



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**DESENVOLVIMENTO DE ESTRUTURAS POLIMÉRICAS BIOATIVAS
MACROPOROSAS DESTINADAS À ENGENHARIA DE TECIDO
ÓSSEO**

GABRIELA BORGES SOARES

QUÍMICA INDUSTRIAL

ORIENTADOR: PROF. DR. ROBERTO HÜBLER

Dissertação de Mestrado realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre/Doutor em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

Trabalho vinculado ao Projeto

**Porto Alegre
Março, 2015**



**DESENVOLVIMENTO DE ESTRUTURAS POLIMÉRICAS
BIOATIVAS MACROPOROSAS DESTINADAS À
ENGENHARIA DE TECIDO ÓSSEO.**

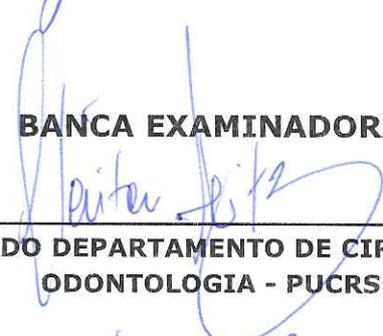
CANDIDATA: GABRIELA BORGES SOARES

Esta Dissertação de Mestrado foi julgada para obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.



DR. ROBERTO HUBLER - ORIENTADOR

BANCA EXAMINADORA



**DR. CLÁITON HEITZ - DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - PUCRS**



DRA. NARA REGINA DE SOUZA BASSO - DO PGETEMA/FENG - PUCRS

O que sabemos é uma gota; o que não sabemos é um oceano.

(Isaac Newton)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais por sempre me incentivarem, por apostarem e por confiarem demais em mim e em minhas escolhas. Atribuo e agradeço a eles todas as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu professor Dr. Roberto Hübler pela orientação desde o último ano de minha graduação até o final do mestrado, além da confiança e dedicação e pelas oportunidades atuais e futuras que vem me oferecendo.

Meu agradecimento aos colegas do laboratório GEPSI é especialmente à grande dedicação, à incansável ajuda da amiga, Mariane, que foi quem me apresentou a esta magnífica área de pesquisa e é quem mais contribui para/com o meu trabalho; à amizade da Mariana, da Renata, do André, do professor Roberto e principalmente às boas risadas da Fabiana, que no último ano se tornou uma grande amiga. Agradeço também à Milena pela amizade, pelas ajudas e pelo bom humor que sempre transmite e a todos os colegas do prédio 96 A que se fizeram presente em meus dias.

Agradeço aos amigos mais próximos, que acompanharam esses anos de estudo. À Giovanna, que sempre esteve presente e disposta a me ajudar e me animar nos momentos mais complicados, à Gabrielly, à Leticia, à Vanessa e ao Paulo, que nunca deixaram de fazer parte de minha vida desde nosso encontro ainda no início da graduação de Química.

À minha irmã, Raquel por ter sido meu exemplo, mesmo sendo a caçula, por mostrar uma dedicação enorme aos estudos.

Ao meu namorado, Felipe, que entrou em minha vida nesta importante etapa da minha formação, por me fazer mais feliz, por me incentivar e se propor a me ajudar sempre.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	3
AGRADECIMENTOS.....	4
SUMÁRIO	5
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVEATURAS	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivos Específicos	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1. Tecido Ósseo.....	19
3.1.1. Enxerto ósseo	23
3.2. Biomateriais.....	24
3.2.1. Biocerâmicas e Hidroxiapatita.....	26
3.2.2. Polímeros Biodegradáveis e PLGA.....	29
3.3. Engenharia de Tecidos	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1. Metodologia I	36
4.2. Metodologia II	37
4.3. Confecção de membranas poliméricas	40
4.4. Tratamento de amostras com hidróxido de sódio	40
4.5. Análises e Caracterizações	41
4.5.1. Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo (MEV-FEG)	41
4.5.2. Ângulo de contato	41
4.5.3. Degradação hidrolítica	42
4.5.4. Ensaio de compressão.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	44

5.1. Resultados preliminares.....	44
5.2. Caracterização das membranas.....	46
5.3. Resultados principais: realizados a partir de <i>scaffolds</i> confeccionados pela Metodologia II	49
5.3.1. Morfologia superficial dos <i>scaffolds</i>	49
5.3.2. Ensaio de degradação hidrolítica.....	57
5.3.3. Ensaio de compressão.....	61
6. CONCLUSÕES	666
7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	688
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
APÊNDICES	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Fotografia de fêmur humano com um núcleo perfurado removido. Tomografia de raio X: imagem do osso esponjoso retirado do fêmur proximal à articulação do joelho.	20
Figura 3.2. Osteoblastos e osteoclastos no mesmo osso	21
Figura 3.3. Estrutura óssea interna exibindo osso compacto e trabecular	22
Figura 3.4. Fragmento de mandíbula do povo maia encontrada na Playa de los Muertos em 1931	24
Figura 3.5. Micrografia de cristais de hidroxiapatita	27
Figura 3.6. Micrografia de grânulo de hidroxiapatita provindo de enxerto ósseo	28
Figura 3.7. Rota metabólica de biorreabsorção dos poliésteres PLA e PGA	30
Figura 3.8. Estrutura química do PLGA, na qual m representa as unidades de ácido glicólico e n representa as unidades de ácido láctico	30
Figura 3.9. Reação de hidrólise de éster.....	31
Figura 3.10. Substituição de nariz a partir do braço. Processo utilizado por Tagliacozzi no século XVI	32
Figura 3.11. Resumo da técnica utilizada pela Engenharia de tecidos. Imagem adaptada	33
Figura 4.1. Pastilhador (a) e prensa hidráulica (b)	38
Figura 4.2. <i>Scaffold</i> (depois de prensado), contendo ainda grânulos de cloreto de sódio.....	38
Figura 4.3. Fluxograma mostrando variações dos <i>scaffolds</i> confeccionados	39
Figura 4.4. Relação entre ângulo de contato e molhabilidade. Imagem adaptada....	42
Figura 5.1. Micrografia da Hidroxiapatita utilizada no compósito	44
Figura 5.2. Micrografias da amostra T com magnificações de 40x (a) e 250x (b)	45

Figura 5.3. Micrografias da amostra V com magnificações de 80x (a) e 250x (b).....	46
Figura 5.4. Micrografia evidenciando a espessura de uma membrana de PLGA sem tratamento (a) e com tratamento químico (b)	47
Figura 5.5. Gotas d'água sobre as superfícies de membrana não tratada (a) e membrana tratada (b).....	48
Figura 5.6. Diferença entre ângulos de contato de amostras sem tratamento (ST) onde a média fora 116,6° e amostras tratadas em solução NaOH (0,5M), onde a média dos ângulos fora igual a 77,6°,	48
Figura 5.7. Micrografias de membranas não tratadas (a) e (c); e tratadas quimicamente (b) e (d)	49
Figura 5.8. . Micrografia de <i>scaffold</i> A1 com magnificação de 25x	50
Figura 5.9. Micrografias de <i>scaffold</i> A2 (a) e <i>scaffold</i> C4 (b) com magnificações de 100x	50
Figura 5.10. Micrografias de <i>scaffold</i> B3 (a) e <i>scaffold</i> D3 (b) magnificações de 100x	51
Figura 5.11. Micrografias de <i>scaffold</i> A4 (a) e <i>scaffold</i> C4 (b) ambas com magnificações de 500x.....	51
Figura 5.12. Micrografias de <i>scaffolds</i> A4 (a), B2 (b), C3 (c) e D3 (d).....	52
Figura 5.13. Micrografias evidenciando porosidade dos muros internos de <i>scaffold</i> A3 em magnificações de 150x (a) e 1000x (b)	53
Figura 5.14. Micrografias de <i>scaffold</i> A1 apresentando diâmetros de poros de 5,15µm (a), 60,7 µm (b) e acima de 500 µm (c)	54
Figura 5.15. Micrografias de <i>scaffold</i> A1 (a) e <i>scaffold</i> B1 (b) com magnificações de 2000x	55
Figura 5.16. Micrografias de <i>scaffolds</i> não tratados, B1 (a) e A1 (c) e <i>scaffolds</i> tratados quimicamente, C2 (b) e A2(d)	56
Figura 5.17. Diferença de rugosidade em superfícies de <i>scaffold</i> não tratado, A1 (a) e <i>scaffold</i> tratado quimicamente, A2 (b).....	57
Figura 5.18. Porcentagens de degradação mássica de <i>scaffolds</i> A1 e A2 (a), B1 e B2 (b), C1 e C2 (c) e D1 e D2 (d)	58

Figura 5.19. Micrografias de <i>scaffold</i> D1 antes da degradação (a,b), <i>scaffold</i> D1 após 42 dias de degradação (c,d) e <i>scaffold</i> D2 após 42 dias de degradação (e,f).	59
Figura 5.20. Percentagem de PBS absorvido pelos <i>scaffolds</i> durante ensaio de degradação.	60
Figura 5.21. Percentagem mássica de PBS absorvido pelos <i>scaffolds</i> B1 e B2 durante degradação nos tempos de 14, 21, 28, 35 e 42 dias.	61
Figura 5.22. Comportamento mecânico de <i>scaffolds</i> A1 em compressão de até 10 N (a) e em compressão de até 50 N (b).....	62
Figura 5.23. Alinhamento de poros em <i>scaffolds</i> A1	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1. Relação das amostras confeccionadas sob vácuo	45
Tabela 5.2. Média de Módulo de Young e Valores de ruptura dos distintos <i>scaffolds</i> confeccionados.	64

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVEATURAS

cm	Centímetro
h	Hora
HA	Hidroxiapatita
k	Quilo
L	Litro
M	Molar
m	Metro
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MPa	MegaPascal
N	Newton
nm	Nanômetro
Pa	Pascal
PBS	Tampão fosfato-salino
PGA	Ácido poli (glicólico)
pH	Potencial hidrogeniônico
PLA	Ácido poli (lático)
PLGA	Ácido poli (glicólico-co-lático)
PLLA	Ácido poli-L-lático
PMMA	Polimetilmetacrilato
t	Tonelada
ε	Epsilon
γ	Gama
θ	Theta
μm	Micrometro

RESUMO

SOARES, Gabriela Borges. **Desenvolvimento de Estruturas Poliméricas Bioativas Macroporosas Destinadas à Engenharia de Tecido Ósseo**. Porto Alegre- RS. 2015. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

Lesões em tecido ósseo chegam a somar 15 milhões de casos por ano mundialmente. Diante disso, uma quantidade significativa de transplantes de tecidos ósseos tem sido realizada nos últimos anos. Uma alternativa promissora para enxertos ósseos está na área da engenharia de tecidos, que se baseia na utilização de estruturas poliméricas atuando como *scaffolds* para regeneração do tecido duro. O objetivo deste trabalho foi buscar a associação entre o copolímero PLGA e a biocerâmica hidroxiapatita com a finalidade de formar uma estrutura polimérica bioativa macroporosa. A confecção foi dada através da dissolução de PLGA em clorofórmio, seguida da adição de hidroxiapatita e cloreto de sódio (agente porogênico). A moldagem das amostras foi realizada por compressão em prensa hidráulica. Após, foi feita a lixiviação das amostras, seguida do tratamento com NaOH. Finalmente os compósitos obtidos foram caracterizados através de MEV-FEG, visando analisar qualitativamente a morfologia, a porosidade e a interconectividade dos poros; a hidrofiliabilidade das superfícies foi analisada por testes de molhabilidade em que foi comprovada a eficiência do tratamento químico; ensaios de degradação hidrolítica realizados em função do tempo revelaram que o percentual de degradação dos diferentes tipos de *scaffolds* não apresentou mudança significativa entre os tempos de 14 e 42 dias. O ensaio de degradação hidrolítica constatou ainda que a retenção de líquido fora maior em *scaffolds* tratados quimicamente; os ensaios de compressão avaliaram o comportamento mecânico dos diferentes tipos de *scaffolds* confeccionados. Concluiu-se, então, que a metodologia utilizada originou compósitos macroporosos que podem vir a ser aplicados na engenharia de tecido ósseo.

Palavras-Chaves: Biomateriais, Hidroxiapatita, PLGA, Engenharia de tecidos.

ABSTRACT

SOARES, Gabriela Borges. **Development of polymeric bioactive macroporous structures for Bone Tissue Engineering**. Porto Alegre - RS. 2015. Master. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

Lesions in bone tissue reach 15 million cases per year worldwide. Thus, a significant amount of bone tissue transplants have been performed in recent years. A promising alternative to bone graft is in the field of tissue engineering, which is based on the use of polymeric structures acting as support for hard tissue regeneration. The objective of this project was look for the association of the PLGA copolymer, to the bioceramic hydroxyapatite, to form a polymeric bioactive macroporous structure. The preparation was made through the PLGA dissolution in chloroform, followed by addition of sodium chloride and hydroxyapatite (porogenic agent). Molding of the samples was performed by compression in hydraulic press. After, was performed the leaching of the *scaffolds*, followed by treatment with NaOH. Finally the composites obtained were characterized by FEG - SEM, in order to analyze qualitatively the morphology, porosity and interconnectivity of the pores; the hydrophilicity of the surface was evaluated by wettability tests it was proved chemical treatment efficiency; *in vitro* hydrolytic degradation assays performed as a function of time demonstrate that the percentage of degradation of various types of *scaffolds* did not showed significant changes between 14 and 42 days. Hydrolytic degradation assays found yet that the fluid retention was higher in *scaffolds* chemically treated; compression tests evaluated the mechanical behavior of different types of *scaffolds* made. It was concluded then that the methodology used originated macroporous composites that may be applied in bone tissue engineering.

Key-words: Biomaterials, Hydroxyapatite, PLGA, Tissue Engineering.

1. INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida da população mundial traz como consequência maiores quantidades de doenças relacionadas à estrutura óssea, inclusive a osteoporose. Isso resulta numa maior demanda pelos setores de ortopedia, provocando, dessa forma, a necessidade do estudo de materiais utilizados para substituição e regeneração de tecido ósseo [1]. A osteoporose provoca diminuição progressiva da densidade óssea e aumento do risco de fraturas. Atualmente no mundo há cerca de 200 milhões de pessoas atingidas por essa doença. Apenas no Brasil, cerca de 70 mil pessoas fraturam o colo do fêmur por ano [2]. Fraturas de ossos são formas muito comuns de lesões. Dados dos últimos anos apontam uma estimativa anual de 15 milhões de fraturas a nível mundial, em que cerca de 10% dos casos necessitam do preenchimento com enxertos [3]. Nos Estados Unidos, por exemplo, a cada ano, aproximadamente 170.000 fraturas ósseas não atingem a cura (devido à gravidade da lesão) sem auxílio de enxertos [4].

A fim de incentivar o processo de cicatrização-regeneração óssea, enxertos ósseos são muitas vezes necessários. O autoenxerto (ou enxerto autólogo) consiste em retirar um pedaço de osso do corpo do paciente (colhido normalmente a partir da crista íliaca, do fêmur, da tíbia ou das costelas) [5] e enxertá-lo para preencher a área danificada. Como o enxerto é oriundo do corpo do paciente, o risco de rejeição é muito baixo, porém, apesar do osso esponjoso autógeno ser considerado padrão para enxertos ósseos, existem várias limitações, tais como a pouca disponibilidade, o aumento da perda de sangue ao se operar dois locais no mesmo paciente e o potencial de vulnerabilidade do local doador. Os enxertos ósseos também podem provir de um doador, neste caso são chamados de enxertos alógenos ou aloenxertos e são oriundos de um banco de ossos humanos. O Brasil conta com

cinco bancos de ossos ativos: Passo fundo/RS (BTME - Banco de Tecidos Músculoesqueléticos Hospital São Vicente de Paulo), Marília/SP (UNIOSS), USP/SP (Banco de Tecidos do IOT), Santa Casa/SP (Banco de Tecidos Salvador Arena) e Rio de Janeiro/RJ (Banco de Tecidos Músculoesqueléticos / Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia) [6]. Todavia, enxertos alógenos também são problemáticos devido aos riscos de infecção, transmissão de patógenos e rejeição imunológica [7-8]. No primeiro semestre do ano de 2014 foram realizados 10.388 mil transplantes ósseos em nosso país, sendo que 761 foram para as cirurgias ortopédicas e 9.614 para as odontológicas. Dentre os estados que mais transplantaram tecido ósseo estão São Paulo, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro, com, respectivamente, 9.751, 322 e 310 transplantes realizados. Assim como na doação de órgãos, a demanda por tecidos musculoesqueléticos, incluindo tecidos ósseos, esbarra na falta de informação por parte de familiares e profissionais [9]. Portanto, o método da criação de enxertos ósseos artificiais que possam reproduzir as características de osso é uma grande opção para a profissão médica [4]. Além do mais, lesões ósseas normalmente causam dores e perda de mobilidade. O dano e a perda de tecidos levam a alterações metabólicas e estruturais que podem causar doenças significativas e diminuir a qualidade de vida [10]. À vista disso, a engenharia de tecidos fornece substitutos biológicos e fisiológicos que podem suprir a perda de tecido devido a doenças ou a acidentes. Entretanto, as propriedades mecânicas de resistência, dureza, superfície e módulo de elasticidade de polímeros comumente utilizados (tais como PMMA, PET, PGA, PLA e PLGA), normalmente, são menores do que as propriedades do osso natural. Por conta disso, nos últimos anos, polímeros têm sido aplicados juntamente às cerâmicas para reconstituição de tecidos, tais como osso, cartilagem, tendões e ligamentos. Isso implica na melhoria das propriedades mecânicas do *scaffold* em comparação com a matriz de polímero puro [10].

Para ser considerado um *scaffold* ideal, o material deve apresentar características como morfologia e propriedades mecânicas semelhantes às do tecido a ser restaurado. Transições nas propriedades mecânicas, nas taxas de degradação e nas propriedades de crescimento interno das células podem ser realizadas através de implantes com gradientes de composição e/ou porosidade variáveis [11].

Dentro da engenharia de tecidos são utilizados polímeros biorreabsorvíveis com diferentes pesos moleculares, cristalinidades, propriedades mecânicas e tempos de absorção. Entre os polímeros mais aplicados estão o ácido polilático (PLA) e o ácido poliglicólico (PGA), que podem ser fabricados separadamente ou em combinações com os seus isômeros (originando assim o Ácido poli (*glicólico-co-lático*), PLGA) [12,13].

Paralelamente aos polímeros biorreabsorvíveis, apatitas de fosfato de cálcio, como a hidroxiapatita (HA), têm sido largamente estudadas para a reparação e substituição de tecidos ósseos danificados ou traumatizados [14]. A semelhança da HA com os fosfatos de cálcio do osso real inspira pesquisadores a utilizá-la para aplicações biomiméticas [4,15,16]. A engenharia de tecidos apresenta uma alternativa ao tratamento de lesões ósseas utilizando compósitos de polímeros biodegradáveis, como o ácido poli (lático-co-glicólico) e fosfatos de cálcio, como a hidroxiapatita. A combinação das características de ambos os materiais possibilita a elaboração de *scaffolds* poliméricos que apresentem propriedade mecânica, biocompatibilidade e biodegradabilidade apropriadas quando se tem como finalidade a engenharia de tecidos [10,17]. Uma excelente alternativa para enxerto ósseo é desenvolver materiais à base de polímero contendo reforços mais duros e mais fortes que o próprio polímero com constituintes tais como fibras, cristais, ou partículas [4].

A hidroxiapatita tem uma elevada resistência mecânica, semelhante ao mineral natural dos ossos. A combinação do biopolímero PLGA com biocerâmicas tais como a HA pode produzir um biomaterial vantajoso para aplicações na área biomédica [18]. Por conseguinte, é importante que o material escolhido como enxerto seja facilmente colonizado pelas células, de modo que o osso possa regenerar e vir a substituir o biomaterial. Para isso, é necessário que o material seja poroso, mas também reabsorvível, para ser substituído pelo tecido ósseo. A presença da porosidade permite que as células migrem para o material inteiro e não unicamente na superfície. Os poros são caracterizados pelo seu volume, seu tamanho, sua forma e também pelas conexões que existem entre eles. A porosidade irá influenciar a reabsorção do material pelo organismo. Torna-se importante

coincidir a taxa de reabsorção do polímero com o tempo de regeneração de tecido ósseo a fim de não interferir na formação do tecido e nem, ao contrário, desaparecer muito rapidamente a ponto de não servir como um suporte para a regeneração óssea [19,20]. É desejável que este tipo de biomaterial seja reabsorvido lentamente e substituído por um tecido natural. Isso significa que o sistema biorreabsorvível interno deve manter a estabilidade dos fragmentos durante o processo de reparação do osso, com a função de transferir gradualmente a tensão ao osso na medida em que o sistema está sendo reabsorvido pelo organismo [12, 21,22].

O objetivo deste trabalho é confeccionar e caracterizar compósitos bioativos dotados de alta porosidade associando o ácido poli (lático-co-glicólico) à hidroxiapatita, visando a aproximação das propriedades do osso real, tais como características de morfologia, composição e propriedades mecânicas. A confecção dos *scaffolds* será dada primeiramente a partir da dissolução do polímero em clorofórmio, seguida da adição da biocerâmica (HA) e de um agente porogênico, (NaCl).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como finalidade desenvolver estruturas poliméricas tridimensionais providas de alta porosidade, aliando o ácido poli (*lático-co-glicólico*) à hidroxiapatita para futura aplicação na área de engenharia de tecido ósseo.

2.1. Objetivos Específicos

- Confeccionar *scaffolds* macroporosos aliando PLGA à HA;
- Confeccionar membranas porosas a partir de solução de PLGA e NaCl;
- Realizar tratamento químico em *scaffolds* em solução de hidróxido de sódio;
- Comparar molhabilidade de *scaffolds* tratados e não tratados quimicamente através da análise de ângulo de contato;
- Caracterizar a morfologia dos *scaffolds* (avaliando rugosidade, porosidade e interconectividade de poros);
- Realizar ensaio de degradação hidrolítica em função do tempo, acompanhando possíveis mudanças no pH da solução;
- Avaliar o comportamento mecânico através de ensaio de compressão.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Tecido Ósseo

O tecido ósseo é o tecido mais resistente do organismo humano. Sua função baseia-se no suporte de tensões e forças, além de proteção e locomoção. Sobretudo, o tecido ósseo é um importante meio de armazenamento de minerais e possui também função no equilíbrio orgânico. Ossos compõem-se de uma matriz orgânica resistente, fortalecida por depósitos de sais de cálcio [23,24].

O esqueleto humano possui uma pluralidade de funções:

- É um dos principais órgãos para a homeostase do cálcio (processo de regulação pelo qual o organismo consegue a constância do seu equilíbrio) e um armazenamento significativo de cálcio, fosfato, magnésio, potássio e sódio;
- Proporciona um suporte mecânico para os tecidos macios e é alavanca para a ação do músculo, conferindo a rigidez necessária para o suporte do corpo humano;
- Protege e aloja órgãos como coração e pulmão (caixa torácica), bem como o encéfalo (caixa craniana);
- É o principal local de hematopoese no humano adulto, no qual o tecido esponjoso de ossos com medula vermelha vem a produzir células sanguíneas [23-25].

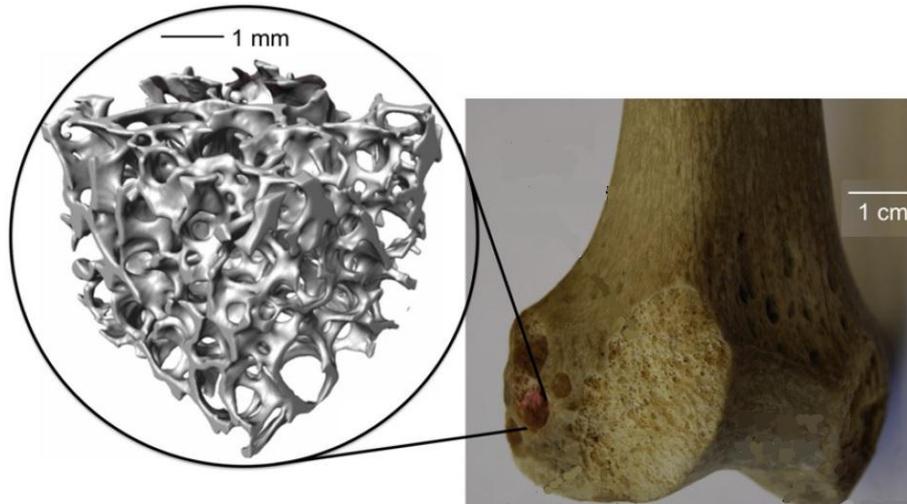


Figura 3.1. Fotografia de fêmur humano com um núcleo perfurado removido. Tomografia de raio X: imagem do osso esponjoso retirado do fêmur proximal à articulação do joelho [26].

A figura 3.1 apresenta um fêmur com uma imagem de tomografia de raios X do osso esponjoso removido. O osso esponjoso possui uma rede de poros interconectados com poros superiores a 500 μm com grandes interconexões entre eles [26]. A matriz óssea é composta por uma parte orgânica e uma parte inorgânica. Os sais cristalinos depositados na matriz orgânica do osso compõem-se basicamente de cálcio e fósforo e são denominados hidroxiapatitas [24,27]. As principais células presentes no tecido ósseo são os osteócitos (osteoblastos antigos enterrados na matriz óssea), os osteoblastos (células mesenquimais), os osteoclastos, e as células de revestimento ósseo, que são osteoblastos inativos localizados na superfície do osso [28,29].

Os osteoblastos e os osteoclastos fazem parte do processo de osseointegração, estimulando a formação de um novo tecido ósseo, a osteogênese. Os osteoclastos são responsáveis pela remodelação e renovação do tecido ósseo. São células gigantes multinucleadas que são especializadas nos processos de reabsorção da matriz óssea. Osteoclastos e osteoblastos estão representados na figura 3.2.

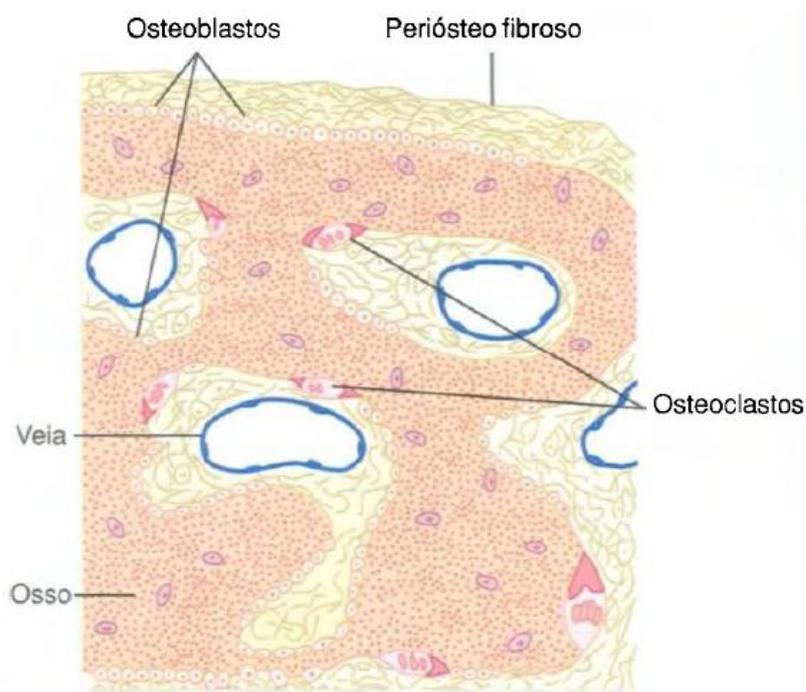


Figura 3.2. Osteoblastos e osteoclastos no mesmo osso [24].

Os osteoblastos criam o novo osso e são responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos e inorgânicos da matriz óssea. Além de serem responsáveis pela formação da matriz óssea, os osteoblastos são responsáveis pela sua mineralização [30].

O osso sofre contínua deposição de osteoblastos e ininterrupta absorção nos locais onde os osteoblastos se encontram ativos. Uma discreta atividade osteoblástica ocorre continuamente em todos os ossos vivos (em torno de 4% de todas as superfícies em qualquer dado momento no adulto) [24]. O osso neoformado imaturo é o osso recém formado pelos osteoblastos, sendo a base de formação do tecido ósseo maduro. O tecido ósseo imaturo é gradualmente reabsorvido pelos osteoclastos e substituído por tecido ósseo maduro, ou lamelar [30]. Exceto nos ossos em crescimento, as taxas de deposição e absorção óssea costumam ser equivalentes entre si, de modo que a massa total de tecido ósseo permanece constante [24].

Os osteoclastos comumente subsistem em massas pequenas, mas concentradas e, uma vez desencadeado seu desenvolvimento, tais massas

costumam destruir o osso em cerca de 3 semanas. No término desse período, os osteoclastos desaparecem e o túnel é invadido pelos osteoblastos; em seguida, inicia-se o desenvolvimento de um novo tecido ósseo. A deposição óssea, então, prossegue por vários meses, ocorrendo o assentamento do novo tecido em sucessivas camadas de círculos concêntricos (lamelas) sobre as superfícies internas da cavidade. Essa deposição do novo tecido ósseo cessa quando o osso começa a invadir os vasos sanguíneos da área [24].

O tecido ósseo é dividido entre tecido ósseo compacto (ou denso) e tecido ósseo trabecular (ou esponjoso ou reticulado). Ambos os tecidos apresentam o mesmo tipo de célula e de substância intercelular, porém diferem-se por possuírem uma distinta disposição de seus elementos e diferentes quantidades de espaços medulares. O tecido ósseo trabecular possui espaços medulares mais amplos, sendo formado por várias trabéculas, que dão aspecto poroso ao tecido, conforme apresentado na Figura 3.3. O tecido ósseo compacto praticamente não possui espaços medulares, existindo, no entanto, além de canalículos, um conjunto de canais que são percorridos por nervos e vasos sanguíneos, chamados canais de Volkmann e canais de Havers. Os ossos apresentam grande sensibilidade e capacidade de regeneração por possuírem uma estrutura inervada e irrigada [27].

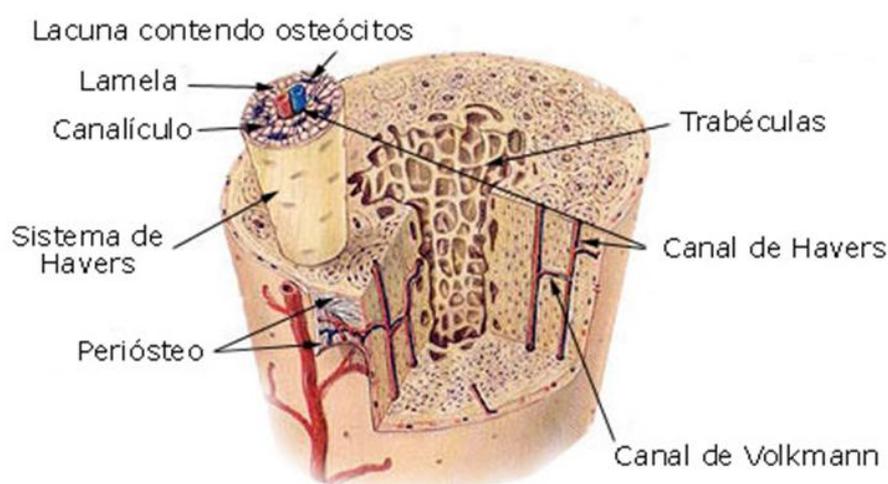


Figura 3.3. Estrutura óssea interna exibindo osso compacto e trabecular [32].

3.1.1. Enxerto ósseo

O osso é um dos órgãos mais frequentemente reparados no corpo humano [33]. Os enxertos ósseos têm sido muito usados para preencher defeitos de ossos causados por trauma ou doença, tais como fraturas, infecções e tumores [34]. As modalidades de tratamento existentes incluem enxertos autógenos, alógenos, xenógenos e sintéticos. Os tipos de enxertos mais raros são os xenógenos (provenientes de doadores de espécies diferentes). Esses são normalmente produzidos a partir de osso bovino cortical ou medular liofilizados. Sua não utilização muitas vezes se deve a aspectos culturais e religiosos [35].

Enxertos autógenos (oriundos do próprio paciente) são a escolha clinicamente preferida para enxerto ósseo, pois tem a enorme vantagem de histocompatibilidade sem os riscos de transmissão de doenças e ainda é o melhor material para reparação óssea. No entanto, o tecido autógeno possui a desvantagem de ser um suprimento limitado. Ademais, há a necessidade de dois procedimentos cirúrgicos para a realização de um autoenxerto (o primeiro para retirada do osso do local doador e o segundo para a inserção desse tecido ósseo já esculpido no local da falha). Enxertos alógenos (provenientes de doadores de mesma espécie) são limitados pelos riscos de transmissão de doenças e por histo-incompatibilidades. Embora os enxertos ósseos alógenos tenham melhor disponibilidade que autoenxertos eles possuem a desvantagem de poder acarretar na transmissão de doenças e causar respostas imunes. No entanto, a disponibilidade limitada de enxertos naturais requer o desenvolvimento de substitutos ósseos alternativos. Enxertos sintéticos à base de materiais cerâmicos têm propriedades mecânicas significativamente diferentes quando comparados com o tecido ósseo humano. A incompatibilidade muitas vezes resulta em falha do implante e, conseqüentemente, em uma cirurgia de revisão [36-38].

O desenvolvimento de materiais biodegradáveis como substitutos ósseos para o preenchimento de grandes defeitos tem sido bastante estudado pela engenharia de tecido ósseo. Estes materiais devem manter a força mecânica

adequada, ser osteocondutores e degradarem-se com uma velocidade controlada para proporcionar espaço para a formação do novo osso [38,39]. Um implante poroso promove o crescimento de tecido ósseo também na parte interna da matriz e funciona fornecendo suporte estrutural inicial ao promover a integração do implante com o osso circundante. À medida que a matriz polimérica se degrada, o tecido ósseo novo gradualmente infiltra-se na estrutura, de forma que o implante possa ser completamente substituído pelo osso, sendo assim capaz de suportar cargas de nível fisiológico [36,40]. Compósitos de polímeros biodegradáveis aliados a biocerâmicas são materiais promissores para enxertos ósseos e têm sido extensivamente investigados [38].

3.2. Biomateriais

A utilização de biomateriais é relatada desde entre 1200 e 700 a.C., quando o povo que habitou a península itálica, os etruscos, desenvolveu métodos de substituições de dentes, utilizando ossos de boi esculpidos. O povo maia, em 600 a.C. alcançou a integração óssea a partir de conchas do mar esculpidas e inseridas diretamente na mandíbula a fim de suprir a falta de dentes, mostrado na Figura 3.4 [41].

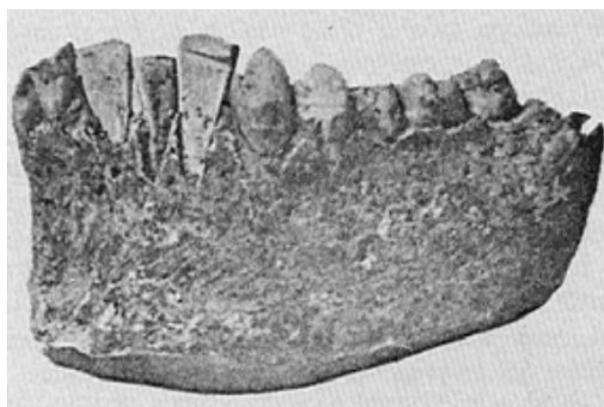


Figura 3.4. Fragmento de mandíbula do povo maia encontrada na Playa de los Muertos em 1931 [42].

No Egito antigo, utilizava-se linho para realização de suturas, já na Europa, na idade média, as suturas eram feitas com um fio retirado do intestino de animais, como gato ou carneiro (chamado categute). Relatos descrevem inclusive a utilização

de fios de ouro para suturas entre 130-200 d.C. Em 1816 Philip Physick sugeriu a utilização de fios de chumbo para a sutura, porém, evidentemente, houve relatos de reações adversas [41].

O conhecimento biomédico tem evoluído muito nos últimos anos. Simultaneamente a isso surgiu esta nova classe de materiais aplicados à biomedicina, os biomateriais. Há inúmeras definições para biomateriais. Na década de 1980, um biomaterial era considerado qualquer material não vivo usado como dispositivo médico, projetado para ter interação com sistemas biológicos [43]. No início da década de 1990, após a “Conferência sobre Consenso nas Definições em Biomateriais”, em Chester, passou-se a considerar um biomaterial todo material que visa interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo [44-46]. Já segundo Park e Lakes um biomaterial pode ser definido como qualquer material usado na fabricação de dispositivos para substituir uma parte ou função do corpo de forma segura, confiável, econômica e fisiologicamente aceitável [47]. Outro conceito, relatado por Park e Bronzino [48] define como biomaterial toda a substância (à exceção de fármacos) ou combinação de substâncias, sintéticas ou naturais, que podem ser utilizadas durante determinado intervalo de tempo, como uma parte de um sistema que trate, aumente, ou substitua tecidos, órgãos, ou funções do corpo.

Existem várias classes de biomateriais, tais como os metais (titânio, que é amplamente usado como substituinte ósseo), os polímeros (PMMA, PET, PGA, PLA, PLGA, etc.), as cerâmicas (alumina, zircônia, hidroxiapatita, etc.) e ainda materiais que ocorrem naturalmente (raros, mas, como exemplo, têm-se os corais marinhos das famílias Poritidae e Goniopora, que podem ser convertidos em hidroxiapatita) [49]. É também possível criar biomaterial compósitos através da combinação de materiais de diferentes classes [50,51].

3.2.1. Biocerâmicas e hidroxiapatita

As biocerâmicas estão entre os materiais mais estudados no ramo de regeneração e reposição de tecidos ósseos. Isso é devido a sua ampla possibilidade de uso, pois podem ser empregadas revestindo sistemas de próteses metálicas ou podem ser associadas a polímeros sintéticos ou naturais dando origem a compósitos [52-55]. De modo geral, os materiais cerâmicos compreendem grandes variedades de substâncias naturais e sintéticas, como vidro, tijolos, pedras e porcelanas, e podem ser compostos de elementos metálicos e não metálicos. Nas últimas quatro décadas observou-se um enorme avanço no campo das biocerâmicas, influenciando no desenvolvimento de materiais cerâmicos para uso na área médica, na reparação esquelética e na reconstrução óssea [52].

As biocerâmicas são definidas como materiais cerâmicos destinados a obter um comportamento fisiológico específico para utilização de um material na construção de dispositivos protéticos artificiais ou de órgãos internos [52,56]. O interesse tem sido dirigido para as propriedades vantajosas da cerâmica, incluindo os seus excelentes níveis de bioatividade, resistência química, resistência à compressão e resistência ao desgaste [57]. A propriedade de bioatividade é uma grande vantagem para a engenharia de tecidos. O termo bioativo é referido a um material que induz uma resposta biológica específica, neste caso, um material que é capaz de induzir a deposição de cristais de apatita na sua superfície. Sendo assim, as reações bioquímicas e biofísicas ocorrentes com o tecido promoverão o crescimento do osso [58]. Cerâmicas bioativas tem a capacidade de aumentar a diferenciação dos osteoblastos, bem como o crescimento deles [38,59].

As primeiras tentativas para substituir tecido ósseo com biomateriais visavam restaurar funções básicas pela reparação dos defeitos causados por lesões e doenças, no entanto o objetivo era chegar a uma resposta biológica mínima do ambiente fisiológico [57]. Tendo como foco a engenharia de tecidos ósseos, cabe salientar que durante o processo de reconstrução do tecido ósseo a osteocondução (interação das células osteogênicas com a biocerâmica) é de extrema importância para a regeneração óssea. Por ser classificada como um material osteocondutor, a

hidroxiapatita possui a capacidade de acelerar a formação de novo osso a volta do implante, reduzindo assim o tempo de cicatrização. Sua incorporação em dispositivos poliméricos oferece uma estrutura mineral que disponibiliza cálcio e fósforo para a neoformação óssea, ademais, neutraliza os subprodutos ácidos da degradação polimérica [60-63].

Dentre os diferentes tipos de biomateriais, as cerâmicas bioativas, como a hidroxiapatita, são fortes aliadas à engenharia de tecidos para a substituição de tecidos duros do corpo [64]. A hidroxiapatita é o mineral mais importante encontrado no tecido ósseo, é constituída por cálcio e fósforo e possui a seguinte fórmula molecular: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ [28]. A Figura 3.5 apresenta uma imagem de micrografia de cristais de hidroxiapatita na sua fase mineral, enquanto a Figura 3.6 apresenta a micrografia de um grânulo de hidroxiapatita provindo de um enxerto ósseo dotado de porosidade a nível macro e microestrutural.

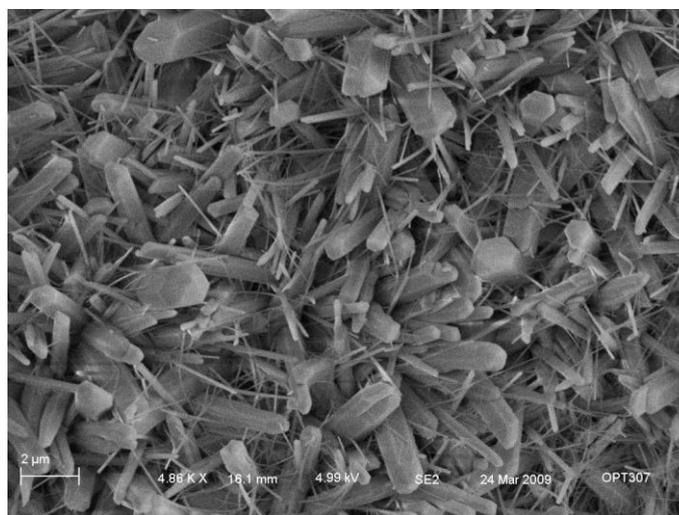


Figura 3.5. Micrografia de cristais de hidroxiapatita [65]

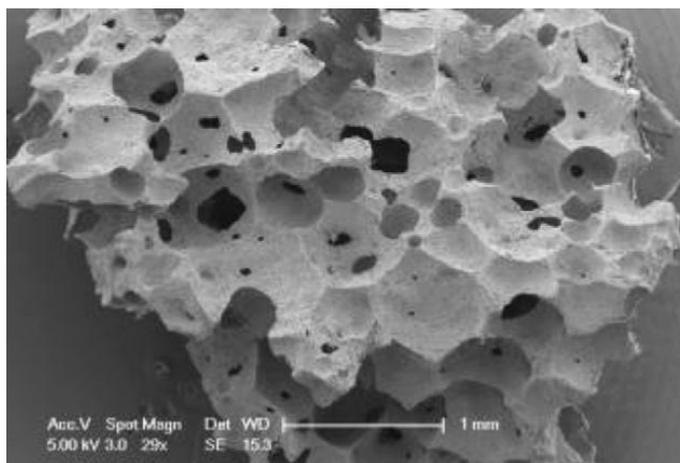


Figura 3.6. Micrografia de grânulo de hidroxiapatita provindo de enxerto ósseo [57].

Fosfatos de cálcio são comumente usados para uma variedade de aplicações que abrangem todas as áreas do esqueleto, incluindo a fusão espinhal, reconstrução craniomaxilofacial, tratamento de defeitos ósseos, tratamento de fraturas e aumento ósseo [57]. Por serem consideradas a fase de cálcio mais próxima à fase mineral do osso humano, as hidroxiapatitas não induzem reações imunológicas e tóxicas quando implantadas em locais ósseos de animais e de seres humanos [66,67]. Este material tem alto potencial para ser usado como revestimento superficial para gerar crescimento ósseo e promover a fixação biológica de próteses [68,69]. Os cristais de hidroxiapatita possuem o tamanho aproximado entre 10 a 100 nm e são encontrados ao longo das fibrilas de colágeno. A dureza e a resistência do tecido ósseo são resultantes da associação entre os cristais de hidroxiapatita e as fibras [70].

Trabalhos envolvendo o interesse no uso de hidroxiapatita em implantes ósseos vêm sendo relatados desde os anos 1980 e 1990 [71]. Embora HA tenha excelentes propriedades de biocompatibilidade, seu uso muitas vezes é limitado devido à sua natureza frágil [64]. Por esse fato, a preparação de compósitos entre os diferentes biomateriais (metais, ligas metálicas, cerâmicas e polímeros, por exemplo) é a estratégia hoje usada para o melhoramento das propriedades e otimização do uso dos mesmos dentro de sua especificidade [63].

3.2.2. Polímeros Biodegradáveis e PLGA

Os polímeros biodegradáveis são aqueles cuja degradação resulta da ação de microrganismos de ocorrência natural, como bactérias, fungos e algas, e podem ser consumidos em semanas ou meses sob condições favoráveis de biodegradação, segundo a Norma ASTM D6400-04 “*Standard Specification for Compostable Plastics*”. O termo biodegradável, descrito por Vert, engloba polímeros e dispositivos sólidos que, devido à degradação macromolecular, sofrem dispersão *in vivo*, mas sem a eliminação dos produtos e subprodutos do organismo. Esses polímeros são, então, atacados por elementos biológicos, formando fragmentos e/ou outros subprodutos de degradação, que normalmente são removidos do seu local de ação, mas nem sempre do organismo [72].

Um polímero bioabsorvível pode se dissolver em fluidos corpóreos sem qualquer clivagem da cadeia macromolecular ou diminuição de massa molecular. Um polímero bioabsorvível pode ser biorreabsorvível se suas macromoléculas são excretadas do corpo. O termo biorreabsorvíveis descreve polímeros que se degradam através da diminuição de tamanho e que são reabsorvidos *in vivo*, e que os materiais são eliminados por rotas metabólicas do organismo. Isso significa que há total eliminação do polímero (e de seus subprodutos) pelo organismo. Polímeros biorreabsorvíveis (como o PLGA) se degradam gerando subprodutos com as características dos metabólitos orgânicos, especificamente os ácidos do Ciclo de Krebs. A biorreabsorção dos polímeros PLA e PGA pode ser observada na Figura 3.7 [72,73].

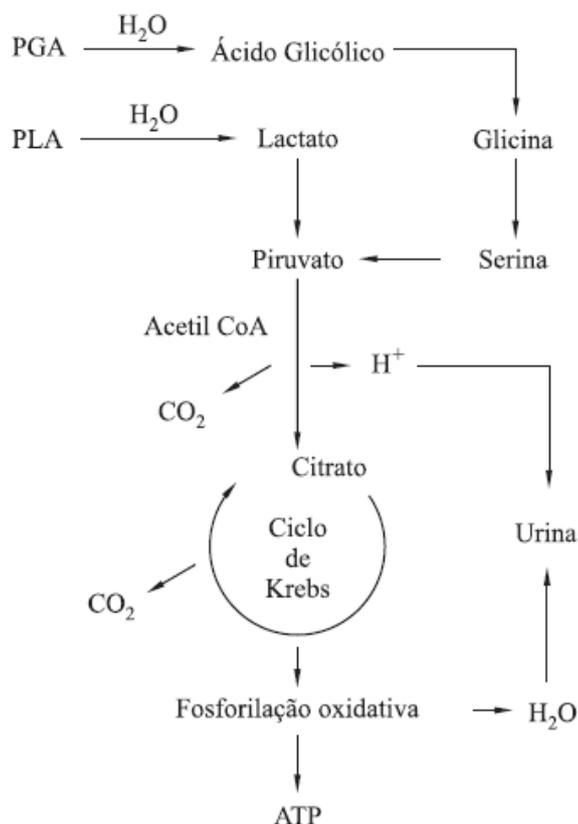


Figura 3.7. Rota metabólica de biorreabsorção dos poliésteres PLA e PGA [73].

O PLGA, Figura 3.8, tem sido um dos copolímeros mais estudados para aplicação na engenharia de tecidos. Esse copolímero é um poliéster biorreabsorvível, que possui elevada resistência mecânica e alta biocompatibilidade. É uma excelente opção para utilização em regeneração de tecidos, uma vez que esse copolímero sintético pode ser facilmente moldado a fim de formar uma estrutura propícia para a regeneração de um tecido específico. Além dessa vantagem, possui as qualidades necessárias para poder ser implantado em tecidos *in vivo* [74,75].

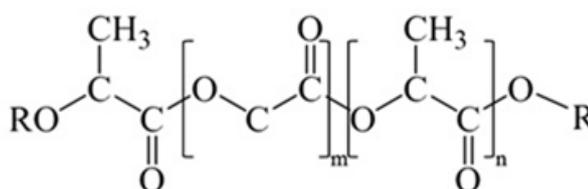


Figura 3.8. Estrutura química do PLGA, na qual m representa as unidades de ácido glicólico e n representa as unidades de ácido lático [76].

Por possuírem alta biodegradação e bioabsorção, poliésteres sintéticos como PLGA vêm ganhando bastante espaço em estudos que envolvem regeneração de tecidos com suporte para adesão celular [20]. A absorção biológica de um material se dá pela degradação induzida pelas atividades do organismo, onde o material bioabsorvível deve ser tão compatível quanto os seus produtos de degradação [77]. Em organismos vivos são necessárias duas etapas para que ocorra a degradação de um material bioabsorvível. Na primeira, ocorre a hidrólise das ligações químicas do polímero e consequente formação de ácidos lático e glicólico [74,75], mostrada na Figura 3.9, e, na segunda etapa, há macrófagos que fagocitam os fragmentos que ainda restam no organismo [78].

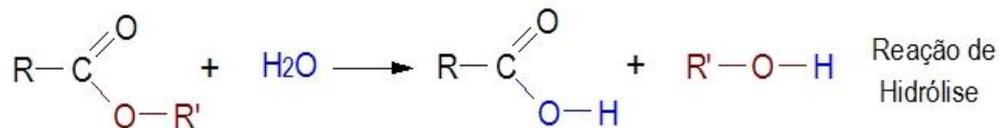


Figura 3.9. Reação de hidrólise de éster [79].

3.3. Engenharia de Tecidos

No século XVI, o professor de anatomia da Universidade de Bolonha, Itália, Gaspare Tagliacozzi, relatou em seu tratado “*De Curtorum Chirurgia per Insistionem*” a descrição de uma substituição de nariz que ele construiu a partir de uma parte do braço. O método era baseado no corte parcial de um retalho de pele da parte superior do braço, reformulando-o em um nariz e enxertando-o no local danificado. Era necessário que o braço do paciente fosse mantido fixo ao nariz por algumas semanas, conforme ilustrado na Figura 3.10. Passado o tempo estabelecido, o novo nariz era desligado do braço [80].

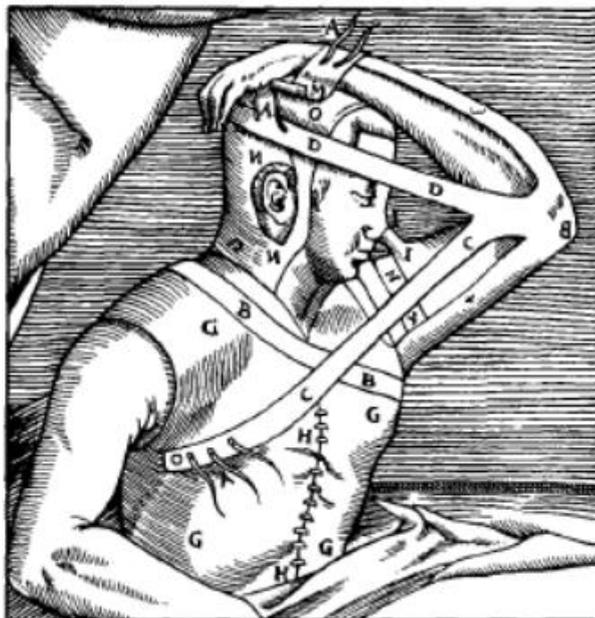


Figura 3.10. Substituição de nariz a partir do braço. Processo utilizado por Tagliacozzi no século XVI [81].

Novas fontes de células, incluindo tipos de células-tronco, têm sido identificadas nos últimos anos, despertando novos interesses na área. Enxertos podem ser naturais, artificiais ou uma combinação de ambos. As células vivas podem migrar para dentro do implante após a implantação ou podem ser associadas com a matriz em cultura celular antes da implantação. O tecido nocivo é eliminado e as células necessárias para o reparo são então introduzidas a fim de otimizar a sobrevivência das células em um ambiente que vai permitir que o corpo se reconstitua [82].

A engenharia de tecidos começou a ser definida apenas a partir de meados da década de 1980. E pode contar com o conhecimento adquirido nas áreas de biologia celular, células tronco, bioquímica, biologia molecular, etc. Do mesmo modo, os avanços na ciência dos materiais, engenharia química e bioengenharia permitem a aplicação racional de princípios de engenharia para sistemas vivos [80,82]. Ela pode ser definida como a aplicação de princípios de engenharia química e biológica para a reparação, restauração ou regeneração de tecidos utilizando fatores de células e biomateriais isoladamente ou em combinação [36]. A engenharia de tecidos está em rápido crescimento dentro de campo interdisciplinar das ciências da saúde que se dedica à fabricação de tecidos e construções de órgãos imitando o

desenvolvimento biológico natural. Essa área destina-se a regenerar os componentes biológicos no exterior do corpo para eventual terapia de substituição (isto é, implantação), através de manipulação de células, de materiais sintéticos (*scaffolds*) e moléculas bioativas [83].

A engenharia de tecidos abrange o desenvolvimento e a substituição de tecidos danificados. Nesta técnica há o desenvolvimento de tecidos pertencentes ao próprio paciente. Esses tecidos são produzidos fora do organismo através da coleta de células saudáveis, que são cultivadas sobre estruturas poliméricas biorreabsorvíveis e, após, os tecidos são implantados no paciente a fim de reconstituir a área danificada [10,83]. A Figura 3.11 ilustra de uma forma sucinta os procedimentos realizados pela engenharia de tecidos para o desenvolvimento de novos tecidos.

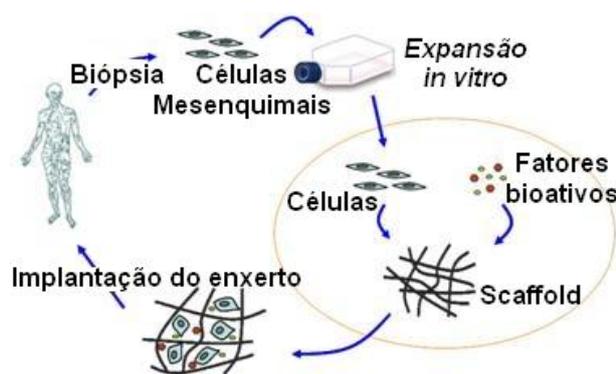


Figura 3.11. Resumo da técnica utilizada pela Engenharia de tecidos. Imagem adaptada [84].

Para aplicações que vão desde vasos ociosos, como vasos sanguíneos, até órgãos complexos, como o rim, a engenharia de tecidos tipicamente envolve a semeadura de células em *scaffolds* de apoio ao crescimento, gerando tecidos implantáveis viáveis, que podem substituir, restaurar e/ou manter a função em locais de lesões e danos *in vivo*. Estes suportes compostos tanto de biomateriais naturais ou sintéticos proporcionam um meio espacial para facilitar a proliferação celular, a vascularização e a regeneração [85].

A importância da perfusão sanguínea para a viabilidade do tecido é incontestável nas ciências da saúde, pois todos os órgãos e tecidos exigem suprimento vascular. Neste contexto, a vascularização constitui uma ressalva

fundamental tanto na cirurgia moderna quanto na engenharia de tecidos [86,87]. Diversos *scaffolds* tridimensionais, tais como espumas, fibras, membranas e microesferas, vêm sendo aplicados com a finalidade de constituir uma matriz artificial para propagação celular [88]. São o tamanho dos poros e a arquitetura dos *scaffolds* tridimensionais que determinam diretamente a organização espacial e a morfologia celular. Por sua vez, a organização espacial (particularmente a proximidade entre as células) regula a proliferação e a diferenciação celular [89].

Diferentes dimensões dos poros são necessárias em diferentes campos de aplicação. Para regeneração de tecidos ósseos, os tamanhos comumente usados dos poros variam entre 200 e 400 μm . O tamanho do poro ideal está descrito como de aproximadamente 300 μm , com um mínimo de 80 μm e um máximo de 500 μm [90,91]. A presença de poros no material polimérico favorece a adesão do tecido vivo ao suporte, sendo isso o principal fator responsável pelo sucesso na utilização de tal material [20,92].

A geração de ossos por transplante autólogo de células ou de tecidos é uma das técnicas mais promissoras em cirurgia ortopédica e engenharia biomédica. Conceitos de tratamento com base nessas técnicas eliminariam os problemas de escassez de área doadora, rejeição imunológica e transferência de patógenos. Os osteoblastos, condrócitos e células mesenquimais, obtidos a partir de tecidos duros e moles do paciente, podem ser expandidos em cultura e semeados em um suporte que será degradado e reabsorvido lentamente conforme o crescimento do tecido *in vitro* e / ou *in vivo* [33,93]. O processo da engenharia de tecido ósseo engloba seis fases: (I) Fabricação do suporte biorreabsorvível; (II) Cultura/semeadura de osteoblastos / condrócitos no suporte polimérico em uma cultura estática (placa de Petri); (III) Crescimento do tecido prematuro em um ambiente dinâmico (frasco de rotação); (IV) Crescimento de tecido maduro em um ambiente fisiológico (biorreator); (V) Transplante cirúrgico; (VI) Assimilação/Remodelação do enxerto [93].

Para enxertos ósseos na engenharia de tecidos, a criação de um leito vascularizado assegura a sobrevivência e as funções das células semeadas que têm

acesso ao sistema vascular para a nutrição, trocas gasosas e eliminação de subprodutos [94]. A vascularização de um *scaffold* pode ser comprometida por puramente depender do crescimento interno de capilares na rede de poros de interligação entre o tecido hospedeiro. *In situ*, a distância entre os vasos sanguíneos e células mesenquimais não ultrapassam 100 μm [95].

A fim de melhorar a absorção do biomaterial pelo tecido, pode-se aumentar a hidrofiliabilidade do *scaffold* através do seu tratamento com hidróxido de sódio [96]. Esse tratamento químico tem como objetivo quebrar ligações ésteres do polímero, expondo assim grupos hidrofílicos [7,96].

Inúmeras tecnologias de fabricação têm sido aplicadas no processamento de materiais biodegradáveis e bioabsorvíveis para suportes poliméricos tridimensionais de elevadas porosidade e área superficial. As técnicas convencionais para a fabricação de *scaffolds* incluem ligação entre fibras, moldagem com solvente, lixiviação, laminação de membrana e moldagem por fusão. Diversos trabalhos têm analisado pesquisas antigas e atuais em técnicas de fabricação de *scaffolds*. No entanto, é raro haver a comparação direta sobre as tecnologias de processamento de *scaffolds* tridimensionais para a comunidade de engenharia de tecidos. Cada metodologia de processamento tem seus prós e contras [93].

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Todas as amostras foram preparadas utilizando-se o copolímero PLGA (LACTOSORB® 8218, contendo 82% de PLLA e 18% de PGA) adquirido da empresa PURAC (Holanda). Utilizou-se a hidroxiapatita disponibilizada pela Baumer como carga do compósito. Como o compósito poroso será destinado à regeneração óssea o tamanho dos poros deve atingir tanto dimensões micro como macro de modo a reproduzir futuramente várias funções, tais como a difusão de nutrientes, inervação, a colonização celular, a angiogênese. Portanto, para provocar a geração de poros, escolheu-se como agente porogênico grânulos de NaCl da marca Merck.

4.1. Metodologia I

A primeira metodologia baseou-se na dissolução do PLGA em clorofórmio, formando uma solução com concentração igual a 3,5%. Após, adicionou-se HA à solução e grânulos de NaCl com diâmetros entre 75 e 150 μm . Esse conteúdo foi então vertido em porta-amostra feito de tetrafluoretileno, elaborado no laboratório do GEPSI (Grupo de Estudos de Propriedades de Superfícies e Interfaces). O porta-amostras foi então submetido a vácuo a fim de serem formados macroporos diretamente pela evaporação do solvente. As relações mássicas entre PLGA e NaCl foram sendo adaptadas ao decorrer da formação da metodologia, porém partiram das relações estabelecidas pela metodologia de Lee *et al* [10]. Além disso, a relação entre PLGA e HA pode ser adaptada partindo da informação que o osso é formado por dois terços de compostos inorgânicos [24].

4.2. Metodologia II

Passou a ser utilizada uma nova metodologia que, por sua vez, baseava-se na prensa da amostra para estabelecer sua forma e compacidade. Optou-se por utilizar duas faixas de diâmetros de grânulos de NaCl. A primeira faixa englobava grânulos entre 600 e 1400 μ m de diâmetro e foi denominada Granulometria A. A segunda faixa abrangia grânulos com diâmetro entre 600 e 2000 μ m e foi chamada Granulometria B. Na fase final da formação desta metodologia (aplicada atualmente) as concentrações entre HA:PLGA:NaCl estavam sendo testadas com 1:1:8 e 1:1:12, 1:2:8 e 1:2:10. Assim como a composição das amostras, o tempo de pressão e a força exercida sobre as amostras estavam sendo variados. Foram utilizadas pressões entre 4 e 18t. Inicialmente o tempo estimado em prensa hidráulica era de 24 a 60h. Porém, diminuindo-se esse tempo observou-se que a amostra possuía uma boa compacidade. O tempo da amostra na prensa hidráulica fora diminuído para 4h, 2h, 1h, 30min e 15min. Após tais ajustes e combinações entre concentração mássica da amostra e pressões exercidas em tempos distintos, estabeleceram-se as características da metodologia II. A relação mássica estabelecida na metodologia II entre a biocerâmica (HA), copolímero (PLGA) e agente porogênico (NaCl) foi fixada em 1:2:10 (HA:PLGA:NaCl).

Os *scaffolds* foram confeccionados a partir da dissolução de PLGA em clorofórmio. Soluções cujas concentrações foram de 7,0% de PLGA em clorofórmio foram preparadas em tubos de ensaio e, esses, mantidos em ultrassom de 40 kHz até a dissolução total dos pellets. Após total dissolução adicionou-se hidroxiapatita, e, então, foi adicionado o agente porogênico. Posteriormente à homogeneização, a solução foi vertida do tubo de ensaio para uma placa de Petri e sua homogeneização foi continuada manualmente com o auxílio de uma espátula até que o solvente evaporasse e o material fosse considerado sólido (aglomerados). O procedimento envolvendo solvente foi realizado sob o fluxo de capela. Na etapa seguinte as amostras foram submetidas a um sistema de vácuo de 10¹ Pa por 2h para remoção do solvente residual.

Posteriormente, o material polimérico seco (aglomerados) obtido na placa de Petri foi removido com espátula e inserido em um pastilhador cilíndrico. Cada *scaffold* foi elaborado contendo massa próxima a 1,75g (massa bruta do composto contendo o polímero, a biocerâmica e o sal). O pastilhador, elaborado pelo GEPSI, foi então submetido às pressões de 8 ou 12t na prensa hidráulica do mesmo laboratório. A Figura 4.1 apresenta as imagens dos equipamentos fundamentais para a confecção das amostras (pastilhador e prensa hidráulica).

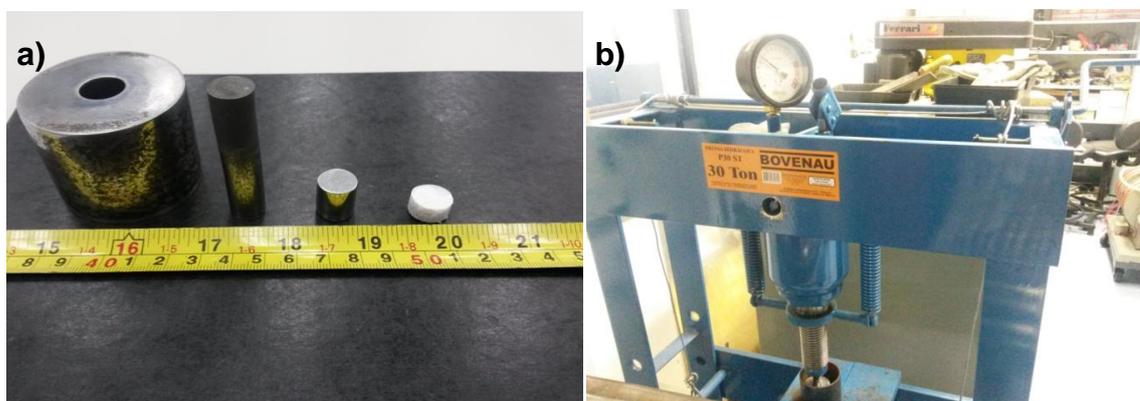


Figura 4.1. Pastilhador (a) e prensa hidráulica (b).

Após o tempo estimado (15 ou 30 min) e sob pressões de 8 ou 12t o pastilhador foi removido da prensa e o suporte polimérico obteve seu formato cilíndrico e compacto, conforme a figura 4.2. A altura média dos *scaffolds* fora de 7,9 mm e seu diâmetro médio de 12,76 mm.



Figura 4.2. *Scaffold* (depois de prensado), contendo ainda grânulos de cloreto de sódio.

A fase final da confecção do suporte polimérico baseou-se na remoção do agente porogênico. Por conseguinte, o material polimérico foi submerso em água deionizada durante 48 horas, sendo que, nas primeiras 5h, a água foi trocada a cada 1h e após, trocada a cada 8 horas. Esse procedimento foi realizado utilizando-se equipamento de ultrassom de 40 kHz.

Todas as variações de *scaffolds* confeccionados estão mais claramente dispostas no fluxograma exibido na Figura 4.3 em que todos os *scaffolds* foram fabricados em duplicata a fim de serem divididos entre tratados e não tratados quimicamente.

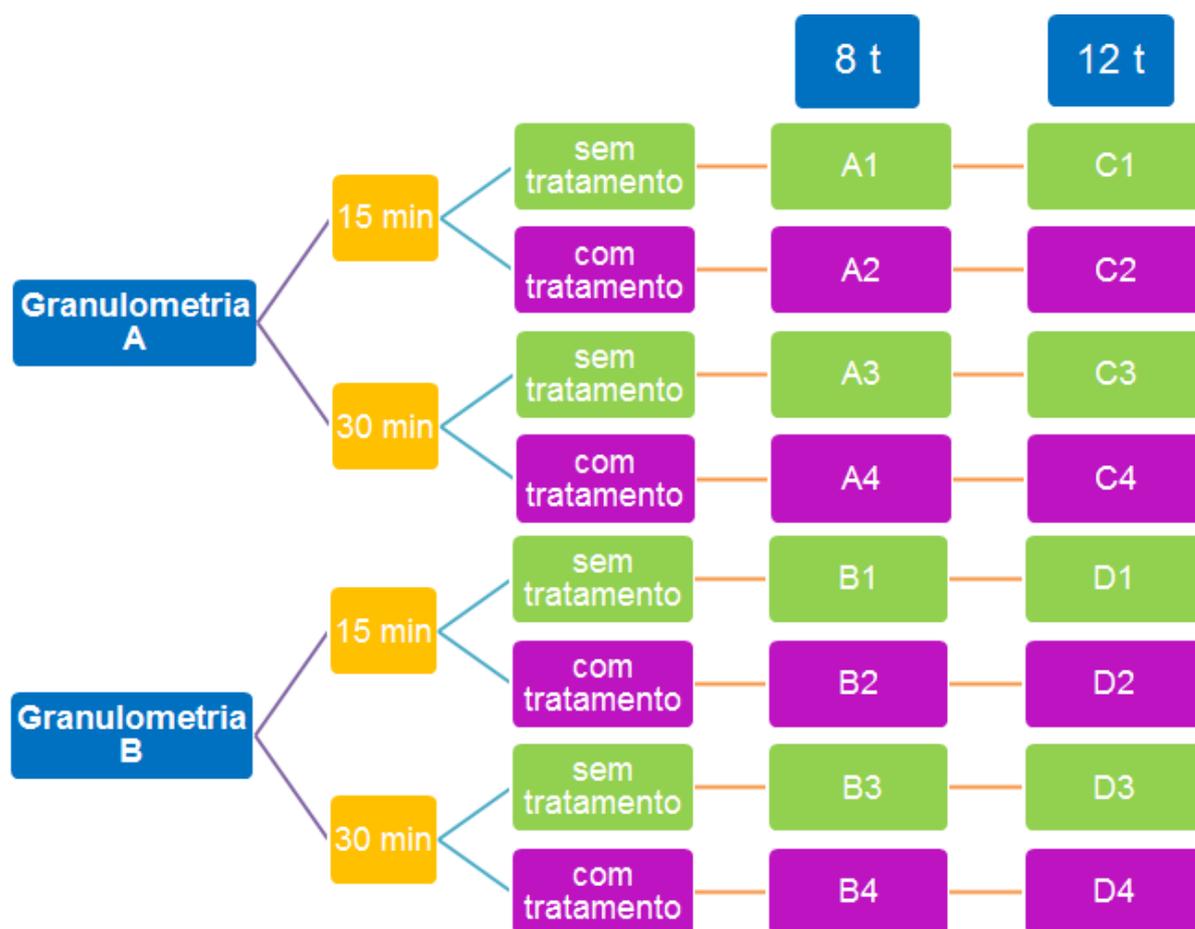


Figura 4.3. Fluxograma mostrando variações dos *scaffolds* confeccionados.

Os *scaffolds* produzidos a partir da metodologia II tornaram-se o foco do presente trabalho. A partir dos *scaffolds* oriundos desta metodologia foram realizadas as principais análises e caracterizações.

4.3. Confeção de membranas poliméricas

Em solução de PLGA em clorofórmio foi adicionado o agente porogênico (NaCl) com granulometria entre 2 e 50 μm . Em seguida a solução foi vertida em uma placa de Petri. Após duas horas de evaporação de solvente em capela de fluxo de ar, as membranas foram submetidas ao sistema de vácuo de 10^1 Pa por 2h para remoção do solvente residual. Seguida essa etapa, as membranas foram submersas em água deionizada por 24h para a remoção do cloreto de sódio (processo realizado em ultrassom de 40kHz). A confecção das membranas poliméricas foi necessária para se originar a análise de ângulo de contato, realizada a partir de membranas tratadas e membranas não tratadas quimicamente (processo descrito dentre os “Materiais e Métodos”).

4.4. Tratamento de amostras com hidróxido de sódio

O tratamento químico em solução NaOH tem como objetivo aumentar a hidrofiliabilidade da superfície do *scaffold* de PLGA. Isso é possível através da hidrólise que ocorre nas ligações de grupos ésteres. Essa hidrólise acarreta na exposição dos grupos funcionais de ácido carboxílico e hidroxila [97]. Baseia-se na imersão das amostras, durante o tempo de cinco minutos, em solução de hidróxido de sódio da marca Merck. A concentração da solução usada foi de 0,5M. Passados cinco minutos, as amostras foram lavadas em água deionizada (processo realizado em ultrassom 40kHz) durante 2h, sendo trocada água a cada meia hora. Esse tratamento fora feito em todos os tipos de *scaffolds* confeccionados, em triplicata, além de ter sido realizado nas membranas.

4.5. Análises e Caracterizações

Idealmente, um *scaffold* deve ter as seguintes características: (i) tridimensionalidade e alta porosidade com uma rede interligada de poros para o crescimento celular e fluxo de transporte de nutrientes e resíduos metabólicos; (ii) ser biocompatível e bioabsorvível, com uma taxa de degradação e reabsorção controlável para coincidir com o crescimento de células do tecido *in vitro* e/ou *in vivo*; (iii) química de superfície adequada para a ligação de células, proliferação e diferenciação; e (iv) as propriedades mecânicas correspondentes às dos tecidos substituído [93]. Portanto, foram escolhidas as técnicas de caracterização descritas a seguir.

4.5.1. Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão de Campo (MEV-FEG)

Essa caracterização é comumente utilizada para avaliação da topografia e morfologia das amostras, permitindo seu mapeamento, de forma a avaliar seu grau de porosidade e interconexões entre poros.

4.5.2. Ângulo de contato

Para essa caracterização utilizou-se um equipamento chamado goniômetro, o qual permite a medida do ângulo de contato do material polimérico com um fluido. A medida do ângulo é obtida através da observação do perfil de uma gota do fluido em contato com o material a ser analisado. À medida que o ângulo de contato diminui, maior é a molhabilidade do material, ou seja, mais o líquido consegue molhar a superfície. A figura 3.12 ilustra a relação do ângulo de contato com a molhabilidade.

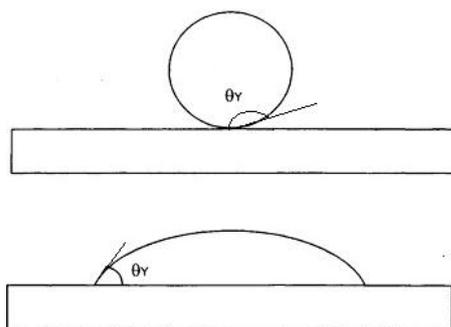


Figura 4.4. Relação entre ângulo de contato e molhabilidade. Imagem adaptada [98].

4.5.3. Degradação hidrolítica

A degradação hidrolítica foi realizada *in vitro*, conforme a metodologia utilizada por Li *et al.* [99] norma ASTM (2010), e teve a finalidade de avaliar o percentual de degradação dos *scaffolds* em função do tempo, bem como o percentual de absorção de líquido. Foram escolhidos todos os *scaffolds* confeccionados pela metodologia II fabricados pelo tempo de 15 min, utilizando-se todas as outras variações (diferentes pressões e diferentes granulometrias). Logo, os ensaios de degradação foram realizados com as 8 variações possíveis (A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1 e D2) e cada variação em triplicata para cada tempo. Cinco tempos foram estabelecidos: 14, 21, 28, 35 e 42 dias. Cada amostra foi pesada em balança analítica e inserida em um frasco de polipropileno contendo 4 mL de PBS (solução preparada com reagentes de alta pureza funcionando como um tampão para degradação do polímero). Os frascos foram colocados em estufa a 37°C. Os parâmetros avaliados foram: massa de líquido absorvida no período inicial, perda mássica, mudanças na topografia e alteração de pH da solução de PBS.

4.5.4. Ensaio de compressão

De forma geral, os equipamentos de ensaio de compressão fornecem o diagrama Carga x Alongamento a partir do qual é construído o diagrama Tensão x Deformação convencional. Este ensaio é comumente utilizado para a obtenção de propriedades mecânicas, tal como o limite de ruptura à compressão e o módulo de Young [100].

O equipamento utilizado foi o MTS Synergie 1000, disponível no Instituto Carnot CIRIMAT, na cidade de Labege, em Toulouse, França.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A morfologia superficial dos *scaffolds* é essencial para sua caracterização, em vista disso, ao decorrer deste capítulo, serão apresentadas diferentes micrografias, utilizadas para analisar a topografia, a porosidade, a rugosidade referente à hidrofiliabilidade ou a erosão causada pela degradação hidrolítica dos *scaffolds*.

5.1. Resultados preliminares

A hidroxiapatita utilizada foi disponibilizada pela empresa Baumer e apresentou-se muito semelhante à encontrada na literatura. A Figura 5.1 apresenta uma micrografia da HA com magnificação de 30.000x onde é possível observar cristais semelhantes aos encontrados na Figura 3.5.

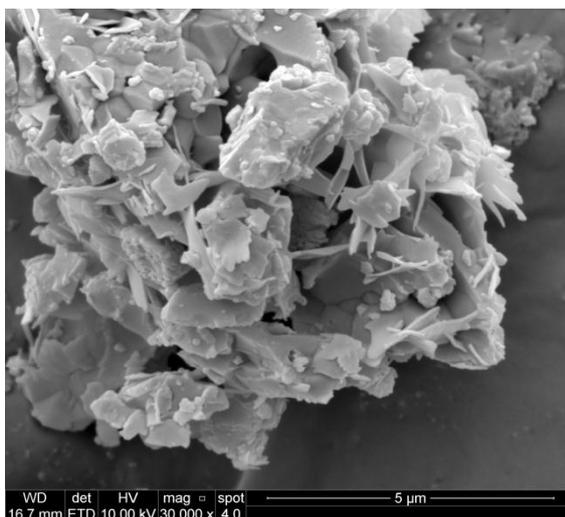


Figura 5.1. Micrografia da Hidroxiapatita utilizada como carga do compósito.

Ao início do projeto, dentro da metodologia I, foram elaboradas amostras com diversas proporções de HA, PLGA e NaCl, conforme apresentado na tabela 5.1.

Tabela 5.1. Relação das amostras confeccionadas sob vácuo.

Amostras	Relação HA:PLGA:NaCl (relação mássica)
T	8:1:16
U	8:1:24
V	3:1:16
W	3:1:8
X	3:1:2
Y	1:1:8
Z	1:1:16

As primeiras amostras elaboradas, T e U, apesar de conterem quantidade significativa do agente porogênico (16 e 24 vezes maiores que a massa do polímero, respectivamente), apresentaram baixa porosidade. Além disso, ambas as amostras demonstraram-se suscetíveis à fragmentação. Micrografias da amostra T (Fig. 5.2) apresentam uma topografia irregular e com poucos macroporos.

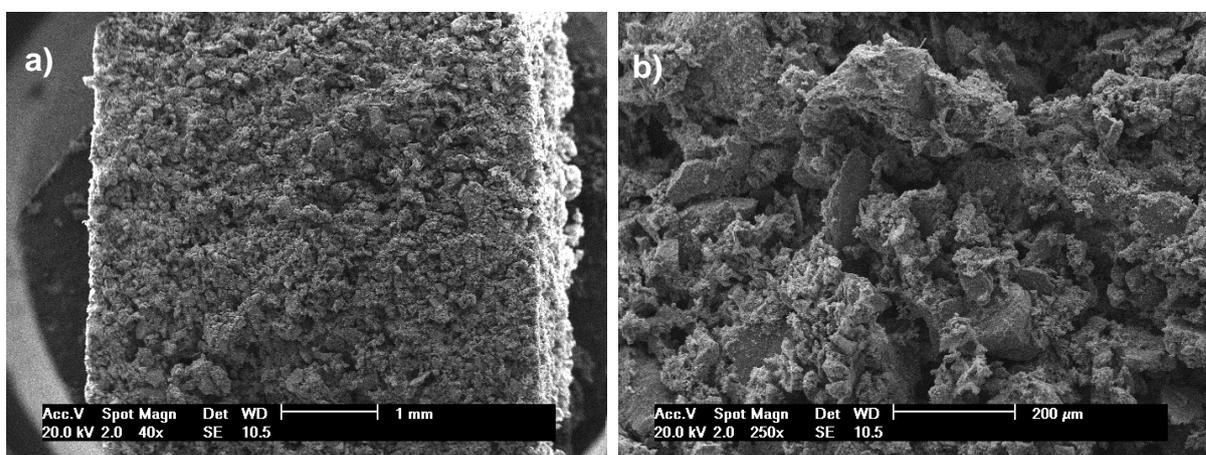


Figura 5.2. Micrografias da amostra T com magnificações de 40x (a) e 250x (b).

As amostras V e W possuíram menor concentração de HA em relação às amostras T e U. Assim, V e W apresentaram menor fragilidade. Portanto, ainda assim, a amostra V, cuja concentração de sal era maior que a amostra W, apresentou maior fragilidade entre as duas. Observou-se ainda que a amostra V possui porosidade mais elevada que a amostra T pelo fato de ter menor

concentração de HA na sua composição. Isso pode ser visto comparando-se a Figura 5.2 com a Figura 5.3.

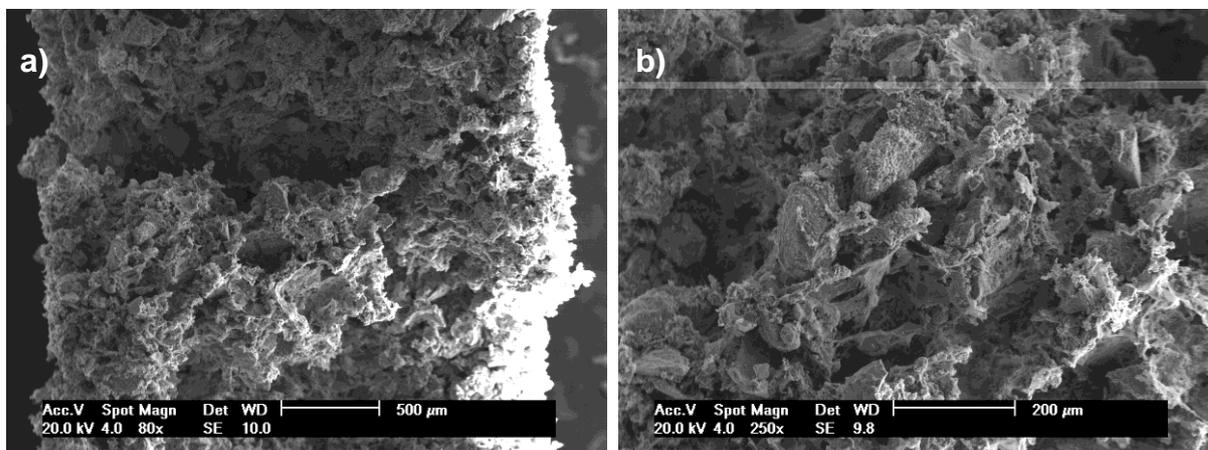


Figura 5.3. Micrografias da amostra V com magnificações de 80x (a) e 250x (b).

A amostra X, por possuir menor concentração de sal em relação a todas as outras amostras, apresentou a maior compactidade e rigidez. As duas últimas amostras dispostas na tabela 5.1 (Y e Z) apresentaram maiores compactidade e rigidez dentre todas. Ainda assim, observou-se que a amostra Z, por possuir maior massa de NaCl demonstrou-se mais frágil e suscetível a ruptura que a amostra Y.

A porosidade produzida pelo sal não foi relevante para nenhuma das amostras elaboradas. A porosidade provocada pelo vácuo fora também insatisfatória, pois não há um controle nas dimensões dos poros formados e, ainda assim, não há uniformidade de porosidade no interior da amostra. De forma geral, a submissão a vácuo formou grandes poros na área central da amostra, sobretudo próximo à superfície. Com essa metodologia os resultados não foram satisfatórios tanto na formação de porosidade quanto na resistência do material confeccionado.

5.2. Caracterização das membranas

A Figura 5.4 revela uma micrografia na qual é possível analisar a espessura das membranas porosas. Membranas que não sofreram tratamento com NaOH,

Figura 5.4.(a), apresentaram espessura de aproximadamente 250 μm e membranas tratadas quimicamente, Fig. 5.4. (b), apresentaram espessura entre 200 e 220 μm .

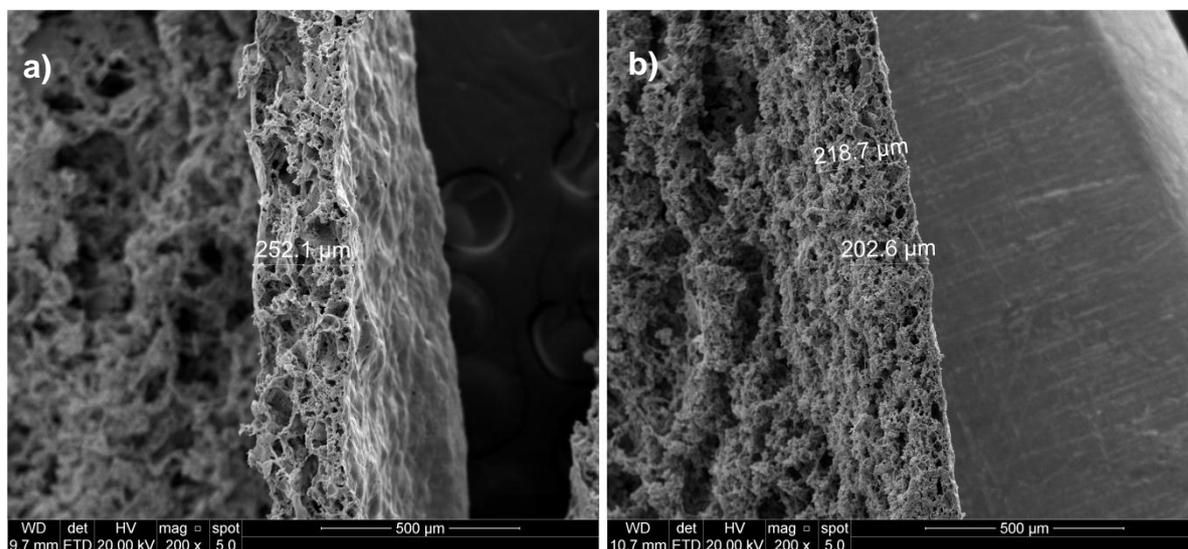


Figura 5.4. Micrografia evidenciando espessuras de membranas porosas de PLGA sem tratamento químico (a) e com tratamento químico (b).

A análise de ângulo de contato foi realizada em membranas com área equivalente a 1cm^2 . Foi utilizado um goniômetro para a realização do teste de molhabilidade. Foram caracterizadas as duas diferentes membranas poliméricas – com tratamento químico e sem tratamento químico – a fim de avaliar a influência do ataque químico na hidrofiliabilidade do polímero.

A diferença na hidrofiliabilidade da membrana não tratada em relação à tratada pode ser observada na figura 5.5. A interação da gota d'água entre ambas as superfícies das membranas é diferente. A membrana tratada, Figura 5.5 (b), demonstra maior molhabilidade, ou seja, maior espalhamento da gota d'água em sua superfície e, conseqüentemente, menor ângulo de contato. Isso comprova a eficácia do tratamento químico realizado, pois visa aumentar a hidrofiliabilidade do polímero através da exposição dos grupos funcionais de ácido carboxílico e hidroxila.

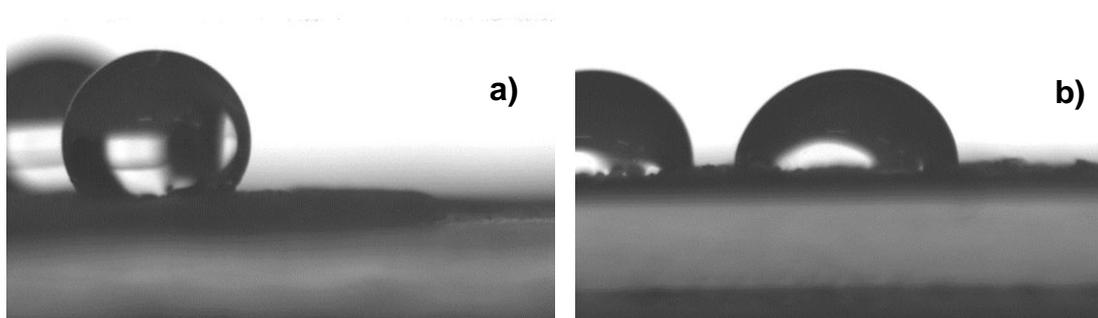


Figura 5.5. Gotas d'água sobre as superfícies de membrana não tratada (a) e membrana tratada (b).

A Figura 5.6 apresenta o gráfico que exibe os ângulos de contato médio entre superfície da membrana e gota d'água, e seus respectivos desvios-padrão. Essa média de ângulos de contato foi realizada a partir de 10 análises em cada membrana. Neste gráfico, é possível observar que o tratamento químico realizado obteve sucesso, pois tornou a superfície da amostra tratada mais hidrofílica do que a não tratada.

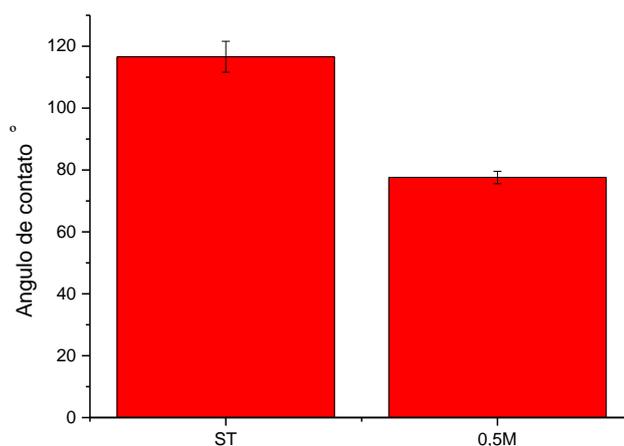


Figura 5.6. Diferença entre ângulos de contato de amostras sem tratamento (ST) onde a média fora 116,6° e amostras tratadas em solução NaOH (0,5M), onde a média dos ângulos fora igual a 77,6°.

A diferença da morfologia da superfície entre as membranas com e sem tratamento químico podem ser comparadas analisando-se as micrografias dispostas na Figura 5.7. O ataque químico pode ser observado através do aumento da erosão na superfície da membrana tratada. É possível observar esse aumento da erosão superficial comparando-se a micrografia (a) com a micrografia (b), ambas com magnificações de 500x, bem como o aumento da área superficial da micrografia (d) em relação à (c), as quais possuem magnificação de 1.000x.

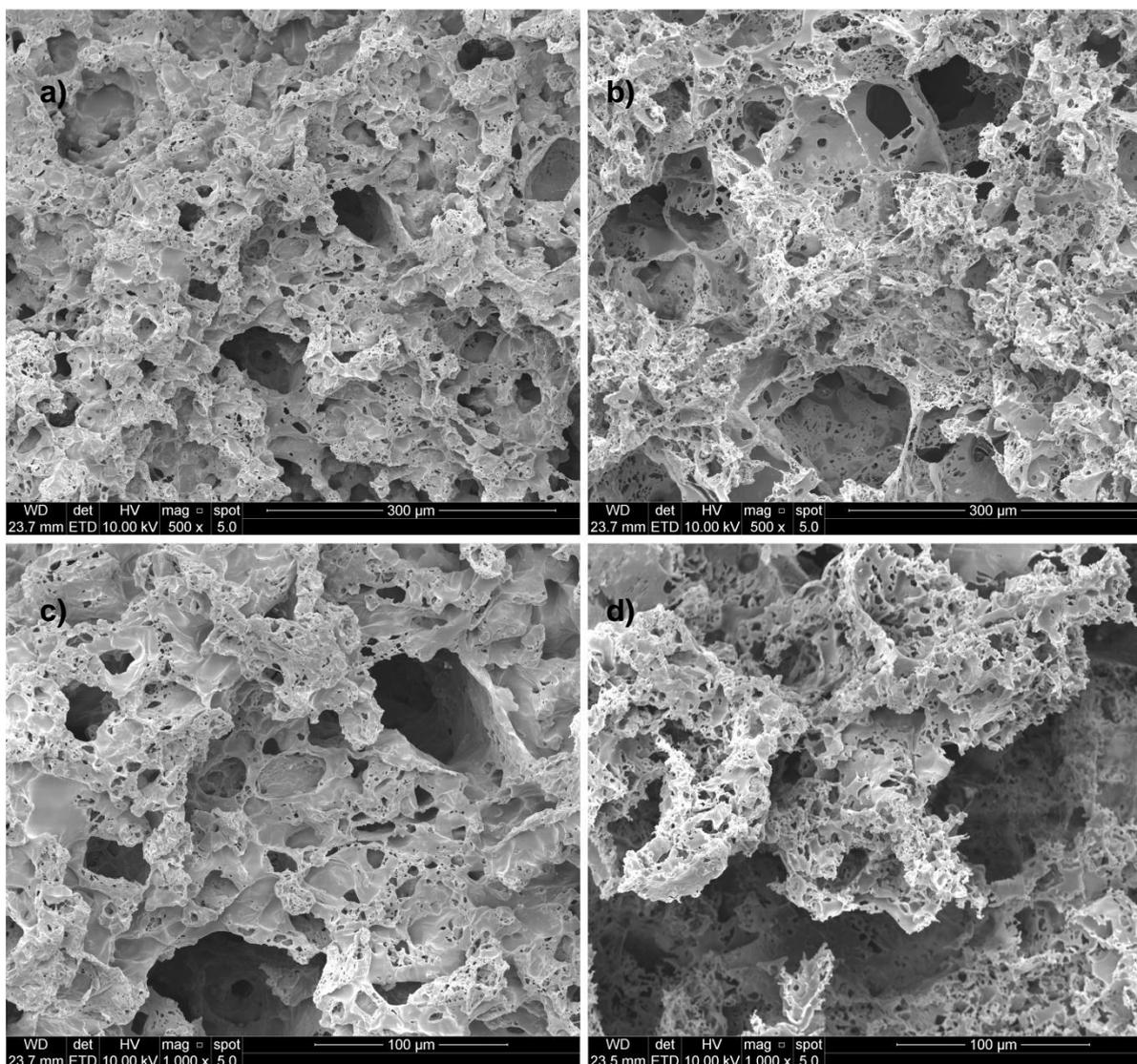


Figura 5.7. Micrografias de membranas não tratadas (a) e (c); e tratadas quimicamente (b) e (d).

5.3. Resultados principais: realizados a partir de *scaffolds* confeccionados pela Metodologia II

5.3.1. Morfologia superficial dos *scaffolds*

O microscópio eletrônico de varredura proporciona uma excelente análise da morfologia das superfícies das amostras, uma vez que suas aproximações possibilitam a visualização de poros, bem como a interconectividade entre eles.

A fim de revelar a porosidade interna dos *scaffolds*, foram feitas secções transversais em cada um deles com serra de diamante. A Figura 5.8 apresenta a secção do *scaffold* A1.

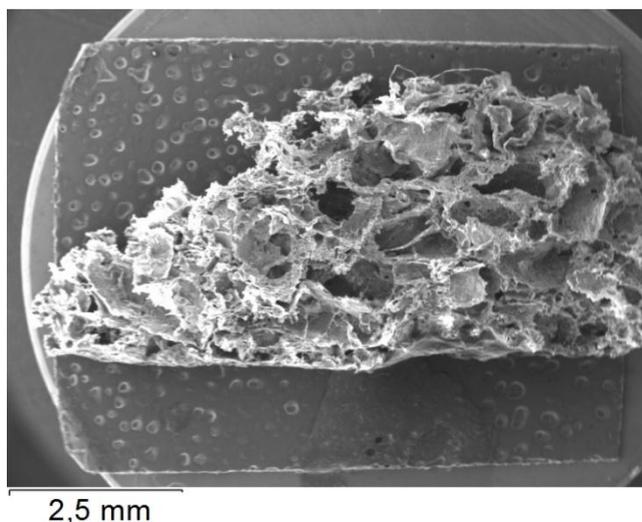


Figura 5.8. Micrografia de *scaffold* A1 com magnificação de 25x.

Todas as amostras nomeadas A e C foram elaboradas utilizando-se a mesma granulometria de sal (granulometria A - entre 600 e 1.400 μm), porém, não foi possível encontrar poros próximos a 1.400 μm de diâmetro. Os tamanhos dos poros maiores, na maioria dos *scaffolds*, não ultrapassam 600 μm e podem ser observados na Figura 5.9.

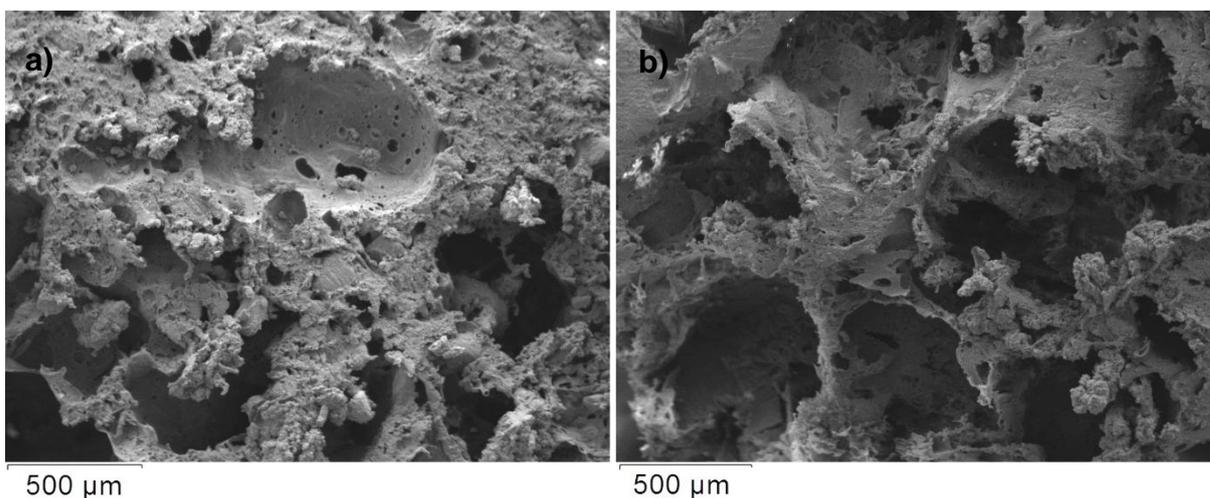


Figura 5.9. Micrografias de *scaffold* A2 (a) e *scaffold* C4 (b) com magnificações de 100x.

Desta forma também se observa a semelhança na porosidade dos *scaffolds* elaborados com granulometria de sal maior (diâmetro entre 600 e 2.000 μm), pois o diâmetro dos poros também não alcançou 2.000 μm . Isso pode ser observado nas micrografias de *scaffolds* nomeadas B3 e D3, na Figura 5.10.

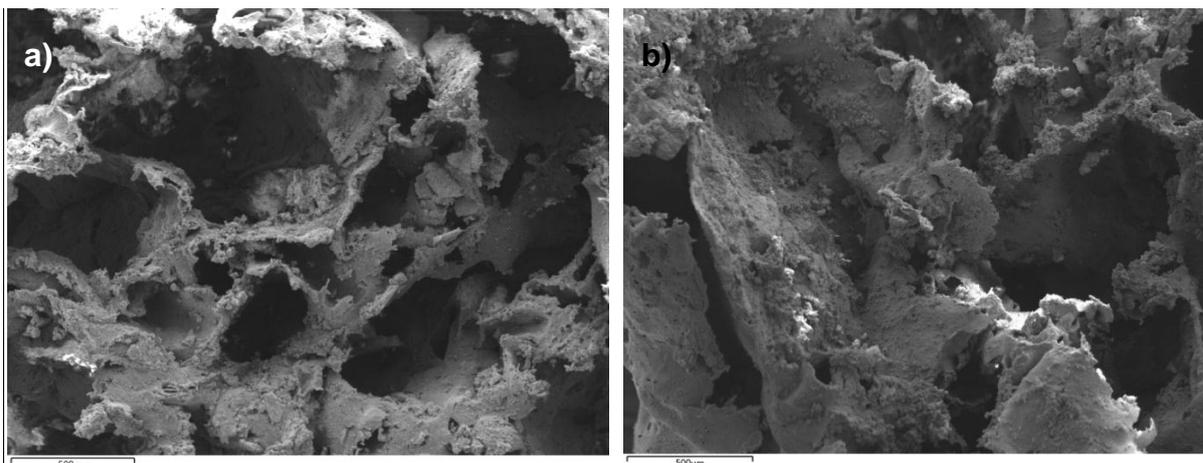


Figura 5.10. Micrografias de *scaffold* B3 (a) e *scaffold* D3 (b) com magnificações de 100x.

A porosidade não foi influenciada pela variação de tempo em prensa (durante confecção), porém a variação da pressão alterou sutilmente a dimensão dos poros, o que pode ser visto na Figura 5.11. A diminuição do tamanho de poros em *scaffolds* confeccionados sob pressão de 12 toneladas pode estar relacionada à tensão interna durante a cura. Assim, após a lixiviação do sal, em *scaffolds* mais estressados (submetidos a 12t), houve a recuperação elástica e consequente diminuição do diâmetro de poros.

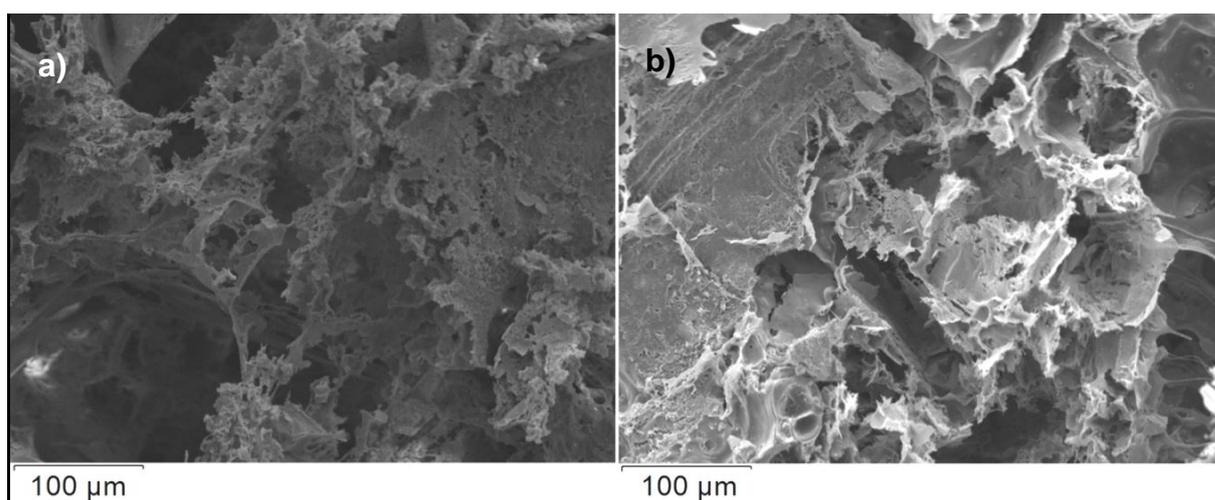


Figura 5.11. Micrografias de *scaffold* A4 (a) e *scaffold* C4 (b), ambas com magnificações de 500x.

A interconectividade dos poros mostrou-se presente em todos os *scaffolds* confeccionados, uma vez que é possível observar a alta porosidade e interligação dentro de poros vizinhos nas amostras apresentadas na Figura 5.12.

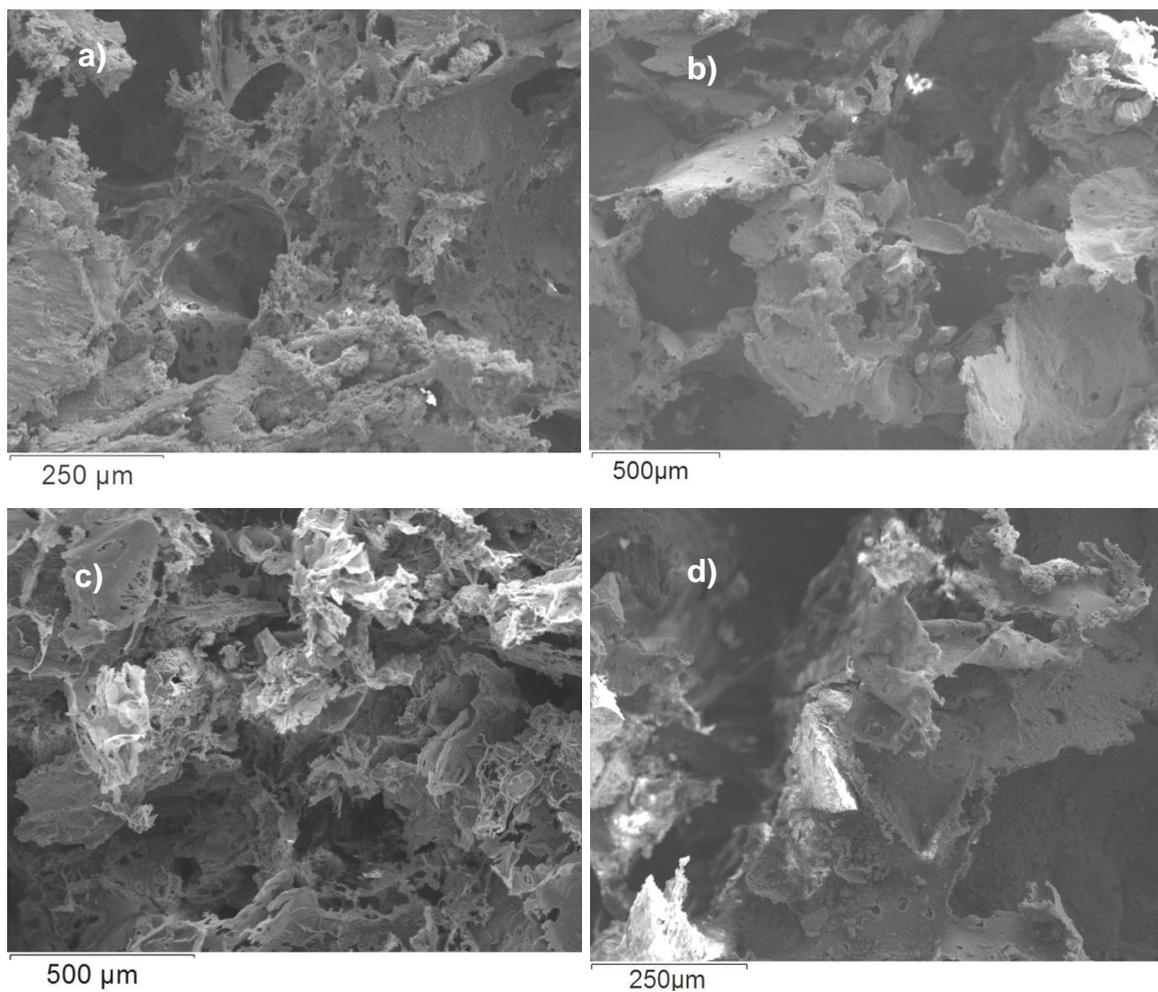


Figura 5.12. Micrografias de *scaffolds* A4 (a), B2 (b), C3 (c) e D3 (d).

Ainda na categoria de porosidade, é importante ressaltar os poros e suas interligações presentes nas paredes internas dos *scaffolds*, conforme apresentado nas imagens do *scaffold* A3 da Figura 5.13.

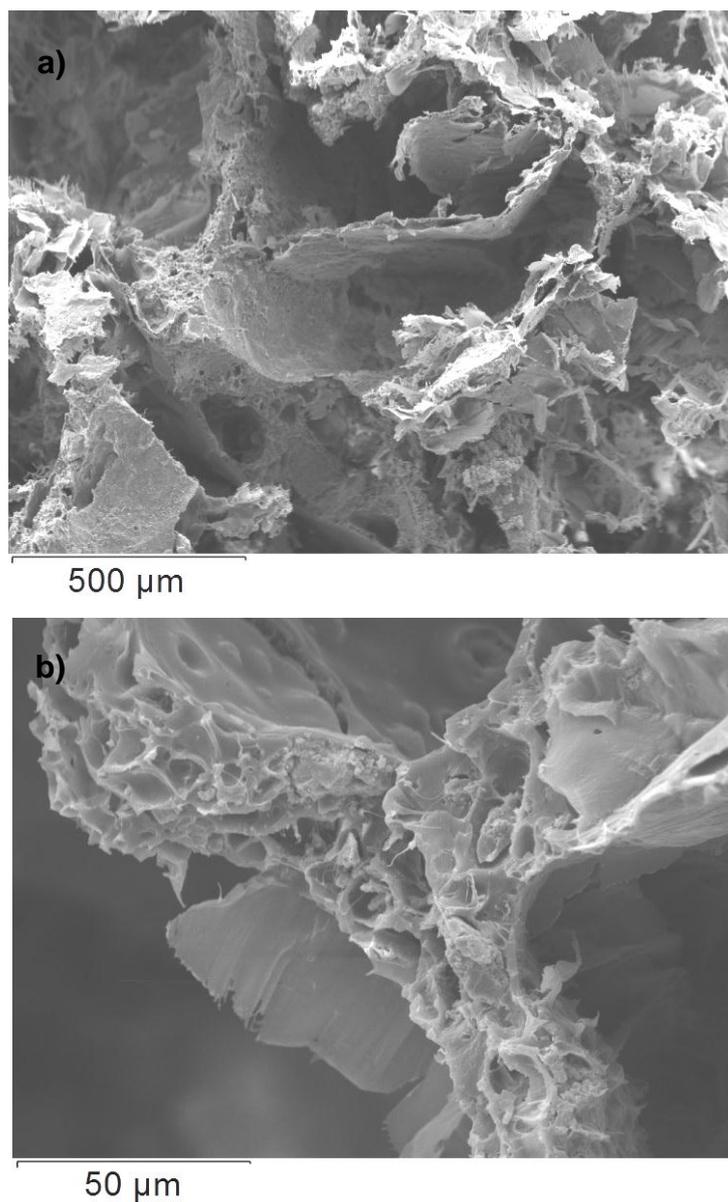


Figura 5.13. Micrografias evidenciando porosidade dos muros internos de *scaffold* A3 em magnificações de 150x (a) e 1.000x (b).

É possível observar a diversidade nas dimensões de poros, sendo encontrados poros que apresentavam poucos micrometros e poros que ultrapassam 500µm de diâmetro. Essa variação de diâmetros pode ser vista nas micrografias dispostas na Figura 5.14.

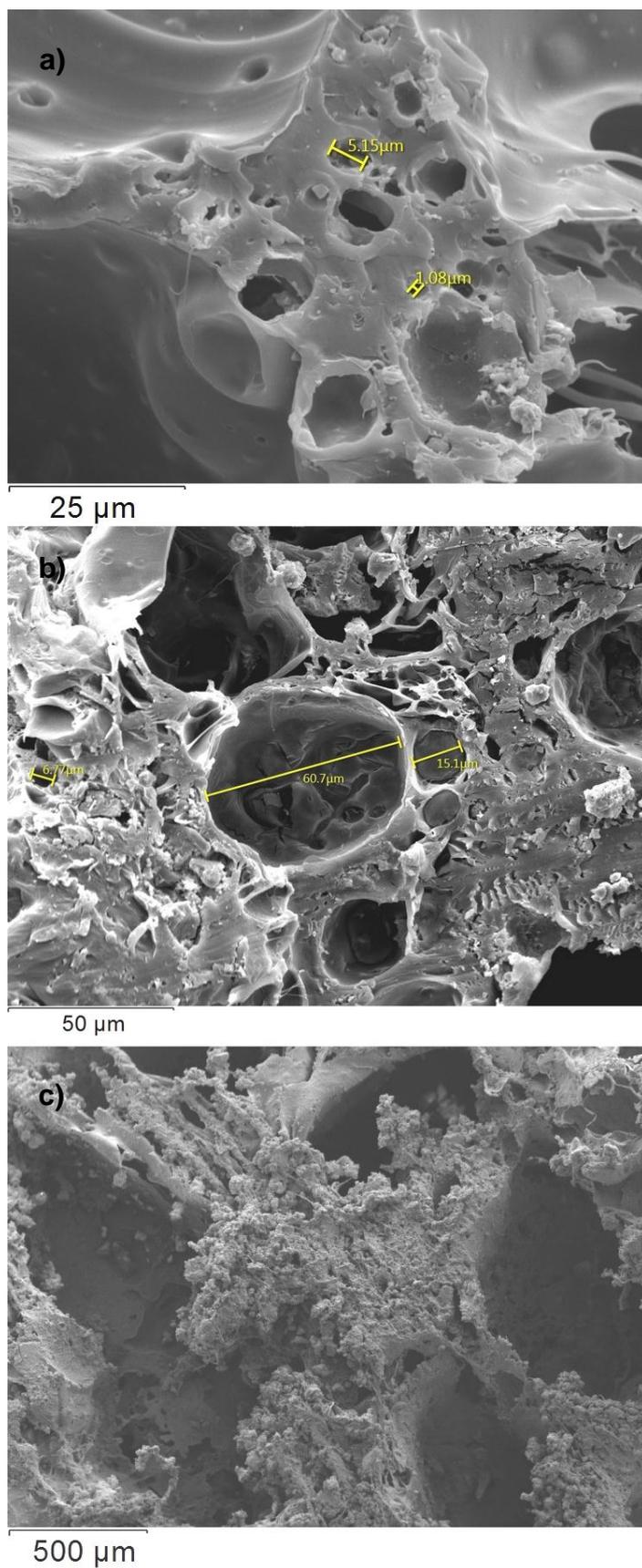


Figura 5.14. Micrografias de *scaffold* A1 apresentando diâmetros de poros de 5,15 μm (a), 60,7 μm (b) e acima de 500 μm (c).

Pode-se observar também a presença de hidroxiapatita depositada na superfície interna dos *scaffolds*, conforme ilustrado na Figura 5.15.

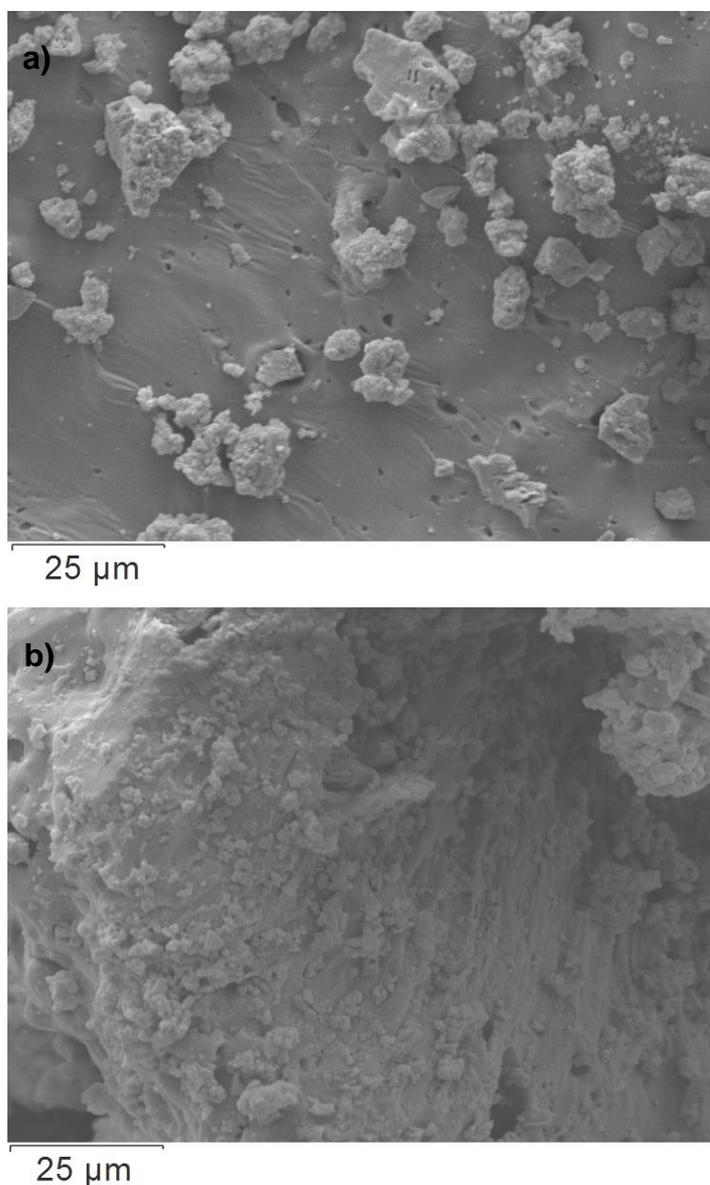


Figura 5.15. Micrografias de *scaffold* A1 (a) e *scaffold* B1 (b) com magnificações de 2.000x.

O ataque químico proporcionou a todos *scaffolds* tratados maior rugosidade, erosão e porosidade em suas superfícies em relação aos não tratados. Isso pode ser observado nas microscopias mostradas na Figura 5.16.

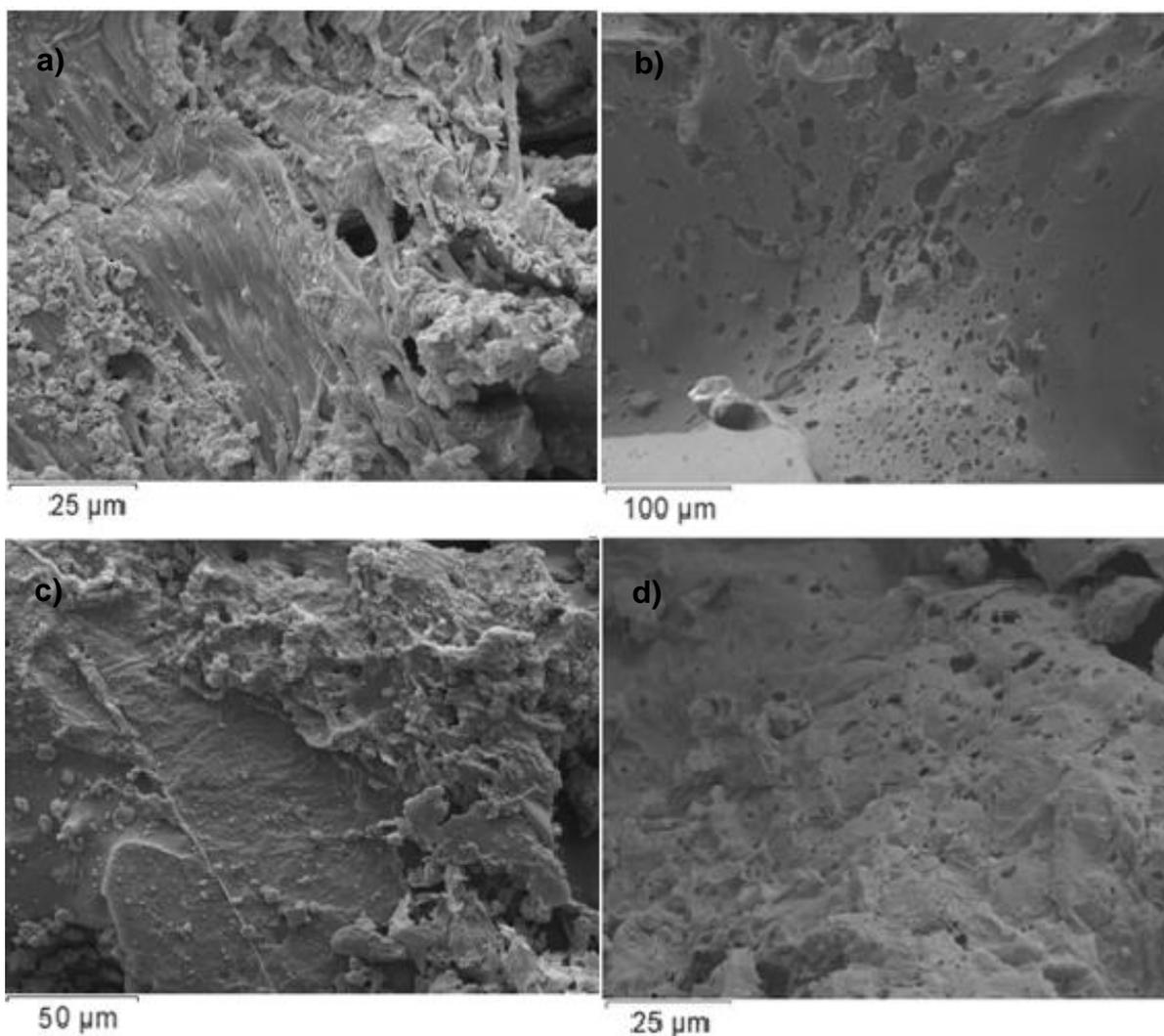


Figura 5.16. Micrografias de *scaffolds* não tratados, B1 (a) e A1 (c) e *scaffolds* tratados quimicamente, C2 (b) e A2 (d).

A eficiência do tratamento químico pode ser comprovada comparando-se, também, a rugosidade superficial a partir de micrografias de *scaffolds* não tratados com micrografias de *scaffolds* tratados com NaOH. O *scaffold* A1 apresenta uma porosidade superficial formada a partir da evaporação do solvente ainda na sua confecção, enquanto o *scaffold* A2 apresenta rugosidade resultante da agressão provinda do ataque químico. Essa constatação pode ser feita comparando-se a imagem (a) com a (b), bem como a imagem (c) com a imagem (d) da Figura 5.17. As rugosidades reveladas nas Figuras 5.17 (b) e 5.17 (d) influenciam diretamente no espalhamento da gota d'água, conforme visto na Fig. 5.5.

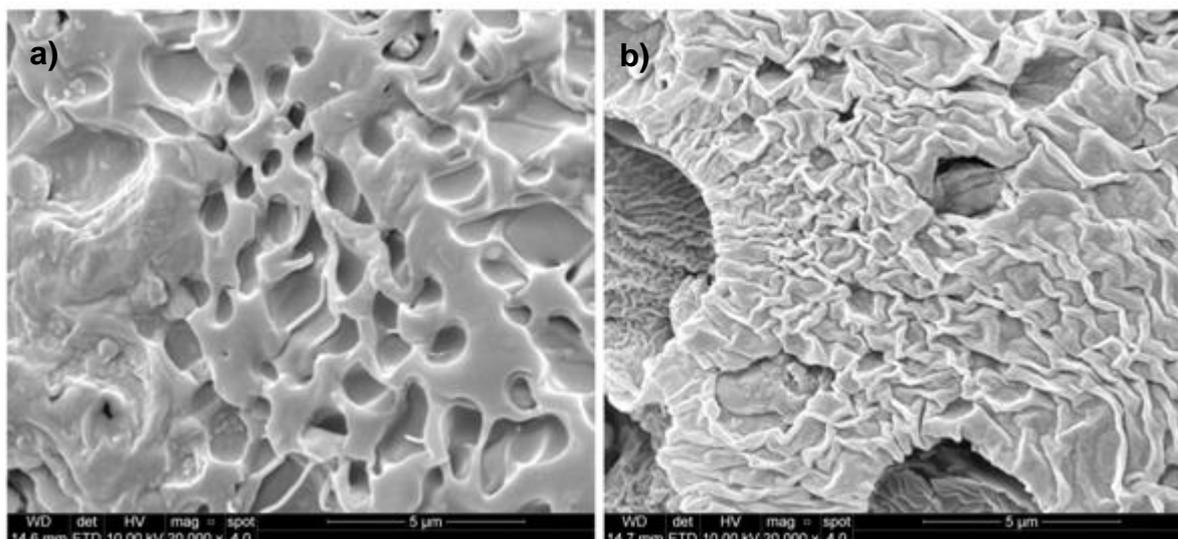


Figura 5.17. Diferença de rugosidade em superfícies de *scaffold* não tratado, A1 (a) e *scaffold* tratado quimicamente, A2 (b).

5.3.2. Ensaio de degradação hidrolítica

Ao final de cada tempo de degradação, *scaffolds* em triplicata foram pesados ainda molhados e, depois de lavados, secos. Suas porcentagens de massa perdida foram calculadas a partir da seguinte fórmula:

$$Pd = [(mi - mf) \cdot 100] / mi$$

Onde Pd é a porcentagem de massa degradada, mi é a massa inicial seca (antes da degradação) e mf é a massa final seca (após degradação).

Os gráficos dispostos na Figura 5.18 apresentam a porcentagem de degradação de todos os *scaffolds* confeccionados nos cinco tempos estabelecidos. Observa-se que o percentual de degradação não é proporcional ao tempo em nenhum dos tipos de *scaffolds*. Em alguns tipos de *scaffolds*, como A1 e A2, o percentual de degradação foi maior para os tempos menores do que para tempos de 42 dias. Os *scaffolds* porosos apresentaram uma perda de massa inicial que pode estar atribuída à perda de partículas de HA. O tempo de degradação fora relativamente curto, visto que as médias dos percentuais de degradação apresentavam-se próximas dentre os tempos de 14 e 42 dias. Esse aumento de

massa durante a degradação hidrolítica se mostra corriqueiro quando se trata de um poliéster [101,102].

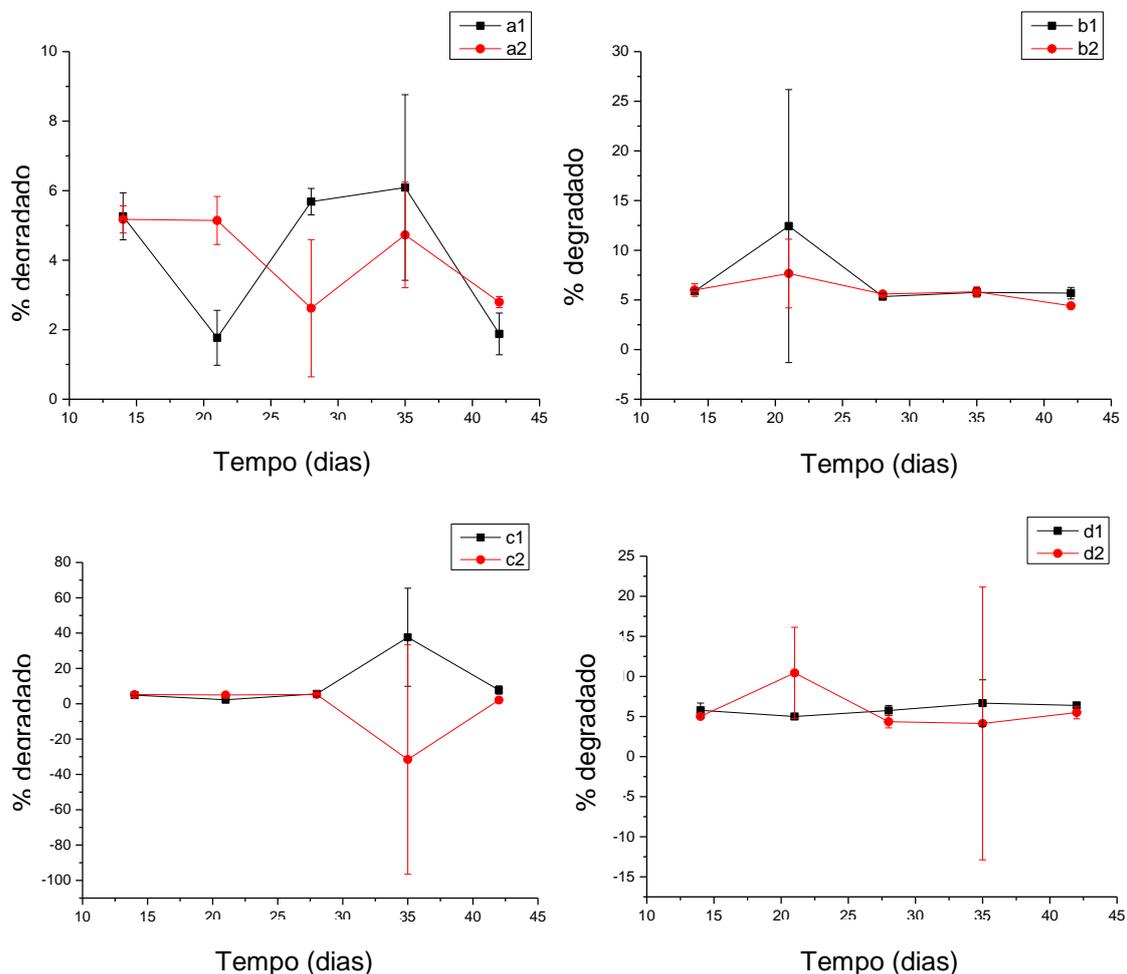


Figura 5.18. Porcentagens de degradação mássica de *scaffolds* A1 e A2 (a), B1 e B2 (b), C1 e C2 (c) e D1 e D2 (d).

Micrografias mostradas na Figura 5.19 revelam que não houve modificações significativas na topografia de *scaffolds* submetidos à degradação. As imagens dos *scaffolds* D1 antes da submissão à degradação, Figura 5.19 (a, b), são muito semelhantes às imagens dos *scaffolds* D1, Fig. 5.19 (c, d), e D2, Fig. 5.19 (e, f), depois de submetidos à degradação de 42 dias.

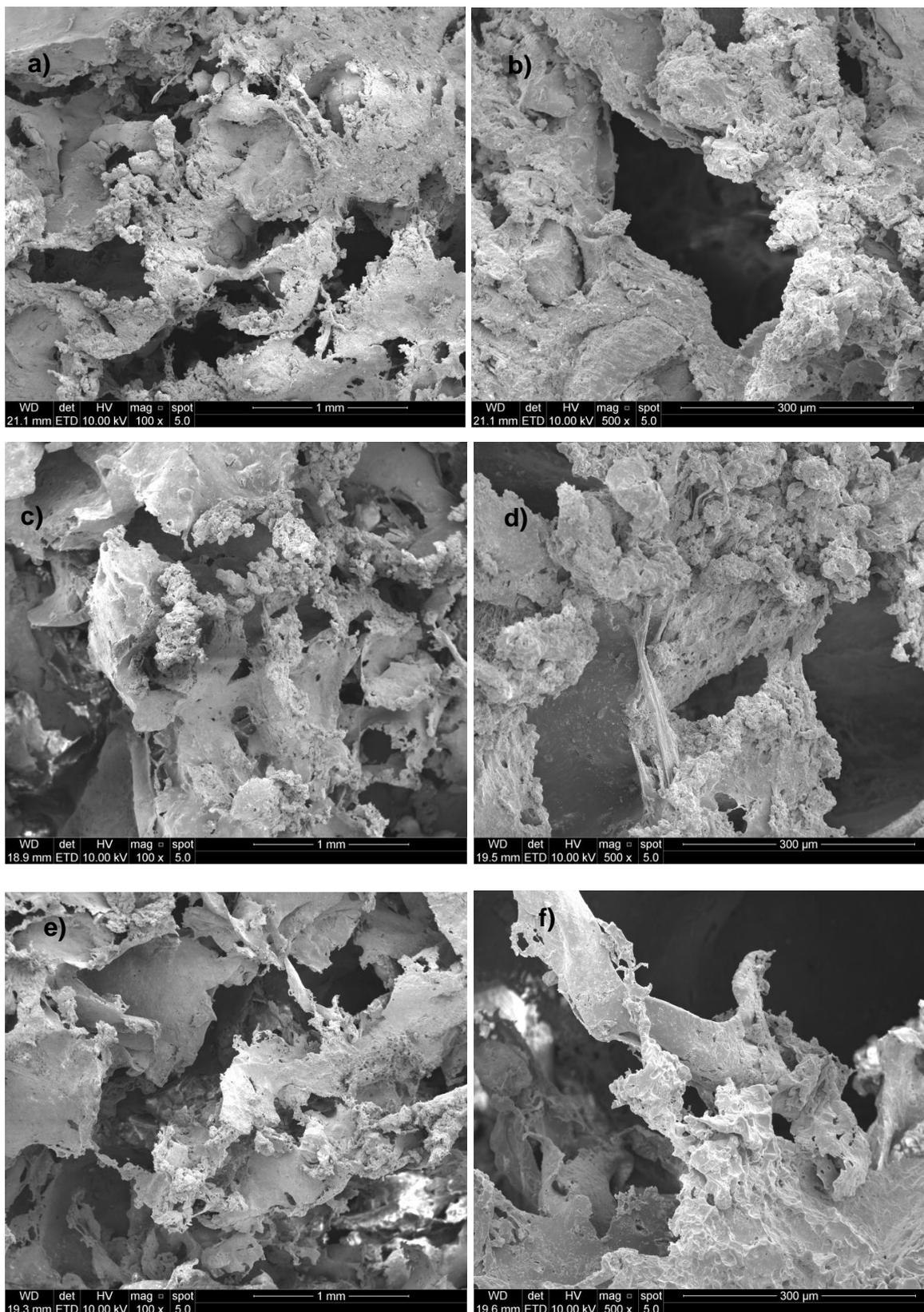


Figura 5.19. Micrografias de *scaffold* D1 antes da degradação (a, b), *scaffold* D1 após 42 dias de degradação (c, d) e *scaffold* D2 após 42 dias de degradação (e, f).

Ao final de cada período de degradação, as soluções de PBS oriundas dos frascos de cada *scaffold* foram reunidas em um Becker onde seu pH foi medido com um pHmetro. Os valores de pH foram iguais a 7,42 (14 dias), 7,46 (21 dias), 7,48 (28 dias), 7,64 (35 dias) e 7,78 (42 dias). Esse aumento de pH pode ser devido à exposição da HA à solução de PBS, que inicialmente apresentava pH igual a 7,40.

Este ensaio de degradação hidrolítica possibilitou também calcular o percentual de líquido absorvido pelas amostras. A quantidade percentual de líquido absorvido nos *scaffolds* foi calculada a partir da fórmula:

$$Pa = [(mt - m_0) / m_0] \times 100$$

Onde Pa é o percentual de líquido absorvido, mt é a massa do *scaffold* com PBS absorvido e m_0 é a massa do *scaffold* seco.

O gráfico da Figura 5.20 apresenta o percentual de absorção de PBS de cada *scaffold* em todos os períodos. Observa-se que as médias dos percentuais de absorção não possuem linearidade em relação ao aumento do período de degradação.

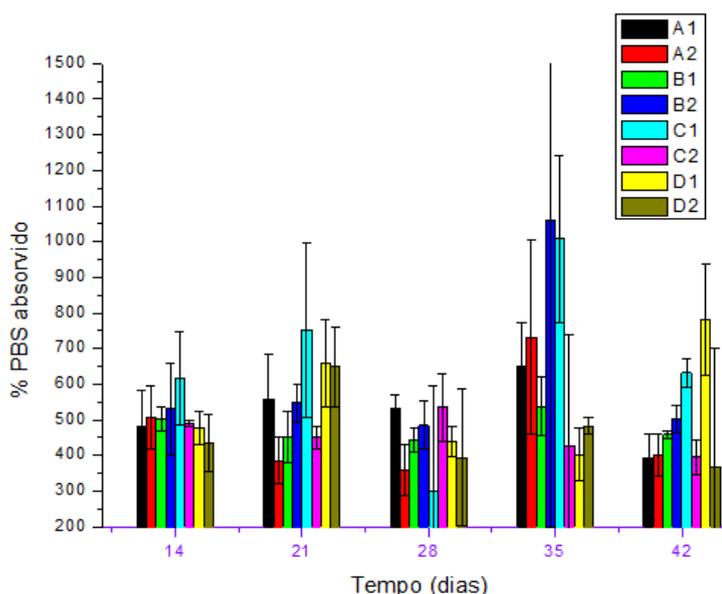


Figura 5.20. Percentagem de PBS absorvido pelos *scaffolds* durante ensaio de degradação.

No gráfico da Figura 5.21 pode-se comparar o percentual de absorção de PBS de *scaffolds* B1 (não tratados) e B2 (tratados quimicamente). Observa-se que *scaffolds* denominados B1 e B2 apresentaram comportamentos diferentes em todos os cinco tempos de degradação. A maior absorção de PBS foi constatada em *scaffolds* tratados quimicamente (B2).

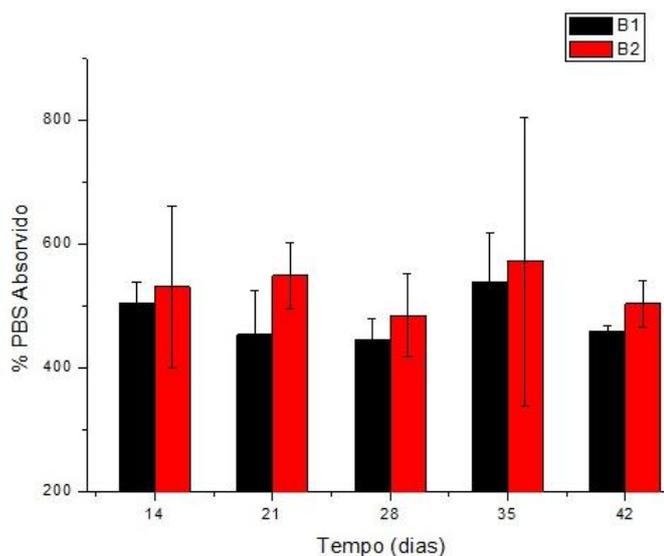


Figura 5.21. Percentagem mássica de PBS absorvido pelos *scaffolds* B1 e B2 durante degradação nos tempos de 14, 21, 28, 35 e 42 dias.

5.3.3. Ensaio de compressão

O comportamento de um *scaffold* A1, quando submetido a uma compressão de até 10 N, é apresentado na Figura 5.22 (a), onde o gráfico apresenta um comportamento elasto-plástico sem fraturas. Quando este mesmo tipo de amostra (A1) é submetido a uma força de até 50 N no ensaio de compressão, é possível observar que o *scaffold* sofre uma fratura – com início de ruptura próximo a carga de 35 N, como pode ser visto na Figura 5.22 (b). Para cada tipo de *scaffold* estudado neste trabalho, foram realizados dois ensaios com força máxima de 10 N e um ensaio com força máxima de 50 N.

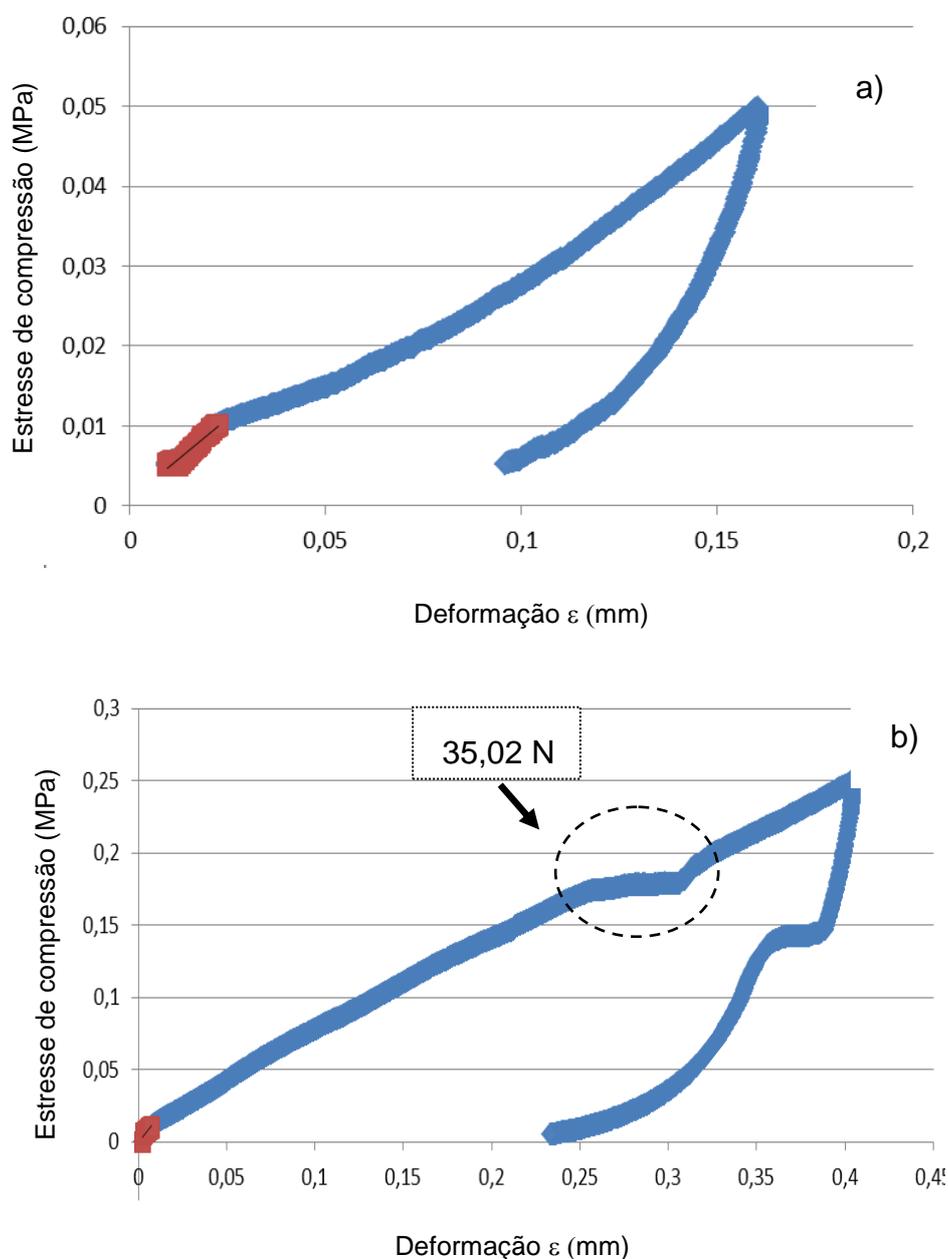


Figura 5.22. Comportamento mecânico de *scaffolds* A1 em compressão de até 10 N (a) e em compressão de até 50 N (b).

Neste trabalho, o módulo de elasticidade (Módulo de Young) para cada amostra estudada foi calculado pela linearização da parte inicial da curva de carregamento destacada em vermelho na Figura 5.22. A análise quantitativa destes valores é mostrada na Tabela 5.2, a qual permite observar que os *scaffolds* submetidos à compressão de 30 min (A3, B3 e C3) apresentaram menor valor de módulo de Young do que os mesmos *scaffolds* submetidos a 15 min de compressão (A1, B1 e C1). O fato do aumento do tempo de compressão gerar amostras menos rígidas pode estar ligado à questão de o polímero precisar de um tempo mínimo para

formar uma estrutura interconectada que traria mais elasticidade ao material após a remoção do sal.

Outra relação importante a ser observada é a influência da dimensão dos poros nas propriedades mecânicas das amostras. Os *scaffolds* confeccionados com sal de granulometria menor obtiveram maiores valores para o Módulo de Young do que os confeccionados a partir de granulometria maior. Para analisar esse dado, o Módulo de Young do *scaffold* A1 foi comparado com o do B1, assim como se comparou o Módulo de Young do A3, com o do B3.

Da mesma forma, o aumento de pressão de oito toneladas para 12 t resultou em uma diminuição do Módulo de Young, visto que os *scaffolds* C1 e C3 obtiveram menores Módulos de Young que A1 e A3, respectivamente. Este resultado mostra o mesmo comportamento obtido com o aumento do tempo de prensa, ou seja, as estruturas mais elásticas podem ser obtidas tanto por aumento da carga quanto pelo aumento do tempo de prensagem.

Comparando-se os resultados entre as amostras de PLGA com e sem a adição da carga de hidroxiapatita (A1 e A1*), ficou evidente que a adição de uma carga ao PLGA contribuiu para o aumento do Módulo de Young tornando a amostra mais rígida, uma vez que os ensaios realizados em *scaffolds* sem HA apresentaram média de Módulo de Young menor que os demais *scaffolds* com carga. É possível observar, nos dados da tabela 5.2, que todos os resultados dos valores de início de fratura estão muito próximos (entre 32,179 e 35,139 N).

Tabela 5.2. Média de Módulo de Young e Valores de ruptura dos distintos *scaffolds* confeccionados.

	A1	A3	B1	B3	C1	C3	A1*
Média Módulo Young (MPa)	1,1173	1,0283	0,7287	0,5387	0,6910	0,5577	0,6498
Desvio Padrão	0,6160	0,5649	0,4797	0,1936	0,3182	0,1225	0,2224
Valores de ruptura (N)	35,019	35,139	32,179	33,719	32,199	33,079	-

* *Scaffold* confeccionado sem hidroxiapatita

Esse ponto de ruptura deve estar relacionado com a fratura sequencial dos contornos dos poros, os quais formam pilares que podem, eventualmente, ser considerados os pontos de sustentação mecânica dos *scaffolds*. Para justificar esta teoria, são mostradas, na Figura 5.23, micrografias de *scaffolds* variando a granulometria do sal e o tempo de prensa. Nela, verifica-se que é possível achar uma região que contenha uma sequência de poros alinhados, podendo gerar um ponto de fragilidade às amostras.

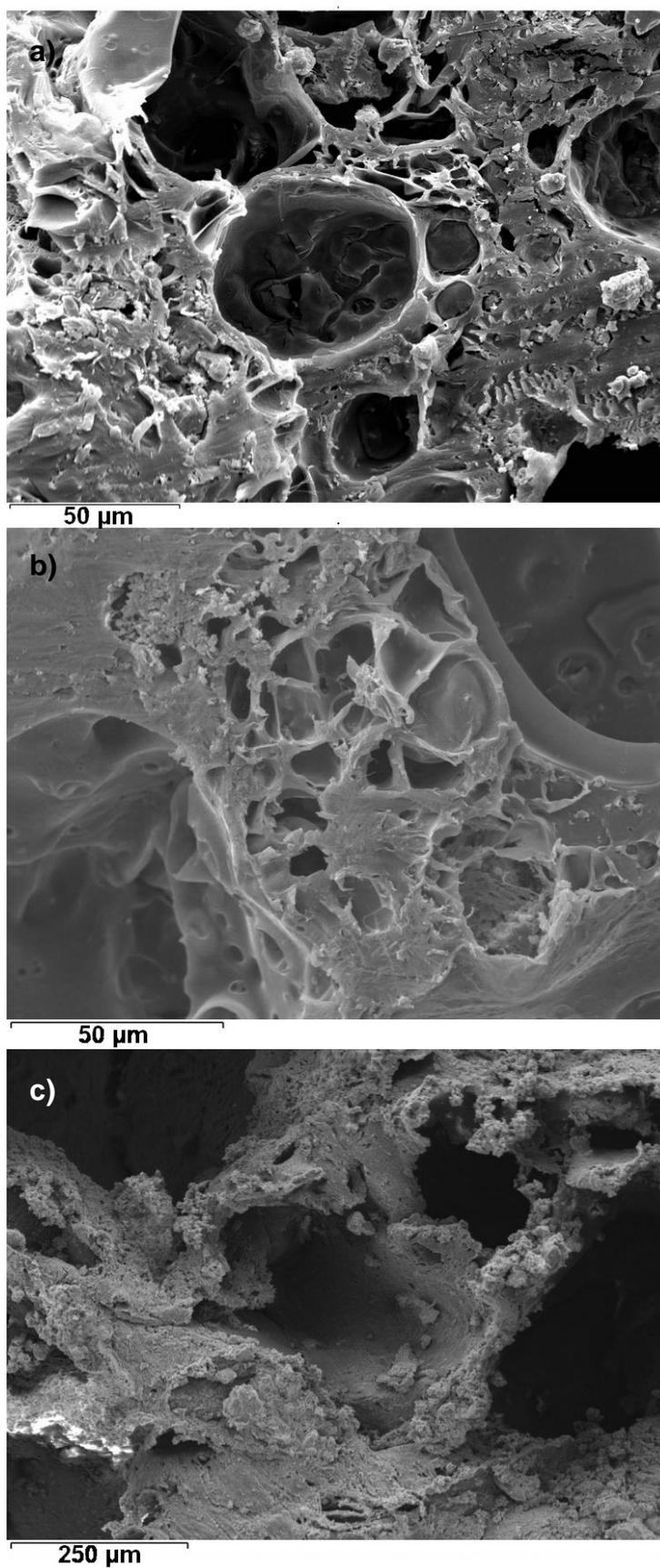


Figura 5.23. Alinhamento de poros em *scaffolds* A1 (a, b) e B3 (c).

6. CONCLUSÕES

Concluiu-se que a metodologia I, que utilizava dimensões de grânulos de NaCl entre 75 e 150 μm e vácuo para evaporação do solvente, não atingiu o grau de porosidade desejado, pois a dimensão dos poros apresentada era insatisfatória. Outro ponto fundamental para desconsiderar esta metodologia, é que a mesma originou *scaffolds* com uma resistência mecânica muito baixa, visto que eles sofriam fragmentação já no ato de serem retirados do molde.

As membranas porosas confeccionadas apresentaram uma menor espessura após tratamento químico. O teste de molhabilidade analisado pelo ângulo de contato provou que o tratamento químico aumenta a hidrofiliabilidade das membranas e, por consequência, dos *scaffolds*. Micrografias de membranas (com e sem tratamento) revelaram mudanças na morfologia superficial após tratamento químico, pois se observou maior erosão provocada pelo ataque básico e aumento da superfície de contato. Estes resultados permitem a criação de superfícies específicas para diversas aplicações onde a molhabilidade é fator fundamental, como, por exemplo, em aplicações biológicas.

A utilização da metodologia II, que incluía a compressão para moldar os *scaffolds*, proporcionou maior grau de porosidade e propriedades mecânicas mais apropriadas para aplicações na engenharia de tecido ósseo. Essa metodologia originou *scaffolds* com porosidades que variavam de poucos micrometros de diâmetro até poros acima de 500 μm . Observou-se que a variação de diâmetro dos poros foi relacionada com as diferentes granulometrias do sal utilizado. A variação da força de pressão exercida sobre as amostras durante sua confecção contribuiu para alterar de forma tênue a dimensão dos poros.

A alta porosidade e a interconecção entre poros esteve presente em todos os *scaffolds* confeccionados pela metodologia II. Foi revelada a presença de aglomerados de hidroxiapatita. Comprovou-se que o ataque químico foi eficiente, visto que os *scaffolds* tratados com NaOH apresentaram aumento da rugosidade, erosão e porosidade em suas superfícies.

Os percentuais de degradação e de absorção de PBS, de cada *scaffold*, puderam ser calculados através do ensaio de degradação hidrolítica. Os valores de degradação não se comportaram de forma proporcional com relação ao tempo. Fato, este, que pode ter ocorrido devido ao curto tempo em que as amostras permaneceram em degradação. Os resultados desse ensaio mostraram que, dentro do período de 42 dias, o percentual de degradação não alterou significativamente, revelando que o ensaio deveria ter sido realizado com períodos maiores. Foi possível também relatar que, de forma geral, os *scaffolds* tratados quimicamente apresentaram maior percentual de absorção de PBS comparados aos não tratados.

Com base nas médias dos módulos de Young das amostras, foi possível concluir que a rigidez elástica dos *scaffolds* aumenta com a diminuição da granulometria do sal utilizado, mostrando um comportamento inversamente proporcional para as dimensões de partículas de sal estudadas neste trabalho. Também, para a carga e o tempo de prensagem das amostras, foi observada uma relação inversamente proporcional com a rigidez mecânica dos *scaffolds*, onde os aumentos do tempo de prensagem e da carga resultaram em valores menores para o módulo de Young. Em relação à carga de início de ruptura das amostras, não foi observada uma diferença significativa, mostrando que todas as amostras estudadas possuem uma resistência mecânica equivalente.

7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar quantitativamente a porosidade de todos os *scaffolds* tratados e não tratados quimicamente.

- Realizar ensaio de degradação hidrolítica com maior período de tempo acompanhando a degradação *in vitro* por GPC (cromatografia por permeação em gel).

- Realizar a adesão de microcápsulas nos *scaffolds* e posterior inserção de fármacos às microcápsulas.

- Realizar testes de adesão celular *in vitro* e, posteriormente, *in vivo*, avaliando a regeneração do tecido ósseo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] GUASTALDI, A. C. APARECIDA, A. H. Fosfato de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, v. 33, p. 1352-1358, 2012.
- [2] ROCHA, M. O. C. et al. Terapêutica clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. cap.67, p.588-604.
- [3] O'KEEFE R. J. et al. Bone tissue engineering and regeneration: from discovery to the clinic—an overview. **Tissue Engineering**. Part B, v.17, p.389–92, 2011.
- [4] EFTEKHARI, S. et al. Fabrication and characterization of novel biomimetic PLLA/cellulose/hydroxyapatite nanocomposite for bone repair applications. **Materials Science and Engineering C** 39, 120–125, 2014.
- [5] BELTHUR, M.V. et al. Bone graft harvest using a new intramedullary system, **Clinical Orthopaedics**. V.466, p.2973–80, 2008.
- [6] Arcata, Inovação em Odontologia. Doação de órgãos e transplantes: O Cenário dos Bancos de Ossos no Brasil. Disponível em: <http://arcata.com.br/destaques/o_cenario_dos_bancos_de_ossos_no_brasil>. Acesso em 28/10/2014.
- [7] Pattison, M. A. et al. Three-dimensional, nano-structured PLGA scaffolds for bladder tissue replacement applications. **Biomaterials**. V. 26. p. 2491-2500, 2005.
- [8] SE HEANG OH et al. Peripheral nerve regeneration within an asymmetrically porous PLGA/Pluronic F127 nerve guide conduit. **Biomaterials**, V. 29 - 11, p. 1601-1609, 2008.
- [9] Grupo Hospitalar São Francisco. Brasil registra queda no número de transplantes de ossos nos primeiros seis meses de 2014. Disponível em: <http://www.saofrancisco.com.br/site/portal/noticias_show.php?noticia=218>. Acesso: 25/11/2014.

- [10] LEE, J.B. et al. PLGA scaffold incorporated with hydroxyapatite for cartilage regeneration. **Surface & Coatings Technology**. V. 202, 5757–5761, 2008.
- [11] SCHILLER, C. et al. Geometrically structured implants for cranial reconstruction made of biodegradable polyesters and calcium phosphate/calcium carbonate. **Biomaterials**. V. 25, 1239–1247, 2004.
- [12] QUERESHY, F.A. et al. The efficacy of bioresorbable fixation in the repair of mandibular fractures: an animal study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. V. 58:1263–9, 2000.
- [13] ISHII, S. et al. Long-term study of high-strength hydroxyapatite/poly (L-lactide) composite rods for the internal fixation of bone fractures: a 2–4-years follow-up study in rabbits. **Journal Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**. V. 66B:539–47, 2003.
- [14] YOSHIKAWA, T. et al. In vivo osteogenic durability of cultured bone in porous ceramics: a novel method for autogenous bone graft substitution. **Transplantation**; 69(1):128–34, 2000.
- [15] WAN, Y.Z. et al. Biomimetic synthesis of hydroxyapatite/bacterial cellulose nanocomposites for biomedical applications **Materials Science and Engineering C** 2, 855–864, 2007
- [16] CHEN, G. et al. Development of biodegradable porous scaffolds for tissue engineering. **Materials Science and Engineering C** 17, 63–69, 2001.
- [17] WILLIAMS, D. Benefit and risk in tissue engineering. **Materials Today**. v.7, p.24-9. 2004.
- [18] MOU, Z.L. et al. Preparation of porous PLGA/HA/collagen scaffolds with supercritical CO₂ and application in osteoblast cell culture. **Journal of Supercritical Fluids** 58, 398–406, 2011.
- [19] FRANZ, S.; et al. Immune responses to implants e a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. **Biomaterials**. v.32, p.6692-6709, 2011.
- [20] BOCCACCINI, A. R. et al. Bioresorbable and bioactive polymer/Bioglass® composites with tailored pore structure for tissue engineering applications. **Composites Science and Technology**, V. 63, p. 2417-2429, 2003.
- [21] KIELY, K. D. et al. One-year postoperative stability of LeFort I osteotomies with biodegradable fixation: A retrospective analysis of skeletal relapse. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, V. 130, p. 310-316. 2006.

- [22] PIETRZAK, W.S. Principles of development and use of absorbable internal fixation. **Tissue Engineering**; 6:425–33, 2000.
- [23] RODAN, G.A. Introduction to bone biology. **Bone**. 13: S3-S6, 1992.
- [24] GUYTON & HALL. Tratado de Fisiologia Médica. 11ª edição. Aesculapius. Capítulo 79. Paratormônio, Calcitonina, Metabolismo de cálcio e Fosfato, Vitamina D, ossos e Dentes. Sindicato Nacional dos editores de livros, Rio de Janeiro, 2006, p. 980-992.
- [25] KLAPISZ-WOLIKOW M: Os alvéolaire. Aspects anatomiques et morphologiques. In: Goldberg M, ed. Manuel d'Histologie et de Biologie Buccale. Paris: Masson, 1989; 109-135.
- [26] JONES, J.R. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. **Acta Biomaterialia**. 9, 4457–4486, 2013.
- [27] VILELA, Ana Luisa Miranda. Anatomia e fisiologia humana. Tecidos que formam o esqueleto. Disponível em: <<http://www.afh.bio.br/sustenta/sustenta2.asp>>. Acesso: 03/11/2014.
- [28] TEN CATE AR. Hueso ed. **Histologia Oral. Desarrollo, estructura y funcion**, 2a ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana, 1986; 146-170.
- [29] DOBLARÉ, J. M.; et al. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. **Engineering Fracture Mechanics**. V. 71, p.1809–40, 2004.
- [30] JUDAS, F. et al. **ESTRUTURA E DINÂMICA DO TECIDO ÓSSEO**. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Março de 2012.
- [31] VELEDA, P. P.; **Produção e caracterização de implantes nanotexturizados de titânio associado à liberação gradual de fármacos**. Porto Alegre. 2012. Tese de doutorado. p.85. Engenharia e Tecnologia de Materiais. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Brasil
- [32] NADEAU, A. Complements sinusiens en vue d'implantologie. **Th. Chir Dent** : Nancy. 27, 1995.
- [33] LANGER, R. et al. Tissue engineering. **Science**. 260: 920- 6, 1993.
- [34] VACANTI, C.A. et al. Tissue-engineered growth of bone and cartilage. **Transplantation Proceedings**, 25:1019–21, 1993.
- [35] FERREIRA, J.R.M. et al. Enxertos ósseos xenógenos utilizados na Implantodontia Oral. **Revista ImplantNews**. 4(3):303-6. 2007.

- [36] LAURENCIN, C.T. et al. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite delivery of BMP-2-producing cells: a regional gene therapy approach to bone regeneration. **Biomaterials**. 22, 1271-1277, 2001.
- [37] BONFIGLIO, M. et al. Immunological responses to bone. **Clinical Orthopaedics and Related Research**; 87:19–27, 1972.
- [38] SANG-SOO KIMA B. et al Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering **Biomaterials**. 27, 1399–1409, 2006.
- [39] RIZZI, S.C. et al. Biodegradable polymer/hydroxyapatite composites: surface analysis and initial attachment of human osteoblasts. **Journal of Biomedical Materials Research**; 55:475–86, 2001.
- [40] THOMSON, R.C. et al. Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone. **Journal Biomaterials Science Polymer edition**. V 7:23-38, 1995.
- [41] BUDDY, D. R. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. **Elsevier**, 2004.
- [42] CESCHIN, J. R. O implante na reabilitação bucal. **Pamed** Editorial, 1984. p.21-56.
- [43] WILLIAMS, D.F. Consensus and definitions in biomateriais. In: Putter C, DeLange GL, Groot K, et al., eds. *Advances in Biomateriais - Implant Materials in Biofunction*, vol 8. Amsterdam: **Elsevier Science Publishers**; 11-16, 1988.
- [44] WILLIAMS, D.F. et al. Second consensus conference on definitions in biomateriais. In: Doherty PJ, Williams RL
- [45] WILLIAMS, D.F. et al. eds. *Advances in Biomateriais: Biomaterial-Tissue Interfaces*, vol 10. Amsterdam: **Elsevier Science Publishers**; 525-533. 1992.
- [46] WILLIAMS, D.F. *The William Dictionary of Biomaterials*, Liverpool, 1999. apud Dorozhkin, S. V.; **Glass and Ceramics**, 64, 11, 2007.
- [47] PARK, J; LAKES, R. S. “Biomaterials – An Introduction”. Springer. 3ª edição. 2007. p. 2.
- [48] PARK, J. B.; BRONZINO, J. D.; *Biomaterials: principles and applications*, CRC PRESS: Boca Raton, 2002.
- [49] JHS Biomateriais. Enxertos ósseos Hidroxiapatita Sintética Disponível em : <<http://www.jhs.med.br/produtos/enxertos-osseos-hidroxiapatita-sintetica/>> Acesso em: 05/09/2014.

- [50] SOULIE, J., COMBES, C. Elaboration et étude d'un biomatériau composite macroporeux . 2014.
- [51] RAMAKRISHNA, S. et al. Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. **Composite Science and Technology** 61,1189-1224, 2001.
- [52] SIQUEIRA, R. L. et al. BIOSILICATO®: HISTÓRICO DE UMA VITROCERÂMICA BRASILEIRA DE ELEVADA BIOATIVIDADE **Quimica Nova**, Vol. 34, No. 7, 1231-1241, 2011.
- [53] BOCCACCINI, A. R. et al. Tissue engineering using ceramics and polymers, CRC Press: New York, 2007.
- [54] FATHI, M.H. et al. Bioactive glass nanopowder and bioglass coating for biocompatibility improvement of metallic implant. **Journal of Materials Processing Technology**, V. 209, p. 1385-1391, 2009.
- [55] KOKUBO, T. Bioceramics and their clinical applications, CRC Press: Boca Raton, 2008.
- [56] HULBERT, S.F. et al. History of bioceramics. **Ceramics International**. Vol 8; n 4. 1982.
- [57] BEST, S.M. et al J. Bioceramics: Past, present and for the future. **Journal of the European Ceramic Society**. v. 28, p. 1319–1327, 2008.
- [58] LEGEROS R.Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. **Chemical Reviews**. v.108, n.11, p.4742-53, 2008.
- [59] AMBROSIO, A.M. et al. A novel amorphous calcium phosphate polymer ceramic for bone repair: I. Synthesis and characterization. **Journal of Biomedical Materials Research**. 58, 295–301, 2001.
- [60] LEGEROS, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research** (395):81–98, 2002.
- [61] DUCHEYNE, P. et al. "Materials for Bone and Joint Replacement", **Materials Science and Technology** -A Comprehensive Treatment. v. 14, p. 29-109, 1992.
- [62] KORKUSUZ, F. et al. Do porous calcium hydroxyapatite ceramics cause porosis in bone? A bone densitometry and biomechanical study on cortical bones of rabbits. **Biomaterials**. 16, 537-543, 1995.
- [63] CIAPETTI G. et al. Osteoblast growth and function in porous poly ϵ -caprolactone matrices for bone repair: a preliminary study. **Biomaterials**. v. 24, n. 21, p. 3815-3824, 2003.

- [64] AMINZARE, M. et al. Hydroxyapatite nanocomposites: Synthesis, sintering and mechanical properties. **Ceramics International**. 39, 2197–2206, 2013.
- [65] WHITE FEATHER. The ossification: Artist Research-Creation. Disponível em: <<http://ossificatorium.blogspot.com.br/>> Acesso: 25/11/2014.
- [66] OHGUSHI, H. Okumura M. Osteogenic capacity of rat and human marrow cells in porous ceramics. **Acta Orthop Stand**. 61: 431-434, 1990.
- [67] PETTIS, G.Y. et al. Tissue response to composite ceramic hydroxyapatite demineralized bone implants. **J Oral Maxillofac Surg**. 48: 1068-1074, 1990.
- [68] BAUER, T.W. et al. Hydroxyapatite coated femoral stems. 1 **Bone Joint Surgery**.; 73-A: 1439-1459, 1991.
- [69] FRAYSINET, P. et al. New observations on middle term hydroxyapatite coated titanium alloy hip prostheses. **Biomaterials**; 13: 668-674, 1992.
- [70] KOKUBO, T: Bioactive glasses ceramics: Properties and applications. **Biomaterials**. 12: 155-163, 1991.
- [71] DE GROOT, K. et al. Plasma sprayed coatings of hydroxylapatite. **Journal of Biomedical Materials Research**. V. 21, 1375–1381, 1987.
- [72] VERT, M. Et al. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. **Journal of Materials Science & Technology**. V. 3, p.432, 1992.
- [73] BARBANTI, S. H. et al. - Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 15, nº 1, p. 13-21, 2005.
- [74] SARDELA et al., "Plasma microstructuring of polymers for contact guidance of cells", In: **International Conference on Advances of Biomaterials for Reconstructive Medicine**, pp. 74-75, Capri, June 2002.
- [75] MONTES DE OCA, Ward. Structure and mechanical properties of PGA crystals and fibres. **Polymer**. 47:7070-7077, 2006.
- [76] ZHOU, H. et al. Fabrication aspects of PLA-CaP/PLGA-CaP composites for orthopedic applications: A review. **Acta Biomaterialia**. 8 1999–2016, 2012.
- [77] TÖRMÄLÄ, P. et al. Bioabsorbable polymers: materials technology and surgical applications. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers**. 212 (2):101-111, 1998.
- [78] CIELO, Vinícius Flores. **Avaliação Da Resposta Tecidual A Discos De Ácido Poli-L/D Láctico: Estudo Experimental Em Ovelhas**. Porto Alegre. 2010. Dissertação. Programa De Pós-Graduação Em Odontologia. PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

- [79] Ésteres e fragrâncias. Disponível em: <<http://portaldoprofessor.mec.gov.br>>. Acesso: 30/10/2014.
- [80] VACANTI, J. et al. Principles of Tissue Engineering, 3rd Edition ed. by Lanza, Langer, and Vacanti. **The History and Scope of Tissue Engineering**, Chapter One. 2007.
- [81] ROCHE, R., et al. Immobilisation for a Tagliacozzi nasal reconstruction using an ASIF external craniofacial fixation apparatus. **European Journal of Plastic Surgery**. 16: 310-312, 1993.
- [82] NEREM, R. M. Tissue engineering: the hope, the hype and the future. **Tissue Engineering**. 12, 1143–1150. 2006.
- [83] RAVI, S. et al. Tissue Engineering. **Advances in Surgery** 48, 137–154, 2014.
- [84] National University Health System. 2010. Disponível em: <<http://www.nuhs.edu.sg/research/programmatic-research/som-registered-programmes/nus-tissue-engineering-programme.html>>. Acesso em 25/11/2014.
- [85] MURPHY, S.V., et al. Organ engineering—combining stem cells, biomaterials, and bioreactors to produce bioengineered organs for transplantation. **Bioessays**; 35(3):163–72, 2013.
- [86] JAIN, R.K. et al. Engineering vascularized tissue. **Nature Biotechnology**; 23(7):821–3, 2005.
- [87] LEVENBERG, S. et al. Engineering vascularized skeletal muscle tissue. **Nature Biotechnology**; 23(7):879–84, 2005.
- [88] SANTO, V. E. et al. Hybrid 3D structure of poly (d,l-lactic acid) loaded with chitosan/chondroitin sulfate nanoparticles to be used as carriers for biomacromolecules in tissue engineering, **Journal of Supercritical Fluids** 54 320–327, 2010.
- [89] LI, Y. YANG, S. T. Effects of three-dimensional scaffolds on cell organization and tissue development, **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 6, 311–325, 2001.
- [90] CHANG, B.S. et al. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations, **Biomaterials**, 21, 1291–1298, 2000.
- [91] HULBERT, S.F. et al. Tissue reaction to three ceramics of porous and non-porous structures, **Journal of Biomedical Materials Research Part A** 6, 347–374. 1972.

- [92] GAO, J. et al. Surface hydrolysis of poly(glycolic acid) meshes increases the seeding density of vascular smooth muscle cells. **Journal of Biomedical Materials Research**. V. 42, no. 3, p. 417-424, 1998.
- [93] HUTMACHER, D. W. et al. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials**, 21, 2529-2543, 2000.
- [94] REECE, G.P. et al. Tissue engineered construct design principles. In: Patrick Jr CW, Mikos AG, McIntire LV, editors. *Frontiers in tissue engineering*. New York, USA: **Elsevier Science**, p. 166-96, 1998.
- [95] VANDER, A. J. et al. **Human physiology**. New York: McGraw-Hill. p. 341-66. 1985.
- [96] THAPA, A. et al. Nano-structured polymers enhance bladder smooth muscle cell function. **Biomaterials**, V. 24, p. 2915-2926, 2003.
- [97] KHORASANI, M. T.; *et al.* Plasma surface modification of poly (L-lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) films for improvement of nerve cells adhesion. **Radiation Physics and Chemistry**, v.77, p.280–287, 2008.
- [98] EUSTATHOPOULOS, N. et al. Wettability at High Temperatures. **Elsevier Science**, 1999.
- [99] LI, H. et al. pH-compensation effect of bioactive inorganic fillers on the degradation of PLGA. **Composites science and technology**, v. 65, p. 2226- 2232, 2005.
- [100] ZAIDEN, A.R., PETERSEN, L.P., OLIVEIRA, S.G. Ensaio Mecânicos de Metais. UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA. 2010
- [101] SHRADOSIM, M. G. Confecção de Estruturas Tubulares Permeáveis de PLGA. Dissertação para a obtenção do título de mestre em engenharia e tecnologia de materiais. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2012
- [102] Larranaga, A. et al. Hydrolytic degradation and bioactivity of lactide and caprolactone based sponge-like scaffolds loaded with bioactive glass particles. **Polymer Degradation and Stability**, vol. 110, pag. 121-128, 2014.

APÊNDICES



Materials Science and Engineering

Congress Office: Deutsche Gesellschaft für Materialkunde e.V.
 Senckenberganlage 10, 60325 Frankfurt, Germany
 Tel. (+49) 69 - 75306 747, Fax (+49) 69 - 75306 733
 e-mail: mse@mse-congress.de, www.mse-congress.de

Mariane Giacomini Schardosim
 INPT - ENSIACET
 CIRIMAT
 4 allée Emile Monso

31030 Toulouse
 FRANCE

MSE 2014
23-25 September in Darmstadt,
Germany

13.11.2014

Dear Mrs. Giacomini Schardosim,

This is to certify that you have been participating in the MSE 2014 Congress in Darmstadt, Germany.

We confirm the presentation of the poster entitled:

„Preparation and Properties of Porous PLGA-bioactive Particles Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering“

Authors: M. Giacomini Schardosim (Sp), INPT - ENSIACET, Toulouse (France); G. Soares, R. Hubler, GEPSI-LMN, Porto Alegre (Brazil); J. Soulié, D. Poquillon, C. Rey, C. Combes, University of Toulouse (France)

Thank you for your involvement!

We are looking forward to seeing you again at one of our next events.

With kind regards

MSE Congress Office
 Anja Mangold and Kristin Tonn
 c/o Deutsche Gesellschaft für Materialkunde e.V.
 Senckenberganlage 10
 D-60325 Frankfurt
 Tel. +49-69-75306 747
 Fax +49-69-75306 733
 mse@mse-congress.de
 www.mse-congress.de
 Deutsche Gesellschaft für Materialkunde e.V.
 Senckenberganlage 10 D-60325 Frankfurt
 www.dgm.de, Internet: www.dgm.de



POROUS CHITOSAN-BIOACTIVE PARTICLES COMPOSITE SCAFFOLDS: INFLUENCE OF THE TYPE AND AMOUNT OF MINERAL LOAD



M. ScharDOSim^{1,2}, J. Soulié², G. Soares¹, D. Poquillon², C. Rey², R. Hübler¹, C. Combes²
¹PUCRS, GEPSI-LMN, Porto Alegre, Brasil ²University of Toulouse, CIRIMAT, UMR 5085 UPS-INPT-CNRS, ENSIACET, Toulouse, France

E-mail: gabriela.soares@acad.pucrs.br

Introduction

The use of artificial grafts that reproduce the characteristics of the bone tissue is an expanding area of human health. Minerals such as apatite and bioglass are well known materials for these applications due to good mechanical properties, biocompatibility, and osteoconductivity [1, 2]. Nevertheless, exclusively mineral scaffolds tend to exhibit high fragility due to low elasticity as well as low degradability [1]. To overcome this shortcoming, in some cases a mineral-polymer (such as chitosan, which is a natural polymer with bioactive potential, making it capable to interact with the surrounding tissue and offering low risk of adverse reactions [3]) composite can be used, combining the desirable properties of both materials [4].

Materials and methods

In this work were prepared three-dimensional macroporous composite scaffolds of chitosan–nanocrystalline apatite/bioglass by freeze-drying. SiO₂-CaO bioactive glass and nanoapatite were synthesized and mixed with chitosan in order to form a composite with three different mineral concentrations (33%, 57% and 75%) Several methodologies were applied to freeze the scaffolds immediately before lyophilization like a freezing in liquid nitrogen (-196°C), freezer (-20°C) and salted ice (-10°C).

Results and discussion

The synthesized mineral charges and were characterized by FTIR, XRD, DLS and SEM.

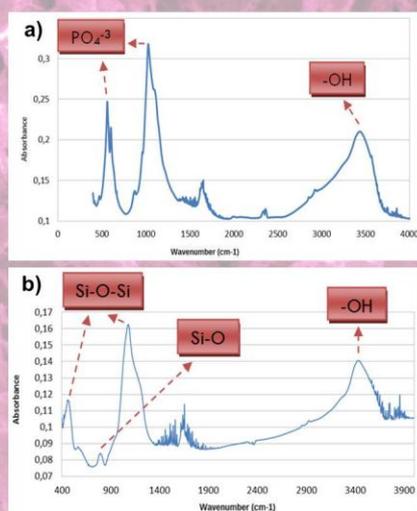


Figure 1. FTIR. a) nanocrystalline apatite; b) Bioglass.

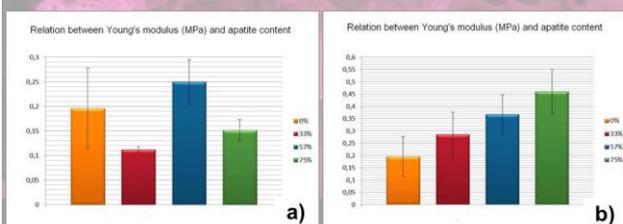


Figure 2. Young's modulus variation. a) nanocrystalline apatite; b) Bioglass.

We can see that the more you increase the mass fraction of bioactive glass, the higher Young's modulus is (Fig.2). Scaffolds fabricated with different bioglass concentration exhibited different sizes of pores, as well as surface roughness (Fig.3).

The obtained composite scaffolds were characterized by compression strength and SEM. Some results are shown in figures 1, 2 and 3.

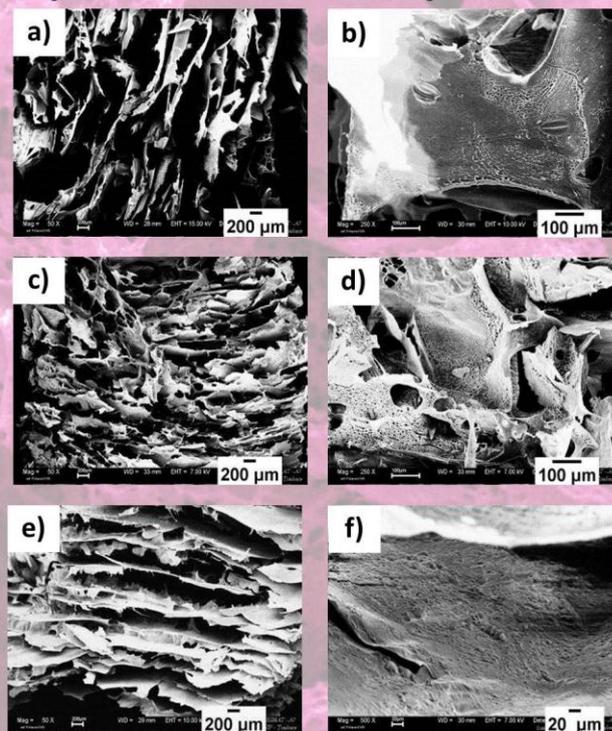


Figure 3. micrographs (SEM) of composites containing (a,b) 33%, (c,d) 57% and (e,f) 75% of bioactive glass. Magnifications of 1000 and 500x.

Conclusion

This study exhibited the possibility of obtaining scaffolds with different compressive strength and young's modulus by altering the type of mineral charge and the ratio mineral-polymer as needed for bone tissue engineering applications.

Results showed that pores size and distribution can be modified by the use of different freezing temperatures. The best results concerning porosity were obtained by freezing the scaffolds at -20°C, which were observed micro and nanotexture.

Acknowledgements

The authors thank CAPES for financial support to this research.

References

- 1 - C. Schiller et al. *Biomaterials* 25, 1239–1247, 2004
- 2 - Boccaccini, A.R. & Maquet, V. - *Composites Science and Technology*, 63, p.2417-2429 (2003)
- 3 - « Chitine et chitosane - Produit du jour - SCF ». In : SCF - Société Chimique de France <http://www.societechimiquedefrance.fr/produit-du-jour/chitine-et-chitosane.html> (accessed February 12, 2014).
- 4 - S. Eftekhari et al. *Materials Science and Engineering C* 39 (2014) 120–125.



DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF MULTILAYER TUBULAR BIORESORBABLE SCAFFOLDS FOR PERIPHERAL NERVE REGENERATION

Schardosim, M.G.¹, Soares, G. B.¹, Zampiva R.Y.S.², Silva, J.B.¹, Hübler R.¹

¹ Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

E-mail: gabriela.soares@acad.pucrs.br



Introduction

Peripheral nerve injury accident is a common type of lesion that can cause loss of mobility and decrease the quality of life [1,2]. Copolymer PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid)) presents all the requirements to be applied in tissue engineering: biodegradability, biocompatibility, mechanical properties, scaffold architecture and manufacturing technology [1,3,4]. Porosity and interconnectivity (generated by salt leaching process) are important to promote cell adhesion as well as the diffusion of nutrients and fluids from the surrounding tissue into the scaffold. [5,6,7,8]. This study has the objective to create multilayer tubular porous hydrophilic scaffolds.

Materials and methods

Membranes were made from the PLGA (7wt%) solution in chloroform, with the addition of Sodium chloride crystals (porogenic agent) in a range of 1:16 (PLGA:NaCl). This membranes were interspersed by smooth membranes in order to obtain different textures and porosity in each layer of the tube. Tubular scaffolds were prepared by rolling the membrane mentioned above on a titanium rod with 2mm diameter. The edge was slightly dissolved with chloroform and pressed against the tube.

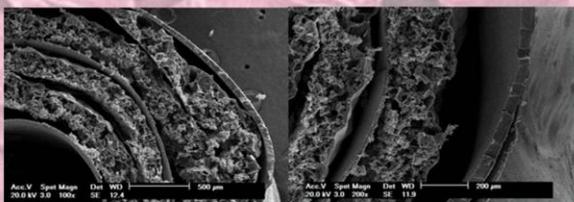


Figure 1. SEM micrographs showing cross-section of the multilayer tubular scaffold showing the smooth and porous layers (a) and in detail the weld point (b).

To enhance the hydrophilicity of the polymer, the scaffolds were treated with sodium hydroxide for five minutes. The samples were divided according to table 1.

Table 1. Samples nomenclature according on NaOH treatment.

Sample	Treatment
A	Non treated
B	NaOH 0,1M
C	NaOH 0,5M

Results and discussion

The micrographs exhibited by figure 2 show that the surface roughness is directly proportional to the NaOH solution concentration used.

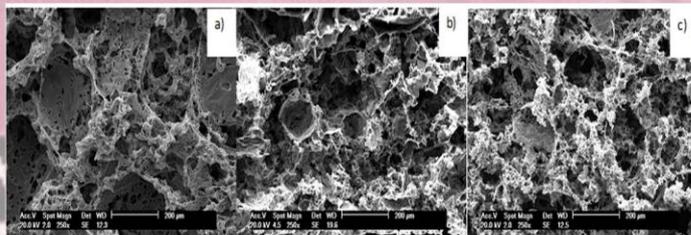


Figure 2. SEM micrographs exhibiting the surface of samples: no treatment (a); NaOH - 0,1M treated (b) and NaOH - 0,5M treated (c) showing the pores distribution and interconnectivity.

FTIR analyses (Fig. 1) showed that the chemical etching did not change the intensity of the characteristics peaks of PLGA, indicating no significant degradation after treatment with NaOH.

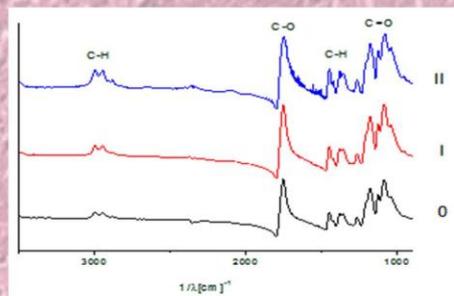


Figure 3. FTIR analyses of samples 0, I and II showing no significant chemical changes on PLGA membranes after physic-chemical process.

Surface hydrophilicity and wettability plays a significant role on cell attachment and tissue-scaffold interactions. The copolymer hydrolysis improved substantially the scaffold wettability as can be seen in table 2.

Table 2. Correlation between NaOH concentration and contact angle. This data shows the effect of each NaOH concentration on sample wettability.

Sample	Contact angle	SD
I	114,53	± 3,89
II	97,97	± 2,84
III	58,44	± 2,98

Conclusion

SEM micrographs showed high porosity on the three samples surface. It was possible to show that the hydrophilicity of the scaffolds is directly proportional to the chemical treatment performed. Furthermore, we were able to create a multilayer tubular highly porous scaffold.

Acknowledgements

The authors thank CEM-PUCRS for scanning electron microscopy analysis; Dr. André Marin Vargas for FTIR analysis; CAPES for financial support.

References

- 1 - ICHIHARA, S.; et al. Injury, Int. J. Care Injured, 39S4, p.29-39, 2008.
- 2 - V. Maquet, D. Martin, B. Malgrange, R. Franzen, J. Schoenen, Moonen et al. J Biomed Mater Res, 52 (2000), pp. 639-651
- 3 - OH, S. H.; et al. Biomaterials, v.29, p.1601-1609, 2008.
- 4 - Albertsson, A.; Guo, B.; Sun, Y.; Finne-Wistrand, A. & Mustafa, K. Acta Biomaterialia, 8, p.144-153 (2012)
- 5 - Plikk, P.; Odellius, K.; Hakkarainen, M. & Albertsson, A.C. Biomaterials, 27, p.5335-5347 (2006).
- 6 - Yang, S.F.; Leong, K.F.; Du, Z.H & Chua, C.K. - Tissue Eng, 5, p.679-681 (2001)
- 7 - Mak, A.F.T.; Shum, A.W.T. & Li, J. - Polymer degradation and Stability v.87, p.487-493 (2004).
- 8 - SCHARDOSIM, Mariane Giacomini. Confeção de estruturas tubulares permeáveis de PLGA para regeneração nervosa. Porto Alegre 2012. Dissertação. PGTEMA - PUCRS, Brasil.