



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPÓSITOS TIPO PLGA-  
APATITA/BIOVIDRO MACROPOROSOS PARA APLICAÇÕES  
BIOMÉDICAS**

**MARIANE GIACOMINI SCHARDOSIM**

QUÍMICA INDUSTRIAL

LICENCIADA EM QUÍMICA

MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**TESE PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ENGENHARIA E  
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

**Porto Alegre**

**Agosto, 2016**



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPÓSITOS TIPO PLGA-  
APATITA/BIOVIDRO MACROPOROSOS PARA APLICAÇÕES  
BIOMÉDICAS**

**MARIANE GIACOMINI SCHARDOSIM**

Química industrial

Licenciada em química

MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

ORIENTADOR: PROF. DR. ROBERTO HUBLER

Tese 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 Doutor em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

**Porto Alegre**

**Agosto, 2016**



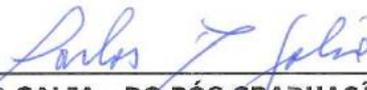
## SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPÓSITOS TIPO PLGA-APATITA/BIOVIDRO MACROPOROSOS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

**CANDIDATA: MARIANE GIACOMINI SCHARDOSIM**

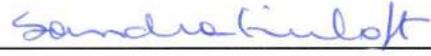
Esta Tese de Doutorado foi julgada para obtenção do título de DOUTOR EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

  
\_\_\_\_\_  
**DR. ROBERTO HUBLER - ORIENTADOR**

### BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
**DR. CARLOS ROBERTO GALIA - DO PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA - UFRGS**

  
\_\_\_\_\_  
**DRA. DENISE CANTARELLI MACHADO - DO INSTITUTO DE PESQUISAS  
BIOMÉDICAS - PUCRS**

  
\_\_\_\_\_  
**DRA. SANDRA MARA OLIVEIRA EINLOFT - DO PGETEMA/FENG - PUCRS**

“Once you can accept the universe as matter expanding into nothing that is something, wearing stripes with plaid comes easy.”

Albert Einstein

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Roberto Hübler, orientador desta tese, a quem devo grande parte dos conhecimentos adquiridos ao longo destes anos. Agradeço principalmente pelo apoio e liberdade que me foi concedida durante toda a minha estadia no GEPSI.

À minha família, pelo apoio sem o qual este trabalho não seria possível. Em especial ao Alexandre por me aturar e me animar sempre, e à pessoa que me fez crer que eu poderia fazer tudo o que minha mente sonhasse: minha mãe!

Gostaria também de agradecer ao meu amigo e colaborador deste trabalho, Dr. André Luís Marin Vargas, por sua revisão e conselhos muito relevantes.

À Gabi Soares pela leitura e auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Denise Cantarelli e à Rafaela do IPB - PUCRS pelos estudos in vitro de biocompatibilidade.

Je tiens à remercier le CIRIMAT- Université Paul Sebatier pour l'accueil et les conditions de travail privilégiées qui m'ont été offertes, et tout particulièrement les trois directeurs avec lesquels j'ai travaillé directement, Christèle Combes, Jeremy Soulie et Christian Rey. Merci aussi à Sophie Cazalbou et Dominique Poquillon pour leur soutien logistique et pour la analyse de porosimetrie et essais mecaniques.

Mes remerciements vont également a “ma famille française”, mes amies Maela, Pierre, Emmanuelle, Hassan, Fatah et Mickael, pour l'ambiance de travail très agréable. Je suis particulièrement reconnaissante a ma presque soeur, Maela Choimet, pour être toujours prête à m'aider. Je suis profondément reconnaissant pour ce que tu as fait pour moi.

A capes pelo apoio financeiro a este projeto.

## SUMÁRIO

Sumário.....	6
Lista de Figuras.....	8
Lista de Símbolos e termos .....	10
Lista de tabelas.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO .....	14
2 OBJETIVOS .....	19
2.1 Objetivos Específicos .....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1 Tecido ósseo .....	20
3.1.1 Perdas ósseas .....	21
3.2 Biomateriais.....	22
3.3 Engenharia de tecidos .....	24
3.3.1 Enxertos autólogos .....	26
3.3.2 Enxertos sintéticos.....	26
3.3.2.1 PLGA.....	28
3.3.2.2 Apatita nanocristalina carbonatada .....	30
3.3.2.3 Biovidro.....	32
3.4 Materiais compósitos.....	33
<i>Liberção de fármacos.....</i>	40
3.5 Técnicas de caracterização .....	41
3.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	41
3.5.2 Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier .....	42
3.5.3 Porosimetria a mercúrio.....	42
3.5.4 Microtomografia de raios X.....	43
3.5.5 Difração de Raios X .....	45
3.5.6 Dispersão dinâmica de luz.....	45
3.5.7 Ensaio de compressão.....	46
3.5.8 Cromatografia de permeação a gel.....	46
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	47

<b>4.1 Síntese de partículas bioativas .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1.1 Biovidro.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1.2 Apatita nanocristalina carbonatada.....</b>	<b>48</b>
<b>4.2 Preparação dos Corpos de Prova (PLGA-apatita; PLGA-biovidro).....</b>	<b>49</b>
<b>4.2.1 Lixiviação de sal.....</b>	<b>49</b>
<b>4.2.2 Liofilização.....</b>	<b>50</b>
<b>4.3 Testes <i>in vitro</i>.....</b>	<b>51</b>
<b>4.3.1 Testes celulares – Biocompatibilidade.....</b>	<b>52</b>
<b>4.4 Preparo das amostras para as caracterizações.....</b>	<b>54</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>57</b>
<b>5.1 Cargas inorgânicas.....</b>	<b>57</b>
<b>5.1.1 FTIR.....</b>	<b>57</b>
<b>5.1.2 DRX.....</b>	<b>59</b>
<b>5.1.3 DLS e MEV (morfologia).....</b>	<b>61</b>
<b>5.2 Arcabouços.....</b>	<b>64</b>
<b>5.2.1 MEV e <math>\mu</math>-CT (morfologia).....</b>	<b>64</b>
<b>5.2.2 Porosimetria.....</b>	<b>77</b>
<b>5.2.3 Propriedades mecânicas.....</b>	<b>79</b>
<b>5.2.4 Biodegradação.....</b>	<b>82</b>
<b>5.2.5 MTT - Biocompatibilidade.....</b>	<b>87</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>90</b>
<b>7 Propostas para trabalhos futuros.....</b>	<b>92</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>93</b>
<b>9 ANEXOS.....</b>	<b>111</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Estrutura óssea interna exibindo osso compacto e trabecular.....	20
Figura 3.2. Fragmento de mandíbula do povo Maia encontrada na Playa de los Muertos em 1931.....	22
Figura 3.3. Hidrólise da ligação éster do PLGA.....	39
Figura 3.4. Esquema de degradação de implantes porosos e não porosos através da hidrólise das ligações éster e autocatálise. Imagem adaptada [90].....	30
Figura 3.5. Esquema de reações no processo sol-gel. Imagem adaptada [104].....	33
Figura 3.6. Micrografias de cimento ósseo com adição de microesferas de PLGA com 20% (a) e 30% (b) de polímero em massa.....	36
Figura 3.7. Secção transversal do equipamento utilizado para realização de análises de porosimetria a mercúrio. Imagem adaptada.....	43
Figura 3.8. Ilustração esquemática do processo de aquisição de imagem através de microtomografia de raios X. Imagem adaptada.....	44
Figura 5.1. Análise de FTIR das cargas sintetizadas: BV2 (a) e ANC2 (b).....	57
Figura 5.2. Difrátograma das apatitas carbonatadas 1 e 2, não foi encontrada diferença significativa na fase cristalina de ambas as apatitas. Os picos foram indexados com base no ICDD PDF 9-432 para a hidróxiapatita.....	59
Figura 5.3. Difrátograma das ANCs 1 e 2, plotado entre 30° e 34° para evidenciar o pico (002). As amostras apresentam picos largos e sobrepostos.....	60
Figura 5.4. Análises de dispersão de luz dinâmica das apatitas 1 e 2 que mostra o efeito do processo de secagem sobre a distribuição do tamanho de partícula.....	61
Figura 5.5. Micrografias das apatitas produzidas em duas magnificações diferentes. ANC1 (a, b) e ANC2 (c, d).....	62
Figura 5.6. Micrografias (a,b) e análise de dispersão de luz dinâmica (c) da amostra BV2.....	63

Figura 5.7. Micrografias dos cristais de sal utilizados na para produção de arcabouços porosos (a,b) e micrografias dos arcabouços de PLGA confeccionados (c,d).....	65
Figura 5.8. Micro CT analise de um arcabouço de PLGA preparado através de lixiviação de sal.....	66
Figura 5.9. Micrografias dos arcabouços preparados por lixiviação de sal. A imagem a mostra um arcabouço com proporções PLGA:ANC2 60:40 (a) e a imagem b 40:60 (b).....	66
Figura 5.10. Micrografias dos arcabouços liofilizados de PLGA. Arcabouço congelado a $-20^{\circ}\text{C}$ (a) e arcabouço congelado a $-196^{\circ}\text{C}$ (b).....	68
Figura 5.11. Micrografias de arcabouços P6 (a,b), P7 (c,d) e P8 (e,f).....	69
Figura 5.12. Micrografias de arcabouços liofilizados de PLGA:biovidro P10 (a,b), P11 (c,d) e P12 (e,f).....	71
Figura 5.13. Micrografias de arcabouços liofilizados. P6 (a), P10 (b), P7 (c), P11 (d), P8 (e) e P12 (f).....	72
Figura 5.14. Microtomografias reconstruída em 3D (a) e corte (b) do arcabouço P1.....	74
Figura 5.15. Microtomografia de um arcabouço P7 preparado pelo processo de liofilização.....	75
Figura 5.16. Microtomografias de arcabouço P11 (a, b) e P12 (c, d).....	76
Figura 5.17. Relação entre a porosidade dos arcabouços e a carga adicionada.....	77
Figura 5.18. Comportamento de compressão dos arcabouços de P1, P7 e P8 (a) e P1, P11 e P12 (B) preparados pela metodologia de liofilização.....	80
Figura 5.19. Módulo de Young em função do tipo e concentração de carga adicionada.....	81
Figura 5.20. Massa percentual de solução TRIS absorvida após cada período de degradação.....	83
Figura 5.21. Massa retida pelos arcabouços de PLGA após cada período de degradação.....	84

Figura 5.22. GPC dos arcabouços de PLGA, PLGA-BV2 e PLGA-ANC2 após cada período de degradação.....	86
Figura 5.23. Viabilidade celular encontrada para o BV2 e dos arcabouços P11 e P12 em relação ao controle positivo, em três períodos (24h, 48h e 72h).....	89

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Temperaturas de congelamento e liofilização utilizadas para geração de partículas de tamanhos diferentes.....	49
Tabela 4.2. Classificação dos grupos de arcabouços, de acordo com o tipo de carga inorgânica e a razão entre polímero:carga utilizados.....	51
Tabela 5.1. Porosidade dos arcabouços preparados em relação à amostra P1.....	78

## LISTA DE SÍMBOLOS E TERMOS

Pa	Pascal
kV	Quilovolt
At%	Porcentagem atômica
$\theta$	Theta
$\lambda$	Lambda
$K\alpha_{Cu}$	Energia de irradiação do cobre
PLGA	Ácido poli ( <i>glicólico-co-lático</i> )
PLLA	Ácido poli (L-lático)
PLA	Ácido poli (lático)
PGA	Ácido poli (glicólico)
TRIS	Meio de degradação tamponado - N-tris[hidroximetil]aminoetano
Aloenxertos	Enxerto transplantado entre 2 indivíduos geneticamente diferentes da mesma espécie
Xenoenxertos	Enxerto transplantado entre indivíduos de espécies diferentes
Enxerto autólogo	Enxerto transplantado de um indivíduo para si mesmo

## RESUMO

SCHARDOSIM, Mariane Giacomini. **Síntese e caracterização de compósitos tipo PLGA-apatita/biovidro macroporosos para aplicações biomédicas.** Porto Alegre. 2015. Tese. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

Danos ao tecido ósseo são formas comuns de lesões, sendo reportadas cerca de 15 milhões de fraturas a cada ano, em escala mundial. Parte destas lesões exige a utilização de enxertos para regeneração óssea. Atualmente, a principal metodologia utilizada para tratamento destas lesões é a utilização de enxertos autólogos. Esta técnica é considerada o padrão ouro da regeneração óssea, porém, existem algumas desvantagens como a necessidade de uma cirurgia para coleta de material. A aplicação de compósitos de polímeros biodegradáveis, como o ácido poli (lático-co-glicólico), fosfatos de cálcio e cerâmicas bioativas, como as apatitas e os biovidros, representa uma alternativa no tratamento de deficiências ósseas. O objetivo desta pesquisa é produzir matrizes porosas de PLGA: apatita/biovidro através de duas metodologias: lixiviação de sal e liofilização. As cargas utilizadas neste trabalho foram sintetizadas através de coprecipitação e metodologia sol-gel e então avaliadas por DRX, FTIR, MEV e DLS. As estruturas porosas obtidas foram caracterizadas por MEV, porosimetria a mercúrio, compressão, microtomografia, degradação *in vitro* e biocompatibilidade *in vitro*. Foram obtidos arcabouços compósitos altamente porosos através das duas metodologias estudadas. A concentração de carga e o tipo de carga adicionada a matriz polimérica alteram as propriedades mecânicas e diferentes características de superfície. Além disso, a velocidade de degradação dos arcabouços é altamente influenciada pela carga inorgânica adicionada.

Palavras-Chave: Engenharia de tecidos, PLGA, apatita, macroestrutura, reparo ósseo.

## ABSTRACT

SCHARDOSIM, Mariane Giacomini. **Synthesis and characterization of macroporous composite type PLGA-apatite / bioglass for biomedical applications.** Porto Alegre. 2015. PhD Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

Bone injuries are a common form of trauma, being reported about 15 million fractures each year worldwide. Some of these lesions require the use of grafts to achieve bone regeneration. Currently, the main method used for treatment of these lesions is the use of autologous grafts. Although this technique is considered the gold standard of bone regeneration, there are some disadvantages such as the need for surgery to collect material and the lack of it. The application of composite biodegradable polymers such as poly (lactic-co-glycolic acid), calcium phosphates and bioactive ceramics such as apatite and bioglasses, represent an alternative in treatment of bone lesions. This is due to the possibility of combining characteristics of both materials. The objective of this research is to produce porous matrices PLGA:apatite/bioglass via two methodologies: salt leaching and lyophilization. The loads used in this study were synthesized by coprecipitation and evaluated by XRD, FTIR, SEM and DLS. The obtained porous structures are characterized by SEM, mercury porosimetry, compression, microtomography, *in vitro* degradation and *in vitro* biocompatibility. Highly porous composite scaffolds were obtained by the two methods studied. The load concentration and the type of load added to the polymeric matrix altered the mechanical properties and generated different surface features. Furthermore, the degradation rate of the supports is highly influenced by the added inorganic filler.

**Keywords:** Tissue engineering, PLGA, apatite, macrostructure, bone repair.

## 2. INTRODUÇÃO

Ossos são tecidos vivos que apresentam capacidade de regeneração contínua. Devido a esta habilidade, é possível que haja a recuperação de diversas lesões ósseas com terapias convencionais sem necessidade de utilização de substitutos ósseos [1,2]. Estatísticas globais indicam a ocorrência de 15 milhões de fraturas ósseas a cada ano, dentre as quais, 10% tem elevada gravidade ou perda óssea e podem requerer a utilização de substitutos ósseos [3]. Atualmente, transplante autólogo colhido principalmente a partir da crista ilíaca, do fêmur, da tíbia ou das costelas do paciente constitui o padrão ouro para a regeneração óssea [4,5]. Apesar de suas propriedades excelentes com relação à osteogênese e imunocompatibilidade, a utilização de enxertos autólogos apresenta desvantagens como a oferta limitada de material e morbidade associada ao local doador [6-8]. Aloenxertos e xenoenxertos ósseos são alternativas viáveis de tratamento, porém, apresentam capacidade de osteogênese reduzida quando comparados à enxertos autólogos [9, 10].

A engenharia de tecidos emprega as ciências biológicas e a engenharia de materiais para desenvolver arcabouços artificiais para regeneração de tecidos [11]. Uma abordagem possível consiste em isolar células específicas do paciente e cultivá-las sobre um arcabouço tridimensional preferencialmente biodegradável. Posteriormente, este material é implantado no local desejado com o objetivo de formar um novo tecido ao longo da degradação do arcabouço [10, 12,13]. Uma alternativa é implantar arcabouços biodegradáveis para crescimento interno do tecido diretamente *in vivo* com o objetivo de estimular, suportar e orientar a adesão celular e, portanto, a regeneração tecidual [14-16].

Estes substitutos ósseos devem apresentar algumas características como: biocompatibilidade e biodegradabilidade permitindo desta forma a remodelação óssea [17, 18]; osteocondutividade e osteoindutividade para guiar o crescimento ósseo em torno e no interior do implante; além de apresentar estrutura similar ao osso [19,20]. Outro requisito importante para a aplicação de um arcabouço na engenharia de tecidos ósseos é a porosidade com elevada interconectividade entre os poros para favorecer e guiar a adesão celular, além de suportar a vascularização do tecido formado [16,21-23].

Os materiais mais amplamente estudados e utilizados em substitutos ósseos são as biocerâmicas, dentre as quais os fosfatos de cálcio são os materiais mais extensivamente examinados. Este fato se deve a sua biocompatibilidade, composição e estrutura semelhante à fase mineral do osso [19, 24], por serem osteocondutivos [25-28] e, em alguns casos, osteoindutivos e bioativos [29-31]. Como exemplos destas cerâmicas disponíveis hoje no mercado destacam-se: hidroxiapatita; fosfato beta-tricálcico; fosfato de cálcio bifásico; fosfato de cálcio amorfo; entre outros. Arcabouços unicamente cerâmicos podem ser implantes adequados para aplicação como substituto ósseo, podendo apresentar macro e microporosidades. Estas características favorecem a formação óssea no interior do implante e favorecem a capacidade para liberação de fármacos. Contudo, estes implantes apresentam degradabilidade insuficiente e resistência mecânica inadequada, ou seja, baixa resistência à compressão e elevada fragilidade [10, 17, 32].

A adição de polímeros biodegradáveis pode favorecer a biodegradabilidade dos arcabouços cerâmicos, alterar as propriedades físicas e mecânicas dos implantes, além de, potencialmente, alterar a velocidade de liberação de fármacos devido a diferentes mecanismos e períodos de degradação [17]. Atualmente, compósitos de polímeros e cerâmicas tem sido desenvolvidos com o objetivo de obter materiais com elevada estabilidade mecânica [33-37].

Diversos autores dividem os polímeros biodegradáveis em dois grandes grupos: polímeros naturais, como o amido, a quitosana, polímeros derivados de

ácido hialurônico e colágeno [38-41] e polímeros sintéticos que podem ser produzidos em condições controladas, apresentando propriedades mecânicas, físicas e químicas estáveis e reprodutíveis, permitindo, assim, um controle das impurezas destes materiais [16].

Os polímeros sintéticos biodegradáveis mais utilizados pela engenharia de tecidos para construção de arcabouços tridimensionais são poliésteres como: ácido poli glicólico (PGA), ácido poli lático (PLA) e ácido poli (lático-co-glicólico) (PLGA) [41]. O PLGA é um copolímero sintético de PLLA ácido poli L-lático e PGA [41] que tem sido aplicado na engenharia de tecidos [42,43] durante as duas últimas décadas, devido à sua excelente biocompatibilidade, propriedades mecânicas e degradação controlada através da utilização de diferentes proporções de PLLA/PGA [42, 44]. Por ser um poliéster, a degradação deste polímero ocorre por hidrólise, gerando como produtos o ácido lático e o ácido glicólico, ambos metabólitos naturais [17,45]. Contudo, estes poliésteres são excessivamente flexíveis e apresentam resistência mecânica à compressão insuficiente para utilização como substitutos ósseos. Além disso, estes polímeros isolados não apresentam a superfície favorável para adesão e proliferação celular.

Com a adição de fosfatos de cálcio a estas matrizes poliméricas, a resistência mecânica e a interação com células são favorecidas, assim como, durante o período de degradação a adição destas cerâmicas pode ajudar a manter o pH mais estável na região próxima ao implante. Isso se deve ao tamponamento gerado pela adição de fosfato de cálcio aos produtos da degradação do PLGA [46]. Metodologias para confecção de compósitos porosos entre polímeros sintéticos biodegradáveis e fosfatos de cálcio têm sido pesquisadas, como: liofilização, técnica que obtém estruturas poliméricas porosas com eficiência, porém, a porosidade dos arcabouços é de difícil controle quando é realizada a adição de carga cerâmica [47]; adição de microesferas poliméricas à matriz cerâmica, metodologia que gera estruturas cerâmicas porosas após a degradação da fase polimérica, o que reduz bruscamente a resistência mecânica do arcabouço [48]; *eletrospinning*, utilizado para produção de fibras poliméricas com adição de carga cerâmica, com a desvantagem de gerar poros com tamanhos e formatos de difícil controle [49]; adição de agentes porogênicos. Comparada a outras técnicas, a lixiviação de agentes porogênicos

oferece algumas vantagens como facilidade no controle da estrutura e tamanho dos poros através do controle das propriedades do agente [46].

Liberação de fármacos, fatores de crescimento ou adesão de células diretamente no local da lesão têm apresentado grande potencial em estudos clínicos. A liberação controlada destes fatores durante a regeneração do tecido ósseo pode ser realizada utilizando sistemas carreadores que apresentem as seguintes características: capacidade de retenção de fármacos e fatores de crescimento, estrutura tridimensional (facilitando assim a infiltração e proliferação de fármacos no arcabouço) e período de degradação compatível com a velocidade de regeneração do tecido [15].

Embora diversos estudos tenham sido realizados nesta área, um dos inúmeros desafios ainda existentes localiza-se na composição e estrutura do arcabouço utilizado, e sua capacidade de manter suas principais funções durante a degradação e liberação de fármacos [9]. Além disso, o comportamento de degradação dos poliésteres como o PLA e PLGA, quando utilizados como matriz para compósitos, é influenciado pelas propriedades das cargas de fosfato de cálcio [50]. Portanto, pretende-se desenvolver e avaliar as propriedades de compósitos de PLGA com diferentes apatitas para aplicação como arcabouços na regeneração óssea e administração de medicamentos que apresentem as características citadas anteriormente.

O objetivo deste estudo é produzir arcabouços compósitos porosos tridimensionais de PLGA - apatita carbonatada nanocristalina e PLGA - biovidro por dois métodos: 1- Técnica de lixiviação de sal utilizando um agente porogênico e 2- liofilização. Para ambas as técnicas diferentes proporções de polímero/carga foram utilizadas a fim de avaliar a influência de cada carga na porosidade, resistência à compressão e tempo de degradação dos arcabouços. As cargas e os arcabouços preparados foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho, microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios x (DRX), granulometria, propriedades elásticas, porosimetria de mercúrio, degradação *in vitro* e biocompatibilidade.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é desenvolver e avaliar as propriedades morfológicas, mecânicas e biológicas de compósitos de PLGA:apatita e PLGA:biovidro para aplicação como arcabouço na regeneração óssea

### 2.1 Objetivos Específicos

Como objetivos específicos deste trabalho destacam-se:

Desenvolver e otimizar metodologia para produção de cargas inorgânicas (apatita nanocristalina carbonatada e biovidro) para adição aos arcabouços poliméricos. Analisar suas composições químicas, cristalinidade (somente apatita nanocristalina carbonatada), tamanho e morfologia de partícula.

Avaliar a influência de diferentes cargas para o PLGA bem como suas concentrações nas propriedades morfológicas dos arcabouços desenvolvidos;

Analisar a morfologia, a porosidade e o módulo de elasticidade das estruturas formadas com diferentes metodologias de preparação dos arcabouços (agente porogênico e liofilização);

Avaliar as modificações sofridas pelos arcabouços ao longo de sua degradação *in vitro* e a influência das diferentes cargas no processo de degradação hidrolítica.

Avaliar a biocompatibilidade das cargas e arcabouços selecionados através de ensaios de MTT.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo apresenta propriedades resultantes da necessidade de rigidez e ductilidade para reduzir o risco de fraturas. Como resultado, o tecido ósseo é multifásico e heterogêneo, como pode ser observado na Figura 3.1, e pode sofrer alterações na sua estrutura, forma e composição de acordo com as necessidades mecânicas e fisiológicas. Este processo de adaptação é conhecido como remodelação óssea (lei de Wolff).

A composição básica dos ossos é hidroxiapatita, proteínas (principalmente colágeno) e água [51,52]. Esta composição pode variar de acordo com idade, gênero e propriedades requeridas (localização do osso) [1, 53, 54].

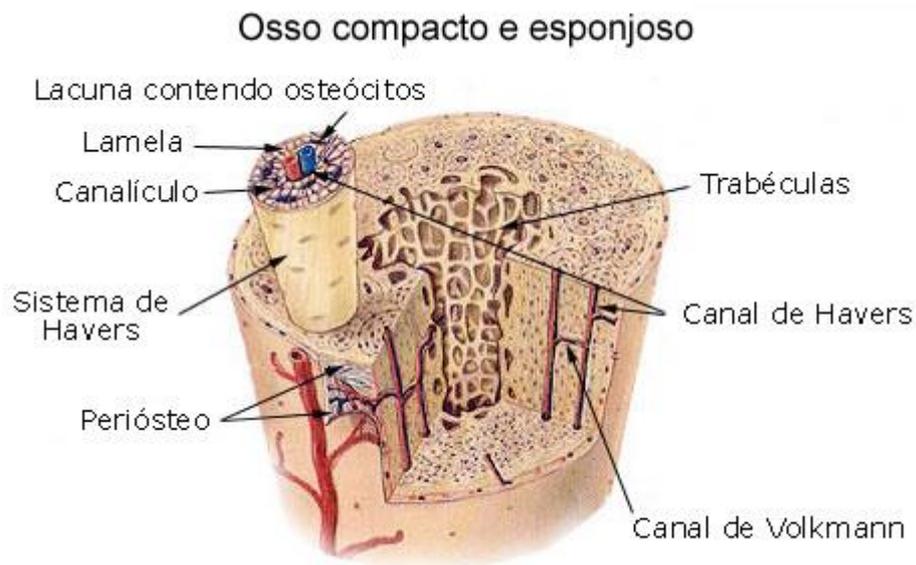


Figura 3.1. Estrutura óssea interna exibindo osso compacto e trabecular [55].

O tecido ósseo é dividido em dois tipos, diferenciados pela porosidade. A porção óssea conhecida como trabecular apresenta entre 50 e 95% de porosidade,

encontrada normalmente em ossos cuboídes e nas extremidades de ossos longos [56, 57].

O tecido ósseo trabecular ainda apresenta elevada interconectividade entre os poros, que são preenchidos com vasos sanguíneos, nervos e diversos tipos de células [56]. O segundo tipo é conhecido como tecido ósseo cortical, extremamente compacto, com porosidade entre 5 e 10% [57]. Este tecido é normalmente encontrado no eixo de ossos longos e em torno do osso trabecular [1, 54].

O esqueleto do embrião consiste em um tecido ósseo conhecido como osso novo, formado rapidamente de forma desorganizada com um arranjo mais ou menos aleatório das fibras de colágeno, o que, após um período é substituído por osso lamelar, formado lentamente com elevada organização e camadas paralelas, que tornam este osso mais resistente do que o osso novo. Geralmente, o osso novo não é encontrado no esqueleto humano a partir dos cinco anos, porém, ele reaparece durante o processo de regeneração óssea (após uma fratura) [1, 54].

Existem quatro tipos de células ósseas classificadas de acordo com as suas funções. Osteoblastos são células mesenquimais, criadas na camada do perióstio que formam o tecido ósseo; Osteoclastos são células criadas pela medula óssea, que desmineralizam o osso com ácido e dissolvem o colágeno com enzimas; Células de revestimento ósseo são osteoblastos inativos localizados na superfície do osso [1, 54]; Osteócitos são osteoblastos antigos enterrados na matriz óssea [57].

### **3.1.1 Perdas ósseas**

Quando uma carga excede o limite tolerado pelo tecido ósseo de uma determinada região, é observado o primeiro tipo de fratura óssea (gerada por trauma produzido por impacto externo ou por contrações musculares) [58]. Outro fator causador de fraturas e lesões ósseas são os tumores ósseos por modificarem as propriedades mecânicas do osso. Além desses, ainda são reportadas fraturas por repetições de cargas abaixo do tolerado pelo osso, conhecidas como fraturas por

stress. Após uma lesão óssea, o processo de regeneração é ativado naturalmente e realizado por grupos de células que substituem o osso antigo por osso novo. Entretanto, nem todas as fraturas são completamente reparadas [1, 54].

### 3.2 Biomateriais

A utilização de biomateriais como se conhece hoje teve início na década de 1960 e, desde então, tem-se observado grandes evoluções nas áreas médica, odontológica e biomédica [59]. Existem exemplos da tolerância do corpo humano a implantes desde a pré-história, ainda de forma não intencional. Restos mortais datados de 9000 anos continham a ponta de uma lança incorporada no quadril [60], aparentemente curado e não impedindo a sua locomoção.

Os etruscos, povo que habitou a península itálica entre 1200 e 700 D.C. desenvolveram um método para substituição de dentes perdidos por pontes feitas com ossos de boi esculpido [60]. Em 600 D.C. a integração óssea foi alcançada a partir de conchas do mar, pelo povo maia, Figura 3.2, e em 200 D.C. utilizando ferro, ambos como implantes odontológicos. Amálgamas dentárias foram utilizadas pela primeira vez em 659 D.C. pelos chineses com o objetivo de reparar dentes deteriorados. Contudo, grande parte dos implantes produzidos falhava devido à falta de conhecimento a respeito da toxicidade dos materiais utilizados [60].



Figura 3.2. Fragmento de mandíbula do povo Maia encontrada na *Playa de los Muertos* em 1931. Fonte: [61]

Evidências históricas indicam a utilização de métodos cirúrgicos há 32000 anos, quando feridas já eram fechadas por meio de sutura ou cauterização. No Egito antigo a realização de suturas era feita utilizando linho, e na Europa, durante a idade média se utilizava catagute (fio animal, geralmente de intestino de carneiro ou gato, usado em cirurgias como suturas). Relatos descrevem a utilização de fios de ouro para suturas entre 130-200 D.C. e em 1816 Philip Physick sugeriu a utilização de fios de chumbo, notando porém, reações adversas [60].

Estudos a respeito da bioreatividade de ouro, prata, chumbo e platina começaram a ser realizados em 1829 em cachorros, por H. S. Levert, obtendo resultados favoráveis na utilização de platina [60]. Zierold publicou em 1924 um estudo referente a testes de diversos materiais, também em cachorros, concluindo que, entre todos os materiais testados, o ouro, a prata, o chumbo e o alumínio são os únicos tolerados pelo organismo, porém não apresentam as propriedades mecânicas necessárias para aplicação.

A ineficiência dos biomateriais puros se deve principalmente a sua capacidade de resposta, comparando a tecidos naturais e órgãos, em relação à flexibilidade e a reatividade [60]. Com base neste argumento, Larry Hench desenvolveu no início de 1960 implantes compósitos metálicos contendo fosfato de cálcio e obteve bons resultados com relação à integração óssea. Estes materiais não cumprem perfeitamente as funções mecânicas de ossos, mas, são estudados até os dias de hoje devido a sua habilidade de desencadear a formação óssea [60].

Cerâmicas de fosfato de cálcio e biovidro tornaram-se populares ao longo dos últimos 30 anos em diversas aplicações clínicas devido a influência positiva destes materiais na proliferação e diferenciação celular [17]. As primeiras pesquisas envolvendo a aplicação de cerâmicos na regeneração óssea foram realizadas há muitas décadas, porém, somente a partir da década de 70 estes materiais ganharam foco. Entre 1982 e 1983 o fosfato de cálcio foi descoberto e reportado por Brown e Chow, o que iniciou uma nova era na qual um dos principais objetivos consistia em manipular as propriedades dos implantes para substituição óssea. Hanker *et al* reportaram em 1986 a combinação de fosfato de cálcio com outros materiais para obtenção de pastas bifásicas injetáveis. Em 1988 Gerhart *et al* desenvolveram

compostos gelatinosos contendo  $\beta$ -TCP. Na década de 90 diversos cimentos de fosfato de cálcio e substitutos ósseos foram desenvolvidos partindo do trabalho publicado por Constantz *et al* [62].

Os primeiros relatos da utilização de polímeros na área biomédica surgiram em 1939 com celofane sendo aplicado como invólucro para vasos sanguíneos, provocando reações fibróticas e, nos anos subsequentes, fios de nylon e poli(metil metacrilato) foram utilizados como suturas. Ingrahan *et al* descreveram em 1947 a utilização de polietileno como implante de material sintético, obtendo bons resultados quanto às reações imunológicas a corpo estranho, que foram caracterizadas como leves. Em 1954 foram publicados estudos toxicológicos realizados em silicone, sendo reconhecido como inofensivo por não apresentar toxicidade. Akutsu *et al* exploraram as possíveis utilizações de poliuretano, principalmente como válvulas cardíacas, em 1959 [60].

A descoberta de polímeros obtidos através da associação dos ácidos láctico e glicólico ocorreu há algumas décadas, sendo utilizados principalmente como suturas [63]. A grande aceitação deste material devido a sua excelente biocompatibilidade, propriedades mecânicas adequadas e biodegradabilidade acabou por torná-lo atraente para outras aplicações [64,65]

### **3.3 Engenharia de tecidos**

Nas últimas décadas pesquisadores na área de biomateriais tem voltado a sua atenção a uma nova técnica para desenvolvimento e substituição de tecidos danificados. O desenvolvimento de tecidos pertencentes ao próprio paciente, porém produzido fora do organismo através da coleta de células sadias que são cultivadas sobre estruturas poliméricas bioreabsorvíveis, é chamado de engenharia de tecidos [66,67]. É válido lembrar que células isoladas não formam tecidos ou órgãos, por isso é necessária a utilização de uma matriz como arcabouço para o crescimento celular [68].

É estudada ainda a utilização de células-tronco e fatores de crescimento nesta técnica. A engenharia de tecidos apresentará vantagens também na área de transplantes de órgãos devido a possibilidade de expansão celular *in vitro*. Desta forma, somente algumas células precisariam ser retiradas do doador para diferenciação e formação de um novo órgão sobre um material polimérico, sendo evitada a necessidade de doação de um órgão [45].

Ensaio relacionados à engenharia de tecidos foram realizados no início de 1970 pelo médico e pesquisador W. T. Green que tinha como objetivo criar uma nova cartilagem a partir da inserção de condrócitos em espículas de ossos e na sequência implantá-la em ratos [68]. Apesar de seu fracasso neste experimento, o autor concluiu que, com o desenvolvimento de novos biomateriais e avanço da ciência, novos tecidos e órgãos poderiam ser criados utilizando esta técnica [68].

Polímeros naturais biodegradáveis como *serum* albumina bovino (BSA), gelatina, colágeno, *serum* albumina humano (HSA) foram estudados para aplicações na engenharia de tecidos. Entretanto, estes materiais apresentam pureza questionável, o que limita o seu uso, assim como os altos preços [64]. Na década de 1990, células-tronco começaram a ser pesquisadas pelo doutor Una Chen na Alemanha, porém existem questões éticas que devem ser levadas em consideração na utilização destas.

Vacanti e Langer, em 1999, procuraram desenvolver matrizes equivalentes a tecidos naturais específicas para inserção de moléculas bioativas e adesão celular, a partir de uma gama de polímeros sintéticos biocompatíveis e biodegradáveis [65].

Um polímero sintético foi implantado pela primeira vez em 1991 em um paciente com malformação congênita do tórax e ausência do esterno. A matriz confeccionada a partir deste polímero sintético passou pelo processo de inserção de células condrócitas autólogas (do próprio paciente) sendo implantada para formar o esterno [68].

### **3.3.1 Enxertos autólogos**

A utilização de enxertos autólogos compreende a coleta de tecido ósseo de uma área para implantação no local desejado [2]. Uma das vantagens associadas à esta técnica, é que enxertos ósseos autólogos possuem células osteogênicas, fator que pode contribuir para a regeneração óssea [69]. Outras opções de enxertos, como alógenos ou xenógenos, são utilizados por serem osteocondutores, porém, apresentam riscos com relação à transmissão de doenças e reação imunológica [27, 70]. Devido a estes fatores, transplantes autólogos são considerados ainda, como o padrão ouro para regeneração óssea [71].

Apesar da excelência dos transplantes autólogos, esta técnica apresenta diversos obstáculos como: limite de tecido coletado, desconforto no local doador, dificuldade na obtenção da forma desejada, entre outros [10, 20, 32, 72]. Para superar estas limitações, substitutos ósseos sintéticos têm sido utilizados para reconstrução e regeneração óssea. Materiais cerâmicos sintéticos, compostos principalmente de fosfato de cálcio, têm sido utilizados nas áreas odontológica e ortopédica nas últimas décadas, com algumas restrições [20, 73].

### **3.3.2 Enxertos sintéticos**

Substitutos ósseos sintéticos para substituição e arcabouço ósseo devem ser biocompatíveis, para que não ocorram reações adversas. Idealmente, este material deve fornecer arcabouço temporariamente, sofrendo degradação na mesma velocidade em que ocorre a regeneração do tecido [74], para que ocorra concomitantemente a transferência da carga do enxerto para o tecido regenerado. Entretanto, no caso de utilização de materiais que apresentam degradação rápida, a pressão fisiológica no tecido não suficientemente desenvolvido pode ocasionar falhas na reparação óssea. Por outro lado, materiais que sofrem degradação extremamente lenta podem obstruir a estimulação celular no tecido regenerado e expor o local do enxerto a inflamações crônicas devido à permanência do implante por um longo período [74].

Além destes fatores, é de extrema relevância que os enxertos apresentem uma elevada porosidade com considerável interconectividade entre os poros. Este fator permite adesão celular, crescimento e reorganização óssea [75], difusão de nutrientes para as células, além de permitir vascularização do enxerto [2]. O tamanho dos poros está diretamente relacionado com a área superficial interna do implante. Diversos estudos revelam que o tamanho ideal de poros para adesão celular e regeneração de tecido ósseo *in vitro* é entre 200 e 400  $\mu\text{m}$  [76,77]. Outra pesquisa demonstrou que implantes com poros inferiores a 200  $\mu\text{m}$  podem sofrer com a oclusão de poros por células, além de evitar em alguns casos, a permeação de células e formação de tecido diferente do tecido fibroso [2, 78].

Materiais poliméricos biodegradáveis têm sido utilizados com frequência pela engenharia de tecidos ósseos devido à habilidade de suportar a regeneração do tecido durante sua vida útil, sendo subsequentemente reabsorvidos pelo organismo [74]. Polímeros naturais como o colágeno e a quitosana apresentam potencial bioativo, o que os torna capaz de interagir com o tecido circundante, oferecendo baixo risco de reações adversas.

Contudo, polímeros sintéticos oferecem vantagens adicionais como a possibilidade de controlar a taxa de degradação do material com base na necessidade específica de cada tecido [74,79]. Alguns dos polímeros sintéticos aprovados para utilização na regeneração óssea são: PGA, PLLA, PLGA e PCL. Entretanto, a baixa resistência mecânica destes materiais para aplicações em tecidos ósseos torna a utilização de substitutos ósseos unicamente poliméricos de difícil aplicação.

Materiais inorgânicos, mais habitualmente fosfatos de cálcio ou biovidro, como as apatitas, são investigados para utilização na regeneração de tecidos ósseos devido a sua biocompatibilidade [80]. Entretanto, materiais exclusivamente cerâmicos apresentam fragilidade elevada devido à baixa elasticidade (elevado módulo de elasticidade) [81].

Para suprir as falhas dos dois tipos de materiais isolados, em alguns casos, se utilizam compósitos adicionando reforços cerâmicos à matriz polimérica [82]. Estes compósitos combinam as propriedades desejáveis dos dois materiais, obtendo arcabouços com características convenientes para diferentes aplicações [83]. Entre os objetivos alcançados com a adição de partículas cerâmicas à matriz polimérica estão o aumento da osteocondutividade e das propriedades mecânicas [17].

A porção inorgânica do compósito seria também responsável pelo aumento da biocompatibilidade do material e melhora na integração do arcabouço com o tecido ósseo [83]. Além disso, alguns autores afirmam que quando materiais cerâmicos são adicionados a poliésteres alifáticos a liberação e reabsorção destes durante a degradação polimérica, que muitas vezes gera produtos ácidos, poderia evitar a geração de um ambiente desfavorável para adesão celular, devido ao tamponamento do pH da região próxima ao implante [83, 84].

### 3.3.2.1 PLGA

Kulkarni *et al* publicaram o primeiro estudo referente à utilização de ácido polilático (PLA) pela medicina em 1966. Os autores demonstraram em animais de pequeno porte (ratos e porquinhos da Índia) que a degradação do polímero ocorre lentamente após ser implantado e ainda é tolerado pelo organismo. Gester *et al* foram os primeiros pesquisadores a utilizarem PLA em cirurgia e traumatologia buco-maxilo-facial, em 1972. Os autores utilizaram placas de PLA para fixação interna de fragmentos ósseos, concluindo que este polímero produz reações inflamatórias tardias, bem como formação de cápsula fibrosa [85].

Placas de PLLA de alto peso molecular foram colocadas em dez pacientes para redução de fraturas isoladas do osso zigomático em 1993, por Bergsma *et al*. Em um período de acompanhamento de três anos, dois destes pacientes submeteram-se a uma nova cirurgia para remoção das placas, sendo constatada presença de material fibroso, facilmente separado do tecido adjacente e de consistência firme. Foram encontradas partículas de PLLA neste material demonstrando que a aplicação de PLLA como implante pode gerar inflamações em decorrência provavelmente de sua cristalização, se mantendo no corpo mais tempo

do que o necessário. Este efeito é descrito na literatura e se deve a semicristalinidade do polímero. Em princípio, a água em contato com o polímero degrada a região amorfa, gerando um aumento percentual na porção cristalina devido ao rearranjo das cadeias originadas neste processo [86].

Algumas décadas atrás o ácido poliglicólico (PGA) foi desenvolvido. A primeira aplicação deste polímero foi em suturas por apresentar baixa resistência mecânica quando comparado a outros polímeros e alta taxa de degradação.

O PLGA é um copolímero criado para unir as características dos polímeros PLA e PGA. A reação de degradação hidrolítica deste polímero pode ser observada na Figura 3.3. Este é bioabsorvível devido a degradação que ocorre após a implantação do mesmo, gerando produtos simples removidos por vias metabólicas. A sua degradabilidade se deve à degradação hidrolítica das ligações éster presente, resultando na liberação gradual de ácido láctico e ácido glicólico. A grande aceitação deste copolímero pela engenharia de tecidos se deve as suas excelentes propriedades de biocompatibilidade e propriedades mecânicas adequadas, o que o torna atraente para diversas aplicações [58,59,87-88].

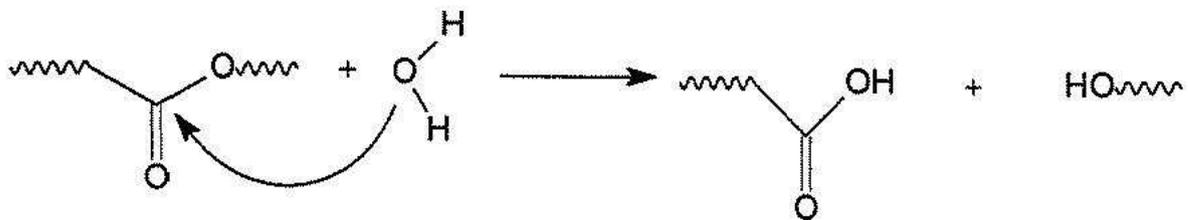


Figura 3.3. Hidrólise da ligação éster do PLGA [79].

A velocidade de degradação deste copolímero depende de diversos fatores como a velocidade de hidrólise das ligações éster, do coeficiente de difusão da água/solução tampão/meio biológico na matriz, difusão e neutralização dos produtos de degradação, localização do implante (irrigação da área) e porosidade/química de superfície (hidrofilicidade do implante) [89]. Wu et al sugerem que a degradação de implantes porosos de PLGA não ocorre de forma consistente, devido a grande superfície em contato com a água no exterior do implante e escassez da mesma no interior dos poros, devido em parte à hidrofobicidade dos poliésteres. Tendo pouca água disponível no interior do implante, os produtos ácidos de degradação não são

eficientemente difundidos para o exterior do implante, gerando uma degradação autocatalítica acentuada. Esta teoria ainda está sendo avaliada devido a exemplos na literatura que mostram efeitos contrários da porosidade sobre a velocidade de degradação de implantes poliméricos.

Athanasίου et al mostraram a degradação de um poliéster com vários níveis de porosidade, concluindo que as amostras menos porosas são degradadas mais rapidamente, devido a redução do pH no interior da amostra. Já Zhang et al estudaram implantes de policaprolactona com vários graus de porosidade. Os resultados obtidos por estes autores sugerem que uma elevada superfície de contato gerada pela porosidade, acelera a degradação dos implantes por aumentar o contato da água com ligações éster [90]. A Figura 3.4 exhibe os processos de degradação mais aceitos até o momento.

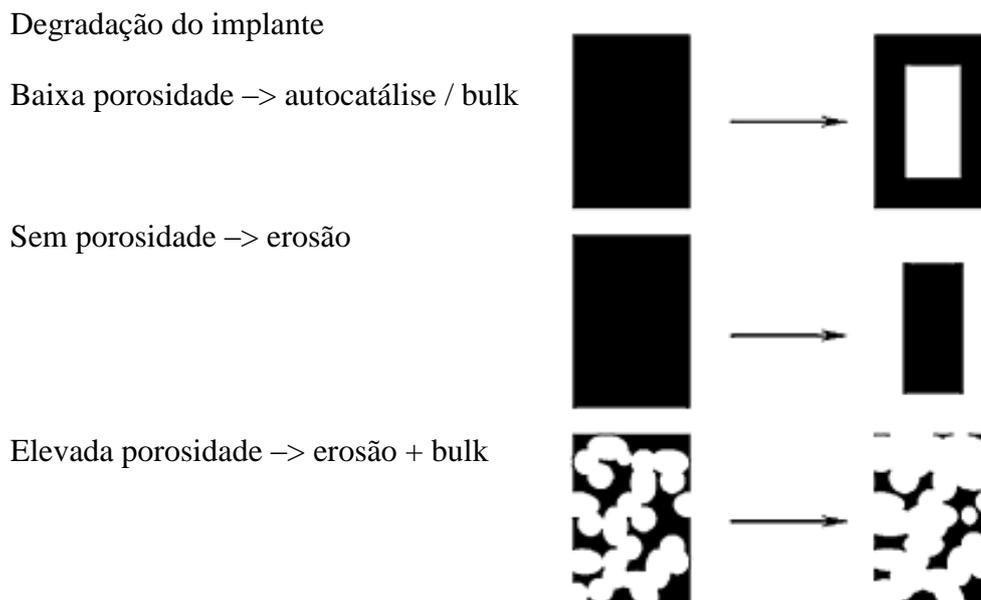


Figura 3.4. Esquema de degradação de implantes porosos e não porosos através da hidrólise das ligações éster e autocatálise. Imagem adaptada [90].

### 3.3.2.2 Apatita nanocristalina carbonatada

Biomateriais a base de fosfato de cálcio são altamente recomendados para utilização como substitutos ósseos em lesões, devido principalmente à sua

biocompatibilidade [51, 91]. Albee et al reportaram em 1920 a primeira utilização de fosfato de cálcio para reparação e regeneração óssea. Apesar das excelentes propriedades biológicas deste material, implantes compostos apenas por fosfato de cálcio não apresentam resistência mecânica apropriada para aplicações *in vivo*. Portanto, estes materiais são utilizados, e alguns casos, no revestimento (plasma spray) de próteses metálicas (titânio em grande parte) por unir a bioatividade da apatita com as propriedades mecânicas do metal [92].

Além dos implantes compósitos com metais, apatitas também apresentam excelentes propriedades quando combinadas com polímeros por assemelhar-se à composição do tecido ósseo: apatita carbonatada e colágeno, que é um polímero natural. Um dos materiais mais utilizados são as hidroxiapatitas altamente cristalinas, por serem extremamente biocompatíveis, porém, tem sido observado que este material apresenta uma baixa taxa de reabsorção e de solubilidade em meio fisiológico.

Nanoapatitas são produzidas principalmente através de coprecipitação química. A redução no tamanho das partículas de apatita aumenta a superfície de contato entre o biomaterial e o meio, podendo alterar a velocidade de dissolução [92, 93]. Além disso, pode-se adicionar íons carbonato durante o processo de formação da nanoapatita, criando uma redução na cristalinidade devido à desordem estrutural criada. A incorporação de  $\text{CO}_3$  à apatita também afeta o tamanho das partículas obtidas. Segundo Tadic et al, um material desenvolvido a base de fosfato de cálcio, apresentando as características descritas, poderia ser considerado ideal para aplicação em enxertos ósseos [92, 94].

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* relatam que fosfatos de cálcio favorecem a adesão celular, sem diferenças significativas encontradas para materiais cristalinos ou amorfos [16, 95].

### 3.3.2.3 Biovidro

Hench et al descobriram na década de 60 que algumas composições de vidro apresentavam características excelentes para aplicação *in vivo* como biocompatibilidade e bioatividade [16, 96, 97].

Cerâmicas de biovidro apresentam como composição principal o óxido de silício, composto biocompatível que induz a formação e regeneração óssea devido a sua capacidade de ligar a superfície do material ao tecido ósseo. Estas cerâmicas apresentam, em grande parte, elevada dureza e resistência mecânica. Devido ao seu elevado módulo de elasticidade em relação às propriedades mecânicas do osso, estas cerâmicas não são habitualmente utilizadas sozinhas. Esses materiais são empregados principalmente no revestimento de implantes [98].

A eficiência de vidros bioativos contendo silício, cálcio e fósforo em contato com tecidos ósseos, é indicada por não gerar fibrose na interface ou resposta imunológica a corpo estranho [99]. Quando estes vidros são colocados em contato com um meio fisiológico, uma camada de fosfato de cálcio carbonatado é formada na superfície, favorecendo a adesão de células pré osteoblásticas que se diferenciam em osteoblastos, gerando o crescimento ósseo [67, 87, 100].

Um estudo mostrou que as partículas de silício favoreceram o crescimento ósseo significativamente em comparação aos resultados encontrados com o uso de HA quando comparados *in vivo* biovidros e hidroxiapatita. Estes resultados podem ser atribuídos à influência exercida pelo silício sobre os genes que controlam a osteogênese e a produção de fatores de crescimento [101, 102].

Duas técnicas são utilizadas para a produção de biovidro: “*melt-quenching*” e “sol-gel”. A principal diferença entre os biovidros preparados por estas duas técnicas é a nanoporosidade e elevada superfície de contato (até duas vezes superior) apresentada pelo biovidro “sol-gel” em contraste com o biovidro denso preparado por “melt-quenching”. A elevada área de superfície é capaz de aumentar a resposta e adesão celular a este material (103, 104). Tetraetil ortosilicato (TEOS) é o precursor mais utilizado para produção de biovidro pelo processo sol-gel. Este composto sofre

hidrólise em ambiente ácido e é precipitado na forma de partículas quando em ambiente básico. O esquema da sequência de reações é apresentado na Figura 3.5. [104].

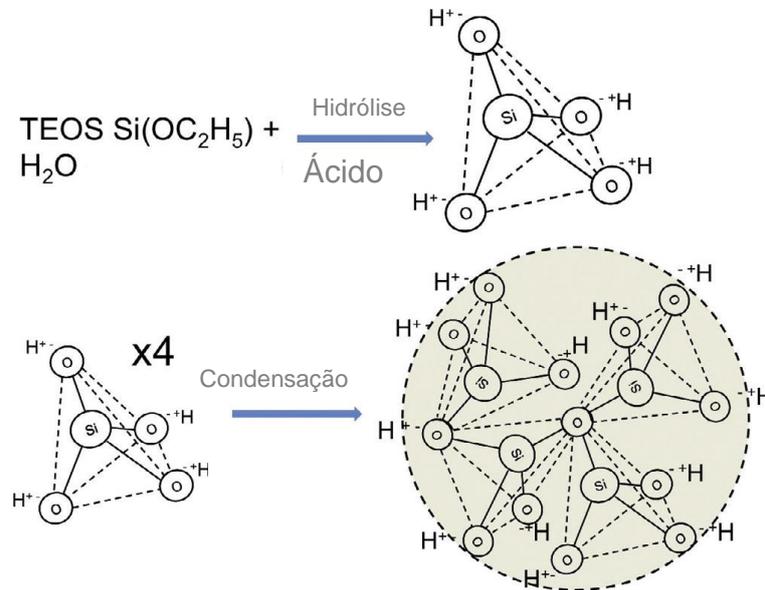


Figura 3.5. Esquema de reações no processo sol-gel. Imagem adaptada [104].

### 3.4 Materiais compósitos

Materiais compósitos são obtidos através da incorporação de dois ou mais materiais com propriedades extremamente diferentes. Este material deve apresentar uma combinação entre as melhores características dos seus componentes, obtendo propriedades superiores aos materiais isolados [89]. As propriedades do compósito resultante da união entre uma matriz e uma carga são extremamente dependentes da interação entre matriz e carga, tamanho de partícula da carga e homogeneidade de dispersão da carga na matriz [105, 106].

A incorporação de materiais cerâmicos como apatitas ou biovidro [84] em uma matriz polimérica gera um material compósito que associa características dos dois materiais [83].

Bonfield et al estão entre os primeiros pesquisadores a perceberem o potencial da utilização de fosfatos de cálcio em compósitos, associados com matriz polimérica para melhorar o desempenho mecânico das cerâmicas isoladas. Partindo do princípio que a estrutura dos ossos compreende cristais minerais dispersos em

uma matriz de colágeno, estes pesquisadores desenvolveram um método de extrusão para obtenção de parafusos de polietileno de alta densidade [107-109].

Como demonstrado por Niemela et al, arcabouços compósitos de polímero e cargas bioativas localizadas na superfície dos poros da matriz polimérica, são capazes de formar uma camada de apatita na superfície do material [110, 111].

Arcabouços confeccionados a partir de colágeno/gelatina e partículas cerâmicas ganharam a atenção de diversos autores nos últimos anos [112-114]. Neste sentido, ganham destaque estruturas esponjosas de gelatina/fosfato de cálcio, altamente porosas, preparadas através da metodologia de liofilização. Embora este processo produza eficientemente arcabouços porosos, as propriedades mecânicas destes compósitos são inferiores as desejáveis para aplicação em reparos ósseos [115].

Compósitos entre materiais cerâmicos e poliméricos também podem ser obtidos com polímeros sintéticos biodegradáveis. Uma metodologia utilizada se dá através da adição de microesferas poliméricas à matriz cerâmica. Uma das primeiras pesquisas a utilizar esta metodologia para inserir microesferas de PLGA em cimento de fosfato de cálcio foi realizada por Simon Jr. et al em 2002 [116]. Microesferas de PLGA com diâmetros entre 180–360  $\mu\text{m}$  foram adicionadas a um cimento de fosfato de cálcio (fosfato tricálcico). O compósito resultante apresentou maleabilidade e biocompatibilidade em testes celulares.

O volume e o tamanho dos poros de uma matriz aplicada à regeneração óssea influenciam consideravelmente a bioatividade deste material [117, 118]. Jaakkola et al observaram uma relação direta entre porosidade/área superficial e bioatividade [119]. A adição de partículas bioativas à matrizes poliméricas bioabsorvíveis, além de aumentar possivelmente a texturização da superfície dos poros (gerando uma maior área superficial), ainda proporciona o efeito de tamponamento do pH próximo a superfície do polímero [120].

Boccaccini et al observaram modificações nas propriedades da superfície de uma matriz polimérica após a adição de biovidro comercial (45S5 Bioglass). Estas matrizes apresentaram elevada hidrofiliabilidade em comparação ao polímero puro, alterando a cinética de degradação do material [121]. Outros estudos relatam ainda que compósitos poliméricos apresentam uma degradação mais homogênea em relação ao polímero isolado. Isto se deve à facilidade de penetração de água nas regiões de interface e microporos gerados normalmente pela carga [122]. Idealmente, materiais aplicados a regeneração óssea apresentam cinética de degradação compatível com a velocidade de regeneração do tecido. Para tanto, é necessário que a matriz porosa permita e estimule a adesão e proliferação celular [16, 123].

Ruhé *et al* e Floor *et al* confeccionaram microesferas de PLGA com diâmetro entre 20-40  $\mu\text{m}$ . Estas microesferas poliméricas foram adicionadas a um cimento injetável de fosfato de cálcio, conforme pode ser observado nas micrografias da Figura 3.6. O objetivo destes pesquisadores era obter um arcabouço poroso após a degradação das microesferas, aumentando assim a superfície de contato do material, fator de elevada importância para a adesão celular. Foi observado, em experimentos *in vitro*, que a adição de 20% de PLGA na forma de microesferas causou a diminuição da resistência do arcabouço à compressão e aumentou o tempo de injeção [124,125]. Estes pesquisadores também observaram erosão nas microesferas do arcabouço, correspondendo na redução da resistência mecânica.

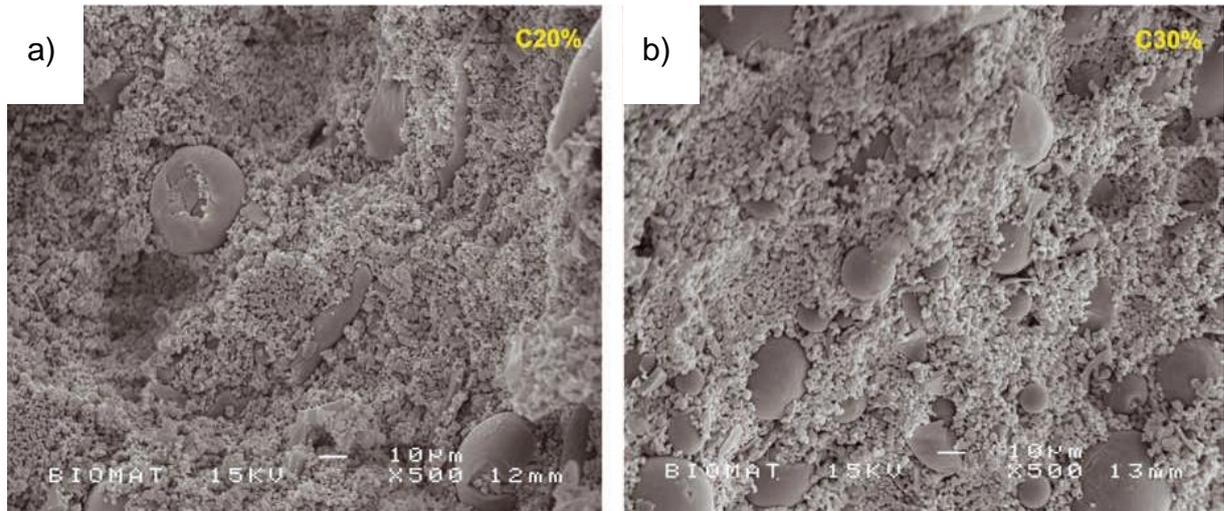


Figura 3.6. Micrografias de cimento ósseo com adição de microesferas de PLGA com 20% (a) e 30% (b) de polímero em massa [126].

Durante os estudos de degradação *in vitro* foi observada uma redução no pH devido a hidrólise do PLGA, que gera os ácidos lático e glicólico. Em comparação com o cimento de fosfato de cálcio microporoso, a adição de microcápsulas de PLGA gerou uma reabsorção elevada nas regiões próximas ao polímero [48].

Shikinami *et al* elaboraram compósitos densos de PLLA e HA e avaliaram suas propriedades e sua eficiência quando implantados em fêmures de coelhos durante o período de regeneração óssea. Esse material apresentou propriedades mecânicas superiores às do osso cortical. Entretanto, a degradação deste material é extremamente lenta e a completa reabsorção levaria anos [17,127].

Um compósito altamente poroso de HA e PLLA/PLGA (com elevada interconectividade entre os poros), foi criado através do método de liofilização por Zhang *et al* [17]. Estes pesquisadores observaram uma excelente adesão das partículas de HA na matriz polimérica. Ainda foi observado por estes pesquisadores que fatores como a concentração do polímero em solvente e a concentração de HA em relação à quantidade de polímero alteram a formação e morfologia dos poros. Os compósitos exibiram propriedades mecânicas elevadas em relação ao polímero isolado, sendo superiores às propriedades mecânicas do osso cortical. Apesar da eficiência deste processo, ele apresenta algumas restrições como relatado pelos

pesquisadores Huang *et al.* Estes pesquisadores reportaram que quando é utilizada uma elevada concentração de PLGA em solução, a porosidade obtida é insuficiente, devido ao aumento da viscosidade da solução. Além disso, a estrutura e tamanho dos poros se tornam extremamente irregular com a adição de hidroxiapatita a matriz polimérica [47].

A obtenção de arcabouços compósitos de PLA/PLGA com fosfatos de cálcio através da técnica de *electrospinning* oferece a possibilidade de produzir compósitos fibrosos com elevada superfície de contato e interconectividade entre os poros. Jeong *et al.* desenvolveram arcabouços nanofibrosos de PLA/HA através desta metodologia com sucesso [128]. A principal desvantagem apontada por pesquisadores com relação a esta técnica é a dificuldade em controlar o tamanho e formato dos poros [49].

Navarro *et al* desenvolveram um compósito entre PLA e um vidro cerâmico a partir de uma solução homogênea dos mesmos com adição subsequente de partículas de cloreto de sódio para geração de porosidade. A concentração de material inorgânico utilizada nesta pesquisa é de 40 %, obtendo como resultado um aumento nas propriedades mecânicas do material. Entretanto, a resistência do produto desenvolvido à compressão foi extremamente baixa [129-130]. Da mesma forma, Niemela *et al* observaram que, apesar das propriedades mecânicas do biovidro, compósitos desenvolvidos com este material somado a um polímero biodegradável apresentam baixa resistência ao cisalhamento e a compressão, quando preparados por extrusão. Apesar disso, Yao *et al* demonstraram que a adição de partículas de vidros bioativo a uma matriz polimérica favorecem a bioatividade do arcabouço, promovendo a diferenciação de osteoblastos [131].

Kokubo *et al* mostraram que as propriedades mecânicas de um polímero podem ser modificadas através da adição de partículas inorgânicas à matriz. Estes pesquisadores avaliaram o módulo de Young do biovidro e encontraram valores em torno de 85 GPa [98, 132, 133].

A bioatividade dos materiais inorgânicos adicionados a matrizes poliméricas se refere à habilidade do material em se conectar ao osso quando implantado [134]. Zhou et al compararam *in vitro* compósitos de PLA-fosfato de cálcio/PLGA-fosfato de cálcio em relação ao polímero sem carga. Estes pesquisadores concluíram que os materiais compósitos têm maior potencial para aplicação clínica por apresentarem maior biocompatibilidade e eficiência na formação óssea quando comparados aos polímeros [135]. Portanto, utilizando-se diferentes tipos de cargas, pode-se obter diferentes períodos de degradação [50].

A bioatividade de um arcabouço tridimensional é favorecida pelo aumento da área de superfície, tamanho e distribuição dos poros. Portanto, a adição de partículas bioativas altera positivamente as propriedades de bioatividade dos arcabouços de duas formas, modificando a química de superfície e proporcionando o crescimento ósseo devido à sua bioatividade e aumentando a área superficial e a rugosidade da superfície dos arcabouços compósitos [136].

Estudos *in vivo*, utilizando materiais compósitos de PLLA e fosfato de cálcio, mostraram que as propriedades biológicas da carga são exibidas também pelo compósito. Além disso, a adição de fosfato de cálcio reduziu a inflamação próxima ao implante, quando comparado ao polímero isolado. Yasunaga et al mostraram ainda que a ligação entre implante e tecido ósseo é significativamente intensificada quando cargas de fosfato de cálcio são adicionadas a uma matriz polimérica.

Aunoble *et al* obtiveram resultados semelhantes ao comparar implantes exclusivamente de PLLA e compósitos PLLA/ $\beta$ -TCP [137]. Em período determinado, após a implantação em coelhos, foi avaliada a osseointegração destes implantes, mostrando que os compósitos estavam em contato direto com o osso, promovendo integração, enquanto os implantes exclusivamente poliméricos geraram a formação de um tecido fibroso [138]. 64 meses após a implantação foi observado que os implantes preparados exclusivamente com PLLA ainda não estavam completamente degradados, tendo sido encapsulado e isolado em alguns casos. Este efeito não foi observado para os materiais compósitos [127, 139].

Os estudos têm mostrado que a adição de biovidro a implantes originalmente exclusivamente poliméricos, ou até mesmo metálicos, promove a proliferação e adesão celular mais eficiente [140]. A adição de biovidro comercial a um poliéster gera a deposição de fosfato de cálcio (elementos provenientes do meio) na superfície do implante. A velocidade de cristalização deste fosfato é diretamente proporcional à concentração de biovidro adicionado ao polímero [119, 141]. Ainda, quando avaliada a capacidade de integração óssea a partir da formação desta camada de fosfato de cálcio na superfície dos implantes, compósitos contendo partículas menores de biovidro são favorecidos.

Um estudo avaliou o comportamento de implantes compósitos contendo biovidro comercial com diferentes tamanhos de partícula, ao longo de seis horas em contato com o meio de degradação *in vitro*. Os pesquisadores concluíram que a cinética de formação da camada de fosfato de cálcio sobre o implante é mais rápida em compósitos contendo partículas menores da mesma carga [140, 142]. Coathup et al também mostraram que partículas menores sofrem reabsorção mais rápida, sendo substituídas por tecido ósseo mais rapidamente quando comparadas a partículas maiores com a mesma composição química [143].

Não existem muitos estudos direcionados à caracterização mecânica de compósitos porosos ou não preparados com poliésteres e cargas inorgânicas como biovidro ou hidroxiapatita. Os autores que investigaram esta área mostraram que se obtêm materiais com propriedades mecânicas e módulo de Young proporcionais a adição de cargas inorgânicas à matriz polimérica. Blaker et al observaram efeitos contrários ao esperado ao adicionar partículas de biovidro a uma matriz polimérica. Comparando o polímero puro e o material compósito obtido, este último apresentou uma redução significativa no módulo de elasticidade. Este efeito foi atribuído à metodologia de preparo do compósito, que ocasionou degradação de parte do polímero e redução da massa molecular [144].

O tamanho e formato das partículas adicionadas a uma matriz polimérica apresentam um impacto significativo nas propriedades mecânicas do compósito preparado [145]. Todo et al avaliaram o efeito da adição de hidroxiapatita

micrométrica e nanométrica, a uma matriz de PLLA na concentração de 10%. Compósitos contendo as partículas menores sofreram fraturas quando comprimidas enquanto os compósitos preparados com partículas maiores apresentaram maior ductilidade [146]. Os autores atribuíram esta diferença de comportamento à formação de aglomerados com tamanhos expressivos em relação às partículas nanométricas. Estes aglomerados promovem a ruptura frágil do material devido à criação de defeitos na estrutura do compósito.

Ainda são necessários estudos referentes ao efeito de cargas inorgânicas com diferentes propriedades químicas, tamanho e distribuição de partículas no comportamento mecânico de um compósito. Grande parte dos estudos encontrados mostra um aumento no módulo de elasticidade do compósito em relação ao polímero isolado, porém, os resultados são bastante variáveis [144, 147].

#### *Liberação de fármacos*

Implantes compósitos de apatita e PLGA podem ser utilizados para liberação de fármacos através de duas metodologias. Na primeira o fármaco é incorporado a matriz polimérica, enquanto na segunda metodologia o fármaco é aderido na superfície do arcabouço, através de ligações covalentes ou microcápsulas degradáveis pelo compósito (metodologia favorecida pela elevada porosidade) [125, 148]. Soriano *et al* estudaram a viabilidade da utilização de compósitos de PLA e fosfato de cálcio associada a liberação de gentamicina. Seus resultados mostraram uma liberação acelerada no início do processo de degradação, comportamento típico do PLA. Após este período a liberação lenta de fármaco foi observada por mais dez semanas [17].

Outra forma estudada para liberação de fármacos *in vivo* é a impregnação de micro e nano esferas com o fármaco desejado e a adição deste material a um cimento de fosfato de cálcio ou aos arcabouços porosos. Estas metodologias são úteis para liberação de fármacos e proteínas diretamente na falha óssea [17].

### **3.5 Técnicas de caracterização**

Analisar a estrutura dos implantes formados, a composição final e a morfologia interna é de extrema importância para prever a interação do implante com o organismo. Portanto, esta seção descreverá a importância da realização das técnicas empregadas, descrevendo o princípio de funcionamento de cada uma.

#### **3.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura**

O princípio físico de operação de um microscópio eletrônico de varredura é baseado na emissão de elétrons por um filamento em alto vácuo, varrendo a superfície da amostra. A interação da superfície da amostra com o feixe de elétrons provoca modificações no sinal destes elétrons de acordo com as modificações da superfície da amostra. Desta forma, são emitidos elétrons secundários, elétrons retroespalhados, fótons, raios X característicos, elétrons Auger, etc. Para formação da imagem detalhada da topografia da amostra são detectados os elétrons secundários, enquanto para determinar diferenças entre os elementos que constituem a amostra, são detectados os retroespalhados. Os raios X emitidos pela amostra após a interação com o feixe de elétrons são característicos para cada elemento, sendo possível, assim, identificar a composição qualitativa e quantitativa da superfície da amostra através de um detector de raios X [149, 150].

Quando amostras condutoras são analisadas não é requerido nenhum tipo de preparação ou tratamento prévio. Entretanto, no caso de amostras isolantes, se faz necessária a cobertura da superfície da amostra com uma fina camada de ouro ou de outros metais [150]. Huang *et al* caracterizaram por MEV arcabouços de PLGA porosos preparados através da adição de cloreto de sódio como agente porogênico, podendo analisar a morfologia das estruturas poliméricas. As micrografias mostram que todos os arcabouços confeccionados apresentaram elevada porosidade e interconectividade entre os poros [151].

### 3.5.2 Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier

O objetivo desta técnica é a identificação dos grupos funcionais presentes em determinada amostra. Diferentes tipos de ligações absorvem frequências características de radiação infravermelha. Os átomos unidos em uma molécula podem realizar três tipos de movimento: translação, rotação e vibração molecular. Quando a radiação infravermelha atinge a amostra, a energia absorvida é transformada nestes tipos de movimentação. Estas energias são quantizadas e geram um espectro onde as ligações presentes no composto analisado podem ser identificadas [152, 153].

Além de fornecer informações qualitativas, a análise pode ser utilizada para obter informações quantitativas, avaliando a intensidade e o formato dos picos no espectro. A largura dos picos é uma função da homogeneidade da ligação química [152].

Mou *et al* utilizaram esta técnica para avaliar a composição química dos arcabouços compósitos de PLGA/HA/colágeno identificando ligações específicas pertencentes à HA e ao colágeno. Estes compósitos porosos foram obtidos com pressão de dióxido de carbono no interior do material [154].

### 3.5.3 Porosimetria a mercúrio

Porosimetria a mercúrio é uma técnica extremamente útil para caracterização de poros entre aproximadamente 35nm e 500mm. Esta caracterização fornece diferentes informações referentes a materiais porosos como: área superficial da amostra, o volume total de poros, a densidade aparente e o tamanho dos poros [155]. Esta técnica de caracterização baseia-se no fato de que o mercúrio é um líquido não-molhante que não reage com grande parte dos materiais e amostras. Em função disto, se torna necessária a aplicação de uma determinada pressão para que o mercúrio ocupe os poros e lacunas nas amostras analisadas.

No período em que a caracterização é realizada, a amostra é mantida em um porta amostras ligado a um capilar. É feito, então, vácuo neste porta amostras seguido do preenchimento deste com mercúrio. Devido à pressão negativa exercida sobre o mercúrio, o mesmo penetrará nos poros da amostra e sensores que detectam a variação sofrida pelo volume de mercúrio indicam o volume injetado na amostra [156]. A Figura 3.7 mostra como ocorre à injeção de mercúrio na amostra a ser analisada.

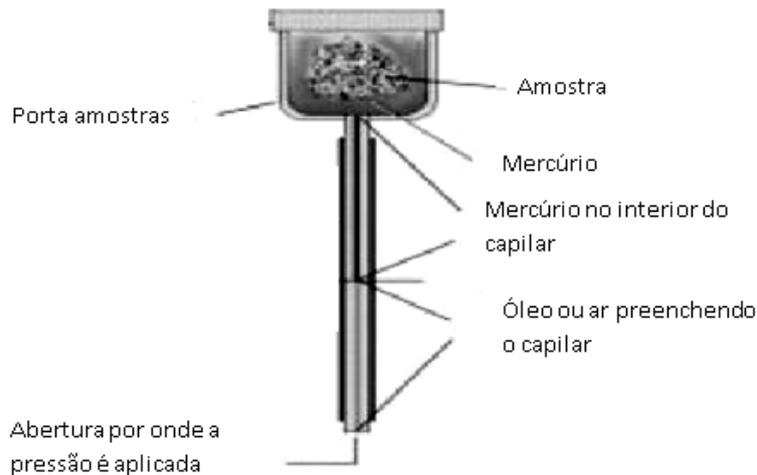


Figura 3.7. Secção transversal do equipamento utilizado para realização de análises de porosimetria a mercúrio. Imagem adaptada [157].

Kim *et al* confeccionaram materiais compósitos porosos de PLGA/HA utilizando cloreto de sódio e dióxido de carbono como agentes porogênicos. Estes autores avaliaram a porosidade dos arcabouços obtidos em diferentes condições através da porosimetria a mercúrio com sucesso [158].

### 3.5.4 Microtomografia de raios X

Microtomografia de raios X é uma técnica radiográfica utilizada para obtenção de imagens tridimensionais da estrutura interna de diversos tipos de materiais com resoluções superiores a 1  $\mu\text{m}$ . Para grande parte dos materiais esta técnica é não destrutiva. Para obtenção de imagens tridimensionais, a amostra é girada sobre um

eixo e uma série de imagens de absorção são registradas. A absorção da luz que passa pelo material depende de fatores como a absorvidade do material, a densidade atômica e o tipo de átomos presentes no caminho percorrido pelo feixe. Uma vez que uma série de radiografias são obtidas de uma amostra, o passo seguinte é uma reconstrução tomográfica. Estas imagens são então reconstruídas para gerar uma imagem tridimensional utilizando princípios matemáticos da tomografia [159].

Devido a relação entre a absorção de raios X e a densidade do material analisado, a estrutura tridimensional interna pode ser deduzida a partir das imagens. A imagem tridimensional obtida é formada por diversas porções de imagens 2D, como pode ser observado na ilustração esquemática de funcionamento do equipamento exibido pela Figura 3.8.

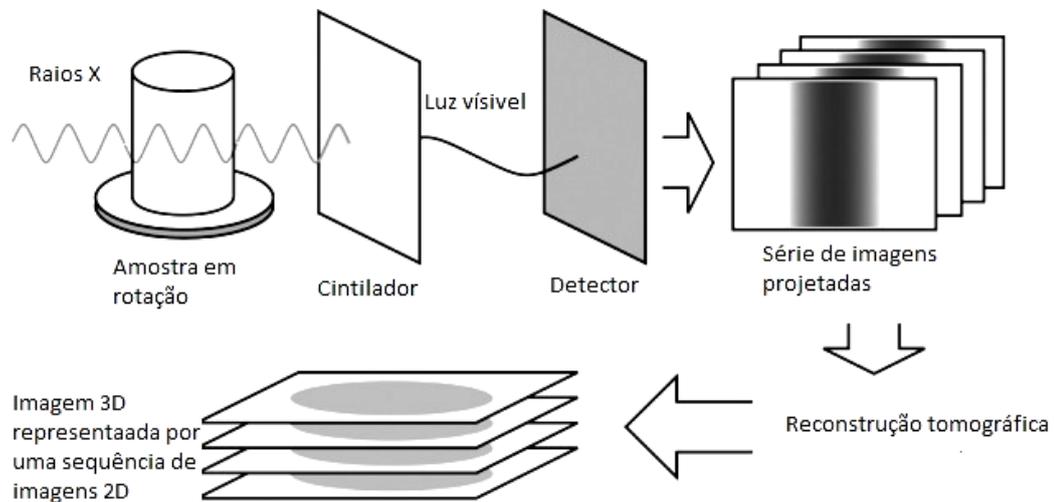


Figura 3.8. Ilustração esquemática do processo de aquisição de imagem através de microtomografia de raios X. Imagem adaptada [159].

Estruturas porosas constituídas de poliuretano e poliuretano/HA foram obtidas através da adição de cloreto de sódio como agente porogênico por Laschke *et al.* Estes pesquisadores utilizaram a técnica de Microtomografia de raios X para avaliar possíveis diferenças estruturais provocadas pela adição de hidroxiapatita à matriz polimérica [160].

### **3.5.5 Difração de Raios X**

A análise por difração de raios X (DRX) é uma técnica utilizada para identificar as estruturas químicas e cristalinas de um material. Permite, também, mensurar as propriedades de uma estrutura quanto a distorções, tamanho da partícula e composição e defeitos de estrutura.

Esta técnica utiliza um método não-destrutivo, sem necessidade de contato. A energia dispersada pelo dispositivo possui um feixe característico do tubo e a difração de todas as camadas atômicas é obtida simultaneamente [149, 161].

O DRX pode ser usado para detectar possíveis transformações de fase, e também para estabelecer comparações de espectros, como por exemplo o espectro padrão do fosfato de cálcio presente no osso humano ou de animais com amostras de tecido ósseo neo-formado. Desse modo, podem-se comparar as tabeladas para os diferentes tipos de osso neo-formado. A presença da fase mineral da hidroxiapatita pode ser qualificada em função das diversas orientações cristalinas de seus constituintes e quantificada em função da matriz do osso neo-formado presente [162].

### **3.5.6 Dispersão dinâmica de luz**

Dispersão dinâmica de luz é uma das técnicas mais utilizadas para avaliação de tamanho de partículas precipitadas ou em suspensão, principalmente por ser sensível a partículas extremamente pequenas. Esta técnica é baseada no deslocamento de um feixe de luz monocromático ao atingir uma partícula em movimento, alterando o comprimento de onda do feixe de luz incidente. A alteração sofrida pelo feixe de luz está relacionada ao tamanho da partícula atingida [163].

### 3.5.7 Ensaio de compressão

Esta análise avalia o comportamento e resistência de um material quando submetido a uma determinada força uniaxial de compressão.

Quando esta força é aplicada a um material, o estresse de compressão é caracterizado pela razão entre força e área de superfície, sendo expresso em  $\text{N/m}^2$  (Pa). A deformação é definida como  $\varepsilon = h_0 - h / h$  onde  $h_0$  é a altura inicial da amostra e  $h$  a sua altura sob compressão.

O equipamento utilizado para análise de compressão é constituído por duas placas paralelas, uma delas móvel, e uma célula de carga. A compressão sofrida pelo corpo de prova pode ser elástica ou plástica. Na deformação elástica, quando a carga aplicada é removida o material retoma o seu formato/altura inicial, enquanto na deformação plástica o material retém parte da deformação sofrida mesmo após a remoção da carga. Em alguns casos, ainda ocorre uma combinação das duas [164].

### 3.5.8 Cromatografia de permeação a gel

A cromatografia de permeação a gel (GPC) é uma das técnicas mais utilizadas para determinação da massa molar de polímeros, sendo relativamente rápida e segura. Esta técnica permite a separação de componentes de uma mistura através de fracionamento em coluna por tamanho das moléculas em solução. A solução contendo o material a ser analisado percola por um leito estacionário poroso, onde as moléculas são fixadas conforme a sua massa molar. Desta forma, as primeiras moléculas a serem eluídas são as de maior tamanho, que não são fixadas nos poros da coluna. As moléculas menores são retidas por períodos de tempo progressivamente maiores por ficarem detidas em poros cada vez menores, sendo carregados em frações consecutivas de tamanhos decrescentes [165].

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão abordadas as metodologias de preparação das cargas e dos compósitos tridimensionais macroporosos e as técnicas de caracterização utilizadas.

As ações para atingir os objetivos específicos aqui descritos foram realizadas parcialmente no CIRIMAT (CNRS – Toulouse – França), durante o período do estágio de doutorado-sanduíche e parcialmente no GEPSI-LMN da PUCRS.

### 4.1 Síntese de partículas bioativas

#### 4.1.1 Biovidro

O processo sol-gel utilizado para a síntese de nanopartículas esféricas de biovidro é normalmente baseado no método de Stöber modificado com um processo de dois passos: os precursores são primeiro hidrolisados sob condições ácidas e depois partículas são precipitadas em solução alcalina [151, 166].

**Para preparar o biovidro neste trabalho, duas soluções foram utilizadas:**

1 - Etanol 94 gl (61,5 mL) + água (108 mL) + ácido nítrico até que a solução apresente pH=2; A esta solução adicionou-se 12,9 g de TEOS.

2 - Etanol 94 gl (198 mL)+ água (54 mL)+ hidróxido de amônio (VWR, concentração de 30%) até que a solução apresente pH=11,5.

A solução 1 foi agitada durante uma hora e, após este período, a solução 2 foi lentamente adicionada a primeira. Adicionou-se então 5,2 gramas de nitrato de cálcio Carlo Erba, com pureza de 97%. Esta suspensão foi agitada durante oito horas. Após este período a suspensão foi centrifugada 3 vezes, trocando o sobrenadante a cada vez. Foram realizados dois processos diferentes com o material filtrado: no primeiro, o filtrado foi congelado e liofilizado a  $-80^{\circ}\text{C}$ ; no segundo, ao filtrado foi adicionado nitrogênio líquido a fim de congelar antes de prosseguir com a liofilização à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . A primeira será chamada de BV1 e a segunda BV2. Para ambos os métodos o filtrado foi liofilizado durante 72 horas (tabela 1).

#### **4.1.2 Apatita nanocristalina carbonatada**

A apatita nanocristalina carbonatada (ANC) foi preparada pela codissolução de um sal de cálcio e um sal de fosfato em solução aquosa. A solução foi tamponada por um excesso de íons fosfato. As soluções utilizadas neste trabalho:

- 1- Nitrato de cálcio  $\{\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}\}$  : 104,4 g em 1500 mL de água destilada.
- 2- Di-hidrogenofosfato de amônio -  $\{(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4\}$ : 180 g + carbonato de sódio  $\{\text{NaHCO}_3\}$ : 180 g em 3000 mL de água destilada.

A primeira solução foi adicionada lentamente à segunda a temperatura ambiente agitando constantemente. Uma vez que foi assegurada a homogeneidade da suspensão, o pH foi medido em torno de 7,2 e o balão foi mantido fechado durante os dez dias de maturação. Após este período, a suspensão foi filtrada em Buchner e lavada repetidamente com água deionizada, a fim de garantir a eliminação dos íons que não reagiram.

Para este método também foram realizados dois processos diferentes com o material filtrado: no primeiro, o filtrado foi congelado e liofilizado a  $-55^{\circ}\text{C}$ ; no segundo, ao filtrado foi adicionado nitrogênio líquido a fim de congelar antes de prosseguir com a liofilização à temperatura de  $-55^{\circ}\text{C}$ . A primeira será chamada de

ANC1 e a segunda ANC2. Usando diferentes temperaturas de congelamento aglomerados com tamanhos diferentes são obtidos. Para ambos os métodos o filtrado foi liofilizado durante 72 horas (tabela 4.1).

Tabela 4.1. Temperaturas de congelamento e liofilização utilizadas para geração de partículas de tamanhos diferentes.

Amostra	Composição	Temperatura de congelamento (°C)	Temperatura de liofilização (°C)
ANC1	Apatita nanocristalina carbonatada	-55	-55
ANC2	Apatita nanocristalina carbonatada	-196	-55
BV1	Biovidro	-55	-55
BV2	Biovidro	-196	-55

#### 4.2 Preparação dos Corpos de Prova (PLGA-apatita; PLGA-biovidro)

Os arcabouços compósitos foram preparados através de duas metodologias diferentes: lixiviação de sal e liofilização.

O PLGA (PURAC - Holanda) utilizado apresenta uma razão entre monômeros de 81/19 (ácido lático/ácido glicólico) com uma viscosidade inerente de 1,79 dL/g. O clorofórmio PA (Merck) com pureza entre 99 - 99,4% e o dimetil carbonato PA (Merck) foram usados sem purificação adicional.

##### 4.2.1 Lixiviação de sal

Arcabouços porosos de PLGA/apatita e PLGA/biovidro foram confeccionados através da metodologia de lixiviação de sal. O copolímero foi dissolvido em clorofórmio a uma concentração definida (3,5%), de forma a obter 10 mL durante 3 horas em ultrassom. Após a obtenção de uma solução homogênea, adicionou-se a carga escolhida (apatita ou biovidro) na concentração predefinida polímero:carga

[100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80]. Partículas de cloreto de sódio foram então adicionadas à suspensão. As suspensões (polímero + carga inorgânica + solvente + NaCl) foram sonicadas durante 3 minutos e depois agitadas em vortex durante 1 minuto. Os produtos resultantes foram vertidos em placas de Petri para evaporação do solvente sob agitação mecânica constante. Os compósitos obtidos foram então colocados em uma prensa hidráulica durante 10 minutos à pressão de 60MPa. Após este período, os compósitos foram colocados em água deionizada por 72 horas, durante as quais, à água foi renovada a cada 8 horas pra remoção completa dos cristais de cloreto de sódio. Finalmente, os arcabouços foram mantidos durante 48 horas em uma câmara de vácuo com pressão de 10 Pa para remoção do solvente residual.

#### **4.2.2 Liofilização**

Os arcabouços de PLGA, PLGA:apatita e PLGA:biovidro foram preparados pelo método de separação de fases induzida termicamente. Dimetil carbonato foi utilizado como um solvente de PLGA; O polímero foi primeiro dissolvido em dimetil carbonato em banho de ultrassom para obter concentrações finais de 3,5 e 7%. As cargas inorgânicas (apatita, biovidro) foram adicionadas às soluções de PLGA em proporções definidas [100: 0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80]. As suspensões (polímero + carga inorgânica + solvente) foram sonicadas durante 3 minutos e depois agitadas em vortex durante 1 minuto. Este processo foi repetido até não serem observados aglomerados. As suspensões foram, em seguida, vertidas em moldes de Teflon.

A fim de congelar os arcabouços e avaliar diferenças em suas propriedades, foram utilizados dois métodos: Banho de nitrogênio líquido (-196°C) e o congelador (-20°C).

- Nitrogênio líquido: os moldes de Teflon contendo as suspensões foram colocados em um recipiente ao qual foi adicionado nitrogênio líquido até que os moldes se encontrem totalmente cobertos. Eles foram deixados submersos durante 30 minutos e mais nitrogênio líquido foi adicionado quando necessário. Após este período, os moldes foram retirados do nitrogênio líquido e liofilizados, para remover

o solvente, até que a amostra apresentasse peso constante (72 horas), gerando a estrutura porosa.

- Congelador: os moldes de Teflon contendo as suspensões de polímero foram colocados no congelador a uma temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 5-7 horas. Os moldes foram então abertos e liofilizados durante 72 horas.

A tabela 4.2 exibe a classificação e nomenclatura das amostras preparadas.

Tabela 4.2. Classificação dos grupos de arcabouços, de acordo com o tipo de carga inorgânica e a razão entre polímero:carga utilizados.

Amostra	Razão entre PLGA:carga	Carga
P1	100:0	--
P6	80:20	ANC2
P7	60:40	ANC2
P8	40:60	ANC2
P9	20:80	ANC2
P10	80:20	BV2
P11	60:40	BV2
P12	40:60	BV2
P13	20:80	BV2

### 4.3 Testes *in vitro*

Os arcabouços desenvolvidos na primeira etapa deste projeto foram submetidos à degradação *in vitro* durante dois meses. Estes testes têm como objetivos: avaliar a velocidade de degradação dos arcabouços, bem como as mudanças morfológicas sofridas durante o processo; Avaliar o comportamento mecânico dos arcabouços durante a degradação; Avaliar a influência das cargas utilizadas e as diferentes concentrações na velocidade de degradação.

Primeiramente, os arcabouços de PLGA/cargas foram avaliados em triplicatas e adicionados em frascos de polipropileno contendo 300 mL de TRIS a 37°C com agitação de 100 RPM. Após os períodos de 14 e 28 dias as amostras foram pesadas, lavadas com água deionizada e secas sob fluxo de capela durante 48h. Após este período, as amostras foram pesadas novamente. Os parâmetros avaliados nos tempos definidos foram: massa de água absorvida; perda mássica e variação da massa molar média.

A absorção de água foi determinada usando a seguinte equação:

$$\text{Absorção de água (\%)} = \frac{A, \text{ um} - A, \text{ sec}}{A, \text{ sec}} \times 100$$

Onde A, um, é o peso da amostra molhada em cada período de tempo e A, sec, é o peso seco dos arcabouços.

A percentagem de perda de peso foi determinada utilizando a seguinte equação:

$$\text{Perda de massa (\%)} = \frac{A_i - A, \text{ sec}}{A_i} \times 100$$

Onde A<sub>i</sub> é o peso inicial do arcabouço.

#### 4.3.1 Testes celulares – Biocompatibilidade

##### *Preparo da cultura de fibroblastos*

Os fibroblastos linhagem NIH/3T3 derivados de camundongo e provenientes do Banco de Células do Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) foram descongelados e cultivados em garrafas de cultura 25 cc em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium Invitrogen®), suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina 10

unidades ml e estreptomicina 10 unidades ml, a 37°C em uma estufa (Sanyo®) sob uma atmosfera umedecida com 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem uma confluência de 80%.

Após esse período as células foram destacadas do frasco de cultura em que estavam aderidas por processo de tripsinização com tripsina EDTA 0,1%, coradas com Azul de Tripán e contadas em uma câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico.

### *Ensaio MTT*

A biocompatibilidade dos arcabouços desenvolvidos (P11 e P12) e das cargas inorgânicas (BV2) foi avaliada *in vitro* através da marcação dos fibroblastos tipo NIH/3T3 com brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), Sigma-Aldrich®, diluído a 0,5% em meio DMEM. As amostras foram submetidas à esterilização com óxido de etileno.

Para esse ensaio foi realizada a análise indireta, sendo adicionado as três concentrações (100%, 75% e 50%) das porções das cargas inorgânicas sintetizadas e porções dos arcabouços compósitos porosos 2500 µl de DMEM suplementado e incubado nas condições citadas anteriormente por 72 horas, sendo que 100% é a quantidade máxima de material colocado em contato com DMEM para formar a solução de extração. Após a contagem de células e vinte e quatro horas antes de atingir o tempo de exposição dos tratamentos, respectivamente, foram preparadas as placas de 96 poços com a densidade celular de  $3,2 \times 10^5$  células por poço. Sendo cada poço preenchido com 200 µL de meio DMEM suplementado e a quantidade de células estabelecidas.

Em vinte e quatro horas as células 3T3 estavam aderidas. A solução de extração foi então adicionada a uma placa de 96 poços contendo fibroblastos NIH 3T3 aderidos (n=3) e incubada nas condições citadas anteriormente por 24, 48 e 72 horas. Hipoclorito de sódio foi utilizado como controle negativo e o meio de cultura sem contato com os materiais avaliados foi utilizado como controle positivo. Após os três períodos predefinidos de incubação, o meio de cultura foi substituído e o

reagente MTT foi adicionado. Após o período de incubação a 37°C (2 horas e 30 minutos), o meio de cultura foi substituído por DMSO (dimetilsulfóxido) Sigma-Aldrich, com pureza de 99.5%, e a absorbância medida a 570 nm.

O efeito das amostras testadas sobre as células foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular \%} = \text{abs}(\text{amostra}) / \text{abs}(\text{controle}) \times 100$$

Onde:  $\text{abs}(\text{amostra})$  é a absorbância média encontrada para a amostra e  $\text{abs}(\text{controle})$  é a absorbância média encontrada para o controle positivo.

#### 4.4 Preparo das amostras para as caracterizações

As cargas sintetizadas foram caracterizadas por FTIR. Uma pequena quantidade de cada carga foi adicionada ao brometo de potássio. A mistura sofreu pressão de 60MPa durante 10 segundos, formando pastilhas translúcidas. Estas amostras foram analisadas em um espectrofotômetro Nicolet 5700 no intervalo de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  (resolução 4 $\text{cm}^{-1}$ ), para avaliar a carbonatação da apatita e obter dados complementares sobre o biovidro. Esta análise foi realizada no CIRIMAT, Toulouse, França.

A difração de raios x foi realizada nas amostras de apatita em um equipamento Shimadzu XRD-7000 com o objetivo de avaliar a cristalinidade da apatita carbonatada obtida. As amostras foram escaneadas com  $2\theta$  entre 20° e 70° usando geometria  $\theta$ - $2\theta$  e monocromador de carbono. O banco de dados do Centro Internacional de Dados de Difração (ICDD) para hidroxapatita (ICDD PDF 9-432) foi utilizado para indexar os picos de difração.

O grau de cristalinidade  $X_c$  das amostras foi calculado baseado na largura do pico (002) na metade de sua altura (FWHM  $\beta_{1/2}$ ), aplicando a seguinte equação [167]:

$$\sqrt[3]{Xc} = \frac{0,24}{\beta^{1/2}}$$

O tamanho do cristalito foi determinado pela equação de Scherrer [167, 168]:

$$D = \frac{k\gamma}{\beta \frac{1}{2} \cos(\theta)}$$

Onde D é o tamanho do cristalito, k é a constante de Scherrer,  $\gamma$  é o comprimento de onda dos raios x.

Esta análise foi realizada no GEPSI-LMN, faculdade de física, PUCRS.

O tamanho de partículas do biovidro foi avaliado utilizando um equipamento Nanosizer Nano Series da marca Malvern Instrument. O biovidro preparado foi disperso em álcool e avaliado em suspensão. A apatita foi avaliada em um equipamento mastersizer 2000 da marca Malvern com um alimentador de pó Scirocco 2000 a pressão de 2 Bar. Esta análise foi realizada no CIRIMAT, Toulouse, França.

Para a realização de MEV, as cargas sintetizadas foram aderidas a fitas de carbono. As amostras tridimensionais foram mantidas durante três minutos em nitrogênio líquido para manter a integridade estrutural durante o corte para análise da secção transversal. Por se tratar de implantes confeccionados a partir de materiais não condutores, ouro foi depositado na superfície dos arcabouços e cargas antes da análise. As micrografias das amostras foram realizadas no Centro de Microscopia e Microanálise – CEMM – da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, em um equipamento FEG-MEV (Field Emission Gun-Scanning Electron Microscope), FEI, modelo Inspect F50.

As análises de porosimetria a mercúrio foram realizadas utilizando um porosímetro de intrusão de mercúrio (AutoPore III, Micromeritics Instruments Inc., Norcross, GA). Esta análise foi realizada no CIRIMAT, Toulouse, França.

As caracterizações por microtomografia de raios x foram realizadas em um equipamento Phoenix/GE nanotom 180 utilizando um alvo de tungstênio, a uma voltagem de 90 kV e uma corrente de 100 mA. O software Datosx foi usado para processar os dados e reconstruir imagens em 3D dos arcabouços.

Os testes de resistência a compressão dos arcabouços de PLGA/PLGA:carga foram realizados utilizando um MTS Synergie 100 equipado com uma célula de carga de 50 kN. Foi utilizada uma velocidade de deformação de 0,2 mm/s. Resumidamente, uma primeira carga de 2 kN foi realizada seguindo-se o descarregamento até 1 kN antes de realizar uma segunda carga de 10 kN. Arcabouços selecionados foram submetidos a uma carga de até 50 kN para identificar possíveis falhas e comportamento a pressões mais elevadas. Três amostras foram testadas para cada condição. Esta análise foi realizada no CIRIMAT, Toulouse, França.

A variação na massa molar do polímero foi acompanhada por cromatografia de permeação em gel ao longo do processo de degradação *in vitro*. Para tanto, as estruturas poliméricas submetidas ao processo de degradação foram dissolvidas em clorofórmio e, na sequência, a solução obtida foi diluída com THF até 2 mL obtendo a concentração de 15 mg/mL para posterior injeção no cromatógrafo HPLC pump-1515 isocrático, utilizando detector de índice de refração Waters Instruments 2412 e THF como eluente. Esta análise foi realizada no laboratório de cromatografia na faculdade de química da PUCRS.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção serão apresentados os resultados deste trabalho, privilegiando as etapas de síntese das cargas inorgânicas (5.1), confecção dos arcabouços e discussão dos resultados obtidos.

### 5.1 Cargas inorgânicas

As cargas inorgânicas preparadas foram analisadas por FTIR, DRX, espalhamento de luz Dinâmico e MEV.

#### 5.1.1 FTIR

A composição química das cargas inorgânicas sintetizadas foi avaliada por FTIR (Figura 5.1). O espectro de absorção IV da apatita carbonatada é semelhante aos espectros de fosfatos de cálcio encontrados na literatura [167]. Os dois picos entre  $500$  e  $600\text{ cm}^{-1}$  e entre  $1000$  e  $1200\text{ cm}^{-1}$ , correspondem aos grupos fosfato. O pico largo entre  $3000$  e  $3600\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao grupo hidroxila.

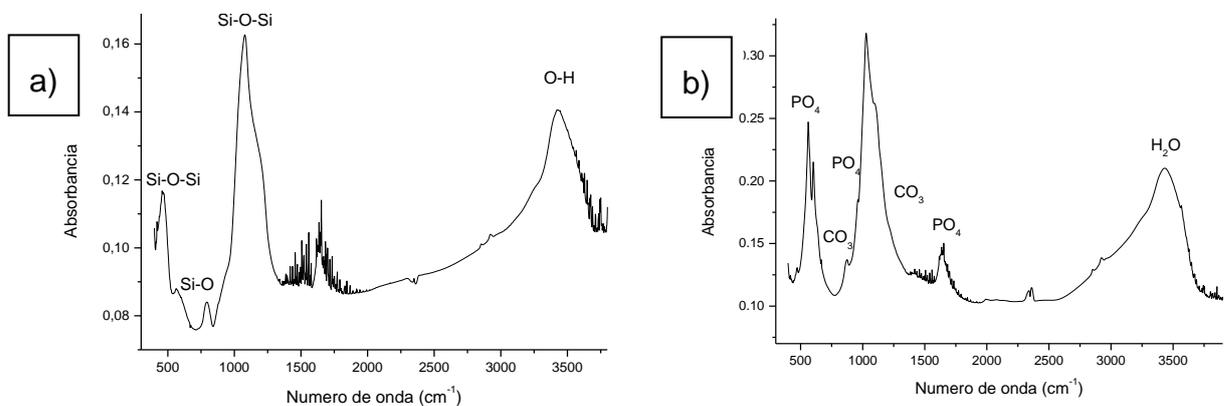


Figura 5.1. Análise de FTIR das cargas sintetizadas: BV2 (a) e ANC2 (b).

É possível observar na Figura 5.1 (a) o espectro obtido para o biovidro, onde os primeiros três picos a  $470\text{ cm}^{-1}$ ,  $800\text{ cm}^{-1}$  e entre  $1000$  e  $1200\text{ cm}^{-1}$  referem-se aos grupos de silício. Estes picos estão de acordo com resultados da literatura [169], indicando que o biovidro sintetizado apresenta características químicas semelhantes aos biovidros amplamente utilizados, que favorecem a osteogênese. Além destes picos, observa-se em torno de  $3500\text{ cm}^{-1}$  é possível observar uma banda característica das ligações O-H, pertencentes à água e, possivelmente, às ligações presentes na superfície do biovidro. Este grupo funcional poderia aumentar a força de interação entre carga e polímero [169].

O espectro apresentado na Figura 5.1 (b) exibe picos característicos de fosfato, indicando, devido ao seu formato, que a ANC obtida apresenta baixa cristalinidade. Os picos referentes a  $\nu_1\text{PO}_4^{-3}$  ( $980\text{-}940\text{ cm}^{-1}$ ) e  $\nu_3\text{PO}_4^{-3}$  ( $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ ) estão sobrepostos e  $\nu_4\text{PO}_4^{-3}$  ( $650\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ ) apresentou dois picos [167]. Os picos referentes ao carbonato são encontrados entre  $1600\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$  e  $890\text{-}850\text{ cm}^{-1}$ . Ambos os espectros exibem picos largos em torno de  $3700\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$  pertencentes às ligações O-H. Estes resultados são corroborados por Querido et al [167]. Ambas as cargas inorgânicas avaliadas são derivadas de minerais reconhecidamente osteocondutivos, osteoindutivos, hidrofílicos e capazes de ativar a expressão do gene osteogênico, favorecendo a formação e regeneração de tecido ósseo devido à sua composição [90, 167, 168, 170].

Como já foi discutido anteriormente, a aplicação destes minerais bioativos na engenharia de tecidos ósseos favorece a adesão e diferenciação de células dando início à regeneração tecidual. Apesar desta grande vantagem, a lenta degradação e biorreabsorção exibida por alguns minerais, dependendo do tamanho e cristalinidade das partículas, ainda representa desafios, como a permanência de material no local do implante por períodos mais longos do que o necessário para a regeneração do tecido [171]. A ANC sintetizada neste trabalho apresenta uma desordem estrutural, o que diminui a cristalinidade. Isso se deve à presença de íons de carbonato na apatita nanocristalina, e potencialmente aumenta a velocidade de degradação [17, 172].

### 5.1.2 DRX

Com o objetivo de avaliar a cristalinidade dos minerais sintetizados, as amostras das apatitas carbonatadas 1 e 2 foram analisadas por DRX (Figura 5.2).

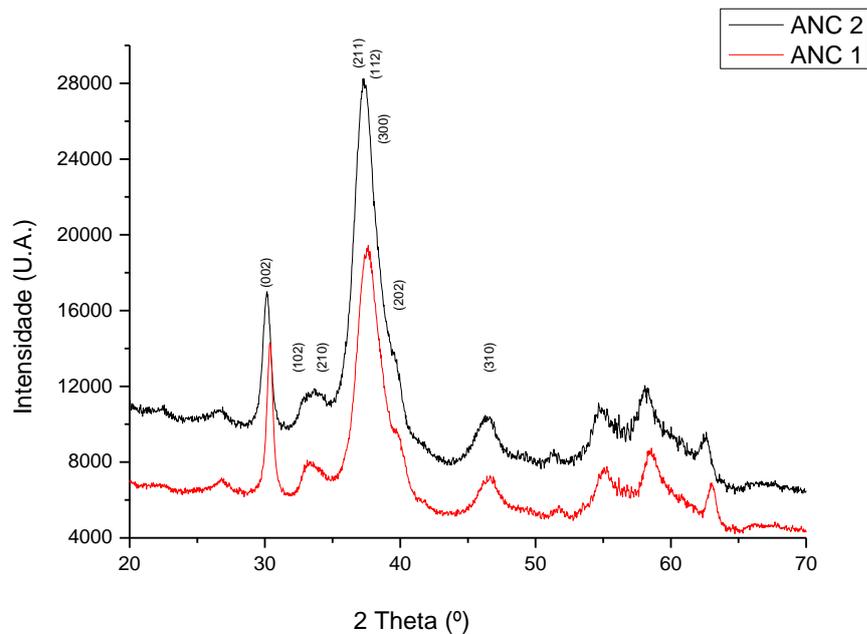


Figura 5.2. Difratograma das ANCs 1 e 2, onde não foi encontrada diferença significativa na fase cristalina de ambas as apatitas. Os picos foram indexados com base no ICDD PDF 9-432 para a hidroxapatita.

Ambas as apatitas sintetizadas apresentaram uma estrutura cristalina semelhante, indicando que o diferente processo de secagem não alterou a estrutura cristalina da carga inorgânica obtida. A Figura 5.3 apresenta em detalhe o pico de reflexão (002), que foi considerado para os cálculos de tamanho de cristalito e grau de cristalinidade por ser o pico mais bem definido e isolado no espectro obtido para as ANCs, além de ser o pico mais amplamente utilizado para este cálculo em amostras de fosfato de cálcio na literatura [167, 168].

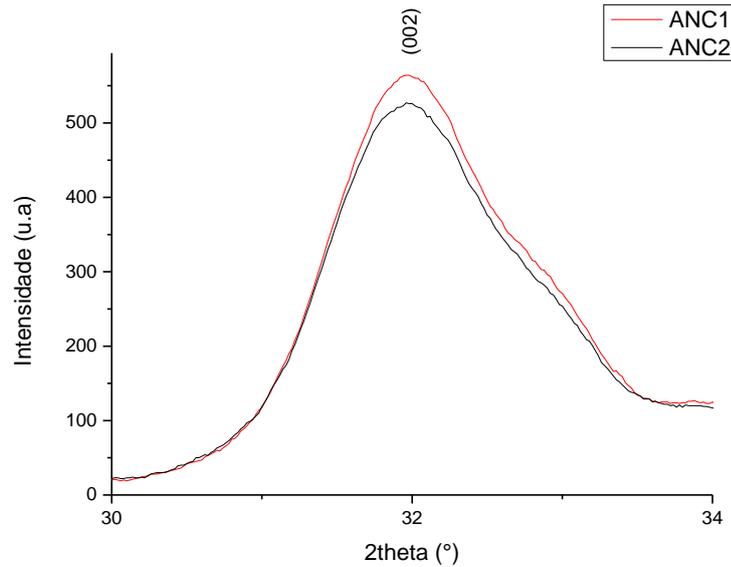


Figura 5.3. Difratograma das ANCs 1 e 2, plotado entre 30° e 34° para evidenciar o pico (002). As amostras apresentam picos largos e sobrepostos.

Os valores de FWHM (largura na metade da altura) para as duas curvas foram utilizados para calcular o tamanho do cristalito e grau de cristalinidade das amostras preparadas. Os resultados obtidos sugerem que não existem diferenças significativas nestes fatores para ambas as cargas inorgânicas (ANC1 e ANC2). Ambas apresentaram tamanho de cristalito próximo a 2,2 nm e cristalinidade extremamente baixa, 0,038 e 0,039 respectivamente. De acordo com Kim et al, os melhores resultados com relação à osteocondução são obtidos com apatitas de baixa cristalinidade, tamanhos reduzidos de cristal e elevada carbonatação[173]. Isto se deve à fase mineral encontrada em ossos ser descrita como apatitas de baixa cristalinidade apresentando cristais de até algumas dezenas de nanômetros, contendo  $\text{CO}_3^{2-}$ . De acordo com Querido et al, nanocristais de fosfato de cálcio com 2-3 nm de diâmetro podem ser encontrados em tecidos recentemente formados próximos a biomateriais, sugerindo que estes cristais servem como centros de nucleação para regeneração óssea [167, 174]. Estes nanocristais com elevada área superficial são parcialmente responsáveis pela angiogênese e adesão do tecido ósseo ao implante. Portanto, um implante contendo as ANCs sintetizadas, que apresentam propriedades semelhantes às produzidas para dar início à regeneração após um trauma, pode acelerar este processo.

### 5.1.3 DLS e MEV (morfologia)

Para avaliar o tamanho das partículas dos vidros bioativos e das apatitas carbonatadas, análises de dispersão dinâmica de luz foram realizadas. A Figura 5.4 exibe os diferentes tamanhos e distribuições de partículas inorgânicas (ANCs) obtidos através da modificação da temperatura de congelamento das amostras antes da liofilização.

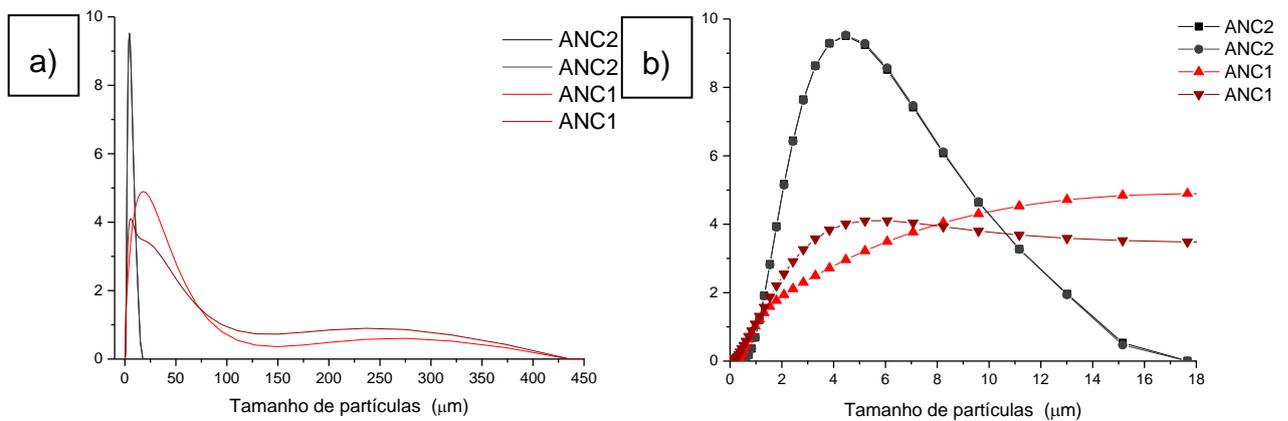


Figura 5.4. Análises de dispersão de luz dinâmica das ANCs 1 (a) e 2 (b) que mostra o efeito do processo de secagem sobre a distribuição do tamanho de partícula.

Na Figura 5.4 (a) e em detalhe (b) é possível observar o efeito direto do processo de congelamento com nitrogênio líquido do material úmido antes do processo de secagem por liofilização.

As caracterizações por análises de dispersão de luz das ANCs sintetizadas mostrou que a ANC1, liofilizada sem prévio congelamento em nitrogênio líquido, apresentou partículas dimensionadas em uma ampla gama entre 1 e 400 µm. A ANC2, por outro lado, exibiu um tamanho de partícula em torno de 5 µm variando de 1 a 16 µm. O tamanho reduzido de partículas e a maior homogeneidade na distribuição do mesmo torna a ANC2 uma carga com propriedades mais indicadas para aplicações na forma de biomateriais e compósitos bioabsorvíveis. Além das vantagens já discutidas em relação à degradação destas partículas menores, no caso de compósitos o material particulado é mais facilmente e homogeneamente disperso na amostra. Uma vez que ambas as apatitas carbonatadas foram

preparadas com os mesmos precursores e tempo de maturação, a redução no tamanho das partículas e aglomerados pode ser atribuída unicamente ao novo processo de secagem. Ao congelar a suspensão de apatita carbonatada com nitrogênio líquido antes de se iniciar a liofilização, é possível diminuir de forma significativa a aglomeração que ocorre durante o processo de remoção de água possivelmente devido à criação de cristais de gelo na carga úmida.

Considerando a aplicação destes materiais à engenharia de tecido ósseo, as propriedades dos arcabouços compósitos dependem fortemente da interface entre a carga inorgânica e a matriz polimérica, bem como o tamanho e distribuição desta carga [92, 175-177]. Ao se utilizar partículas menores e homoganeamente distribuídas na matriz polimérica, como é o caso das amostras congeladas com nitrogênio líquido antes da secagem, deveremos obter as melhores características mecânicas. A Figura 5.5 (a, b) apresenta micrografias de ANC1, preparadas utilizando o processo convencional de secagem.

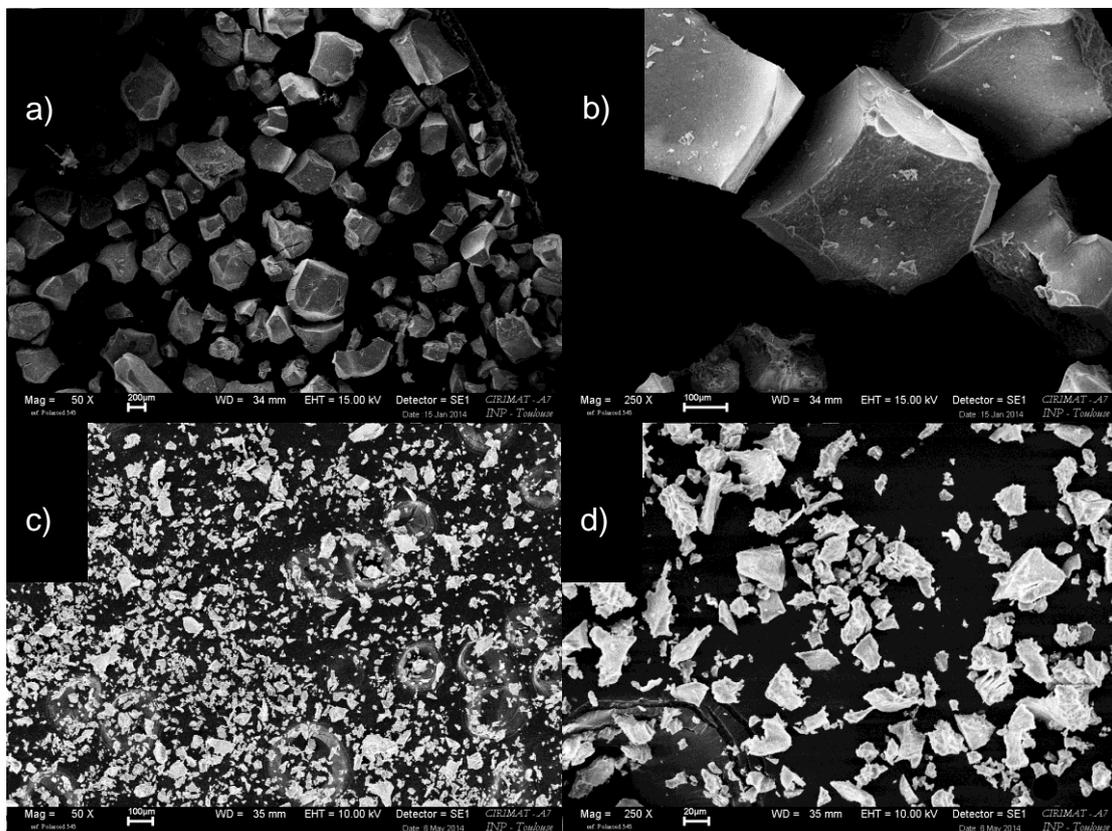


Figura 5.5. Micrografias das apatitas produzidas em duas magnificações diferentes. ANC1 (a, b) e ANC2 (c, d).

Estas micrografias mostram partículas com aproximadamente 200-300  $\mu\text{m}$ , com estrutura homogênea. Esta estrutura pode ser observada em grande parte das partículas, possivelmente devido à remoção lenta da água durante o processo de secagem, sem congelamento prévio da amostra. Já as imagens exibidas pela Figura 5.5 (c, d) são referentes à ANC2, que apresentam tamanho reduzido e morfologia heterogênea em relação à ANC1, possivelmente devido ao congelamento extremamente rápido com nitrogênio líquido, por formar cristais de água distribuídos aleatoriamente na amostra. Estes resultados corroboram com os dados exibidos pelas análises de DRX, DLS e FTIR. A Figura 5.6 exhibe micrografias do BV2 (a,b) e análise de DLS deste material (c).

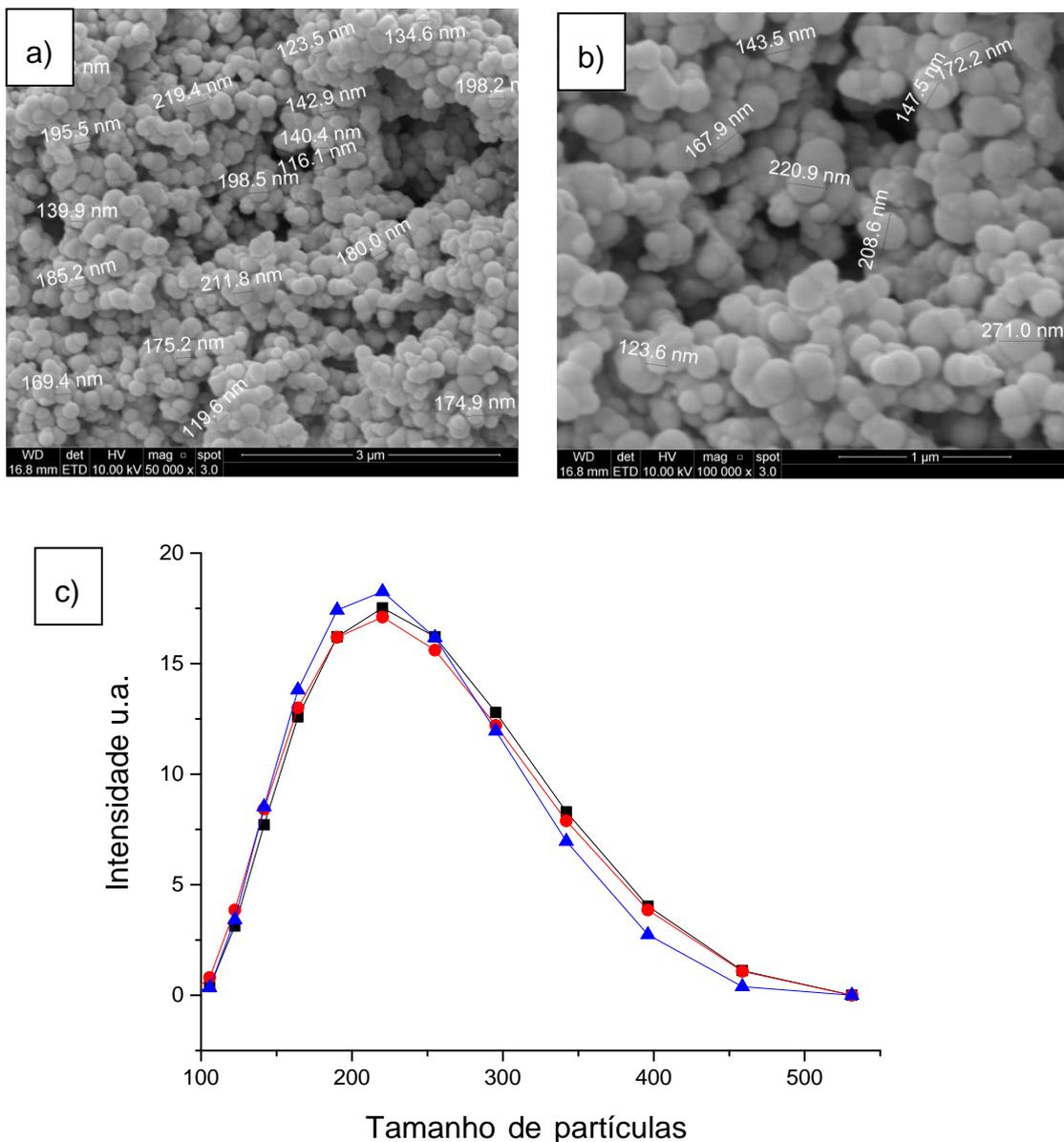


Figura 5.6. Micrografias (a,b) e análise de dispersão de luz dinâmica em triplicata (c) da amostra BV2.

Através das micrografias exibidas na Figura 5.6 (a,b) é possível observar estruturas esféricas com tamanho de partículas médio igual a 170,8 nm e com um desvio padrão de 38,6 nm, corroborando com os resultados de DLS apresentados na Figura 5.6 (c). O tamanho das partículas obtidas é de elevada importância pois esta propriedade influencia na distribuição das partículas na matriz polimérica, na área superficial e portanto na bioatividade deste material, conforme descrito na literatura por Onishi et al [178].

Para o biovidro desenvolvido neste trabalho pelo método sol-gel com uma alteração no processo de secagem, a elevada área de superfície (partículas com diâmetro médio de aproximadamente 170,8 nm) pode, além de aumentar a superfície de contato do implante com o meio biológico, acelerar a degradação do biovidro, conforme discutido por Jones et al [104].

## **5.2 Arcabouços**

Conforme citado no item 3.4, arcabouços tridimensionais temporários (bioabsorvíveis) podem guiar a regeneração óssea, idealmente estimulando os mecanismos naturais de regeneração do tecido ósseo [104]. Com este objetivo, foram desenvolvidos arcabouços de PLGA e PLGA associado a cargas bioativas. Os arcabouços obtidos foram analisados por MEV,  $\mu$ CT, porosimetria de mercúrio, compressão mecânica, velocidade de degradação e biocompatibilidade.

### **5.2.1 MEV e $\mu$ CT (morfologia)**

#### **- Lixiviação com sal**

O processo de lixiviação de sal utilizado neste trabalho para criar matrizes porosas permitiu controlar o tamanho dos poros, através do controle da granulometria dos cristais de sal adicionados à suspensão de polímero/carga. A análise MEV dos cristais de NaCl usados para preparar estes arcabouços são

exibidos na Figura 5.7 (a,b). As micrografias exibidas na Figura (c, d) são referentes às amostras de PLGA preparadas utilizando estes cristais.

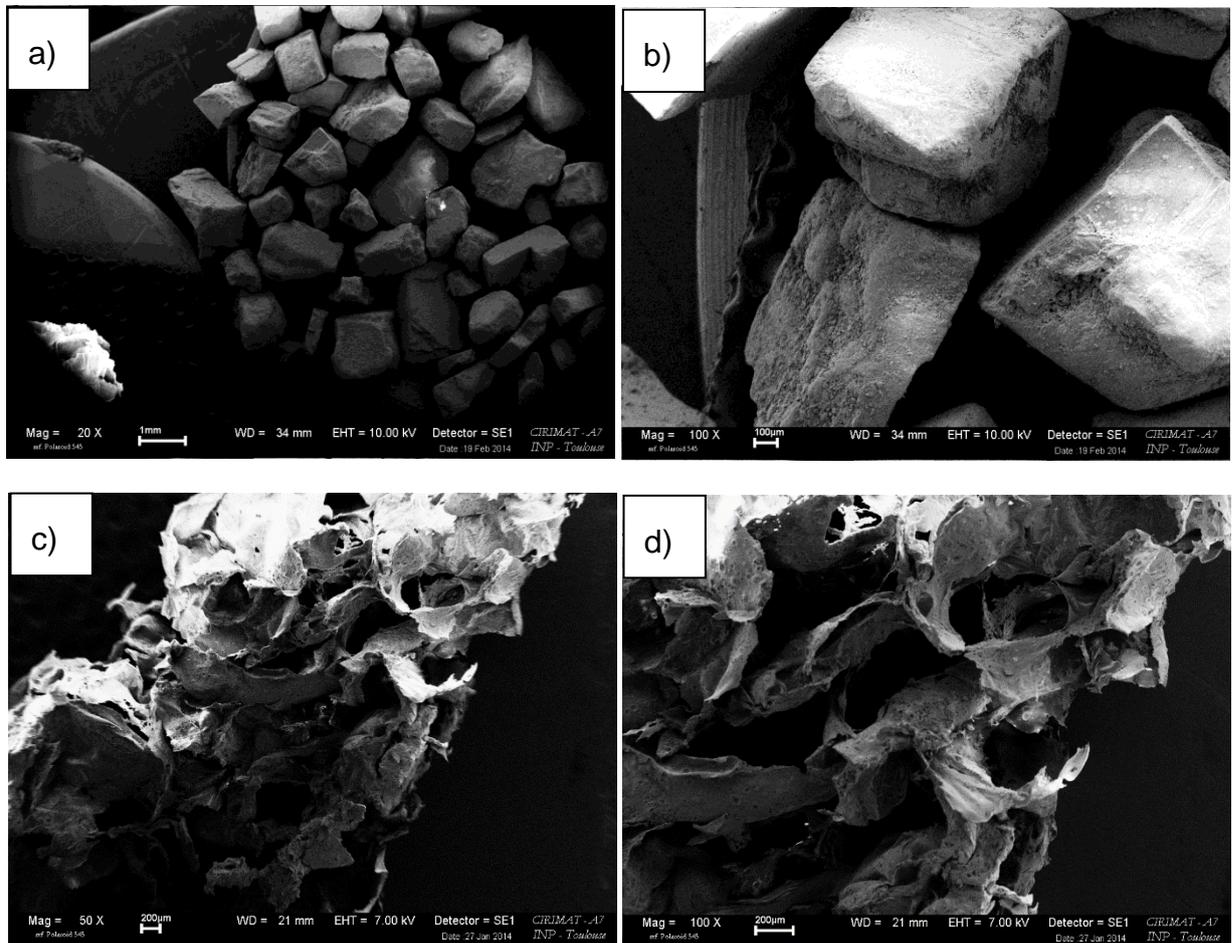


Figura 5.7. Micrografias dos cristais de sal utilizados na para produção de arcabouços porosos (a,b) e micrografias dos arcabouços de PLGA confeccionados (c,d).

As micrografias do sal utilizado no processo de lixiviação mostram partículas com tamanho entre 400 e 600  $\mu\text{m}$ . Esta faixa de tamanhos foi escolhida com o objetivo de produzir arcabouços contendo poros suficientemente grandes para infiltração e adesão de células ósseas. Os arcabouços obtidos com este sal apresentam poros menores do que as partículas de sal devido ao processo de compressão. De acordo com Le Bolay, um dos fatores mais importantes a ser considerado para o sucesso de um arcabouço na regeneração óssea é a porosidade e interconectividade entre os poros. [177, 179].

A Figura 5.8 apresenta uma microtomografia computadorizada do arcabouço preparado por lixiviação de sal.

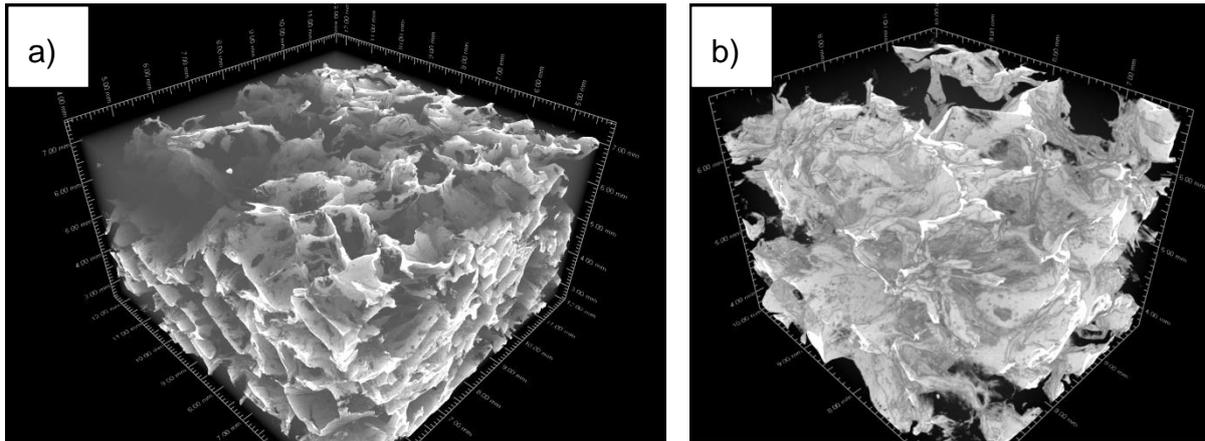


Figura 5.8. Micro CT análise de um arcabouço de PLGA preparado através de lixiviação de sal.

Esta amostra exibiu elevada porosidade, com poros em tamanhos da ordem de 600  $\mu\text{m}$  distribuídos homoganeamente no arcabouço, adequados para aplicação em regeneração óssea. No entanto, é possível observar que as paredes dos poros dão densas, o que limita a interconectividade entre os mesmos. É possível observar que os poros assimétricos não exibem uma direção preferencial. A Figura 5.9 apresenta micrografias de arcabouços preparados por lixiviação de sal com proporções de PLGA:ANC2 60:40 e 40:60, permitindo observar a morfologia interna dos arcabouços obtidos.

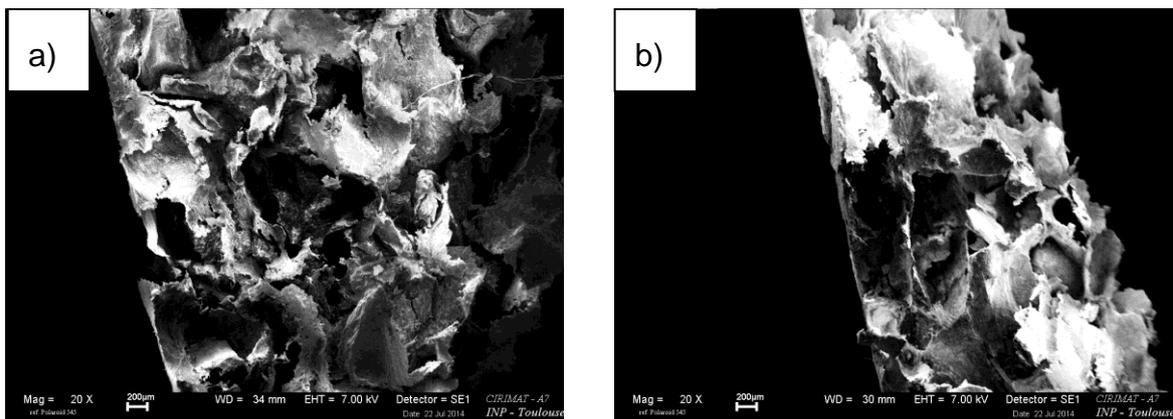


Figura 5.9. Micrografias dos arcabouços preparados por lixiviação de sal. A imagem a mostra um arcabouço com proporções PLGA:ANC2 60:40 (a) e a imagem b 40:60 (b).

Analisando estas imagens e as comparando com as imagens exibidas na Figura 5.7 (c,d), é possível observar que o tamanho de poros não sofre alteração

com a adição de diferentes concentrações de cargas ao polímero. Contudo, pode-se perceber um aumento na densidade e espessura das paredes dos poros, reduzindo ainda mais a interconectividade.

Nossos resultados estão de acordo com Cazalbou et al [176], que afirma que uma elevada porosidade em um arcabouço é a propriedade responsável pela adesão e proliferação celular, transporte e difusão de nutrientes e finalmente angiogênese. Contudo, é difícil manter uma distribuição homogênea das partículas porogênicas e controlar a direção destas partículas, o que provoca obtenção de arcabouços com baixa interconectividade.

### Liofilização

Arcabouços liofilizados exibiram uma organização superior de macroporos e maior nível de interconexão entre os poros em relação aos arcabouços lixiviados. Além disso, os arcabouços lixiviados mostraram paredes mais espessas, poros maiores, menor número de interconexões entre os poros do que os arcabouços liofilizados que apresentam uma melhor organização controlada por cristalização in situ do solvente e temperatura de congelamento.

A Figura 5.10 mostra dois arcabouços de PLGA liofilizados preparados com diferentes temperaturas de congelamento. A amostra a) foi congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  e a amostra b) foi congelada a  $-196^{\circ}\text{C}$ . A magnificação permitiu reconhecer o tamanho dos poros e a sua distribuição nestes arcabouços.

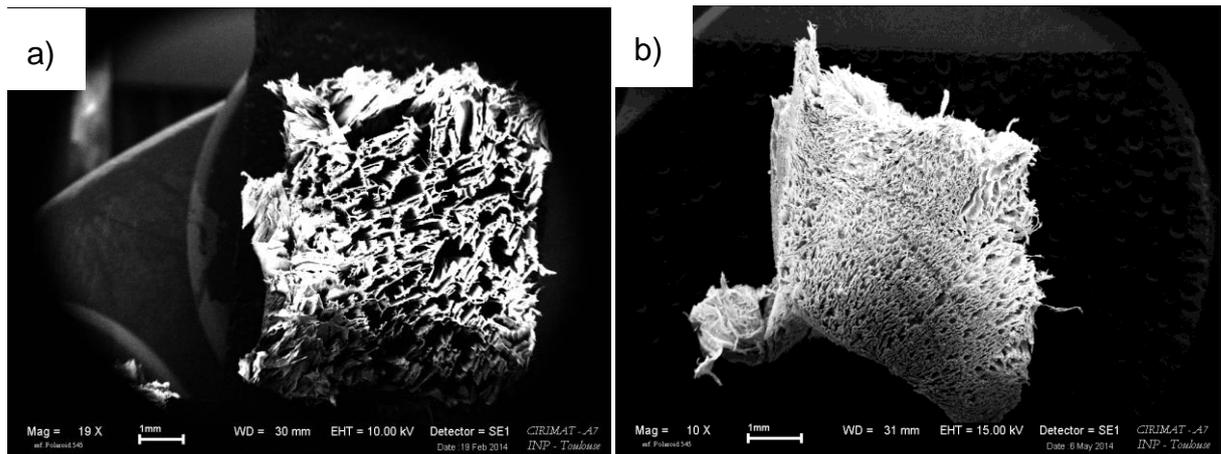


Figura 5.10. Micrografias dos arcabouços liofilizados de PLGA. Arcabouço congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  (a) e arcabouço congelado a  $-196^{\circ}\text{C}$  (b).

A estrutura porosa dos arcabouços congelados à temperatura mais elevada apresentou poros significativamente maiores quando comparado com arcabouços congelados em nitrogênio líquido, as quais, por outro lado, apresentam poros pequenos porém em grande quantidade, aumentando assim a possibilidade de interconectividade. O aumento do tamanho dos poros em temperaturas maiores de congelamento se deve, provavelmente, à formação de cristais de solvente maiores e mais organizados durante o processo de congelamento. Ambos os processos de congelamento possuem possíveis aplicações na engenharia de tecidos [180, 181]. Contudo, tamanho de poros favorável à adesão celular, capazes de servir como suporte e também, de controlar e favorecer a proliferação de células e difusão de nutrientes, é uma necessidade em arcabouços aplicados à engenharia de tecidos [182]. Entre as amostras estudadas neste trabalho, as mais propícias para aplicações na engenharia de tecidos ósseos são aquelas preparadas à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , motivo pelo qual apenas este tipo de amostra será analisada nos arcabouços com cargas.

As Figuras 5.11 e 5.12, exibem micrografias dos arcabouços porosos contendo, respectivamente, PLGA-ANC2 e PLGA-BV2. As imagens são apresentadas com a mesma ampliação. Arcabouços com concentrações elevadas de apatita apresentam porosidade reduzida e paredes de poros mais espessas.

Além disso, estes arcabouços exibem microporosidade adicional, bem como maior rugosidade proporcionando maior área de superfície.

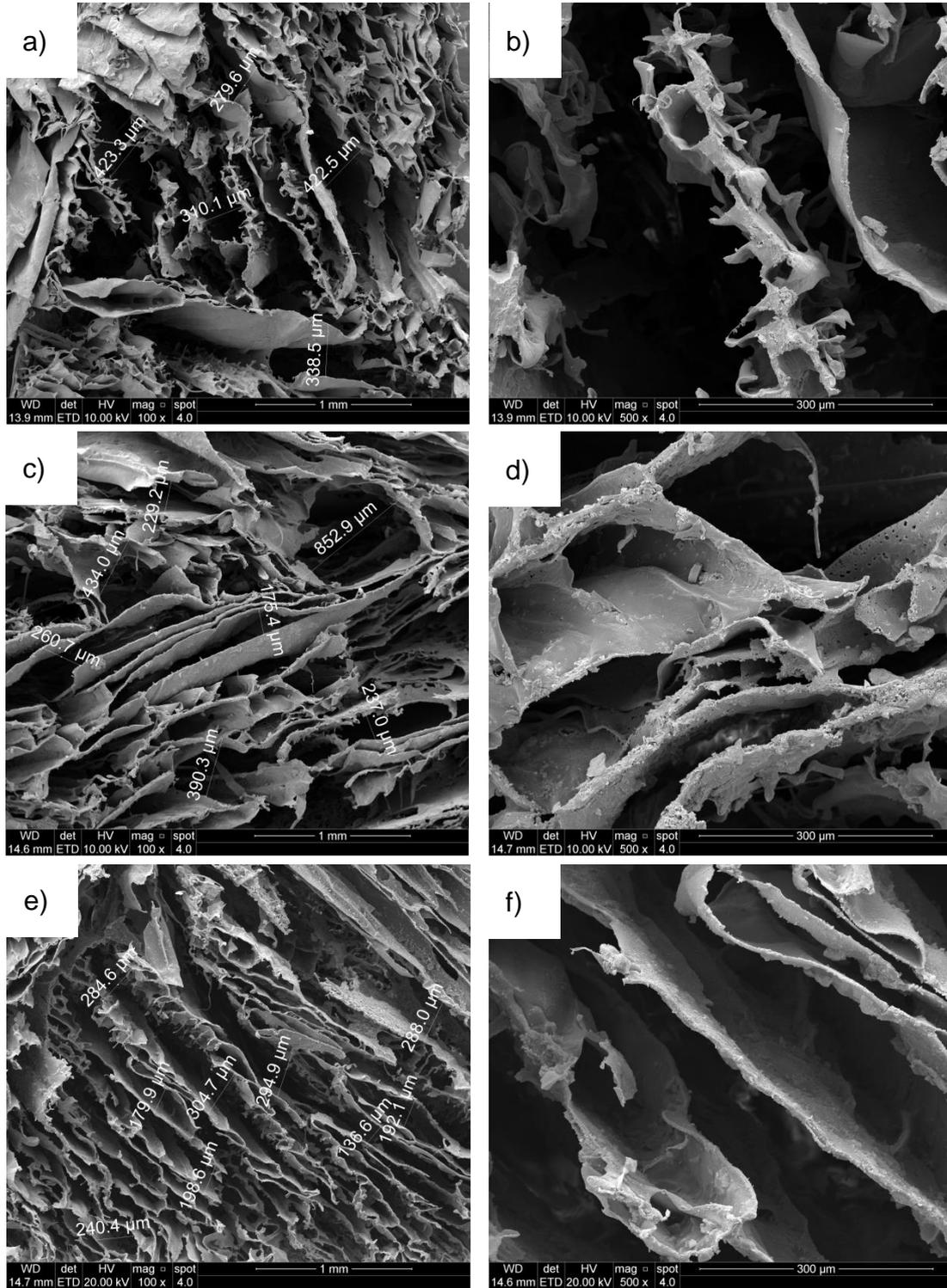


Figura 5.11. Micrografias de arcabouços P6 (a,b), P7 (c,d) e P8 (e,f).

Arcabouços com diferentes propriedades podem ser obtidos através dos mesmos biomateriais quando utilizados métodos de confecção e concentração de cargas inorgânicas diferentes, como pode ser observado na Figura 11 (a, c, e). Essas imagens mostram um aumento na densidade do arcabouço diretamente proporcional ao aumento na concentração da carga adicionada. Este aumento na densidade pode ser observado em relação à redução no tamanho dos poros nas imagens (c, e) em relação à imagem (a).

A Figura 5.11 (c) exibe micrografia de uma amostra contendo uma concentração intermediária de apatita. Esta amostra é claramente mais densa do que as amostras contendo menor concentração de apatita (Figura 5.11 - a). Contudo, é possível observar nesta imagem um poro que não segue esta tendência, apresentando um diâmetro de 852,9  $\mu\text{m}$ . Isso demonstra que apesar da tendência a aumentar a densidade dos arcabouços, através da redução do tamanho de poros e aumento da espessura das paredes, com o aumento da concentração de ANC2, alguns pontos das amostras podem destoar do restante relativamente homogêneo. Isso se deve possivelmente ao gradiente de temperatura das amostras durante o período de congelamento. Ao aumentar-se a magnificação nestas amostras (Figura 5.11 b, d, f) vê-se entre as lamelas as cargas adicionadas distribuídas na superfície das paredes dos poros.

A Figura 5.12 (a, c, e) apresenta micrografias de amostras contendo BV2 em diferentes concentrações. Estas amostras apresentam a mesma tendência exibida pelas amostras contendo diferentes concentrações de ANC2. Contudo, na amostra contendo a maior concentração de BV2 (Figura 5.12 e, f) além da maior densidade, uma menor homogeneidade na distribuição dos poros é observada. Além disso, a imagem (e) mostra paredes de poros sobrepostas, indicando uma fragilidade mais elevada desta amostra em relação às amostras contendo menores concentrações de BV2. Esta sobreposição de lamelas foi produzida, provavelmente, durante o processo de clivagem para realização da análise. Ao observar-se as imagens com maiores magnificações, exibidas pela Figura 5.12 (b, d, f), pode-se perceber o aumento na espessura das paredes dos poros. Além disso, a micrografia exibida pela imagem (f) mostra em detalhe características que podem ser interpretadas

como maior rigidez, e portanto menor elasticidade desta amostra em relação às amostras exibidas nas imagens (b, d).

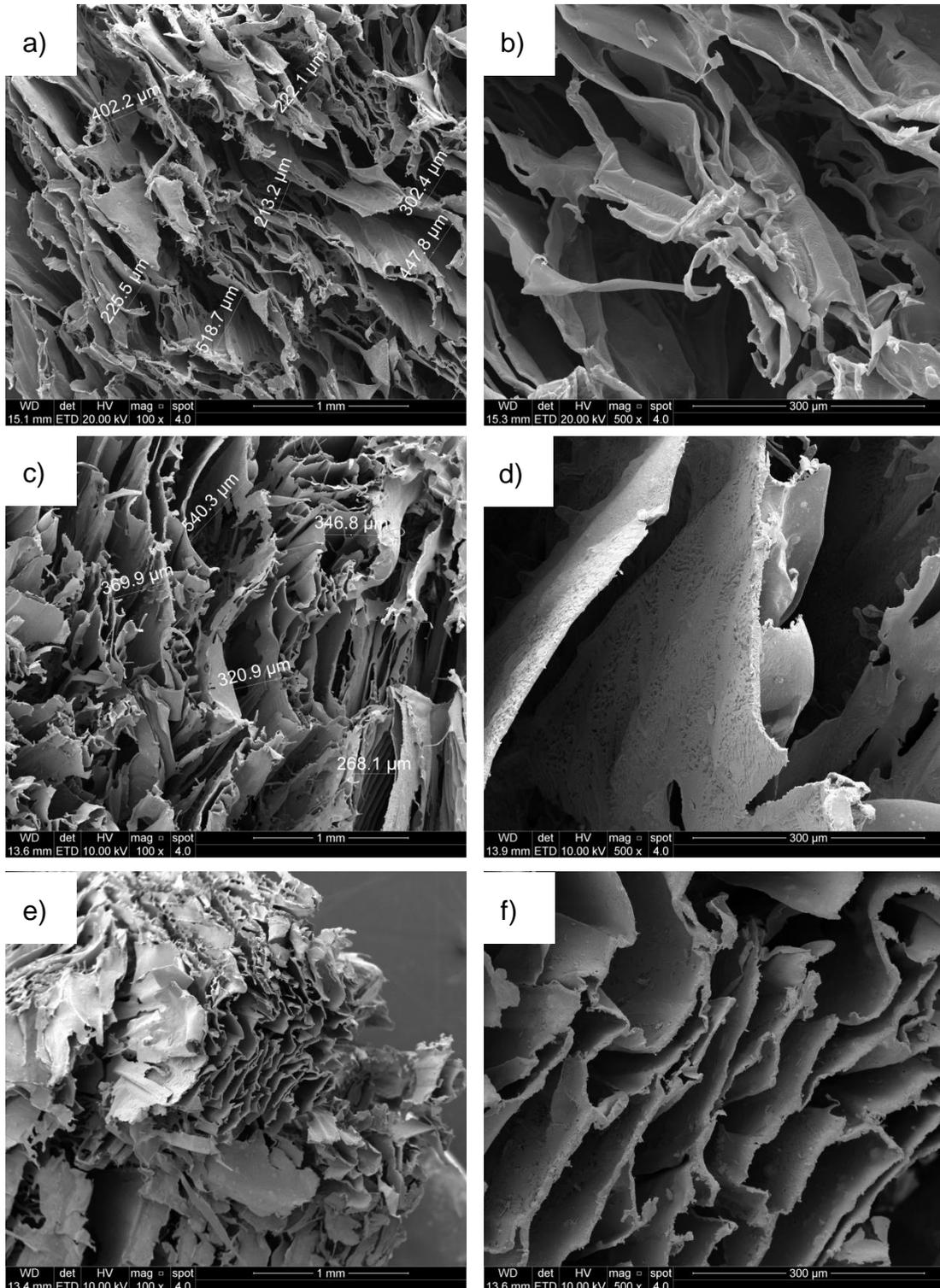


Figura 5.12. Micrografias de arcabouços liofilizados de PLGA:biovidro P10 (a,b), P11 (c,d) e P12 (e,f).

Na figura 5.13 são exibidas micrografias de amostras contendo diferentes concentrações de ANC2 e BV2 com magnificação de 10000X para permitir a observação da estrutura das lamelas dos arcabouços e distribuição de cargas na superfície.

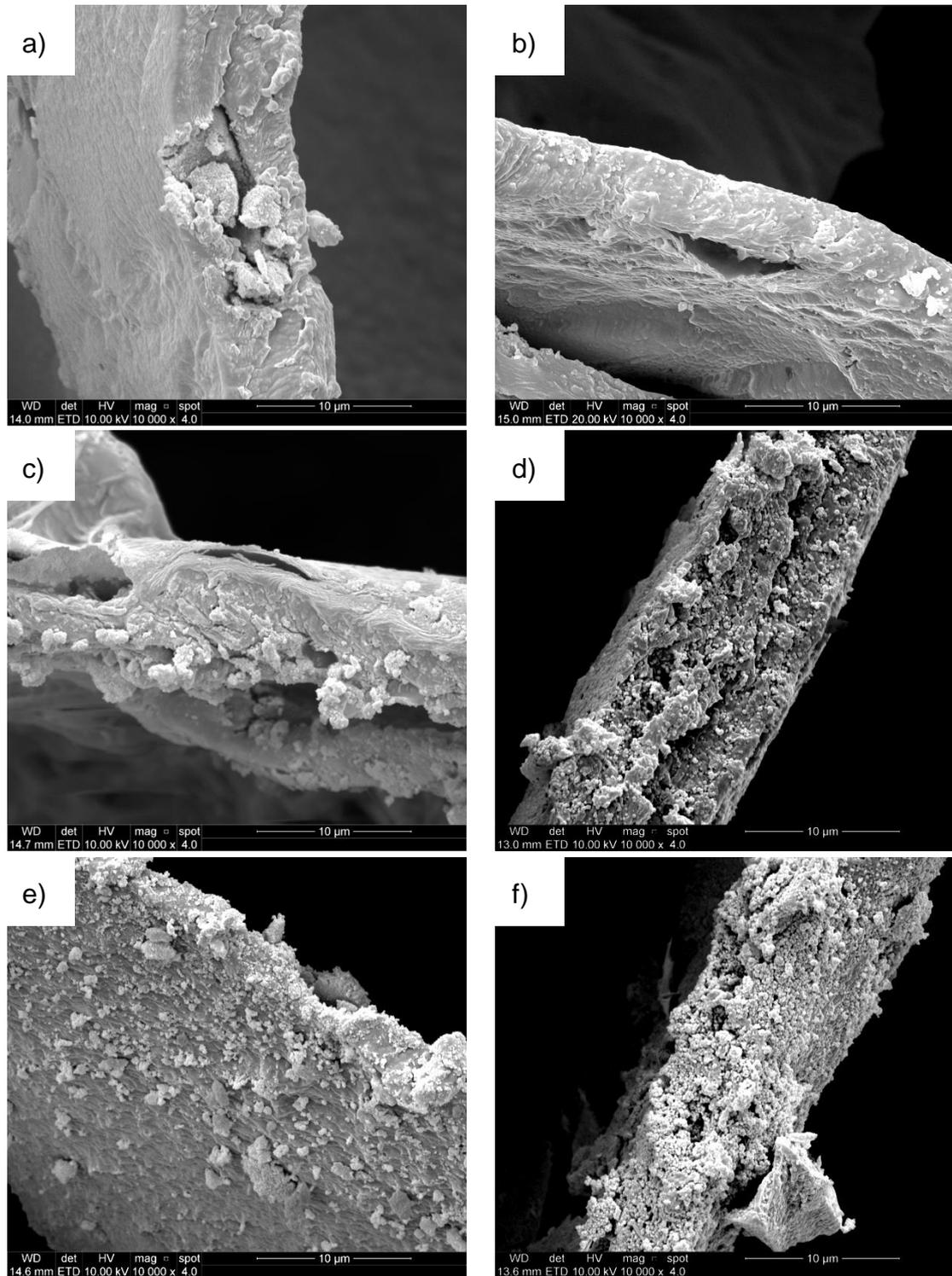


Figura 5.13. Micrografias de arcabouços liofilizados. P6 (a), P10 (b), P7 (c), P11 (d), P8 (e) e P12 (f).

As imagens (a, c, e) exibidas na Figura 5.13 mostram a presença de partículas de ANC2 no interior das paredes dos poros (a) e na sua superfície (c, e). Este efeito observado é intensificado com o aumento da concentração de ANC2 adicionada. A Figura 5.13 (a) mostra partículas de ANC2 medindo aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  no interior de uma parede de poros. Em contrapartida, na imagem (e) pode-se observar uma cobertura mais homogênea da parede dos poros por partículas de ANC2. Isso se deve à maior concentração de ANC2 nesta amostra, além da distribuição homogênea desta carga na amostra.

Comparando as imagens (a, b) exibidas pela Figura 5.13, pode-se observar uma maior quantidade de partículas de BV2 nas paredes dos poros. Isso se deve ao tamanho consideravelmente menor das partículas de BV2 em relação à ANC2. Analisando as imagens (d, f), é possível observar um aumento evidente na rugosidade nanométrica exibida pelas paredes dos poros e, conseqüentemente, um aumento na superfície de contato. A presença de cargas presentes na superfície dos poros pode ser um bom método de manipular o desempenho e diferenciação das células, sem perder as propriedades e funcionalidades dos materiais poliméricos. Segundo Tellado *et al*, superfícies de implantes em nanoescala e com química superficial favorável ao crescimento ósseo são capazes de induzir a diferenciação celular apropriada à regeneração do tecido ósseo (diferenciação em células osteogênicas) [182]. Essa superfície pode favorecer a proliferação de osteoblastos e fibroblastos, e portanto, a regeneração do tecido. Portanto, entre os resultados exibidos até o momento, os arcabouços preparados através da técnica de liofilização, contendo elevadas concentrações de cargas seriam os melhores candidatos para aplicação na engenharia de tecidos, devido à interconectividade entre os poros e elevada rugosidade superficial.

A eficácia da metodologia de liofilização para a produção de arcabouços interligados altamente porosos e o efeito da razão entre carga inorgânica e polímero na estrutura e distribuição dos poros nos implantes tridimensionais foram avaliados por  $\mu\text{CT}$ . A Figura 5.14 exhibe imagens de  $\mu\text{CT}$  de uma amostra de PLGA, preparada por liofilização.

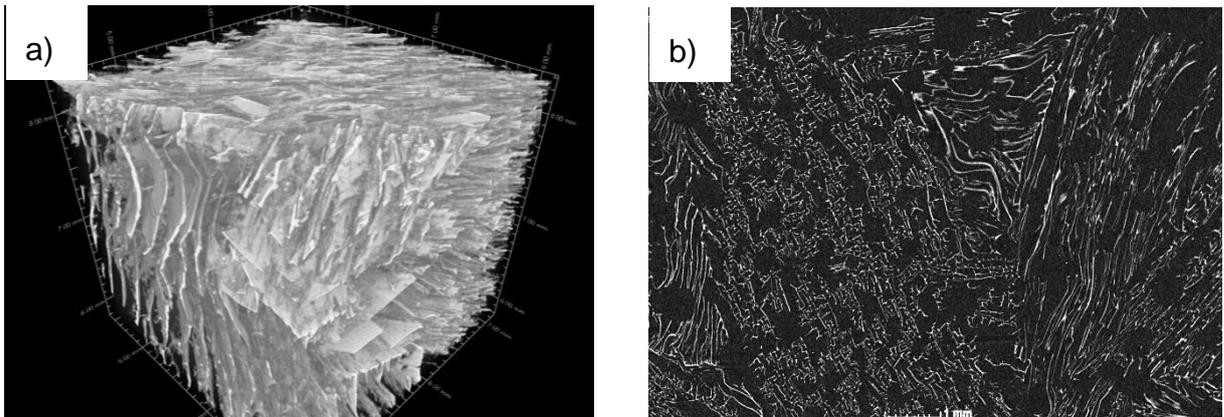


Figura 5.14. Microtomografias reconstruída em 3D (a) e corte (b) do arcabouço P1.

A Figura 5.14 exibe imagens reconstruídas em 3D e de corte de um arcabouço sem adição de cargas inorgânicas. Essa análise evidencia a homogeneidade de distribuição de poros gerados pelo processo de liofilização. Também é possível observar que este arcabouço apresenta poros que tendem, em grande parte, a seguir uma direção. Este efeito se deve ao processo lento de congelamento a temperaturas mais baixas, que permite o crescimento e organização dos cristais de solvente.

O efeito da adição de cargas na morfologia dos arcabouços desenvolvidos foi analisado por microtomografia. A figura 5.15 apresenta imagens de  $\mu$ -CT de uma amostra contendo ANC2 em proporção PLGA:ANC2 (60:40). Os pontos mais luminosos exibidos por essas imagens referem-se à presença de ANC2 homogeneamente distribuída na estrutura compósita. Esta análise mostra que mesmo com o congelamento mais lento, a dispersão de ANC2 na amostra se mantém constante, não ocorrendo deposição ou aglomeração de partículas em um determinado ponto.

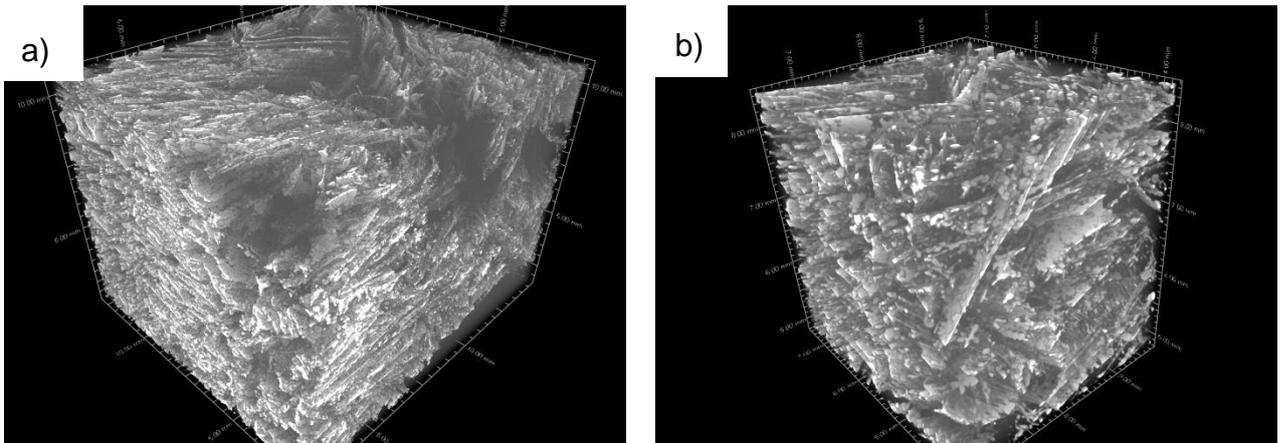


Figura 5.15. Microtomografia de um arcabouço P7 preparado pelo processo de liofilização.

A distribuição destas cargas é facilmente observada, principalmente na imagem (b) da Figura 5.15, devido à densidade da ANC2 ser superior à densidade do polímero presente no compósito. Em análises de  $\mu$ -CT, a escala de cinzas é relacionada diretamente à densidade do material, onde estruturas com elevadas densidades apresentam maior brilho. A organização da carga ANC2 observada nesta imagem corrobora com os resultados de MEV encontrados para amostras iguais.

Efeito semelhante ao descrito acima para amostras contendo ANC2 foi observado para amostras contendo BV2, como exibido pela Figura 5.16. No entanto, a estrutura dos poros da primeira é substancialmente mais uniforme. Isto pode ser explicado pela dispersão das micro e nano partículas de apatita e biovidro, respectivamente, na matriz polimérica. Em todos os arcabouços os poros maiores estão interligados por poros menores.

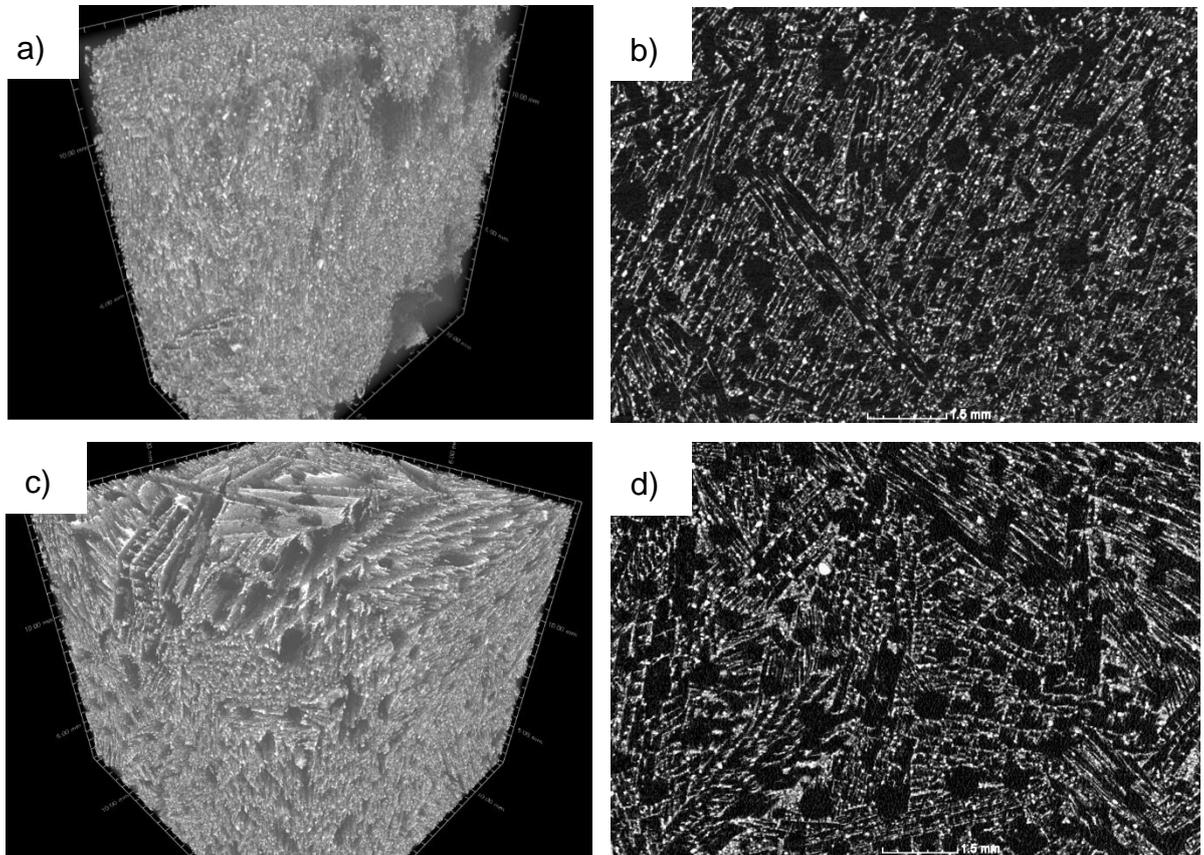


Figura 5.16. Microtomografias de arcabouço P11 (a, b) e P12 (c, d).

As imagens do arcabouço P12, exibidas pela Figura 5.16 (c, d) mostram uma maior desorganização entre os poros, exibindo lamelas e poros formados em diferentes direções. Esse efeito se deve, possivelmente, à maior quantidade de nanopartículas dispersas nos arcabouços, que geram por sua vez, uma quantidade maior de sítios para o início do congelamento da amostra. Essa característica morfológica favorece a interconexão de poros maiores por canais, poros e lamelas criados em direções contrárias.

Esta característica torna esses arcabouços adequados para aplicações na engenharia de tecidos por, possivelmente, permitir a difusão de nutrientes e fluidos essenciais para o desenvolvimento do tecido a partir de células infiltradas no arcabouço poroso, além de permitir a liberação dos produtos da degradação dos arcabouços para o meio externo.

### 5.2.2 Porosimetria

Nesta pesquisa, após diversos testes, foi escolhida a concentração de 3,5% (m/v) de PLGA em DMC, com o objetivo de encontrar equilíbrio entre a porosidade e as propriedades mecânicas dos arcabouços produzidos. A porosimetria a mercúrio foi realizada para avaliar quantitativamente a porosidade dos compósitos obtidos. A Figura 5.17 exibe grau de porosidade em relação a carga adicionada e a razão entre carga/polímero.

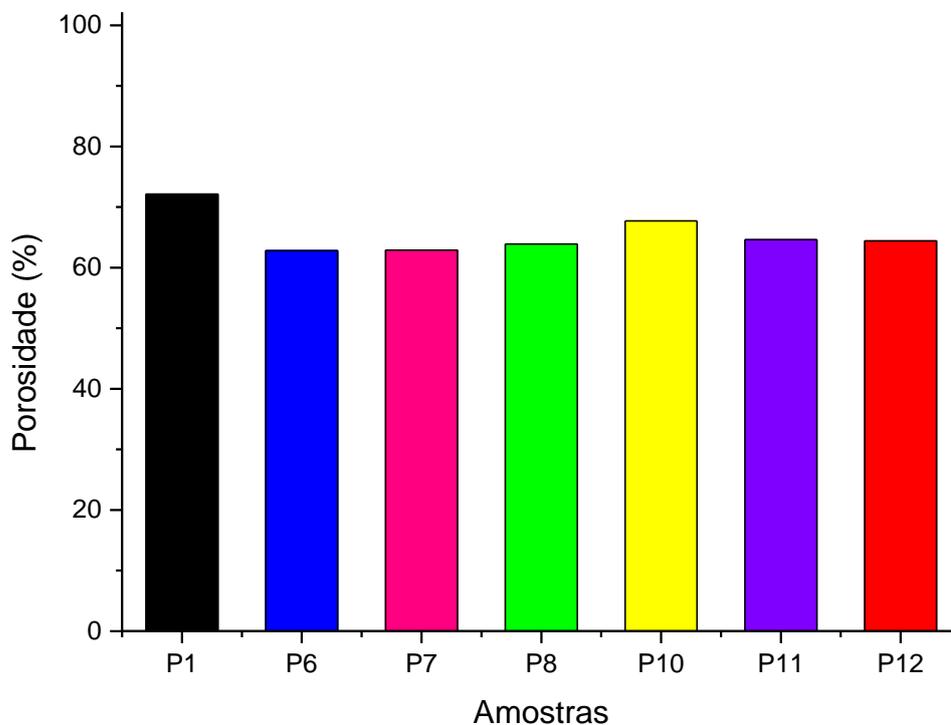


Figura 5.17. Relação entre a porosidade dos arcabouços e a carga adicionada.

Tomando como base a amostra P1 (sem adição de carga) a tendência para as amostras P1, P6, P7, P8, P10, P11, P12, é apresentar uma pequena redução na porosidade quando cargas são adicionadas. Isso se deve à redução no tamanho dos poros e aumento da densidade do arcabouço, também exibido pelas micrografias, quando há adição de ACN2 ou BV2 aos arcabouços. Contudo, não há diferença significativa na porosidade obtida para amostras contendo diferentes concentrações de cargas. Estes resultados corroboram com os resultados obtidos por  $\mu$ -CT. A

tabela 5.2 mostra a relação percentual da porosidade exibida pelas amostras contendo cargas inorgânicas em relação à amostra P1.

Tabela 5.2. Porosidade dos arcabouços preparados em relação à amostra P1.

Amostra	P6	P7	P8	P10	P11	P12
Razão Pn/P1	87,07	87,2	88,6	93,8	89,6	86,5

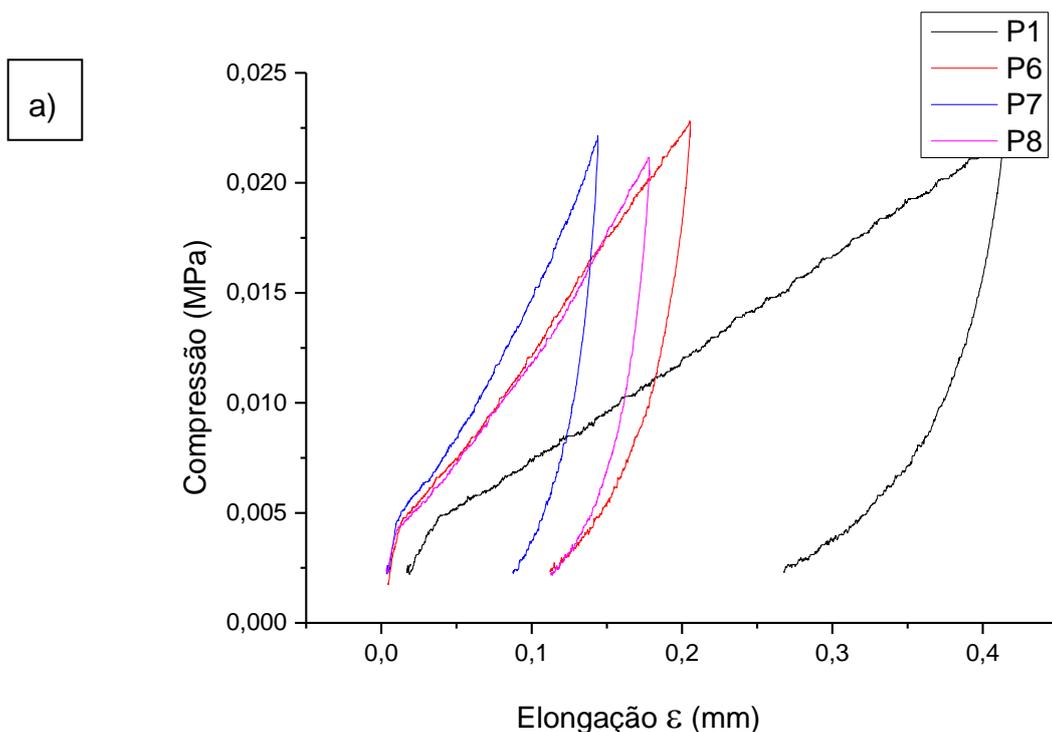
Esta tabela mostra que a adição de cargas inorgânicas ao polímero provoca uma redução pequena na porosidade dos arcabouços, porém a concentração das cargas adicionadas não é um fator fundamental. Uma das principais preocupações ao se criar um arcabouço compósito para aplicações biomédicas consiste na manutenção de porosidade elevada para permitir a regeneração do tecido afetado [90, 183, 184]. Neste trabalho foram discutidas previamente as características excelentes de morfologia conferidas pelas cargas inorgânicas aos arcabouços e após analisar a porosidade relativa das amostras pode-se estimar que a perda de porosidade devido à adição de cargas não é expressiva, portanto, não representa um problema para aplicação destes na engenharia de tecidos ósseos.

Pesquisas têm mostrado que a adição de cargas minerais a polímeros para obtenção de arcabouços compósitos porosos aumenta a biocompatibilidade e a resistência mecânica destes materiais. No entanto, concentrações elevadas destes minerais poderiam gerar uma redução na porosidade [47,185]. Além disso, a porosidade de arcabouços de polímeros sintéticos preparados por liofilização pode ser alterada também pela concentração do polímero no solvente escolhido. Apesar de elevada porosidade ser extremamente importante para a permeação de células e nutrientes, a resistência mecânica precisa ser levada em consideração para evitar o colapso prematuro do implante. Pesquisadores mostraram ainda, que pequenas diferenças na porosidade destes materiais podem gerar mudanças significativas na sua resistência mecânica [183, 184]. Dessa maneira, torna-se importante avaliar as propriedades mecânicas (comportamento mediante compressão, módulo de elasticidade) das amostras confeccionadas [49, 186, 187].

### 5.2.3 Propriedades mecânicas

A fim de avaliar o efeito de diferentes tipos e concentrações de partículas adicionadas sobre as propriedades mecânicas dos arcabouços, foram realizadas análises de compressão. Os arcabouços preparados por liofilização apresentaram uma deformação elástica, enquanto os arcabouços lixiviados exibem um comportamento plástico. Isto pode ser devido a graus diferentes de porosidade e densidade entre os dois arcabouços preparados por metodologias distintas. Além disso, as paredes que dividem os poros nos arcabouços preparados por lixiviação de sal são consideravelmente mais espessas do que as paredes observadas em arcabouços liofilizados, tornando o seu comportamento menos elástico. Estas características causam a ruptura plástica dos arcabouços preparados por lixiviação, e eventual colapso da amostra. Portanto, a partir deste ponto, o trabalho é focado exclusivamente na metodologia de liofilização, como já foi dito na seção anterior.

A Figura 5.18 mostra o comportamento de arcabouços contendo duas concentrações diferentes de ANC2 (a) e BV2 (b) em comparação à arcabouços sem adição de cargas durante o processo de compressão.



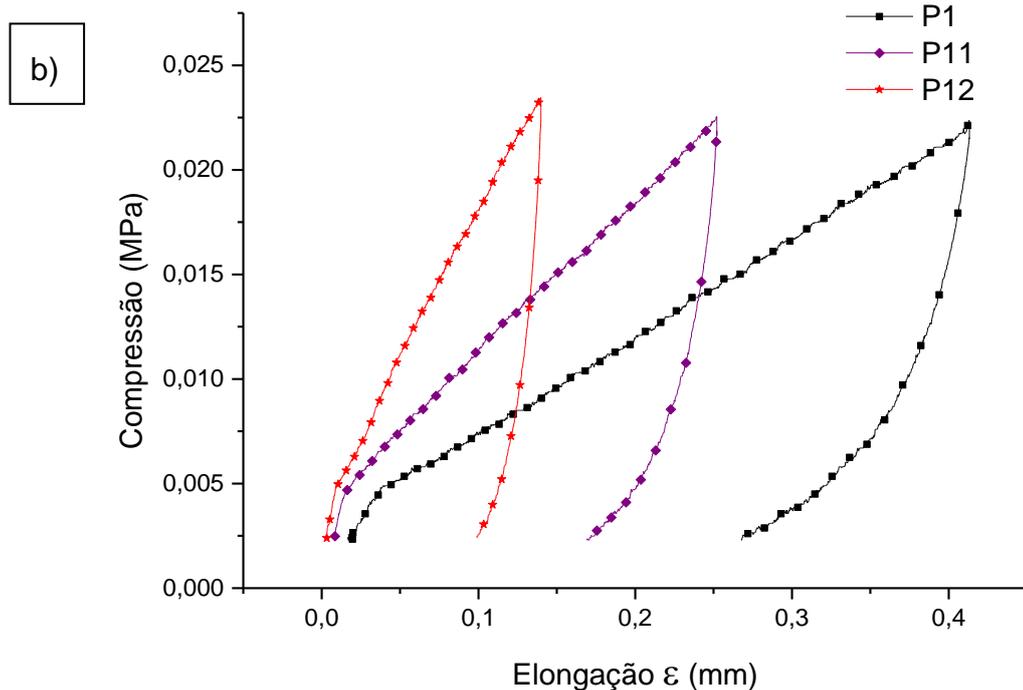


Figura 5.18. Comportamento de compressão dos arcabouços de P1, P7 e P8 (a) e P1, P11 e P12 (B) preparados pela metodologia de liofilização.

A partir da Figura 5.18 (a) mostrando o comportamento de arcabouços (P1, P7 e P8) mediante compressão, observa-se que a amostra P1 apresenta um comportamento elástico característico para amostras exclusivamente poliméricas. A recuperação desta amostra chega a aproximadamente 35% de sua elongação durante a compressão. Em contraste a essa amostra, as amostras P7 e P8 sofrem uma deformação (elongação) menor quando submetidas à mesma pressão. Esse comportamento corrobora com a premissa de que ao se adicionar cargas inorgânicas, obtêm-se estruturas mais rígidas. Contudo, o crescimento da rigidez (redução da elasticidade) não é linear com o aumento da concentração de partículas de ANC2, no caso das amostras P7 e P8. Este é um comportamento anômalo que é possivelmente explicado pelo tamanho e distribuição das partículas de ANC2. Conforme observado por MEV e DLS as partículas de apatita apresentam tamanho médio de 4  $\mu\text{m}$  e, em alguns casos, estas partículas são encontradas dentro das paredes dos poros. A inclusão de grandes quantidades destas partículas nas paredes dos poros pode gerar pontos mais frágeis, que colapsam ao sofrer compressão.

A figura 5.18 (b) mostra que quando é adicionado BV2 ao polímero, também observamos um aumento na rigidez dos arcabouços. Contudo, para estes arcabouços, é observado um aumento linear na rigidez em relação à concentração de carga, corroborando com a literatura [129-130]. A diferença de comportamento apresentada por arcabouços contendo ANC2 e BV2 pode ser explicada pelo tamanho das partículas do último, que são nanométricas, conforme observado por DLS.

A Figura 5.19 exhibe os diferentes módulos de compressão encontrados para as amostras P1, P6, P7, P8, P10, P11 e P12.

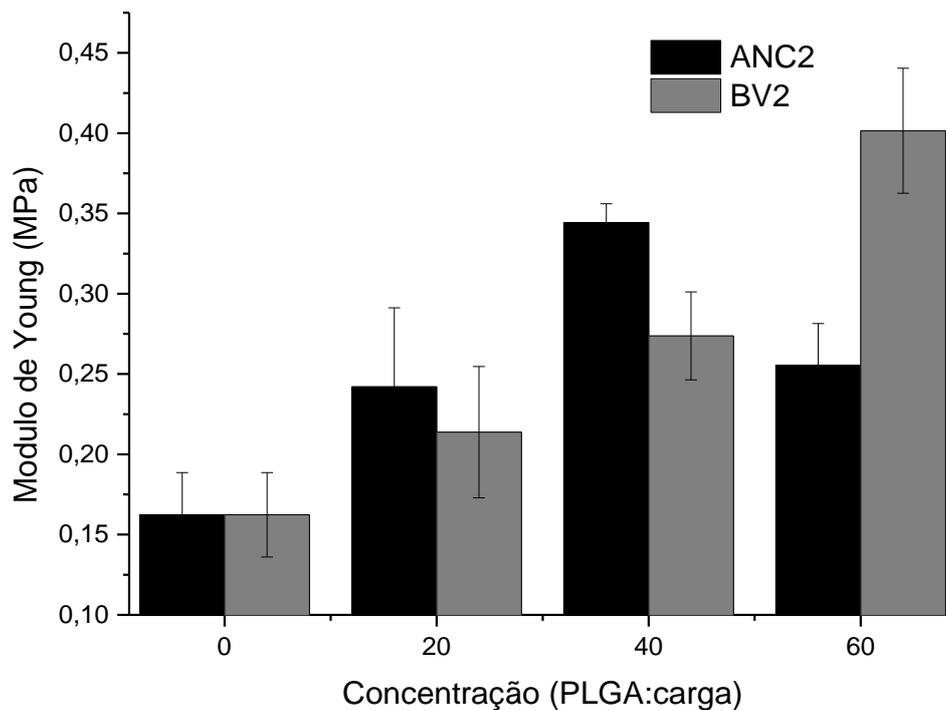


Figura 5.19. Módulo de Young em função do tipo e concentração de carga adicionada.

A caracterização mecânica mostrou um aumento do módulo de elasticidade para os arcabouços preparados por liofilização, com adição de apatita e biovidro, conforme esperado. Grande parte dos autores relaciona o aumento no módulo de Young, com a adição de cargas cerâmicas à matriz polimérica. Além disso, pode-se relacionar a elevação do módulo de elasticidade com o aumento na concentração da

carga adicionada, corroborando com os gráficos de compressão X deformação. No entanto, um ponto máximo é observado para o arcabouço liofilizado com apatita a 40% que pode ser devido à criação de pontos frágeis pela quantidade muito elevada de partículas de apatita no arcabouço P8. Este efeito não é observado para os arcabouços preparados com biovidro. Esse comportamento exibido pelas amostras com diferentes tipos de cargas mostra que não é somente a razão entre carga e polímero que afeta as propriedades mecânicas, mas também o tamanho, forma e cristalinidade da porção inorgânica do compósito [187-188].

Arcabouços compósitos contendo biovidro apresentaram módulos de elasticidade proporcionais à carga adicionada, aumentando a rigidez mecânica linearmente até a concentração de PLGA:BV2 (40:60) estudada neste trabalho, sem apresentar um ponto máximo prévio.

De um ponto de vista clínico, é esperado que o paciente aplique alguma pressão no implante, durante a regeneração óssea. Portanto, é importante que os arcabouços que tem como objetivo sustentar a adesão celular e regeneração do tecido apresentem propriedades mecânicas que garantam sua integridade durante os primeiros momentos após a implantação [90, 189]. Implantes que sofrem deformação elástica podem ser mais resistentes do que os que sofrem deformação plástica, pela sua capacidade de voltar ao seu estado original uma vez que a pressão é reduzida ou cessada por um período de tempo. A partir dos dados apresentados até o momento, é possível afirmar que a amostra com maior potencial de aplicação como enxerto é a amostra P12 (com biovidro) e a amostra P7 (com apatita).

#### **5.2.4 Estudo de degradação**

Com o objetivo de avaliar a influência do tipo e concentração de carga adicionada aos arcabouços porosos, foi realizada degradação *in vitro*. Em cada período de degradação, as amostras foram pesadas imediatamente após a remoção da solução TRIS para avaliar a quantidade de solução aquosa absorvida por cada

arcabouço poroso com diferentes concentrações e tipos de cargas inorgânicas. A Figura 5.20 mostra os resultados em percentagem de solução TRIS absorvida em relação à massa inicial do arcabouço.

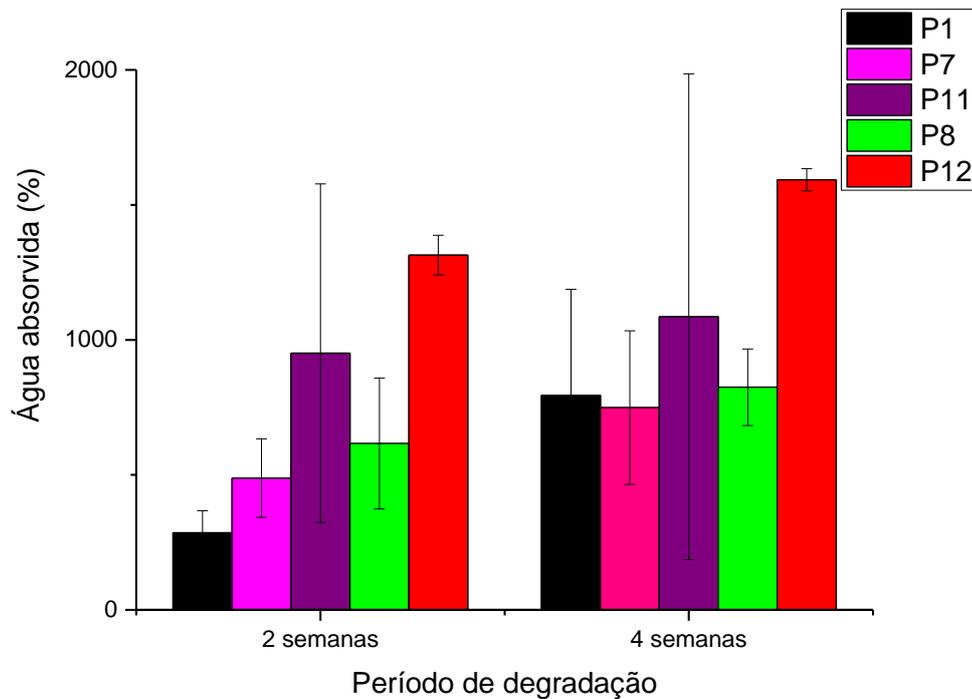


Figura 5.20. Massa percentual de solução TRIS absorvida após cada período de degradação.

Foi possível observar que as amostras contendo menor quantidade de cargas (P7 e P11), obtiveram menor quantidade de água quando comparadas às amostras P8 e P12, respectivamente. Além da concentração, a capacidade de adsorção de água dos arcabouços porosos é altamente dependente do tipo de carga inorgânica adicionada. Este efeito é mais acentuado nos arcabouços contendo biovidro provavelmente devido ao tamanho nanométrico de suas partículas. Isto pode ser atribuído à maior área de superfície coberta com apatita ou biovidro, gerando uma micro/nanoestrutura com propriedades mais hidrofílicas na superfície dos poros dos arcabouços, diretamente em contato com a solução de TRIS. A hidrofiliabilidade dos arcabouços terá uma grande influência na performance do material em meio biológico, como demonstrados por Idaszek et al [190-193].

Foi observado também, que a percentagem de solução TRIS absorvida é mais elevada depois de quatro semanas de degradação comparando com a quantidade deste meio absorvido após duas semanas de degradação para todas as composições testadas. Isto se deve, provavelmente, ao aumento da hidrofiliabilidade do polímero após o início da degradação hidrolítica.

Uma das vantagens, do ponto de vista da degradação dos arcabouços, de adicionar biovidros/fosfatos de cálcio a poliésteres é que a sua dissolução provocará a liberação de cátions, que funcionam como tampões de pH para os produtos de degradação da matriz polimérica. O tamponamento diminui a degradação do polímero por autocatálise e controla o pH no local do implante [194, 195]. Dessa maneira, é importante avaliar e quantificar a perda de massa e degradação das amostras confeccionadas, como mostra a Figura 5.21.

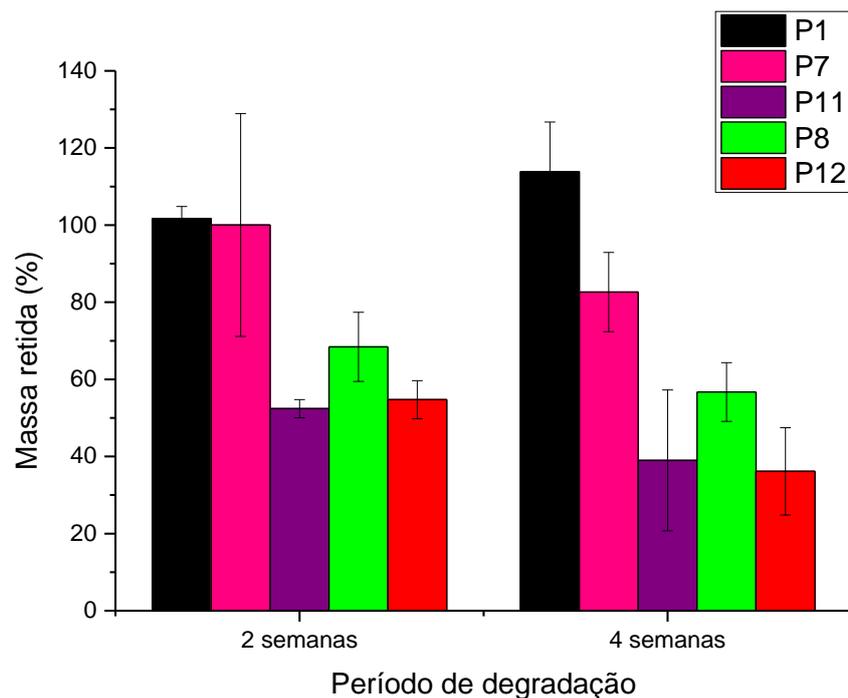


Figura 5.21. Valores médios e o desvio padrão da massa retida pelos arcabouços em cada período de degradação.

É possível observar uma perda de massa entre a segunda e a quarta semana para todos os arcabouços, com exceção do arcabouço sem carga inorgânica (P1). Para esta estrutura porosa, observa-se um ganho de massa no primeiro período de

degradação e este ganho é acentuado no segundo período de degradação. Este efeito é devido ao intumescimento que ocorre normalmente durante a degradação hidrolítica do poliéster caracterizada pela presença de alguma quantidade de água no interior dos poros que não foi removida pelo processo de secagem, sendo observado também por Navarro et al [196].

As cargas inorgânicas (BV2 e ANC2) exerceram uma influência não somente na retenção de água, mas também na velocidade de degradação dos arcabouços, quando comparadas as figuras 5.20 e 5.21. É possível observar que o principal fator influenciando a velocidade de degradação dos arcabouços é o tipo e concentração de carga, provavelmente devido ao aumento na hidrofiliidade e na superfície de contato entre amostra e meio. Os arcabouços mais hidrofílicos e que apresentam maior superfície de contato com a solução, sofrem perda de massa em velocidade proporcional à quantidade de TRIS adsorvido. Além disso, parte da perda de massa das amostras que contém cargas inorgânicas se deve a desintegração, dissolução e erosão das partículas localizadas na superfície dos arcabouços [90, 189].

Os arcabouços contendo BV2 são visivelmente mais hidrofílicos do que os arcabouços unicamente poliméricos ou contendo apatita. Esta propriedade também é proporcional à razão entre PLGA:carga, sendo que a maior quantidade de carga gera maior intumescimento e, portanto, maior perda de massa em todos os períodos de degradação, para todos os arcabouços produzidos e avaliados. A diferença entre arcabouços contendo as mesmas concentrações de ANC2 e BV2 pode ser explicada também pela distribuição e cobertura mais eficiente das paredes dos poros do polímero, devido ao tamanho reduzido das partículas do biovidro, como mostrado e discutido pelas micrografias e  $\mu$ -CT (seção 5.2.1). Portanto, a perda de massa exibida pelos arcabouços contendo cargas inorgânicas não é, necessariamente, diretamente proporcional à degradação do polímero.

O elevado intumescimento apresentado pelas amostras contendo BV2 e a perda de massa causada pela erosão de partículas pode gerar uma falsa relação de degradação entre os arcabouços estudados. Para observar esse efeito – a relação

entre a perda de massa observada e a degradação do PLGA – realizou-se análises por GPC, como mostradas na Figura 5.22.

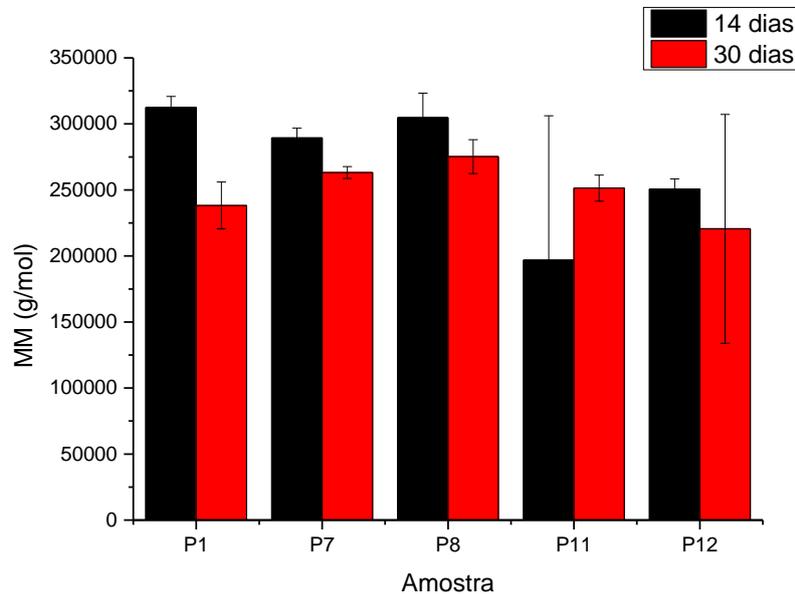


Figura 5.22. GPC dos arcabouços de PLGA, PLGA-BV2 e PLGA-ANC2 após cada período de degradação.

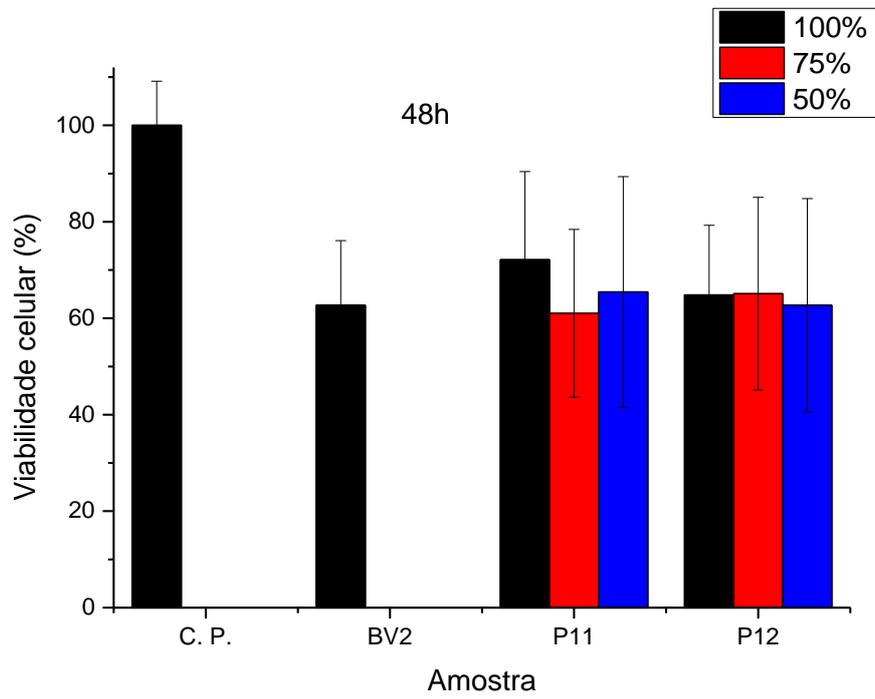
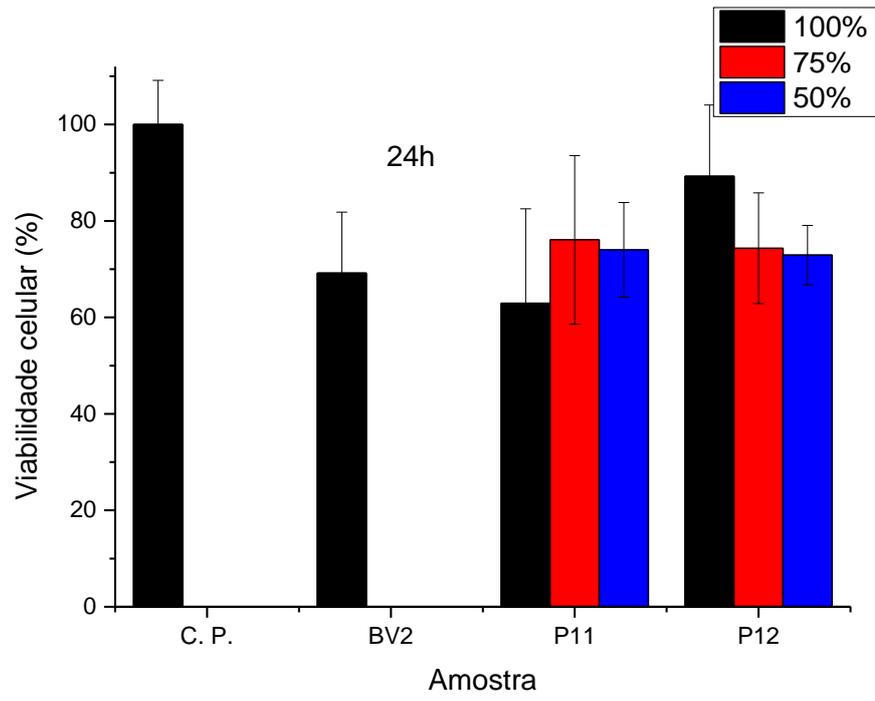
Este gráfico exibe a massa molar ponderal média encontrada para cada tipo de amostra em cada período de degradação. É possível observar que os valores encontrados sofrem uma redução considerável entre os dois períodos de degradação, e esta redução é ainda acentuada para as amostras contendo biovidro devido, provavelmente, ao elevado intumescimento apresentado por estas amostras. Contudo, a perda de massa das amostras não é diretamente proporcional à redução na massa molar observada, indicando que parte da perda de massa das amostras não está relacionada com a degradação do polímero e sim, possivelmente, com a perda de carga presa a superfície dos arcabouços.

Dessa forma, os arcabouços confeccionados apresentam alguns dos requisitos importantes para a eficiência de um material para a engenharia de tecidos e apresentam uma velocidade de degradação compatível com a regeneração do tecido ósseo, causando assim a substituição do arcabouço pelo osso regenerado. A morfologia e a química de superfície desses implantes são fatores extremamente

importantes para a interação implante-célula, como observado por Lee et al [197]. Os dados de GPC encontrados nessa pesquisa sugerem que em conjunto com a degradação do PLGA, também ocorre a erosão e degradação das cargas adicionadas, sendo que estes últimos fatores são responsáveis em grande parte pela perda de massa durante o período de degradação. Esse efeito é importante pois a degradação de biovidros e apatitas, libera íons de cálcio, fósforo e silício que estimulam a proliferação e diferenciação de osteoblastos [192, 198]. Logo, é importante relacionar a velocidade de degradação com a regeneração do tecido, sabendo-se que quanto mais rapidamente esses processos acontecem, mais rápida será a recuperação do paciente [184]. Portanto, foi estudada também a resposta celular a alguns materiais desenvolvidos nesta pesquisa.

### **5.2.5 MTT – Biocompatibilidade**

Conforme os resultados obtidos até o momento, considera-se que as amostras contendo BV2 são as mais interessantes para a aplicação na engenharia de tecidos devido à elevada área de superfície e rugosidade nas paredes dos poros, além da hidrofiliabilidade superior exibida por essas amostras. Portanto, foi avaliada a biocompatibilidade – citotoxicidade de arcabouços contendo BV2 (P11 e P12) e da nanocarga, através da viabilidade celular em três períodos de tempo (24, 48 e 72 horas). A Figura 5.23 exibe os resultados encontrados para a viabilidade celular dos materiais avaliados em percentagem, em 24, 48 e 72 horas. A carga foi testada somente com uma quantidade máxima, porém os arcabouços foram testados em três concentrações em relação ao meio.



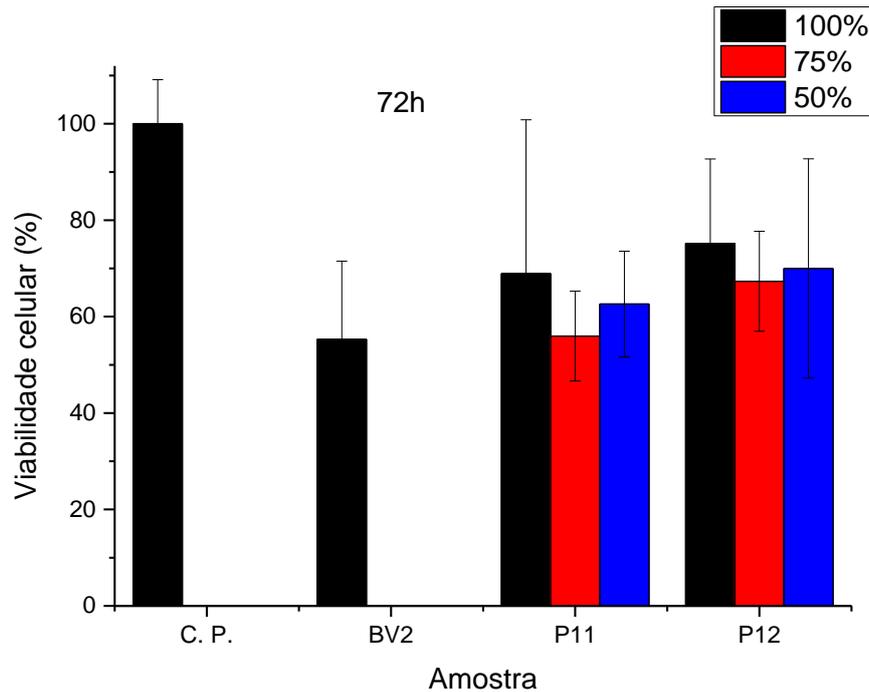


Figura 5.23. Viabilidade celular encontrada para o BV2 e dos arcabouços P11 e P12 em relação ao controle positivo, em três períodos (24h, 48h e 72h).

A absorvância do MTT para todas as amostras foi observada em 570 nm. Todas as amostras demonstraram citotoxicidade baixa, porém significativa, em relação ao controle nos três períodos de tempo avaliados. Uma certa citotoxicidade inicial leva a uma resposta inflamatória que promove a regeneração tecidual. Fatores de crescimento que estimulam a osteogênese são produzidos durante um processo inflamatório, desde que este, não seja exacerbado e não se torne crônica [199].

Não são observadas diferenças significativas na resposta celular entre os três períodos avaliados. Não foi observada diferença significativa nos resultados obtidos para os arcabouços em concentrações diferentes, o que indica que nem mesmo a mais alta concentração avaliada apresenta toxicidade celular suficientemente expressiva para impedir o seu uso.

## 6 CONCLUSÃO

Foram desenvolvidas cargas inorgânicas – biovidro através da metodologia sol-gel e apatita nanocristalina carbonatada através da metodologia de coprecipitação – com propriedades otimizadas para a aplicação associada ao PLGA, na forma de arcabouços porosos. Foi possível obter partículas menores somente alterando o processo de secagem do material após a síntese, sem causar mudanças significativas na cristalinidade e composição das cargas.

Arcabouços porosos foram produzidos com PLGA e as cargas selecionadas e somente com o polímero para controle. Através da análise morfológica dos arcabouços produzidos foi possível observar a influência do tamanho das partículas adicionadas ao polímero no tamanho e distribuição dos poros, além da rugosidade superficial observada na parede dos poros. A adição de cargas inorgânicas gerou modificações significativas nas propriedades mecânicas dos arcabouços preparados. Grande parte dos arcabouços apresentou aumento no módulo de elasticidade e redução na porosidade como tendência, proporcional à adição de cargas inorgânicas. Estes efeitos não são observados para o arcabouço contendo a concentração mais elevada de apatita, para a qual se obteve um máximo de rigidez para uma concentração intermediária.

Duas metodologias foram selecionadas para a preparação dos arcabouços porosos: agente porogênico e liofilização. Os arcabouços preparados pela metodologia de lixiviação de agente porogênico apresentaram elevada porosidade com tamanhos controlados pelo tamanho do cristal de sal (agente porogênico) porém baixa interconectividade entre os poros. Para as amostras preparadas por liofilização (congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ ), foi observada uma elevada porosidade e interconectividade entre os poros, além de organização estrutural e distribuição homogênea dos poros no arcabouço. Estas propriedades sofreram algumas alterações, como o aumento na desorganização dos poros (avaliada por

microtomografia), aumento da área superficial e rugosidade quando cargas foram adicionadas. Foram realizadas ainda análises das propriedades mecânicas (módulo de elasticidade) das amostras selecionadas, onde se observou que as amostras preparadas por lixiviação sofrem deformação plástica e ruptura quando aplicada força suficiente, e as amostras preparadas por liofilização sofrem deformação elástica. Já as amostras congeladas a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  exibiram poros menores, não sendo interessantes para aplicação na engenharia de tecidos ósseos. Por estas razões, as amostras preparadas por liofilização ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) foram selecionadas para os testes posteriores.

Arcabouços selecionados foram submetidos à degradação *in vitro* durante 28 dias. As amostras contendo cargas inorgânicas sofreram um maior intumescimento quando comparadas as amostras sem cargas ou com menor quantidade das mesmas, devido a maior hidrofiliçidade e área de superfície. A perda de massa a cada período de degradação foi proporcional ao intumescimento sofrido pela amostra. As amostras com maior quantidade de carga inorgânica são mais hidrofílicas e apresentam maior superfície de contato com a solução tampão utilizada durante o processo de degradação. Além disso, estas amostras apresentam grandes quantidades de cargas inorgânicas na superfície das paredes dos poros, o que pode gerar uma redução na massa do arcabouço não proporcional à redução na massa molar do polímero, conforme foi observado através da análise de GPC.

Ensaio de MTT foram realizados para avaliar a biocompatibilidade/citotoxicidade das cargas inorgânicas preparadas e alguns arcabouços selecionados. Todas as amostras testadas, em todas as concentrações avaliadas e em todos os períodos de tempo apresentaram citotoxicidade extremamente baixa.

Com base nos estudos feitos neste trabalho, podemos concluir que as estruturas porosas de PLGA com biovidro na proporção 40:60, preparadas por liofilização com congelamento prévio a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  apresentam excelentes propriedades para utilização como arcabouços em engenharia tecidual, devendo ser o candidato ideal para continuação deste trabalho.

## **7 PROPOSTA PARA TRABALHOS FUTUROS**

Avaliação de adesão celular aos arcabouços;

Avaliação da difusão de células no interior dos poros;

Aplicação dos arcabouços em testes *in vivo*.

## 8 REFERÊNCIAS

- [1] DOBLARE, M.; *et al.* Modelling bone tissue fracture and healing: a review. **Eng Fract Mech**, v.71, p.1809–40, 2004.
- [2] PUPPI, D.; *et al.* Polymeric materials for bone and cartilage repair. **Progress in Polymer Science**, v.35, p.403–40, 2010.
- [3] O'KEEFE, R. J.; *et al.* Bone tissue engineering and regeneration: from discovery to the clinic—an overview. **Tissue Eng Part B**, v.17, p.389–92, 2011.
- [4] LAURENCIN, C.; *et al.* Bone graft substitutes, **Exp. Rev. Med. Dev.**, V.3, p49-57, 2006.
- [5] BELTHUR, M.V.; *et al.* Bone graft harvest using a new intramedullary system, **Clin. Orthop.** V.466, p.2973–80, 2008.
- [6] KIM, D.H.; *et al.* Prospective study of iliac crest bone graft harvest site pain and morbidity, **Spine J.**, v.9, p.886–92, 2009.
- [7] SCHWARTZ, C.E.; *et al.* Prospective evaluation of chronic pain associated with posterior autologous iliac crest bone graft harvest and its effect on postoperative outcome, **Health Qual. Life Outcomes**, v.7, p.49, 2009.
- [8] ROY, A.; *et al.* Porous calcium phosphate-poly (lactic-co-glycolic) acid composite bone cement: A viable tunable drug delivery system, **Materials Science and Engineering C**, v.59, p.92–101, 2016.
- [9] VO T.N.; *et al.* Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.64, p.1292-1309, 2012
- [10] BERGEMANN, C.; *et al.* Continuous cellularization of calcium phosphate hybrid scaffolds induced by plasma polymer activation, **Materials Science and Engineering C**, v.59, p.514–523, 2016

- [11] WILLIAMS D. Benefit and risk in tissue engineering. **Mater Today** , v.7, p.24-9, 2004.
- [12] KUMAR, P.R. A.; et al. Rapid and complete cellularization of hydroxyapatite for bone tissue engineering, **Acta Biomaterialia**, v.1, p.545-552, 2005.
- [13] SHIN H.; et al. Biomimetic materials for tissue engineering. **Biomaterials**, v.24, p.4353-64, 2003.
- [14] DROTLEFF S.; et al. Biomimetic polymers in pharmaceutical and biomedical sciences. **Eur J Pharm Biopharm**, v.58, p.385-407, 2004.
- [15] KHALAJABAD, S. Z.; et al. The effect of MgO on the biodegradation, physical properties and biocompatibility of a Mg/HA/MgO nanocomposite manufactured by powder metallurgy method, **Journal of Alloys and Compounds**, v.655, p.266–280, 2016.
- [16] REZWAN K.; et al. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, **Biomaterials**, v.27, p.3413-31, 2006.
- [17] HABRAKEN, W.J.E.M.; et al. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. **Adv Drug Deliv Rev**, v.59, p.234-48, 2007.
- [18] ERSHUAI, Z.; et al. Electrospun PDLLA/PLGA composite membranes for potential application in guided tissue regeneration, **Materials Science and Engineering C**, v.58, p.278–285, 2016.
- [19] GIANNOUDIS, P. V.; et al. Bone substitutes: an update. **Injury**, v.36, p.20—7, 2005.
- [20] MATSUNO, T.; et al. Alveolar bone tissue engineering using composite scaffolds for drug delivery. **Japanese Dental Science Review**, v.46, p.188–92, 2010.
- [21] LEVENBERG S.; et al. Advances in tissue engineering current topics in developmental biology, **New York: Academic Press**, v.61, p.113-34, 2004.
- [22] GRIFFITH L.G. Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering. **Ann NY Acad Sci**, v.961, p.83-95, 2002.

- [23] KARAGEORGIU V.; *et al.* Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v.26, p.5474-91, 2005.
- [24] CARDOSO, C. L.; *et al.* Current considerations on bone substitutes in maxillary sinus lifting, **Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral**, v.9, p.102-107, 2016.
- [25] LEGEROS R. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clin Orthop Relat Res**, p.81-98, 2002.
- [26] BUCHOLZ R. Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes. **Clin Orthop Relat Res**, v.395, p.44-52, 2002.
- [27] BROWN, A.; *et al.* Porous magnesium/PLGA composite scaffolds for enhanced bone regeneration following tooth extraction, **Acta Biomaterialia**, v.11, p.543–553, 2015.
- [28] JARCHO M. Calcium-phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. **Clin Orthop Relat Res**, p.259-78, 1981.
- [29] SCHEK R.; *et al.* Combined use of designed scaffolds and adenoviral gene therapy for skeletal tissue engineering. **Biomaterials**, v.27, p.1160-6, 2006.
- [30] HING K. Bioceramic bone graft substitutes: influence of porosity and chemistry. **Int J Appl Ceram Technol**, v.2, p.184-99, 2005.
- [31] JOHNSON A.J.W.; *et al.* A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair. **Acta Biomaterialia**, v. 7,p.16-30, 2011.
- [32] BOCK, N.; *et al.* Electrospraying of polymers with therapeutic molecules: State of the art, **Progress in Polymer Science**, v.37, p.1510-1551, 2012.
- [33] KIM H.W.; *et al.* Hydroxyapatite/poly([epsilon]- caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. **Biomaterials**, v.25, p.1279-87, 2004.
- [34] BOCCACCINI A.R.; *et al.* Preparation and characterisation of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and PLGA/Bioglass(R) composite tubular foam scaffolds for tissue engineering applications. **Mater Sci Eng C**, v.25, p.23-31, 2005.

- [35] HEDBERG, E. L.; *et al.* In vitro degradation of porous poly(propylene fumarate)/ poly(DL-lactic-co-glycolic acid) composite scaffolds. **Biomaterials**, v.26, p.3215-25, 2005.
- [36] ZHANG K.; *et al.* Processing and properties of porous poly(L-lactide)/bioactive glass composites. **Biomaterials**, v.25, p.2489-2500, 2004.
- [37] NIIRANEN H.; *et al.* In vitro and in vivo behavior of self-reinforced bioabsorbable polymer and self-reinforced bioabsorbable polymer/bioactive glass composites. **J Biomed Mater Res A**, v.69A, p.699-708, 2004.
- [38] SZABO G.; *et al.* A prospective multicenter randomized clinical trial of autogenous bone versus beta-tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevation: histologic and histomorphometric evaluation. **Int J Oral Maxillofac Implants**. V.20, p.371-81, 2005.
- [39] SINGH, D.; *et al.* Synthesis of composite gelatin-hyaluronic acid-alginate porous scaffold and evaluation for in vitro stem cell growth and in vivo tissue integration, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.116, p.502–509, 2014.
- [40] OGOSE A.; *et al.* Comparison of hydroxyapatite and beta tricalcium phosphate as bone substitutes after excision of bone tumors. **J Biomed Mater Res**, v.72B, p.94-101, 2005.
- [41] SEAL B.L.; *et al.* Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Mater Sci Eng: R: Rep**, v.34, p.147-230, 2001.
- [42] THAPA, A.; *et al.* Nano-structured polymers enhance bladder smooth muscle cell function. **Biomaterials**, v.24, p.2915–26, 2003
- [43] LUO, y. *et al.* three-dimensional scaffolds. Principles of tissue engineering, **elsevier**, 3<sup>a</sup> edição, 2007
- [44] LANAO, F.; *et al.* Physicochemical Properties and Applications of Poly(lactic-co-glycolic acid) for Use in Bone Regeneration, **Tissue engineering: Part B**, V.19, 2013.
- [45] BARBANTI, S. H.; Morfologia de polímeros reabsorvíveis como arcabouço para cultura de osteoblastos. São Paulo. 2001. Dissertação de mestrado. p.94. Engenharia mecânica. Universidade estadual de campinas. Brasil.

- [46] TAN Q.; *et al.* Fabrication of Porous Scaffolds with a Controllable Microstructure and Mechanical Properties by Porogen Fusion Technique. **Int. J. Mol. Sci.** v.12, p. 890-904, 2011.
- [47] HUANG Y.X.; *et al.* Preparation and properties of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA)/nano-hydroxyapatite (NHA) scaffolds by thermally induced phase separation and rabbit MSCs culture on scaffolds. **J Biomater Appl**, v.8, p.409-32, 2008.
- [48] RUHÉ P.Q.; *et al.* Biocompatibility and degradation of poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/Calcium phosphate cement composites, **J. Biomed. Mater.Res.**, v.74A, p.533-44, 2005.
- [49] LIU C.; *et al.* Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. **Chem Eng Res Des**, v.85, p.1051-64, 2007.
- [50] ZIEGLER, J.; *et al.* Adsorption and release properties of growth factors from biodegradable implants, **J. Biomed. Mater. Res.**, v.59 p.422–8, 2002.
- [51] WEINER, S.; *et al.* The material bone: structure-mechanical function relations. **Ann Rev Mater Sci**, v.28, p.271–98, 1998.
- [52] LUCCHINETTI, E.; Composite models of bone properties. **Bone mechanics handbook**, 2<sup>a</sup> ed. Boca Raton, 2001.
- [53] GINEBRA, M. P.; *et al.* Structure and mechanical properties of cortical bone. Structural biological materials. **Pergamon Press**, 2000.
- [54] LEE, W. Y.; *et al.* miRNA-29b improves bone healing in mouse fracture model, *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.430, p.97–107, 2016.
- [55] 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.
- [56] MARTIN, R. B.; *et al.* Skeletal tissue mechanics. Nova York. **Springer-Verlag**, 1998.
- [57] LI, K. C.; *et al.* Healing of osteoporotic bone defects by baculovirus-engineered bone marrow-derived MSCs expressing MicroRNA sponges, **Biomaterials**, v.74, p.155-166, 2016.

- [58] YANG, K. H.; *et al.* The relationship between loading conditions and fracture patterns of the proximal femur. **J Biomech Engng**, v.118, p.575–8, 1996.
- [59] BRASH, J. L.; Biomaterials in Canada: The first four decades. **Biomaterials**, v.26, p.7209–20, 2005
- [60] BUDDY, D. R.; Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. **Elsevier**, 2004
- [61] CESCHIN, J. R.; O implante na reabilitação bucal. **Pamed Editorial**, p.21-56, 1984.
- [62] BOHNER, M. Design of ceramic-based cements and putties for bone graft substitution, **European cells and materials**, v.20, p.1-12, 2010.
- [63] MOTTA, A. C.; *et al.* Síntese, caracterização e degradação "in vitro" do poli( L-ácido láctico-co-ácido glicólico). **Revista Matéria**, v.11, p.340–50, 2006.
- [64] JAIN, A. R.; The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glicolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v.21, p.2475-90, 2000.
- [65] VACANTI, J. P.; *et al.* Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. **The lancet**, v.354, p. S32-S34, 2004.
- [66] KNESER, U.; *et al.* Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeons' point of view. **J. Cell. Mol. Med**, v.10, p.7-19, 2006.
- [67] SHARIF, E.; *et al.* Preparation of a biomimetic composite scaffold from gelatin/collagen and bioactive glass fibers for bone tissue engineering, **Materials Science and Engineering C**, v.59, p.533–541, 2016.
- [68] LIEBERMAN, J. R.; *et al.* The role of growth factors in the repair of bone. **Bone Joint. Surg. Am.** v.84, p.1032-1044, 2002.
- [69] ARRINGTON, E. D.; *et al.* Complications of iliac crest bone graft harvesting. **Clin Orthop Related Res**, v.329, p.329:300—9, 1996.
- [70] KHOJASTEH, A.; *et al.* Development of PLGA-coated  $\beta$ -TCP scaffolds containing VEGF for bone tissue engineering, **Materials Science and Engineering: C**, v.69, p.780-788, 2016.

- [71] SCHULHOFER, S. D.; *et al.* Iliac crest donor site morbidity in foot and ankle surgery. **J Foot Ankle Surg**, v.36, p.155—8, 1997.
- [72] KOHN, D. H.; Bioceramics. **Biomedical engineering and design handbook**, v.1, Nova York, 2009.
- [73] HARTMAN, E. H.; *et al.* Ectopic bone formation in rats: the importance of the carrier. **Biomaterials**, v.26,p.1829—35, 2005.
- [74] LIU, Y.; *et al.* Review: Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering. **Biotechnol Adv**, v.31, p.688-705, 2013.
- [75] STACHEWICZ, U.; *et al.* 3D imaging of cell interactions with electrospun PLGA nanofiber membranes for bone regeneration, **Acta Biomaterialia**, v.27, p.88–100, 2015
- [76] LEONG, K. F.; *et al.* Solid freeform fabrication of three dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. **Biomaterials**, v.24, p.2363–78, 2003.
- [77] SCHWARTZ, I.; *et al.* Calvarial bone repair with porous D,L-poly lactide. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v.112, p.707–13, 1995.
- [78] BOYAN, B. D.; *et al.* Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. **Biomaterials**, v.17, p.137–46, 1996.
- [79] SALGADO, A. J.; *et al.* Bone tissue engineering: state of the art and future trends. **Macromol Biosci**, v.4, p.743–65, 2004.
- [80] LIM, H. C.; *et al.* High tibial osteotomy using polycaprolactone-tricalcium phosphate polymer wedge in a micro pig model. **J Bone Joint Surg**, v.93, p.5, 2011
- [81] ASANO, K. Synthesis of HCP, FCC and BCC structure alloys in the Mg–Ti binary system by means of ball milling. **J Alloys Compd**, v.480, p.558–63, 2009.
- [82] DANOUX, C, B.; *et al.* In vitro and in vivo bioactivity assessment of a polylactic acid/hydroxyapatite composite for bone regeneration, **Biomatter**, v.4, 2014.
- [83] HUTMACHER, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials**, v.21, p.2529-43, 2000.

- [84] SHIKINAMI, Y.; *et al.* Bioresorbable devices made of forged composites of hydroxyapatite (HA) particles and poly-L-lactide (PLLA): part I. Basic characteristics. **Biomaterials**, v.20. p.859-77, 1998.
- [85] GESTER, L. *et al.*; A biodegradable intraosseous appliance in the treatment of mandibular fractures. **Oral Surg**, v.30, p.344-8, 1972.
- [86] BERGSMA, E. J.; *et al.* Foreign body reactions to resorbable poly(L-lactide) bone plates and screws used for the fixation of unstable zygomatic fractures. **J. Oral Maxillofac Surg**, v.51, p.666-70, 1993.
- [87] GINSAC, N. Caractérisation de matériaux composite polyacide lactique-bioverre pour application dans la réparation osseuse, INSA de Lyon, 2011 ;
- [88] PELTONIEMI, H. *et al.* The use of bioabsorbable osteofixation devices in craniomaxillofacial surgery. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics**, v.94, p.5-14, 2002.
- [88] EGLIN, D.; *et al.* Degradation of synthetic polymeric scaffolds for bone and cartilage tissue repairs, **Soft Matter**, v.5, p.938–947, 2009.
- [90] WUA, S.; *et al.* Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering, **Materials Science and Engineering**, v.80, p.1–36, 2014.
- [91] MCDERMOTT, A. M.; *et al.* Influence of structural load-bearing scaffolds on mechanical load- and BMP-2-mediated bone regeneration, **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v.62, p.169-181, 2016.
- [92] TADIC, D. *et al.* Continuous synthesis of amorphous carbonated apatites. **Biomaterials**, v.23, p.2553–2559, 2002
- [93] CHEN, X.; *et al.* The synthesis of hydroxyapatite with different crystallinities by controlling the concentration of recombinant CEMP1 for biological application, **Materials Science and Engineering C**, v.59, p.384–389, 2016
- [94] SUGIURAN, Y. *et al.* Fabrication of carbonate apatite foam based on the setting reaction of  $\alpha$ -tricalcium phosphate foam granules, **Ceramics International**, v.42, p.204–210. 2016.
- [95] KUTTAPPAN, S.; *et al.* Biomimetic composite scaffolds containing bioceramics and collagen/gelatin for bone tissue engineering - A mini review, **International Journal of Biological Macromolecules**, 2016.

- [96] HENCH, L.L. et al. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. **J Biomed Mater Res Symp**, v.2 p.117–141, 1971.
- [97] ISLAM, S.; et al. Effects of sintering temperature on the compressive mechanical properties of collagen/ hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, **Materials Letters**, v.173, p.231-234, 2016.
- [98] KOKUBO T, et al. Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials**, v.24, p.2161-2175, 2003.
- [99] BALAMURUGAN, A. et al. Synthesis and characterisation of sol gel derived bioactive glass for biomedical applications. **Materials Letters**, v.60, p.3752–3757, 2006.
- [100] CHANDRASEKARAN, A.; et al. Physico-chemical and biological studies on three-dimensional porous silk/spray-dried mesoporous bioactive glass scaffolds, **Ceramics International**, v.42, p.13761-13772, 2016.
- [101] XYNOS, I.D.; et al. Bioglass<sup>®</sup> 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation in vitro: implications and applications for bone tissue engineering. **Calcif Tissue Int**, v.67, p.321–329, 2000.
- [102] KAUR, G.; et al. A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication, and apatite formation, in Wiley Online Library, 2013.
- [103] SIQUEIRA, R. L.; et al. Gel-derived SiO<sub>2</sub>–CaO–Na<sub>2</sub>O–P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bioactive powders: synthesis and in vitro bioactivity, **Mater Sci Eng C**, v.31, p.983–91, 2011.
- [104] JONES, J. R.; et al. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids, **Acta Biomaterialia**, v.23, p.S53–S82, 2015.
- [105] LOW, I. M.; et al., ceramic matrix composites – Microstructure, properties and applications. **Woodhead publishing limited**, Cambridge 2006
- [106] MISHRA, R.; et al. Osteocompatibility and osteoinductive potential of supermacroporous polyvinyl alcohol-TEOS-Agarose-CaCl<sub>2</sub> (PTAgC) biocomposite cryogels, **J Mater Sci: Mater Med**, v.25, p.1327–1337, 2014.

- [107] TAKAHASHI, Y.; *et al.* Enhanced osteoinduction by controlled release of bone morphogenic protein-2 from biodegradable sponge composed of gelatin and  $\beta$ -tricalcium phosphate, **Biomaterials**, v.26, p.4856-65, 2005.
- [108] BEST, S.M.; *et al.* Bioceramics: Past, present and for the future. **Journal of the European Ceramic Society**, v.28, p. 1319-27, 2008.
- [109] BONFIELD W.; *et al.* Hydroxyapatite reinforced polyethylene: a mechanically compatible implant. **Biomaterials**, v.45, p.185-6, 1981.
- [110] NIEMELÄ T, *et al.* Self-reinforced composites of bioabsorbable polymer and bioactive glass with different bioactive glass contents. Part I: Initial mechanical properties and bioactivity. **Acta Biomaterialia**, v.1, p.235-242, 2005.
- [111] SURMENEV, R. A.; *et al.* Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis – A review, **Acta Biomaterialia**, v.10, p.557–579, 2014.
- [112] BONFIELD, W.; *et al.* Interfaces in analogue biomaterials. **Acta Mater.**, v.46, p.2509-18, 1998.
- [113] KIM H.W.; *et al.* Hydroxyapatite and gelatin composite foams processed via novel freeze-drying and crosslinking for use as temporary hard tissue scaffolds, **J. Biomed. Mater. Res.**, v.72A, p.136-45, 2004.
- [114] SHIBATA, Y. *et al.* Colloidal  $\beta$ -tricalcium phosphate prepared by discharge in a modified body fluid facilitates synthesis of collagen composites, **J.Dent.Res.**, v.84, p827-31, 2005.
- [115] LIN, F.H. *et al.* Biological effects and cytotoxicity of the composite composed by tricalcium phosphate and glutaraldehyde-cross-linked gelatin, **Biomaterials**, v.19, p.905–17, 1998.
- [116] JR.C.G.S.; *et al.* Preliminary report on the biocompatibility of a moldable, resorbable, composite bone graft consisting of calcium phosphate cement and poly(lactide-co-glycolide) microspheres, **J. Orthop. Res.**, v.20, p.473-82, 2002.
- [117] MAQUET, V. *et al.* Porous poly( $\alpha$ -hydroxyacid)/Bioglass composite scaffolds for bone tissue engineering. I: Preparation and in vitro characterization. **Biomaterials**, v.25, p.4185–4194, 2004

- [118] BLAKER, J.J. et al. Mechanically anisotropic PDLLA/Bioglass composite foams as scaffolds for bone tissue engineering. **Acta Biomater**, v.1, p.643–652, 2005.
- [119] JAAKKOLA, T. et al. In vitro Ca-P precipitation on biodegradable thermoplastic composite of poly([epsilon]-caprolactone-co-lactide) and bioactive glass (S53P4). **Biomaterials**, v.25, p.575–581, 2004.
- [120] LI, H.Y. et al. pH-compensation effect of bioactive inorganic fillers on the degradation of PLGA. **Compos Sci Technol**, v.65, p.2226–2232, 2005.
- [121] MAQUET, V. et al. Preparation, characterization, and in vitro degradation of bioresorbable and bioactive composites based on Bioglass<sup>®</sup>-filled polylactide foams. **J Biomed Mater Res A**, v.66A, p.335–346, 2003.
- [122] SHIKINAMI, Y. et al. Bioresorbable devices made of forged composites of hydroxyapatite (HA) particles and poly -lactide (PLLA). Part II: practical properties of miniscrews and miniplates. **Biomaterials**, v.22, p.3197–3211, 2001.
- [123] CAVO, M.; et al. Scaffold microstructure effects on functional and mechanical performance: Integration of theoretical and experimental approaches for bone tissue engineering applications, **Materials Science And Engineering: C**, v.68, p.872-879, 2016.
- [124] RUHE P.Q.; et al. rhBMP-2 release from injectable poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement composites, **J. Bone Jt. Surg. Am.** V.85A, p.75-81, 2003.
- [125] HABRAKEN W.J.E.M.; et al. Injectable PLGA microsphere/calcium phosphate cements: physical properties and degradation characteristics, **J. Biomater. Sci., Polym.** v.17, p.1057-74, 2006.
- [126] WATERING F.C.V.; et al. Calcium phosphate/poly(D,L-lactic-coglycolic acid) composite bone substitute materials: evaluation of temporal degradation and bone ingrowth in a rat critical-sized cranial defect. **Clin Oral Implants Res.**, v.23, p.151-9, 2012.
- [127] SHIKINAMI, Y.; et al. The complete process of bioresorption and bone replacement using devices made of forged composites of raw hydroxyapatite particles/poly L-lactide (F-u-HA/PLLA). **Biomaterials**, v.26, p.5542–51, 2005.
- [128] JEONG S.I.; et al. Nanofibrous poly(lactic acid)/ hydroxyapatite composite scaffolds for guided tissue regeneration. **Macromol Biosci**, v.8, p.328-38, 2008.

- [129] NAVARRO, M.; *et al.* Development and cell response of a new biodegradable composite scaffold for guided bone regeneration. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v.15, p.419–22, 2004.
- [130] YAO J.; *et al.* Solution-mediated effect of bioactive glass in poly(lactic co glycolic)-bioactive glass composites on osteogenesis of marrow stromal cells, **J. Biomed. Mater. Res.**, v.75A, p.794-801, 2005.
- [131] KOKUBO T.; *et al.* How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v.27, p.2907-15, 2006.
- [132] RAJENDRAN, V. *et al.* Microstructural dependence on relevant physical-mechanical properties on SiO<sub>2</sub>-Na<sub>2</sub>O-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> biological glasses. **Biomaterials**, v.23, p. 4263-4275, 2002.
- [133] EQTESADI, S.; *et al.* Improving mechanical properties of 13–93 bioactive glass robocast scaffold by poly (lactic acid) and poly ( $\epsilon$ -caprolactone) melt infiltration, **Journal of Non-Crystalline Solids**, v.432, p.111-119, 2016.
- [134] ZOU H.; *et al.* Fabrication aspects of **PLA-CaP/PLGA-CaP composites for orthopedic applications: A review**. **Acta Biomaterialia**, v.8, p.1999-2016, 2012.
- [135] DENG X.; *et al.* Poly(l-lactic acid)/hydroxyapatite hybrid nanofibrous scaffolds prepared by electrospinning. **J Biomater Sci Polym**, v.18, p.117-30, 2007.
- [136] SAMAVEDI, S.; Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior, **Acta Biomaterialia**, v.9, p.118-119, 2013
- [137] AUNOBLE, S. *et al.* Biological performance of a new  $\beta$ -TCP/PLLA composite material for applications in spine surgery: In vitro and in vivo studies. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v.78, p.416-422, 2006
- [138] FURUKAWA, T. *et al.* Histomorphometric study on high-strength hydroxyapatite/poly(L-lactide) composite rods for internal fixation of bone fractures. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.50, p.410-419, 2000

- [139] HASEGAWA, S. A 5–7 year in vivo study of high-strength hydroxyapatite/poly(L-lactide) composite rods for the internal fixation of bonefractures, **Biomaterials**, v.27, p.1327-1332, 2006.
- [140] RICH, J. et al. In vitro evaluation of poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-DL-lactide)/bioactive glass composites. **Biomaterials**, v. 23, p.2143-2150, 2002
- [141] FRANCIS, A.; et al. Fabrication and cytotoxicity assessment of novel polysiloxane/bioactive glass films for biomedical applications, **Ceramics International**, v.42, p.15442-15448, 2016.
- [142] ZEIMARAN, E.; et al. Bioactive glass reinforced elastomer composites for skeletal regeneration: A review, **Materials Science and Engineering: C**, v.53, p.175-188, 2015.
- [143] COATHUP, M. J.; The effect of particle size on the osteointegration of injectable silicate-substituted calcium phosphate bone substitute materials in Wiley Online Library 2013.
- [144] BLAKER, J. J. et al. Premature degradation of poly( $\alpha$ -hydroxyesters) during thermal processing of Bioglass®-containing composites. **ActaBiomaterialia**, v.6, p.756-762, 2009
- [145] VERHEYEN C. C.. Evaluation of hydroxylapatite/poly(L-lactide) composites: Mechanical behavior. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 26, p.1277-1296, 1992
- [146] TODO, M. et al. Relationship between microstructure and fracture behavior of bioabsorbable HA/PLLA composites. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v.37, p.2221-2225. 2006
- [147] ROWE, M. D.; et al. Hydrolytic degradation of bio-based polyesters: Effect of pH and time, **Polymer Testing**, v.52, p.192-199, 2016.
- [148] SHEIKH, Z.;et al. In vitro degradation and in vivo resorption of dicalcium phosphate cement based grafts, **Acta Biomaterialia**, v.26, p.338-346, 2015.

- [149] BRUNDLE, C.R.; *et al.* Encyclopedia of Materials Characterization. **Stoneham: Butterworth-Heinemann**, 1992
- [150] HUANG W.; *et al.* PHBV microspheres – PLGA matrix composite scaffold for bone tissue engineering. **Biomaterials**, V. 31, p.4278-85, 2010.
- [151] MOREIRA, J. C.; *et al.* Determinação das Constantes K e  $\alpha$  da Equação de Mark-Houwink de Poli(p-acetóxiestireno). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 14, nº 2, p. 80-2, 2004
- [152] MOU Z.L.; *et al.* Preparation of porous PLGA/HA/collagen scaffolds with supercritical CO<sub>2</sub> and application in osteoblast cell culture. **The Journal of supercritical Fluids**, V. 58, p.398-406, 2011.
- [153] OH, S. H.; *et al.* Peripheral nerve regeneration within an asymmetrically porous PLGA/Pluronic F127 nerve guide conduit. **Biomaterials**, v.29, p.1601-9, 2008
- [154] Raman Spectroscopy basics. **Disponível em** [http://content.piaction.com/Uploads/Princeton/Documents/Library/UpdatedLibrary/Raman\\_Spectroscopy\\_Basics.pdf](http://content.piaction.com/Uploads/Princeton/Documents/Library/UpdatedLibrary/Raman_Spectroscopy_Basics.pdf). Acesso em 10 de julho de 2013.
- [155] Porosimetria por Injeção de Mercúrio. **Disponível em** [http://www.lmpt.ufsc.br/pesquisa\\_micro\\_porosimetria.php](http://www.lmpt.ufsc.br/pesquisa_micro_porosimetria.php). Acesso em 10 de julho de 2013.
- [156] Physical characterization of materials using mercury intrusion porosimetry by micromeritics. **Disponível em** <http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=2641>. Acesso em 10 de julho de 2013.
- [157] KIM S.S.; *et al.* Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v.27, p.1399-409, 2006.
- [158] LANDISA, E. N.; *et al.* X-ray microtomography. **Materials characterization**, v.61, p.1305–16, 2010.
- [159] LASCHKE M.W.; *et al.* In vitro and in vivo evaluation of a novel nanosize hydroxyapatite particles/poly(ester-urethane) composite scaffold for bone tissue engineering. **Acta Biomater.**, v.6, p.2020-7, 2010.
- [160] EUSTATHOPOULOS, N.; *et al.* Wettability at High Temperatures. **Elsevier Science**, 1999.

- [161] YANOVSKA, A.; et al. Synthesis and characterization of hydroxyapatite-gelatine composite materials for orthopaedic application, **Materials Chemistry and Physics**, 2016.
- [162] 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.
- [163] SARTOR, M. Dynamic light scattering to determine the radius of small beads in Brownian motion in a solution. University of California, San Diego, 2013
- [164] CEGLIA, G. Elaboration et caractérisation de matériaux polymères poreux modèles à base d'émulsions contrôlées. Tese, França, 2011
- [165] AKCELRUD, L.; Fundamentos da ciência dos polímeros. São Paulo, ed. Manole, 2007.
- [166] SHEN, Q.; et al. A simplified approach for evaluation of the polarity parameters for polymer using the K coefficient of the Mark–Houwink–Sakurada equation, **Journal of Colloid and Interface Science**, v.275, p.30-34, 2004.
- [167] QUERIDO, W.; et al. Does Crystallinity of Extracted Bone Mineral Increase over Storage Time?, **Materials Research**, v.16, p.970-974, 2013.
- [168] MCELDERRY, J. D. P.; et al. Crystallinity and compositional changes in carbonated apatites: Evidence from <sup>31</sup>P solid-state NMR, Raman, and AFM analysis, **Journal of Solid State Chemistry**, v.206, p.192-198 2013.
- [169] FLOROIAN, L.; et al. Nanostructured bioglass thin films synthesized by pulsed laser deposition: CSLM, FTIR investigations and in vitro biotests, **Applied Surface Science**, v.255, p.3056–3062, 2008.
- [170] CHEN, S.; et al. Fabrication of nanofibrous tubular scaffolds for bone tissue engineering, **Materials Letters**, v.182, p.289-293, 2016.
- [171] KOUTSOPOULOS, S., Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods, Wiley Periodicals, Inc 2002.

- [172] MATOS, A. C.; et al. Novel doped calcium phosphate-PMMA bone cement composites as levofloxacin delivery systems, **International Journal of Pharmaceutics**, v.490, p.200-208, 2015.
- [173] KIM, Y. K.; et al. Healing Mechanism and Clinical Application of Autogenous Tooth Bone Graft Material, **Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications**, p.405-436 ISBN 978-953-51-1051-4, 2013
- [174] KŁOSOWSKI, M. M.; et al. Probing carbonate in bone forming minerals on the nanometre scale, **ACTA BIOMATERIALIA**, v.20, p.129-139, 2015.
- [175] REY, C.; et al. Physical chemistry of biological apatites, **Biomaterialization and Biomaterials**, p.95-127, 2016.
- [176] CAZALBOU, S. et al. Minéralisations biologiques à base de phosphate de calcium. **C. R. Palevol**, v.3, p.563–572, 2004
- [177] LE BOLAY, N. et al. Production, by co-grinding in a media mill, of porous biodegradable polylactic acid–apatite composite materials for bone tissue engineering. **Powder Technol.** V.190, p.89–94, 2009
- [178] ONISHI, H.; et al. Quantitative comparison of bone growth behavior in granules of Bioglass, AW glass-ceramic, and hydroxyapatite, **J Biomed Mater Res**, v.51, p.37–46, 2000.
- [179] NGA, N. K.; et al. Biomimetic scaffolds based on hydroxyapatite nanorod/poly(d,l) lactic acid with their corresponding apatite-forming capability and biocompatibility for bone-tissue engineering, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.128, p.506-514, 2015.
- [180] GEIDOBLE, R. Controlled ice nucleation in the field of freeze-drying: Fundamentals and technology – review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.85 p.214–222, 2013.
- [181] WATT, F. M.; et al. Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate, **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**, v.14,p.467–473, 2013.
- [182] TELLADO, S. F.; et al. Strategies to engineer tendon/ligament-to-bone interface: Biomaterials, cells and growth factors, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.94, p.126–140, 2015.

- [183] IKEDA, R.; et al. The effect of porosity and mechanical property of a synthetic polymer scaffold on repair of osteochondral defects, **Int. Orthop**, v.33, p.821–828, 2009.
- [184] GÓMEZ, S.; et al. Design and properties of 3D scaffolds for bone tissue engineering, **Acta Biomaterialia**, 2016.
- [185] USWATTA, S. P.; et al. Injectable porous nano-hydroxyapatite/chitosan/tripolyphosphate scaffolds with improved compressive strength for bone regeneration, **Materials Science and Engineering: C**, v.69, p.505-512, 2016.
- [186] SAMAMI, H.; et al. Computer modeling of the degradation behavior of polyester-based tissue engineering scaffolds, **Characterisation and Design of Tissue Scaffolds**, p.45-74, 2016.
- [187] XYNOS, I. D.; et al. Bioactive glasses: Importance of structure and properties in bone regeneration, *Journal of Molecular Structure*, v.1073, p.24–30, 2014.
- [188] LIN, Y.; et al. Long-term bone regeneration, mineralization and angiogenesis in rat calvarial defects implanted with strong porous bioactive glass (13–93) scaffolds, **Journal of Non-Crystalline Solids**, v.432, p.120-129, 2016.
- [189] CAVO, M.; et al. Scaffold microstructure effects on functional and mechanical performance: Integration of theoretical and experimental approaches for bone tissue engineering applications, **Materials Science and Engineering: C**, v.68, p.872-879, 2016.
- [190] MEHDIZADEH, H.; et al. Three-dimensional modeling of angiogenesis in porous biomaterial scaffolds, **Biomaterials**, v.34, p.2875-87, 2013.
- [191] WU, F.; et al. Fabrication and properties of porous scaffold of zein/PCL biocomposite for bone tissue engineering, **Compos Part B Eng**, v.43, p.2192-7, 2012.
- [192] CAO, L.; et al. Development of degradable and bioactive composite as bone implants by incorporation of mesoporous bioglass into poly(L-lactide), **Composites Part B: Engineering**, v.77, p.454–461, 2015.

- [193] IDASZEK, J.; et al. How important are scaffolds and their surface properties in regenerative medicine, **Applied Surface Science**, 2016.
- [194] MISRA, S. K.; et al. Effect of nanoparticulate bioactive glass particles on bioactivity and cytocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate) composites, **J R Soc Interf**, v.7, p.453–65, 2010.
- [195] FANTNER, G. E.; et al. Hierarchical interconnections in the nano-composite material bone: fibrillar cross-links resist fracture on several length scales, **Compos Sci Technol**, v.66, p.1205–11, 2006.
- [196] NAVARRO, M. et al. In vitro degradation behavior of a novel bioresorbable composite material based on PLA and a soluble CaP glass. **Acta Biomaterialia**, v.1, p.411-419, 2005.
- [197] LEE, W. H.; et al. A review of chemical surface modification of bioceramics: effects on protein adsorption and cellular response, **Colloids Surf B**, v.122 p.823-34, 2014.
- [198] SHAH M. M.; et al. Osteoblastic differentiation under controlled bioactive ion release by silica and titania doped sodium-free calcium phosphate-based glass, **Colloids Surf B**, v.121, p.82-91, 2014.
- [199] SANDBERG, E.; et al. Bone Regeneration by the Osteopromotion Technique Using Bioabsorbable Membranes: An Experimental Study in Rats, **J Oral Maxillofac Surg**, v.51, p.1106-1114, 1993.

## 8 ANEXOS

## Anexo 1. Relatório referente ao estagio sanduíche.



Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux

### Short report on the visit of Mariane GIACOMINI SCHARDOSIM (PhD student at PUCRS-LMN, Porto Alegre, Brazil) at CIRIMAT-INPT, Toulouse, France (15/10/2013-14/10/2014)

Mariane GIACOMINI SCHARDOSIM, PhD student at PUCRS (Porto Alegre, Brazil) worked in CIRIMAT laboratory (<http://www.cirimat.cnrs.fr/presentation-67/>, Toulouse, France) during one year under the supervision of Jérémy SOULIE and Christèle COMBES.

The objective of the study performed by Mariane GIACOMINI SCHARDOSIM was to produce three-dimensional porous composite scaffolds of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)-bioactive mineral particles (bioglass or carbonated nanocrystalline apatite) by two methods: 1- Salt leaching technique using a porogenic agent with different particle sizes and proportions (methodology initiated at PUCRS-LMN, Brazil); 2- freeze-drying (methodology initiated at INPT-CIRIMAT, France). For both techniques various mineral filler/polymer ratios were used in order to evaluate the influence of each type of bioactive filler (bioglass and apatite) in scaffolds porosity, compressive strength and degradation time. The synthesized bioglass or apatite powders and composite scaffolds were characterized by FTIR spectroscopy, scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), granulometry and X-ray tomography. In addition, the mechanical properties (compressive strength, elastic stiffness), the porosity (using mercury intrusion porosimetry), and the *in vitro* degradation in buffered solution at pH 7.4 and 37°C of the composite scaffolds were characterized. The results showed different degrees of crystallinity for the apatites as well as different granulometries. SEM analyses showed scaffolds with interconnected porosity in a size range between 200 and 400 micrometers with a different organization pattern depending on the methodology. We were able to demonstrate also that the pores size and the scaffolds surface roughness depend partly on the apatite/polymer ratio. This study showed that by selecting the type of bioactive filler and processing parameters we can prepare biodegradable and bioactive porous composite scaffolds with adapted properties for bone tissue engineering.

To progress in her PhD work Mariane GIACOMINI SCHARDOSIM collaborated with two research teams of CIRIMAT: the Phosphates, Pharmaceutics, Biomaterials (PPB) team for the main part of her research work and the Mechanics, Oxidation, Microstructure (MEMO) team for the evaluation of the mechanical properties of the macroporous materials she prepared.

Mariane GIACOMINI SCHARDOSIM is currently writing an exhaustive report on the work she performed at CIRIMAT during the year 2013-2014 and we plan to prepare a paper presenting the main results of her study and to submit it to an international journal before June 2015.

In addition, part of the results Mariane GIACOMINI SCHARDOSIM obtained in CIRIMAT have been already disseminated in the form of an oral and a poster communication in a French national and an international congress respectively (see the details of these communications below). For both of them CAPES has been acknowledged for the one year doctoral fellowship.

CIRIMAT has taken in charge the transportation, accommodation and registration fees for the participation of Mariane GIACOMINI SCHARDOSIM to the MSE 2014 congress in Germany where she presented her poster.

Disseminations of the results in national and international congresses:

- *Preparation and properties of porous PLGA-bioactive particles composite scaffolds for bone tissue Engineering*. M. Schardosim, J. Soulié, G. Soares, D. Poquillon, C. Rey, R. Hubler, C. Combes  
**Poster presentation** at Materials Science and Engineering (MSE) congress, 23-25 September 2014, Darmstadt (Germany).

- *Scaffolds composites macroporeux pour la régénération osseuse*. M. Giacomini Schardosim, D. Poquillon, S. Cazalbou, B. Duployer, C. Tenailleau, C. Rey, R. Hubler, J. Soulié, C. Combes  
**Oral presentation** at Matériaux 2014 Congress, 24-28 Nov. 2014, Montpellier (France).

Finally, the collaboration initiated between LMN-PUCRS and CIRIMAT-INPT thanks to this one-year doctoral CAPES fellowship for Mariane GIACOMINI SCHARDOSIM and the promising preliminary results she obtained enable us to submit in may 2014 a bilateral project on the same research topic to the CAPES-COFECUB 2015 call in a view to strengthen this new franco-brazilian collaboration. We are currently expecting the list of the projects selected by the French-brazilian committee.

Toulouse, the 10th of december 2014



Christèle COMBES - Professor  
Institut National Polytechnique de Toulouse  
christele .combes@ensiacet.fr