desvantagem as características imunológicas por serem provenientes de espécies diferentes e a possibilidade de transmissão de doenças. Devido à sua estrutura natural, é física e quimicamente comparável à matriz óssea mineralizada humana. Apresenta-se disponível em granulação ou em blocos medulares ou corticais (Neves, 2003).

Enxerto Aloplástico ou sintético (Biomateriais): diversas pesquisas tem sido realizadas para tornar possível o projeto, síntese e caracterização de biomateriais que promovam a indução da reparação óssea na região do defeito biológico em substituição as opções de um enxerto ósseo autógeno, alógeno ou xenógeno.

Os biomateriais destinados a substituir ou compor o sistema esquelético devem apresentar resistência mecânica e propriedades morfológicas e físico-químicas que permitam atingir um grau de biocompatibilidade e biofuncionalidade compatíveis com a osteointegração, proporcionando um desempenho adequado de sua função (Yoshimoto et al., 2009).

3.3 Osteofisiologia

A realização de enxerto ósseo possibilita a reconstrução da anatomia e devolve previsibilidade ao tratamento. A neoformação óssea ocorre por três mecanismos: osteogênese, osteoindução e osteocondução.

Segundo Marzola e Pastori (2006), a osteogênese é a formação e o desenvolvimento de tecido ósseo. Caracterizada quando o próprio enxerto é suprido de células capazes de formação óssea (osteoblastos); a osteoindução é a capacidade do enxerto em estimular a atividade osteogênica, promovendo a proliferação osteoblástica com neoformação óssea, trata-se de um processo ativo e representa a habilidade do enxerto em estimular a produção óssea pelo tecido receptor; na osteocondução a matriz física serve de arcabouço para formação de

um novo osso, é um processo passivo, representado pela habilidade do enxerto em permitir a invasão vascular e celular proveniente da área receptora, e que depende basicamente do número e tamanho dos canais através do enxerto.

Todo material substituto ósseo possui ao menos um desses três modos de ação (Lynch et al., 1999).

Segundo Gutierrez et al. (2006), o critério para a seleção do material para enxerto deve considerar a capacidade de produção óssea por proliferação celular de osteoblastos transplantados ou por osteocondução de células da superfície do enxerto; capacidade de produzir osso por osteoindução de células mesenquimais; capacidade do osso neoformado em se transformar em osso medular maduro; manutenção do osso maduro ao longo do tempo sem perda após entrar em função; capacidade para estabilizar implantes quando colocados simultaneamente com o enxerto; apresentar baixa taxa de infecção e de antigenicidade; ser de fácil acesso e ter alto nível de confiabilidade.

Por ocasião de uma lesão no tecido ósseo, seja por trauma ou cirurgia, ocorre o desencadeamento de uma sequência histológica bem definida para que o defeito ósseo seja reparado. Inicialmente se desenvolve um quadro hemorrágico devido ao rompimento dos vasos sanguíneos, juntamente com a destruição da matriz e morte celular (Junqueira; Carneiro, 2004; Fini et al., 2004; Stevens, 2008; Geris et al., 2008). Os macrófagos então removem o coágulo sanguíneo e restos celulares e da matriz, iniciando a reparação. Perióstio e endóstio circunvizinhos à área lesionada, respondem com uma intensa proliferação de células osteoprogenitoras que irão penetrar pelas extremidades ósseas rompidas. Neste anel conjuntivo e junto às extremidades da fratura óssea é formado um tecido ósseo imaturo que evolui com o aparecimento de um calo ósseo, que envolve as extremidades. As forças de tração e compressão sofridas na zona de reparação óssea após o restabelecimento da funcionalidade da região proporcionam a remodelação do calo ósseo e sua completa substituição por um tecido ósseo lamelar, não sendo observada a formação de tecido cicatricial. (Junqueira; Carneiro, 2004).

Outro aspecto importante quanto ao emprego dos biomateriais diz respeito ao processo de inflamação, pois a diminuição do pH na região afetada, aumenta a taxa de absorção de determinados tipos de cerâmicas podendo desencadear eventos biológicos indesejáveis e retardar o processo de reparação e até mesmo comprometê-lo (Legeros, 2002).

Nos casos em que o processo inflamatório torna-se exacerbado, ocorre uma produção excessiva de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio, devido ao

aumento brusco do metabolismo celular, elevando o estresse oxidativo dos tecidos circunvizinhos. Esta produção descontrolada pode provocar patologias como inflamação crônica, doenças degenerativas, arteriosclerose e câncer. Os radicais livres podem desnaturar proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos ou fazer com que percam suas funções, pois danificam o DNA produzindo falhas na transcrição, provocando mutação ou inviabilizando a célula, o que finalizaria em morte por apoptose ou por necrose. Quando os radicais livres atingem os lipídios ocorre degeneração da membrana celular, denominada de peroxidação lipídica (Pompéia et al., 2003).

Um biomaterial para preenchimento ósseo, entre outras características, deve ser capaz de mediar essa reação inflamatória e o consequente estresse oxidativo que surge em qualquer tecido lesado ou cirurgicamente lesionado.

Após esta explanação sobre o tecido ósseo, que neste estudo receberá o biomaterial desenvolvido, serão estudados o comportamento biológico dos materiais e suas propriedades biológicas, fundamentais para viabilizar seu emprego.

3.4 Comportamento Biológico dos Materiais Sintéticos

Segundo Lima (2006), os biomateriais podem ser classificados de acordo com a interface implante/tecido em: biotoleráveis, bioinertes, bioativos e biodegradáveis.

Materiais Biotoleráveis são aqueles apenas tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes pela formação de uma camada envoltória de tecido fibroso que é induzida pela liberação de compostos químicos, íons, produtos de corrosão e outros, por parte do metal implantado. Quanto maior a espessura da camada de tecido fibroso formada, menor a tolerabilidade dos tecidos ao material. Os materiais biotoleráveis são praticamente todos os polímeros sintéticos e a grande maioria dos metais.

Materiais Bioinertes são também tolerados pelo organismo, mas a formação do envoltório fibroso apresenta uma espessura bem reduzida, uma vez que o material implantado libera quantidades mínimas de produtos químicos. Os materiais bioinertes mais utilizados são zircônia, alumina.

Materiais Bioativos são aqueles nos quais ocorrem ligações químicas entre material de implante e o tecido ósseo (osteointegração). Os principais materiais desta classe são os vidros e vitrocerâmicas à base de fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita e os compostos de fosfato de cálcio, titânio e suas ligas e carbono.

Materiais Biodegradáveis (ou reabsorvíveis), são aqueles que, após certo período de tempo em contato com os tecidos biológicos, são degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Seus produtos de degradação não são tóxicos e são eliminados pelo metabolismo normal. São materiais de aplicação temporária cuja permanência se faz desnecessária, mas que dispensam uma nova intervenção cirúrgica para sua retirada. Os principais exemplos desses materiais são o fosfato tricálcico (β -TCP) e os polímeros poli(ácido láctico)(PLA) e poli(ácido glicólico) (PGA) e o poli(ϵ -caprolactona) (PCL).

Além do conhecimento das características físico-químicas do material sintético deve ser também avaliado seu comportamento biológico, ou seja, sua interatividade com o tecido receptor.

Os biomateriais interagem com as proteínas sanguíneas devido a grande diversidade de características superficiais apresentadas pelas proteínas, que são heteropolímeros naturais cujas unidades básicas são os aminoácidos, conferindo-lhes um grande potencial para adsorver em quase todos os tipos de interface, pois podem apresentar simultaneamente regiões hidrofóbicas, polares não carregadas e polares carregadas em sua superfície (Rosa et al., 2000).

O sangue é um dos fluidos biológicos que mais comumente entra em contato com os biomateriais. Constituído por elementos sólidos (glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas) suspensos em um meio líquido denominado plasma (Murray et al., 1993), cuja concentração total de proteínas é de aproximadamente 70 mg/mL, com cerca de 150 bandas de proteínas determinadas por eletroforese em gel (Andrade e Hlady, 1987).

As proteínas apresentam diversas funções no sangue. A albumina, por exemplo, apresenta no corpo humano uma concentração normal em torno de 3,5 e 5,5 g/dL, corresponde a 50% das proteínas plasmáticas e é sintetizada no fígado e é fundamental para a manutenção da pressão osmótica, necessária para a distribuição correta dos líquidos corporais entre o compartimento intravascular e o extravascular, localizado entre os tecidos (Ebah, 2012).

O mineral mais abundante do corpo humano é o cálcio, que ao entrar no capilar venoso 50% apresenta-se ligado a proteína, sendo 80% ligado à albumina e 20% à globulina, os outros 50% circulam em forma iônica. O cálcio é fundamental para a formação e manutenção da matriz óssea, sendo necessário para o crescimento e desenvolvimento dos ossos e dentes. Sua distribuição é de 99% nos ossos e dentes e

1% no sangue, espaço extracelular e células de tecidos moles (Bourdeau *apud* Grüdtner et al., 1997).

A albumina apresenta em sua molécula cerca de 12 sítios de ligação para o cálcio, porém, nem todos estes sítios ficam ocupados, porque, na dependência de fatores como por exemplo o pH, o cálcio é liberado e circula na forma iônica, ou seja, na acidose fica aumentada a concentração do íon, por haver diminuição da ligação cálcio-albumina, enquanto que na alcalose fica aumentada esta ligação, com consequente diminuição de cálcio iônico, que é fisiologicamente ativo. Assim, em um pH de 7,4 cada g/dl de albumina liga 0,8g/dl de cálcio (Bourdeau *apud* Grüdtner et al., 1997).

Neste estudo, a interação da albumina com um biomaterial forneceu dados em relação à interação do cálcio no processo de neoformação óssea.

Já o fibrinogênio é uma glicoproteína envolvida nas etapas finais da coagulação, como precursor de monômeros de fibrina necessários para a formação do *plug* plaquetário resultando na interrupção de sangramentos. Possui alta massa molecular e é solúvel no plasma sanguíneo, convertendo-se em fibrina pela ação da trombina, que é a enzima ativa. O fibrinogênio, assim como a albumina, tem origem no fígado e sua deficiência pode produzir alterações como: hemorragias de caráter leve a grave ou a formação de coágulos sanguíneos. Apresenta como valores de referência- 1,5 a 3,7g/l (Murray et al., 1993). A TAB 1 apresenta as doze principais proteínas presentes no plasma e suas respectivas concentrações. As demais proteínas presentes no plasma são denominadas globulinas, como as imunoglobulinas (IgG, IgA, IgM) que são responsáveis pelo mecanismo de defesa do organismo.

TABELA 1 - Principais proteínas do plasma humano

Proteína	Concentração (mg/mL)
Albumina	40
IgG	8-17
LDL	4
HDL	3
α -Macroglobulina	2,7
Fibrinogênio	2-3
Transferina	2,3
α -Anti-tripsina	2
Haptoglobinas	4,8-5,6
C3	1,6
IgA	1-4
IgM	0,05-2

Fonte - Andrade e Hlady, 1987.

3.5 Arcabouços Sintéticos e a Engenharia do Tecido Ósseo

Diversos biomateriais estão disponíveis para a remodelação do tecido ósseo. Visando à produção de arcabouços sintéticos empregados na Engenharia de Tecidos encontram-se as cerâmicas e os polímeros.

Cerâmicas

Dentre as cerâmicas, as apatitas, que são definidas pela fórmula química $M_{10}(Y_6)Z_2$ formam soluções sólidas como resultado da substituição dos sítios M^{2+} , Y^{3-} ou Z , onde as espécies M^{2+} são cátions metálicos bivalentes (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} ou Cd^{2+}), as espécies Y^{3-} são ânions trivalentes (PO_4^{3-} , AsO_4^{3-} , VO_4^{3-} , CrO_4^{3-} ou MnO_4^{3-}) e Z ânions monovalentes (F^- , OH^- , Br^- ou Cl^-). Os diferentes grupos das apatitas são referenciados com base no ânion predominante, ou seja, fluorapatita (F), hidroxiapatita (OH), clorapatita (Cl), entre outros (Legeros, 1991; Elliot, 1994).

De Jong (1926 apud Gouveia, 2008) foi o primeiro a observar a semelhança entre padrões de difração de raios X da fase mineralizada dos ossos e da hidroxiapatita sintética, verificando uma composição não bem definida da fase mineralizada e variações entre os estágios de maturação e envelhecimento dos tecidos duros (Kawashi et al., 2000; Bens-Nissan; Pezzotti, 2002).

O emprego da hidroxiapatita sintetizada (HAP), como material biocompatível, vem da sua similaridade química com a matriz orgânica do tecido ósseo, onde a ligação que se faz é de natureza química, permitindo a proliferação de fibroblastos¹, osteoblastos e outras células ósseas que não distinguem a superfície da hidroxiapatita da superfície óssea (Santos, 2002).

Nas últimas décadas tem-se testemunhado um grande aumento no emprego da HAP na Engenharia de Tecidos (Roy; Linnehan, 1974; Hench, 1991; Anselme et al., 1999; Hutmacher, 2000).

O recobrimento de superfícies com HAP é um fator reconhecidamente importante na determinação de respostas biológicas, pois o efeito das cargas superficiais é diretamente propagado para as células e ocorre indiretamente através da adsorção

¹ Fibroblastos são as células mais comuns do tecido conjuntivo. Responsáveis pela biossíntese de colágeno do tipo I produzem a substância intercelular e originam células de outros tecidos conjuntivos, sendo responsáveis também pela regeneração tecidual.

iônica e de substâncias macromoleculares, apresentando um caráter osteocondutor em relação à proliferação de osteoblastos na remodelação do tecido ósseo (Kobayashi et al., 2001; Nakamura et al., 2002; Kumar et al., 2010).

Já o processo bioerosão da HAP difere da reabsorção da porção mineral do tecido ósseo, pois os cristais ósseos, que tem dimensões na ordem de nanômetros, não apresentam uma ligação forte entre si, são cultivados numa matriz orgânica, possuem uma grande área de superfície e uma maior bioatividade em comparação aos cristais de HAP (que tem dimensões micrométricas), apresentam área de superfície pequena e apresentam uma forte ligação entre os cristais (Kim et al., 1995; Kim et al., 1996; Kim et al., 2000).

A hidroxiapatita sintética é classificada como material osteocondutor por favorecer o crescimento ósseo. Apresenta uma resistência à absorção pelo organismo, que ocorre numa taxa de 1 a 2% ao ano e pode ser encontrada comercialmente em diversas texturas e tamanhos de partículas (blocos ou grânulos), podendo ser porosa ou densa (Constantino; Freidman, 1994; Misch, 2000; Cachinho, 2006).

Elliot (1994), relatou que a Hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) apresenta razão molar Ca/P de 1,67, e é composta por uma rede tridimensional de óxido de cálcio e poliedros de fosfato, cuja célula unitária é representada pelo cristal de apatita, constituído por grupos de Ca^{2+} , PO_4^{3-} e OH^- empacotados juntos.

Formada basicamente por íons de cálcio e fosfatos que participam ativamente do equilíbrio iônico, quando empregada como material para enxerto ósseo, não promove resposta inflamatória ou de corpo estranho ao tecido receptor devido as suas propriedades de biocompatibilidade e atoxicidade local e sistêmica (Barney et al., 1986; Greenwald et al., 2001).

Cowin (2000) observou que a superfície da HAP permite ligações do tipo dipolo, favorecendo a adsorção de moléculas de água, proteínas e colágeno na superfície, induzindo a regeneração tecidual.

Cada célula hexagonal de HAP contém dez íons cálcio localizados em sítios não equivalentes, quatro no sítio I (Ca_I) e seis no sítio II (Ca_II). A estrutura da HAP permite que facilmente sejam feitas substituições catiônicas e aniônicas isomorfas, onde o Ca^{2+} pode ser substituído por metais como o Mg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} ; os grupos PO_4^{3-} podem ser substituídos por carbonatos e vanadatos; e os grupos OH^- por carbonatos, F^- e Cl^- . Tais substituições podem alterar a cristalinidade, dimensões dos cristais,

estabilidade, bioatividade, biocompatibilidade, solubilidade, propriedades de adsorção da estrutura da HAP e os parâmetros de rede sem que ocorra significativa mudança na simetria hexagonal da estrutura. (Kim et al., 2003)

Estes átomos estão distribuídos em um arranjo hexagonal numa estrutura cristalina como a representada na FIG. 6.

FIGURA 6 - Estrutura unitária cristalina da hidroxiapatita.
Fonte: Kay et al. 1964 *apud* Mavropoulos, 1999.

Os íons hidroxilas estão rodeados por dois grupos de átomos de Ca_{II} e por dois grupos de PO_4^{3-} tetraédricos, ambos arranjados em posições triangulares. Os átomos de Ca_{I} estão mais afastados. A existência de dois sítios de íons cálcio traz consequências importantes para a hidroxiapatita que contem impurezas catiônicas, pois suas propriedades estruturais podem ser modificadas dependendo do sítio ocupado pelo cátion da impureza (Kay et al., 1964; Lacerda et al., 2009).

A HAP presente no tecido ósseo não é estequiométrica, observa-se uma deficiência em cálcio em até 10% (razão Ca/P mais próxima de 1,5). O balanço eletrônico das cargas pode ser obtido pela ausência de grupos hidroxilas (OH^-), ou pela presença do ânion hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}) no lugar do PO_4^{3-} (Hench; Wilson, 1993; Ribeiro et al., 2006).

A HAP sintetizada deficiente em cálcio (d-HAP) apresenta uma razão estequiométrica que varia entre 1,5 e 1,67 (Monma et al., 1981; Kannan et al., 2005), cuja composição química pode ser expressa pela fórmula geral (Reação 1):

O desvio de estequiometria da d-HAP depende do método de síntese empregado, sendo que o processo de precipitação com temperatura variando de 25 a 100°C, com o pH inicial da suspensão menor que 12, atingindo, após a síntese um pH igual a 5, tem sido o mais utilizado para se obter a HAP deficiente em Ca^{2+} (Legeros, 1991).

As condições do meio empregado na síntese do material, como temperatura, pH, concentração de íons, entre outros, definirá o tipo de fase de fosfato de cálcio formado. A TAB. 2 apresenta além da classificação dos fosfatos de cálcio pela razão molar Ca/P, que varia entre 0,5 a 2,0, também os valores de solubilidade. Nota-se que com o aumento da razão molar Ca/P o produto de solubilidade diminui ou reduz a razão de degradação destes materiais *in vivo* (Brown, 1999).

TABELA 2 – Classificação dos fosfatos de cálcio em função da razão molar Ca/P e do produto de solubilidade

Símbolo	Nome	Fórmula	Ca/P	Produto de solubilidade
MCMP	Diidrogeno fosfato de cálcio monoidratado	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5	$1,0 \times 10^{-3}$
DCPD	Hidrogeno fosfato de cálcio diidratado	$\text{CaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	$1,87 \times 10^{-7}$
DCP	Hidrogeno fosfato de cálcio	CaHPO_4	1,0	$1,26 \times 10^{-7}$
OCP	Fosfato octacálcico	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33	$5,01 \times 10^{-15}$
TCP	Fosfato tricálcico (α, β)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	$2,83 \times 10^{-30}$
HAP	Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot (\text{OH})_2$	1,67	$2,35 \times 10^{-59}$
TTCP	Fosfato tetracálcico	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,0	-

Fonte - Gouveia, 2008.

O método de neutralização é adequado para a síntese de hidroxiapatita com tamanho de partículas nanométricas (Gouveia, 2008), onde a adição do ácido fosfórico a

uma razão de 8,0 mL/min possibilita a obtenção de HAP estequiométrica. Observou também que amostras que apresentem $\text{pH} < 6$ após a total adição do ácido fosfórico apresentam d-HAP, e com tratamento térmico a 800°C há formação de mistura bifásica HAP e β -TCP.

O diagrama de estabilidade do sistema Ca-P-H₂O a 25°C é apresentado na FIG. 7 na forma do logaritmo da concentração total de cálcio da solução em função do pH da suspensão. Observa-se que a fase $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ é obtida em meio básico enquanto a fase $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, em meio menos alcalino.

FIGURA 7 - Diagrama de estabilidade do sistema Ca-P-H₂O a 25°C

Fonte - Ogasawara et al. (2001 apud Gouveia, 2008).

As biocerâmicas de fosfato de cálcio apresentam a seguinte ordem de degradação: DCPD > DCP > OCP > TCP > HAP, que se caracteriza pela reabsorção do material causada pela sua dissolução na dependência da solubilidade do material e do pH local no meio fisiológico, pela desintegração física em partículas menores e por fatores biológicos como fagocitose, presença de leucócitos e de mediadores químicos que promovem a redução do pH local (Ratner et al., 1996; Hench; Wilson, 1993).

O aumento da área de superfície (pó > sólido poroso > sólido denso) e o decréscimo da cristalinidade podem aumentar a velocidade de reabsorção (degradação) do material (Ratner et al., 1996; Kawashi, 1997). Essa degradação da HAP é

extremamente baixa quando comparada com a do β -TCP, que, na dependência da estequiometria e porosidade, após um período de 6 a 15 meses apresenta reabsorção parcial (Bens-Nissan; Pezzotti, 2002; Ratner et al., 1996) e estudos demonstram também sua reabsorção total em 12 meses (Hench; Wilson, 1993), enquanto que, em um implante ósseo, a HAP poderá permanecer por 3 ou 4 anos (Bens-Nissan; Pezzotti, 2002; Ratner et al., 1996).

Dentre todos os fosfatos de cálcio, o TCP e a HAP são os que tem despertado maior interesse de estudo para a Engenharia de Tecidos (Elliot, 1994; Hench; Wilson, 1993; Legeros, 2002; Gouveia, 2008).

Durante as duas últimas décadas, compósitos à base de nanohidroxiapatita e de polímeros tem sido desenvolvidos na Engenharia de Tecidos para aplicações como enxerto para a regeneração do tecido ósseo. Os estudos visam melhorar as propriedades mecânicas da HAP, sua bioatividade, biodegradabilidade e propriedades de biocompatibilidade (Hong et al., 2005; Boissard et al., 2009; Dong et al., 2009; Thein-Han et al., 2009; Jack et al., 2009; Jayabalan et al., 2010).

Uma variedade de materiais à base de polímeros biodegradáveis tem despertado o interesse científico quanto ao seu emprego como arcabouço sintético. Segundo Almeida (2003), a presença de polímeros biodegradáveis predispõe sua substituição por uma rede nutridora devido à formação de inúmeros condutos que, colonizados por células osteoprogenitoras, induziriam crescimento ósseo na região enxertada.

Polímeros

Polímeros são compostos químicos de elevada massa molecular resultantes de reações químicas de polimerização. São macromoléculas formadas a partir de unidades estruturais menores - os monômeros. O princípio geral para nomear os polímeros é utilizando-se o prefixo *poli*, seguido da unidade estrutural repetitiva que define o polímero, escrita entre parênteses (Associação Brasileira de Polímeros, 2012).

A polimerização é uma reação em que os monômeros se combinam quimicamente para formar moléculas longas, mais ou menos ramificadas com a mesma composição centesimal. Podem ser formados por reação em cadeia ou por meio de reações de poliadição ou policondensação. A polimerização pode ser reversível ou não, espontânea ou provocada (por calor ou reagentes). O número de unidades estruturais

repetidas numa macromolécula é chamado grau de polimerização (Kahovec; Fox; Hatada, 2002).

Uma das possíveis classificações dos polímeros diz respeito a suas características de degradação, que segundo Brito et al. (2011), podem ser: biopolímeros, polímeros verdes ou polímeros biodegradáveis.

- Biopolímeros – produzidos a partir de matérias-primas de fontes renováveis como milho, cana-de-açúcar, celulose, quitina entre outras. As fontes renováveis possuem um ciclo de vida mais curto comparado com fontes fósseis como o petróleo. Fatores ambientais e sócio-econômicos como os causados pelos processos de extração e refino utilizados para produção dos polímeros provenientes do petróleo, a escassez desta matéria prima e aumento do seu preço também estão relacionados ao crescente interesse pelos biopolímeros. Apesar de todas as vantagens, os biopolímeros possuem algumas limitações técnicas que tornam difícil sua processabilidade e seu uso como produto final. Para viabilizar o processamento e uso dos biopolímeros em diversas aplicações, , blendas, compósitos e nanocompósitos tem sido estudados no intuito de melhorar propriedades como processabilidade, resistência térmica, propriedades mecânicas e reológicas, permeabilidade a gases e a taxa de degradação.

- Polímeros verdes – são polímeros que outrora eram sintetizados a partir de matéria-prima proveniente de fontes fósseis, mas que, devido a avanços tecnológicos passaram também a ser sintetizados a partir de matéria-prima proveniente de fontes renováveis. Para diferenciá-los o adjetivo verde é acrescentado ao nome do polímero, como p. ex. o polietileno verde (PE verde) e o policloreto de vinila verde (PVC verde), que mantem as mesmas características dos polímeros obtidos de fontes fósseis. Nem o PE nem o PVC verde são biodegradáveis, entretanto, pelo fato de serem provenientes de fontes renováveis, são classificados como biopolímeros. Após o final de sua vida útil, os produtos verdes podem ser reutilizados, reciclados ou enviados para sistemas de reciclagem energética, com a principal vantagem de gerar emissão neutra de carbono. Os polímeros verdes apresentam custo competitivo.

-Polímeros biodegradáveis – são aqueles em que a degradação resulta da ação de microrganismos de ocorrência natural como bactérias, fungos e algas, podendo ser consumidos em semanas ou meses sob condições favoráveis de biodegradação. São provenientes de fontes naturais renováveis como milho, celulose, batata, cana-de-açúcar, sintetizados por bactérias a partir de pequenas moléculas ou derivados de fonte animal, como a quitina, a quitosana ou proteínas. Outros polímeros biodegradáveis podem ser obtidos de fontes fósseis, petróleo, ou da mistura entre biomassa e petróleo. Os

polímeros biodegradáveis provenientes do petróleo mais conhecidos são as policaprolactonas (PCL), as poliesteramidas, os copoliésteres alifáticos e os copoliésteres aromáticos.

Na TAB. 3 estão os principais polímeros biodegradáveis, suas características e aplicações.

TABELA 3 – Alguns polímeros biodegradáveis: propriedades e características

Polímero	Característica	Biodegradabilidade (meses)	Utilização
Poliácido glicólico (PGA)	Poliéster linear de cadeia alifática	6 a 12	Dispositivos para angioplastia Fios de sutura
Polidioxanona (PDO)	Polieter-éster polimerizado pela abertura do anel	6 a 12	Fios de sutura
Poliácido láctico (PLA)	Polímero de cadeia cíclica com 2 isômeros	Mais que 24	Fios de sutura Membranas para regeneração guiada
Poliácido láctico co-glicólico	90% ácido glicólico 10% ácido láctico	3 a 4	Recobrimento de placas e parafusos em fixação ortopédica Fios de sutura
Poli(ε-caprolactona) (PCL)	Poliéster de estrutura linear e hidrofóbico	12 a 18	Fios de sutura Matriz para crescimento celular Próteses reabsorvíveis Substitutos de ureter Espaçador de articulação Enxerto ósseo Matriz para enxerto vascular

Fonte - modificada de Almeida, 2003.

Dentre eles, o poli(ϵ -caprolactona) (PCL) mostra-se atraente e promissor apresentando um importante potencial para aplicações na área médica, sendo largamente empregado na medicina como carreador de drogas (sistemas de liberação controlada de fármacos), cimentos ortopédicos e odontológicos, material de sutura e como matriz para o crescimento de tecido biológico devido às suas excelentes características de biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de já ser um material com aprovação pela Food and Drug Administration (FDA), (Darney et al., 1989; Bezwada et al., 1995; Albertsson; Varma, 2003; Khor et al., 2003; Almeida, 2003).

Devido a sua alta permeabilidade o PCL tem sido utilizado também na liberação de drogas de baixo peso molecular (Coombes et al., 2004), a exemplo do encapsulamento de antibióticos, por apresentar biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* (De Queiroz et al., 2002), assim como tem sido empregado em suturas reabsorvíveis e substitutos de enxerto ósseo (Rezwan et al., 2006).

O poli(ϵ -caprolactona) é um poliéster de estrutura linear e hidrofóbico devido a presença de grupos metilênicos não-polares e um único grupo éster relativamente polar em cada unidade que se repete. Outras características são sua natureza semicristalina, alta permeabilidade, baixa solubilidade, baixo ponto de fusão, estabilidade ao calor, atoxicidade além de ser biodegradável (De Queiroz et al., 2002).

Para Oyane et al. (2005) e Shor et al. (2007) o PCL ganha destaque por suas aplicações na Engenharia de Tecidos como matriz para o crescimento celular, uma vez que os estudos com seus compósitos demonstram a constituição de um arcabouço em enxertos aloplásticos onde as propriedades biológicas e mecânicas tem sido mantidas até que o processo de restauração biológica se complete.

Outro aspecto importante a ser considerado no emprego do PCL na Engenharia de Tecidos é quanto a sua biodegradação. Frost e Pearson (1961) descreveram o principal mecanismo de biodegradação dos polímeros - a hidrólise química simples – que ocorre em duas fases. Na primeira fase a água dos fluídos orgânicos e do meio extracelular é absorvida pelas cadeias poliméricas implantadas, interferindo com as ligações químicas da fase amorfa do polímero, quebrando as longas cadeias poliméricas tornando-as menores. Ocorre uma redução do peso molecular seguida por uma perda das propriedades físicas. Na segunda fase, enzimas agem sobre os fragmentos poliméricos restantes, metabolizando-os e promovendo rápida perda de

massa do polímero. As moléculas resultantes da biodegradação polimérica são eliminadas pelo organismo.

A taxa de biodegradação do PCL varia consideravelmente de acordo com as condições de sua síntese. Esta biodegradação ocorre por hidrólise da ligação éster e formação de produtos de decomposição que são intermediários normais do metabolismo celular. Esta taxa é importante para que ocorra o reparo ósseo, pois a substituição do compósito pelo tecido ósseo neoformado deve ocorrer em um ritmo que possibilite que a regeneração mantenha as propriedades mecânicas mais próximas do tecido original (Rhee et al., 2002; Rhee, 2004). A estimativa de biodegradabilidade do PCL linear no organismo é de 12 a 18 meses (Kim et al., 2004; Funabashi et al., 2009).

O poli(ϵ -caprolactona) é usualmente sintetizado por polimerização de abertura de anel em massa ou em solução. A síntese de poliésteres por condensação a partir dos correspondentes hidroxiácidos também é possível, mas é muito difícil obter polímeros com alta massa molar e livre de mistura de cíclicos.

O processo de obtenção por polimerização de abertura de anel em massa ou em solução (FIG. 8) é relativamente simples e de baixo custo.

FIGURA 8 - Obtenção do poli(ϵ -caprolactona) após polimerização por abertura do anel

Fonte - Almeida, 2003.

3.6 O PCL na Obtenção de Arcabouços para a Engenharia de Tecido

O primeiro dispositivo poroso surgiu no início dos anos 60, tratava-se de um compósito cuja matriz era uma mistura de alumina, sílica e carbonato de cálcio (Cerosium®), onde os poros eram parcialmente preenchidos por resina epóxi inerte, o que lhe proporcionava propriedades mecânicas adequadas para aplicações em áreas sujeitas a carga (Hench; Wilson, 1993).

A aplicação de polímeros sintéticos biodegradáveis se iniciou no final dos anos 70 a exemplo dos fios de sutura biorreabsorvíveis, como o poli (α -hidroxiácidos) (Nair; Laurencin, 2007; Pachence et al., 2007).

As propriedades mecânicas e a velocidade de degradação dos polímeros sintéticos podem sofrer alteração na dependência de modificações químicas simples, podendo ser produzidos com velocidade de degradação de dias ou anos, ou seja, adequando-se a cinética de degradação conforme a aplicação desejada. Também as propriedades físicas e químicas podem ser controladas e adaptadas a diferentes aplicações como, por exemplo, como substitutos para pele, ossos ou cartilagens (Gunatillake; Adhikari, 2003).

O uso da enzima transglutaminase tecidual como revestimento da superfície do PCL foi estudado com o intuito de aumentar a biocompatibilidade do PCL. Concluíram que a transglutaminase tecidual é uma proteína que se liga fortemente a fibronectina na matriz pericelular, aumentando a adesão do PCL e assim a sua biocompatibilidade. A fibronectina tecidual é sintetizada pelos fibroblastos e células endoteliais e está relacionada com a adesão, migração, diferenciação e crescimento celular (Heath et al., 2002).

A reconstrução de tecidos e estruturas complexas como a articulação têmporo-mandibular (ATM), tem sido um grande desafio para a Engenharia de Tecidos e o emprego de polímeros biodegradáveis tem se mostrado promissor nos reparos do tecido ósseo e cartilaginoso (Williams et al., 2005).

A produção dos polímeros sintéticos em condições controladas reproduz propriedades físicas e mecânicas como resistência a tração, módulo de elasticidade e razão de degradação havendo também o controle da presença de impurezas. Observa-se que o risco a toxicidade, imunogenicidade e o desenvolvimento de infecções são menores para os polímeros sintéticos quando comparados aos polímeros naturais (Rezwan et al., 2006).

Os polímeros sintéticos biodegradáveis mais empregados são os poliésteres alifáticos, dentre eles, o poliácido láctico (PLA) e suas formas racêmicas, copolímeros do ácido láctico, poli-caprolactona (PCL) e seus derivados. Esses polímeros vem sendo aplicados como suporte para crescimento de células e neoformação tecidual, demonstrando diminuir o risco de infecção e o tempo do pós-operatório para o paciente (Rezwan et al., 2006).

Atualmente os poliésteres alifáticos tem sido o material de eleição para a confecção de próteses temporárias, estruturas porosas, matrizes tridimensionais (suporte de tecidos) e como veículo de liberação controlada de fármacos (Nair; Laurencin, 2007).

Os polímeros biodegradáveis ainda desempenham um papel fundamental como suporte, proporcionando a formação de estruturas tridimensionais e ambientes de matriz extracelular para a regeneração tecidual. Este material deve mimetizar a matriz extracelular natural e a interação célula-matriz, bem como a liberação biológica de sinais que evidenciem o processo de cura. O desenvolvimento destes materiais biomiméticos objetiva alcançar propriedades semelhantes às da matriz extracelular (Ma, 2008).

Os materiais destinados a enxertos devem apresentar além das características essenciais de biocompatibilidade, propriedades como a capacidade de suportar e transferir cargas, serem estáveis quando implantados no organismo, apresentar uma cinética de superfície controlada, indutividade e condutividade na cicatrização do leito cirúrgico (Silva, 2011).

O PCL pode ser combinado a materiais biocerâmicos como fosfatos de cálcio (CaP), fosfato tricálcico (TCP), hidroxiapatita (HAP) para produzir substitutos ósseos, aumentando a estabilidade mecânica do suporte e melhorando a interação com o tecido (Rezwan, et al., 2006; Habraken et al., 2007).

Técnicas de modificação química da superfície de biocerâmicas como os processos de silanização, adsorção de agentes tensoativos, sais de zircônio e a enxertia de macromoléculas tem sido desenvolvidas para o aumento da adesão interfacial entre as fases poliméricas e biocerâmicas do compósito, de forma a preservar as propriedades mecânicas do material, obtendo-se fases híbridas mais estáveis e de elevado desempenho para aplicações biológicas (Liu e Van Blitterswijk, 1998; Borum-Nicholas; Wilson Junior, 2003).

A síntese de um biomaterial híbrido inorgânico/orgânico, onde uma hidroxiapatita nanométrica é revestida com o polímero poli(ϵ -caprolactona) biodegradável de topoliga estrela, visa colaborar com a Engenharia de Tecidos no que tange sobre a adesão interfacial entre a cerâmica e o polímero, a trababilidade do compósito, a estabilidade mecânica do suporte e a interação tecidual quanto a adsorção proteica, hidrofobicidade e proliferação celular.

Ignjatovic (1999) descreveu que a mistura física do PCL com a hidroxiapatita apresenta-se como conveniente para a medicina ortopédica devido a proximidade das propriedades mecânicas com as do tecido ósseo, sendo que a baixa adesão interfacial na

fase polímero/cerâmica é contornada pela promoção de ligações covalentes, o que favorece a adesividade.

O revestimento com polímeros lineares e biodegradáveis na superfície de biocerâmicas, a exemplo do poli(ácido láctico) e poli(ϵ -caprolactona), tem se apresentado como uma técnica atraente para obtenção de compósitos com elevada estabilidade interfacial e desempenho mecânico (Hong et al., 2005; Lee et al., 2006; Lee et al., 2007).

A produção de compósitos HAP/PCL visa aliar as propriedades de osteocondutividade e bioatividade (Taizo et al., 2000; Shikinami e Okuno, 2001; Deng et al., 2001; Kim et al., 2004).

Silva (2011) estudando o desenvolvimento, caracterização e estudo pré-clínico de dispositivos implantáveis biocompatíveis baseados no PLC concluiu que o polímero não apresentou citotoxicidade; nos estudos de genotoxicidade *in vitro*, nas concentrações estudadas dos compósitos PCL/HAP, não houve evidências de carcinogenicidade e mutagenicidade; quanto à imunotoxicidade, demonstrou não haver ação tóxica sobre o sistema imunológico, evidências de atividades inflamatórias ou de hipersensibilidade; na avaliação da hemocompatibilidade não foi observada atividade trombogênica sobre as superfícies das pastilhas de PCL/HAP. Nos testes de biocompatibilidade *in vivo*, tanto o PCL quanto o compósito PCL/HAP, foram classificados como não irritantes e de baixa toxicidade.

3.7 Arquitetura Molecular do PCL

Macrômeros de PCL podem ser sintetizados a partir de moléculas de PCL dióis com hidroxilas terminais, em presença de grupos acrílicos após reação das hidroxilas terminais com cloreto de acrilóila (cloreto de vinila) formando-se em seguida o macrômero por polimerização radicalar (FIG. 9).

FIGURA 9 – Síntese do macrômero de PCL (2) e de PCL ramificado (3) a partir de uma molécula de PCL diol (1).

Fonte - Kweon et al., 2003

A polimerização por abertura do anel lactônico (ROP) é o principal método industrial de síntese do poliéster poli(ε-caprolactona) (De Queiroz et al., 2002; Yanjun et al., 2004; Wang e Dong, 2006) empregando para tanto compostos organometálicos a base de iodo (De Queiroz et al., 2002), enzimas (De Queiroz et al., 2002, Albertsson; Varma, 2003) ou estanho e zinco (Yanjun et al., 2004) como catalisadores, podendo ser realizada em massa, em solução, em emulsão ou em suspensão utilizando iniciadores eficientes para desencadear a polimerização (Coulembier et al., 2006).

A polimerização pode ocorrer por três mecanismos diferentes de reação: aniônica, catiônica ou inserção por coordenação, na dependência do tipo de iniciador (Kricheldorf, 2001; Albertsson; Varma, 2003; Coulembier et al., 2006).

A FIG. 10 apresenta um esquema que exemplifica a polimerização aniônica que pode ser iniciada por metais alcalinos ou óxidos de metais alcalinos (Coulembier et al., 2006)

FIGURA 10 – Polimerização por abertura do anel de lactonas por iniciador aniônico; reação - ataque nucleofílico de um iniciador carregado negativamente ao carbono da carbonila ($C=O$) ou ao átomo de carbono adjacente ao oxigênio da lactona, resultando na formação do poliéster linear.

Fonte - Albertsson e Varma, 2003.

A ϵ -caprolactona é uma lactona extensa, por isso sua reação procede pela clivagem do grupo acil-oxigênio levando a formação de um íon alcóxido como espécie propagadora conforme demonstrado na FIG. 11.

FIGURA 11 – Polimerização aniônica de lactonas mostrando a clivagem do grupo acil-oxigênio formando um íon alcóxido como espécie propagadora.

Fonte - Albertsson e Varma, 2003.

A polimerização da ϵ -caprolactona pode ocorrer também por um mecanismo onde a mistura do octanato de estanho ($Sn(Oct)_2$) e um composto contendo hidrogênio

ativo (ROH), formam um complexo que participa da etapa de propagação da polimerização. Na FIG. 12, observa-se que, Inicialmente o $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ reage com o co-iniciador (ROH), gerando um alcóxido [1], o verdadeiro iniciador da reação. Em seguida ocorre a inserção do monômero cíclico entre a ligação $\text{Sn}-\text{OR}$ [2], formando uma reação reversível e promovendo o crescimento da cadeia (propagação) [3], o ROH é co-iniciador de massa molar baixa ou uma macromolécula com grupo hidroxila terminal (Albertsson; Varma, 2003; Coulembier et al., 2006).

FIGURA 12 – Mecanismo de abertura do anel da ϵ -caprolactona. [1] formação de um complexo a partir da mistura do $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ e um composto contendo hidrogênio ativo (ROH) gerando um alcóxido (iniciador da reação). [2] inserção do monômero cíclico entre a ligação $\text{Sn}-\text{OR}$ (reação reversível) [3] crescimento da cadeia.

Fonte - Albertsson e Varma, 2003.

Já para preparação de poliésteres alifáticos, com estrutura e arquitetura bem definida, tem-se empregado o mecanismo de polimerização de inserção por coordenação com abertura do anel. Na polimerização do ϵ -caprolactona (ϵ -CL) são empregados os catalisadores de metal ativo (compostos orgânicos de metais - estanho, alumínio, ítrio, lítio e zinco) com o objetivo de controlar a microestrutura do polímero, pois esta afeta diretamente as propriedades mecânicas e de biodegradabilidade (Albertsson; Varma, 2002).

Os polímeros que tem como finalidade aplicações biomédicas empregam como catalizador o cloreto de estanho ou o octanoato de estanho (2-etil-hexanoato de estanho), sendo que este, além de ser aceito pelo FDA para fins alimentícios e médicos,

apresenta solubilidade em solventes orgânicos e monômeros de ésteres cíclicos, auxiliando na reação de síntese do poliéster (Ryner et al., 2001).

Na polimerização por inserção por coordenação (FIG. 13), ocorre a clivagem do grupo acil-oxigênio da lactona com inserção do monômero na ligação metal-oxigênio do iniciador. A coordenação do oxigênio heterocíclico com o metal resulta na sua polarização tornando o carbono do grupo carbonila do monômero mais susceptível ao ataque nucleofílico (Albertsson; Varma, 2003).

FIGURA 13– Polimerização da lactona por inserção por coordenação. A clivagem do grupo acil-oxigênio da lactona ocorre com inserção do monômero na ligação metal-oxigênio do iniciador

Fonte - Albertsson e Varma, 2003.

A polimerização por abertura do anel lactônico com iniciadores organometálicos, a altas temperaturas ou por longos tempos de reação, propicia reações de transesterificação intermolecular (FIG. 14) e intramolecular (FIG.15) aumentando o índice de polidispersão do poliéster (Albertsson; Varma, 2003).

FIGURA 14 - Reações de transesterificação intermolecular durante polimerização por abertura de anel

Fonte - Albertsson e Varma, 2003.

FIGURA 15 - Reações de transesterificação intramolecular (*back-biting*) durante polimerização por abertura de anel.

Fonte - Albertsson e Varma, 2003.

No mecanismo de abertura do anel de lactonas, empregando o composto organometálico $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ como iniciador, a reação de polimerização por abertura do anel é conduzida na presença de compostos com hidrogênio ativo (FIG. 16). No mecanismo de ativação do monômero, o mesmo é coordenado com o catalisador e é ativado. A abertura do anel lactônico ocorre pelo ataque nucleofílico do álcool, levando a inserção do monômero na ligação metal-oxigênio pelo rearranjo de elétrons. A funcionalidade do álcool e do monômero são coordenados no complexo $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ durante a propagação. A reação é finalizada pela hidrólise, formando um grupo hidroxila terminal (Albertsson; Varma, 2003).

FIGURA 16 – Mecanismo de ativação do monômero de lactonas por polimerização por abertura do anel lactônico empregando o composto organometálico $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ como iniciador.

Fonte - Albertsson e Varma, 2003.

A cinética de degradação dos poliésteres alifáticos ocorre por hidrólise das ligações éster e depende de vários fatores como o peso molecular médio numérico (M_w), índice de polidispersão (M_w/M_n), processamento, condições ambientais, tensão e deformação, área de contacto, morfologia, distribuição dos componentes quimicamente reativos no interior da cadeia, presença de monômeros originais, hidrofilicidade, orientação da cadeia, cristalinidade, a composição química e estrutura conformacional, temperatura de fusão (T_m) e temperatura de transição vítrea (T_g) (Rezwan et al., 2006; Tokiwa; Calabia, 2007).

Após a degradação, as unidades monoméricas dos polímeros são eliminadas através de mecanismos regulados pelo próprio organismo. A degradação do PCL de alto peso molecular ($M_n=50.000$) leva três anos até sua completa remoção do corpo sendo, portanto considerada muito lenta (Coombes et al., 2004; Rezwan et al., 2006).

Ainda segundo Rezwan et al. (2006), a degradação química do poli (ϵ -caprolactona) e seus copolímeros envolve duas etapas: a clivagem hidrolítica da porção éster da molécula e a perda de massa através da difusão de espécies oligoméricas. Os produtos gerados da degradação do PCL são metabolizados através do Ciclo de Krebs.

Quando comparado a outros poliésteres alifáticos, as aplicações do PCL se limitam devido a sua lenta cinética de reabsorção e degradação, em função da sua alta cristalinidade e caráter hidrofóbico (Kweon et al., 2003). O caráter hidrofóbico se deve à presença de cinco grupos metileno apolar e um grupo éster relativamente polar em cada unidade repetitiva (De Queiroz et al., 2002).

O poli (ϵ -caprolactona) apresenta caráter semicristalino com temperatura de transição vítrea entre -60°C e -72°C , e baixo ponto de fusão ($58-60^\circ\text{C}$), o que facilita seu processamento. É também maleável à temperatura ambiente e corporal e suas propriedades mecânicas e a degradação enzimática podem ser alteradas pelo controle da sua cristalinidade. Além disto, o PCL pode ser misturado a vários polímeros amorfos ou cristalinos (Elzein et al., 2005; Sarasam e Madihally, 2005; Rezwan et al., 2006; Sabino, 2007; Ma, 2008).

3.8 PCL com Topologia Estrela (PCLE)

Nas últimas décadas, o estudo de polímeros ramificados como os polímeros com topologia estrela tem atraído muito a atenção devido as suas propriedades

mecânicas e reológicas, e por apresentarem facilidade no controle funcional de sua superfície, propriedades que não são acessíveis na maioria dos polímeros lineares.

Como citado anteriormente, uma das desvantagens do emprego do PCL linear nas aplicações farmacológicas e biomédicas refere-se à degradação *in vitro* e *in vivo* ser muito lenta. Ajustando-se o balanço hidrofílico/hidrofóbico do polímero, efetuando misturas de polímeros ou copolímeros com polilactatos e polilactonas ou controlando a arquitetura macromolecular da cadeia polimérica pode-se alterar características como a alta cristalinidade e hidrofobicidade de um polímero (Wang e Dong, 2006). Desta forma, a síntese do PCL com topologia estrela (PCLE) tende a acelerar a cinética de degradação.

Os polímeros com topologia estrela diferem de seus análogos lineares de mesma massa molar (M_n) na sua estrutura. São mais compactos por apresentarem menor volume hidrodinâmico e raio de rotação e, conseqüentemente, menor viscosidade (Lapientis, 2009). Essa arquitetura bem definida, peculiar dos poliésteres com microestrutura como polímeros com topologia estrela, despertam interesse por sua funcionalidade influenciar suas propriedades físico-químicas (YanJun et al., 2004).

Um polímero de topologia estrela é constituído por um núcleo central acoplado com três ou mais ramificações de mesmo peso molecular. Se houver um aumento do número de ramificações ocorre um aumento no peso molecular, porém o volume hidrodinâmico não se altera e conseqüentemente, a viscosidade permanece praticamente constante (Nuñez et al., 2004).

A viscosidade intrínseca (η) de um polímero em solução é um parâmetro que pode ser empregado para caracterizar um polímero ramificado, pois a viscosidade depende diretamente das dimensões moleculares da macromolécula. A cadeia polimérica pode assumir inúmeras conformações e a morfologia de uma partícula pode ser representada por um “novelo aleatório”. Além disto, a dependência da (η) com o formato molecular se deve ao coeficiente de fricção que cada segmento do polímero exerce sobre o centro de massa da partícula exercido pelo processo de fluência do solvente, ou seja, se deve ao movimento de rotação da molécula (Lucas et al., 2001).

A viscosidade intrínseca está diretamente relacionada ao volume hidrodinâmico da partícula dependendo, portanto, da massa molecular e da interação entre os segmentos do polímero e das moléculas do solvente (é expressa em unidade de volume por unidade de massa). Quanto maior for esta interação, tanto maior (mais inchado) será o novelo polimérico, como pode ser observado na FIG. 17 (Lucas et al., 2001).

FIGURA 17 – Comportamento do novolo polimérico frente a um mau solvente (a) – apresenta-se contraído; um bom solvente (b) – apresenta-se expandido.

Fonte: Silva, 2009.

Nos casos de polímeros com topologia estrela a ramificação aumenta a densidade do novolo polimérico, fazendo com que o volume ocupado por um polímero seja menor do que o de um polímero linear de mesmo tamanho e, conseqüentemente, sua viscosidade intrínseca é menor. O grau de ramificação (g') é caracterizado pelo fator de ramificação dado pela fórmula:

$$g' = \left(\frac{[\eta]_{\theta, \text{ramif}}}{[\eta]_{\theta, \text{lin}}} \right)_M$$

Os modelos de Stockmayer/Fixman e o modelo de Zimm e Kilb caracterizam a relação entre o parâmetro g' e o número de ramificações (f) de um polímero estrela (Fixman et al., 1953; Fixman, 1956), sendo que o modelo de Stockmayer-Fixman é dado pela equação

$$g' = f^{3/2} \left[2 - f + 2^{1/2(f-1)} \right]^{-3}$$

e a relação entre o parâmetro g' e o número de ramificações no modelo de Zimm e Kilb (1959):

$$g' = \frac{\left(\frac{2}{f}\right)^{\frac{3}{2}[0,39(f-1)+0,196]}}{0,586}$$

Dong et al. (2001) demonstraram a síntese do dendrímero PCLE utilizando como núcleo o pentaeritritol e trimetilolpropano relatando a síntese de PCLE de três e quatro braços via polimerização por abertura do anel lactônico do monômero ϵ -caprolactona (ϵ -CL).

Os estudos de Wang e Dong (2006) investigaram as propriedades físicas, a cinética de cristalização, o crescimento esferulítico e a morfologia do PCL sintetizado com diferentes braços: PCLE com 4 braços (4sPCL) e 6 braços (6sPCL), PCL linear com 1 braço (LPCL) e 2 braços (2 LPCL). A polimerização foi realizada a 120°C por 24h. O peso molecular dos polímeros de PCL obtidos foi controlado pela razão molar entre monômero (ϵ -CL) e o iniciador (álcool primário). Os iniciadores utilizados na polimerização foram: álcool benzílico para obtenção do LPCL, 1,6-hexanol para a obtenção do 2 PCL, pentaeritritol para obtenção do 4sPCL e éter do pentaeritritol para obtenção do 6sPCL.

Segundo os autores, a análise de DSC demonstrou que todos os polímeros obtidos possuem ponto de fusão monomodal com temperatura entre 48,6–59,1°C no primeiro ciclo de aquecimento. A temperatura de cristalização obtida no ciclo de resfriamento está entre 20,1–35,4°C, e um pico de fusão endotérmico monomodal foi obtido no segundo ciclo de aquecimento com temperaturas de fusão entre 42,9–58,0°C. Concluíram que possivelmente não existe uma cristalização secundária nos polímeros com estrutura bem definida, em razão do tempo de rearranjo e cristalização durante os ciclos de aquecimento e resfriamento devido à sua baixa temperatura de transição vítrea (- 60°C) e a sua regularidade molecular. Além disto, a temperatura máxima de fusão (T_m) (que aumenta em polímeros de maior peso molecular) e a temperatura de cristalização (T_c) diminuem com o aumento do número de braços no PCLE (LPCL > 2LPCL > 4sPCL > 6sPCL), devido ao decréscimo do peso molecular de cada braço de PCL ligado ao núcleo iniciador funcional o que leva a um aumento na densidade do braço de PCL.

Ainda no mesmo estudo, (Wang e Dong 2006), concluíram que o grau de cristalinidade (X_c) dos polímeros obtidos decresceram com o aumento do número de braços na seguinte ordem LPCL > 2LPCL > 4sPCL > 6sPCL, e apresentaram estrutura cristalina similar. A razão de cristalização (K) isotérmica e não isotérmica obtida foi a seguinte: 2LPCL > LPCL > 4sPCL > 6sPCL. A constante de cristalização (K) para o PCL linear diminui com o aumento do peso molecular do polímero enquanto que para a PCLE,

(K) aumentou. O PCL linear apresentou uma boa morfologia esferulítica no tempo de cristalização de 80s enquanto que para o PCLE os esferulitos apresentaram-se irregulares com morfologia pobre até o tempo de cristalização de 600s (FIG. 18).

FIGURA 18 - A imagem por Microscopia óptica polarizada apresenta as micrografias do PCL cristalizado a 38°C em: (A) LPCL, 80s; (B) 2LPCL, 80s; (C) > 4sPCL, 520s; (D) 6sPCL, 600s; (E) LPCL4, 90s; (F) 2LPCL4, 90s; (G) 4sPCL, 90s; (H) 6sPCL4, 90s.

Fonte - Wang e Dong, 2006.

Concluíram que a arquitetura estrela tem um efeito aparente na morfologia de formação dos esferulitos. Com o aumento do peso molecular do polímero, o PCLE (4sPCL e 6sPCL) tem a morfologia esferulítica melhorada no tempo de cristalização de 90s, similar ao observado para o PCL linear. Tanto o PCLE quanto o PCLL com alto peso molecular apresentaram boa morfologia esferulítica. Em ambos, o número de braços e o peso molecular controlaram a razão de cristalização isotérmica e não isotérmica, a morfologia e o crescimento esferulítico.

Empregando os conhecimentos explanados, este estudo foi proposto com a finalidade de desenvolver um novo biomaterial para implante no tecido ósseo, objetivando contribuir com a Engenharia de Tecidos na obtenção de um reparo tecidual biologicamente adequado, propiciando um melhor tempo de reparação e qualidade do osso neoformado.

4 TRABALHO EXPERIMENTAL

O estudo das propriedades biológicas das hidroxiapatitas e de seus compósitos foi realizado pelos ensaios de citotoxicidade, de adsorção proteica por técnica de radioisótopos, estudo da aderência/proliferação celular, da atividade de fosfatase alcalina e pela avaliação do crescimento ósseo realizado em um estudo *in vivo*.

A hidroxiapatita com tamanho de partícula micrométrica (HAP-91) é um material comercial e foi adquirida da empresa JHS[®].

A cerâmica bifásica hidroxiapatita/ β -TCP (HAP-8) foi sintetizada no laboratório de materiais cerâmicos do Centro de Ciência e Tecnologia e Materiais (CCTM) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), assim como a hidroxiapatita nanométrica (HAPN).

A síntese do polímero poli(ϵ -caprolactona) de topologia estrela (PCLE) e o recobrimento das Hidroxiapatitas com ele foram realizados no Laboratório de Biomateriais na Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), originando os compósitos HAPN/PCLE e HAP-91/PCLE.

A TAB. 4 apresenta os grupos experimentais empregados neste estudo.

TABELA 4 – Grupos experimentais conforme o biomaterial

Grupo	Biomaterial
HAP-91	Hidroxiapatita micrométrica (JHS [®])
HAP-91/PCLE	Compósito Hidroxiapatita micrométrica (JHS [®]) + PCLE
HAP-8	Cerâmica bifásica nanocrométrica (HAP + β -TCP)
HAPN/PCLE	Compósito Hidroxiapatita nanométrica + PCLE

Para o estudo *in vivo* (procedimento cirúrgico e alojamento dos animais) utilizou-se o biotério do IPEN.

Este projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética do IPEN conforme ANEXO I.

Após aquisição da HAP-91 realizou-se a síntese das Hidroxiapatitas. Em seguida a HAP-91 e a HAPN foram revestidas com o polímero PCLE.

4.1 Processamento: Síntese e Caracterização dos Materiais

4.1.1 Síntese das Cerâmicas nanométricas

As cerâmicas foram obtidas pelo processo de precipitação (método de neutralização). Baseado nos métodos de Rathje e Hayek, que consiste no gotejamento do ácido fosfórico numa suspensão de hidróxido de cálcio (Afshar et al., 2003; Campos et al., 2004), conforme a equação [2]:

Trabalhos recentes vem demonstrando ser este um método adequado para a obtenção de uma HAP nanométrica (Gouveia et al., 2006; Marchi et al., 2007; Campos et al., 2007; Gouveia et al., 2008). A velocidade de adição do ácido fosfórico empregada foi a razão de 8,0mL/min (Gouveia, 2008).

A TAB. 5 descreve os precursores utilizados para a síntese dos nanocristais de hidroxiapatita.

TABELA 5 – Precursores utilizados para a síntese da hidroxiapatita nanométrica

Precursor	Peso molecular	Pureza (%)
Hidróxido de cálcio - Ca(OH)_2	74,1	99,6
Ácido fosfórico - H_3PO_4	97,9	85,0

O fluxograma do processo de obtenção do pó da hidroxiapatita nanométrica é apresentado na FIG. 19.

FIGURA 19 – Fluxograma do processo de obtenção da hidroxiapatita nanométrica.

Devido a uma variação na velocidade de adição do ácido fosfórico durante o processamento, ocorreu a formação da fase β -TCP além da HAP com tamanho de partícula nanométrica, originando uma cerâmica bifásica que neste estudo foi caracterizada e avaliada biologicamente fornecendo dados adicionais.

4.1.2 Síntese do PCLE

Vários métodos de síntese do PCLE tem sido propostos na literatura, destacando-se a polimerização por abertura de anel utilizando os mecanismos de iniciação radicalar, iônica ou a síntese enzimática (Heuschen et al., 1981; Gross et al., 2001; De Queiroz et al., 2002).

Neste trabalho, o poli(ϵ -caprolactona) de topologia estrela (PCLE) foi sintetizado utilizando-se uma azida funcionalizada e um núcleo de poliol conforme Kolb et al. (2001).

A síntese se iniciou com a obtenção do PCLE de três braços pela policondensação entre o núcleo de poliglicerol e o monômero caprolactona em atmosfera e temperatura controladas (Fernandes et al., 2006), purificados em coluna de troca iônica e dializados. A reação de polimerização ocorreu sob agitação do monômero ϵ -caprolactona, glicerol e 2-etilhexanoato de estanho como catalisador, durante 24h em atmosfera inerte de nitrogênio, onde dois gramas de ϵ -caprolactona (17,5 mmol), 0,03g de glicerol (0,33 mmol) e 0,025g de 2-etil-hexanoato estanoso (0,062 mmol) foram colocados num tubo de Schlenk de polimerização equipado com uma barra de agitação magnética conforme FIG. 20.

FIGURA 20 – Tubo de Schlenk de polimerização equipado com barra de agitação magnética para a síntese do poli(ϵ -caprolactona) de topologia estrela.

Aplicou-se vácuo para o tubo durante 10min e, em seguida, o tubo foi purgado com argônio por três vezes, fechado a vácuo e imerso num banho de óleo pré-aquecido a 150°C. A polimerização prosseguiu por 24h sob agitação e atmosfera de argônio. O tubo de polimerização foi então arrefecido até à temperatura ambiente (25 °C) e o polímero dissolvido em 50mL de DCM e reprecipitado em n-hexano. O PCLE de três braços (1) foi isolado por filtração e seco em vácuo durante 48h. Rendimento: 1,70g (85%). $M_w=8280$; $M_n=5430$; índice de polidispersão ($IP=M_w/M_n$) =1,53.

A uma mistura de 0,05mol (9.71g) deste PCLE de três braços (1) e 0,05mol (5,06g, 3.67mL) de trietilamina, gotejou-se P-toluenossulfonilo (0,05mol, 9.82g) em 100mL de cloreto de metileno, ao longo de 1h a 0°C. Essa mistura ficou em agitação durante a noite à temperatura ambiente (25°C).

Um precipitado branco de cloridrato de trietilamina foi separado por filtração e lavado com 50mL de cloreto de metileno. O cloreto de metileno foi removido sob pressão reduzida para deixar um óleo amarelo pálido que foi purificado por cromatografia *flash* sobre sílica usando diclorometano e acetonitrilo (3:1, 1:1, e 0:01 v/v). Os solventes foram evaporados e desta forma se obteve o PCLE monotosilato (2) com um rendimento de 65%.

Uma porção de 0,03mol do PCLE monotosilato (2) (10,45g), em acetonitrilo seco (20mL), foi gotejada durante 30min, a 0,036mol de tioacetato de sódio preparado em acetonitrilo anidro em atmosfera de argônio. A mistura ficou sobre agitação durante 4h à temperatura ambiente. O precipitado branco de monotosilato de sódio foi removido por filtração e o solvente evaporado sobre pressão reduzida, obtendo-se o ditosilato (3) com rendimento de 15%.

Ao resíduo de ditosilato (3) foi adicionado 25mL de uma solução 1M de ácido clorídrico que foi aquecido em refluxo durante 6h. O solvente foi evaporado e o resíduo purificado por cromatografia *flash* em sílica, usando diclorometano/acetonitrilo com trietilamina a 0,1% (3:1, 2:1 e 1:1 v/v), fornecendo 5,44g de um sólido amarelo pálido, obtendo-se assim a síntese do PCLE Mercapto (4), com rendimento de 86%.

Os grupos tiol foram introduzidos ao PCLE, usando o método modificado de tioacetato, que é realizado por conversão do tosilato com o tiol-protegido através de tioacetato PCLE. Isto é facilmente hidrolisado por 1M de HCl para formar o produto final (4) que apresenta três grupos OH terminais, e assim a tosilação ocorre nas extremidades. A FIG. 21 apresenta o esquema da rota de síntese do PCLE mercapto de três braços.

FIGURA 21 - Esquema que ilustra a rota de síntese do PCLE: núcleo de glicerol na presença do iniciador octanato de estanho ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$) e monômero ϵ -caprolactona, sintetizando o poli(ϵ -caprolactona) estrela de três braços (1); após gotajamento com P-toluenossulfonilo ocorre a síntese do PCLE monotosilato (2); após gotejamento com tioacetato de sódio preparado em acetonitrilo anidro obtém-se o PCLE ditosilato (3); após adição de solução 1M de ácido clorídrico e purificação por cromatografia *flash* em sílica obtém-se a síntese do PCLE mercapto de três braços (4).

Fonte: Lele; Leroux, 2002; Calderon et al., 2009.

4.1.3 Síntese dos Compósitos

O Revestimento dos cristais de HAP com PCLE foi realizado conforme Hawker et al. (1996), empregando a este método uma adaptação da técnica de silanização comumente usado para modificar hidroxiapatita e sílica para que

ocorra uma ligação covalente entre as moléculas orgânicas e suas superfícies (Durrieu et al., 2004; Nielsen et al., 2010).

Neste trabalho, os grupos hidroxila dos cristais de HAP foram funcionalizados com grupos epoxi, após a reação com (3-glicidiloxipropil) trimetoxissilano. O grupo silano foi epoxidado e ligado covalentemente a um ou mais grupos hidroxila da superfície de ligações da HAP e, em seguida, permitindo que o grupo epoxi reagisse com o grupo SH do PCLE.

Inicialmente 1g de cristais de HAP foi misturado com 50mL de DMF num balão de dois, com um fluxo de azoto e um tampão de *Dean Stark*. A solução foi mantida a 175°C durante 4h e o produto da destilação, cerca de 10mL, foi removido. A solução foi arrefecida a 95°C e transferida para um condensador. Um volume de 1,0ml de (3-glicidiloxipropil) trimetoxissilano foi adicionado e a solução mantida a 95°C e se deixou reagir por 48h. Após este período, uma solução de PCLE em dimetilformamida (1g:50mL) foi gotejada ao balão contendo os cristais funcionalizados HAP que reagiu por mais 72h a 95°C. Em seguida a mistura foi filtrada e lavada duas vezes com dimetilformamida (DMF) e duas vezes com água desmineralizada. A FIG. 22 ilustra a rota da síntese dos compósitos HAP/PCLE.

FIGURA 22 – Rota da síntese dos compósitos pelo revestimento dos cristais de HAP com PCLE. Os cristais de HAP foram misturados a DMF num balão de dois. Após remoção do produto da destilação e arrefecimento da solução ocorreu o gotejamento da solução de PCLE mercapto de três braços ao balão contendo os nanocristais HAP.

Fonte – Lele e Leroux, 2002; Calderon et al., 2009.

Finalmente, o pó contendo o compósito inorgânico/orgânico HAP/PCLE já revestido foi lavado usando extração soxhlet com DCM à temperatura de refluxo durante 2 dias, e seco sob vácuo à temperatura ambiente (25°C).

Após a síntese, os biomateriais foram caracterizados pelos métodos de difração de raios X, distribuição de tamanho médio de partículas, cromatografia de permeação em gel, espectroscopia de massa MALDI-TOF, ressonância magnética nuclear de prótons e de carbono, calorimetria exploratória diferenciada, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, espectroscopia de energia dispersiva de raios X, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão e pelo potencial zeta.

4.2 Técnicas de Caracterização Físico-Química dos Biomateriais

4.2.1 Difração de raios X (DRX)

A análise qualitativa por difratometria de raios X (Procedimento CMQ-LAQ-PE-QI-004) foi realizada no Laboratório de Análises Químicas/CMQ utilizando o equipamento: Difratômetro de raios X (DRX 02) marca Panalytical, modelo X'Pert PRO MPD. Adotando parâmetros de 10-80° (2θ) e passos 0,05/5s, foram verificadas as fases cristalinas e secundárias do material. O princípio físico desta técnica baseia-se na Lei de Bragg que expressa a relação simples entre a distância das camadas adjacentes de átomos, o comprimento de onda da radiação X e o ângulo de difração, através da equação:

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

onde θ é o ângulo de difração para um espaçamento d , λ é o comprimento de onda do raio X e n é igual a um e corresponde ao raio difratado de primeira ordem, no qual o ângulo de difração é menor (Russel, 1994; Reed, 1995).

4.2.2 Distribuição de tamanho médio de partículas

O conhecimento do tamanho médio e da distribuição do tamanho de partícula é um pré-requisito fundamental para muitas operações de produção e processamento envolvendo sistemas de materiais particulados. A distribuição do tamanho de partícula influi de maneira significativa em várias etapas de produção

(transporte, compactação, sinterização, etc.) e na microestrutura do material, afetando a resistência mecânica, a densidade e as propriedades térmicas e elétricas do produto final. Portanto a sua determinação é uma etapa crítica em todos os processos que de alguma maneira envolvam materiais em pó.

Na determinação da distribuição do tamanho de partícula deve ser considerada a morfologia da partícula em questão, pois uma esfera tem seu tamanho definido por um único valor: o diâmetro. Já partículas com formatos irregulares necessitam de mais de uma medida para a quantificação do seu tamanho. Para expressar este valor em um único número, normalmente adota-se o valor de uma esfera equivalente. O diâmetro médio, porém, não pode ser apresentado como única informação referente ao tamanho do material particulado. Como já mencionado, deve-se obter informações com respeito à distribuição granulométrica do pó, pois materiais com diâmetros médios idênticos podem apresentar diferentes distribuições (Heuschen, 1981).

Os dados mais comumente usados são os gráficos de distribuição de frequência acumulada e incremental e os *decis* D10, D50 e D90 que correspondem, respectivamente, aos valores que 10, 50 e 90% da distribuição das partículas que apresentam diâmetros menores.

O método de Espalhamento (ou difração) de luz faz parte de um conjunto de técnicas, onde as partículas são dispersas num fluído em movimento. As partículas de pó causam descontinuidades no fluxo do fluído, que são detectadas por uma luz incidente e correlacionadas com o tamanho de partícula. Ao atingir uma quantidade de partículas a luz incidente sofre uma interação segundo quatro diferentes fenômenos: difração, refração, reflexão e absorção (Hildebrand, 1999 apud Parini, 2003), formando um invólucro tridimensional de luz. O formato e o tamanho deste invólucro é afetado pelo índice de refração relativo da partícula no meio dispersante, pelo comprimento de onda da luz e pelo tamanho e formato da partícula. Detectores estrategicamente posicionados medem a intensidade e o ângulo da luz espalhada. O sinal dos detectores é então convertido para a distribuição de tamanho de partícula através de algoritmos matemáticos (Auen, 1997 apud Parini, 2003).

Nos casos em que as partículas são opacas e maiores que o comprimento de onda da luz, a aproximação de Fraunhofer pode ser empregada. O tamanho de partícula altera a intensidade e o ângulo do feixe de luz espalhado. Com a utilização de luz monocromática coerente (laser), o ângulo de espalhamento é inversamente proporcional ao diâmetro da partícula (assume-se a forma esférica). O menor tamanho de partícula passível de detecção deve ser pelo menos duas vezes o comprimento de onda do laser. A faixa típica de trabalho vai de 0,1/1 a 200/300 μm , porém o seu uso é mais difundido para partículas maiores que 1 μm ou 2 μm (Jillavenkatesa et al., 2001 apud Parini, 2003)

Neste estudo, uma amostra de 0,5g de pó de HAP-91 e da HAPN foi dispersa em meio aquoso com adição de poliacrilato de amônia. O dispersante permaneceu durante um minuto em ultrassom. A avaliação da distribuição de tamanho de partículas/aglomerados utilizou a técnica de difração a laser em equipamento Mastersizer 2000 (Malvern instruments) do Laboratório Núcleo de Separadores Compactos (NUSEC) da Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), com distribuição do tamanho de partículas na faixa de 0,1 a 500 μm , assumindo formato esférico para partículas cujo diâmetro é maior que o comprimento de onda (λ).

4.2.3 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Algumas propriedades dos polímeros, importantes em termos de sua processabilidade e aplicações, estão diretamente relacionadas com o peso molecular específico, isto porque as propriedades mecânicas, químicas e de biodegradabilidade são drasticamente afetadas pelo peso molecular do polímero, ou seja, as características e o comportamento de um polímero durante o processamento dependem do tamanho médio e da distribuição de suas cadeias.

A cromatografia de permeação em gel é uma técnica que determina a distribuição de pesos moleculares de polímeros. Rápida e segura promove o fracionamento das cadeias poliméricas de um polímero em relação ao volume hidrodinâmico que cada uma delas ocupa em solução.

A técnica de GPC utiliza colunas empacotadas com géis de poliestireno ou polietileno glicóis reticulados de diferentes porosidades constituindo a fase estacionária. O polímero dissolvido em solvente apropriado é separado de acordo com seu volume hidrodinâmico, ou seja, moléculas pequenas tendem a permanecer na fase estacionária, enquanto moléculas grandes são excluídas preferencialmente desta fase. Ao penetrarem nos poros, as cadeias menores percorrem um caminho maior que as cadeias maiores. Ao final da coluna de separação cadeias de massa molecular maior serão eluídas primeiro, sendo seguidas pelas cadeias menores. Os detectores devem ter sensibilidade suficiente para determinação quantitativa das cadeias poliméricas.

O sistema analítico empregado neste trabalho era composto por um cromatógrafo Waters 244, equipado com detector 2414 (índice de refração) e o solvente tetrahidrofurano (THF) foi utilizado como eluente.

Foram utilizadas colunas Waters Ultrastyrigel 103Å (200 – 3000) – Waters Ultrastyrigel HR-1 100 Å (10 – 5000) colocadas em série, com volume de 20µL de injeção da amostra com velocidade de fluxo 1 mL/min.

A curva de calibração foi determinada com padrões de poliestireno de massas molares 785, 1950, 5000 e 9075 g/mol.

4.2.4 Espectrometria de massa MALDI-TOF

MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser- Desorption / Ionization - time-of-fly*) é uma técnica de ionização usada em espectrometria de massa. Utilizada para a identificação de proteínas, em particular, a impressão digital peptídica. Permite que biomoléculas (proteínas, peptídeos e açúcares) e grandes moléculas orgânicas (como polímeros e dendrímeros) que se fragilizam quando ionizadas, não se fragmentem como ocorre nos métodos convencionais.

A macromolécula é primeiro implantada numa matriz sólida, muitas vezes constituída por um material orgânico (p.ex.- α -ciano-4-hidroxicinamínico ou ácido trans-3-indoleacrílico e sais inorgânicos, como cloreto de sódio ou trifluoruroacetato prata). A matriz é utilizada para evitar que a biomolécula seja destruída e para facilitar a vaporização e ionização. A amostra é irradiada com um laser pulsado (laser de azoto). Os íons de energia a laser ejetados da matriz são

eletronicamente excitados, cátions e macromoléculas neutras criam uma densa nuvem de gás acima da superfície da amostra. A macromolécula é ionizada pelas colisões com pequenos cátions com a complexação.

Na distribuição do peso molecular determinada por GPC notou-se que os pesos moleculares observados não são valores absolutos porque os volumes hidrodinâmicos dos polímeros em estrela diferem dos padrões lineares utilizados para a calibração. O peso molecular do PCLE sintetizado foi então caracterizado por espectroscopia MALDI-TOF devido à variação do peso molecular desejado do PCLE em razão molar entre (M/I) do polímero ϵ -caprolactona para o glicerol.

Para a análise do PCLE, um volume de 5,0 μ L da solução polimérica em clorofórmio foi colocado em placa (96 MSP; Bruker Daltonics), seguida de secagem à temperatura ambiente (25°C). O sobrenadante seco foi coberto com 5,0 μ L de solução de matriz composta de ácido α -ceto-4-hidroxibenzoico diluída em acetonitrila (50%) e ácido trifluoroacético (2,5%). Utilizou-se um espectrômetro de massa MALDI-TOF LT microflex Bruker equipado com laser de 337 nm de nitrogênio. A detecção dos íons positivos foi feita no modo linear sendo o espectro de massas o resultado de 200 pulsos de laser. Os espectros de massa foram coletados no intervalo de 2.000 a 20.000.

4.2.5 Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (^1H -RMN) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (^{13}C -RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica que permite determinar propriedades de uma substância através do correlacionamento da energia absorvida contra a frequência, na região de radiofrequência (rf) do espectro eletromagnético. A frequência é regida pelas características estruturais da amostra. A absorção é função de determinados núcleos da molécula. Um espectro de RMN é um registro gráfico das frequências dos picos de absorção contra suas intensidades.

A ressonância magnética nuclear de próton (^1H -RMN) e carbono (^{13}C -RMN) foi efetuada em um espectrômetro Bruker AM-500 do “Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Tecnológicas-CSIC”, Madri-Espanha. Uma alíquota

da amostra do PCLE foi dissolvida em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e os grupos hidroxilas terminais foram esterificados com anidrido tricloroacético.

4.2.6 Calorimetria Exploratória Diferenciada (DSC)

Quando as substâncias são aquecidas ou resfriadas várias transformações físicas ou químicas envolvendo absorção (processo endotérmico) ou produção de calor (processo exotérmico) podem ocorrer.

A calorimetria exploratória diferencial é uma técnica de análise térmica na qual se mede a diferença de energia fornecida ou liberada por uma substância em relação a um material de referência, enquanto ambos são submetidos a uma programação controlada de temperatura.

A forma, a posição e o número de picos endotérmicos e exotérmicos em função da temperatura, obtidos nas curvas de DSC podem ser utilizados para identificar uma substância, bem como verificar seu comportamento térmico em relação a amostras de mesma natureza. A técnica de DSC pode ser utilizada para determinação quantitativa da substância presente, pois o calor de reação é proporcional à quantidade de amostra.

A transição vítrea (T_g) é um importante efeito térmico que pode ser utilizado para a caracterização de polímeros amorfos ou semicristalinos. A T_g é a propriedade do material onde se pode obter a temperatura da passagem do estado vítreo para um estado “maleável” ou “borrachoso”, sem ocorrência de uma mudança estrutural. A parte amorfa do material (parte onde as cadeias moleculares estão desordenadas) é a responsável pela caracterização da temperatura de transição vítrea. Abaixo da T_g , o material não tem energia interna suficiente para permitir deslocamento de uma cadeia em relação à outra por mudanças conformacionais, portanto, quanto mais cristalino for o polímero, menor será a T_g .

Na temperatura de transição vítrea, em um resfriamento, o polímero passa de um líquido super-resfriado ou um estado “borrachoso” para um estado sólido. A T_g também ocorre no sentido inverso, no aquecimento. No estado

líquido, as moléculas podem se mover umas em relação às outras, ocorrendo então os chamados rearranjos cooperativos.

A transição vítrea se reflete macroscopicamente a partir de mudanças em várias propriedades como a capacidade calorífica, o coeficiente de expansividade térmica, a resposta a forças de compressão ou expansão.

Métodos termoanalíticos como DSC fornecem informações sobre efeitos térmicos que são caracterizados por uma mudança no calor específico em função da temperatura, tais como o comportamento de fusão, cristalização e transições sólido-sólido.

As propriedades térmicas do polímero PCLE foram investigadas utilizando-se a calorimetria exploratória diferencial (DSC) o que permitiu determinar as temperaturas de transição vítrea (T_g) e de fusão (T_m). A amostra foi analisada sob atmosfera de nitrogênio ($50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), com velocidade de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ em um equipamento Perkin Elmer DSC 60 do Laboratório de Biomateriais da Universidade Federal de Itajubá - UNIFEI, previamente calibrado com padrões de índio com cadinho de alumínio e tampa não hermética. O intervalo de temperaturas explorado foi de -120°C a 80°C . A amostra foi aquecida de -120°C até 80°C e em seguida resfriada rapidamente até -120°C . Atingido o equilíbrio térmico, a amostra foi submetida a novo aquecimento nas mesmas condições e novamente resfriada a -120°C .

4.2.7 Espectroscopia no Infravermelho com Transformadas de Fourier (FTIR)

Uma técnica muito importante no estudo de sistemas moleculares complexos é a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. Embora não seja uma técnica de caracterização estrutural absoluta, fornece informações sobre três importantes características estruturais: composição química, estrutura configuracional e conformacional, e as forças interatômicas associadas às ligações de valência ou interações intermoleculares.

Átomos covalentemente ligados formando uma molécula não permanecem fixos um em relação ao outro, mas vibram ao redor de uma distância interatômica média. A energia absorvida, resultante da interação de um polímero

com radiação eletromagnética de determinada energia, pode ser convertida em movimentos vibracionais e rotacionais, o que leva a variação nas distâncias interatômicas e nos ângulos das moléculas. A energia absorvida, associada com as vibrações de uma molécula ligada covalentemente pode ser descrita em termos de níveis de energia vibracionais discretos, sendo os diferentes níveis de energia vibracional dados por:

$$E = (n + \frac{1}{2}). h\nu$$

Os comprimentos de onda de radiação ($\lambda = c/\nu$) capazes de excitar uma molécula de um nível vibracional a outro incluem a região do infravermelho. As vibrações moleculares podem causar uma variação no momento de dipolo se a absorção da radiação eletromagnética dentro da região do infravermelho está para ocorrer. Esta condição é conhecida como regra de seleção.

A banda IR resultante é uma banda vibracional fundamental com uma intensidade proporcional ao quadrado da variação no momento de dipolo. Na espectroscopia no infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR), utiliza-se um interferômetro para coletar os dados ao invés do monocromador usado nos espectrômetros dispersivos convencionais. As vantagens do espectrômetro FTIR sobre os convencionais são uma melhora na razão sinal/ruído por unidade de tempo, um maior ganho de energia e maior velocidade e precisão no espectro obtido. A análise do interferograma obtido é realizada por um programa de computador.

A análise do pó de PCLE foi realizada no equipamento Perkin Elmer Spectrum One (FTIR) do laboratório de biomateriais da Universidade Federal de Itajubá e para o estudo da presença de grupos funcionais característicos do polímero PCLE. O espectro de infravermelho obtido para o polímero PCLE foi realizado numa faixa de análise entre 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e intervalo de 2 cm^{-1} .

4.2.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é capaz de produzir imagens da superfície de uma amostra com ampliação de até 300.000 vezes em alta resolução. As imagens criadas em MEV tem uma aparência tridimensional. As imagens fornecidas pelo MEV possuem um caráter virtual, pois o que é visualizado no monitor é a transcodificação da energia emitida pelos elétrons. Em um MEV típico, os elétrons são emitidos

termionicamente a partir de um cátodo (filamento) de tungstênio ou hexaboreto de lantânio (LaB_6) e acelerados através de um ânodo, sendo também possível obter elétrons por efeito de emissão de campo. O tungstênio é usado por ser o metal com mais alto ponto de fusão e mais baixa pressão de vapor, permitindo que seja aquecido para a emissão de elétrons. O feixe de elétrons, o qual normalmente têm uma energia que vai desde algumas centenas de eV até 100keV, é focalizado por uma ou duas lentes condensadoras, em um feixe com um ponto focal muito fino (0,4 a 0,5nm). Este feixe passa através de pares de bobinas de varredura e pares de placas de deflexão na coluna do microscópio. As lentes objetivas defletem o feixe horizontal e verticalmente para que ele varra uma área retangular da superfície da amostra. Quando o feixe primário interage com a amostra, os elétrons perdem energia por dispersão e absorção em um volume em forma de gota, conhecido como volume de interação, o qual se estende de menos de 100nm até em torno de 5 μm para dentro da superfície da amostra. O tamanho do volume de interação depende da energia dos elétrons, do número atômico dos átomos da amostra e da densidade da amostra. A interação entre o feixe de elétrons e a amostra resulta na emissão de elétrons secundários, elétrons retroespalhados, elétrons Auger, raios X Bremsstrahlung, raios X característicos, radiação eletromagnética na região do infravermelho, do visível e do ultravioleta, além de causar aquecimento da amostra.

Espécimes de metal não exigem nenhuma preparação especial, apenas adequação dimensional para se ajustar na câmara de amostras. Espécimes sólidos não condutivos devem ser recobertos com uma camada de material condutivo, exceto quando observados com ambiente de vácuo variável. Uma cobertura ultrafina de material eletricamente condutiva é depositada tanto por evaporação de alto vácuo quanto por *sputter* de baixo vácuo na amostra, o que previne o acúmulo de campos elétricos estáticos no espécime devido irradiação elétrica durante a produção da imagem. Tais coberturas incluem ouro, ouro/paládio, platina, tungstênio, grafite, etc. Outra razão para a metalização, mesmo quando há condução mais do que suficiente, é para melhorar o contraste, esta situação é mais comum na operação de microscópios eletrônicos de varredura por emissão de campo (*field emission SEM*).

Para o estudo da morfologia dos materiais uma amostragem do pó foi dispersa em etanol e depositada com auxílio de conta-gotas sobre o porta-amostra e após secagem ao ar, foi realizado recobrimento com ouro. Para a caracterização das amostras foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura (MEV) da marca Philips, modelo XL-30 com sistema EDS da marca Edax.

4.2.9 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é a técnica na qual um feixe de elétrons é emitido em direção a uma amostra ultrafina, interagindo com a amostra enquanto a atravessa. Essa interação forma uma imagem que é ampliada e focada em um dispositivo de imagem, como uma tela fluorescente em uma camada de filme fotográfico, ou detectada por um sensor. A MET é um dos principais métodos de análise em uma vasta gama de campos científicos, tanto em ciências físicas quanto biológicas, sendo aplicada na pesquisa oncológica, virologia, ciência dos materiais, pesquisas sobre a poluição, nanotecnologia e semicondutores. Permite ainda observar modulações na composição química, orientação de cristais, estrutura eletrônica e a indução da mudança da fase eletrônica bem como as comuns imagens baseadas na absorção do material.

O projeto do porta-objetos do espécime de um MET incluem saídas de ar para permitir a inserção do suporte da amostra no vácuo com um aumento mínimo na pressão em outras áreas do microscópio. Os fixadores da amostra são adaptados para manter um tamanho padrão de grelha sobre a qual a amostra é colocada. Existe uma grande variedade de disposições de porta-objetos e de fixadores, dependendo da amostra.

A amostra é manipulada para apresentar a região de interesse para o feixe, como em uma única difração de grão (cristalito), em uma orientação específica. Para acomodar isso, o porta-objetos do MET inclui mecanismos para a translação da amostra no plano XY da amostra, do ajuste da altura Z do fixador da amostra, e, normalmente, há pelo menos um grau de liberdade de rotação para a amostra. Assim, um estágio de MET pode fornecer quatro graus de liberdade para o movimento do espécime.

A superfície das amostras com espessura de 1000Å foram obtidas por microtomia com a seguinte sequência de preparação: corte de lâminas de 0,8 a 1,0mm de espessura e afinamento por polimento mecânico até 0,10 - 0,20mm de espessura. A morfologia das amostras foi examinada por MET no equipamento JEOL JEM -2100 operando com uma voltagem de aceleração de 80kV. Os cortes ultrafinos (80nm) foram preparados usando um ultramicrotomo Leica EM FC6 com navalha de diamante.

4.2.10 Espectroscopia de Energia Dispersiva de raios X (EDX)

A espectroscopia de energia dispersiva de raios X é uma técnica de microanálise química usada em conjunto com microscopia eletrônica de varredura (MEV). A técnica de EDS detecta os raios X emitidos a partir da amostra, durante o bombardeamento por um feixe de elétrons para caracterizar a composição elementar do volume analisado. Podem ser analisadas e caracterizadas fases menores que 1µm.

Quando a amostra é bombardeada pelo feixe de elétrons do MEV, os elétrons são ejetados a partir dos átomos que compõem a superfície da amostra. As lacunas de elétrons resultantes são preenchidos por elétrons de um estado superior, e um raio X é emitido para equilibrar a diferença de energia entre os dois estados elétrons, essa energia de raios X é característico do elemento a partir do qual foi emitido.

A EDX mede a abundância relativa de emissão de raios X em relação a sua energia. O sinal é então enviado para um analisador de canais múltiplos, onde os impulsos de tensão são classificadas. A energia, tal como determinado a partir da medição de tensão, para cada ocorrência de raios X é enviado para o computador para visualização e avaliação de dados adicionais. O espectro de raios X de energia versus as contagens são avaliadas para determinar a composição elementar do volume da amostra.

Para a análise qualitativa das amostras, valores de energia de raio X, a partir do espectro de EDX, são comparados com os valores característicos conhecidos de raio X de energia para determinar a presença de um elemento na amostra. Para a visualização de detalhes da composição elementar do compósito foi utilizada microscopia eletrônica de varredura, equipamento da marca EDAX Philips modelo XL-30.

4.2.11 Potencial Zeta

Potencial Zeta (PZ) é um termo científico para eletrocinética potencial em sistemas coloidais. Na literatura química coloidal é normalmente indicado com a letra grega zeta, daí ζ -potencial.

O potencial zeta é a diferença de potencial entre o meio de dispersão e a fase estacionária de líquido ligado à partícula dispersa, cujo significado é de que o seu valor pode ser relacionado com a estabilidade das dispersões coloidais, e indica o grau de repulsão entre partículas adjacentes igualmente carregadas em uma dispersão. Para moléculas e partículas que são suficientemente pequenas, um potencial zeta elevado irá conferir estabilidade, ou seja, a solução ou dispersão irá resistir a agregação. Quando o potencial é baixo, a atração supera a repulsão e a dispersão irá quebrar e flocular. Assim, colóides com elevado

potencial zeta (negativo ou positivo) são eletricamente estabilizados enquanto colóides com baixos potenciais zeta tendem a coagular ou flocular. A TAB. 6 (Hanaor et al., 2011) demonstra o comportamento da estabilidade de um coloide em função do potencial zeta.

TABELA 6– Comportamento da estabilidade do coloide em função do potencial zeta em módulo

potencial zeta [mV]	comportamento de estabilidade do colóide
de 0 a ± 5	Coagulação rápida ou floculação
a partir de ± 10 para $30\pm$	Incipiente instabilidade
a partir de ± 30 para $40 \pm$	Estabilidade moderada
a partir de ± 40 para $60 \pm$	Boa estabilidade
mais do que ± 61	

Os valores de potencial zeta são dependentes da composição da fase da HAP e do tamanho de partícula (Ferraz et al., 2001).

Neste estudo, o potencial zeta (PZ) das suspensões da HAP-8, HAP-91, HAPN/PCLE e HAP-91/PCLE foi medido em solução PBS, a pH 7,4 e 25°C, utilizando-se um equipamento Nanosizer/Zetasizer® Nano-ZS Modelo ZEN 3600 (Malvern Instruments - USA) do Laboratório Núcleo de Separadores Compactos (NUSEC) da Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI). O fundamento da técnica baseia-se no fato de que a carga elétrica não é medida diretamente. Após a aplicação de um campo elétrico, as partículas movimentam-se em direção ao eletrodo de carga oposta e, desta forma, o potencial elétrico pode ser determinado pela medida da sua velocidade de migração.

Após a síntese e caracterização dos biomateriais foi realizada a avaliação das propriedades biológicas realizados pelos ensaios *in-vitro* pelos estudos da citotoxicidade, da adsorção proteica por técnica radioisotópica, aderência / proliferação celular, da atividade de fosfatase alcalina e por um estudo *in-vivo*, conforme descritos a seguir.

4.3 Avaliação Biológica *in vitro*

4.3.1 Estudo da Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade está fundamentado no procedimento originalmente desenvolvido por Borefreund e Puerner (1984, apud Silva, 2008) para a triagem de agentes citotóxicos sobre uma monocamada de células.

O método baseia-se na avaliação quantitativa de células viáveis após a exposição a um agente tóxico pela incubação com o corante supravital do composto tetrazólio MTS e um agente acoplador de elétrons PMS. O MTS é biorreduzido pelas células ao produto formazan, que é solúvel no meio de cultura, e então é efetuada uma análise colorimétrica da coloração incorporada.

A quantidade de MTS (marcador da viabilidade celular) incorporada pela população de células é diretamente proporcional ao número de células viáveis na cultura. A amostra testada que induz a toxicidade celular é medida em um intervalo de concentrações do extrato do biomaterial, e a concentração que produzir uma redução de 50% na absorção de MTS é tomado como o parâmetro de citotoxicidade (Silva, 2008). A sua principal vantagem em relação aos ensaios tradicionais de toxicidade *in vivo* é fornecer uma resposta mais simples, sensível, econômica e homogênea.

Neste trabalho foi utilizada uma cultura de células de ovário de hamster chinês (ATCC CHO K1) em monocamada, separada por tripsinização. A suspensão celular foi centrifugada e o precipitado ressuspensionado em meio RPMI 1640, contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), após lavagem com PBS estéril. Uma microplaca de cultura celular de 96 poços foi preparada a partir da adição de diluições crescentes do extrato do biomaterial (50µL/placa, 4 placa/diluição).

A tripsinização das células foi realizada mantendo-se a placa a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Em seguida, com o emprego de uma pipeta, 50µL da suspensão celular (~3000 células) foram depositadas nos poços num volume total de 100µL cada. Colunas controle de 4 poços foram preparadas com o meio sem a colocação das células (branco) e meio com células, ao invés de extrato (controle negativo=100%).

A microplaca foi incubada sob atmosfera úmida de CO₂, após 72h, 20mL de uma mistura (20:1) de MTS a 0,2% e PMS a 0,09% em PBS foi adicionada aos poços teste onde permaneceram por 2h. A incorporação do corante foi medida por meio de um leitor de microplacas a 490nm contra o branco.

A citotoxicidade (IC_{50%}) foi estimada pela curva de interpolação, como a concentração do extrato do biomaterial, correlacionando o percentual médio de células viáveis em relação à concentração dos extratos. A avaliação da biocompatibilidade do extrato dos materiais cerâmicos e dos compósitos, na sua forma em pó, considerou o número de células na ausência dos extratos igual a 100%.

4.3.2 Estudo da Adsorção Proteica por Técnica Radioisotópica

O estudo quantitativo do fenômeno da adsorção de proteínas plasmáticas na superfície dos materiais é de grande importância uma vez que é um dos primeiros eventos que ocorre quando um biomaterial entra em contato com o sangue. Esta camada de proteína adsorvida se torna a mediadora das interações entre os biomateriais e os componentes do sistema biológico e determina o desempenho dos materiais sintéticos em contato com o sangue. Esta adsorção pode ser desejável ou não, dependendo do tipo e quantidade das proteínas adsorvidas na interface sólido/líquido (Santin et al., 1997).

O método que utiliza proteínas radiomarcadas tem sido o mais utilizado no estudo da adsorção proteica.

Neste estudo, as proteínas fibrinogênio (HFB) e albumina (HSA) humana foram marcadas com iodo radiotivo (^{125}I) segundo Ribela et al. (1993), onde a marcação das proteínas com ^{125}I foi realizada pela técnica clássica de cloramina T.

Foram adicionados 10 μL de tampão fosfato de sódio 0,5M, pH 7,4 a 10 μL de solução contendo 5 μg da proteína, a um volume de ^{125}I que resulte em 29,6 MBq (0,8mCi), e 10 μg de cloramina T (10 μL de uma solução de 1mg de cloramina T em 1mL de fosfato de sódio 0,5M, pH 7,4). A reação de marcação foi realizada a temperatura ambiente, em agitação branda. Após 30 segundos, seguiu-se a adição de 10 μg de metabissulfito de sódio (10 μL de solução de 1mg de metabissulfito em 1mL de tampão fosfato de sódio 0,5M, pH 7,4), e de 200 μg de iodeto de potássio (200 μL de solução de 10mg de KI em 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,05M contendo 0,1% de BSA).

A purificação do traçador (^{125}I / proteína) foi efetuada por cromatografia de exclusão molecular utilizando resina Sephadex G-100, em coluna de vidro com dimensões 2,5cm x 50cm, com fluxo de 12mL/h, sendo a eluição realizada em tampão fosfato de sódio 0,05M contendo 0,1% de BSA e 0,1% de azida sódica.

Foram coletadas frações de 2mL do traçador. Cada fração de proteína purificada (HFB e HSA) foi contada (em contagens por minuto - cpm) num contador de poço para quantificação da atividade presente. Frações de proteínas com contagens de $1,2 \times 10^6$ cpm para HSA e $6,9 \times 10^5$ cpm para HFB foram separadas e estocadas a -20°C até sua utilização. As atividades específicas

encontradas para as proteínas foram de 49,6 $\mu\text{Ci/ng}$ para a HSA e de 22,5 $\mu\text{Ci/mg}$ para o HFB.

As concentrações de proteínas adsorvidas foram determinadas por contagem gama em um detector de radiação gama (Packard Cobra II - contador gama). A leitura de fundo foi realizada a partir de tubos expostos aos marcadores ^{125}I -HSA ou ^{125}I -HFB que não continham as Hidroxiapatitas ou seus compósitos.

Para o ensaio de adsorção, alíquotas das proteínas marcadas foram diluídas com solução salina de PBS 0,01M (0,1M de NaCl) e a contagem, para cada amostra, realizada em triplicata e calculada a concentração na superfície de proteínas de acordo com a equação [3]:

$$\text{Proteína (mg/g)} = \frac{[\text{contagem (cpm)} \times C_{\text{solução}} (\text{mg/mL})]}{[SA_{\text{solução}} (\text{cpm/mL}) \times m(\text{g})]} \quad [3]$$

onde as contagens são as medições de radioatividade a partir da amostra (HAP-8; HAPN/PCLE; HAP-91; e HAP-91/PCLE), $C_{\text{solução}}$ e $SA_{\text{solução}}$ são a concentração e a atividade específica da solução de proteína, respectivamente. Após a normalização dos resultados para a massa (m), a quantidade de proteína adsorvida (Γ) para cada concentração de solução (C) foi calculada e ajustada à equação de Langmuir [equação 4]:

$$\Gamma = \frac{\Gamma_{\text{max}} kC}{(1 + kC)} \quad [4]$$

onde Γ_{max} é a monocamada da capacidade de adsorção e k é a constante de Langmuir ou constante de associação, que é uma medida da afinidade aparente da proteína com a superfície. Os ensaios foram realizados em três repetições para cada amostra.

O estudo de adsorção das proteínas marcadas foi efetuado em tubos contendo amostras de 0,6g de pó. Em seguida, os tubos foram preenchidos com 5mL de uma solução de PBS da proteína marcada (aproximadamente $2,0 \times 10^5 \text{cpm/mL}$). Após incubação por 30 minutos a 25°C retirou-se uma alíquota de 200 μL e analisou-se a quantidade de proteína no sobrenadante em contador Cobra. Nesse caso a atividade proteica correspondente foi considerada como sendo a adsorção total (Γ_{max}).

Após centrifugação, o pó foi separado do sobrenadante e foi adicionado 5mL de solução tampão PBS. Após agitação em vortex (por 30 segundos), foi mantido em repouso por 30min, quando então foi retirada uma aliquota de 200 μ L para análise no contador gama. A atividade medida neste caso correspondeu ao processo de adsorção reversível (Γ_1).

Em seguida o sistema foi novamente centrifugado e o pó foi separado de seu sobrenadante. A contagem da atividade do pó correspondeu à adsorção irreversível (Γ_2).

Todas as contagens sofreram subtração das contagens de fundo (aproximadamente 200cpm). A contagem observada (cpm) dividida pela eficiência do contador (0,8) forneceu o número de desintegrações por minuto (dpm). A relação entre dpm e a atividade específica da proteína marcada (Bq/mg) permitiu o cálculo da massa de proteína adsorvida.

A percentagem de marcador ligado à HSA e HFB determinada por métodos de cromatografia (Stern et al., 1965) foram mais do que 98,0%. As atividades finais do ^{125}I -HSA e ^{125}I -HFB foram $1,68 \times 10^8$ cpm/mg e $3,8 \times 10^6$ cpm/mg, respectivamente.

4.3.3 Estudo da aderência / proliferação celular

As células Humanas de osteossarcoma MG-63 (ATCC, Rockville, MD) foram utilizadas para o ensaio de resposta de células osteoblásticas nas superfícies dos materiais.

As células foram cultivadas em discos de 10mm ($\varnothing$) x 1mm de espessura dos materiais (esterilizados por raios gama a 25 kGy) em Dulbecco modificado por Eagle (DMEM, Gibco) contendo 10% de soro bovino fetal inativado pelo calor (SBF, Gibco), 1% de penicilina-estreptomicina. As culturas foram mantidas a 37°C numa atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂. As células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 e separadas com tripsina EDTA (0,25% de tripsina, Gibco) a 37°C durante 2min. As pastilhas foram colocadas em placas de 24 poços para implante de células MG-63 a uma densidade definida em torno de $2,0 \times 10^4$ células/cm². As células MG-63 foram incubadas em solução de DMEM suplementado por 3 e 5 dias. Após a incubação das células com os discos no tempo indicado, houve uma lavagem com PBS e depois foi adicionado 35 μ l, de MTS e 350 μ l de DMEM por poço. Após 3h de

incubação, a absorvância de controle e os poços tratados foram medidos num leitor de placas a 490nm.

A adição de isotiocianato de fluoresceína (FITC) - faloidina conjugada (Sigma) a 37°C para corar a membrana do DNA das células MG-63 durante 20min. Ao final deste período foram lavadas e incubadas durante 10min à temperatura ambiente com DAPI. As amostras foram montadas em *Vectorshield fluorescente* (Vector Laboratories, UK) e observadas por microscópio confocal a laser-Leica SP2.

Para estimar a viabilidade/proliferação das células foi utilizado o ensaio de redução do MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrasodium brometo) a um produto de reação “formazan púrpura” pelas células vivas. As culturas de controle e as amostras de materiais semeados foram incubados com 0,5mg.mL⁻¹ de MTT por 4h. O meio foi decantado, os sais de formazan dissolvidos com dimetilsulfóxido e a absorvância foi medida a 600nm. Os resultados foram comparados em termos de área de superfície macroscópica e expressos como A₆₀₀cm⁻².

Os resultados foram expressos em média ± S.E.M. obtidos a partir de 4 amostras para cada grupo experimental e submetidos a análise estatística utilizando o teste t de *Student* ou uma análise de variância (ANOVA). Os valores de *p* igual a ou menor do que 0,05 foram considerados significativos.

4.3.4 Estudo da Atividade de Fosfatase Alcalina

Discos de HAP-8, HAPN/PCLE, HAP-91 e HAP-91/PCLE (0,8cm²) foram fixados à parte inferior das placas de cultura de tecidos (48 poços). Amostras de MG-63, a uma densidade de células conjunto em torno de 2,0×10⁴ células/cm², foram colocadas em DMEM suplementado com FBS a 5%, e o meio foi trocado a cada 24h durante a incubação numa incubadora de CO₂.

A atividade de fosfatase alcalina (ALP) em cada amostra foi determinada após 1, 3, 5 e 7 dias. Para remover as células não ligadas, as amostras foram lavadas suavemente com solução de PBS de pH 7,4. Cada amostra foi incubada com 100µl de solução de fosfato de o-nitrofenilo a 37°C por 30min. A produção de o-nitrofenol na presença de ALP foi medida por monitorização da absorvância de luz pela solução a 405nm, utilizando leitor

ELISA. A atividade de ALP foi calculada em nanomoles de produto da reação (o-nitrofenol) por minuto/mg de proteína celular.

Na análise estatística os resultados foram expressos em média $\pm$ S.E.M. obtidos a partir de quatro amostras para cada grupo experimental. Todos os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o *teste t de Student* ou uma análise de variância (ANOVA). Os valores de *p* igual a ou menor do que 0,05 foram considerados significantes.

4.4 Avaliação Biológica *in vivo*

Para o procedimento cirúrgico o pó, de cada biomaterial, foi prensado em matriz pré-fabricada ($\varnothing=6\text{mm}$ x 1,5mm de altura) para confecção de 8 pastilhas para cada grupo experimental, e foram esterilizadas no CTR/IPEN com dose de irradiação gama de 25 KGy utilizando uma fonte de Cobalto 60 (Gammacell-220 Cobalt-60 Gamma Irradiator Atomic Energy of Canada, Comercial Products, Ottawa, Canada).

Foram utilizados 8 coelhos albinos, Nova Zelândia, (*Oryctolagus cuniculus*), geneticamente controlados, adultos, machos, com aproximadamente 1 ano de idade e peso e em torno de 3Kg, armazenados no biotério do IPEN, distribuídos em gaiolas individuais (FIG. 23), recebendo ração estéril seca e água sob temperatura ambiente constante de 21°C.

FIGURA 23 - Gaiola de armazenamento dos animais no biotério do IPEN. Estantes climatizadas para seis coelhos

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos conforme o material com 2 coelhos cada conforme TAB. 7.

TABELA 7 - Grupos experimentais - distribuição dos animais conforme material de implante ósseo

Biomaterial							
HAP-91		HAP-91/PCLE		HAP-8		HAPN/PCLE	
animal	enxerto	animal	enxerto	animal	enxerto	animal	enxerto
1	a	3	a	5	a	7	a
	b		b		b		b
2	a	4	a	6	a	8	a
	b		b		b		b

Para o procedimento cirúrgico, o seguinte protocolo foi utilizado para uma anestesia segura e eficiente alívio da dor:

- Cloridrato de xilazina (i.m.) – sedativo, analgésico e relaxante muscular em concentração de 5mg/kg do animal;
- Cloridrato de cetamina (i.m.) - anestésico dissociativo em concentração de 35mg/Kg do animal;
- Lidocaína 2% (i.m.) - (Amina da Xilidina sob a forma de cloridrato sem vaso constritor) - anestésico Local –*in loco*;
- Cloridrato de tramadol (i.m) - analgésico potente de ação central - 3mg/Kg do animal;
- Profenid 2mL (i.m.) – Anti-inflamatórios não esteróides - 3mg/Kg do animal;
- Pentabiótico (i.m.) - (1mL/3 Kg de animal) - frasco/ampola (1,7 g):

<i>Benzilpenicilina</i>	<i>benzatina</i>	600.000	UI
<i>Benzilpenicilina</i>	<i>procaína</i>	300.000	UI
<i>Benzilpenicilina</i>	<i>potássica</i>	300.000	UI
<i>Diidroestreptomicina</i>	<i>base (sulfato)</i>	250	mg
<i>Estreptomicina</i>	<i>base (sulfato)</i>	250	mg
<i>Ampola com diluente água destilada estéril</i>		3 mL	

Após a anestesia geral foi realizada tricotomia crânio-caudal na face medial proximal das tíbias do animal, seguida pela aplicação de gluconato de clorhexidina a 0,12% e iodopovidona para a antissepsia e degermação local da superfície cutânea. Com a superfície para realização do procedimento cirúrgico assim delimitada, uma porção tópica de lidocaína foi aplicada e se procedeu a abordagem cutânea e muscular de aproximadamente 3cm, em comprimento, na região medial da tíbia, próximo à epífise que se articula com o fêmur, expondo cirurgicamente o tecido ósseo.

Com uma trefina de $\varnothing=6,5\text{mm}$ (Dentoflex[®]), empregando um motor de baixa rotação (BLM 600 PLUS, DRILLER[®]), com aproximadamente 1.000rpm e refrigeração constante com solução fisiológica a 0,9%, foram realizadas duas perfurações ósseas na tíbia esquerda de cada coelho, onde as pastilhas de cada biomaterial foram depositadas no leito cirúrgico (FIG. 24). As incisões foram suturadas em camadas com fios de mononylon 5-0, 75cm com agulha 3/8 CR 3,0cm.

FIGURA 24 - Tíbia do coelho durante o procedimento cirúrgico logo após a inserção das pastilhas do biomaterial nas lojas cirúrgicas

No dia subsequente à cirurgia, os animais receberam uma dose de Pentabiótico intramuscular (i.m.) (1mL/3Kg) e 1 dose de Analgésico (Tramal[®]) (5mg/Kg) e foram mantidos nas gaiolas, com alimentação à base de ração seca e estéril e água como no pré-operatório. O experimento foi submetido e realizado de acordo com as normas da Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEUA-IPEN/SP), sob parecer Projeto nº 68/10 aprovado, conforme ANEXO I.

O tempo de seis semanas escolhido para realizar a eutanásia dos animais levou em consideração à correlação do tempo de cicatrização das espécies, no qual, de

acordo com Roberts et al. (1994), a velocidade de metabolismo no coelho é, em média, três vezes superior à da espécie humana. Após esse período os animais foram sedados e eutanasiados.

Após a dissecação das camadas mais superficiais a tíbia foi removida e seccionada com disco diamantado, proporcionando amostras com aproximadamente 2,5cm de comprimento (longo eixo). As amostras fixadas sofreram descalcificação conforme Anexo II.

Após a fixação dos fragmentos em formol 10%, os materiais foram desidratados em banhos sucessivos de etanol em concentrações crescentes (70-100%) e diafanizados em xilol. Após três banhos de 2h em parafina precedeu-se à inclusão em bloco no mesmo material (FIG. 25). Foram obtidos cortes na posição longitudinal com 5 µm de espessura, em micrótomo manual (Leica – RM 2145).

FIGURA 25 - Blocos de parafina contendo cortes transversais da região das lojas ósseas a e b da tíbia de um animal de cada grupo experimental: HAP-91, HAP-91/PCLE, HAP-8 e HAPN/PCLE.

Os cortes coletados em lâminas foram desparafinizados, tendo as lâminas passadas pela seqüência de imersões também descrita no Anexo II, foram corados pelo Tricrômico de Masson e visualizadas por microscopia de luz Convencional (campo claro). Realizou-se a análise morfológica quanto à integridade das pastilhas, da loja óssea cirúrgica, da cortical óssea, da presença de células do tecido ósseo e a neoformação óssea.

5 RESULTADOS

5.1. Caracterização dos materiais

Os materiais foram caracterizados por difração de raios X (DRX), pela distribuição de tamanho médio de partículas e por Microscopia Eletrônica de Varredura e de Transmissão.

5.1.1 Difração de raios X (DRX)

A análise do difratograma da amostra de HAP-91 (FIG. 26) revelou ser este material compatível com o padrão ICDD 74-0566, confirmando a presença da fase cristalina: Fosfato básico de cálcio (hidroxiapatita).

FIGURA 26 - Difratograma de raios X da Hidroxiapatita micrométrica (HAP-91). (*) $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$. Comparado com o padrão ICDD 74-0566.

A FIG. 27 apresenta o difratograma do compósito HAP-91/PCLE onde se observam os picos em 2θ igual a 20° e 23° , característicos do polímero PCLE, confirmando sua presença no compósito.

FIGURA 27 - Difratograma de raios X do compósito HAP-91/PCLE. (*) $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$. Comparado com o padrão ICDD 74-0566. Em 2θ igual a 20° e 23° são observados os picos característicos do PCLE.

A análise do difratograma da HAP-8 (FIG. 28) revelou ser compatível com o padrão ICDD 74-0566 e padrão ICDD 9-0169 confirmando a presença das fases cristalinas: Hidroxiapatita e Fosfato de cálcio (β -TCP).

FIGURA 28 - Difratograma de raios X da cerâmica nanométrica bifásica (HAP-8), com a presença de (*) $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, comparado com padrão ICDD 74-0566; e de (↓) β -TCP, comparado com o padrão ICDD 9-0169.

A análise do difratograma da HAPN/PCLE (FIG. 29) revelou ser compatível com o padrão ICDD 74-0566, confirmando a presença da fase cristalina: Hidroxiapatita. Podem ser observados os picos em 2θ igual a 20° e 23° característicos do PCLE.

FIGURA 29 - Difratograma de raios X do compósito HAPN/PCLE. (*) $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$. Comparado com o padrão ICDD 74-0566. Podem ser observados os picos em 2θ e 23° característicos do PCLE.

5.1.2 Distribuição de tamanho médio de partículas

A FIG. 30 apresenta o gráfico obtido com a curva média de distribuição em volume para a amostra da HAP-91 e uma imagem das partículas da hidroxiapatita, a FIG. 31 mostra uma imagem da partícula micrométrica em maior aumento.

FIGURA 30 - Gráfico da curva média de distribuição em volume para a amostra (HAP-91); no detalhe imagem obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura da Hidroxiapatita micrométrica.

FIGURA 31 – Micrografia obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura de partículas micrométricas da HAP-91.

A FIG. 32 apresenta o gráfico obtido com a curva média de distribuição em volume para a amostra da HAPN e uma imagem das partículas da hidroxiapatita aglomerada.

FIGURA 32 - Gráfico da distribuição granulométrica HAPN; no detalhe Hidroxiapatita nanométrica aglomerada obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura

A FIG. 33 apresenta micrografias (a e b), obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão, das partículas da cerâmica nanométrica.

a

b

FIGURA 33 – Micrografias da cerâmica nanométrica obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão. (a) partículas da HAP-8; (b) partícula da cerâmica bifásica nanométrica.

A FIG. 34 apresenta uma micrografia obtida por MEV da HAPN em que podem ser observadas partículas da hidroxiapatita aglomerada, confirmando os achados na análise da distribuição de tamanho médio de partículas (FIG. 30).

FIGURA 34- Micrografia por Microscopia Eletrônica de Varredura da Hidroxiapatita nanométrica onde são observadas partículas da hidroxiapatita aglomerada

A FIG. 35 apresenta uma micrografia obtida por MEV da HAPN onde se pode notar sinterização das partículas

FIGURA 35 – Micrografia por Microscopia Eletrônica de Varredura da Hidroxiapatita nanométrica apresentando partículas da HAPN sinterizadas

5.2 Caracterização Físico-Química do PCLE

O polímero PCLE foi caracterizado por cromatografia de permeação em gel (GPC), espectroscopia de massa MALDI-TOF, ressonância magnética nuclear de prótons (^1H -RMN) e carbono (^{13}C -RMN), calorimetria exploratória diferenciada (DSC), espectroscopia de infravermelho utilizando transformada de Fourier (FTIR).

5.2.1 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Levando-se em consideração a curva de calibração, foram obtidos para o PCLE os valores de peso molecular médio numérico (M_n) de 5.430 g/mol e peso molecular médio ponderal (M_w) de 8.280 g/mol, com índice de polidispersão ($IP = M_w/M_n$) igual a 1,53), observando-se uma faixa de distribuição unimodal (um pico de distribuição de pesos moleculares. A FIG. 36 ilustra a análise por GPC do polímero PCLE.

FIGURA 36- Análise da cromatografia de permeação em gel. Observa-se que o valor do peso molecular médio numérico do PCLE é da ordem de 10^3 g/mol, o que o caracteriza como um polímero de baixo peso molecular.

Como esses valores de massa molar, para as sínteses de PCLE, foram da ordem de 103 g/mol, o polímero é caracterizado como um polímero de baixo peso molecular, o que significa que o PCLE apresenta uma cinética de biodegradação maior que a do PCL.

5.2.2 Espectroscopia por MALDI-TOF

O espectro de massa MALDI-TOF do PCLE (FIG. 37) mostra picos de maior intensidade atribuída aos íons de sódio caracterizados por um aumento de massa de 114Da, que é igual à massa da unidade de repetição do PCL. O PCLE sintetizado contém picos que se estendem a partir de cerca de $m/z = 4,0-8,0$ kDa em boa concordância com as medições de GPC obtidas. Os pesos moleculares dos três braços do PCLE variaram de 5,430 (Mn) de 8280 (Mw) com Mw/Mn razão de 1,53.

FIGURA 37 – Espectro MALDI-TOF para o PCLE. Os picos de maior intensidade atribuída aos íons de sódio são caracterizados por um aumento de massa que é igual à massa da unidade de repetição do PCLE.

5.2.3 Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (^1H -RMN) e de Carbono (^{13}C -RMN)

A FIG. 38 apresenta o espectro da ressonância magnética nuclear de próton. Os sinais de ^1H -RMN e as atribuições dos hidrogênios da ligação do glicerol aos monômeros do PCLE.

FIGURA 38 - Espectro da ressonância magnética nuclear de próton do PCLE: o sinal *a* - tripleto referente à ligação da OH⁻ do grupo metileno do glicerol ao grupo éster do monômero ϵ -CL; *b* - duplo dubleto referente a ligação da OH⁻ dos grupos metilenos do glicerol ao grupo éster do monômero ϵ -CL, característica da estrutura com topologia estrela; *c*- tripleto referente aos H₂ dos grupos metilenos adjacentes ao O₂ do grupo éster; *e* - quarteto - H₂ dos grupos metilenos vizinho aos H₂ de 2 grupos metilenos; *d*- tripleto (H₂ do grupo metileno vizinhos aos H₂ de outro grupo metileno); o sinal dos H₂ *g* é de um grupo metileno vizinho aos H₂ de dois grupos metilenos sendo um quarteto.

A FIG. 39 apresenta o espectro da ressonância magnética nuclear de Carbono (¹³C-RMN) do PCLE e as atribuições dos carbonos da cadeia polimérica.

FIGURA 39 - Espectro da ressonância magnética nuclear de Carbono (¹³C-RMN) do PCLE e as atribuições dos carbonos da cadeia polimérica: sinal; picos *a* e *b*- carbonos do glicerol que fazem a ligação com o grupo éster do monômero; pico *c*- carbono do grupo metileno que se liga ao O₂ na cadeia do monômero; pico *d*- carbono do grupo metileno do monômero que está ligado ao O₂ do grupo éster; picos *e* e *f* - carbonos dos grupos metilenos da cadeia do monômero.

5.2.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A temperatura de fusão (T_m) igual a $57,3^\circ\text{C}$ foi determinada no primeiro ciclo de aquecimento (FIG. 40). A temperatura de transição vítrea (T_g) igual a $64,3^\circ\text{C}$ foi determinada somente no segundo aquecimento onde sua visualização foi mais clara (FIG. 41).

FIGURA 40 - A temperatura de fusão (T_m) de $57,3^\circ\text{C}$, determinada no primeiro ciclo de aquecimento

FIGURA 41- A temperatura de transição vítrea (T_g) de $-64,3^\circ\text{C}$, determinada no segundo aquecimento.

Os valores encontrados estão de acordo com dados da literatura (Wang e Dong, 2006) o que confere ao PCLE características de maleabilidade e controle de cristalinidade semelhantes a sua forma linear (PCL).

5.2.5 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho permitiu uma análise imediata da microestrutura do PCLE, podendo ainda ser observadas a pureza do produto obtido e a existência de reações secundárias.

Na FIG. 42 são destacados os sinais típicos de um poliéster. O intenso pico em 1720cm^{-1} corresponde ao sinal de deformação axial da carbonila ($\text{C}=\text{O}$) do grupo éster. O sinal observado em 3500cm^{-1} corresponde às vibrações de deformação axial dos grupos hidroxilas (OH) devido à polimerização com glicerol. Os sinais em 2945cm^{-1} e 2952cm^{-1} correspondem às deformações axiais assimétricas de $\text{C}-\text{H}$ e CH_2 . O sinal detectado em 2864cm^{-1} corresponde às deformações axiais simétricas de $\text{C}-\text{H}$ e CH_2 . O sinal em 1471cm^{-1} corresponde às deformações angulares simétricas no plano. Em 1245cm^{-1} observam-se as vibrações de deformação axial de $\text{C}-\text{O}$ do éster, que são, na verdade, duas vibrações assimétricas acopladas: $\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}$ e $\text{O}-\text{C}-\text{C}$.

FIGURA 42 - O espectro vibracional da amostra de PCLE. Observa-se o intenso pico em 1720cm^{-1} que corresponde ao sinal de deformação axial da carbonila ($\text{C}=\text{O}$) do grupo éster; em 3500cm^{-1} - vibrações de deformação axial dos grupos OH ; em 2945cm^{-1} e 2952cm^{-1} - deformações axiais assimétricas de $\text{C}-\text{H}$ e CH_2 ; em 2864cm^{-1} - deformações axiais simétricas de $\text{C}-\text{H}$ e CH_2 ; em 1471cm^{-1} - deformações angulares simétricas no plano; e em 1245cm^{-1} - duas vibrações assimétricas acopladas: $\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}$ e $\text{O}-\text{C}-\text{C}$.

O espectro do filme de PCLE na análise por FTIR obtido neste estudo permitiu observar a presença de grupos funcionais característicos do polímero PCLE.

5.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias que seguem possibilitaram o estudo da morfologia dos pós da hidroxiapatita micrométrica (HAP-91) FIG. 43 e FIG. 44, onde se observa um aspecto laminado das partículas da hidroxiapatita.

FIGURA 43- Micrografias obtida por MEV da Hidroxiapatita micrométrica (HAP-91).

FIGURA 44 - Micrografias obtida por MEV da Hidroxiapatita micrométrica (HAP-91).

Já o estudo por MEV dos compósitos demonstrou que houve uma alteração morfológica no contorno dos grãos da hidroxiapatita, que perderam o aspecto laminado, apresentando uma estrutura com aspecto de fundido. Atribui-se esta continuidade observada no contorno das partículas à presença do polímero envolvendo a cerâmica. As FIG. 45 e FIG. 46 apresentam as micrografias do compósito HAP-91/PCLE.

FIGURA 45- Micrografia obtida por MEV do compósito HAP-91/PCLE.

FIGURA 46 - Micrografias obtida por MEV do compósito HAP-91/PCLE.

Na análise por Espectroscopia de Energia Dispersiva de raio X (EDX) que foi realizado conjuntamente a Microscopia Eletrônica de Varredura, pode-se observar a distribuição dos elementos Ca, O, P e C presentes no compósito HAPN/PCLE, evidenciando a homogeneidade dos elementos Ca, P, C e O na distribuição do revestimento com o polímero na cerâmica (FIG. 47).

FIGURA 47 - Micrografia por Microscopia Eletrônica de Varredura e Eletromicrografia do compósito HAPN/PCLE mostrando a distribuição homogênea dos elementos Ca, P, C e O.

5.2.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As FIG. 48 e FIG. 49 apresentam micrografias por MET da amostra da HAPN/PCLE.

As partículas da Hidroxiapatita nanométrica (regiões mais escuras) aparecem sobrepostas e envoltas pelo polímero PCLE (regiões mais claras), evidenciando o revestimento do compósito. Estas imagens também corroboram os achados do estudo da distribuição de tamanho médio de partículas e de MEV para a HAPN, que demonstram uma leitura das partículas aglomeradas.

Observa-se também que, com o revestimento, as partículas passam a apresentar uma área de superfície maior.

FIGURA 48 – Micrografia por Microscopia Eletrônica de Transmissão do compósito HAPN/PCLE; partículas de HAP revestidas com PCLE.

FIGURA 49 – Micrografia por Microscopia Eletrônica de Transmissão do compósito HAPN/PCLE; partículas de HAP revestidas com PCLE.

Na FIG. 50 pode-se observar no compósito HAPN/PCLE o revestimento envolvendo uma partícula de hidroxiapatita nanométrica bem como a imagem de partículas esféricas sobrepostas, com diâmetro em torno de 20nm.

FIGURA 50- Micrografias por MET do compósito HAPN/PCLE onde se observa o PCLE envolvendo as partículas de hidroxiapatita nanométrica esféricas sobrepostas, com diâmetro em torno de 20nm.

A FIG. 51 apresenta uma micrografia por MET da HAPN/PCLE. Na interface orgânica/inorgânica entre uma partícula de HAPN revestida com PCLE observa-se que o revestimento não altera a estrutura ordenada das partículas da HAPN.

FIGURA 51- Micrografia por MET da HAPN/PCLE evidencia a interface orgânica/inorgânica (setas) do compósito, onde se observa que o revestimento com PCLE não altera a estrutura ordenada das partículas da HAPN.

5.2.8 Potencial Zeta

Para as partículas dos compósitos de HAPN/PCLE e HAP-91/PCLE o PZ encontrado foi de $-28,1 \pm 3,2$ mV e $-48,0 \pm 4,7$ mV, respectivamente. Já para as partículas não revestidas, HAP-8 e HAP-91, os PZ encontrados foram de $-11,7 \pm 2,7$ mV e $-35,6 \pm 5,3$ mV, respectivamente, conforme FIG. 52.

FIGURA 52 – Potencial zeta das partículas

Para atribuição de duas fases da cerâmica HAP-8, o potencial zeta atingiu um valor de -25 mV, enquanto que para os pós de HAP e β -TCP os valores são de -20 mV e -5 mV, respectivamente, estando de acordo com a dados da literatura.

Segundo a Tabela 6 (pag. 56), o potencial zeta apresenta um comportamento de estabilidade do colóide independentemente de sua carga (positiva ou negativa), desta forma, considerando os valores absolutos, os resultados obtidos demonstram a estabilidade da HAP-91/PCLE > HAP-91 > HAPN/PCLE > HAP-8.

Observou-se também que o tamanho da partícula influencia o valor do potencial zeta, sendo que para os materiais nanoparticulados um valor absoluto encontrado foi menor quando comparado aos materiais microparticulados.

5.2.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para as pastilhas

As FIG. 53, FIG. 54, FIG. 55 e FIG. 56 apresentam as micrografias de cada biomaterial, respectivamente HAP-8, HAPN/PCLE, HAP-91 e HAP-91/PCLE.

Pode-se observar que nas pastilhas dos compósitos a presença do PCLE confere um aspecto de continuidade entre as partículas, já nas pastilhas confeccionadas apenas com as cerâmicas, em ambas as granulações, observou-se uma definição mais nítida da partícula.

FIGURA 53 - Micrografia por microscopia eletrônica de varredura da pastilha de HAP-8.

FIGURA 54 – Micrografia por microscopia eletrônica de varredura da pastilha de HAPN/PCLE.

FIGURA 55 – Micrografia por microscopia eletrônica de varredura da pastilha de HAP- 91.

FIGURA 56 – Micrografia por microscopia eletrônica de varredura da pastilha de HAP- 91/PCLE.

Após a realização da síntese e caracterização dos materiais foi realizada avaliação biológica *in vitro* e *in vivo*. Foram realizados o estudo de citotoxicidade, da adsorção de proteínas de aderência/proliferação celular, da atividade da fosfatase alcalina que contribuem para elucidar os mecanismos envolvidos na biocompatibilidade do nanocompósito HAPN/PCLE, finalizando com um estudo *in vivo* para avaliar o crescimento ósseo após enxertia do material em tíbias de coelho.

5.3. Avaliação Biológica *in vitro*

5.3.1 Estudo da Citotoxicidade

A FIG. 57 apresenta curva de interpolação para citotoxicidade ($IC_{50\%}$) estimada pela concentração do extrato do biomaterial resultando em 80% da inibição de 50% da incorporação do MTS, correlacionando o percentual médio de células viáveis em relação à concentração dos extratos.

Os dados foram normalizados pela média dos controles de todos os experimentos. As barras de erro representam o desvio padrão da média (N=3).

FIGURA 57 – Avaliação da citotoxicidade dos materiais *in vitro* conforme a legenda: (■)HAP-91, (▲)HAP- 91/PCLE, (●)HAP-8 e (○)HAPN/PCLE.

Os resultados obtidos indicam que nenhum dos materiais apresentou resíduos tóxicos sendo, portanto, biocompatíveis *in vitro*.

5.3.2 Estudo da Adsorção Proteica por Técnica Radioisotópica

A quantidade de proteína adsorvida total (Γ_{max}), reversível (Γ_1) e irreversível (Γ_2), para cada solução de concentração C foi calculada e ajustada ao Langmuir de acordo com a Equação [3] (pag. 59), e os coeficientes de correlação são $R_2 = 0,992$ para HFB e $R_2 = 0,999$ para HSA, e indicam a adsorção de proteínas na monocamada da HAP-8, HAP-91, HAPN/PCLE, HAP-91/PCLE.

As curvas isotérmicas resultantes da adsorção do fibrinogênio (HFB) estão representadas na FIG. 58 para HAP-8, HAPN/PCLE, e FIG. 59 para HAP-91 e HAP-91/PCLE.

Figura 58 – Curvas isotérmicas de adsorção para superfícies de HFB para HAP-8 em (A) e HAPN/PCLE (B) , onde Γ = adsorção total; Γ_1 = adsorção reversível e Γ_2 = adsorção irreversível

Figura 59 - Curvas isotérmicas de adsorção para HFB sobre as superfícies HAP-91 (A) e HAP-91/PCLE (B). onde Γ = adsorção total; Γ_1 = adsorção reversível e Γ_2 = adsorção irreversível

A FIG. 60 apresenta as curvas isotérmicas resultantes da adsorção da albumina (HSA) para HAP-8, HAPN/PCLE e a FIG. 61 as curvas isotérmicas resultantes da adsorção da albumina (HSA) para HAP-91 e HAP-91/PCLE.

Figura 60- Curvas isotérmicas de adsorção para HSA das superfícies em HAP-8 (A) e HAPN/PCLE (B). Γ , Γ_1 e Γ_2 são a quantidade de adsorção total, quantidade de adsorção reversível e quantidade de adsorção irreversível, respectivamente.

Figura 61 - Curvas isotérmicas de adsorção para HSA sobre as superfícies HAP-91 (A) e HAP-91/PCLE (B). Γ , Γ_1 e Γ_2 são a quantidade de adsorção total, quantidade de adsorção reversível e quantidade de adsorção irreversível, respectivamente.

Observa-se que no intervalo de concentração mais baixa, as alterações no volume do material produz grandes mudanças na quantidade de proteína adsorvida, o que resulta em um aumento praticamente linear na adsorção. No entanto, quando a concentração de massa é aumentada, a adsorção é reduzida a um patamar ou então, um nível de adsorção máxima é atingida. Este tipo de comportamento de adsorção é referido como sendo uma isotérmica de Langmuir (Young et al., 1988).

A correspondente capacidade de adsorção de monocamada $\Gamma_{\max}$ e as constantes de associação valores de k de cada isoterma são resumidos nas TAB. 8 para o fibrinogênio, e TAB. 9 para a albumina.

TABELA 8 - Capacidade de adsorção da monocamada, a $\Gamma_{\max}$ e a associação constante k obtidas pelo ajuste das isotermas na equação [4] (pag. 59) para a equação de Langmuir ($R_2 = 0,999$ para HFB)

	Equação Isotérmica	$\Gamma_{\max}$ (mg/g)	k (mL/mg)
HFB para HAP-8	$C/\Gamma = 8.51C + 62.10$	$1.2 \cdot 10^{-4}$	134.19
HFB para HAPN/PCLE	$C/\Gamma = 17.02C + 124.20$	$0.59 \cdot 10^{-4}$	136.46
HFB para HAP-91	$C/\Gamma = 0.1637C + 14.60$	$61 \cdot 10^{-4}$	11.23
HFB para HAP-91/PCLE	$C/\Gamma = 166.76C + 1217.20$	$60 \cdot 10^{-4}$	0.14

TABELA 9 - Capacidade de adsorção da monocamada, a $\Gamma_{\max}$ e a associação constante k obtidas pelo ajuste das isotermas na equação [4] (pag. 59) para a equação de Langmuir ($R_2 = 0,993$ para HSA)

	Equação Isotérmica	$\Gamma_{\max}$ (mg/g)	k (mL/mg)
HSA para HAP-8	$C/\Gamma = 0.022C + 0.014$	45.46	1.57
HSA para HAPN/PCLE	$C/\Gamma = 0.131C + 0.081$	7.63	1.62
HSA para HAP-91	$C/\Gamma = 0.089C + 0.0547$	11.24	1.63
HSA para HAP-91/PCLE	$C/\Gamma = 0.794C + 0.488$	1.26	1.63

Na análise estatística, os dados foram apresentados como média + S.E.M., $n = 3$. Todos os dados foram submetidos a análise estatística utilizando o teste t de Student ou unidirecional ou bidirecional análise de variância (ANOVA). A significância foi estabelecida em $p < 0,05$.

5.3.3 Estudo da Aderência/Proliferação Celular

A literatura tem relatado que a fixação das células e a adesão ao suporte de cultura ocorrem em um curto espaço de tempo, cerca de minutos (Gwynn, 1994; Anselme, 2000) sendo este evento celular também muito afetado pelas características da superfície do material (Anselme, 2000). Estudos utilizando células MG-63 (linhagem de células derivada de um osteossarcoma, que produzem rendimentos elevados de interferon após superindução com ácido polynosinic polycytidylic, cicloheximida, e actinomicina D) oferecem dados importantes sobre os mecanismos do processo de crescimento ósseo. Por este motivo foi realizado o estudo sobre a aderência celular e proliferação do MG-63.

A aderência celular e proliferação da MG-63 são apresentadas na FIG. 62 que mostra a proliferação de células MG-63 após 1 e 4 dias de cultura sobre as superfícies de HAP-8, HAP-91, HAPN/PCLE e HAP-91/PCLE em comparação com células em disco de cultura (controle positivo).

Figura 62 - Níveis de proliferação celular do MG-63. (A)- o grupo controle positivo; (B)- HAPN/PCLE; (C)- HAP-91/PCLE; (D) HAP-8 e (E) HAP-91 após cultura durante 7 dias

Para o grupo controle e todos os grupos experimentais, os resultados demonstraram um aumento na proliferação celular em função do tempo de cultura. Após o primeiro dia de cultura, a proliferação de células MG-63 nas superfícies da HAPN/PCLE apresentaram uma pequena diferença quando comparado com HAP-91/PCLE. Após o quarto dia de cultura a proliferação de células MG-63 apareceu significativamente superior para HAPN/PCLE quando comparada com o grupo HAP-91/PCLE.

Assim, o comportamento nas superfícies das células de HAP-8 ou HAP-91 foi afetado após o revestimento com PCLE em comparação com as superfícies não revestidas. É bem sabido que a capacidade de umedecimento (hidrofobicidade / hidrofobicidade) de superfícies de biomateriais é considerado como um dos fatores críticos que determina a proliferação e adesão celular (WEI et al. ,2007). Para avaliar a hidrofiliicidade das superfícies das HAPN/PCLE e HAP-91/PCLE o ângulo de contacto de água dos compostos foi determinado utilizando a medição do ângulo de contato estático.

Na FIG. 63 pode-se observar que a HAP-8 e a HAP-91 demonstram uma profunda hidrofiliicidade, exibindo ângulos de contato do estado de $\theta = 12,8^\circ$ e $17,6^\circ$, respectivamente. O revestimento com PCLE nas superfícies das Hidroxiapatitas alterou os ângulos de contato para $76,8^\circ$ e $63,5^\circ$, respectivamente, conduzindo a uma modulação de molhabilidade das biocerâmicas. O valor do ângulo de contacto da água para os discos de cultura de células (CCD) foi estabelecido em $75,6^\circ$, sendo o mais próximo encontrado o da HAPN/PCLE.

Figura 63 – Superfície do ângulo de contato da HAP-8; HAP-91; HAPN/PCLE; HAP-91/PCLE e CCD.

5.3.4 Estudo da Atividade de Fosfatase Alcalina

A funcionalidade das células foi avaliada pela atividade de fosfatase alcalina juntamente com a proliferação celular, utilizando a enzima ALP, um marcador de diferenciação de osteoblastos, que existe nas membranas intracelulares e cuja atividade catalítica aumenta a secreção de outras proteínas da matriz extracelular numa fase relativamente precoce (Rickard et al., 1993).

Para investigar o efeito do revestimento do PCLE nas superfícies das HAPs no comportamento de diferenciação celular, a atividade de ALP foi medida por cultura de células MG-63 sobre o HAPN/PCLE e HAP-91/PCLE, HAP-91 e HAP-8 e os grupos em comparação com célula de cultura (controle positivo).

Observou-se um aumento na atividade de ALP no controle e em todos os grupos experimentais. Após o 7^o dia, exibiu um nível significativamente maior para as superfícies das HAPN/PCLE e HAP-91/PCLE em relação às cerâmicas puras. Com base nestes resultados, confirmou-se que o revestimento com PCLE melhorou significativamente a adesão e crescimento de células osteoblásticas MG-63, na superfície das hidroxiapatitas.

A FIG. 64 ilustra uma imagem de microscópio de epifluorescência de HAP-8, HAP-91, HAPN/PCLE e HAP-91/PCLE onde células MG-63 cultivadas durante 1 dia foram coradas com laranja de acridina e brometo de etídio.

Figura 64 - Coloração por imunofluorescência de células MG-63, em três dias. (A) culturas sobre uma lâmina de vidro; (B) HAPN/PCLE; (C) HAP-91/PCLE; (D) HAP-8 e (E) HAP-91; células coradas por alaranjado de acridina e brometo de etídio.

Na análise da morfologia das células não foram detectadas alterações apoptóticas típicas, sendo observado um bom nível de aderência entre as células e os compósitos - HAPN/PCLE e HAP-91/PCLE, resultados que confirmam sua biocompatibilidade.

Após os estudos das propriedades biológicas *in vitro*, o estudo realizou um trabalho envolvendo a enxertia de pastilhas dos biomateriais para avaliação *in vivo* da resposta das células do tecido ósseo frente aos mesmos.

5.4 Avaliação Biológica *in vivo* - Análise Histológica

Para a análise histológica as lâminas foram coradas pelo método de coloração Tricrômico de Masson (TM).

As FIG. 65 e FIG. 66 mostram lâminas histológicas coradas por (TM) para os grupos HAP-8 e HAPN/PCLE, respectivamente, onde são observados a medula óssea, o osso neoformado e o implante na loja cirúrgica.

FIGURA 65– Imagem da lâmina histológica do grupo HAP-8. Observa-se (1) a medula óssea; (2) implante na loja cirúrgica, nota-se a pastilha sofreu uma deformação e há presença de trabéculas ósseas no seu interior, provavelmente devido a fase β -TCP; (3) osso neoformado sobre o implante.

FIGURA 66 – Imagem da uma lâmina histológica do grupo HAPN/PCLE. (1) medula óssea; (2) implante na loja cirúrgica; (3) crescimento ósseo sobre a região do implante.

As FIG. 67 e FIG. 68 mostram lâminas dos grupos HAP-91 e HAP-91/PCLE, respectivamente, onde se pode observar a presença da medula óssea, o osso neoformado e o implante na loja cirúrgica.

FIGURA 67 – Imagem da lâmina histológica do grupo HAP-91. (1) medula óssea; (2) implante na loja cirúrgica com integridade da pastilha; (3) osso neoformado sobre a região do implante.

FIGURA 68 – Imagens das lâminas histológicas do grupo HAP-91/PCLE. (1) medula óssea; (2) implante na loja cirúrgica; (3) osso neoformado sobre a região do implante.

Em todas as amostras analisadas, de todos os grupos experimentais, foi observado crescimento ósseo sobre os implantes.

Estudos posteriores devem avaliar a quantidade e qualidade da neoformação óssea utilizando marcadores ósseos e tempos de eutanásia seriados, proporcionando uma avaliação biológica mais ampla.

6 DISCUSSÃO

A síntese de um novo biomaterial que venha trazer benefícios colaborando com o restabelecimento de função e estética na reabilitação do tecido ósseo foi o incentivo para este trabalho.

A capacidade de remodelação óssea se deve às características específicas deste tecido que, devido a sua vascularização, apresenta metabolismo ativo e dinâmico, mantendo uma interação constante entre suas células: osteoblastos (síntese), osteócitos (manutenção) e os osteoclastos (reabsorção) e a matriz óssea (Watkins, 2001; Junqueira; Carneiro, 2004; Órefice et al., 2006).

Os biomateriais destinados à aplicação na medicina regenerativa na reparação do tecido ósseo devem apresentar propriedades morfológicas e físico-químicas que propiciem um grau de biocompatibilidade e biofuncionalidade com a osteointegração. Sua concepção e síntese baseiam-se na biomimética do tecido biológico (Heuer, 1992; Mann et al., 1993; Niemeyer, 2001; Hiles; Levitsky, 2005; Ott et al., 2008; Yoshimoto et al., 2009).

Esse biomaterial deve respeitar e interagir com os mecanismos de remodelação óssea, proporcionando o restabelecimento desejado. O emprego de materiais à base de polímeros biodegradáveis como arcabouço sintético advém da predisposição de sua substituição por uma rede nutridora devido à formação de inúmeros condutos, que serão colonizados por células osteoprogenitoras induzindo crescimento ósseo na região enxertada (Almeida, 2003).

A cerâmica Hidroxiapatita (HAP) foi eleita devido a sua similaridade química com a matriz orgânica do tecido ósseo, onde a ligação que se faz é de natureza química, permitindo a proliferação de células ósseas que não distinguem a superfície da hidroxiapatita da superfície óssea (Roy; Linnehan, 1974; Hench,

1991; Anselme et al., 1999; Hutmacher, 2000; Kawashi et al., 2000; Bens-Nissan; Pezzotti, 2002; Santos, 2002). Quando empregada como material para enxerto ósseo não promove resposta inflamatória ou de corpo estranho ao tecido receptor devido as suas propriedades de biocompatibilidade e atoxicidade local e sistêmica (Barney et al., 1986; Greenwald et al., 2001; Almeida, 2003).

Tanto a HAP quanto o β -TCP, dentre os fosfatos de cálcio, são os materiais que tem despertado maior interesse de estudo para a engenharia de tecidos devido as suas características de biocompatibilidade e interação com o tecido ósseo (Elliot, 1994; Hench; Wilson, 1993; Legeros, 2002; Gouveia, 2008).

A HAP sintética é classificada como material osteocondutor segundo a definição de Marzola e Pastori (2006), por ser uma matriz física que serve de arcabouço para a neoformação óssea, favorecendo a remodelação ao mesmo tempo em que apresenta uma resistência à absorção pelo organismo (Constantino; Freidman, 1994; Misch, 2000; Kobayashi et al., 2001; Nakamura et al., 2002; Cachinho, 2006; Kumar et al., 2010).

As hidroxiapatitas comerciais apresentam tamanho de partícula micrométrica e pequena área de superfície, com uma forte ligação entre os cristais, o que faz com que seu processo de reabsorção seja diferente da reabsorção da porção mineral do tecido ósseo, que possui cristais com dimensões na ordem de nanômetros, uma fraca ligação entre si e que são cultivados numa matriz orgânica com uma grande área de superfície, tendo ainda uma maior bioatividade em comparação aos cristais de HAP (Kim et al., 1995; Kim et al., 1996; Kim et al., 2000). A HAP micrométrica (comercial) estudada apresenta, segundo o fabricante, uma dimensão de partícula média em torno de 10 μ m, dado confirmado pelo estudo da distribuição do tamanho das partículas.

Já a produção de biomateriais com uma estrutura molecular altamente organizada em nível nanométrico proporciona seu emprego numa vasta gama de possibilidades funcionais (Stupp; Braun, 1997; Hench; Polak, 2002; Tan; Saltzman, 2004), estando em acordo com objetivo deste estudo.

Na síntese das cerâmicas nanométricas foram obtidas partículas com diâmetros em torno de 80-100nm, que após o revestimento com o polímero passaram a apresentar diâmetros em torno de 200-300nm. Os resultados obtidos

e apresentados nos ensaios de distribuição de tamanho de partículas foram analisados juntamente com as Microscopias Eletrônicas de Varredura e de Transmissão, e se encontram em acordo com Gouveia (2008). O estudo da variação no tamanho das partículas tem seu fundamento uma vez que influencia no o comportamento dos materiais durante o processamento e nas propriedades finais dos produtos gerados (Heuschen, 1981).

Para a síntese das cerâmicas empregou-se o método de neutralização, considerado adequado para a obtenção da HAP nanométrica estequiométrica (Gouveia. 2008). Conforme os difratogramas obtidos, observou-se que, a primeira síntese da HAP apresentou apenas a fase $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, e este foi o material revestido com o PCLE originando o compósito (HAPN/PCLE), cujo difratograma apresentou os picos em 2θ igual a 20° e 23° característicos da presença do PCLE. Na segunda síntese da cerâmica foi observada a formação da fase β -TCP, provavelmente em função de uma variação no gotejamento durante o tratamento térmico, formando uma mistura bifásica HAP e β -TCP (HAP-8) conforme reação no processamento (Legeros, 1991; Mostafa, 2005; Kannan et al., 2005; Kumta et al., 2005; Gouveia, 2008), optou-se pela manutenção deste grupo com a intenção de fornecer dados adicionais ao trabalho uma vez que a cinética de degradação do β -TCP é diferente da HAP. O difratograma da hidroxiapatita micrométrica (HAP-91) confirmou a presença de uma fase cristalina única, a hidroxiapatita. E o difratograma de seu compósito evidenciou a presença do PCLE representado pelos picos em 2θ igual a 20° e 23° .

Para compor o compósito, optou-se por um poliéster alifático, pois atualmente, este tem sido o material de eleição para estruturas porosas e matrizes tridimensionais como suporte de tecidos (Nair; Laurencin, 2007) por alcançar propriedades semelhantes às da matriz extracelular (MA, 2008) e por suportar o crescimento de células e neoformação tecidual, demonstrando diminuir o risco de infecção e o tempo do pós-operatório (Rezwan et al., 2006). Além das características essenciais de biocompatibilidade, apresenta propriedades como a capacidade de suportar e transferir cargas, estabilidade quando implantados no organismo, cinética de superfície controlada, indutividade e condutividade no processo de cicatrização (Silva, 2011).

Dentre eles, a escolha do poli(ϵ -caprolactona) (PCL), por se um material hidrofóbico, biodegradável, já ser aprovado pela FDA, apresentar alta flexibilidade e cristalinidade, módulo de elasticidade semelhante ao osso, ter uma baixa temperatura de transição vítrea e habilidade para a mobilidade molecular, o que o torna um bom plastificante e ser largamente empregado na área médica devido às suas excelentes características de biocompatibilidade (Darney et al., 1989; Bezwada et al., 1995; Albertsson; Varma, 2003; Khor et al., 2003; Almeida, 2003). Além destas características pode ser sintetizado em uma topologia diferente da linear, como por exemplo, em topologia estrela o que permite o controle de algumas de suas propriedades.

Neste trabalho a síntese do PCL foi realizada por polimerização de abertura de anel lactônico pela sua simplicidade, baixo custo e por ser este o principal método industrial de síntese deste poliéster (De Queiroz et al., 2002; Yanjun et al., 2004; Wang e Dong, 2006).

Importante ressaltar também que, segundo Rhee et al. (2002) e Rhee (2004) a taxa de biodegradação do PCL varia consideravelmente conforme as condições de sua síntese. Esta biodegradação, que ocorre por hidrólise da ligação éster, forma produtos de decomposição intermediária normais do metabolismo celular, que são facilmente eliminados pelo organismo.

A estimativa de biodegradabilidade do PCL em sua estrutura linear no organismo é de 12 a 18 meses (Kim et al., 2004; Funabashi et al., 2009) e segundo Coombes et al. (2004) e Rezwan et al. (2006) a degradação do PCL de alto peso molecular ($M_n=50.000$) leva três anos até sua completa eliminação, portanto considerada muito lenta, o que limita suas aplicações quando comparado a outros poliésteres alifáticos (Kweon et al., 2003).

Mas, segundo Gunatillake e Adhikari (2003) e Rezwan et al. (2006) a produção dos polímeros sintéticos sob condições controladas, na dependência de modificações químicas, pode ter as propriedades mecânicas e a cinética de degradação alteradas conforme a aplicação desejada.

Wang e Dong (2006) propõem, entre outras formas, o controle da arquitetura macromolecular da cadeia polimérica com o objetivo de diminuir este tempo de biodegradação. Realizou-se então a ramificação do PCL, com a

finalidade de se obter uma estrutura polimérica com topologia estrela, via polimerização por abertura do anel lactônico do monômero ϵ -caprolactona (ϵ -CL), estando em acordo com Dong et al. (2001), que também demonstraram a síntese do dendrímero PCLE por esta via.

Os polímeros com topologia estrela diferem de seus análogos lineares de mesmo peso molecular médio numérico (M_n) na sua estrutura, sendo mais compactos, com menor volume hidrodinâmico e raio de rotação e, conseqüentemente, menor viscosidade. Essa arquitetura bem definida influencia as propriedades físico-químicas do material (YanJun et al., 2004; Lapienis, 2009).

O PCLE mercapto de três braços apresenta três grupos OH terminais nas extremidades, onde ocorre a tosilação. Foram obtidos rendimentos de 65% do monotosilato e de 15% do ditosilato (intermediários), estando em acordo com os outros métodos relatados na literatura para a síntese de polímeros dendríticos mercapto (Lele; Leroux, 2002; Calderon, 2009).

A escolha do $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ como catalisador, em acordo com Ryner et al. (2001), para a síntese dos polímeros com finalidade de aplicações biomédicas, além de ser aceito pela FDA para fins alimentícios e médicos, apresenta solubilidade em solventes orgânicos e monômeros de ésteres cíclicos, auxiliando na reação de síntese do poliéster. Segundo Albertsson e Varma (2003) e Coulembier et al. (2006) seu emprego também promove o controle da microestrutura do polímero, o que afeta diretamente as propriedades mecânicas e de biodegradabilidade.

O estudo por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) permitiu uma análise imediata da microestrutura do PCLE constatando a presença de seus grupos funcionais. Assim como nos estudos por ressonância magnética nuclear de prótons e de carbono os resultados evidenciaram os sinais das atribuições dos hidrogênios da ligação do glicerol aos monômeros do PCL, com a presença de um tripleto e um duplo dubleto, confirmando assim a efetiva obtenção da estrutura com topologia estrela do polímero, o PCLE mercapto de três braços.

O comportamento do polímero durante o processamento é altamente dependente do tamanho médio e da distribuição de comprimentos de suas

cadeias. Embora a estrutura química do polímero seja igual, pesos moleculares diferentes podem mudar completamente suas propriedades mecânicas, térmicas, reológicas (viscosidade, plasticidade, elasticidade), e por esta razão, os polímeros são caracterizados principalmente por seu peso molecular. Nos casos de polímeros com topologia estrela a ramificação aumenta a densidade do novelo polimérico, fazendo com que o volume ocupado pelo polímero seja menor do que o de um polímero linear de mesmo tamanho e, conseqüentemente, sua viscosidade intrínseca seja menor (Lucas et al., 2001).

Devido ao menor volume do PCLE em relação ao polímero linear (PCL) a interação com o tecido ósseo ocorre numa área superficial maior, propiciando a formação de um arcabouço com um número maior de poros, e conseqüentemente com propriedades mecânicas adequadas para aplicações a áreas sujeitas a carga, estando em acordo com Hench e Wilson (1993).

Segundo Silva (2009), na síntese de PCLE, usando como catalisador o $\text{Sn}(\text{Oct})_2$, obtem-se polímeros com diferentes pesos moleculares devido à variação da razão molar entre o monômero ϵ -CL e o iniciador. A análise por DSC do PCLE demonstrou que o aumento do seu peso molecular provoca um aumento no seu ponto de fusão, fazendo com que o rearranjo de cristalização do PCLE seja interrompido pela arquitetura altamente ramificada das cadeias laterais deste polímero.

O peso molecular do PCLE, neste estudo, foi determinado por cromatografia de permeação em gel (GPC) e de acordo com os valores de peso molecular médio numérico (M_n) e o peso molecular médio ponderal (M_w), observou-se uma faixa de distribuição unimodal. O índice de polidispersão ($\text{IP} = M_w/M_n$) refere-se a proporção entre os braços do polímero estrelado. Neste estudo foi obtido um IP igual a 1,53, considerado satisfatório.

Como na distribuição de pesos moleculares determinada pela GPC notou-se não haver valores absolutos (porque os volumes hidrodinâmicos dos polímeros em estrela diferem das dos padrões lineares utilizados para a calibração), razão pela qual também foi realizada a caracterização por espectroscopia MALDI-TOF, cujos espectros de massa mostraram picos de maior intensidade atribuída aos íons de sódio caracterizados por um aumento de massa

que é igual à massa da unidade de repetição do poli(ϵ -caprolactona). Concluiu-se que os valores obtidos de peso molecular médio numérico (M_n), para a síntese do PCLE, o caracterizam como um polímero de baixo peso molecular.

Polímeros de baixo peso molecular são particularmente atraentes para a indústria farmacêutica uma vez que podem ser utilizados no projeto de sistemas transportadores de fármacos. No caso de polímeros hidrofóbicos, a exemplo do PCLE, o baixo peso molecular deverá propiciar uma maior cinética de biodegradação relativamente ao PCL linear, de peso molecular mais elevado.

Em função da sua alta cristalinidade e hidrofobicidade (De Queiroz et al., 2002; Kweon et al., 2003), o PCL apresenta caráter semi-cristalino com temperatura de transição vítrea (T_g) entre -60°C e -72°C , e baixa temperatura de fusão (T_m) ($58-60^\circ\text{C}$), o que facilita seu processamento, sendo maleável à temperatura ambiente e corporal. Suas propriedades mecânicas e a degradação enzimática podem ser alteradas pelo controle da sua cristalinidade (Elzein et al., 2005; Sarasam e Madihally, 2005; Rezwan et al., 2006; Sabino, 2007; Ma, 2008).

As propriedades térmicas do PCLE foram investigadas utilizando-se a calorimetria exploratória diferencial (DSC) para determinar as temperaturas de transição vítrea e de fusão. A temperatura de fusão (T_m) encontrada foi de $57,3^\circ\text{C}$ e a temperatura de transição vítrea (T_g) encontrada foi de $-64,3^\circ\text{C}$ estando de acordo com os dados encontrados na literatura, como nos estudos de Wang e Dong (2006). Desta forma, a regularidade molecular confere as mesmas características de maleabilidade e controle de cristalinidade encontrados para o PCL que apresenta natureza semicristalina, hidrofobicidade, alta permeabilidade, baixa solubilidade, baixo ponto de fusão, estabilidade ao calor e atoxicidade (De Queiroz et al., 2002).

Frente aos resultados de caracterização realizados pode-se afirmar que a síntese do polímero poli(ϵ -caprolactona) de topologia estrela mercapto com três braços foi efetiva. O PCLE obtido mantém as propriedades térmicas do PCL linear, conferindo-lhe uma maleabilidade a temperatura ambiente e fisiológica, alta permeabilidade e facilidade de processamento.

A confecção de compósitos à base de nanohidroxiapatita e de polímeros bioativos visa melhorar as propriedades mecânicas, bioatividade,

biodegradabilidade e propriedades de biocompatibilidade (Hong et al., 2005; Boissard et al., 2009; Dong et al., 2009; Thein-Han et al., 2009; Jack et al., 2009; Jayabalan et al., 2010).

A mistura física do PCL com a hidroxiapatita apresenta uma proximidade com as propriedades mecânicas do tecido ósseo, favorecendo a adesividade, o aumento da estabilidade mecânica do suporte e uma melhor interação com o tecido (Ignjatovic, 1999; Rezwan et al., 2006; Habraken et al., 2007). Esta mistura também favorece a obtenção de materiais com elevada estabilidade interfacial e desempenho mecânico (Hong et al., 2005; Lee et al., 2006; Lee et al., 2007) além de aliar propriedades de osteocondutividade e bioatividade (Taizo et al., 2000; Shikinami e Okuno, 2001; Deng et al., 2001; Kim et al., 2004), constituindo um arcabouço para enxertos aloplásticos, propiciando a manutenção das propriedades biológicas e mecânicas até que o processo de restauração biológica se complete (Oyane et al., 2005; Shor et al., 2007).

Técnicas de modificação química da superfície de biocerâmicas visam aumentar a adesão interfacial entre as fases poliméricas e a biocerâmicas, obtendo-se fases híbridas mais estáveis e de elevado desempenho para aplicações biológicas (Liu; Van Blitterswijk, 1998; Borum-Nicholas; Wilson Junior, 2003).

Tendo em mãos a hidroxiapatita micrométrica e após a síntese das hidroxiapatitas nanométricas e do polímero PCLE foi realizada a síntese do material objeto deste estudo – uma Hidroxiapatita nanométrica revestida com polímero poli(ϵ -caprolactona) - HAPN/PCLE.

A análise por Espectroscopia de Energia Dispersa de Rx (EDX) evidenciou a homogeneidade do revestimento, sendo possível observar a clara distribuição dos elementos Ca, O, P e C.

As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para a hidroxiapatita micrométrica demonstraram uma definição nos limites das partículas do biomaterial puro, porém um aspecto de estrutura fundida (de continuidade no contorno) das partículas na análise do compósito HAP-91/PCLE, devido à presença do PCLE, evidenciando uma alteração morfológica. Constatou-

se também que o revestimento com PCLE proporcionou uma melhor trabalhabilidade dos compósitos na confecção das pastilhas, diminuindo o aspecto quebradiço apresentado pelas cerâmicas puras.

Quanto à avaliação das propriedades biológicas, nenhum dos materiais analisados, cerâmicas e compósitos, apresentou resíduos tóxicos no estudo de citotoxicidade *in vitro*, estando em acordo com os estudos de Silva (2011). Relevante é o fato de que para HAPN/PCLE observou-se uma diminuição da citotoxicidade em relação à HAP-8, provavelmente devido ao aumento da área superficial da partícula nanométrica ocasionada pelo revestimento com o PLCE, o que reduziria seu potencial de alteração celular, que ocorre quando as nanopartículas atravessam a membrana da célula, ocasionando alterações de transcrição no DNA ou a inviabilizando (Yildirimer et al., 2011). Observou-se também que todos os materiais propiciaram uma proliferação e adesão celular em relação às células osteoblásticas MG-63, sendo que para a HAPN/PCLE e a HAP-91/PCLE a atividade de ALP exibiu um nível significativamente maior apresentando assim boas propriedades quanto à biocompatibilidade.

Já a adsorção seletiva de proteínas plasmáticas pelo material da superfície de um implante ou material de enxerto biomédico é um fator crítico para vias de ativação celular que visam melhorar sua integração óssea. Várias destas proteínas estão presentes no plasma sanguíneo (albumina, factor de von Willebrand, fibrinogênio ou fibronectina, por exemplo) e mesmo após um curto tempo de exposição, ligam-se às superfícies artificiais que irão influenciar as interações com outras proteínas e as vias de ativação celular. O emprego de um sistema modelo de fibrinogênio, que é o receptor principal da membrana das plaquetas (GPIIb-IIIa), pode ser utilizado para prever o desempenho da hemocompatibilidade de biomateriais (Weber; Wendel, 2005).

As proteínas também apresentam diferentes comportamentos de adsorção em sua superfície devido às suas características específicas inerentes. Pode ser hidrofóbicas (neutra) ou hidrofílicas (neutra, positiva e negativamente carregadas), sendo que as interações da superfície das proteínas iônicas (repulsiva ou de atração), hidrofóbicas e forças de van-der-Waals fornecem as mais importantes forças motrizes de adsorção (Johnson et al., 1994).

A influência do revestimento com PCLE sobre os cristais de hidroxiapatita, quanto à adsorção de proteínas, foi medida quantitativamente em função da concentração das proteínas albumina (HSA) e fibrinogênio (HFB) marcadas com ^{125}I em função de sua concentração. As curvas isotérmicas resultantes da adsorção de HSA e HFB demonstram um acento inicial indicando elevada afinidade destas proteínas com a superfície do material.

Quanto à adsorção do fibrinogênio, alterações significativas ocorreram para a constante de associação (k), indicando que as superfícies dos compósitos tem uma fraca afinidade pelo HFB à temperatura ambiente, relativamente às cerâmicas (HAP-8 e HAP-91). Sabe-se que a adsorção de fibrinogênio indica uma propensão a trombogenicidade, sendo assim, uma menor adsorção desta proteína sérica pelos compósitos os tornam menos trombogênicos em comparação com as cerâmicas puras.

As curvas isotérmicas de adsorção para o fibrinogênio obtidas demonstraram que a adsorção máxima (Γ_{max}) da HAP-8 foi cerca de 10 vezes maior em relação a HAPN/PCLE e entre a HAP-91 e seu compósito, foi cerca de 150 vezes menor para a HAP-91/PCLE. Comparando-se a adsorção entre os compósitos, para as partículas micrométricas foi cerca de 10 vezes menor em relação as nanométricas. A adsorção de HFB na sua forma reversível (Γ_1) para HAPN/PCLE foi reduzida em cerca de 4 vezes quando comparada a HAP-8, além de apresentar uma quantidade de adsorção reversível muito próxima da máxima.

Sendo assim, a adsorção reversível (Γ_1) do fibrinogênio encontrada, neste estudo foi, em valores aproximados, para a HAP-8 $\approx$ HAP-91 > HAPN/PCLE > HAP-91/PCLE.

Quanto adsorção da proteína albumina (HSA) as curvas isotérmicas demonstram uma adsorção máxima para HAPN/PCLE cerca de 5 vezes menor relativamente à HAP-8, e a adsorção de HSA para a HAP-91/PCLE cerca de 12 vezes menor em relação à HAP-91. Na comparação entre os compósitos, a adsorção de HSA para a HAP91/PCLE é cerca de 6 vezes menor que para a HAPN/PCLE. O estudo da adsorção de albumina pelo biomaterial está relacionado com a ligação com Ca^{++} , uma vez que esta proteína possui sítios de captação de íons cálcio, quanto maior sua adsorção, maior será a propensão para a regeneração do tecido ósseo.

Na forma reversível (Γ_1) a adsorção da albumina encontrada para as cerâmicas apresentou um valor cerca de 100% maior em relação a seus compósitos. Na comparação entre os compósitos quanto ao tamanho das partículas (nano ou micrométricas), observou-se que, para HPAN/PCLE a adsorção ocorreu cerca de sete vezes mais que na HAP-91/PCLE.

Desta forma, a adsorção reversível da albumina encontrada neste estudo foi, em valores aproximados, para a HAP-8 > HAPN/PCLE > HAP-91 > HAP-91/PCLE, demonstrando uma menor afinidade de adsorção desta proteína pelos compósitos em relação as cerâmicas não revestidas.

A superfície da HAP permite ligações do tipo dipolo, o que favorece a adsorção de moléculas de água, proteínas e colágeno na superfície, conduzindo a regeneração tecidual (Elwing et al., 1986; Golander et al., 1990; Wu et al., 1993; Cowin, 2000), mas o aumento da hidrofobicidade de superfície promove uma maior adsorção de proteínas (Malmsten, 1995; Duracher et al., 2000).

Em relação às curvas isotérmicas nas formas reversível e irreversível, observou-se que na adsorção irreversível (onde a proteína é adsorvida de modo desnaturante, ou seja, perde sua conformação terciária/quaternária), todos os materiais apresentaram uma leve discrepância em relação à adsorção reversível do HFB e da HSA, com exceção a adsorção para HAPN/PCLE, e da HSA para HAP-91/PCLE. Ressalta-se que o ideal é que a adsorção ocorra na forma reversível, onde não ocorre perturbação na estrutura da proteína.

Concluiu-se que além do resvestimento com o PCLE, o tamanho das partículas também influencia na adsorção protéica tanto do fibrinogênio quanto da albumina.

De acordo com a literatura, uma suspensão de partículas será estável se possuir um valor absoluto maior que 25mV. Assim, quando o potencial zeta é relativamente alto, maior que 25mV (em valor absoluto), as forças repulsivas predominam em relação às atrativas, logo o sistema se mantém disperso. Quando o potencial zeta é relativamente baixo, menor que 25mV (valor absoluto), as forças atrativas predominam em relação às repulsivas, as partículas tendem a se aproximar, formando agregados (Hanaor et al., 2011).

Os valores de potencial zeta também são dependentes do tamanho de partícula (Vandiver et al., 2005; Wang et al., 2006) o que justifica os menores valores encontrados para as nanopartículas não revestidas HAP e consequentemente uma estabilidade menor relativamente a seus compósitos revestidos.

O aumento do potencial zeta também confirmou a existência de interações hidrofóbicas entre HFB ou HSA com a HAPN/PCLE e a HAP-91/PCLE. Isto porque o aumento da carga de superfície em partículas coloidais aumenta a magnitude entre partículas de repulsão eletrostática, que tendem a perturbar agregados de proteínas existentes e desestimular ainda mais a agregação (Prieto et al., 2004; Patil et al., 2007). Por conseguinte os compósitos, HAPN/PCLE e HAP-91/PCLE, poderiam ligar-se a HSA e HFB através de uma combinação de interações eletrostáticas e hidrofóbicas podendo ainda formar micelas – como aglomerados.

Já foi mencionado que no estudo da aderência/proliferação celular observou-se aumento, em função do tempo de cultura, para todas as amostras, sendo maior para os compósitos quando comparados às cerâmicas puras e que, após o quarto dia, foi significativamente maior para a HAPN/PCLE. Este resultado deve ser interpretado juntamente com a capacidade de molhamento (hidrofobicidade/hidrofiliicidade - ângulo de contato), da superfície do material (Wei, 2007).

Os resultados apresentados no estudo do ângulo de contato mostram um aumento significativo para as HAPN/PCLE e HAP-91/PCLE em relação às HAP-8 e HAP-91, demonstrando que houve uma melhoria da modulação em hidrofiliicidade, que pode ser atribuída à modulação de ligações de hidrogênio entre o número de grupos hidroxila da HAP-91 e da HAP-8, respectivamente. Conclui-se que os compósitos, HAPN/PCLE e HAP-91/PCLE, podem ser mais apropriados para a ligação com as células do que os outros materiais, pois apresenta um ângulo de contato próximo ao da superfície da água para a adesão de fibroblastos, relatado no intervalo entre 55° e 75° (Groth; Altankov, 1996; Wei et al., 2009; Webb et al., 2011).

Quanto ao estudo *in vivo*, a escolha por coelhos se deu pela facilidade na realização do procedimento cirúrgico devido às características anatômicas da

tíbia do animal, que apresenta dimensões adequadas, possibilitando a realização de duas perfurações na mesma tíbia, reduzindo o número de animais empregados. Além do que, o tempo de cicatrização da espécie, devido a sua velocidade de metabolismo ser três vezes superior à da espécie humana (Roberts et al., 1986), nos forneceu um parâmetro comparativo de 4,5 meses para avaliação da interação dos biomateriais com o tecido ósseo, já que o tempo de eutanásia escolhido foi de 6 semanas.

Para a inserção no leito cirúrgico optou-se pela confecção de pastilhas prensadas em matriz pré-fabricada pela facilidade na inserção do implante na loja óssea no momento transcirúrgico (materiais nanoparticulados poderiam ser deslocados ou removidos da loja óssea). Pode-se observar após a eutanásia e remoção/dissecação das tíbias, em análise macrométrica das peças anatômicas, a presença de todas as pastilhas implantadas.

Na avaliação histológica das lâminas pode-se observar um crescimento ósseo sobre todos os implantes, sem a presença significativa de atividade osteoclástica e de reações de processos inflamatórios, aspectos compatíveis com período pós-cirúrgico escolhido.

No entanto, essa remodelação óssea apresentou diferenças na análise morfológica, onde foram observadas para HAP-91 regiões com tecido cicatricial e hiperplasia de tecido cartilaginoso. Neste grupo também foi observado que para o mesmo animal e, portanto, o mesmo material, apresentou crescimento diferente entre si, ou seja, uma amostra apresentou crescimento lamelar e o outro não, isto provavelmente devido a estímulos de tração da área de inserção do tendão. Em comparação com o grupo HAP-91/PCLE observou-se que a área de crescimento ósseo sobre as pastilhas foi menor para este grupo, porém apresentado um tecido mais organizado. Em ambos os grupos as pastilhas permaneceram íntegras na loja cirúrgica.

Já nos grupos das nanopartículas, a HAP-8 apresentou trabéculas ósseas no interior da pastilha, provavelmente devido à reabsorção da fase β -TCP e liberação de íons em função de sua solubilidade, já que a degradação do TCP é maior que da HAP (Hench; Wilson, 1993; Ratner et al., 1996; Brown, 1999).

Deve-se considerar ainda o aumento da área de superfície em função do tamanho das partículas e o decréscimo da cristalinidade que também podem influenciar a velocidade de reabsorção do material, aumentando-a (Hench; Wilson, 1993; Ratner et al., 1996; Kawashi, 1997; Bens-Nissan; Pezzotti, 2002).

7 CONCLUSÕES

Analisando os resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que:

- a) As técnicas de análise físico-químicas indicam que o revestimento das biocerâmicas com PCLE foi efetivo, originando os compósitos nano (HAPN/PCLE) e microestruturados (HAP-91/PCLE).
- b) O revestimento das biocerâmicas com PCLE foi homogêneo.
- c) O revestimento das superfícies da biocerâmica com o PCLE exerce influência no processo de adsorção das proteínas séricas fibrinogênio (FHB) e albumina (HSA).
- d) O potencial zeta demonstra a estabilidade coloidal da HAP-91/PCLE > HAP-91 > HAPN/PCLE > HAP-8. Assim como uma menor estabilidade coloidal das nanopartículas em relação às micropartículas de HAP.
- e) Nenhum material estudado apresentou citotoxicidade e todos propiciaram crescimento celular, evidenciando boas propriedades biocompatíveis.
- f) A proliferação de células osteoblásticas (MG-63) indicou crescimento celular significativamente maior para o compósito HAPN/PCLE em relação aos outros biomateriais, sugerindo a existência de influência da área superficial.
- g) As medidas do ângulo de contato evidenciam o aumento da hidrofobicidade dos compósitos HAPN/PCLE e a HAP-91/PCLE em relação às biocerâmicas sem revestimento.
- h) Todos os biomateriais estudados promoveram neoformação óssea. Entretanto, as biocerâmicas revestidas com o PCLE apresentaram neoformação mais lenta, possivelmente associada à biodegradação do recobrimento com PCLE nas superfícies das biocerâmicas.
- i) O material HAPN/PCLE apresenta características potenciais de um biomaterial para enxerto ósseo.

ANEXOS

I – Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa

Parecer - Projeto Nº 68/10 - CEUA-IPEN/SP

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa **“ESTUDO DE UM NANOCOMPÓSITO HIDROXIAPATITA/POLI ϵ -CAPROLACTONA NA REGENERAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO”** de responsabilidade do pesquisador **JOSÉ CARLOS BRESSIANI** foi considerado APROVADO.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados, a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais, dependendo da duração do projeto) referentes ao andamento da pesquisa. Após o término da pesquisa, uma cópia do trabalho deve ser encaminhada a este CEUA .

São Paulo, 29 de novembro de 2010

Prof. Dra. Nanci do Nascimento
Coordenadora do CEUA-IPEN

II– Protocolo do processamento das peças anatômicas – tíbias de coelho – para confecção das lâminas histológicas

PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO PARA OSSO

Fixação.

Descalcificação – Solução de Ácido Fórmico á 10%

Troca de solução pelo menos 3x por semana. O material ficou 18 dias.

Processamento, inclusão e obtenção dos cortes:

Após a fixação dos fragmentos feita em formol 10%, os materiais foram desidratados em banhos sucessivos de etanol em concentrações crescentes (70-100%) e diafanizados em xilol. Três banhos de 2 horas em parafina precederam a inclusão em bloco no mesmo material.

Segue abaixo a tabela das concentrações crescente de álcool, e a parafinização:

Solução	Tempo
Álcool 70%	1 hora
Álcool 95%	1 hora
Álcool absoluto	6 horas
Xilol	3 horas
Parafina	6 horas

As peças foram incluídas em parafina. Foram obtidos cortes na posição longitudinal com 5 um de espessura, em micrótomo manual (Leica – RM 2145).

Os cortes uma vez coletados em lâminas, foram desparafinizados, tendo as lâminas passadas pela sequência de imersões descrita no quadro abaixo e corados por Tricômico de Masson.

Solução	Tempo
Xilol I	10 min
Xilol II	10 min
Álcool abs	5 min
Álcool 95 %	5 min
Álcool 70 %	5 min
Lavar em água corrente	3 min
Hematoxilina	5 min
Diferenciador	rápido
Eosina	1 min
Lavar rápido	
Álcool 70%	30 seg
Álcool 95%	30 seg
Álcool abs	3 min
Álcool abs	5 min
Álcoo/xilol (1:1)	5 min
Xilol	5 min
Xilol	5 min

Montagem em bálsamo da Fischer.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFSHAR, A.; GHORBANI, M.; EHSANI, N.; SAERI, M.R. SORELL, C.C. Some important factors in the wet precipitation process of hydroxyapatite. **Materials and Design**, v. 24, n.3, p. 197-202, May 2003.
- ALBERTSSON, A.C.; VARMA, I.K. Aliphatic polyesters: Synthesis, properties and applications. **Adv. Polym. Sci.**, v. 157, p. 1-40, 2002.
- ALBERTSSON, A.C.; VARMA, I.K. Recent developments in ring opening polymerization of lactones for biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 6, p. 1466 -1486, Nov.-Dec. 2003.
- ALMEIDA, K.A. **Sistema híbrido macroporoso para enxertos ósseos aloplásticos**. 2003. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), Itajubá.
- ALMEIDA, K.A.; THYLANDERA, M.C.L.; QUEIROZ, A.A.A. $PCL_2/Ca(OH)_2$ bioactive composite for endodontic treatment. **Mater. Sci. Eng. C**. v. 24, n. 5, p. 697-699, Nov. 2004.
- ANDRADE, J.D.; HLADY, V. Plasma protein adsorption: the big twelve. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 516, p. 158-72, 1987.
- ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, n. 7, p. 667–81, Apr. 2000.
- ANSELME, K.; BIGERELLE, M.; NOEL, B.; DUFRESNE, E.; JUDAS, D.; IOST, A.; HARDOUIN, P. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. **J. Biomed. Mater. Res.** v. 49, n. 2, p. 155-156, Feb. 2000.
- ANSELME, K.; NOEL B.; FLAUTRE, B.; BLARY, M.C.; DELECOURT, C.; DESCAMPS, M.; HARDOUIN, P. Association of porous hydroxyapatite and bone marrow cells for bone regeneration. **Bone.**, v. 25, n. 2, p. 51S–54S, Aug. 1999.
- ARUN, K.G. **Prática na implantodontia**. São Paulo, SP: Editorial Premier, 2001.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE POLÍMEROS – ABPOL. **Consulta geral a homepage**. Disponível em: <<http://www.abpol.com.br>>. Acesso em: 08 out. 2012.
- BARNEY, V. C., LEVLN, M. P., ADAMS, D. F. Bioceramic implants in surgical periodontal defects. A comparison study. **J. Periodontol.**, v.57, n. 12, p.764-70, Dec. 1986.

BENS-NISSAN, B.; PEZZOTTI, G. Bioceramics: Processing routes and Mechanical **Evaluation**. *Journal of the Ceramic of Japan*, v. 110, n. 7 p. 601-8, 2002.

BEZWADA, R.S.; JAMIOLKOWSKI, D.D.; LEE, I. Monocryl suture, a new ultra-pliable absorbable monofilament suture. *Biomaterials*, v. 16, n. 15, p. 1141-8, Oct. 1995.

BOISSARD, C.I.R.; BOURBAN, P.E.; TAMI, A.E.; ALINI, M.; EGLIN, D. Nanohydroxyapatite/poly(ester urethane) scaffold for bone tissue engineering. *Acta. Biomater.*, v. 5, n.9, p. 3316-3327, Nov. 2009.

BOREFREUND, E.; PUERNER, J.Á. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J. Tissue Culture Meth.*, v. 9, n. 1, p. 7-9, 1984.

BORUM-NICHOLAS, L.; WILSON JUNIOR, O.C. Surface modification of hydroxyapatite. Part I. Dodecyl alcohol. *Biomaterials*, v. 24, n.1, p. 3671-9, Sept. 2003.

BRITO, G.F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E.M.; MÉLO, T.J.A. Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. *Rev. Eletr. de Materiais e Processos*, v.6, n.2, p.127-139, 2011.

BROWN, P.W. Hydration behavior of Calcium Phosphates um analous to hydration behavior of calcium silicates. *Cement and Concrete Research*, v. 29, n.8, p.1167-71, 1999.

CACHINHO, S.C.P. **Titânio macroporoso para osteointegração – replicação inversa de esponjas poliméricas**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Aveiro, Portugal.

CALDERON, M.; GRAESER, R.; KRATZ, F.; HAAG, R. Development of enzymatically cleavable prodrugs derived from dendritic polyglycerol. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 19, n. 14, p. 3725–3728, July 2009.

CAMPOS, M.; MULLER, F.A.; BRESSIANI, A.H.A.; BRESSIANI, J.C. Comparative study of sonochemical synthesized β -TCP and BCP-nanoparticles. *Key Eng. Mater.*, v. 254-256, p. 923-926, 2004.

CAMPOS, M.; MULLER, F.A.; BRESSIANI, A.H.A.; BRESSIANI, J.C.; GREIL, P. Sonochemical synthesis of calcium phosphatase powders. *J. Mater, Sci. Mater. Med.*, v. 18, n. 5, p. 669-75, May 2007.

CARVALHO, H.F.; COLLARES-BUZATO, C.B. **Células: uma abordagem multidisciplinar**. Barueri, SP: Editora Manole, 2005.

CONSTANTINO, P.D.; FREIDMAN, C.D. Synthetic bone graft substitutes. *Otolaryngol. Clin. North Am.*, v. 27, n. 5, p. 34-49, Oct. 1994.

COOMBES, A.G.A.; RIZZI, S.C.; WILLIAMSON, M.; BARRALET, J.E.; DOWNES, S.; WALLACE, W.A. Precipitation casting of polycaprolactone for applications in tissue engineering and drug delivery. *Biomaterials*, v. 25, n. 2, p. 315-325, 2004.

COULEMBIER, O.; DEGÉE, P.; HEDRICK, J. L.; DUBOIS, P. From controlled ring-opening polymerization to biodegradable aliphatic polyester: Especially poly (β -malic acid) derivatives. **Prog. Polym. Sci.**, v. 31, n.8, p.723-747, 2006.

COWIN, S.C. **Bone Mechanics Handbook**. 2.ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2000.

DARNEY, P.D.; MONROE, S.E.; KLAISLE, C.M.; ALVARADO, A. Clinical evaluation of the Capronor contraceptive implant: preliminary report. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 160, n. 5 Pt 2, p. 1292-5, May 1989.

DE QUEIROZ, A.A.A.; FRANÇA, E.J.; ABRAHAM, G.A.; ROMÁN, J.S. Ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone by iodine charge-transfer complex. **J. Poly. Sci.: Part B: Polymer Physics**, v. 40, n. 8, p. 714-22, 2002.

DENG, X.; HÃO, J.; WANG, C. Preparation and mechanical properties of nanocomposites of poly(D,L-lactide) with Ca-deficient hydroxyapatite nanocrystals. **Biomaterials**, v. 22, n. 21, p. 2867-73, Nov. 2001.

DONG, C.M.; QIU, K.Y.; GU, Z.W.; FENG, X.D. Synthesis of Star-Shaped Poly(ϵ -caprolactone)-*b*-poly(D,L-lactic acid-*alt*-glycolic acid) with Multifunctional Initiator and Stannous Octoate Catalyst. **Macromolecules**, v. 34, n.14, p. 4691–4696, 2001.

DONG, Z., LI, Y., ZOU, Q. Degradation and biocompatibility of porous nano-hydroxyapatite/polyurethane composite scaffold for bone tissue engineering. **Appl. Surf. Sci.**, v. 255, n. 12, p. 6087-6091, Apr. 2009.

DURACHER, D.; ELAISSARI, A.; MALLET, F.; PICHOT, C. Adsorption of modified HIV-1 capsid p24 protein onto thermosensitive and cationic core-shell poly(styrene)-poly(N-isopropylacrylamide) particles. **Langmuir**, v. 16, n. 23, p. 9002-8, 2000.

DURRIEU, M.C.; PALLU, S.; GUILLEMOT, F.; BAREILLE, R.; AMEDEE, J.; BAQUEY, C.; LABRUGERE, C.; DARD, M. Grafting RGD containing peptides onto hydroxyapatite to promote osteoblastic cells adhesion. **J. Mater. Sci.-Mater. Med.** v.15, n. 7, p. 779–786, July 2004.

EBAH. **Proteínas Plasmáticas**. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAazxcAG/proteinas-plasmaticas>>. Acesso em: 12 out. 2012.

ELLIOT, C. **Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates**. New York: Elsevier Science, 1994. (Studies in Inorganic Chemistry 18)

ELWING, H.; IVARSSON, B.; LUNDSTROM, I. Complement deposition from human sera on silicon surfaces studied in situ by ellipsometry: The influence of surface wettability. **Eur. J. Biochem.**, v. 156, n. 2, p. 359-65, Apr. 1986.

ELZEIN, T.; AWADA, H.; NASSER-EDDINE, M.; DELAITE, C.; BROGLY, M. A model of chain folding in Polycaprolactone-*b*-Polymethyl Methacrylate block copolymers. **Thin Solid Films**, v. 483, n.1-2, 388- 395, 2005.

ENCICLOPÉDIA MÉDICA MORAES AMATO. **Index.php**title=Enxerto. Disponível em: <<http://www.encyclopedia.med.br/index.php?title=Enxerto>>. Acesso em: 08 out. 2012.

FERNANDES, E.G.; DE QUEIROZ, A.A.A.; ABRAHAM, G.A.; SAN ROMÁN, J. Antithrombogenic properties of bioconjugate streptokinase-polyglycerol dendrimers. **J. Mater. Sci. Mater. Med.** v. 17, n. 2, p. 105-11, Feb. 2006.

FERRAZ, M.P.; MONTEIRO, F.J.; SERRO, A.P.; SARAMAGO, B.; GIBSON, I.R.; SANTOS, J.D. Effect of chemical composition on hydrophobicity and zeta potential of plasma sprayed HA/CaOP₂O₅ glass coatings. **Biomaterials**, v. 22, n. 23, p. 3105-112, Dec. 2001.

FINI, M.; GIAVARESI, G.; TORRICELLI, P.; BORSAR, I.V.; GIARDINO, R.; NICOLINI, A.; CARPI, A. Osteoporosis and biomaterial osteointegration. **Biom. Pharm.**, v. 58, n. 9, p. 487-493, Nov. 2004.

FIXMAN, M. Excluded volume in polymer chains. **J. Chem. Phys.** v.23, n. 9, p. 174, 1956.

FIXMAN, M.; ZIMM, B., STOCKMAYER, W.H. Excluded volume in polymer chains. **J. Chem. Phys.**, v. 21, n. 10, p. 1716, 1953.

FROST, A.A.; PEARSON, R.G. **Kinetics and mechanism**. 2.ed. New York: John Wiley & Sons, 1961.

FUNABASHI, M.; NINOMIYA, F.; KUNIOKA, M. Biodegradability Evaluation of Polymeres by ISO 14855-2. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 10, n. 8, p. 3635-54, 2009.

GERIS, L.; GERISCH, A.; SLOTEN, J.V.; WEINER, R.D.; VAN OOSTERWYCK, H. Angiogenesis in bone fracture healing: a bioregulatory model. **J. Theor. Biotech.**, v. 251, n. 1, p. 137–158, Mar. 2008.

GOLANDER, C.G.; LIN, Y.S.; HLADY, V.; ANDRADE, J. D. Wetting and plasma protein adsorption studies using surfaces with a hydrophobicity gradient. **Colloids Surf.**, v. 49, p. 289-302, 1990.

GOUVEIA, D.S. **Obtenção de pós nanométricos de hidroxiapatita sintetizados com magnésio utilizando ultra-som**. 2008. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

GOUVEIA, D.S.; BRESSIANI, A.H.A.; BRESSIANI, J.C. Phosphoric acid rate addition effect in the hydroxyapatite synthesis by neutralization method. **Materials Science Forum**, v. 530-531, p. 593-598, 2006.

GOUVEIA, D.S.; COUTINHO, A.C.S.; BRESSIANI, A.H.A.; BRESSIANI, J.C. Effect of Mg²⁺ addition during HA nanoparticles synthesis using ultrasonic irradiation. **Key Engineering Materials**, v. 361-363, p. 203-206, 2008.

GREENWALD, A.S.; BODEN, S.D. GOLDBERG, V.M.; KHAP, Y.; LAURENCIN, C.T.; ROSIER, R.N. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J. Bone Joint Surg. Am.*, v. 83, n. 2, p. 98-103, 2001.

GROSS, R.A.; KALRA, B.; KUMAR, A. Polyester and polycarbonate synthesis by in vitro enzyme catalysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 55, n. 6, p. 655–60, June 2001.

GROTH, T.; ALTANKOV, G. Studies on cell-biomaterial interaction: role of tyrosine phosphorylation during fibroblast spreading on surfaces varying in wettability. *Biomaterials*, v. 17, n. 12, p. 1227–1234, June 1996.

GRÜDTNER, V.S; WEINGRILL, P.; FERNANDES, A.L. Aspectos da absorção no metabolismo do cálcio e vitamina D. *Rev. Bras. Reumatol.*, v. 37, n. 3, p. 143-151, maio/jun. 1997.

GUNATILLAKE, P.A.; ADHIKARI, R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur. Cells Mat.*, v. 5, n. 25, p. 1-16, May 2003.

GUTIERRES, M.; LOPES, M.A.; HUSSAIN, N.S.; CABRAL, A.T.; ALMEIDA, L.; SANTOS, J.D. Substitutos ósseos - conceitos gerais e estado. *Actual ArquiMed.*, v. 19, n. 4, p. 153-162, 2006.

GWYNN, I.A.P. Cell biology at interfaces. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, v. 5, n. 6/7, p. 357–60, 1994.

HABRAKEN, W.J.E.M.; WOLKE, J.G.C.; JANSEN, J.A. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 59, n.4-5, p. 234 - 248, 2007.

HANAOR, D.A.H.; MICHELAZZI, M.; LEONELLI, C.; SORRELL, C.C. The effects of carboxylic acids on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of ZrO₂. *J. Eur. Ceram. Soc.*, v.32, n. 1, p. 235–244, 2011.

HEATH, D.J.; CHRISTIAN P.; GRIFFIN M. Involvement of tissue transglutaminase in the stabilization of biomaterial/tissue interfaces important in medical devices. *Biomaterials*, v. 23, n. 6, p.1519–1526, Mar. 2002.

HENCH L.L.; POLAK, J.M. Third-generation biomedical materials. *Science*, v. 295, p. 1014–7, 2002.

HENCH, L.L. Bioceramics, From concept to clinic. *J. Am. Ceram. Soc.* v. 74, n. 7, p. 1487-1510, 1991.

HENCH, L.L.; WILSON, J. *Introduction to bioceramics*. Singapore: Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 1993.

HEUER, A.H. Innovative materials processing strategies: a biomimetic approach. *Science*, v. 255, n. 5048, p.1098–105, 1992.

HEUSCHEN, J.; JEROME, R.; TEYSSIÉ, P.H. Polycaprolactone-based copolymers. Synthesis by anionic coordination type catalysts. **Macromolecules**, v. 14, n. 2, p. 242-246, Mar. 1981.

HILES, M.; LEVITSKY, S. Interactive biomaterials: taking surgery to the next level. **Int. Surg.**, v. 90, n. 3 Suppl., p.S13-S20, July/Aug. 2005.

HONG, Z.; ZHANG, P.; HE, C.; QIU, X.; LIU, A.; CHEN, L.I.; CHEN, X.; JING, X. Nano-composite of poly(L-lactide) and surface grafted hydroxyapatite: mechanical properties and biocompatibility. **Biomaterials**, v. 26, n. 32, p. 6296-304, Nov. 2005.

HUTMACHER, D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials**, v.21, n. 24, p. 2529-43, Dec. 2000.

IGNJATOVIC, N.; TOMIC, S.; DAKIC, M.; MILJKOVIC, M.; PLAVSIC, M.; USKOKOVIC, D. Synthesis and properties of hydroxyapatite/poly(L-lactide) composite biomaterials. **Biomaterials**, v.20, n. 9, p. 809-816, May 1999.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993**: 1992, Biological, evaluation of medical devices - Part 5 - Tests for cytotoxicity: in vitro methods. Geneve: ISO, 1992.

JACK, K.S.; VELAYUDHAN, S.; LUCKMAN, P.; TRAU, M.; GRØNDAHL, L.; COOPER-WHITE, J. The fabrication and characterization of biodegradable HA/PHBV nanoparticle-polymer composite scaffolds. **Acta Biomater.**, v. 5, n. 7, p. 2657–2667, 2009.

JAYABALAN, M.; SHALUMON, K.T.; MITHA, M.K.; GANESAN, K.; EPPLE, M. Effect of hydroxyapatite on the biodegradation and biomechanical stability of polyester nanocomposites for orthopedic applications. **Act. Biomater.**, v. 6, n. 3, p. 763–775, Mar. 2010.

JOHNSON, C.A.; WU, P.; LENHOFF, A.M. Electrostatic and van der Waals contributions to protein adsorption: 2. modeling of ordered arrays. **Langmuir** v.10, n. 10, p. 3705–13, 1994.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. (Ed.) **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap. 8, p. 136-153.

KAHOVEC, J.; FOX, R.B.; HATADA, K. **Nomenclature of Regular Single-Strand Organic Polymers**. Prague: Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, 2002. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/rssop>>. Acesso em: 08 out. 2012.

KANNAN, S.; LEMOS, I.A.F.; ROCHA, J.U.G.; FERREIRA, J.M.F. Synthesis and characterization of magnesium substituted biphasic mixtures of controlled hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphatate ratios. **Journal of Solid State Chemistry**, v.178, n. 10, p. 3190-6, Oct. 2005.

KAWASHI, E.Y. **Fosfatos de cálcio: porosidade, cristalinidade, potencial de interface e comportamento in vivo**. 1997. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

KAWASHI, E.Y.; BERTAN, C.A.; REIS, R.R.; ALVES, O.L. Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v.23, n.4, p.518-22, 2000.

KHOR, H.L.; NG, K.W.; HTAY, A.S.; SCHANTZ, J.T.; TEOH, S.H.; HUTMACHER, D.W. Preliminary study of a polycaprolactone membrane utilized as epidermal substrate. **J. Mater. Sci. Mater. Med.** v.14, n. 2, p. 113-20, Feb. 2003.

KIM, H.M., REY, C.; GLIMCHER, M.J. Isolation of calcium-phosphate crystals of bone by non-aqueous methods at low temperature. **J. Bone Miner. Res.**, v.10, n. 10, p. 1589-601, Oct. 1995.

KIM, H.M.; KIM, Y.; PARK, S.J.; REY, C.; LEE, H.M.; GLIMCHER, M.J.; KO, J.S. Thin film of low-crystalline calcium phosphate apatite formed at low temperature. **Biomaterials**, v.21, n.11, p. 1129-1134, June 2000.

KIM, H.M.; REY, C.; GLIMCHER, M.J. X-ray diffraction, electron microscopy, and Fourier transform infrared spectroscopy of apatite crystals isolated from chicken and bovine calcified cartilage. **Calcif. Tissue Int.** v.59, n. 1, p. 58-63, July 1996.

KIM, H.W.; KNOWLES, J.C.; KIM, H.E. Hydroxyapatite/poly(epsilon-caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. **Biomaterials**, v. 25, n.7/8, p. 1279-87, Mar./Apr. 2004.

KIM, S.R.; LEE, J.H.; KIM, Y.T.; RIU, D.H.; JUNG, S.J.; LEE, Y.J.; CHUNG, S.C.; KIM, Y.H. Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatites and their sintering behaviors. **Biomaterials**, v. 24, n. 8, p. 1389-98, Apr. 2003.

KOBAYASHI, T.; NAKAMURA, S.; YAMASHITA, K. Enhanced osteobonding by negative surface charges of electrically polarized hydroxyapatite. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 57, n. 4, p. 477-484, Dec. 2001.

KOLB, H.L.; FINN, M.G.; SHARPLESS, K.B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. **Angew. Chem. Int.** v. 113, n. 11, p. 2056–2075, 2001.

KRICHELDORF, H.R. Syntheses and application of polylactide. **Chemosphere**, v. 43, n. 1, p. 49 -54, Apr. 2001.

KUMAR, D.; GITTINGS, J.P.; TURNER, I.G.; BOWEN, C.R.; BASTIDA-HIDALGO, A.; CARTMELL, S.H. Polarization of hydroxyapatite: Influence on osteoblast cell proliferation. **Acta Biomater.**, v. 6, n. 4, p. 1549–1554, Apr. 2010.

KUMTA, P.N.; SFEIR, C.; LEE, D.H.; OLTON, D.; CHOI, D. Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization. **Acta Biomater.**, v. 1, n. 1, p. 65-83, Jan. 2005.

KWEON, H.Y.; YOO, M.K.; PARK, I.K.; KIM, T.H.; LEE, H.C.; LEE, H.-S.; OH, J.-S.; AKAIKE, T.; CHO, C.-S. A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. **Biomaterials**, v.24, n. 5, p. 801-808, Feb. 2003.

LACERDA, K.A.; LAMEIRAS, F.S.; SILVA, V.V. Avaliação da biodegradação de matrizes porosas à base de hidroxiapatita para aplicação como fontes radioativas em braquiterapia. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p.1216-21, 2009.

LAPIENIS, G. Star-shaped polymers having PEO arms. **Progress in Polymer Science**, v. 34 n. 9, p. 852–892, Sept. 2009.

LEE, H.J.; CHOI, H.W.; KIM, K.J.; LEE, S.C. Modification of hydroxyapatite nanosurfaces for enhanced colloidal stability and improved interfacial adhesion in nanocomposites. **Chem. Mater.**, v. 18, n. 21, p. 5111-8, 2006.

LEE, H.J.; KIM, S.E.; CHOI, H.W.; KIM, C.W.; KIM, K.J.; LEE, S.C. The effect of surface-modified nano-hydroxyapatite on biocompatibility of poly(ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite nanocomposites. **Eur. Polym. J.** v.43, n. 5, p. 1602-8, May 2007.

LEGEROS, R.Z. **Calcium phosphates in oral biology and medicine**. Switzerland: Karger, 1991. (Monographs in oral Science, v. 15)

LEGEROS, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res.* n. 395, p. 81-98. Feb. 2002.

LELE, B.S.; LEROUX, J.C. Synthesis of novel amphiphilic star-shaped poly(1-caprolactone)-blockpoly(N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide) by combination of ring-opening and chain transfer polymerization. **Polymer**, v. 43, n. 21, p. 5595–5606, Oct. 2002.

LIMA, P.M. Tópicos em biomateriais. **Informativo da Área de Ciência e Engenharia dos Biomateriais Tópicos em Biomateriais**, v.1, n.1, set. 2006. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAj_0AC/topicos-biomateriais-1>. Acesso em: 20 mar. 2012.

LIU, Q.; VAN BLITTERSWIJK, C.A. Composite biomaterials with chemical bonding between hydroxyapatite filler particles and PEG/PBT copolymer matrix. **J. Biomed. Mater. Res.** v.40, n. 3, p. 490-7, June 1998.

LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E.E.C. **Caracterização de polímeros**: determinação de peso molecular e análise térmica. Rio de Janeiro: E-papers, 2001.

LYNCH, S.E.; GENCO, R.J.; MARX, R.E. **Tissue engineering – applications in maxillofacial surgery and periodontics**. Illinois: Quintessência Books, 1999. 297 p.

MA, P.X. Biomimetic materials for tissue engineering. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 60, n. 2, p. 184-198, Jan. 2008.

MALMSTEN, M. Ellipsometry studies of the effects of surface hydrophobicity on protein adsorption. **Colloids Surf. B**, v. 3, n. 5, p. 297-308, Jan. 1995.

MANN, S.; ARCHIBALD, D.D.; DIDYMUS, J.M.; DOUGLAS, T., HEYWOOD, B.R.; MELDRUM, F.C.; REEVES, N.J. Crystallization at inorganic-organic interfaces: biominerals and biomimetic synthesis. **Science**, v. 261, n. 5126, p. 1286-1292, Sept. 1993.

MARCHI, J.; DANTAS, A.C.S.; GREIL, P.; BRESSIANI, J.C.; BRESSIANI, A.H.A.; MULLER, F.A. Influence of Mg-substituion on the physicochemical properties of calcium phosphate powders. **Materials Research Bulletin**, v. 42, n. 6, p.1040-50, June 2007.

MARZOLA, C.; PASTORI, C.M. Enxertos em reconstruções de maxilas atroficas. **Revista de Odontologia**, São Paulo, n. 4, p. 298-309, 2006.

MAVROPOULOS, E. **A Hidroxiapatita como removedora de Chumbo**. 1999. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública - Fundação Osvaldo Cruz.

MISCH, C.E. **Implantes dentais contemporâneos**. 2.ed. Santos: Editora Santos, 2000.

MONMA, H.; UENO, S.; KANAZAWA, T. Properties of hydroxyapatite prepared by the hydrolysis of tricalcium phosphatase. **Journal of chemical technology & Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 15-24, 1981.

MOSTAFA, N.Y. Characterization, thermal stability and sintering of hydroxyapatite powders prepared by different routes. **Materials Chemistry and Physics**, v.94, n. 2/3, p. 333-41, Dec. 2005.

MURRAY, R.K., GRANNER, D.K., MAYES, P.A., RODWELL, V.W. **Harper's biochemistry**. Norwalk: Appleton & Lange, 1993.

NAIR, L.S.; LAURENCIN, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Prog. Polym. Sci.**, v. 32, n. 8-9, p. 762-798, 2007.

NAKAMURA, S.; KOBAYASHI, T.; YAMASHITA, K. Extended bioactivity in the proximity of hydroxyapatite ceramic surfaces induced by polarization charges. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 61, n. 4, p. 593-599, Sept. 2002.

NEVES, J.B. **Enxertos ósseos intra-orais em implantodontia**. Atualização multidisciplinar para o clínico e o especialista. Rio de Janeiro: Medis, 2003. v. 3, cap. 14, p. 293 -301. (Odontologia Integrada)

NIELSEN, R.; NIELSEN, J.L.; LARSEN, K.L. Distribution and accessibility of cyclodextrins covalently bound onto silica gel. **J. Inclus. Phenom. Macrocycl. Chem.** v. 67, n. 3/4, p. 399–405, Aug. 2010.

NIEMEYER, C.M. Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: Biotechnology meets materials science. **Angew. Chem. Int. Edn Engl.**, v. 40,n. 22, p. 4128–4158, Nov. 2001.

NÚÑEZ, E.; FERRANDO, C.; MALMSTROM, E.; CLAEISSON, H.; WERNER, P.E.; GEDDE, U.W. Crystal structure, melting behaviour and equilibrium melting point of starpolyesters with crystallisable poly ϵ -caprolactone) arms. **Polymer**, v. 45, n. 15, p. 5251- 5263, 2004.

OGASAWARA, T.; BASTOS, I.N.; ANDRADE, M.C.; SILVA, R.R., SOARES, G.A. Análise termodinâmica da fluoretação da hidroxiapatita no sistema Ca-P-F-H₂O) a 37°C. **Educação & Tecnologia**, Belo Horizonte, v. 6, n. 1/2, p. 14-7, jan./dez. 2001.

ÓREFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. **Biomateriais**: fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.

OTT, H.C.; MATTHIESEN, T.S.; GOH, S.K.; BLACK, L.D.; KREN, S.M.; NETOFF, T.I.; TAYLOR, D.A. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. **Nat. Med.**, v. 14, n. 2, p. 213-21, 2008.

OYANE, A.; UCHIDA, M.; YOKOYAMA, Y.; CHOOLG, C.; TRIFFIT, J.; ITO, A. Simple surface modification of poly(ϵ -caprolactone) to induce its apatite-forming ability. **J. Biomed. Mater. Res. A**, v. 75, n. 1, p. 138-45, Oct. 2005.

PACHENCE, J.M.; BOHRER, M.P.; KOHN, J. Biodegradable polymers. In: LANZA, R.P.; LANGER, R.S.; VACANTI, J. (Ed.) **Principles of tissue engineering**. 3. ed. London: Academic, 2007. cap. 23, p. 323 - 339.

PARINI, C.J. **Estudo comparativo de métodos de determinação do tamanho de partícula**. 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

PATIL, S.; SANDBERG, A.; HECKERT, E.; SELF, W.; SEAL, S. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. **Biomaterials**, v. 28, n. 31, p. 4600–07, Nov. 2007.

POMPÉIA, C.; LIMA, T.; CURI, R. Arachidonic acid cytotoxicity: can arachidonic acid be a physiological mediator of cell death? **Cell Biochem. Funct.**, v. 21, n. 2, p. 97-104, 2003.

PRIETO, G.; SABIN, J.; RUSSO, J.; GONZALEZ, P.A.; SARMIENTO, F. A study of the interaction between proteins and fully-fluorinated and fully-hydrogenated surfactants by ζ -potential measurements. **Colloids. Surf. A: Physicochem.**, v. 249, n. 1/3, p. 51–5, 2004.

RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. Waltham: Academic Press, 1996.

REDE DE TECIDOS. **Paródia - Tecido Ósseo**. Disponível em: <<http://rededetecidos.blogspot.com.br/2013/04/blog-post.html>>. Acesso em: 09 out. 2011.

REED, J.S. **Principles of ceramics processing**. 2. ed. John Wiley & Sons, 1995.

REZWAN, K.; CHEN, Q.Z.; BLAKER, J.J.; BOCCACCINI, A.R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n.1 8, p. 3413-3431, 2006.

RHEE, S.H. Bone-like apatite-forming ability and mechanical properties of poly(epsilon-caprolactone)/silica hybrid as a function of poly(epsilon-caprolactone) content. **Biomaterials**, v. 25, n. 7/8, p. 1167-1175, Mar./Apr. 2004.

RHEE, S.H.; CHOI, J.Y.; JIM, H.M. Preparation of a bioactive and degradable poly(e-caprolactone) silica hybrid through a sol-gel method. **Biomaterials**, v. 23, n. 24, p. 4915-21, Dec. 2002.

RIBEIRO, C.C.; GIBSON, I.; BARBOSA, M.A. The uptake of titanium íons by hydroxyapatite structural changes and possible mechanisms. **Biomaterias**, v. 27, n. 9, p. 1749-61, Mar. 2006.

RIBELA, M.T.C.P; Y MURATA, Y.; MORGANTI, L.; TONIOLO, D.; BARTOLINI, P. The use of recombinant human growth hormone for radioiodination and standard preparation in radioimmunoassay. **J. Innumol. Methods**, v. 159, n.1/2, p. 269-74, 1993.

RICKARD, D.J.; GOWEN, M.; MACDONALD, B.R. Proliferative responses to estradiol, IL-1 alpha and TGF beta by cells expressing alkaline phosphatase in human osteoblast-like cell cultures. **Calcif. Tissue Int.**, v. 52, n. 3, p. 227-33, Mar. 1993.

ROBERTS, E.W.; POON, L.C.; SMITH, R.K. Interface histology of rigid endosseous implants. **J. Oral Implantol.**, v. 12, n 3, p. 406-16, 1986.

ROSA, P.T.V.; ARRUDA A.C.F; SANTANA, C.C.. Adsorção de proteínas do sangue na superfície de biomateriais. In: ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE ADSORÇÃO, 2., 2000, Florianópolis. Anais... Florianópolis: UFSC, 2000.

ROY, D.M.; LINNEHAN, S.K. Hydroxyapatite formed from coral-skeletal carbonate by hydrothermal exchange. **Nature**, p. 247:220-222, 1974.

RUSSEL, J.B. **Química geral**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1994. v.1, p. 411-6.

RYNER, M.; STRIDSBERG, K.; ALBERTSSON, A.C.; VON SCHENCK, H.; SVENSSON, M. Mechanism of ring-opening polymerization of 1,5-dioxepan-2-one and L-lactide with stannous 2-ethylhexanoate: a theoretical study. **Macromolecules**, v. 34, n. 12, p. 3877-3881, 2001.

SABINO, M.A. Oxidation of polycaprolactone to induce compatibility with other degradable polyesters. **Polym. Degrad. Stab.**, v. 92, n.6, p. 986-996, 2007.

SANTIN, M.; WASSALL, M.A.; PELUSO, G.; DENYER, S.P. Adsorption of α -1-microglobulin from biological fluids onto polymer surfaces. **Biomaterials**, v.28, n. 11, p.823-827, June 1997.

SANTOS, L.A. **Desenvolvimento de cimentos de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área médico-odontológica**. 2002. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SARASAM, A.; MADIHALLY, S.V. Characterization of chitosan-polycaprolactone blends for tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 27, p. 5500 - 5508, 2005.

SEIBERT, J.S. Reconstruction of deformed, partially edentulous ridges, *using full thickness onlay grafts*. Technique and wound healing. **Compend. Contin. Educ. Dent.**, v. 4, p. 437-453, 1983.

SHARED. **Sistema esquelético**. Disponível em: <http://dc429.4shared.com/doc/i7ER0vJo/preview.html>. Acesso em: 09 out. 2011.

SHIKINAMI, Y.; OKUNO, M. Bioresorbable devices made of forged composites of hydroxyapatite (HA) particles and poly(L-lactide) (PLLA). Part II: practical properties of miniscrews and miniplates. **Biomaterials**, v. 22, n. 23, p. 3197-211, Dec. 2001.

SHOR, L.; GUCERI, S.; WEN, X.; GANDHI, M.; SUN, W. Fabrication of three-dimensional polycaprolactone/hydroxyapatite tissue scaffolds and osteoblast-scaffold interactions *in vitro*. **Biomaterials**, v. 28, n. 35, p. 5291-7, Dec. 2007.

SILVA, A.R.P. **Estudo das propriedades bioquímicas de sistemas poliméricos arborescentes PGDL-AAS para o tratamento do câncer**. 2008. 142 f. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia) - Universidade Federal de Itajubá, Itajubá.

SILVA, E.C.S.V. **Síntese, caracterização e estudo das propriedades biocompatíveis do poli (ϵ -caprolactona) com topologia estrela**. 2009. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Itajubá, Itajubá.

SILVA, F.M. **Desenvolvimento, caracterização e estudo pré-clínico de dispositivos implantáveis biocompatíveis baseados no polímero poli (ϵ -caprolactona)**. 2011. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

STERN, H.S.; ZOLLE, I.; MCAFFEE, J.G. Preparation of technetium (TC99M)-labelled serum albumin (human). **Int. J. Appl. Radiat. Isotop.** v. 16, 283-288, 1965.

STEVENS, M.M. Biomaterials for bone tissue engineering. **Materials Today**, v.11, n.5, p. 18-25, May 2008.

STUPP, S.I.; BRAUN, P.V. Molecular manipulation of microstructures: biomaterials, ceramics, and semiconductors. **Science**, v. 277, n. 5330, p. 1242–8, Aug. 1997.

TAIZO, F.; YOSHIMURA, M.; TSUNORU, Y.; YASUO, S.; MASAKI, O.; TAKASHI, N. Biodegradation behavior of ultra-high-strength hydroxyapatite/poly(L-lactide) composite rods for internal fixation of bone fractures. **Biomaterials**, v. 21, n. 9, p. 889-98, May 2000.

TAN, J.; SALTZMAN, W.M. Biomaterials with hierarchically defined micro- and nanoscale structure. **Biomaterials**, v. 25, n. 17, p. 3593-3601, Aug. 2004.

THEIN-HAN, W.W.; SHAH, J.; MISRA, R.D.K. Superior in vitro biological response and mechanical properties of an implantable nanostructured biomaterial: nanohydroxyapatite/silicone rubber composite. **Acta. Biomater.**, v. 5, n. 7, p. 2668-79, Sept. 2009.

TOKIWA, Y.; CALABIA, B.P. Biodegradability and biodegradation of polyesters. **J. Polym. Environm.**, v. 15, n. 4, p. 259-67, Oct. 2007.

VANDIVER, J.; DEAN, D.; PATEL, N.; BONFIELD, W.; ORTIZ, C. Nanoscale variation in surface charge of synthetic hydroxyapatite detected by chemically and spatially specific high-resolution force spectroscopy. **Biomaterials**, v. 26, n. 3, p. 271-83, Jan. 2005.

WANG, J.L.; DONG, C.M. Physical properties, crystallization kinetics, and spherulitic growth of well-defined poly(ϵ -caprolactone)s with different arms. **Polymer**, v. 47, n. 9, p. 3218-3228, Apr. 2006.

WANG, W.X.; Y. HAN, S. L.I.; DAI, H.; L. J.I.A.; HE, J. Modification and characterization of hydroxyapatite nanoparticles. **Nanoscience**, v. 11, p. 154-6, 2006.

WATKINS, J. **Estrutura e função do sistema musculoesquelético**. Porto Alegre: Art Med, 2001.

WEBB, H.K.; HASAN, J.; TRUONG, V.K.; CRAWFORD, R.J.; IVANOVA, E.P. Nature inspired structured surfaces for biomedical applications. **Curr. Med. Chem**, v. 18, n. 22, p. 3367-75, Aug. 2011.

WEBER, N.; WENDEL, H.P. Formation of viscoelastic protein layers on polymeric surfaces relevant to platelet adhesion. **J. Biomed Mater. Res.**, v. 72 A, n. 4, p. 420-7, Mar. 2005.

WEI, J.; IGARASHI, T.; OKUMORI, N.; MAETANI, T.; LIU, B.S.; YOSHINARI, M. Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts. **Biomed. Mater.**, v. 4, n. 4, p. 1-7, 2009.

WEI, J.; YOSHINARI, M.; TAKEMOTO, S.; HATTORI, M.; KAWADA, E.; LIU, B.; ODA, Y. Adhesion of mouse fibroblasts on hexamethyldisiloxane surfaces with wide range of wettability. **J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.**, v. 81 B, n. 1, p. 66-75, Apr. 2007.

WILLIAMS, J.M.; ADEWUNMI, A.; SCHEKA, R.M.; FLANAGANA, C.L.; KREBSBACHA, P.H.; FEINBERGD, S.E.; HOLLISTERA, S.J; DASB, S. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. **Biomaterials**, v. 26, n. 23, p. 4817-4827, 2005.

WU, H.; FAN, Y.; SHENG J.; SUI, S.F. Induction of changes in the secondary structure of globular proteins by a hydrophobic surface. **Eur. Biophys. J.**, v.22, n. 3, p.201-5, 1993.

YANJUN, C.; XIAOMEI, M.A.; XIAOZHEN, T.; YINPEI, L. Synthesis, characterization, and thermal stability of star-shaped poly(ϵ -caprolactone) with phosphazene core. **Eur. Polym. J.**, v. 40, n. 2, p. 299-305, 2004.

YILDIRIMER, L.; THANH N.T.K.; LOIZIDOU, M.; SEIFALIAN, A.M. Toxicological considerations of clinically applicable nanoparticles. **Nano Today**, v.6, p. 585-607, 2011.

YOSHIMOTO, M.; WATANABE I.S.; MARTINS M.T. et al. Microstrutural and ultrastructural assessment of inferior alveolar nerve damage following nerve lateralization and implant placement: an experimental study in rabbits. **Int. J. Oral Maxillofac Implants**, v. 24, n.5, p. 859-65, Sept./Oct. 2009.

YOUNG, B.R., PITT, W.G., COOPER, S.L. Protein adsorption on polymeric biomaterials: I. Adsorption isotherms. **J. Coll. Interf. Sci.**, v. 124, n. 1, p. 28-43, July 1988.

ZIMM, B.H.; KILB, R.W. Dynamics of branched polymer molecules in dilute solution. **J. Polym. Sci.**, v. 37, n. 131, p. 19-42, May 1959.