

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
MINAS, METALÚRGICA E DE MATERIAIS

MS.c. LETÍCIA ARAÚJO VASCONCELLOS

OBTENÇÃO DE COMPÓSITOS DE CIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO
COM FIBRAS DE PLGA E ALGINATO DE SÓDIO

Tese para obtenção do título de Doutor em Engenharia

Porto Alegre

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Escola de Engenharia

**Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de
Materiais**

LETÍCIA ARAÚJO VASCONCELLOS

Mestre em Engenharia de Materiais

**OBTENÇÃO DE COMPÓSITOS DE CIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO
COM FIBRAS DE PLGA E ALGINATO DE SÓDIO**

Trabalho realizado no Departamento de Materiais da Escola de Engenharia da UFRGS, dentro do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais - PPGEM, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia.

Área de Concentração: Ciência dos Materiais.

Porto Alegre 2012

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do título de Doutor em Engenharia, área de concentração em Ciência dos Materiais e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e pela Banca Examinadora do Curso de Pós-Graduação.

Orientador: Prof. Dr. Luis Alberto dos Santos (PPGE3M/UFRGS)

Co-orientador: Carlos Pérez Bergmann (PPGE3M/UFRGS)

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Annelise Kopp Alves (PPGE3M/UFRGS)

Profa. Dra. Eliana Cristina da Silva Rigo (USP)

Prof. Dr. Tiago Moreno Volkmer (UNIFRA)

Prof. Dr. Telmo Roberto Strohaecker

Coordenador do PPGEM

Porto Alegre

2012

DEDICATÓRIA

Para meus amados pais:

Neusa Mello Araújo e

Higino Bittencourt Vasconcellos (“*in memoriam*”)

AGRADECIMENTOS

Presto a minha homenagem as pessoas que estiveram comigo durante esta trajetória de quatro anos:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luís Alberto dos Santos, pela orientação e compreensão. Obrigada professor.

Ao Prof Dr. Carlos Pérez Bergmann, pela co-orientação no trabalho e ao Laboratório de Materiais Cerâmicas (LACER/UFRGS) onde foram feitas a parte das caracterizações desta Tese.

Ao Prof Dr. Telmo Roberto Strohaecker pela indicação de ser orientada pelo Prof. Dr. Luís Alberto dos Santos.

Aos professores Vânia Caldas de Souza, Ruth Marlene Campomanes Santana, Annelise Kopp Alves e Altair Sória Pereira. A todos meus colegas do LABIOMAT (Laboratório de Biomateriais) que me ajudaram e auxiliaram diversas vezes neste trabalho.

A meus pais, Higino (*in memoriam*) e a minha mãe, que dedico esta Tese, por todo apoio e amor incondicional.

À minha família e amigos (Ismael Fernandes, Suzana Fernandes e Lucas Fernandes) pela compreensão e carinho. Um agradecimento especial a Dra. Débora Vigevani Schaf por sua dedicação comigo durante todo este período.

A Universidade federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalurgia e Materiais (PPGE3M), a Escola de Engenharia da UFRGS e ao Departamento de Materiais (DEMAT/UFRGS), pela formação de excelência.

E, finalmente, ao CNPq pelo apoio financeiro durante o meu doutorado que sem este auxílio não seria possível realizar este trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTAS DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	13
NOMENCLATURA	14
1. INTRODUÇÃO	15
1.2. Objetivo do Trabalho.....	19
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1. Biomateriais	20
2.2. Cimentos à Base de Fosfato de Cálcio	23
2.3 Polímeros Absorvíveis.....	25
2.3.2 Fibras de poli (ácido láctico).....	28
2.3.3 Alginato de Sódio	29
2.4 <i>Scaffolds</i>	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.2. Obtenção do pó de cimento de fosfato de cálcio (α -fosfato tricálcico)...	43
3.3. Obtenção das fibras de Alginato de Sódio e PLGA por TIPS	44
3.4. Obtenção das fibras de Alginato de Sódio e PLGA por gotejamento.....	44
3.5. Obtenção de Cimento de Fosfato de Cálcio com fibras de Alginato de Sódio e de PLGA.....	45
3.7. Preparações dos <i>Scaffolds</i> de cimento com fibras	46
3.7. Caracterização dos Materiais Obtidos	48
3.8. Estudo <i>In Vitro</i> do Cimento	53
3.9. Avaliação do Potencial de Citotoxicidade <i>In Vitro</i> – Método difusão Ágar	53
3.10. Avaliação <i>In Vivo</i> dos <i>scaffolds</i> de Alginato de Sódio Puro	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	57
4.1. Caracterização do cimento de fosfato de cálcio (α -TCP).....	57
4.2. Distribuição de tamanhos de partículas	59
4.3. Grupamentos Químicos	60

4.4.	Determinação do tempo de pega: Método de Impedância	61
4.5.	Avaliação em SBF do cimento de α -TCP	62
4.6.	Obtenção das Fibras de Alginato de Sódio e PLGA por TIPS	67
4.6.2.	Grupamentos químicos: Espectroscopia de Infravermelho do Alginato de Sódio e PLGA.....	70
4.7.	Obtenção das Fibras de Alginato de Sódio e PLGA por Gotejamento	74
4.8.	Obtenção de Cimento de Fosfato de Cálcio com Fibras	83
4.9.	Avaliação da Citotoxicidade.....	102
4.10.	Análise <i>in vivo</i> com células-tronco dos Scaffolds de Alginato de Sódio 104	
5.	CONCLUSÕES	106
6.	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	109
6.	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	109

RESUMO

A utilização de biomateriais a base de fosfato de cálcio tem revolucionado a medicina no reparo de partes danificadas do sistema ósseo. Dentre estes, os cimentos a base de fosfatos de cálcio de pega hidráulica tem despertado grande interesse em função de sua biocompatibilidade e endurecimento *“in situ”*, o que permite uma maior facilidade de manipulação e adaptação à forma e dimensões do defeito ósseo. Entretanto, estes cimentos possuem baixa resistência mecânica quando comparados com os ossos do corpo humano. Neste presente trabalho foi estudado a obtenção de pós de cimento de fosfato de cálcio e adicionados a fibras de poli(ácido co-glicólico) (PLGA) e Alginato de Sódio, visando o aumento das propriedades mecânicas destes cimentos. Foi utilizado um novo método de obtenção de fibras por gotejamento em reagente, tanto para o PLGA e o Alginato de Sódio, sendo depois congeladas essas fibras e liofilizadas. Ambos os métodos de obtenção de fibras por gotejamento foram Patenteados, além de publicações em revistas e congressos internacionais. Com este mecanismo foi possível obter-se fibras por método inovador e reforçar a matriz, o que favoreceu o aumento das propriedades mecânicas, permitindo, assim, a obtenção de materiais mais resistentes. Os materiais obtidos foram utilizados na construção de *scaffolds* para crescimento tecidual, possibilitando manter uma maior integridade mecânica.

ABSTRACT

The use of biomaterials based on the calcium phosphate has revolutionized the medicine to repair damaged parts of the skeletal system. Among these, the cements based calcium phosphates handle hydraulic has been much interest due to its biocompatibility and hardening "in situ", allowing greater ease of handling and adjustment to the shape and dimensions of the bone defect. However, these cements have lower mechanical strength when compared with the bones of the human body. In the present work to obtain powders of cement of calcium phosphate and added to fibers of poly (co-glycolic acid) (PLGA) and sodium alginate, in order to increase the mechanical properties of these cements. We used a novel method for obtaining fibers in drip reagent for both PLGA and sodium alginate; the fibers are then frozen and lyophilized. Both methods of obtaining fibers were patented drip, as well as publications in international journals and conferences. With this mechanism it was possible to obtain novel method for fibers and strengthen the matrix, thus favoring increased mechanical properties, thus allowing obtaining more resistant materials. The materials were used in the construction of scaffolds for tissue growth, allowing greater maintain mechanical integrity.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química de uma cadeia polimérica de Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico).....	27
Figura 2: Estrutura do ácido β -D-manurônico (a), α -L-gulurônico (b) e Alginato (c) (ERTESVÁG & VALLA, 1998).....	31
Figura 3: Fluxograma com o resumo da Primeira e Segunda etapa realizado no trabalho.....	40
Figura 4: Fluxograma com o resumo da terceira e quarta etapa realizada no trabalho.....	41
Figura 5: Esquema da montagem do circuito elétrico para medidas de impedância do tempo de pega do cimento de fosfato de cálcio (α -TCP).....	49
Figura 6: Microscópio eletrônico de varredura (MEV) utilizado para as observações das amostras.....	52
Figura 7: Difratoograma de Raios X (DRX) do α -TCP obtido com temperatura de 1300°C, durante 5 horas e resfriamento brusco. Moagem a seco dos reagentes durante 2 horas.....	58
Figura 8: Gráfico do tamanho de partícula do α -TCP utilizado no trabalho.....	59
Figura 9: Espectro de Infravermelho do α -TCP utilizado nas amostras.....	61
Figura 10: Gráfico de Impedância (tempo x condutividade iônica) apresentando os valores de Tensão (kV) e corrente (mA) durante 60 min.....	62
Figura 11: Valores de P. A. das amostras com α -fosfato tricálcico durante 14 dias.....	63
Figura 12: (A) Densidade Aparente (D.A.) das amostras puras de α -TCP. (B) Valores de absorção de água das amostras de α -TCP puras.....	65
Figura 13: As amostras de Alginato de Sódio com concentrações de 0,4; 0,6 e 0,8%.....	68
Figura 14: Espectro de Infravermelho das amostras de Alginato liofilizadas em diferentes concentrações.....	70

Figura 15: Espectro de Infravermelho das amostras de Poli (ácido láctico-co-glicólico) PLGA pura e os espectros dos PLGA gotejados em Metanol por até cinco vezes.....	72
Figura 16: Amostras de PLGA gotejadas até cinco vezes em álcool isopropílico (A) e metanol (B) e álcool etílico (C) com uma concentração de 1%.....	75
Figura 17: Amostras de PLGA gotejadas até 5 vezes em álcool isopropílico (A) e metanol (B) e álcool etílico (C) com uma concentração de 1%.....	77
Figura 18: Fibras de Alginato de Sódio gotejadas cinco vezes em álcool etílico (A), metanol (B) isopropílico e em (C) metanol com concentração de 1%.....	79
Figura 19: apresenta as amostras de Alginato de Sódio que foram dissolvidas e gotejadas até cinco vezes em álcool etílico (A), isopropílico (B) e em metanol (C) com concentração de 1%.....	81
Figura 20: Resistência à compressão das composições do cimento de fosfato de cálcio com fibras de PLGA e fibras de Alginato de Sódio.....	83
Figura 21: Ensaio de flexão em quatro pontos (Módulo de Ruptura [MPa]) das amostras de α -TCP puras e os compósitos com PLGA e Alginato de Sódio de 1%, 2%, 3% e 4% na sua composição.....	86
Figura 22: Valores calculados de K_{IC} para as amostras puras, com fibras de PLGA e fibras de Alginato de Sódio.....	88
Figura 23: Valores de tenacidade à fratura plástica para as amostras com 0% de fibras, com fibras de PLGA e fibras de Alginato de Sódio.....	89
Figura 24: Porosidade aparente das amostras com fibras de PLGA (A) e Alginato de Sódio (B).....	91
Figura 25: Densidade aparente das amostras com fibras de PLGA (A), Alginato de Sódio (B).....	93
Figura 26: Absorção de água das amostras com fibras de PLGA (A), Alginato de Sódio (B).	95
Figura 27: <i>Scaffold</i> de cimento de α -TCP com fibras de Alginato de Sódio.....	97
Figura 28: Superfície do <i>scaffold</i> de cimento de α -TCP com fibras de Alginato de Sódio.....	97

Figura 29: MEV do <i>scaffold</i> com 3% de fibras PLGA.....	98
Figura 30: MEV do <i>scaffold</i> com 3% de fibras PLGA.....	99
Figura 31: <i>Scaffold</i> com 3% de fibras PLGA.....	100
Figura 32: Morfologia das culturas de células-tronco mesenquimais dos camundongos. (A) Aumento 200X no microscópio optico. (B) Aumento 400X no microscópio optico.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Interações biomateriais com tecidos humanos.....	21
Tabela 2: Comparação da resistência mecânica de alguns ossos do corpo humano e a resistência de cimento de fosfato de cálcio.....	25
Tabela 3: Principais propriedades químicas (XG e XM) e físicas (μ , M_n , d_p) do Alginato.....	32
Tabela 4: Parâmetros estruturas do <i>scaffolds</i> para aplicação.....	37
Tabela 5: Descrição e classificação do índice de zona (IZ).....	55
Tabela 6: Ensaio de citotoxicidade das amostras com 3% de fibras de PLGA na matriz de cimento de α -TCP.....	102
Tabela 7: Ensaio de citotoxicidade das amostras com 2% de fibras de Alginato de Sódio na matriz de cimento de α -TCP.....	103

NOMENCLATURA

D.A. - densidade aparente [g/cm^3]

J_{IC} - tenacidade à fratura para propagação plástica de trincas [J/m^2]

K_{IC} - tenacidade à fratura para propagação frágil de trincas [$\text{Pa}\cdot\text{m}^{1/2}$]

P.A. - porosidade aparente [%]

t_f - tempo de pega final [min]

t_i - tempo de pega inicial [min]

V_m , V_f - frações volumétricas da matriz e fibra

α , β - TCP - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; alfa, beta fosfato tricálcico

$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$; - pirofosfato de cálcio.

AS - Alginato de Sódio

AC - Alginato de Cálcio

CC – CaCO_3 ; carbonato de cálcio

CFC - cimento de fosfato de cálcio

DCPA - CaHPO_4 ; hidrogenofosfato de cálcio anidro; fosfato dicálcico anidro; monetita

DCPD: $\text{CaHPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; hidrogenofosfato de cálcio didratado; fosfato di-cálcico didratado; brushita

IR - espectroscopia no infravermelho

IC - índice de citotoxicidade

PLA – Poli (ácido láctico)

PLLA – Poli (ácido L- láctico)

PLGA – Poli (ácido láctico – co – glicólico)

IL - índice de lise; porcentagem de células degeneradas

IR – razão entre IZ/IL.

SBF - fluido corporal simulado; *simulated body fluid*

MEV - microscopia eletrônica de varredura

TCP - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; fosfato tricálcico

1. INTRODUÇÃO

Os avanços científicos obtidos pelo homem no século XX permitiram obter grande domínio sobre processos físico-químicos, tanto teóricos como experimentais, que impulsionaram os avanços tecnológicos que hoje fazem parte do nosso cotidiano. Na virada do novo milênio, duas grandes áreas se destacam como promessas de um mundo novo e melhor: a biotecnologia e as nanociências. Nestas duas áreas, bilhões de dólares são investidos anualmente tanto pelos órgãos governamentais de fomento à pesquisa como por empresas privadas pelos seus setores de P,D&I, fazendo com que os avanços sejam dados a passos largos.

A pesquisa de novos materiais sempre ocupou posição de destaque no meio científico e, neste novo milênio, materiais com propriedades especiais voltados para aplicações médicas e biológicas, têm tido grande destaque por unificarem os esforços de pesquisadores das áreas de nano e biotecnologia.

Os biomateriais podem ser definidos como substâncias de origem natural ou sintética que são toleradas de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos. Eles são utilizados como um todo ou parte de um sistema que trata, restaura ou substitui algum tecido, órgão ou função do corpo (MIRTCHI *et al.*, 1989), ou ainda como um material não biológico utilizado em um dispositivo médico, com intenção de interagir com sistemas biológicos (WILLIANS, 1987).

Dentre os materiais biológicos, encontram-se os autoenxertos, que utilizam tecido ósseo do próprio indivíduo e os aloenxertos que consistem em utilizar uma porção de tecido ósseo de outro indivíduo para a reconstituição da parte danificada. Destes materiais, os auto-enxertos são os mais utilizados devido à ausência de resposta imunológica. Entretanto, sua aplicação está limitada a cada caso em particular, ao estado do paciente e à localização e tamanho do defeito ósseo. Além disso, o uso desse tipo de implante apresenta numerosas desvantagens: complicações pós-operatórias, aumento do tempo de operação, dificuldade de uma conformação exata ao defeito e, em alguns

casos, a indisponibilidade da quantidade de osso necessária para restaurar a cavidade defeituosa (CONSTANTINO *et al.*, 1991; MUTING *et al.*, 1993).

Os principais avanços no campo dos biomateriais têm ocorrido devido ao aumento da expectativa de vida da população e de acidentes em meios de transporte. Os cimentos a base de fosfatos de cálcio tem sido utilizados como enxerto ósseo com grande sucesso nesta última década. O termo “cimento de fosfato de cálcio” foi introduzido por Gruninger *et. al.*, (MIRTCHI *et al.*, 1990). Um cimento desse tipo pode ser preparado misturando-se um sal de fosfato de cálcio com uma solução aquosa para que se forme uma pasta que possa reagir em temperatura ambiente ou corporal dando lugar a um precipitado que contenha um ou mais fosfato de cálcio e ocorrendo a pega pelo intercruzamento dos cristais deste precipitado.

É importante ressaltar que, apesar de tudo, muitos implantes apresentam problemas de estabilidade na superfície devido a interações com os tecidos humanos e os fluídos fisiológicos que entram em contato. Um aspecto importante sobre as possibilidades de aplicação dos biomateriais é a necessidade de que todos os componentes, como os produtos que possam ser gerados em processos biodegradativos devem ser biocompatíveis (MONTEIRO *et. al.*, 2004).

A incorporação de fibras em matrizes frágeis de cimento serve para aumentar a tenacidade à fratura do compósito pelo processo de freagem da trinca e conseqüente aumento nas resistências de tração e flexão do compósito (KELLY, 1970).

As principais características que um biomaterial deve possuir para ser considerado biocompatível são as seguintes (CANO *et. al.*, 2004):

- Não produzir resposta ao sistema imunológico;
- Não ser tóxico;
- Não ser carcinogênico;
- Não ser incompatível medicamente;
- Não ser incompatível hemodinamicamente.

Dentre os materiais desenvolvidos e pesquisados nos últimos anos, que possuem essas e outras características importantes para utilização como biomateriais, estão as biocerâmicas de fosfato de cálcio. Os fosfatos de cálcio são de especial interesse em medicina devido, principalmente, à sua ocorrência em calcificações normais (dentina, esmalte, osso) e patológicas (cálculos).

A parte mineral do dente, dentina e osso humano foi identificada como um fosfato de cálcio com estrutura de apatita por volta de 1926 utilizando difração de Raios X (LE GEROS, 1991). Porém, uma de suas limitações, é devida à sua baixa resistência mecânica, sendo, portanto, um material direcionado para aplicações que não exijam grandes esforços mecânicos, como substituto de ossos da face e crânio, com exceção da mandíbula.

Uma fibra embutida numa matriz qualquer contribui para aumentar a capacidade de suportar esforços do corpo. A carga é transferida da matriz para a fibra, por deformação de cisalhamento na interface matriz-fibra. A transferência de carga tem sua origem, geralmente, como um resultado das diferenças de propriedades físicas da fibra e matriz; por exemplo, diferença de módulo de elasticidade entre fibra e matriz.

Diferentes mecanismos podem operar durante a fratura do compósito dependendo das diferenças em propriedades mecânicas e geométricas entre a matriz e a fibra. Em compósitos de cimento, as fibras são normalmente descontínuas; isto é, elas estão dispersas na matriz, e não atravessam inteiramente o corpo.

As fibras de reforço em cimentos tipicamente são confeccionadas em polímeros, como polipropileno, náilon e fibras de carbono. No caso do uso de fibras poliméricas para implantação, estas deverão ser constituídas por polímeros biocompatíveis, em virtude da reabsorção parcial ou total do cimento de fosfato de cálcio (RAVAGLIOLI, *et. al.*, 1992).

Dentre os biomateriais poliméricos, o poli (ácido lactico-co-glicólico) PLGA têm sido produzidos e usados como implantes que degradam e são absorvidos pelo organismo e, por isso, destaca-se devido à sua característica de biocompatibilidade e bioreabsorção.

O Alginato é um polissacarídeo natural relativamente abundante com potencial para a fabricação de biofilmes e fibras devido às suas propriedades colodais e para a produção de *scaffolds* para engenharia de tecidos (tecidos moles). É um copolímero linear constituído por blocos de β -D- ácido manurônico (unidades M) e de α -L ácido gulurônico (unidades G) extraído de diversas espécies de algas pardas. O Alginato pode reagir com íons divalentes, por exemplo, de cálcio, formando um gel ou com íons polivalentes formando ligações cruzadas.

Devido à sua estrutura linear e elevada massa molecular, o Alginato é capaz de formar filmes resistentes e boas fibras no estado sólido (RINAUDO, *et. al.* 2008).

O Alginato possui facilidade em formar gel, sendo capaz de reter grande quantidade de água. A formação deste gel é independente da temperatura, o que faz com que este biopolímero seja utilizado na maioria das vezes sob esta forma. É um material muito utilizado como agente estabilizante em alimentos, e também na produção de adesivos, tintas, brinquedos e papéis (OLIVEIRA, *et. al.*, 2004).

Na área biomédica o Alginato possui algumas características vantajosas como biocompatibilidade, não toxicidade, hidrofílico e capacidade de formar gel. A gelificação do Alginato permite a encapsulação de várias substâncias, e quando modificado quimicamente, é utilizado na liberação controlada de proteínas que promovem a regeneração do tecido mineralizado e como carregador de células transplantadas. Porém, a sua baixa taxa de degradação constitui uma desvantagem que ainda está sendo estudada (AUGST *et al.*, 2006).

O Alginato de Sódio vem sendo estudado para usos como matriz para suporte de culturas celulares específicas, imobilização de microorganismos, excipiente para medicamentos, material para impressão dental e pegativo para ferimentos (LEE *et al.*, 2004; AUGST *et al.*, 2006; AVELLA *et al.*, 2007; QIN, 2008; KO *et al.*, 2010).

O mecanismo da degradação *in vitro* dos polímeros bioreabsorvíveis tem sido avaliado nos últimos anos e demonstra ser um processo heterogêneo na extensão do material. Resultados semelhantes são obtidos nos estudos *in vivo*.

Atualmente, na engenharia de tecidos, para cultura tridimensional de células, são utilizados arcabouços (*scaffolds*) de crescimento tecidual de diversos materiais e composições. O *scaffold* é um suporte onde estas células são colocadas para sofrerem uma multiplicação celular e também uma “orientação” de seus tecidos. Para isso ocorrer, é necessário um *scaffold* que possua um tamanho de poro definido e uma alta porosidade em sua estrutura. Também é necessária uma alta área superficial, bioabsorção e uma taxa de degradação apropriada, biocompatibilidade, integridade mecânica para manter a estrutura e a interação com as células permitindo a adesão o crescimento, a migração e finalmente a diferenciação celular.

Os cimentos de fosfato de cálcio possuem elevado potencial de uso como materiais para confecção de *scaffolds*, devido à sua biocompatibilidade, osteocondutividade e bioatividade. No entanto, suas baixas propriedades mecânicas, notadamente tenacidade à fratura, dificulta sua utilização.

1.2. Objetivo do Trabalho

O objetivo deste trabalho foi o aumento as propriedades mecânicas dos cimentos ósseos de α - fosfato tricálcico (α -TCP) através da adição de fibras de PLGA e Alginato de Sódio obtidas por gotejamento e a partir destas fibras construir *scaffolds* pelo método de adição de esferas de parafina.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Biomateriais

Vários são os critérios que um material precisa atender para ser enquadrado como um biomaterial. Segundo a Conferência de Consenso em Biomateriais para aplicações clínicas de 1982 (WILLIAMS, *et. al.* 1987) entende-se por biomaterial: "Toda substância (com exceção de drogas) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que durante um período de tempo indeterminado é empregado como um todo ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais".

Isso significa que, no sentido mais amplo, são enquadrados nessa categoria todos os materiais empregados na medicina, odontologia, medicina veterinária e farmacologia, além daqueles que entram na forma de implantes em contato direto com o tecido do corpo. Uma definição prática é dada por Park, segundo o qual "biomateriais são tudo que, de modo contínuo ou intermitente, entra em contato com fluidos corpóreos, mesmo que esteja localizado fora do corpo" (PARK, 1979). Assim, pinos e placas de fixação externas não são considerados biomateriais; ao contrário, o são bisturis, lâminas e demais instrumentos cirúrgicos.

De uma forma geral, as interações materiais/tecido podem provocar quatro tipos de reações, como mostra a Tabela 1:

Tabela 1: Interações biomateriais com tecidos humanos.

INTERAÇÕES MATERIAIS/TECIDO	
Tóxica	Morte do tecido envoltório
Não-Tóxica Degradável	Substituição pelo tecido envoltório
Não-Tóxica Inativa	Formação de uma cápsula fibrosa fina não aderente
Não-Tóxica Bioativa	Formação de uma ligação interfacial com o tecido envoltório

O desenvolvimento de cimentos de fosfato de cálcio é imprescindível para o avanço tecnológico no campo dos biomateriais. Na literatura internacional existem poucos trabalhos publicados utilizando fibras biocompatíveis como reforço de cimentos de fosfato de cálcio, apesar da resistência mecânica dos cimentos desenvolvidos internacionalmente apresentarem valores reduzidos quando comparados aos tecidos que se pretende substituir, possuindo, assim, este sistema compósito um potencial enorme de utilização em ortopedia e odontologia. Na literatura consultada, apenas Santos (2002), realizou um estudo profundo destinado a elevar a resistência mecânica dos cimentos de fosfato de cálcio. Santos obteve um aumento de até 148% na resistência mecânica à compressão com a adição de microfibras de náilon, carbono e polipropileno.

2.1.1. Biocompatibilidade e Biofuncionalidade

Biocompatibilidade significa que o material e seus possíveis produtos de degradação devem ser tolerados pelos tecidos envoltórios e não devem causar prejuízo ao organismo a curto e longo prazo. Para que um material seja aceito clinicamente como um material de implante, ele precisa atender a alguns requisitos fundamentais, como o material deve ser biocompatível, ou seja, sua presença não deve causar efeitos nocivos, os tecidos não devem causar a degradação do material, como, por exemplo, corrosão em metais, a não ser de forma tolerável, o material deve ser biofuncional, ou seja, deve ter as características adequadas para cumprir a função desejada, pelo tempo desejado e o material deve ser esterilizável.

Paralelamente à biocompatibilidade, é importante que o implante permita o desempenho imediato e com êxito da função específica (estática e dinâmica) da parte do corpo que está sendo substituída. Esta característica está embutida no conceito de biofuncionalidade (RAVAGLIOLI, 1992). Nesse conceito estão incorporados, também, os problemas associados à degradação química dos materiais, visto que o meio fisiológico pode ser bastante agressivo - mesmo aos materiais considerados extremamente inertes quimicamente, levando à redução da eficiência do implante.

2.1.2. Classificação dos Biomateriais

Os biomateriais podem ser classificados de acordo com o seu comportamento fisiológico em (HENCH, *et. al.*, 1993):

- Biotoleráveis, materiais apenas tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes por meio da formação de camada envoltória de tecido fibroso. Esta camada é induzida por meio da liberação de compostos de químicos, íons, produtos de corrosão e outros por parte do material implantado. Quanto maior a espessura da camada de tecido fibroso formada, menor a tolerabilidade dos tecidos ao material. Os materiais biotoleráveis são praticamente todos os polímeros sintéticos assim como a grande maioria dos metais.
- Bioinerte, materiais também tolerados pelo organismo, mas em que a formação de envoltório fibroso é mínimo, praticamente inexistente. O material não libera nenhum tipo de componente ou, mais realisticamente, o faz em quantidades mínimas. A quantidade de células fagocitárias na interface é mínima, a resposta fagocítica será passageira e uma fina cápsula tomará lugar após o implante. Em alguns casos esta camada é praticamente imperceptível. Os materiais bioinertes mais utilizados são alumina, zircônia, titânio, liga de titânio e carbono.
- Bioativos, materiais em que ocorrem ligações de natureza química entre material e tecido ósseo (osteointegração). Em função da similaridade química entre estes materiais e a parte mineral óssea, os tecidos ósseos se ligam a eles, permitindo a osteocondução por meio do recobrimento por células ósseas. Os principais materiais desta classe são os vidros e vitrocerâmicas à base de fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita e os compostos de fosfato de cálcio.
- Absorvíveis, materiais que, após certo período de tempo em contato com os tecidos, acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Tais materiais são extremamente interessantes em aplicações clínicas em função de ser desnecessária nova intervenção cirúrgica para a retirada do material de implante. Os principais exemplos desses materiais são o fosfato tricálcico (TCP) e o ácido polilático.

2.2. Cimentos à Base de Fosfato de Cálcio

O cimento, de α -TCP, pode ser preparado misturando-se um sal de fosfato de cálcio com água ou com uma solução aquosa para que se forme uma pasta que possa reagir em temperatura ambiente ou corporal dando lugar a um precipitado que contenha um ou mais fosfato de cálcio e ocorrendo a pega pelo inter cruzamento dos cristais deste precipitado. Esses cimentos reúnem uma série de vantagens que permitem seu uso como preenchimento e substituto de partes danificadas do sistema ósseo, dentre as quais não é necessário dar forma ao preenchimento e também pode ter mínima cavidade para o preenchimento, a preparação é realizada durante o ato cirúrgico, tem ótimo contato com o osso e o implante e tem características de biocompatibilidade e bioatividade (SANTOS, 2002).

A principal desvantagem dos cimentos de fosfato de cálcio conhecido é sua baixa resistência mecânica, que no melhor dos casos consegue igualar-se à do osso trabecular, ou a um quinto do osso cortical. Essas comparações são mostradas na tabela 2.

Composições mais resistentes de cimentos de fosfato de cálcio encontrariam aplicações em ortopedia e neurocirurgia, como alternativa para a consolidação de fraturas múltiplas de ossos longos, fixação de próteses articulares cimentadas e substituição de discos intervertebrais e corpos vertebrais.

Tabela 2: Comparação da resistência mecânica de alguns ossos do corpo humano e a resistência de cimento de fosfato de cálcio.

TIPOS	Módulo de elasticidade, E (GPa)	Resistência a tração, σ_t (MPa)	Resistência a compressão, σ_c (MPa)
OSSOS DA PERNA			
Fêmur	17,2	121	167
Tíbia	18,1	140	159
Perônio	18,6	146	123
OSSOS DO BRAÇO			
Úmero	17,2	130	132
Rádio	18,6	149	114
Cúbito	18,0	148	117
CIMENTO			
TTCP + DCPA ⁹	-	12*	34 - 51
TTCP + DCPD + HA ¹⁰	-	-	45
β -TCP + MCPM ¹⁰	-	3,2 [†]	-
β -TCP + DCPD + CC ¹⁰	-	1,5 [†]	-
α -TCP + HA, Na ₂ HPO ₄ ¹⁰	-	-	35 ± 5
* = Resistência a compressão diametral, σ_{td}			

TTCP: Ca₄(PO₄)₂O; DCPA: CaHPO₄; DCPD: CaHPO₄.2H₂O; HA: Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂; MCPM: Ca(H₂PO₄)₂.H₂O; α, β -TCP: α, β -Ca₃(PO₄)₂

2.2.1. Sistema α -TCP

Dos sistemas de CFC estudados, somente aquele baseado no α -TCP cumpre com o requisito referente ao pH (entre 6,5 e 8,0) (DRIESSENS *et al.*, 1997). Poucos estudos têm sido realizados para aperfeiçoar o desempenho mecânico dos CFC baseados no α -TCP. A adição de hidroxiapatita precipitada a esses cimentos em níveis de até 4 % tem sido relatada como favorável à resistência à compressão do material, ao mesmo tempo em que adições de CaO de até 3% tem um efeito prejudicial sobre a resistência (BERMUDEZ, *et al.*, 1994).

Driessens *et al.*, (GINEBRA, *et al.*, 1995) estudaram o efeito da temperatura e diferentes aditivos sobre diversas propriedades do cimento de α -TCP. À temperatura do corpo, há um aumento da resistência mecânica durante a pega comparada às obtidas à temperatura ambiente, o que foi explicado pelo aumento da velocidade da reação de pega. As adições de carbonatos solúveis, pirofosfatos e, sobretudo de sais de magnésio retardam a pega e pioram a resistência do cimento.

A presença de $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, β -TCP ou hidroxiapatita sinterizada, em quantidade de até 10 %, não teve efeito sobre a resistência. Adições de ágar, ácido algínico, caseína, polivinilpirrolidona, dodecilsulfato de sódio, cloreto de hexadeciltrimetilamônio, gelatina e glutaldialdeído foram prejudiciais para as propriedades do cimento (DRIESSENS, *et al.*, 1997).

2.3 Polímeros Absorvíveis

Os poli (lactides) podem ser considerados policondesados do ácido láctico e pertencem à classe dos α -hidróxi-ácidos. Os polímeros podem ser obtidos na forma semicristalina utilizando como monômero de partida o ácido láctico, ou ácido 2-hidroxi propanóico. (OLIVEIRA, L. F., 2008)

O ácido láctico é bifuncional, possui uma função álcool e também uma função ácido carboxílico e pode ser convertido em polímero por muitos caminhos. O mais simples deles é através de uma policondesação intermolecular, mas por este tipo de rota, se obtém um material de baixa massa molar. Para se obter mais alto grau de polimerização deve-se usar como monômero de partida o dímero cíclico do ácido láctico, denominado lactide (OLIVEIRA, L. F., 2008).

Outra vantagem apresentada pelos Poli (lactides) é que os monômeros que são usados como partida para a sua produção (ácido láctico e lactide), são facilmente acessíveis quimicamente. Uma variedade de rotas químicas pode ser usada para se obter ácido láctico e através de diferentes técnicas pode-se converter este lactide com altos rendimentos (OLIVEIRA, L. F., 2008).

2.3.1 Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)

O Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico), PLGA é um copolímero dos monômeros ácido láctico e ácido glicólico. Os copolímeros PLGA podem ser aplicados tanto em dispositivos médicos como na liberação controlada de medicamentos. É importante notar que não existe uma relação linear entre a composição do copolímero e as suas propriedades mecânicas e de degradação (OLIVEIRA, L. F., 2008). A figura 1 mostra a estrutura simplificada de uma cadeia de PLGA (OLIVEIRA, L. F., 2008).

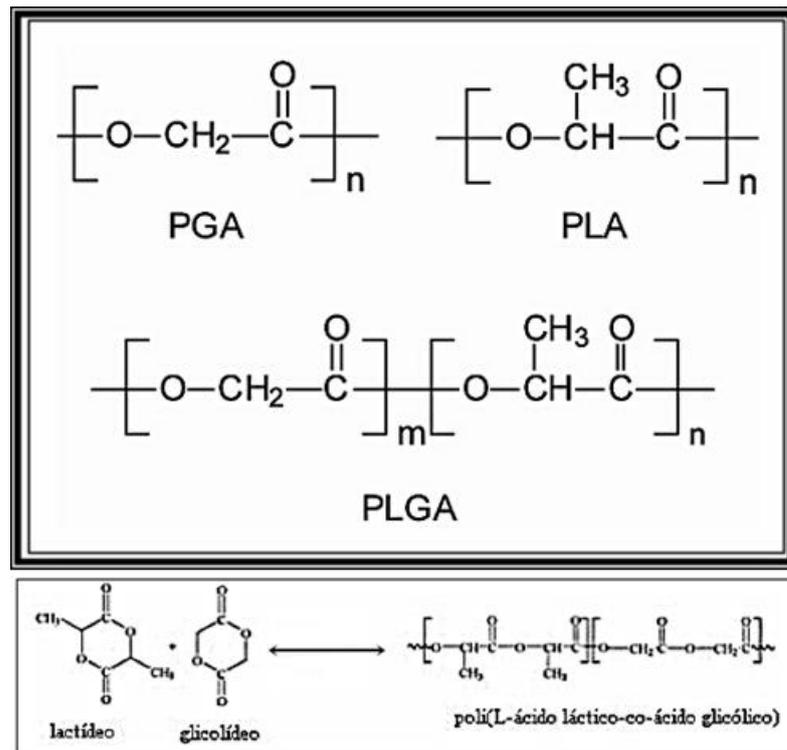


Figura 1: Estrutura química de uma cadeia polimérica de Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico).

As propriedades desse copolímero são bastante influenciadas pela razão molar dos monômeros. Para a composição 50/50, o PLGA é um material hidroliticamente instável e mais suscetível à degradação entre 1 e 2 meses, enquanto que para razões 75/25 e 85/15 a degradação varia nas faixas de 4 a 5 meses e 5 a 6 meses, respectivamente (OLIVEIRA, L. F., 2008). Produtos comerciais com diferentes proporções dos monômeros têm sido desenvolvidos para uma ampla gama de aplicações biomédicas. PuraSorb[®]PLG é um copolímero semicristalino bioabsorvível de L-ácido láctico e ácido glicólico com os monômeros na razão de 80L/20G.

Um copolímero contendo 90% de ácido glicólico (GA) e 10% de ácido L-láctico (LA) foi inicialmente utilizado para o desenvolvimento de suturas com multifilamento Vicryl[®]. Uma versão modificada dessa sutura, Vicryl Rapid[®], é irradiada para aumentar a taxa de degradação. PANACRYL[®] É outro material polimérico que está sendo desenvolvido comercialmente a partir do copolímero com uma razão LA/GA, com objetivo de diminuir a taxa de degradação. Outros copolímeros têm sido desenvolvidos para a fabricação de suturas com monofilamento.

Dentre estes podemos incluir o poli (ácido glicólico-co-trimetileno carbonato) e poli (ácido glicólico-co-caprolactona), contendo segmentos duros e moles ao longo da cadeia polimérica. Outras aplicações para o PLGA são em forma de malhas (Vicryl Mesh[®]), reforços de sutura, substituição de pele. A engenharia de tecidos para enxertos cutâneos utilizam o Vicryl Mesh[®] como suporte para estrutura (OLIVEIRA, L. F., 2008).

Demonstrou-se que o PLGA sofre hidrólise através das ligações de éster e a taxa de degradação depende de uma série de parâmetros incluindo a razão LA/GA, a massa molecular, a forma e a estrutura da matriz polimérica. Várias formas de PLGA como, por exemplo, microesferas, microcápsulas, nanoesferas, nanocápsulas e nanofibras têm sido desenvolvidos para a liberação controlada de fármacos ou de proteínas (OLIVEIRA, L. F., 2008).

Os poliésteres PGA, PLA e PLGA podem ser obtidos por duas rotas sintáticas principais: por policondensação direta dos monômeros ou por polimerização por abertura de anéis de dímeros cíclicos (OLIVEIRA, L. F., 2008).

2.3.2 Fibras de poli (ácido láctico)

Em 1960, começaram as primeiras suturas biodegradáveis aprovadas na indústria médica formadas de ácido láctico e ácido glicólico (GILDING, *et. al.*, 1979). Desde aquele tempo outros dispositivos médicos, baseado em láctico e ácido de glicólico, como também outros materiais, inclusive copolímeros de poli (dioxanona) e poli(trimetileno carbonato), e homopolímeros e copolímeros poli(ϵ -caprolactona), foram aceitos para uso como dispositivos biomédicos (Barrows TH,1986). Além destes dispositivos aprovados, muitas pesquisas continuam em polianidridos, poliortoésteres, e outros materiais (SANTOS, 2002).

Os polímeros bioabsorvíveis são capazes de degradarem-se em compostos de menor peso molecular, sendo envolvidos nas vias metabólicas. O principal processo químico envolvido na absorção dos polímeros bioabsorvíveis é a reação de hidrólise e quebra da cadeia principal do polímero. Na verdade, tem sido proposto que o termo mais adequado para a

reação dos biopolímeros absorvíveis no corpo humano seria a bioerosão, onde um polímero insolúvel em água que é convertido sob condições fisiológicas em materiais solúveis em água, sem preocupação com o mecanismo específico envolvido no processo de erosão. (OLIVEIRA, L. F., 2008)

A bioerosão inclui os processos físicos (como dissolução) e químicos (como clivagem da cadeia). O termo “bio” indica que a erosão ocorre em condições fisiológicas. Desta forma, o termo mais adequado seria “polímero bioerodível” em substituição ao termo “polímero bioabsorvível”. Entretanto, o termo mais frequentemente utilizado é o segundo, consagrado pelo uso. (OLIVEIRA, L. F., 2008)

Atualmente têm-se usado polímeros sintéticos bioabsorvíveis para a confecção de barreiras mecânicas, os quais oferecem controle da estrutura e propriedades assim como estrutura física e química, cristalinidade, condições hidrofílicas e hidrofóbicas, padrão de degradação e propriedades mecânicas. Este material pode ser processado em várias formas e microestruturas, assim como a área superficial desejada, quantidade, tamanho e distribuição dos poros. Há também crescente atenção aos polímeros sintéticos para as potencialidades em órgãos artificiais e como sistemas liberadores de drogas (OLIVEIRA, L. F., 2008).

Existem diversos métodos de obtenção de fibras poliméricas, sendo que os métodos citados em literatura para obtenção de fibras por: *electrospinning* e processo de separação de fases.

2.3.3 Alginato de Sódio

Alginatos são de grande interesse como potencial componente estrutural de filmes e coberturas por causa de suas propriedades coloidais únicas, na qual inclui compactação, estabilização, suspensão, formação do filme, produção do gel, e estabilização da emulsão (KING, 1983; MOE *et al.*, 1995). Ele é um carboidrato coloidal hidrofílico extraído com álcali diluído de várias espécies de algas *Phaeophyceae*.

Em termos moleculares, o Alginato é da família de copolímeros binários, composto por ligações 1-4 de ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulurônico (G), de larga variação na composição e estrutura sequencial (KING, 1983; MOE *et al.*, 1995). Estes monômeros são organizados em blocos ao longo da cadeia, que podem ser compostos por blocos de homopolímeros (GG e MM) junto com blocos alternados (MG) na mesma molécula, como pode ser visto na figura 2 (SMIDSROD, 1974).

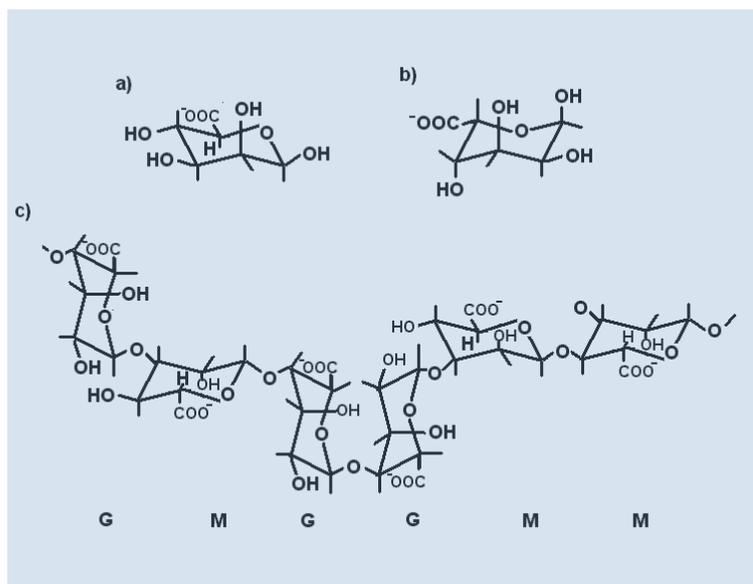


Figura 2: Estrutura do ácido β -D-manurônico (a), α -L-gulurônico (b) e Alginato (c) (ERTESVÁG & VALLA, 1998).

A diferença na sequência e no conteúdo de blocos determinará a flexibilidade da cadeia, influenciando na solubilidade e estabilidade do gel que será formado. Blocos MG, por exemplo, formam cadeias mais flexíveis e mais solúveis em pH baixos e a estabilidade do gel está diretamente relacionada ao conteúdo de blocos G (ERTESVÁG, *et al.*, 1998).

Ácido algínico é o único polissacarídeo que contém, naturalmente, grupos carboxílicos em cada constituinte residual, e possui várias habilidades funcionais (IKEDA *et al.*, 2000). A propriedade mais usada e única em Alginatos é sua habilidade de reagir com cátions polivalentes, especialmente íons cálcio, para produzir géis fortes ou polímeros insolúveis (GRANT *et al.*, 1973; KING, 1983).

Considerando a importância potencial como uma fonte natural e renovável do ácido algínico, ele é usado para o desenvolvimento como uma fonte para filmes comestíveis ou biodegradáveis (LAZARUS *et al.*, 1976; WILLIAMS *et al.*, 1978; PARRIS *et al.*, 1995; PAVLATH *et al.*, 1999). A principal aplicação comercial do Alginato é na forma de sal, sendo largamente utilizado nas indústrias alimentícia, farmacêutica, têxtil e de papel (MANCINI *et al.*, 1996).

Sais formados por íons monovalentes (sódio, potássio, amônio) formam Alginatos solúveis em água e por íons multivalentes (cálcio, magnésio, cromo, bário, alumínio), insolúveis em água. O Alginato de Sódio em pó pode ser caracterizado através da determinação da porcentagem de blocos manurônicos (M) e gulurônicos (G) utilizando espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) e a viscosidade intrínseca $[\mu]$ em NaCl 0,1M (PAVLATH *et al.*, 1999).

A viscosidade de soluções de Alginato depende dos arranjos dos blocos M e G e a Tabela 3 apresenta características de Alginatos obtidos dos dois principais tipos de algas, uma rica em grupos M e outra em grupos G. Comercialmente eles são divididos em três classes de acordo com a viscosidade: baixa viscosidade (LV), média viscosidade (MV) e alta viscosidade (HV). A relação entre viscosidade intrínseca e a massa molecular média (M_n) de qualquer tipo de Alginato de Sódio é calculada pela Equação de Mark-Houwink (CLEMENTI *et al.*, 1999), conforme a Equação [1].

$$[\mu] = 1,228 \cdot 10^4 \cdot M_n^{0,963} \quad \text{[Equação 1]}$$

O grau de polimerização, d_p , é obtido pela relação $d_p = M_n / 198$.

Tabela 3: Principais propriedades químicas (X_G e X_M) e físicas (μ , M _{η} , d_p) do Alginato.

Alga	Tipo	N°	X _G (%)	X _M (%)	μ (dL/g)	M _{η} (kDa)	d _p
<i>Macrocystis pyrifera</i>	Alto-M	LV	0,38	0,62	5,9	72,7	367
		MV	0,35	0,65	9,6	119,9	606
		HV	0,37	0,63	10,7	134,5	679
<i>Laminaria hyperborea</i>	Alto-G	LV	0,63	0,37	5,9	73,1	369
		MV	0,57	0,43	6,8	84,6	427
		HV	0,63	0,37	17,0	217,7	1099

N° é a codificação para viscosidade do Alginato; X_G(%) é a porcentagem de ácido gulurônicos; X_M(%) é a porcentagem de ácido manurônicos (M); μ (dL/g) é a viscosidade intrínseca em NaCl 0,1M; M _{η} (kDa) é a massa molecular média; d_p grau de polimerização.

Conforme apresentado na tabela 4, a composição molecular específica de uma amostra de Alginato depende da alga de onde o mesmo é extraído, podendo ocorrer variações nas porcentagens de ácido manurônico (M) e gulurônico (G).

A estrutura do gel de Alginato é governada não somente pela concentração e estrutura química do material do gel, mas também pela cinética de formação do mesmo, que depende da concentração de cátions, da força iônica e do pH. A formação do gel de Alginato de cálcio é uma operação complexa e depende do tipo de Alginato utilizado, do grau de associação entre o Alginato e o cálcio, da fonte de íons de cálcio (cloreto, fosfato, lactado ou acetato de cálcio) e dos métodos de preparação (PAVLATH *et al.*, 1999).

2.3.4 Reforço de Cimento por Fibras

A carga é transferida, pela matriz, para a fibra, por deformação de cisalhamento na interface matriz-fibra. A transferência de carga tem sua origem, geralmente, como um resultado das diferenças de propriedades físicas da fibra e matriz. Expressões que mostram a variação da tensão de

cisalhamento ao longo da interface-fibra matriz, e da tensão de tração na fibra podem ser obtidas por um equilíbrio de forças atuando num elemento de volume da fibra. Diferentes mecanismos podem operar durante a fratura do compósito, dependendo das diferenças de propriedades mecânicas e geometria entre a matriz e a fibra. Em compósitos de cimento as fibras são normalmente descontínuas, isto é, elas estão dispersas na matriz, e não atravessam inteiramente o corpo.

Estudos têm mostrado que, ao contrário do que ocorre com fibras descontínuas, as fibras contínuas em matrizes de cimento *Portland* hidratado podem ser consideradas como sendo simplesmente ligadas à matriz, a qual transfere pouca ou nenhuma carga às fibras. A tensão de tração na fibra é essencialmente constante ao longo do seu comprimento.

A incorporação de fibras em matrizes frágeis de cimento serve para aumentar a tenacidade à fratura do compósito pelo processo de freagem da trinca e conseqüente aumento nas tensões de tração e flexão do compósito (KELLY, 1970). Dois métodos principais têm sido utilizados para aumentar a resistência à fratura dos cimentos ósseos de PMMA: redução da porosidade e adição de fases de reforço. (TOPOLESKI *et al.*, 1995).

O conhecimento das propriedades das fibras é importante como subsídio ao projeto estrutural. Uma elevada resistência à tração da fibra é essencial para uma ação eficaz de reforço. Quanto maior a razão entre o módulo de elasticidade da matriz e da fibra, maior será a transferência de tração da matriz para as fibras. Fibras com altos valores de deformação na ruptura promovem elevada capacidade de deformação do compósito. Problemas associados com o desligamento na interface matriz-fibra são prevenidos pela utilização de materiais com baixos valores de módulo de Poisson.

Na prática, muitas fibras têm falhas superficiais devido a manipulação, processamento, envelhecimento, etc.; tais defeitos afetam a resistência mecânica dos compósitos. A redução da resistência devido a defeitos nas fibras varia com o comprimento e diâmetro da fibra (RILEY, *et al.*, 1968; PARATT, 1960). Pouca atenção tem sido dada aos efeitos de fibras defeituosas em compósitos de cimento. Deve-se, também, salientar que a tensão de tração nas fibras decresce quando aumentamos o seu comprimento.

2.4 Scaffolds

À medida que há uma melhoria na tecnologia aplicada à saúde humana, a expectativa de vida vem aumentando, mas nem todas as partes do corpo podem manter suas funções com o processo de envelhecimento. É preciso que os ossos e a cartilagem apoiem o envelhecimento do corpo, embora as células que os produzem se tornem menos ativas com o tempo. Outros órgãos, tais como os rins, o coração e o fígado devem ser operados para ter um tempo de vida maior (SCHEFFLER, *et. al.*, 2005).

Procedimentos cirúrgicos para o reparo de perda de tecido devido a algum trauma ou extração de tecido doente envolvem implantes de enxerto (transplantes), que podem ser doados de um sítio do mesmo paciente (autoenxerto), de outro ser humano (homoenxerto) ou de outras espécies (xenoenxertos). Tanto nos homoenxertos quanto nos xenoenxertos, há a possibilidade de transmissão de doenças, o que faz com que haja uma grande demanda para substitutos sintéticos especialmente projetados e fabricados para agir como um *scaffold* (arcabouço tridimensional poroso) na regeneração de tecidos para seu estado natural e suas funções, que é fundamental para a engenharia tecidual (SCHEFFLER, *et. al.*, 2005).

Os *scaffolds* normalmente possuem propriedades osteocondutivas, e raramente propriedades osteoindutivas ou osteogênicas, além de possuírem a grande vantagem de servir de suporte mecânico (BLOM, 2007). Quando utilizados para regeneração do tecido ósseo, os *scaffolds* podem ser classificados em dois tipos: arcabouços que induzem a migração e o crescimento celular, provenientes de tecidos vizinhos, para a formação de tecido ósseo; arcabouços carreadores de células osteogênicas autógenas, que foram colonizadas em biorreatores e subsequentemente reimplantadas no paciente (BURG, *et al*, 2000). Eles podem ser de origem natural, como as cerâmicas, a exemplo do coral; sintéticos bioabsorvíveis, como o PLGA (Poli ácido glicólico - ácido lático), caprolactama (CPL) e cerâmicas porosas; ou híbridos (AHSAN, *et al.*, 2005).

Deste modo, essa ciência visa criar e aprimorar novas terapias e/ou desenvolver novos biomateriais que restaurem, melhorem ou impeçam o agravamento da função tecidual comprometida, o que resulta em redução significativa de custos (KAIGLER, *et al.*, 2001; SACHLOS, *et al.*, 2003; MARINS, *et al.*, 2004).

Vários materiais vêm sendo desenvolvidos para utilização em implantes cirúrgicos e dispositivos médicos-odontológicos. HENCH (HENCH, *et al.*, 1998) indicou que, devido às limitações da utilização de enxerto ósseo autógeno, materiais sintéticos para essa aplicação vêm sendo pesquisados com uma alternativa de tratamento e lesões em tecido ósseo.

Os eventos que são esperados que os implantes promovessem nos tecidos vivos são:

- Habilidade de se auto-reparar;
- Capacidade de manutenção do suprimento sanguíneo;
- A alteração da sua estrutura em resposta a fatores ambientais.

Espera-se, ainda, que os novos biomateriais possam, através da interação entre biologia e engenharia, promover um reparo tecidual por um tempo mais longo do que a limitada expectativa de vida para os implantes humanos (HENCH *et al.*, 2000). Dentre os biomateriais que foram desenvolvidos, e vem sendo aperfeiçoados estão alguns polímeros (poli (ϵ -Caprolactona), poli (metacrilato de metila), etc.), cerâmicas (hidroxiapatita), vidros bioativos (Bioglass®), compósitos (Poli (ϵ -Caprolactona) (PCL) e α -Fostato Tricálcico (α -TCP) (SOLOMÃO, *et al.*, 2011), hidroxiapatita-titânia (GOMIDE, *et al.*, 2005)), etc.

Para que sejam desenvolvidos *scaffolds*, algumas características devem ser levadas em conta, a saber:

- Devem suportar a deposição e crescimento celular;
- Devem possuir uma taxa de degradação controlada a fim de suportar as duas fases de desenvolvimento tecidual (*in vitro* e *in vivo*), sem perder as propriedades mecânicas necessárias para substituir o tecido perdido;

- Devem ter uma taxa de degradação de tal forma que haja espaço suficiente para o tecido se desenvolver, à medida que o material é reabsorvido (RATNER *et al.*, 1996).

A tabela 4 resume o comportamento do *scaffold* quando acrescentada células em sua matriz para reparação óssea.

Tabela 4: Parâmetros estruturas do *scaffolds* para aplicação.

COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DOS SCAFFOLDS ACRESCIDA DE CÉLULAS NA REPARAÇÃO ÓSSEA	
Função do <i>scaffold</i>	Característica necessária para cada função do <i>scaffold</i>
Não provocar resposta inflamatória de toxicidade <i>in vivo</i>	Deve ser biocompatível, não-tóxico e não carcinogênico
Ajudar o crescimento tridimensional de tecidos e órgãos	Forma específica tridimensional
Semear uniformemente alta qualidade de células	Apresentar alta porosidade e alta conectividade entre os poros
Permitir adesão, proliferação e diferenciação celular.	Possuir superfície química e topografia apropriadas
Permitir interações significativas entre as superfícies celulares e anexas	Relação área de superfície x volume
Promover proliferação e migração celular e conduzir o crescimento de tecido ao longo do <i>scaffold</i>	Tamanho de poros apropriados para permitir a penetração de células e a interconectividade entre elas
Dirigir e orientar as células da matriz extracelular para formação de novo tecido	Orientação correta das fibras dentro do <i>scaffold</i>
Permitir o movimento de nutrientes dentro e fora do <i>scaffold</i>	Alta porosidade e interconectividade entre os poros
Degradação do <i>scaffold</i> para permanecer somente tecido natural	Taxa de degradação dos <i>scaffolds</i> não devem ser tóxicos nem promover inflamação <i>in vivo</i>
Integridade estrutural suficiente para reter forma <i>in vivo</i> com tensão mecânica suficiente para apoiar o tecido em desenvolvimento e resistir em forças <i>in vivo</i>	<i>Scaffold</i> deve igualar-se às propriedades mecânicas do tecido em desenvolvimento

(EDWARDS *et al.*,2004)

A engenharia tecidual vem permitindo a utilização de células do próprio paciente, de doadores e células-tronco fetais ou de adultos, cultivados em *scaffolds* de materiais compatíveis com o organismo. Essa metodologia aparece como uma boa alternativa para aplicações médicas pelo benefício ao paciente, uma vez que, a partir de um pequeno número de células, via expansão em culturas *in vitro*, podem minimizar a rejeição dos implantes (KELLOMAKI *et al.*, 2004; MAY *et al.*, 2007).

Atualmente, em engenharia de tecidos, para cultura de células são utilizados arcabouços de crescimento tecidual (*scaffolds*) de diversos materiais e composições. Para isso ocorrer, é necessário um *scaffold* que possua um tamanho de poro definido e uma alta porosidade em sua estrutura. Também é necessária uma alta área superficial, biodegradabilidade e uma taxa de degradação apropriada, biocompatibilidade, integridade mecânica para manter a estrutura e a interação com as células permitindo a adesão o crescimento, a migração e finalmente a diferenciação celular (MAY *et al.*, 2007).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental foi dividida em quatro etapas. A primeira etapa consistiu na obtenção dos pós de cimento de fosfato de cálcio (α -TCP), a construção de *scaffolds* puros, pelo método utilizando esferas de parafina, e a caracterização físico-química.

A segunda etapa do trabalho foi a obtenção das fibras de Alginato de Sódio e PLGA, por liofilização, somente dissolvido, congelado e liofilizado (TIPS – *Thermo Induced Phase Separation* ou Separação de fases termicamente induzida). A primeira e a segunda etapa estão resumidas no fluxograma, figura 3.

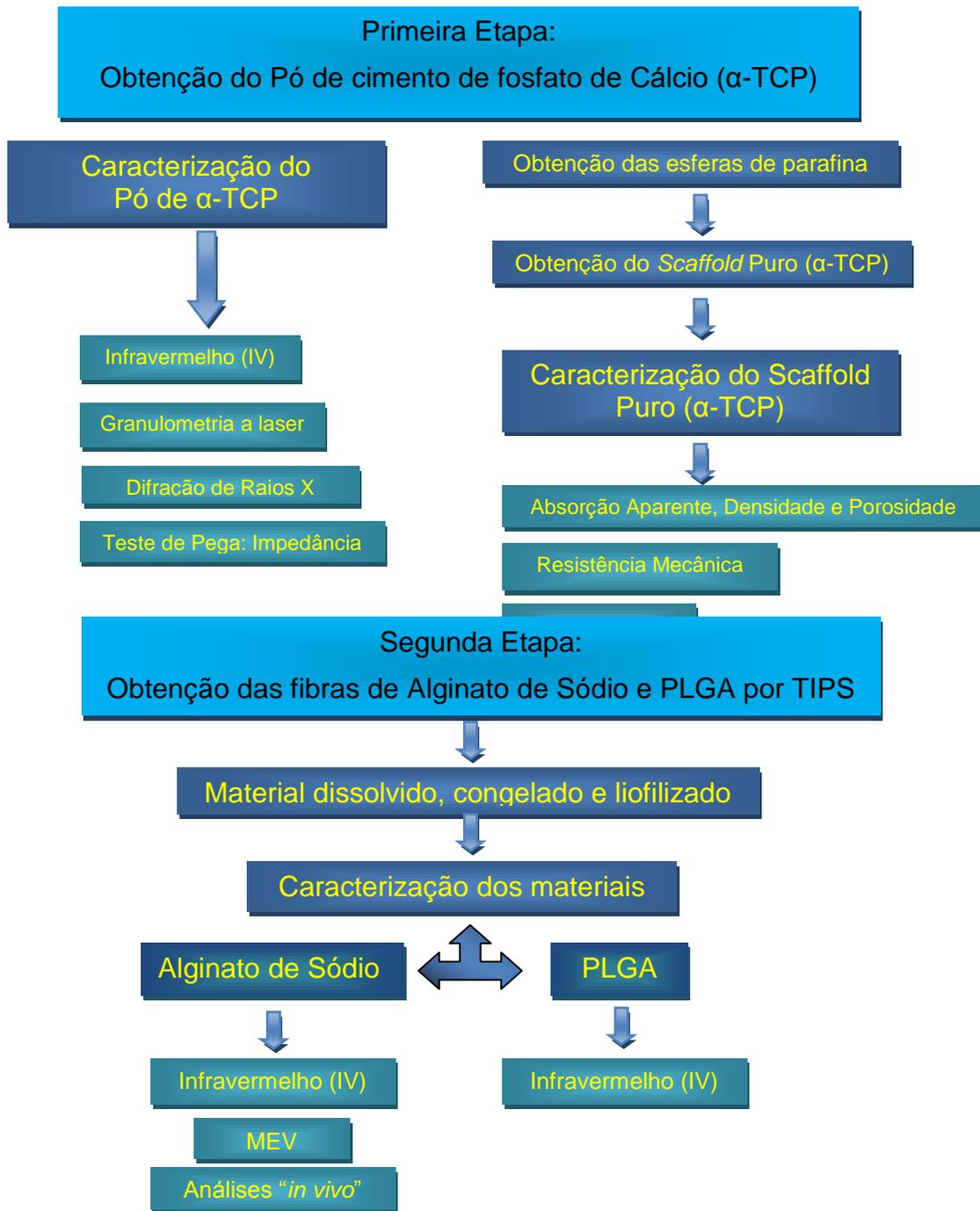


Figura 3: Fluxograma com o resumo da Primeira e Segunda etapa realizado no trabalho.

A terceira etapa consistiu na obtenção das fibras de Alginato de Sódio e PLGA, com gotejamento em diversos reagentes sob agitação e, após, congelamento e liofilização.

A quarta etapa foi à obtenção dos *scaffolds* de cimento de fosfato de cálcio (α -TCP) puro e contendo adições de fibras de Alginato de Sódio e PLGA pelo método de obtenção de poros por materiais voláteis (esferas de parafina) sua caracterização físico-química e de citotoxicidade. A terceira e quarta etapa estão resumidas no fluxograma, figura 4.

Para uma melhor organização no capítulo de Materiais e Métodos, primeiramente, foram descritas todas as etapas para obtenção dos materiais. O capítulo 3.7. é especialmente para descrever cada técnica de caracterização e equipamentos utilizados na realização do trabalho.

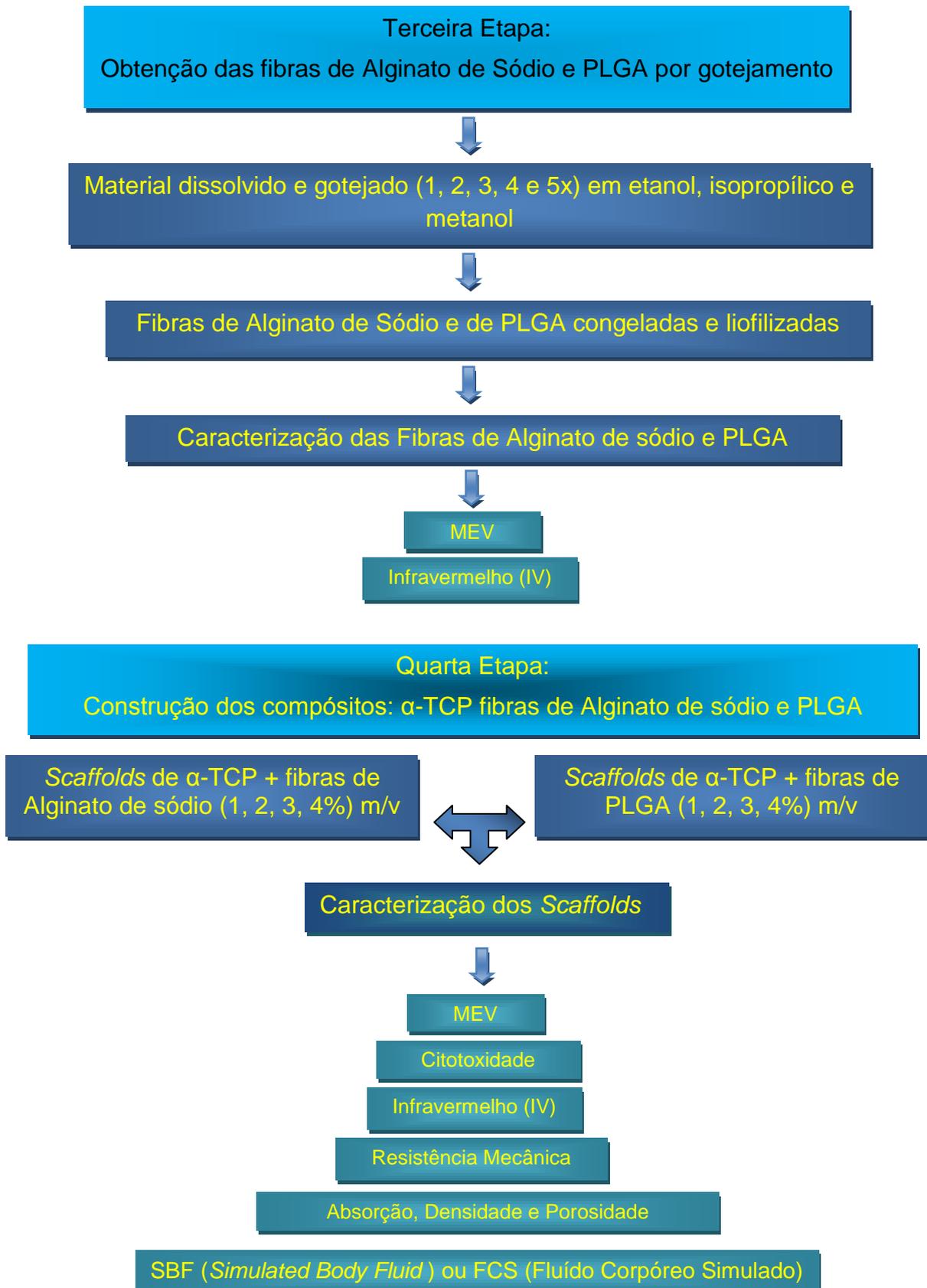


Figura 4: Fluxograma com o resumo da terceira e quarta etapa realizada no trabalho.

3.2. Obtenção do pó de cimento de fosfato de cálcio (α -fosfato tricálcico)

O cimento de α -fosfato tricálcico (α -TCP) foi sintetizado em laboratório utilizando-se o carbonato de cálcio (CaCO_3) (Nuclear) e o pirofosfato de cálcio (γ - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$). A homogeneização inicial entre os precursores foi realizada a seco em moinho de bolas de alumina por 1 h. O processo de calcinação permitiu a reação dos dois precursores químicos, a fase gama do pirofosfato de cálcio e carbonato de cálcio, que foram mantidos em forno tipo mufla a temperatura de 1300 °C por 5 h, seguido de resfriamento brusco. Os valores para realização da síntese do α -TCP foi calculado a partir da seguinte reação química.



O α -TCP após resfriamento foi desagregado manualmente com almofariz e pistilo de porcelana e passado em peneira malha 20 ABNT (850 μm). A moagem a úmido foi feita utilizando álcool etílico absoluto (Vetec[®]) ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) por 2 horas. A composição resultante foi alocada em uma bandeja de aço inoxidável, onde permaneceram 72 horas em estufa a 70 °C para promover a evaporação total do álcool.

Após a moagem em álcool, o α -TCP passa a se chamar cimento, pois a partir deste momento se reagir com água ocorre o endurecimento. A fração líquida do cimento foi formulada com o objetivo de se obter uma solução aquosa aceleradora da reação de presa do cimento, semelhante à composição utilizada na literatura para mistura de cimentos de α -TCP. A formulação mais difundida para a fração líquida corresponde a uma solução de 2,5% de hidrogenofosfato disódico (Na_2HPO_4) em água destilada e deionizada, sendo esta a utilizada. O cimento obtido foi caracterizado pelas seguintes técnicas:

- Fases cristalinas. Difração de raios X qualitativa (DRX);
- Grupamentos químicos. Espectroscopia de infravermelho (IV);

- Tamanho de partículas: Análises de granulometria a laser.

Os pós obtidos foram misturados à fase líquida (2,5% Na₂HPO₄ - Fosfato de sódio bibásico–dodecahidratado PA (Vetec[®]) para reação de presa do cimento, sendo obtidos corpos-de-prova puros e com a adição de fibras de Alginato de Sódio e PLGA em volume de 1%, 2%, 3% e 4%. Suas propriedades físico-químicas e mecânicas foram analisadas utilizando os seguintes ensaios:

- Determinação do tempo de pega: Método por Impedância e comparação com o método das agulhas de Gilmore (norma ASTM: C 266 – 1999);
- Resistência mecânica: Ensaio de compressão e flexão;
- K_{IC} e J_{IC};
- Grupamentos químicos. Espectroscopia de infravermelho (IV).

3.3. Obtenção das fibras de Alginato de Sódio e PLGA por TIPS

Primeiramente, o PLGA (PURASORB[®]) fabricante PURAC[®], foi dissolvido em clorofórmio em um agitador magnético por 1 hora em agitação máxima (600rpm) e em diferentes concentrações (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1% w/v); o mesmo foi realizado para o Alginato de Sódio (Aldrich[®], pureza >99,5%), mas utilizando como solvente água destilada e deionizada.

Posteriormente dissolvidos, o PLGA e o Alginato de Sódio foram alocados em recipientes do equipamento de liofilização (*manifolds*) e congelados por 24 horas a uma temperatura de aproximadamente de -20°C e depois levadas para liofilização. O equipamento utilizado para liofilização foi da marca Terroni, modelo Enterprise II.

Os materiais obtidos foram caracterizados por:

- Microestrutura. Microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Grupamentos químicos. Espectroscopia de infravermelho (IV).

3.4. Obtenção das fibras de Alginato de Sódio e PLGA por gotejamento

Um segundo método para obtenção das fibras foi preparado com Alginato de Sódio (Aldrich[®], pureza >99,5%) com concentrações de 1 e 2%, dissolvido em água deionizada em agitador magnético por 2 horas (600 rpm) e

para o PLGA também foi utilizado no mesmo método e concentrações de 1 e 2%, mas como solvente clorofórmio.

As soluções foram gotejadas até cinco vezes em três reagentes diferentes (álcool etílico P.A. (Vetec[®]), álcool isopropílico P.A. (Vetec[®]) e metanol (Synth[®]) sob agitação (~600 rpm), por 30 minutos. Depois de retiradas as amostras utilizando uma pinça, peneira para escorrer o excesso de líquido e colocado em congelador (-20° C) durante no mínimo de 24 horas e posteriormente liofilizadas.

Foram determinadas as características das fibras selecionadas mediante a determinação de:

- Morfologia: Microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Grupamentos químicos: Espectroscopia de infravermelho (IV).

3.5. Obtenção de Cimento de Fosfato de Cálcio com fibras de Alginato de Sódio e de PLGA

À composição de cimento de fosfato de cálcio obtida no item 3.1. foram adicionadas as fibras obtidas no item 3.3., nos teores de 0, 1, 2, 3, 4% em volume. Foram confeccionados corpos-de-prova, sendo determinados suas propriedades físico-químicas e mecânicas, utilizando dos seguintes ensaios:

- Resistência mecânica: Ensaio de compressão e K_{IC} e J_{IC} (Norma ASTM E 1820-96);
- Microestrutura: Microscopia eletrônica de varredura (MEV).

3.6. Obtenções de esferas de parafinas

Para o estudo e obtenção de parafina na forma de microesferas utilizou-se um béquer com capacidade para 1 litro contendo 500 mL de água deionizada, foi adicionado 4g de poli (álcool vinílico) (PVA) (Kuraray Poval[®]), 5g de sulfato de sódio (Na_2SO_4) (Synth[®]). Esta solução foi aquecida até 100°C e no final adicionada a parafina comercial (Petrobrás) e aguardada sua total fusão (67°C). Colocou o sistema sob agitação magnética a 400 rpm durante aproximadamente 10 à 15 minutos para a formação de uma espuma consistente e branca. Depois da formação da espuma o agitador magnético foi

desligado e feito um choque térmico com a adição de 500 ml de água fria (com a temperatura de aproximadamente 5°C).

As esferas foram colocadas em uma torre de peneiras, lavadas com água destilada e separadas em faixas granulométricas. As esferas foram lavadas com água destilada e deionizada, secas à temperatura ambiente e armazenadas em dissecador. A faixa granulométrica das esferas de parafina utilizada no trabalho foi entre 250 a 100 μm .

3.7. Preparações dos *Scaffolds* de cimento com fibras

3.6.1 Preparação dos *Scaffolds* com fibras de Alginato

Depois de obtido e caracterizado o cimento de fosfato de cálcio (α -TCP) e das fibras liofilizadas de Alginato de Sódio, foi realizada a preparação dos *scaffolds*. Primeiramente, as fibras liofilizadas de Alginato de Sódio foram selecionadas, separadas (para manter homogeneidade de mistura) e misturadas ao pó de fosfato de cálcio (α -TCP) com esferas de parafina e após adicionada a fase líquida, na proporção de 1 ml para cada 1g de cimento.

As esferas de parafina foram adicionadas nas seguintes porcentagens em volume: 57, 63 e 66% (densidade da parafina = 0,89 g/cm^3 , densidade do cimento de fosfato de cálcio (α -TCP) = 2,35 g/cm^3). Para construção de todos os *scaffolds* que continham parafina foi utilizado o volume de 63%.

A pasta obtida foi vazada e colocadas em diversos tipos de moldes: molde de aço inoxidável em forma de cilindros (altura de 12 mm e diâmetro de 6 mm) e em dois tipos de moldes de silicone em forma de barras com e sem trinca (barras sem trinca (altura de 7,2 mm, comprimento da barra de 34 mm e largura de 6 mm) barras com trinca (altura de 5,7 mm, comprimento da barra de 50 mm e largura de 11 mm) seguindo-se as orientações da Norma ASTM E 1820-96 (ASTM, 1996) e colocadas em recipiente a 100% de umidade e alocadas em uma estufa com temperatura controlada de 37°C por 48 horas para obter sua total pega. Depois de 48 horas foram retiradas dos seus moldes e submetidas a tratamento térmico e químico para extração da parafina.

A extração da parafina dos *scaffolds* com fibras de Alginato de Sódio (1, 2, 3, 4%) consistiu em colocar as amostras sobre papéis absorventes em uma

estufa a 50°C por 24 horas, pois o processo inicial de degradação do Alginato de Sódio é a partir de 67°C, e posteriormente os *scaffolds* ficaram submersos em Peróxido de Hidrogênio P.A. a temperatura ambiente por 48 horas. Para finalizar foram colocados novamente na estufa a 50°C por 24 horas. Os materiais obtidos foram analisados pelos seguintes ensaios:

- Microestrutura: Microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Resistência mecânica: Ensaio de compressão e K_{IC} e J_{IC} (Norma ASTM E 1820-96).

3.6.2 Preparação dos *Scaffolds* com fibras de PLGA

O mesmo método de mistura das fibras de Alginato foi utilizado para misturar as fibras de PLGA com o cimento de fosfato de cálcio (α -TCP) e assim a preparação dos *scaffolds*.

A pasta obtida, também foi vazada e colocadas nos mesmos de moldes de silicone e o de aço inoxidável utilizados no item 3.6.1.e deixadas à temperatura ambiente por 48 horas para sua total pega.

Depois foram retiradas dos seus moldes (amostras contendo α -TCP, e esferas de parafina e α -TCP, esferas de parafina e fibras de PLGA com (1, 2, 3 e 4%) e submetidas ao mesmo tratamento térmico e químico para extração da parafina.

A extração da parafina consistiu em colocar as amostras sobre papéis absorventes em uma estufa a 100°C por 24 horas para extração da maior parte de parafina e, posteriormente as amostras com PLGA foram submersas em Peróxido de Hidrogênio P.A. por 48 horas em temperatura ambiente e retornaram para estufa a uma temperatura de 100°C. Foi utilizada a temperatura de 100°C para extração da parafina nos *scaffolds* com fibras de PLGA, pois o ponto de fusão do PLGA é acima de 200°C (entre 255 a 230°C). E foram caracterizadas pelos mesmos métodos descritos no item 3.6.1.

3.7 Caracterização dos Materiais Obtidos

3.7.1 Difração de Raios X

Para esta análise utilizou-se o Difratômetro Phillips X'Pert MPD com tubo de cobre (radiação $K_{\alpha} = 1,5418 \text{ \AA}$). A tensão e a corrente utilizadas no tubo foram 40 KV e 40 mA, respectivamente, para a obtenção dos difratogramas. A velocidade de varredura do goniômetro foi de $0,05^{\circ}$ por segundo, sendo o intervalo de varredura de 10° a 75° . Para a realização deste ensaio os pós foram compactados em um porta-amostra usando um peso padrão (o conjunto acompanha o difratômetro da Phillips).

3.7.2 Espectroscopia de Infravermelho

Espectroscopia de infravermelho (IV). O equipamento utilizado para esta caracterização foi um Espectrômetro Spectrum 1000 num intervalo de 500 a 4000 cm^{-1} .

3.7.3 Análise granulométrica a Laser

Foram feitas análises de granulometria a laser em um equipamento CILAS 1180 (faixa de detecção do aparelho de $0,04$ a $2500 \mu\text{m}$) utilizando álcool isopropílico.

3.7.4 Determinação do tempo de pega: Método por Impedância

O método usual para caracterização da reação de pega do cimento é pelas agulhas de Gilmore, com base na norma ASTM: C 266 – 1999. Este método utiliza um caráter mecânico: o cimento é considerado curado quando ele puder resistir a uma carga mecânica aplicada, sobre a sua superfície.

Neste trabalho o tempo de pega do cimento foi determinado pela impedância do material, com base em uma reação de Oxi-redução. Foi utilizada uma fonte com Tensão de até 30 kV, um amperímetro (Minipa[®]), um voltímetro (Minipa[®]), dois eletrodos feitos de uma chapa de cobre (com dimensões de 1 cm de altura e 4 cm de comprimento) e um molde de silicone onde foi vazado o cimento de fosfato de cálcio (α -TCP). A figura 5 mostra o esquema de montagem do sistema.

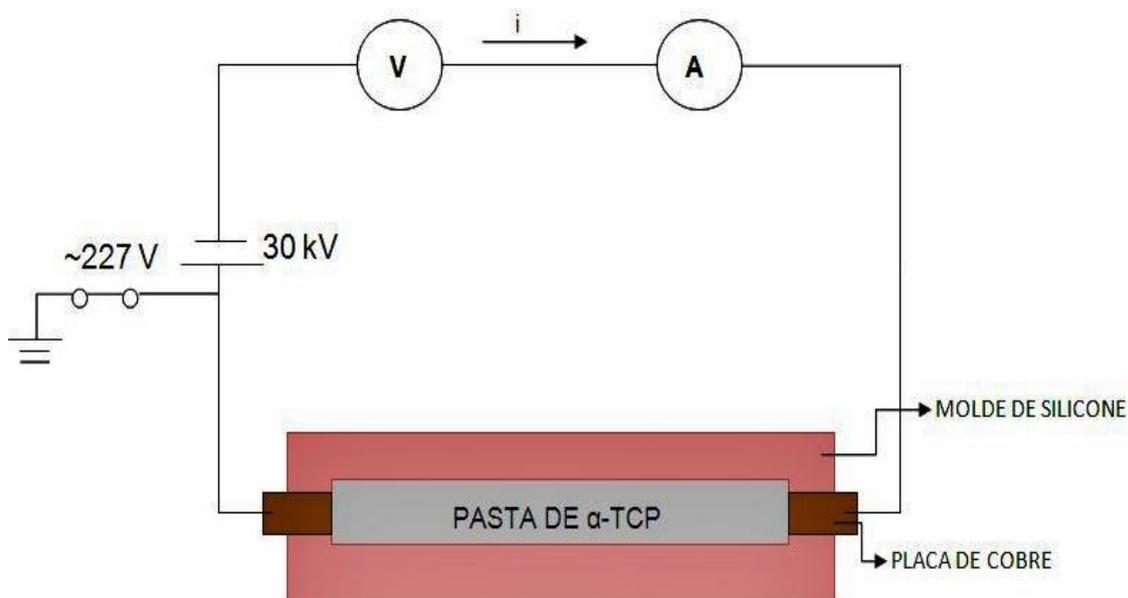


Figura 5: Esquema da montagem do circuito elétrico para medidas de impedância do tempo de pega do cimento de fosfato de cálcio (α -TCP).

Feita uma comparação com a literatura (com o método das agulhas de Gilmore) ficou constatado que o método por impedância era válido, pois os tempos de pega foram similares ao que foi determinado no trabalho. Sendo que, com a vantagem, da impedância ter o controle da reação de oxi-redução a cada minuto. No presente trabalho foram utilizados os dados anotados a cada cinco minutos (um valor de corrente elétrica e um de voltagem). Quando estes valores ficam praticamente constantes, não há mais a troca iônica dentro do cimento, e é observado o endurecimento do cimento.

Uma das desvantagens de utilizar o método das agulhas de Gilmore tem sido relatada que os cimentos podem ter às vezes duas reações de endurecimento. As duas medidas correspondem ao conhecido tempos de pega inicial e final, mas a informação é ainda superficial e pode ser inadequada se

as cargas aplicadas não forem apropriadas às propriedades de endurecimento do cimento. (BOHNER *et al.*, 2005).

3.7.5 Ensaios de Resistência Mecânica e Tenacidade à fratura

Os ensaios de tenacidade à fratura foram realizados seguindo-se as orientações da Norma ASTM E 1820-96 “*Standard Test Method for Measurement of Fracture Toughness*” (ASTM, 1996). Por esta norma, foram confeccionados corpos de prova de cimento de fosfato de cálcio no formato de barras retangulares com dimensões de 5 mm de espessura, 10 mm de altura e 50 mm de comprimento. O entalhe nas amostras foi obtido pela introdução de lâmina de aço inoxidável (0,37 mm) lubrificada com graxa de silicone, durante a conformação dos corpos de prova.

O comprimento do entalhe utilizado foi de 5 mm. Para a realização dos ensaios, utilizou-se máquina universal de ensaios Shimadzu (AG-X/50 kN), com velocidade de 1mm/min e 0,5 mm/min em ensaio compressão e de flexão em quatro pontos.

Foram calculados os valores de tenacidade à fratura, K_{IC} , para a propagação frágil de trincas, e J_{IC} , integral de superfície que engloba a frente da trinca de uma superfície fraturada à outra, utilizada para caracterizar o campo de tensão-deformação ao redor da frente da trinca, sendo um critério para de fratura em regime elástico-plástico.

Esse critério foi adaptado para caracterizar concreto reforçado por fibras, primeiramente por Mindess *et al.*, (MINDESS *et al.*, 1977) e, posteriormente por Li *et al.*, (LI *et al.*, 1987). Os valores de K_{IC} e J_{IC} foram calculados pelas expressões:

$$K_{IC} = P / (B \cdot W^{1/2}) \cdot Y(\alpha) \quad \text{[Equação 3]}$$

Onde:

$$Y(\alpha) = (S/W) \cdot \left\{ 3 \cdot \alpha^{1/2} / [2 \cdot (1 + 2 \cdot \alpha) \cdot (1 - \alpha)^{3/2}] \right\} \cdot [1,99 - \alpha(1 - \alpha) \cdot (2,15 - 3,93 \cdot \alpha + 2,7 \cdot \alpha^2)] \quad \text{[Equação 4]}$$

W: altura da amostra;

S: distância entre apoios do ensaio;

a_0 : comprimento do entalhe;

a: a_0/W [Equação 5]

P: carga;

B: espessura do corpo de prova;

$$J_{IC} = J_{el} + J_{pl} \quad \text{[Equação 6]}$$

Sendo:

$$J_{el} = [K_{IC}^2(1-n^2)]/ E \quad \text{[Equação 7]}$$

Onde:

n: módulo de Poisson

E: módulo de elasticidade

$$J_{pl} = (2*A)/(B*b_0) \quad \text{[Equação 8]}$$

Onde:

A: área da curva tensão versus deslocamento

$$b_0: W-a_0 \quad \text{[Equação 9]}$$

3.7.6 Microestrutura. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) utilizado foi do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFRGS um equipamento marca JEOL, modelo JSM-6060. A figura 6 apresenta a foto do equipamento utilizado no trabalho.



Figura 6: Microscópio eletrônico de varredura (MEV) utilizado para as observações das amostras.

O equipamento funciona numa tensão de 0,1 a 30 kV, podendo ser utilizado em observações convencionais de imagem em elétrons secundários (SEI). Todas as amostras analisadas por MEV foram cobertas com uma dupla camada de filme fino de ouro via *sputtering*.

3.7.7 Absorção de água, Densidade e Porosidade Aparente

O procedimento para o cálculo da absorção de água, porosidade e densidade aparentes baseou-se na norma internacional ASTM C 20 (*Standard test methods for apparent porosity, water absorption, apparent specific gravity, and bulk density of burned refractory brick and shapes by boiling water*) através da determinação da massa da amostra seca e das massas úmida e imersa. Este método é baseado no princípio de Arquimedes.

Para a realização da pesagem das amostras imersas e úmidas, foi necessário que os corpos-de-prova permanecessem imersos em água um período de tempo de 24 horas. Para a realização do peso imerso, utilizou-se o princípio de Arquimedes, de deslocamento de um fluido determinando-se o mesmo. Mediu-se o peso seco (P_s), peso úmido (P_u) e o peso imerso em água

(P_i) e aplicando as Equações 7 a 9, calculou-se a Absorção de Água (AA), a Porosidade Aparente (PA) e a Densidade Aparente (DA), respectivamente.

$$A.A. = P_u - P_s / P_s \quad \text{[Equação 10]}$$

$$P. A. = P_u - P_s / P_u - P_i \quad \text{[Equação 11]}$$

$$D. A. = (P_s / P_u - P_i) \times \rho_L \quad \text{[Equação 12]}$$

Onde, ρ_L é a densidade do meio líquido. Para o cálculo da porosidade e densidades aparente foram utilizados 7 corpos-de-prova de cada composição. A massa seca foi determinada após secagem dos corpos-de-prova por um período de tempo não inferior a 24 horas em estufa a 70°C, para as amostras α -TCP puras e com as com fibras de PLGA, para as amostras de α -TCP com fibras de Alginato de Sódio o tempo foi também inferior a 24h, mas com a estufa a 50°C.

3.8. Estudo *In Vitro* do Cimento

Para realização do estudo *in vitro*, das amostras de cimentos de fosfatos de cálcio (puras, 1, 2,3, e 4% de fibras de PLGA e Alginato de Sódio) foram colocados em solução de SBF (*Simulated Body Fluid*) ou FCS (Fluído Corpóreo Simulado), líquido preparado em laboratório que simula os fluídos corpóreos (KOKUBO *et al.*, 1990; OHTUSKI *et al.*, 1991). A solução de SBF foi preparada para que apresentasse uma composição próxima de íons presentes no plasma sanguíneo humano. O SBF foi preparado em solução tampão de Tris/HCl (pH 7,4) adicionando-se NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, NaHCO₃, K₂HPO₄ e Na₂SO₄.

As amostras foram colocadas em frascos de polietileno na proporção de 50 mL/g. Os frascos foram selados e permaneceram em banho termostático na temperatura de 37±1°C nos seguintes períodos de tempo: 01 dia, 07 dias, 14 dias, sendo que a solução de SBF foi trocada a cada 48 horas. A cada período determinado, as amostras foram retiradas, lavadas em água destilada e secas em temperatura ambiente por pelo menos 24 horas.

3.9. Avaliação do Potencial de Citotoxicidade *In Vitro* – Método difusão Ágar

Os *scaffolds* aprovados nas etapas anteriores foram avaliados quanto à citotoxicidade conforme as normas: ISO 10993.5: 2009 – *Biological Evaluation*

for Medical Devices Tests for Cytotoxicity: In Vitro Methods, ASTM F895-84: 1984-Standard Test Method for Agar Diffusion Cell Culture Screening for Cytotoxicity e *US Pharmacopédia* 32, 2009 – *Biological Reactivity Tests In Vitro*. Para o ensaio de citotoxicidade foram usadas células da linhagem de fibroblastos. Os compósitos aprovados nas etapas anteriores foram avaliados no Instituto Adolfo Lutz – Seção de Culturas celulares, sendo utilizado o método de difusão em Ágar.

A linhagem Celular (NCTC Clone 929), células de tecido conjuntivo de camundongo (ATCC CCL-1) e são semeadas em placas de Petri e incubadas por 48 horas para formação da monocamada celular. O meio de cultura líquido é substituído pelo meio de cobertura sólido, que é composto por partes iguais do meio duas vezes concentrado e Ágar com vermelho neutro.

As amostras são colocadas sobre esse meio de cobertura e as placas novamente incubadas por 24 horas. Observa-se macro e microscopicamente o índice de zona (IZ) que é a área não corada pelo corante vital. As amostras são testadas em quadruplicadas em placas separadas. A tabela 5, apresenta a descrição do índice de zona (IZ) observada no microscópio.

Tabela 5: Descrição e classificação do índice de zona (IZ).

IZ	DESCRIÇÃO	CLASSIFICAÇÃO
	Nenhuma Zona sob e ao redor da amostra	Nenhuma
	Alguma alteração ou degeneração celular sob a amostra	Fraca
	Zona limitada sob a amostra	Leve
	Zona entre 0,5 – 1,0 cm ao redor da amostra	Moderada
	Zona maior que 1,0 cm ao redor da amostra	Severa

As amostras sólidas são colocadas diretamente sobre o meio de cobertura. O controle positivo foi fragmentado de 0,5 cm x 0,5 cm de látex tóxico e o controle negativo são utilizados discos de papel de filtro atóxico com 0,5 cm de diâmetro.

3.10. Avaliação *In Vivo* dos *scaffolds* de Alginato de Sódio Puro

Foram utilizadas células-tronco mesenquimais derivadas do pulmão e de tecido-adiposo de camundongos. Camundongos adultos (8-12 semanas) da linhagem C567Bl/6 foram obtidos da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética local.

As culturas de células-tronco foram estabelecidas conforme estabelecido por da Silva Meirelles et al., 2006. Resumidamente, os tecidos foram coletados, digeridos com o uso de colagenase tipo I (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA), lavados e colocados em cultura em meio Dulbecco's Modified Eagle's contendo HEPES (HDMEM, Sigma) e 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab). As culturas foram mantidas em estufa umidificada a 37°C, com 5% de CO₂ no ar.

O meio foi trocado a cada 2-3 dias. Quando as células atingiam 80%-90% de confluência, eram removidas com tripsina (0.25% trypsin/0.1% EDTA, Sigma), e passadas para novos frascos na taxa de repique apropriada. As células foram utilizadas nos experimentos entre as passagens 3 a 8.

As culturas foram observadas com um microscópio invertido com contraste de fase (Axiovert 25; Zeiss, Hallbergmoos, Alemanha), e fotografadas com câmera digital (AxioCam MRc, Zeiss), utilizando o software AxioVision 3.1 (Zeiss).

Para análise da capacidade de adesão das células-tronco ao biomaterial, as peças foram colocadas em um poço de uma placa de cultivo de 24 poços e semeadas com 5×10^4 células, em 50 μ l de HDMEM. Após 3 horas de incubação a 37°C em estufa com 5% de CO₂, adicionou-se 500 μ l de HDMEM em cada poço, o biomaterial foi agitado dentro do meio para liberação das células não aderidas, e transferido para um novo poço, com 500 μ l de HDMEM fresco.

O poço original foi incubado por mais 2 horas a 37°C, para aderência de células que tivessem sido liberadas pela agitação do biomaterial. Após, o meio foi aspirado, e o poço recebeu 100 μ l de corante Giemsa, sendo lavado com PBS depois de 3 minutos. O fundo do poço foi analisado ao microscópio invertido, para avaliação do número de células liberadas após agitação do biomaterial.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Caracterização do cimento de fosfato de cálcio (α -TCP)

4.1.1. Difração de Raios X (DRX) do α -TCP

A presença de β -TCP como fase indesejada no pó de α -TCP obtido por diversos métodos tem sido reportada em literatura (BERMÚDEZ *et al.*, 1994; TAMPIERI *et al.*, 1997; FAMERY *et al.*, 1994; FERNÁNDEZ *et al.*, 1996). Até o momento ainda não são conhecidos registros sobre a obtenção de α -TCP puro segundo Motisuke, o material mais puro registrado foi obtido por reação entre CaCO_3 e DCPA a 1300 °C, por 6 h, seguido de resfriamento brusco (BERMÚDEZ *et al.*, 1994), e continha ao redor de 5 % de β -TCP, por causa de uma baixa quantidade à alta velocidade de resfriamento. Usualmente, os α -TCP obtidos por esse método contêm aproximadamente 15 % de β -TCP (MOTISUKE, 2010 e GINEBRA *et al.*, 1997).

Como pode ser observado nas Figuras 7, também os materiais obtidos neste trabalho por reação entre CaCO_3 e DCPA contêm β -TCP como fase indesejada.

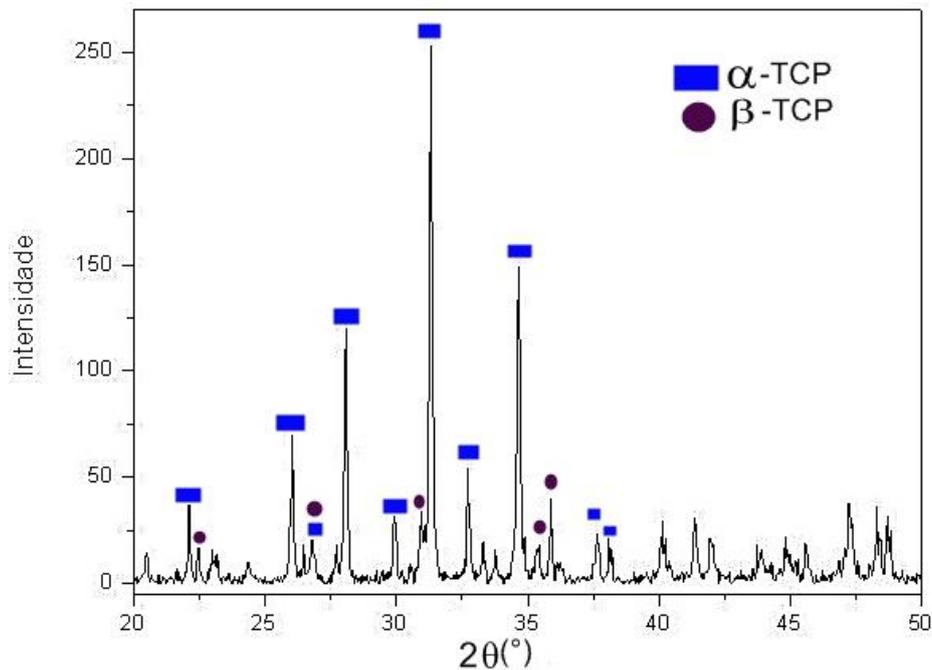


Figura 7: Difratograma de Raios X (DRX) do α -TCP obtido com temperatura de 1300°C, durante 5 horas e resfriamento brusco. Moagem a seco dos reagentes durante 2 horas.

A figura 7 apresenta os picos característicos do Fosfato tricálcico (α -TCP) para uma composição $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$. A partir de 40° (2θ) não são apresentados picos característicos, pois ainda não foram datados na literatura. A fase estável, do fosfato tricálcico, a baixa temperatura é o β -TCP, até aproximadamente 1125°C. A partir de 1200°C a fase β -TCP inicia o processo de transformação em α -TCP, mas a fase β -TCP não é eliminada totalmente da nova fase metaestável (α -TCP) apresentando um percentual residual.

Segundo Carrodeguas *et. al.*, a transformação de fase β para α se inicia entre 1150 e 1200°C e entre 1300 e 1350°C se inicia uma região de estabilidade do α -TCP puro que se estende até 1500°C (CARRODEGUAS, *et. al.*, 2008).

Atualmente, pesquisadores estão estudando uma forma de obtenção de α -TCP puro sem e com a utilização de dopantes durante a sinterização do cimento. Pietak, *et al.*, 2007 avaliou a ação do silício como estabilizante da fase α pode ser evidenciada comparando-se as amostras TCP- com silício e α -TCP sem dopagem com silício. Utilizou um mesmo protocolo de queima a 1400°C (taxas de aquecimento e resfriamento de 10°C/minuto e 2 horas de patamar).

Provavelmente para se conseguir maior pureza para o α -TCP sem dopagem com silício seria necessário utilizar um tempo de patamar mais elevado para garantir a total transformação β para α antes de iniciar o resfriamento da amostra. (MOTISUKE, M., 2010)

4.2. Distribuição de tamanhos de partículas

Para determinar o tamanho das partículas, foi utilizado o método de difração por laser. Essa técnica tem como princípio a utilização do espalhamento de luz para determinar o tamanho das partículas, pelo seu volume. Por exemplo, se 11% da distribuição está no tamanho entre 6,9 - 7,75 μm significa que o volume total de todas as partículas com diâmetro nessa variação representa 11% do volume total de todas as partículas na distribuição. Esse método é utilizado para partículas com diâmetros entre 0,5 μm até 350 μm . Foram realizadas três leituras para a mesma amostra.

Para que as partículas permaneçam dispersas em solução, foi utilizado ultrassom por 01 minuto antes da realização da análise. Os resultados da análise granulométrica a laser mostra que o tamanho de partícula do fosfato de cálcio (α -TCP) obtido ficou na média de 8 μm , apresentada na figura 8, observando um tamanho ideal de partícula do cimento que deve ser menor e/ou igual a 10 μm .

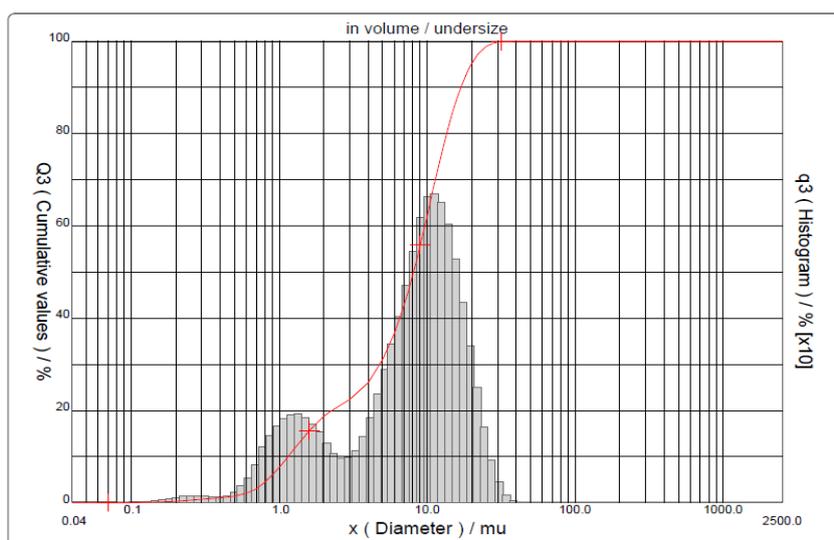


Figura 8: Gráfico do tamanho de partícula do α -TCP utilizado no trabalho.

Segundo Ginebra *et al.*, o tamanho de partícula é um fator chave, que modifica significativamente as propriedades finais do cimento, e que

especialmente, afeta a cinética da reação química e a consolidação mecânica do cimento. Entretanto, é um parâmetro que pode ser muito útil para ajustar o comportamento do cimento de acordo com a aplicação clínica requerida.

Observa-se o tamanho médio das partículas (pós-moagem) um valor compatível aos da literatura. A faixa encontrada em trabalhos anteriores é de um diâmetro médio de 20 a 2 μ m (CHOW *et al.*, 1997). Outra importância do tamanho médio das partículas dos CFC é na influencia da quantidade de líquido necessário para obtenção do material em forma de pasta para sua pega posteriormente.

Propriedades de superfície como rugosidade, área específica e porosidade da interface entre o material e o ambiente biológico (*in vivo* ou *in vitro*) podem ser controladas pela modificação do tamanho de partícula no pó iniciante utilizado no cimento (GINEBRA *et al.*, 2004).

E, como tem sido apresentada em investigações recentes, essa propriedade, em nível micro e nanoestrutural pode ter uma forte influência na adsorção de proteínas e, conseqüentemente, na adesão de osteoblastos (BOYAN *et al.*, 1999, WEBSTER *et al.*, 2000). Com isso, é de grande importância a verificação do tamanho dos grãos utilizados na preparação do cimento, pois como foi mencionada qualquer mudança nesse parâmetro pode alterar significativamente as propriedades finais do material.

4.3. Grupamentos Químicos

As principais bandas identificadas no espectro do Fosfato Tricálcico (α -TCP) são os dos grupos funcionais de ortofosfatos (PO_4), hidroxilas (OH), hidrogenofosfato (HPO_4) e provável pirofosfato (P_2O_7), estes dois últimos em quantidade de traço, já que seus picos não são expressivos e nem observados em outras posições do espectro, características destas espécies, como mostra a figura 9.

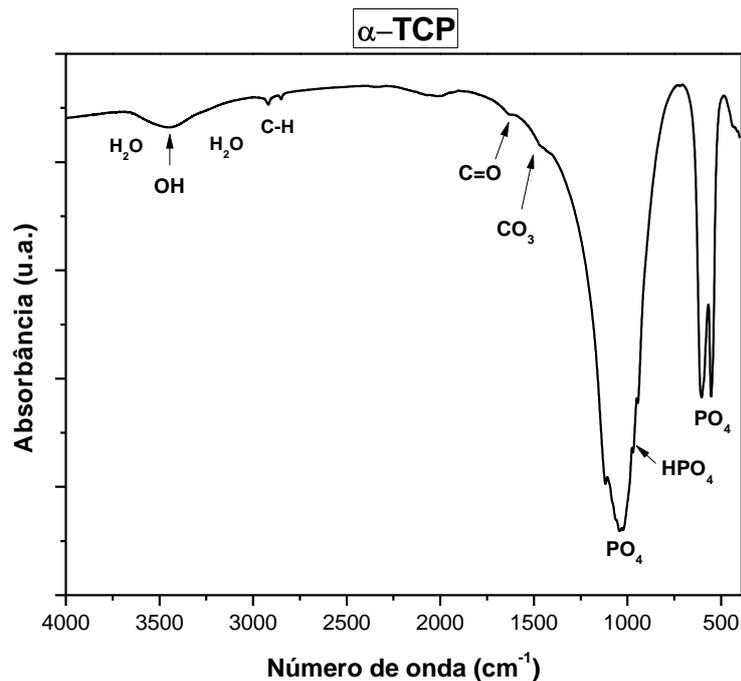


Figura 9: Espectro de Infravermelho do α -TCP utilizado nas amostras.

Observa-se a presença de picos em 660 e 563 cm^{-1} , característico do modo (P-O) ou PO_4 . 967 cm^{-1} referente à ligação PO-H modo de estiramento de grupos HPO_4 ; 1030 cm^{-1} , referente a grupos PO_4 ; 1467 e 1423 cm^{-1} referente à ligação C-O de grupos CO_3 , 1640 cm^{-1} referente à deformação axial de (C=O); 2918 e 2847 cm^{-1} deformações axiais de C-H alifático; 3456 cm^{-1} referente à ligação O-H de grupos (OH); 3665 e 3075 cm^{-1} referente à água (H_2O) absorvida.

Conforme o estudo de Turbiani, *et. al.*, também não identificamos no espectro de α -TCP há ausência das bandas em 460 cm^{-1} e 740 cm^{-1} e de uma banda isolada em 600 cm^{-1} , que são características do α -TCP, indicando que o pó inicial refere-se ao β -TCP. O β -TCP é facilmente identificado por apresentar uma banda larga de 900 a 1200 cm^{-1} . (TURBIANI, *et. al.*,2000).

4.4. Determinação do tempo de pega: Método de Impedância

Foi realizado um experimento para determinação do tempo de pega total do cimento α -TCP. O método consistiu em avaliar a impedância da pasta formada por α -TCP mais uma fase líquida de água deionizada e fosfato de sódio bibásico-dodecahidratado P.A. ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) com uma concentração

de 2,5% Na_2HPO_4 , ou seja, quando um determinado componente cria uma resistência e gasta energia em forma de calor, tem-se o Efeito Joule.

No caso, esta forma de trocas de energias foi por uma reação oxirredução dos íons (uma forma reduzida e uma forma oxidada) que constituía a pasta. A figura 10, mostras os resultados obtidos no experimento.

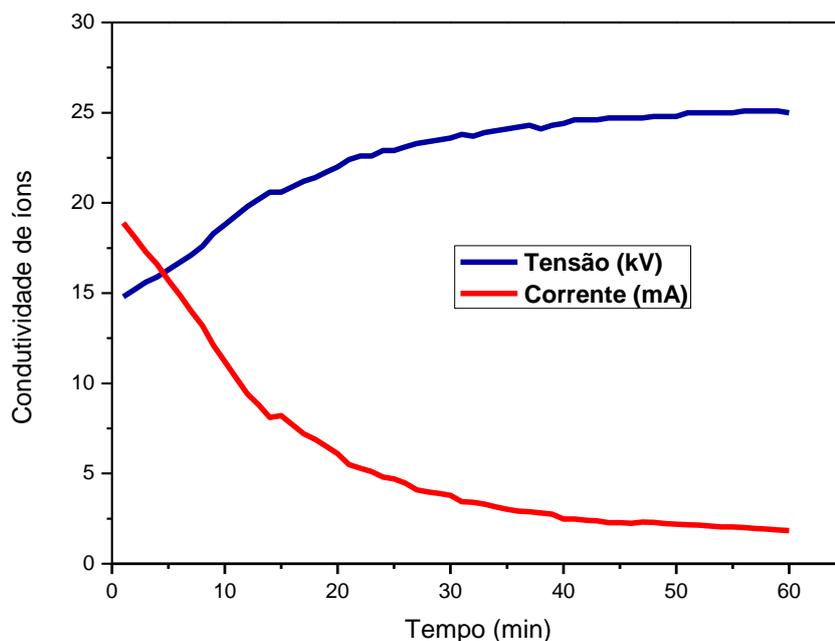


Figura 10: Gráfico de Impedância (tempo x condutividade iônica) apresentando os valores de Tensão (kV) e corrente (mA) durante 60 min.

O gráfico (figura 10) mostra que o tempo de pega total do cimento foi de 60 minutos e que quanto maior o tempo menor fica a condutividade iônica dentro do material, mas a sua tensão e também a sua resistividade aumentam ao longo do período de endurecimento do cimento.

4.5. Avaliação em SBF do cimento de α -TCP

Preparou-se uma composição de cimento de fosfato de cálcio com 100% de α -fosfato tricálcico, acrescidos de uma solução a 2,5% de Na_2HPO_4 , com uma relação líquido/pó de 0,32 mL/g. A pasta obtida, moldada e mantida por 24 horas a 100% de umidade e colocada em uma solução SBF (*Simulated Body Fluid*) a 36,5°C em uma estufa com controle de temperatura, por 24 horas e 14 dias, sendo trocada a solução a cada 2 dias. O SBF foi feito com os seguintes

componentes químicos: NaCl, NaHCO₃, KCl, K₂HPO₄.3H₂O, MgCl₂.6H₂O, HCl, CaCl₂, Na₂SO₄ e Tris (hidroxilamina) aminometano (TRIS).

O Na₂HPO₄ é uma solução que atua como aceleradora da reação de pega, por exemplo, sendo utilizada como controladores da reação de transformação do α -TCP em CDHA (BERMUDEZ et al., 1994; GINEBRA et al., 1995). Resultados obtidos em laboratório, por Bermudez e Ginebra, para a utilização de líquidos com concentrações superiores a 2,5% de Na₂HPO₄ demonstraram que o tempo de pega reduz-se drasticamente, sendo impossível a manipulação do material. A figura 11 mostra os valores de porosidade aparente das amostras de α -fosfato tricálcico sem adição de fibras na sua composição.

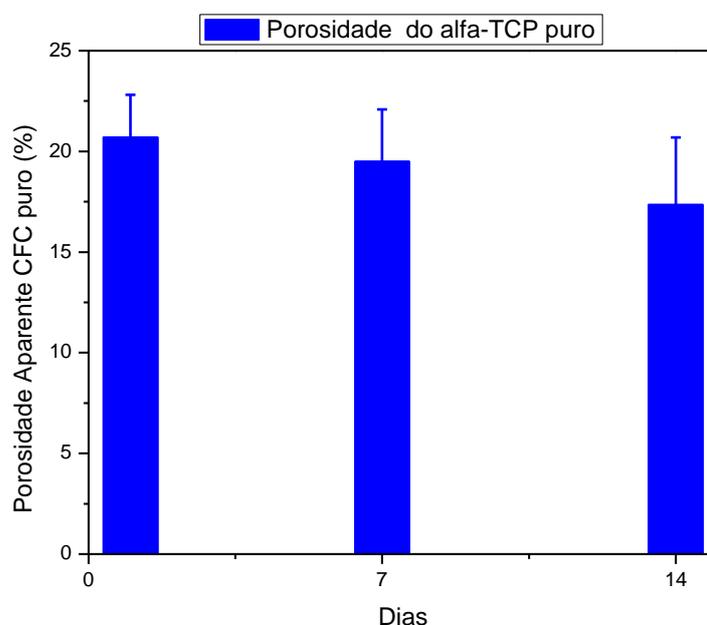


Figura 11: Valores de P. A. das amostras com α -fosfato tricálcico durante 14 dias.

Observa-se que a porosidade aparente das amostras com 100% de α -TCP, na sua composição, diminuiu o seu valor durante os 14 dias. O valor inicial medido para 24 horas de imersão foi de (20,71 ± 2,1), em sete dias este valor diminui para (19,51 ± 2,58) e chegando ao décimo quarto dia a um valor de (17,4 ± 3,35). A porosidade das amostras 100% de α -TCP teve um decréscimo de aproximadamente 16% em 14 dias.

Segundo Machado *et al.*, este comportamento de diminuição no valor da

porosidade aparente pode ser explicado pela criação de uma fase de Hidroxiapatita deficiente em Cálcio ($\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$) como foi constatado no trabalho de Machado (2009). Isso pode ocorrer durante este período em que amostras ficam submersas e SBF. Na figura 12 apresenta a densidade aparente (D.A.) e a absorção aparente de água (A.A.) das amostras 100% de α -TCP (Machado *et al.*,2009).

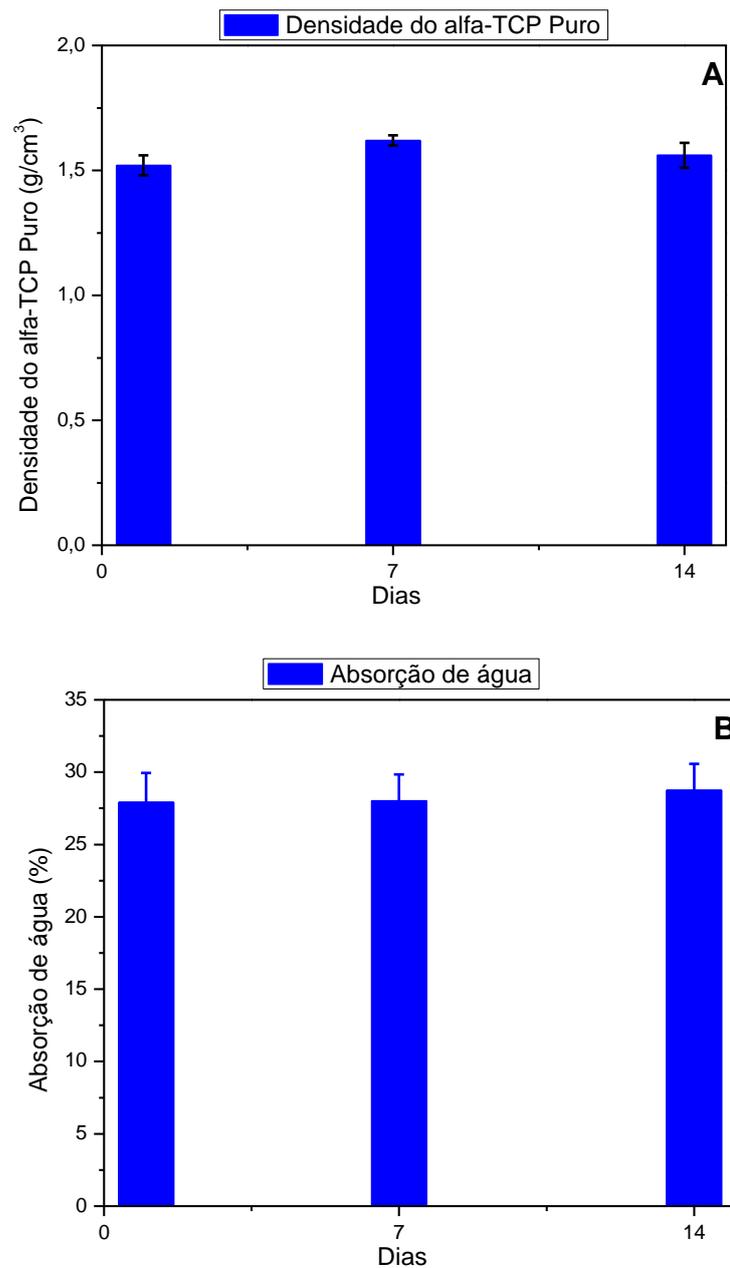


Figura 12: (A) Densidade Aparente (D.A.) das amostras puras de α -TCP. (B) Valores de absorção de água das amostras de α -TCP puras.

O primeiro gráfico (figura 12 (A)) apresenta que a densidade aparente das amostras sofreu um aumento, sendo um resultado coerente com a diminuição da porosidade das amostras. Em 24 horas o valor de densidade foi de $(1,52 \pm 0,04)$ g/cm³, no sétimo dia para $(1,62 \pm 0,02)$ g/cm³ e em 14 dias $(1,56 \pm 0,05)$ g/cm³. A absorção aparente de água das amostras pura de cimento (figura 12 (B)) apresentou

um pequeno aumento de 0,83% com um erro médio de $\pm 1,89$ na absorção de água nas amostras durante 14 dias submersas em SBF a 37°C.

Comparando com a literatura, Gbureck et. al., obtiveram o α -TCP pelo método convencional, e obtiveram blocos de cimento com pós moídos por 60 e 240 minutos com densidade aparente de 1,47 e 1,44 g/cm³, respectivamente e com porosidade de 46,5 e 48,2%, respectivamente. Miño-Fariña et. al., também obtiveram valores de $(1,64 \pm 0,05)$ g/cm³ de densidade aparente e porosidade aparente de $47,57\% \pm 1,66$ (GBURECK et. al., 2004, MIÑO-FARIÑA et. al., 2009).

Portanto, mesmo os pós de α - fosfato tricálcico obtidos por métodos diferentes conforme a literatura consultada, o pó de α -TCP obtido neste trabalho esta dentro dos padrões de valores tanto para porosidade aparente e absorção de água.

4.6. Obtenção das Fibras de Alginato de Sódio e PLGA por TIPS

4.6.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de PLGA e Alginato de Sódio por TIPS

Nesta seção apresentaremos as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para todas as fibras de Alginato de Sódio. A figura 13 mostra as micrografias das amostras de Alginato de Sódio com concentrações de 0,4; 0,6 e 0,8% que foram dissolvidas em água deionizada, colocadas para congelar por 24 horas e liofilizadas.

Observa-se uma aparência de flocos, principalmente, para as amostras 0,4% e 0,6%. A presença de uma superfície expondo a uma estrutura lamelar para amostra com maior concentração 0,8%. Esta diferença entre as amostras 0,4% e 0,6% com a amostra 0,8% pode justificar que com aumento na concentração na quantidade de Alginato de Sódio dissolvido em água deionizada mostrando uma estrutura mais compactada após a sua liofilização e com alguma tendência a formação de flocos e lamelas.

Esta estrutura pode ser comparada com o trabalho que Uchida, que mostra uma imagem de MEV de uma estrutura porosa na superfície de um *scaffold*. Devido à retirada do sal, a superfície do *scaffold* possui uma estrutura porosa. Eles construíram esta estrutura 3D para ser utilizada para reconstrução de artéria carótida (UCHIDA, *et.al.*, 2008).

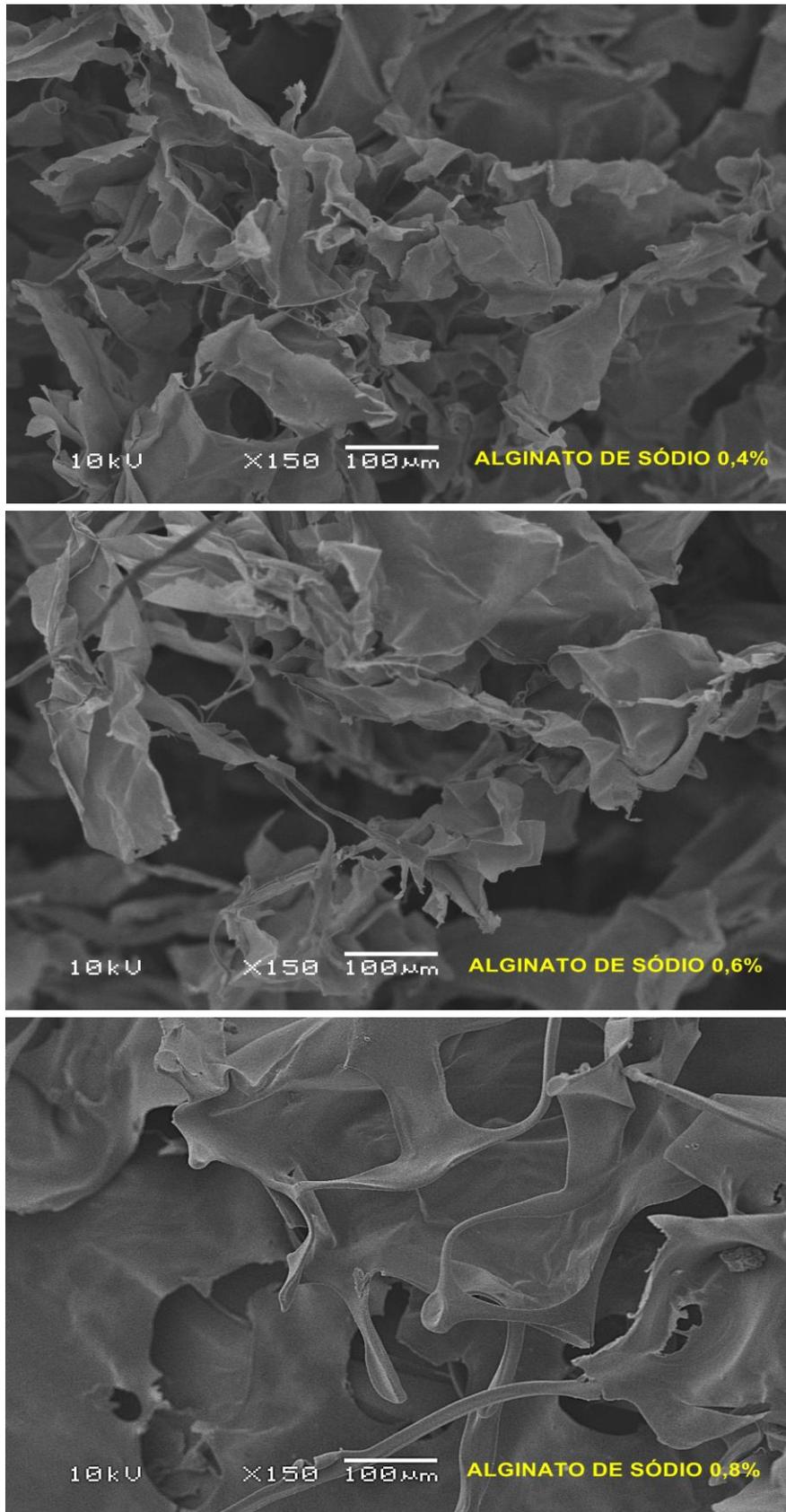


Figura 13: As amostras de Alginato de Sódio com concentrações de 0,4; 0,6 e 0,8%.

É possível observar a presença de defeitos tipo escamas e /ou lamelas para as duas primeiras amostras (0,4% e 0,6%). Há presença de escamações e ondulações em toda superfície que podem favorecer a proliferação celular entre as mesmas. Por este método, não foi possível obter fibras de Alginato de Sódio e PLGA, sendo que, as amostras de PLGA não permitiram a realização de microscopia, pois elas formaram um filme fino transparente (similar a um filme de PVC) impossibilitando sua observação microscópica.

Feita uma pesquisa na literatura de patentes, verificou-se várias possibilidades de não ter formado fibras para os dois materiais usando este método. No caso do Alginato de Sódio, avaliou-se que para obter fibras de Alginato do sódio na maior parte das pesquisas o material é extrudado, utilizado o método de fiação e que também há mistura do Alginato de Sódio a outro material. Algumas destas invenções são citadas abaixo.

Segundo a invenção de Vidyadhar, refere à incorporação de emulsões individuais ou duplas em uma matriz de polissacarídeo reticulada selecionada de Alginato de Sódio, particularmente quando pegada em uma solução salina. A formação das fibras para utilização em compósitos é feitas por extrusão e foram usadas como processos de encapsulação (VIDYADHAR S., R., et al, PI0612854-8 A2, 2006).

Outra invenção utilizou método de fiação para obtenção de fibras de Alginato e carragenina. A fibra preparada tinha as vantagens de boa biocompatibilidade, degradação fácil e material têxtil renovável. (YANZHI XIA, CN 101509152, 2009).

Na invenção Yanzhi Xia, o Alginato de Sódio em pó (micro-nano) é misturado em uma solução de celulose bacteriana, que dispersa uniformemente o Alginato de Sódio pó por ondas de ultrassons e realização de fiação molhado, em que o conteúdo do Alginato de Sódio no compósito.

O método de obtenção de fibras de PLGA, descritas na literatura, na maioria é pelo método de *Electrospinning* ou extrusão. Outro fator importante é que o PLGA é dissolvido e congelado instantaneamente com nitrogênio líquido e liofilizado, originando a formação de fibras ou são utilizados ultra congeladores, onde o material dissolvido é colocado por algumas horas e após

liofilizado (RAJESH V., *et.al.*, 2010; SUNG J. K, *et al.*, 2010, VICTOR J. CHEN, *et.al.*, 2004).

4.6.2. Grupos químicos: Espectroscopia de Infravermelho do Alginato de Sódio e PLGA

Para as amostras de Alginato de Sódio que foram liofilizadas, os espectros de infravermelho (IV) não mostraram alterações visíveis nas suas regiões de bandas características, mesmo sendo liofilizadas.

A figura 14 mostra o espectro das amostras de Alginato de Sódio por liofilização.

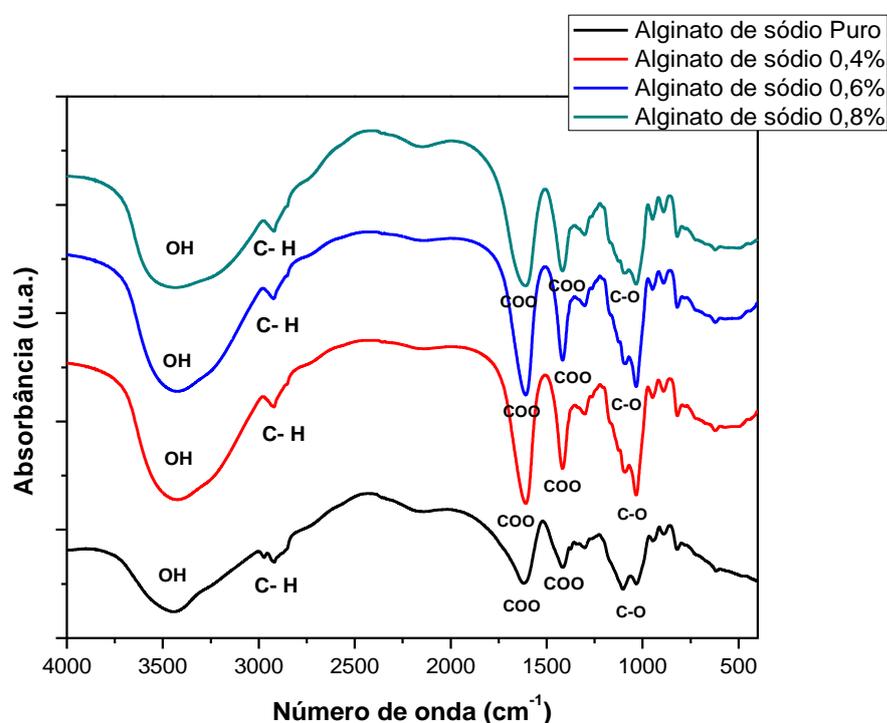


Figura 14: Espectro de Infravermelho das amostras de Alginato liofilizadas em diferentes concentrações.

As bandas e/ou picos visualizados no espectro de infravermelho correspondem às vibrações de simétricas de COO (1618 cm^{-1}), vibrações assimétricas de COO (1417 cm^{-1}), vibrações características de hidroxilas (OH) na água (banda entre $3000\text{ a }3800\text{ cm}^{-1}$), alongamento de C-H alifático (2924 cm^{-1}), alongamento de C-O (1035 cm^{-1}), que são característicos de polissacarídeos (PATEL *et al.*, 1999).

Os dados obtidos neste trabalho são os mesmos obtidos por Isiklan *et al.* e Sarmiento *et al.* No caso de Isiklan, apresentam espectros do Alginato de

Sódio contendo picos não identificados em 1097, 1255 e 1740 cm^{-1} , este último podendo estar sobreposto ao pico de 1618 cm^{-1} . Portanto, conforme os dados na literatura e os obtidos neste trabalho, mesmo dissolvendo, congelando e liofilizando o material, a sua composição química continua a mesma (ISIKLAN *et al.*, 2009 e SARMENTO *et al.*, 2006).

A figura 15 apresenta os espectros das amostras de PLGA puro e das fibras que foram gotejadas de um até cinco vezes em metanol (CH_4O). Esse espectro está sendo apresentado nesta sessão, pois como no caso do Alginato de Sódio não houve contaminação e degradação do polímero após ser dissolvido e liofilizado.

Não foram apresentados os espectros de PLGA dissolvidos em álcool etílico ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) e isopropílico ($\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$), pois mesmo pertencendo ao mesmo grupo das hidroxilas e com um grau de toxicidade diferentes, foi escolhido apresentar somente os espectros de PLGA dissolvidos em metanol, pois é o reagente com maior nocividade à saúde humana.

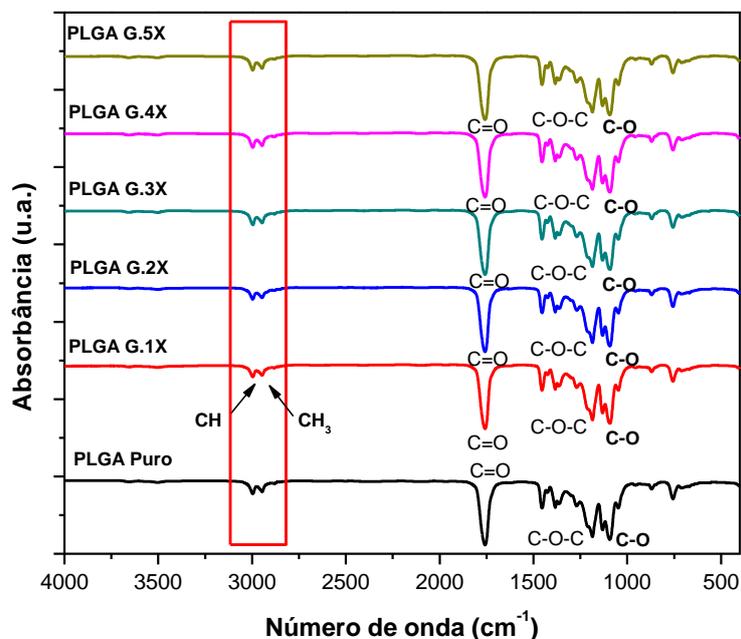


Figura 15: Espectro de Infravermelho das amostras de Poli (ácido láctico-co-glicólico) PLGA pura e os espectros dos PLGA gotejados em Metanol por até cinco vezes.

As absorções características do PLGA são três fortes bandas devidas a vibrações do grupo C-CO-O-C. Ou seja, a banda devida ao estiramento do C=O em 1751 cm^{-1} , a banda devida ao estiramento assimétrico do C-O em 1195 cm^{-1} e em 1110 cm^{-1} ao estiramento simétrico C-O-C. A ausência de uma banda intensa na região $3500\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ (estiramento do grupamento O-H) é um indicativo de ausência de subprodutos de hidrólise do PLGA.

Segundo os pesquisadores Motta *et al.*, Drumond *et al.* os copolímeros sintetizados foram analisados estruturalmente através de espectroscopia do infravermelho. Todos os copolímeros apresentam as seguintes bandas de absorção: $2997\text{--}2965\text{ cm}^{-1}$ (CH_2 , CH_3), 1759 cm^{-1} (C=O), $1360\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$ (CH_3), 750 cm^{-1} (CH), que caracterizam o PLGA. Neste trabalho concluímos com os espectros de infravermelho (IV) que não ocorreu a degradação do material (MOTTA, A. C., *et al.*, 2006, DRUMOND, W. S. *et al.*, 2004).

Existem várias formas de degradação e contaminação de polímeros. O tipo de polímero e a etapa de polimerização irão influenciar a estabilidade do material e a sua suscetibilidade a determinados tipos de reações de degradação. Na polimerização, o tipo de grupo químico ou resíduo que permanece na cadeia polimérica poderá atuar como ligação fraca, facilitando a

degradação térmica. Neste caso o efeito vai se manifestar de forma acentuada se houver a formação de peróxidos. (CÁCERES, *et. al.*, 2004)

Em outro trabalho, a degradação de policarbonato em contato com diversos fluidos foi avaliada flexionando o corpo de prova sob uma determinada tensão (como em um ensaio de flexão com dois apoios), introduzindo o fluido e monitorando a relaxação de tensão. Os fluidos usados foram: metanol, álcool isopropílico e etileno glicol monometil éter. (PINHEIRO, *et al.*, 2004).

Os autores mostraram que a flexão crítica do policarbonato em álcool isopropílico é de 1,21 %, em metanol é de 1,74 % e no éter monometílico do etileno glicol é de 0,29 %. Sendo que no último caso o corpo de prova rompeu 22 segundos depois da exposição ao líquido. É interessante que, segundo os autores, o metanol tem o maior coeficiente de difusão em policarbonato, seguido do éter monometílico do etileno glicol. No caso do álcool isopropílico o coeficiente de difusão é muito baixo para ser medido, indicando que o efeito de *stress-cracking* é realmente localizado na superfície do corpo de prova. (DE PAOLI, *et. al.*, 2008).

4.7. Obtenção das Fibras de Alginato de Sódio e PLGA por Gotejamento

4.7.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das fibras de PLGA e Alginato de Sódio por gotejamento

Nesta seção apresentaremos as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para todas as fibras de PLGA. Para facilitar a análise das amostras, todas serão obtidas com aumento de 33 vezes, com objetivo de ter uma visualização geral das fibras, 500 vezes para ter uma observação mais próxima das fibras ou de regiões relevantes para este trabalho.

A figura 16 mostra as amostras de PLGA que foram dissolvidas em clorofórmio e gotejadas até cinco vezes em álcool isopropílico (A) e metanol (B) e álcool etílico (C) com uma concentração de 1%

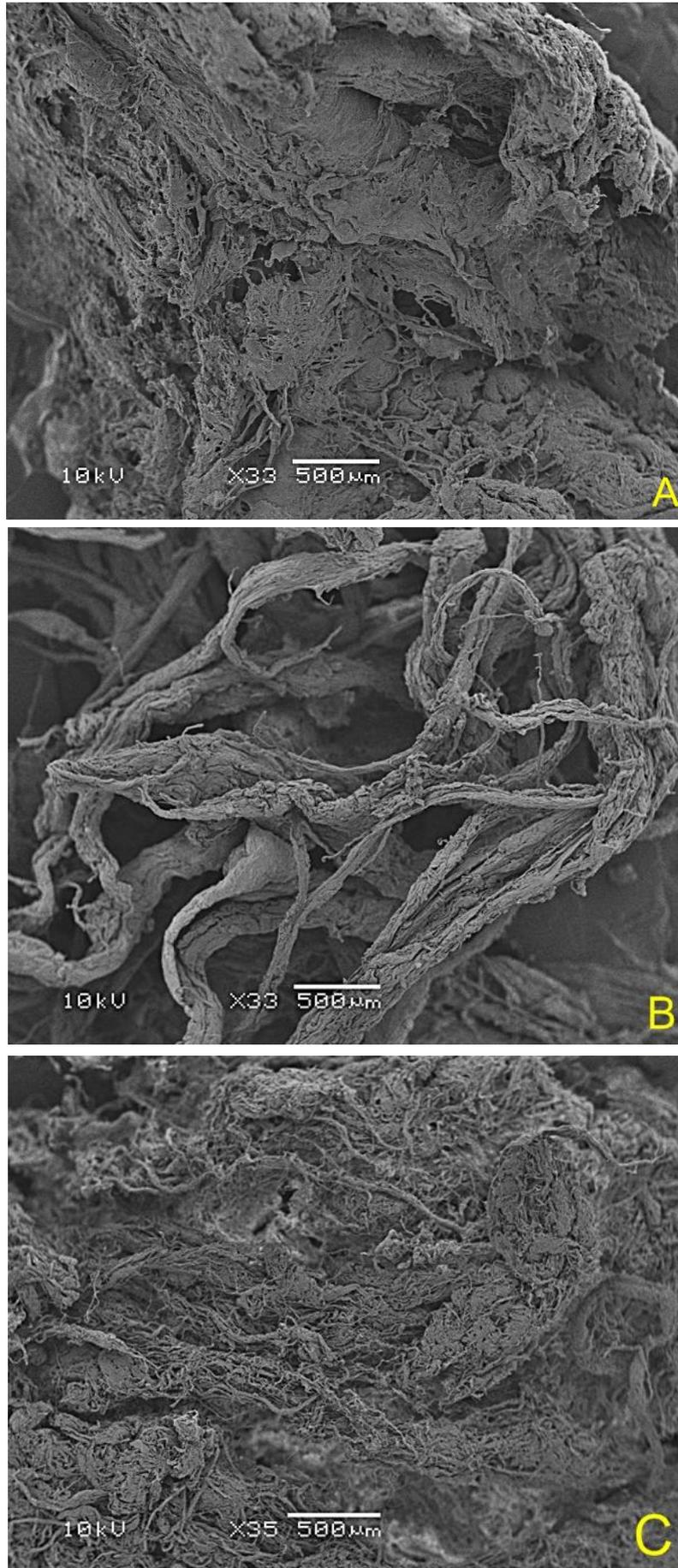


Figura 16: Amostras de PLGA gotejadas até cinco vezes em álcool isopropílico (A) e metanol (B) e álcool etílico (C) com uma concentração de 1%.

Nesta sequencia de micrografias das fibras de PLGA que foram dissolvidas em clorofórmio e depois de gotejadas em diferentes reagentes podemos notar o efeito de formação de fibras.

Para melhor compreender o efeito da influência das amostras serem gotejadas em diferentes reagentes a figura 17 mostra as mesmas amostras da figura 16, mas com um aumento maior.

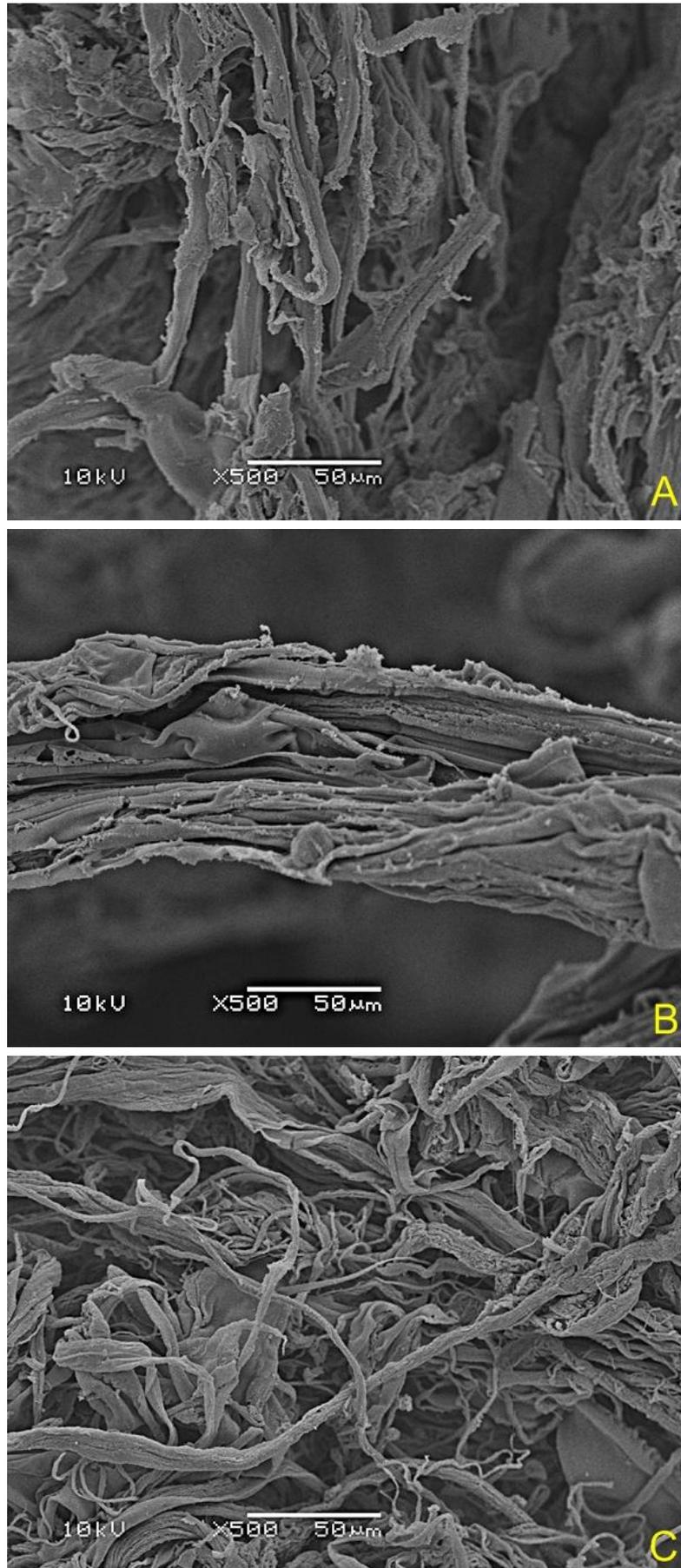


Figura 17: Amostras de PLGA gotejadas até 5 vezes em álcool isopropílico (A) e metanol (B) e álcool etílico (C) com uma concentração de 1%.

Já para amostras gotejadas em metanol ocorreu a formação de fibras homogêneas apesar de estarem agrupadas. Este efeito de homogeneização não é observado nas amostras gotejadas em álcool isopropílico onde é observada uma rede de fibras rugosas e/ou com certo grau de degradação e, novamente, agrupadas.

Como no caso do Alginato de Sódio que não foi gotejado e formou uma estrutura porosa (vide 4.2.1.) também foram confeccionadas amostras de fibras de PLGA e congeladas e liofilizadas em uma placa de 12 poços, utilizada para cultura celular, com intenção de obter um *scaffold*. Foram enviadas para avaliação no Departamento de Genética da UFRGS, mas não obtivemos sucesso, pois as fibras de PLGA são hidrofóbicas e não resultou na proliferação e no crescimento celular (células-tronco mesenquimais).

Todas estas amostras gotejadas em metanol e isopropílico comparadas com as amostras em etanol mostraram uma maior homogeneidade nas fibras, menores agrupamentos entre fibras e pouquíssima rugosidade. Por isso, a confecção dos corpos de prova foram escolhidas as fibras de PLGA gotejadas em álcool etílico e depois de liofilizadas.

Na próxima sequência de micrografias são apresentadas as amostras de Alginato de Sódio que foram dissolvidas em água deionizada e depois de gotejadas em diferentes reagentes, podemos notar o efeito de formação de fibras. Todas foram obtidas com aumento de 33 vezes, com objetivo de ter uma visualização geral das fibras, 500 vezes para ter uma observação mais próxima das fibras ou de regiões relevantes para este trabalho.

A figura 18 mostra as amostras de Alginato de Sódio que foram dissolvidas e gotejadas cinco vezes em álcool etílico (A), álcool isopropílico (B) e em metanol (C) com concentração de 1%.

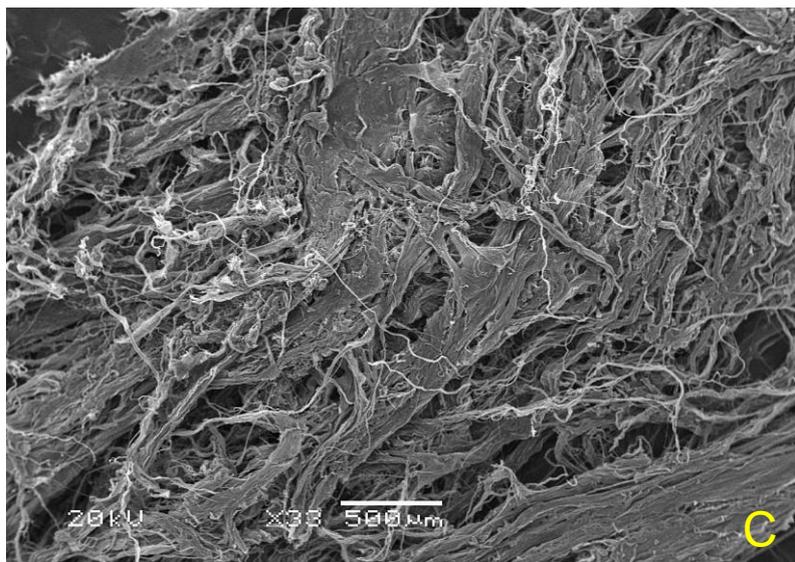
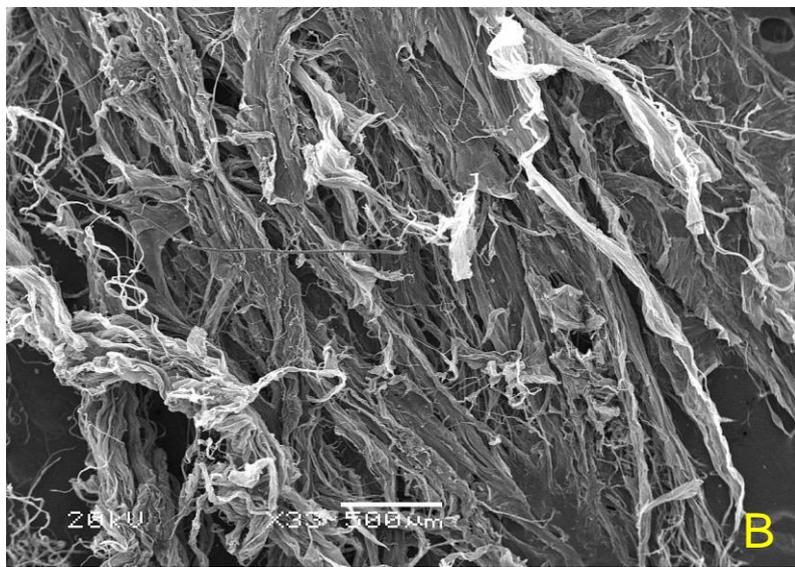
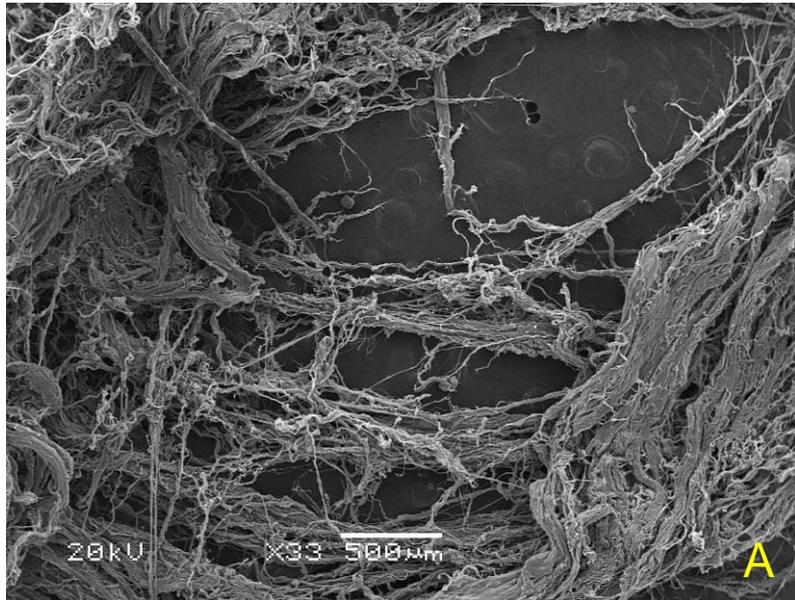


Figura 18: Fibras de Alginato de Sódio gotejadas cinco vezes em álcool etílico (A), metanol (B) isopropílico e em (C) metanol com concentração de 1%.

Comparando as imagens da figura 13 com as da figura 18, observa-se uma mudança significativa nas micrografias com relação ao processo de liofilização apenas (TIPS). Com o gotejamento do Alginato de Sódio foi possível obter fibras e com isso a sua estrutura física mudou significativamente, pois não mais apresenta uma estrutura lamelar e esponjosa.

Como no caso das fibras de PLGA, as fibras escolhidas para construção dos compósitos foram as gotejadas em álcool etílico. Fazendo uma comparação das micrografias da figura 18 (A, B e C), nota-se que as fibras menos aglomeradas e homogêneas são as da figura 18 (A) e as com maior heterogeneidade são as da figura 18 (B).

A figura 19 apresenta as amostras de Alginato de Sódio que foram dissolvidas e gotejadas até cinco vezes em álcool etílico (A), álcool isopropílico (B) e em metanol (C) com concentração de 1% obtida com aumento de 500 vezes.

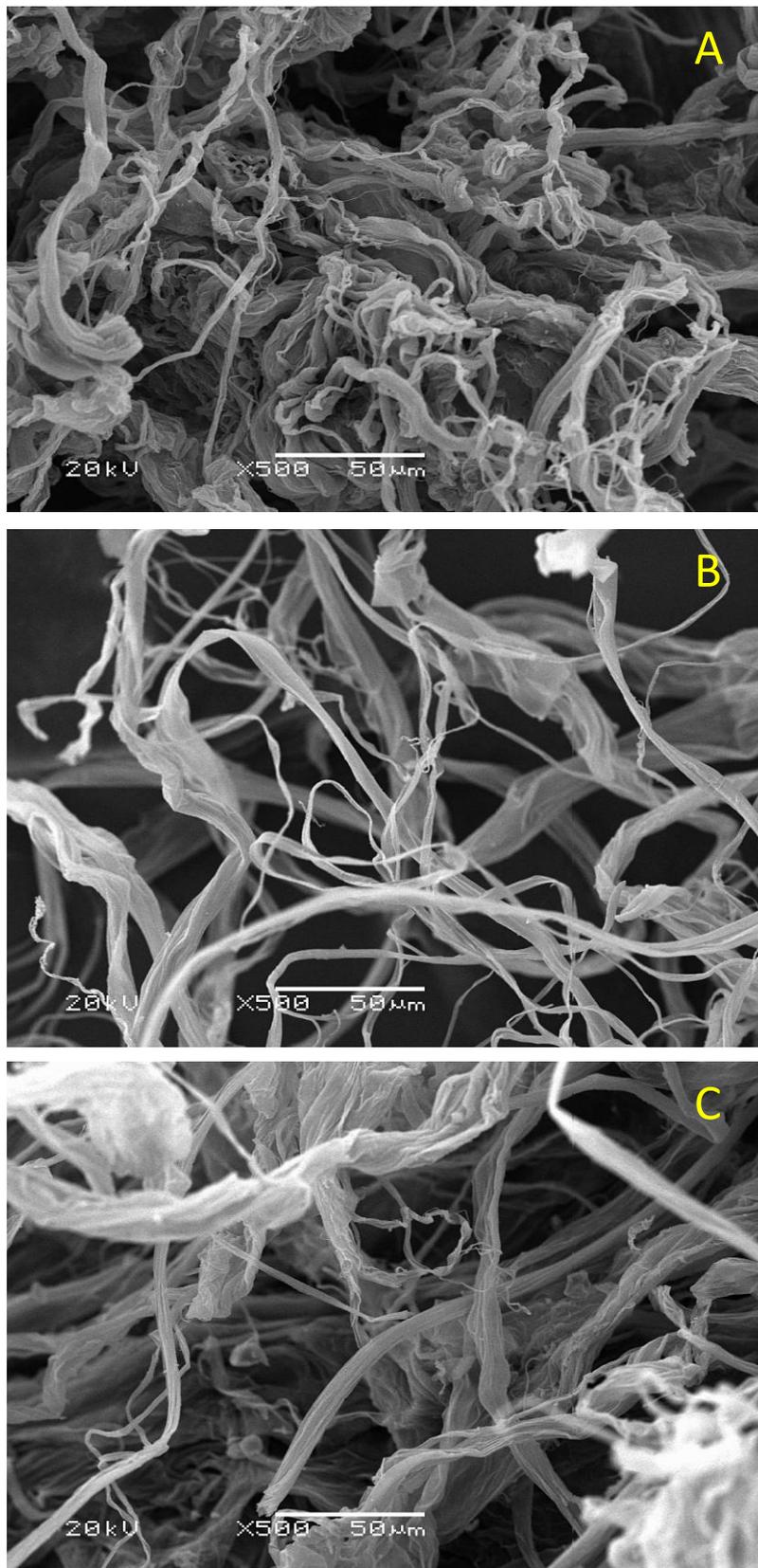


Figura 19: apresenta as amostras de Alginato de Sódio que foram dissolvidas e gotejadas até cinco vezes em álcool etílico (A), isopropílico (B) e em metanol (C) com concentração de 1%.

Com um aumento maior é possível comprovar a formação de fibras pelo método de gotejamento, as fibras mesmo sendo gotejadas em reagentes diferente mostraram similaridade entre elas. Novamente comparando com a figura 13, das amostras não gotejadas de Alginato de Sódio, apresentaram uma diferença significativa apenas aplicando o método de gotejamento, antes do seu congelamento durante 24 horas e depois liofilizado.

Este processo de gotejamento das fibras de Alginato de Sódio é um método inovador que foi obtido primeiramente, no pós-doutorado do Prof. Dr. Luís Alberto dos Santos no Instituto de Ciência e Tecnologia de Polímeros (ICTP) em Madrid, Espanha e é objeto de patente (“Processo de Obtenção de Fibras de Alginato e a Fibra assim Obtida” 016110006701).

Não foram apresentadas as micrografias das fibras gotejadas de 1, 2, 3 e 4 vezes, pois a variação entre as fases de gotejamentos foi a aglomeração das fibras e todas apresentaram diâmetros de fibras heterogêneos.

Este fator de aglomeração das fibras, que permitiu a obtenção de materiais bastante resistentes, o que é uma característica positiva para utilização destas fibras aglomeradas como *scaffolds* para cultura celular, já que um dos principais problemas dos *scaffolds* é a sua baixa resistência mecânica, que muitas vezes dificultam ou impedem seu manuseio com facilidade.

4.8. Obtenção de Cimento de Fosfato de Cálcio com Fibras

4.8.1. Resistência mecânica

Nesta seção apresentaremos os valores dos ensaios de compressão e flexão em quatro pontos das amostras de cimento de α -TCP puro e para as amostras que foram adicionadas fibras de PLGA e Alginato de Sódio em frações volumétricas de 1 %, 2%, 3% e 4%. A variação da resistência à compressão com e sem adição de fibras, tanto de PLGA e Alginato de Sódio, é apresentada na figura 20.

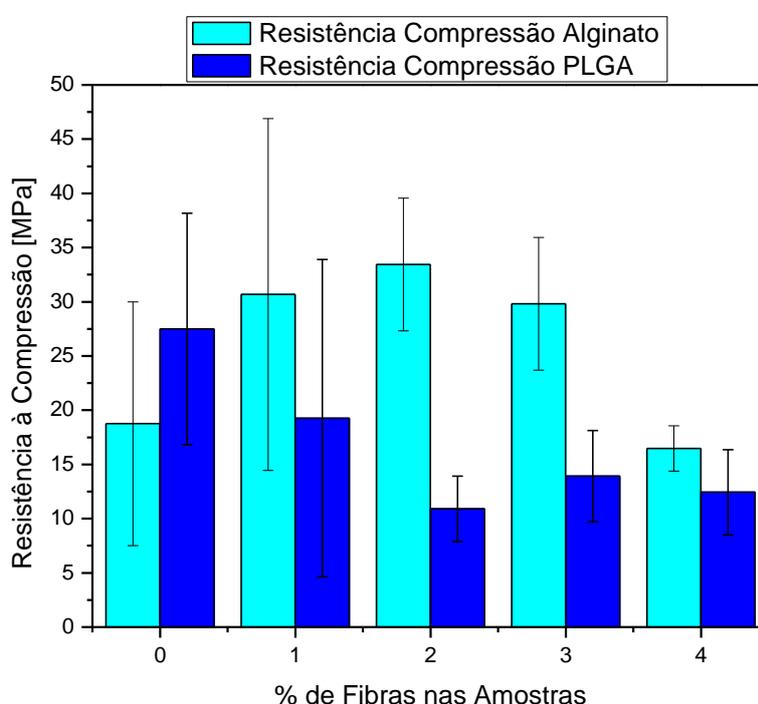


Figura 20: Resistência à compressão das composições do cimento de fosfato de cálcio com fibras de PLGA e fibras de Alginato de Sódio.

Observando na figura 20 que a adição de fibras de PLGA diminuiu a resistência à compressão das composições do cimento fosfato de cálcio. Esse fato ocorre, pois, durante a hidrólise, primeiramente ocorre à dissolução do α -TCP e em seguida, a precipitação de CDHA. O processo de dissolução do α -TCP é mais rápido que o de precipitação de CDHA, ocorrendo uma diminuição do entrelaçamento dos cristais, que reflete na diminuição da resistência mecânica do cimento.

Após 6 horas de hidrólise, o cimento ainda apresenta a fase de β -TCP, por isso, a resistência mecânica é próxima ao cimento antes da hidrólise. Os valores de resistência nos tempos de 24, 48 e 72 horas são próximos, isso indica que não ocorre mais transformação que afete a resistência mecânica do material (CARRODÉGUAS, 2003).

A queda da resistência mecânica do cimento ocorre, também, devido à maior porosidade apresentada após 48 horas de hidrólise, sendo que há um aumento do tamanho e das quantidades de poros do cimento, e, quanto maior o tamanho e a quantidade de poros, menor a resistência mecânica do material. Porém, segundo relatos, um implante ósseo requer biocompatibilidade, resistência mecânica e porosidade para promover as interações entre o biomaterial e o tecido sem reações indesejáveis. A criação de uma estrutura porosa relacionando o tamanho do poro, forma, distribuição e suas relativas orientações é um dos mais importantes problemas da engenharia de biomateriais (VAZ *et al.*, 1999).

Para as amostras que foram adicionadas fibras de Alginato de Sódio ocorreram um efeito de aumento do valor médio de resistência à compressão até a composição de 2%, mas depois houve um decréscimo do seu valor. Analisando as composições de 0% de fibra e 1% de fibra, observa-se também uma maior dispersão de valores que nas demais composições.

Devido a esta variação para estas duas primeiras composições (0% e 1%) podemos dizer que também ocorreu uma variação significativa acrescentando fibras ao cimento. Para ambos os casos este fato pode estar ligado a defeitos na matriz do cimento de fosfato de cálcio pelas fibras. Este fato pode ter ocorrido devido a formação de bolhas durante o processo de conformação das amostras que diminui a resistência mecânica e aumenta a porosidade do compósito.

Segundo Park (PARK, 1998), através da adição de diversos tipos de fibras em cimento *portland*, observou que a resistência mecânica dos compósitos com altos teores de fibras diminui suas propriedades mecânicas devido à baixa mobilidade no estado fresco e à alta porosidade do compósito endurecido.

A adição de fibras a composições de cimento geralmente não produz aumento significativo da resistência à compressão. Estudos de Dardare (DARDARE, 1975), entretanto, indicaram que a incorporação de fibras de polipropileno a composições de concreto pode aumentar a resistência à compressão, sendo este aumento dependente da fração volumétrica e comprimento das fibras. Entretanto, poucos estudos a respeito do aumento da resistência à compressão de cimentos têm sido realizados, o que dificulta o entendimento dos mecanismos de aumento de resistência mecânica.

A resistência à compressão de um compósito não é facilmente correlacionada às propriedades da matriz e da fibra, uma vez que as propriedades dos componentes, especialmente das fibras poliméricas, não são normalmente conhecidas, por diferirem do polímero bruto, dado o estiramento que sofrem as fibras sintéticas durante o seu processamento, resultando na orientação das cadeias poliméricas com possível formação de cristalitos orientados e redução da fase amorfa (HAWTHORNE & TEGHTSOONIAN, 1975).

De qualquer forma, não existem teorias que descrevam adequadamente o comportamento à compressão de compósitos acrescidos de fibras, em função do grande número de processos de falha do material, cada uma tendo uma equação que a governa (PIGGOTT & WILDE, 1980).

A figura 21 mostra os ensaios de flexão em quatro pontos e o cálculo do Módulo de Ruptura das amostras de α -TCP puras e os compósitos com PLGA e Alginato de Sódio de 1%, 2%, 3% e 4% na sua composição.

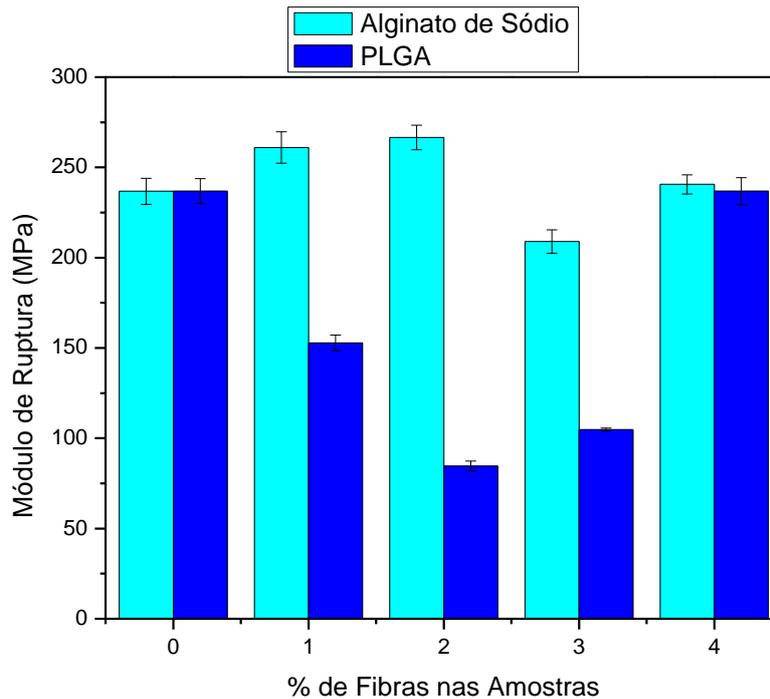


Figura 21: Ensaio de flexão em quatro pontos (Módulo de Ruptura [MPa]) das amostras de α -TCP puras e os compósitos com PLGA e Alginato de Sódio de 1%, 2%, 3% e 4% na sua composição.

Pode-se observar que os valores de módulo de ruptura sofreram variações significativas. Para as fibras de PLGA, nota-se que o valor diminuiu até a composição de 2% e após aumenta e se aproxima muito da composição de 0%. Durante os ensaios na máquina de testes universal se observou que a partir da composição de 3% a maioria das amostras não sofreu ruptura total, isto é, o cimento sofreu a quebra, mas a amostra não se dividia em duas porque ficava presa pelas fibras de PLGA que continha o compósito. Por este motivo, foi escolhida a amostra com composição de 3% de fibras de PLGA como a mais resistente na matriz de α -TCP.

Nas amostras de Alginato de Sódio observa-se um comportamento completamente diferente das amostras que tinham fibras de PLGA em sua composição. Neste caso os valores aumentaram até 2% e após teve uma diminuição significativa do seu valor de tensão. Um dos motivos observados para ocorrer esta variação em composições maiores (3% e 4%) foi a saturação de fibras de Alginato de Sódio na matriz do cimento α -TCP.

Como foi utilizada uma fase líquida para pega do cimento, as fibras liofilizadas de Alginato de Sódio ocorreu a hidratação das fibras, conseqüentemente, o aumento volumétrico das mesmas. Com isso imperfeições que acontecem no cimento quando é conformado (Park, 1998) foi intensificado com o inchamento das fibras, sendo que, quando retiradas dos seus moldes varias amostras estavam empenadas e com fissuras. Portanto, os compósitos que continham 2% de fibras de Alginato de Sódio foram escolhidos como a melhor composição.

É importante lembrar que os cimentos são matrizes porosas, com distribuições de poros. A presença de poros não apenas afeta as propriedades da matriz, mas também as propriedades da interface fibra/matriz. Porém, a influência dos efeitos da porosidade na predição das propriedades do compósito ainda não é totalmente compreendida (Beaudoin, 1990).

4.8.2. Determinação da Tenacidade à Fratura (K_{IC} e J_{IC})

Para determinação da Tenacidade à fratura, das amostras, que é uma medida de quantidade de energia que um material pode absorver antes de fraturar, foram calculados os valores de K_{IC} e J_{IC} pelas expressões mostradas no capítulo 3.5. A figura 22 mostra os valores calculados de K_{IC} para as amostras com 100% de α -TCP em sua composição e para os compósitos com 1% até 4% de fibras de PLGA e Alginato de Sódio.

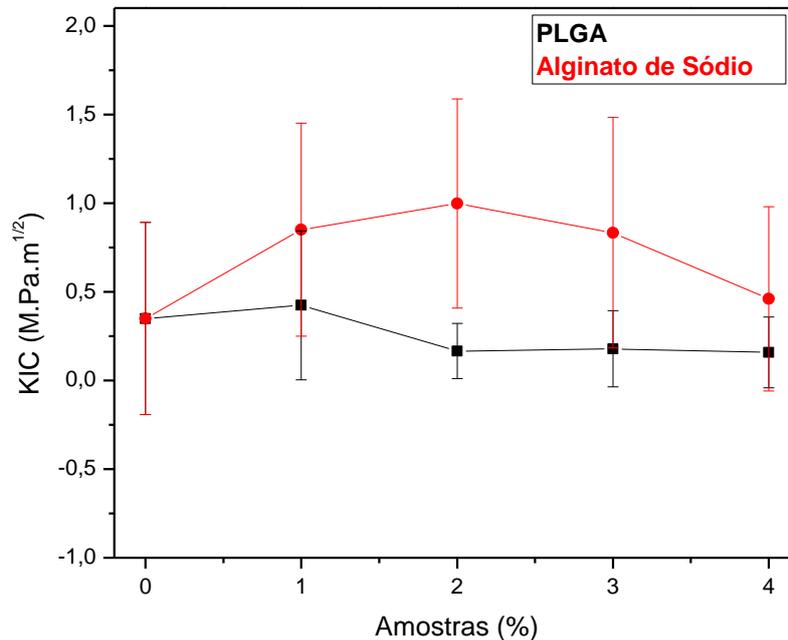


Figura 22: Valores calculados de K_{IC} para as amostras puras, com fibras de PLGA e fibras de Alginato de Sódio.

Observa-se que para as composições com fibra de Alginato de Sódio ocorreu um aumento nos valores médios de K_{IC} , atingindo o valor máximo para a composição de 2% de fibras com um valor de $0,99 \text{ M.Pa.m}^{1/2}$. Este resultado teve um aumento de aproximadamente 3 vezes (2,9 vezes) comparando com o valor de K_{IC} das amostras puras (0%) que foi de $0,35 \text{ M.Pa.m}^{1/2}$.

Para as amostras com fibras de PLGA diminuiu a resistência à compressão das composições de cimento de fosfato de cálcio. Este fato ocorre porque, durante a hidrólise, a dissolução de α -TCP ocorre em primeiro lugar e, em seguida, a precipitação de CDHA. O processo de dissolução de α -TCP é mais rápido do que a precipitação de CDHA, causando uma diminuição do entrelaçamento de cristais, o que reflete uma diminuição da resistência mecânica do cimento.

A diminuição da resistência mecânica do cimento também ocorre devido à maior porosidade mostrada após 48 horas de hidrólise, e há um aumento no tamanho e na quantidade de poros do cimento, e quanto maior o tamanho e a porosidade, a menor resistência mecânica do material.

No entanto, de acordo com os relatórios, um implante ósseo exige força biocompatibilidade, mecânica e porosidade para promover a interação entre o biomaterial e o tecido sem reações indesejáveis. A criação de uma estrutura porosa relacionar o tamanho dos poros, distribuição, forma e orientação relativa é um dos mais importantes problemas de engenharia de biomateriais (VAZ *et. al.*, 1999).

O aumento da tenacidade à fratura das amostras com fibras de Alginato de Sódio em sua composição foram inesperados, uma vez que comparado a outros polímeros com baixos valores de módulo de elasticidade, estes não reforçam a estrutura na região elástica de deformação do compósito. (Santos, 2002).

Estes resultados obtidos com as fibras de Alginato de Sódio são inéditos, pois se aproximam significativamente da faixa de K_{IC} do osso cortical humano que é entre 2 a 12 $M.Pa.m^{1/2}$. (RAVAGLIOLI *et. al.*, 1992), apesar de estar próximo ao mínimo do valor de K_{IC} do osso cortical. Na figura 23 são apresentados os valores de tenacidade à fratura plástica para as amostras com 0% de fibras, com fibras de PLGA e fibras de Alginato de Sódio.

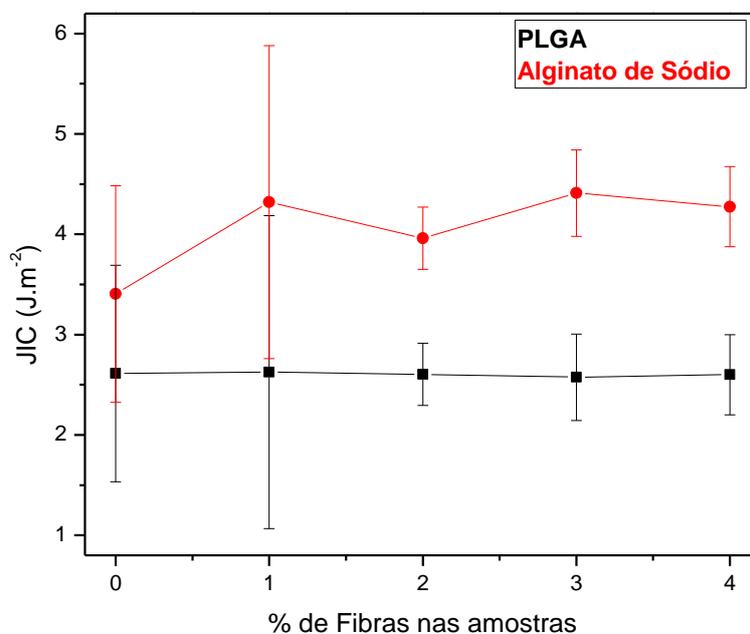


Figura 23: Valores de tenacidade à fratura plástica para as amostras com 0% de fibras, com fibras de PLGA e fibras de Alginato de Sódio.

As amostras com fibras de PLGA, não sofreram variações significativas nos valores de J_{IC} no que se refere ao regime plástico da fratura do material. Mas as amostras com fibras de Alginato de Sódio ocorreram um aumento, em relação à amostra com 100% de α -TCP, no seu valor médio de J_{IC} . Isso ocorre devido ao fato de que, quando o volume de fibras é aumentado, há uma redução do aumento da abertura da trinca para um dado deslocamento durante o ensaio de tenacidade, indicando um ancoramento da trinca mais efetivo obtido pelas fibras quando presentes no compósito em uma maior fração volumétrica, aumentando o valor de tenacidade (SANTOS, 2002).

4.8.3. Avaliação em SBF do cimento de α -TCP contendo fibras

Prepararam-se composições de cimento α -fosfato tricálcico, com fibras de PLGA e Alginato de Sódio com 1%, 2%, 3% e 4%, acrescidos à mesma solução utilizada nas amostras com 100% de α -TCP, já descritos na seção anterior. A figura 24 mostra os valores de porosidade aparente das amostras com fibras de PLGA (A) e Alginato de Sódio (B).

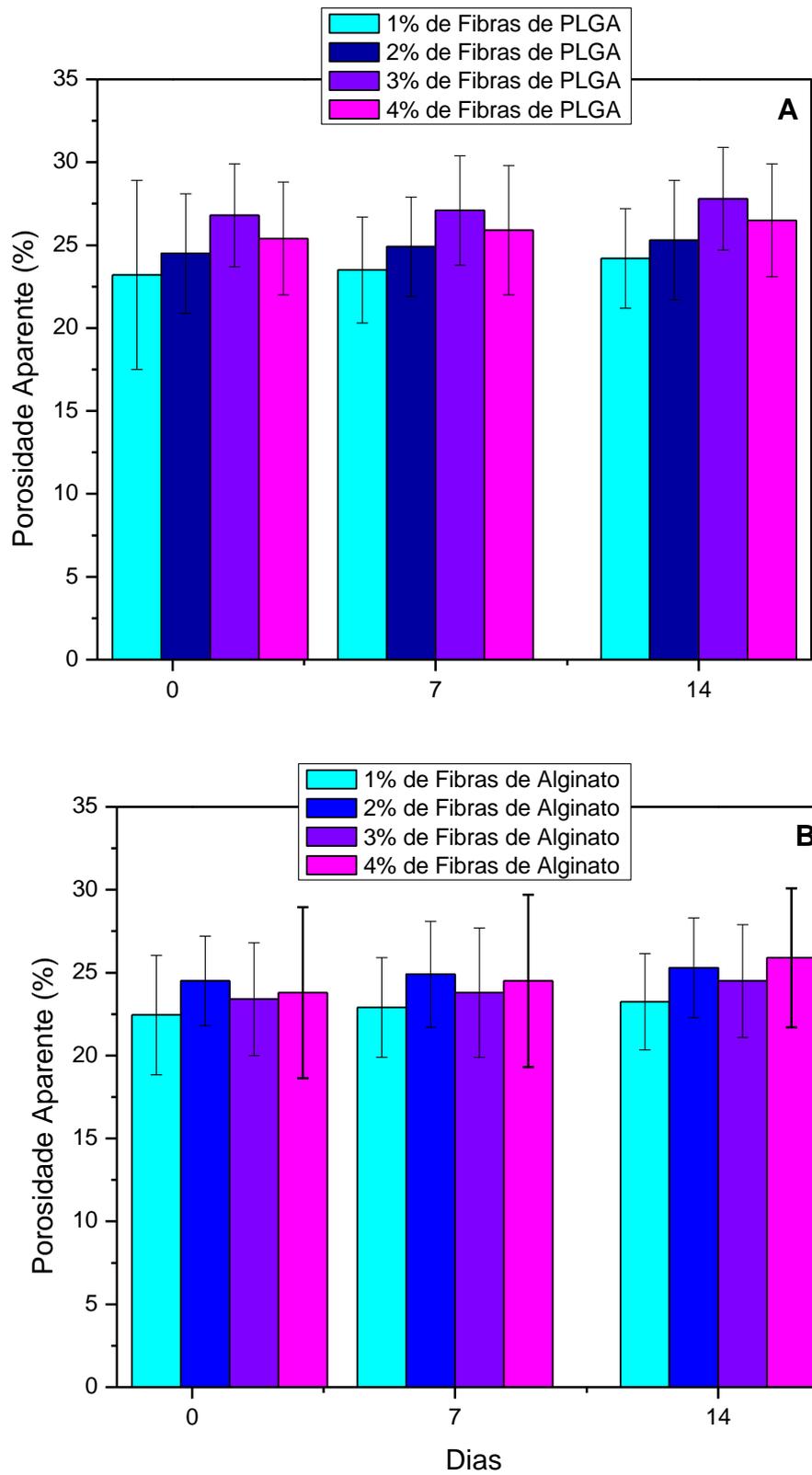


Figura 24: Porosidade aparente das amostras com fibras de PLGA (A) e Alginato de Sódio (B).

Para todos os tipos de fibras, o aumento da quantidade de fibras aumenta a porosidade do cimento, como consequência da dificuldade de empacotamento das partículas de cimento (DRIESENS et al, 1997). Observando ambos os gráficos tanto as amostras com fibras de PLGA e fibras de Alginato de Sódio ocorreu um aumento, não significativo, no valor de porosidade aparente e de forma linear durante os 14 dias que estavam submersas em SBF.

O maior aumento foi para a composição com 4% de fibras de Alginato de Sódio ($2,1\% \pm 3,6$), este resultado não era esperado, visto que as fibras de Alginato de Sódio são hidrofílicas, mas durante os 14 dias onde estiveram submersas pode ter ocorrido uma erosão tanto do cimento de fosfato de cálcio e/ou das fibras de Alginato de Sódio, resultando em um aumento da sua porosidade aparente. A figura 25 apresenta os resultados de Densidade aparente das amostras com fibras de PLGA (A), Alginato de Sódio (B).

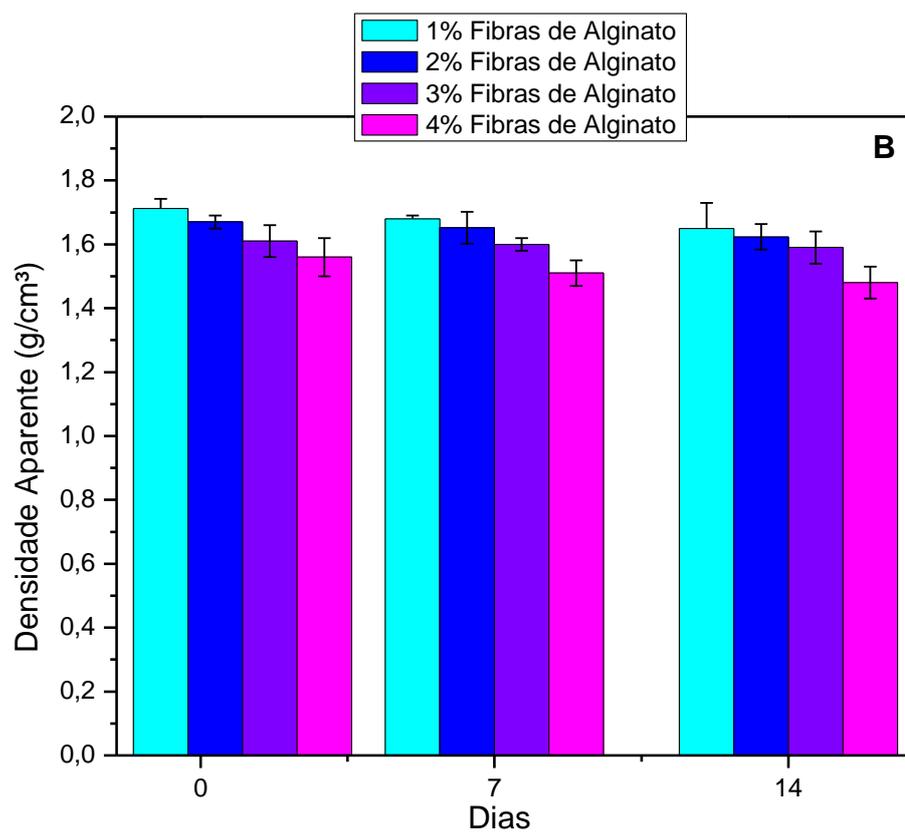
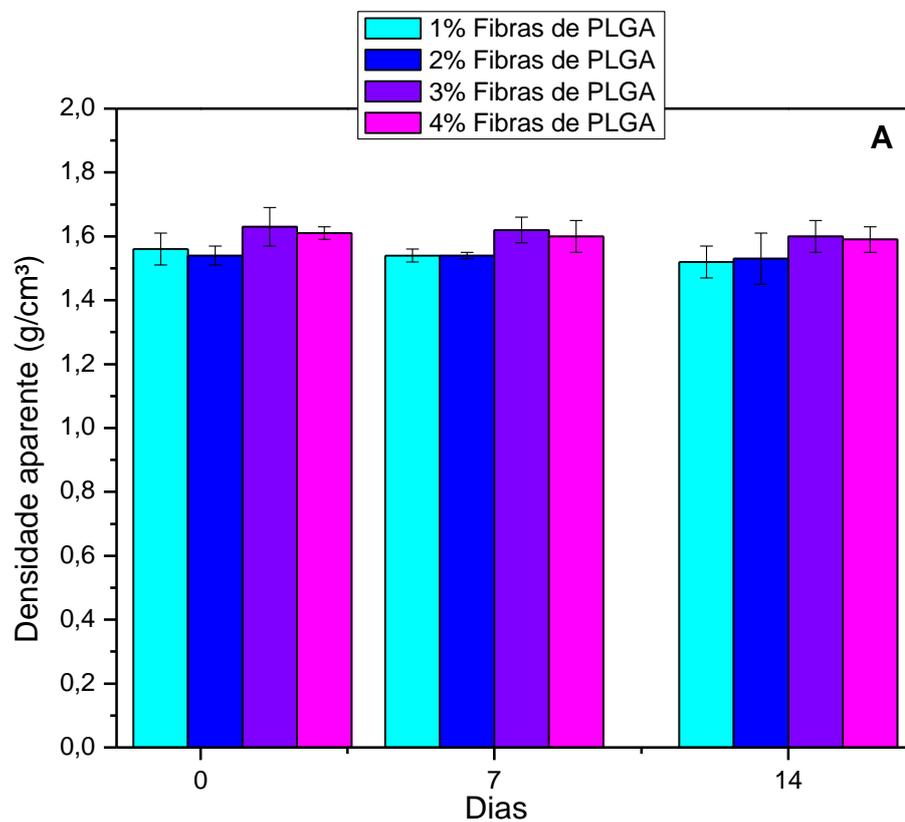


Figura 25: Densidade aparente das amostras com fibras de PLGA (A), Alginato de Sódio (B).

Os resultados de densidade aparente (g/cm^3) para os cimentos com fibras (PLGA e Alginato de Sódio) figura 25, não houve valores de aumento ou diminuição significativos. Realizando uma comparação numérica com os valores de densidade, para todos os compósitos, e erro médio a relação teve um resultado podendo ser considerado constante. Mesmo, considerando não expressivo, os valores de densidade aparente das amostras com fibras de PLGA diminuiu durante os 14 dias. Os compósitos de 1 e 3% de fibras de PLGA é que foram os que tiveram a maior diminuição de densidade aparente, respectivamente, 0,04 e 0,03 g/cm^3 . Para os cimentos com 1 e 4% de fibras de Alginato de Sódio foram os com menores valores de densidade (0,08 e 0,062%).

A figura 26 apresenta os resultados de absorção de água para os compósitos com fibras de PLGA e Alginato de Sódio.

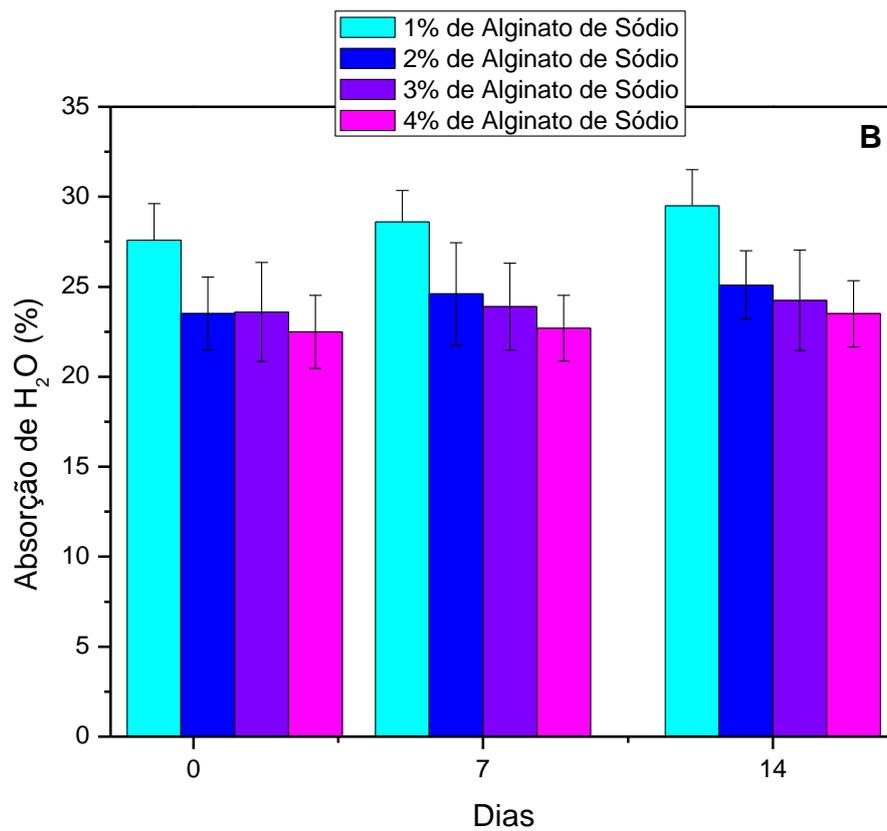
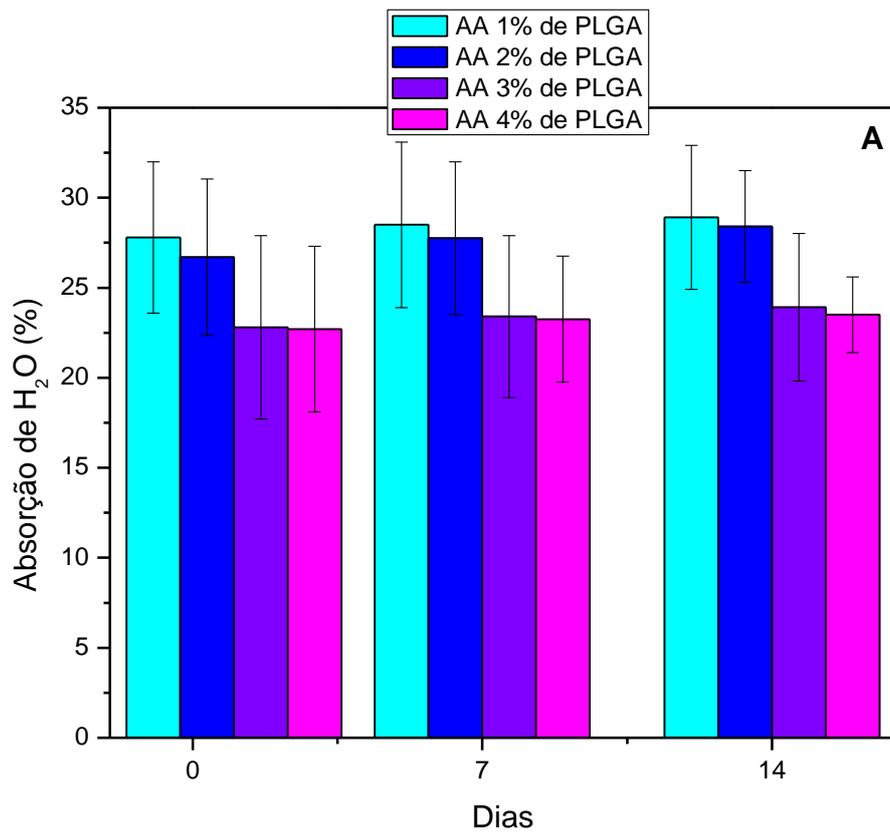


Figura 26: Absorção de água das amostras com fibras de PLGA (A), Alginato de Sódio (B).

Em todas as amostras o valor de absorção de água aumentou durante os 14 dias submersos em SBF. Para os compósitos com fibras de PLGA o valor não foi significativo. Também foi verificado que durante este período de 14 dias, as fibras de PLGA, não reagiram com a solução, mantendo-se sua característica hidrofóbica. As amostras com fibras de Alginato de Sódio também aumentaram o seu percentual na absorção, principalmente, para o compósito de 4% de fibras de Alginato de Sódio.

A degradação dos cimentos de fosfato de cálcio ocorre quando a pasta de cimento entra em contato com grandes quantidades de líquido, como resultado da penetração de um na outra. Por outro lado, a reação de pega atua contrariamente à degradação, iniciando-se quando o líquido de pega é adicionado ao pó de cimento, ocorrendo o aumento de resistência mecânica pelo inter cruzamento de cristais de hidroxiapatita. Essas duas reações opostas, pega e degradação, ocorrem competitivamente, e as propriedades do cimento no líquido serão o resultado em ambas as reações (MIYAMOTO *et al.*, 1996).

4.8.3. *Scaffolds* com as fibras de Alginato de Sódio e PLGA

Neste capítulo apresentaremos as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para os *scaffolds* com as fibras de Alginato de Sódio e PLGA. Para facilitar a análise das amostras, os *scaffolds* apresentados serão os que obtiveram melhores resultados em relação aos ensaios mecânicos, que foram as de cimento com 2% de fibras de Alginato de Sódio e as de 3% de fibras de PLGA.

As imagens mostradas foram obtidas com aumento de 33 vezes, com objetivo de ter uma visualização geral das fibras, 500 vezes para ter uma observação mais próxima das fibras ou de regiões relevantes para o trabalho. A figura 27 apresenta a secção transversal do *scaffold* de cimento com 2% de fibras de Alginato de Sódio.

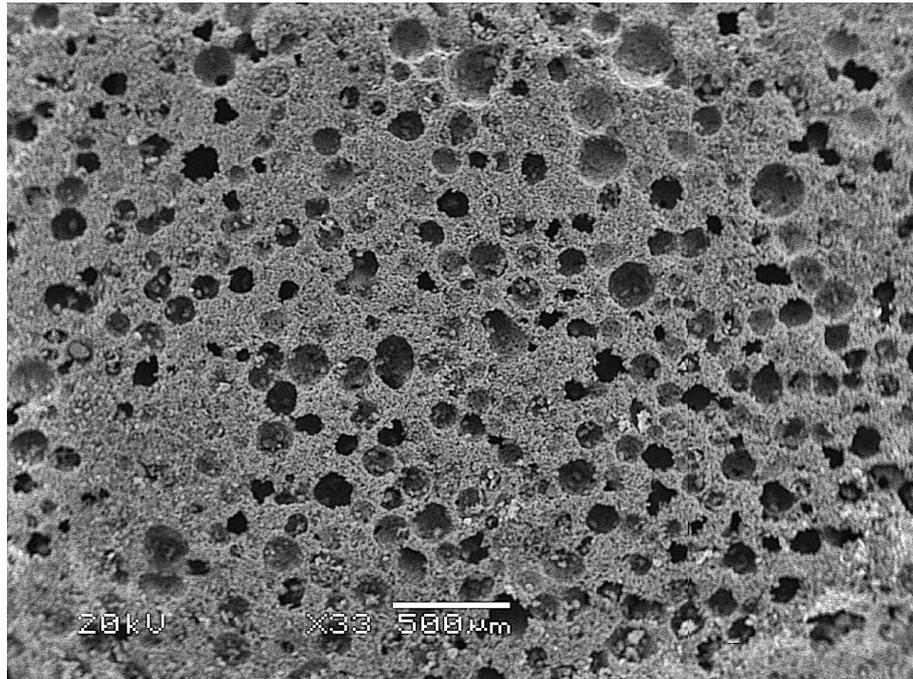


Figura 27: Scaffold de cimento de α -TCP com fibras de Alginato de Sódio

É possível observar nesta região vários poros menores a 500 μm , que foram formados após a extração das esferas de parafina. A figura 28 mostra o MEV desta mesma amostra, mas obtida com aumento de 500 vezes.

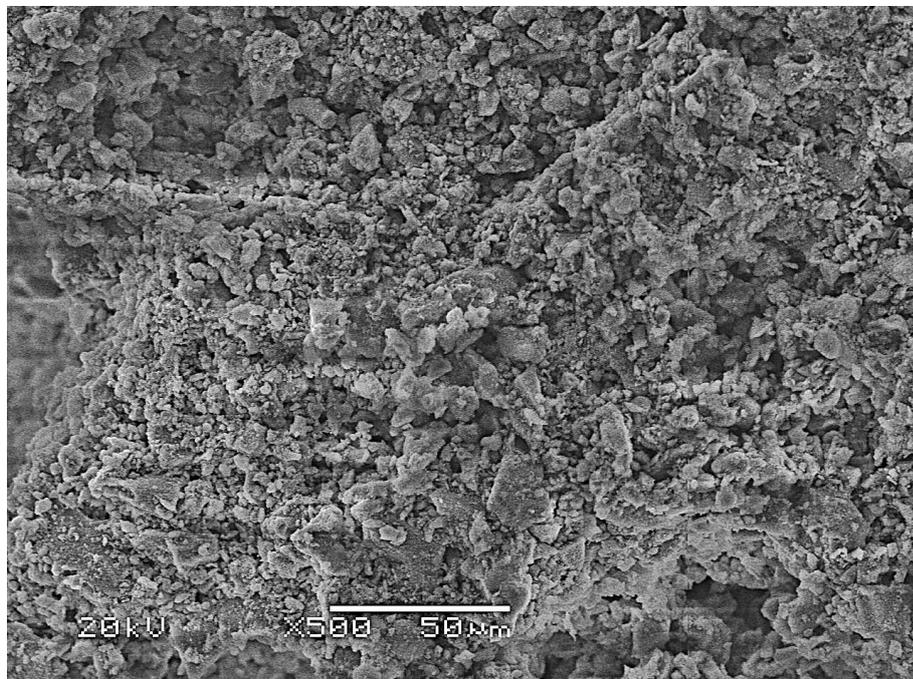


Figura 28: Superfície do scaffold de cimento de α -TCP com fibras de Alginato de Sódio.

Observa-se uma superfície extremamente rugosa, do cimento de α -TCP mais 2% de fibras de Alginato de Sódio. Mesmo com o aumento de 500 vezes, não foi possível distinguir as fibras de Alginato de Sódio do cimento de fosfato de Cálcio. Isto mostra que as fibras de Alginato se incorporaram e se misturaram completamente à matriz de cimento, sendo impossível distinguir um do outro.

Segundo Santos (SANTOS, 2002) para as amostras apenas mantidas por 24 h a 100% de umidade, não se pode observar o aparecimento de estruturas de CDHA, como seria de se esperar. O aparecimento de agulhas ou placas petaloides é característico dos cimentos de fosfato de cálcio baseados no α -TCP (GRUNINGER *et al.*, 1984; YU *et al.*, 1992; DRIESSENS *et al.*, 1997). A figura 29 mostra MEV do *scaffold* com 3% de fibras PLGA.

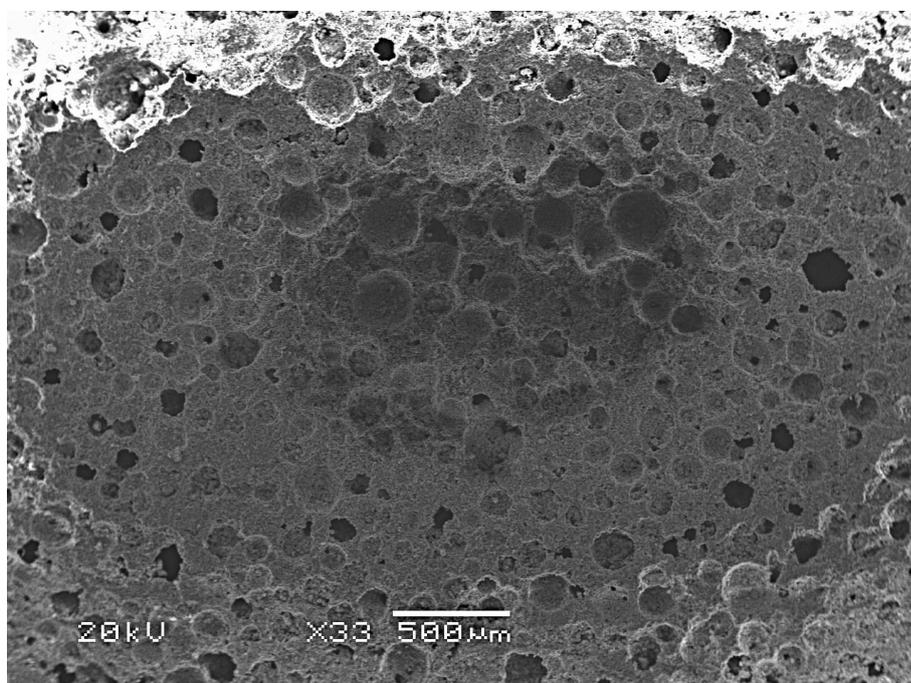


Figura 29: MEV do *scaffold* com 3% de fibras PLGA.

Observa-se na figura 29 uma superfície preenchida de orifícios derivados da extração da parafina. Alguns destes orifícios são superficiais outros com maior profundidade na área secção transversal onde foi analisada a amostra. Estes orifícios apresentam uma heterogeneidade entre si, variando o seu tamanho. Como no caso do *scaffold* com 2% de fibras de Alginato de Sódio, não foi possível distinguir as fibras de PLGA com este aumento de 33 vezes.

Nas figuras 30 e 31, entretanto, observa-se facilmente a presença destas microestruturas características do cimento de α -fosfato tricálcico reagido. É pelo intercruzamento destes cristais que ocorre o aumento da resistência mecânica do material (GRUNINGER *et al.*, 1984). A figura 30 apresenta o MEV do *scaffold* com 3% de fibras PLGA na composição do cimento de α -TCP obtida com aumento de 500 vezes.

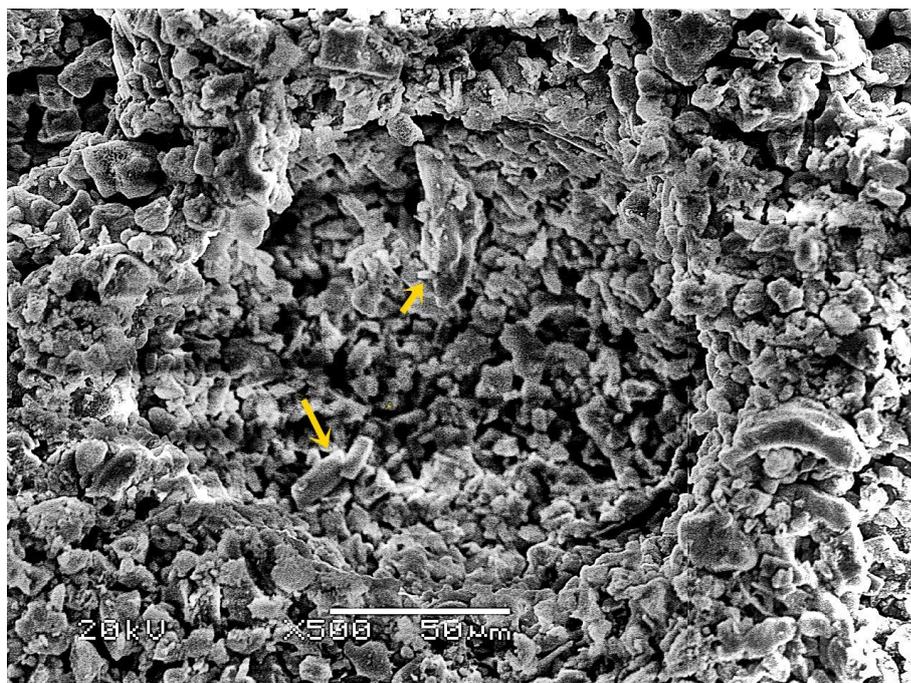


Figura 30: MEV do *scaffold* com 3% de fibras PLGA.

Para este aumento de 500 vezes do *scaffold* com 3% de fibras de PLGA já é possível observar no cimento de fosfato de cálcio precipitações de cristais com formato petaloide. A figura 30 mostra alguns cristais com formatos petaloides visualizadas e sinalizadas com setas amarelas. Mesmo assim, estes cristais ficam nitidamente observados na figura 31 com um aumento de 5000 vezes.

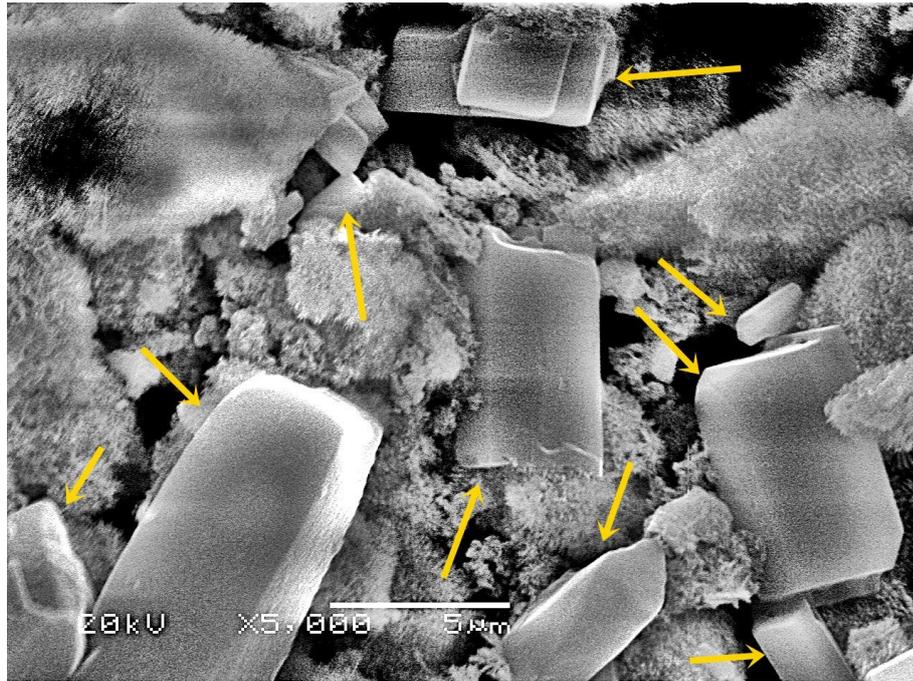


Figura 31: Scaffold com 3% de fibras PLGA.

Podemos verificar que as fibras de PLGA estão totalmente incorporadas ao cimento de fosfato de cálcio, sem apresentar material aderido à superfície, o que explicaria os valores de propriedades mecânicas obtidos. Os cristais com formato petaloide possuem diferentes comprimentos, diâmetros e direções. A microestrutura obtida com este *scaffold* apresenta grãos de cimento de fosfato de cálcio interligados, mas ainda possui uma estrutura de poros interconectados que é fundamental para a semeadura e cultura de células.

Pode ser observado e confirmado, pelas micrografias, que pela reação de hidratação do α -fosfato tricálcico é produzida uma hidroxiapatita deficiente em cálcio, que é visualizada na figura 31. Também podemos confirmar este resultado, em virtude da detecção da banda referente ao grupamento HPO_4 (961 e 2.970 cm^{-1}), característico deste tipo de hidroxiapatita (LEGEROS, 1991).

Segundo Santos após imersão por 7 dias em SBF o fosfato de cálcio sem nenhuma modificação apresentou cristais com formato petaloide formando um entrelaçado cristalino responsável pela resistência mecânica do cimento (SANTOS, 2002). Estruturas similares têm sido descritas para cimentos de α -TCP (GINEBRA *et al.*, 1995).

Observa-se, também, a deposição de hidroxiapatita no formato de glóbulos, presumidamente oriunda da solução SBF, comprovando a indicação de biocompatibilidade do material (SANTOS, 2002).

A microestrutura da matriz de cimento não apresentou alteração microestrutural, como seria de se esperar, uma vez que o trabalho de Mirtchi mostrou que a presença de sulfato de cálcio favorece a precipitação de fosfato de cálcio diidratado (DCPD) no mesmo hábito cristalino (agulhas) em composições de cimento baseado no β -TCP, aumentando a resistência mecânica das composições. Assim o cimento de α -TCP, com a precipitação da hidroxiapatita no formato de agulhas, contribui com a resistência mecânica do cimento e a melhor adesão das fibras adicionadas a matriz (MIRTCHI *et al.*, 1989).

4.9. Avaliação da Citotoxicidade

Na parte final do trabalho, procedeu-se à análise de citotoxicidade dos *compósitos*. Optou-se pela avaliação da citotoxicidade do material pelo método de difusão em ágar, conforme descrito na seção de materiais e métodos. Os *compósitos* avaliados foram os de fibras de PLGA (3% na composição do α -TCP) e do Alginato de Sódio (2% na composição do α -TCP), após imersão em SBF, por 24 horas, a 37°C. Os resultados obtidos dos scaffolds com 3% de fibras de PLGA na composição do cimento de α -TCP são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Ensaio de citotoxicidade das amostras com 3% de fibras de PLGA na matriz de cimento de α -TCP.

DESCRIÇÃO	ÍNDICE DE ZONA OBTIDA APÓS A LEITURA DAS PLACAS DE			
	N°1	N°2	N°3	N°4
α -TCP com 3% de fibras de PLGA	IZ	IZ	IZ	IZ
	2	2	2	2
	0	0	0	0
Controle	4	4	4	4

Onde IZ, representa o índice de zona, sendo que o valor zero corresponde à nenhuma zona de citotoxicidade e o valor 4 corresponde à uma zona severamente citotóxica. O índice de zona corresponde à área que não é corada pelo ágar com corante vermelho neutro. As células coradas correspondem às células mortas. Como se pode ver na tabela 6, o cimento de fosfato tricálcico com 3% de PLGA apresentou a graduação de índice de zona igual a dois, o que indica que a quantidade de células que foram coradas pelo corante vital foi leve. A tabela 7 apresenta os resultados dos scaffolds com 2% de fibras de Alginato de Sódio na matriz de cimento de α -TCP.

Tabela 7: Ensaio de citotoxicidade das amostras com 2% de fibras de Alginato de Sódio na matriz de cimento de α -TCP.

DESCRIÇÃO DA AMOSTRA	ÍNDICE DE ZONA OBTIDA APÓS A LEITURA DAS PLACAS DE CULTURAS CELULARES			
	N°1	N°2	N°3	N°4
α -TCP com 2% de fibras de Alginato de Sódio	IZ	IZ	IZ	IZ
	2	2	2	2
	0	0	0	0
Controle Negativo	0	0	0	0
Controle Positivo	4	4	4	4

Como no caso dos scaffolds com 3% de fibras de PLGA, os scaffolds com 2% de Alginato de Sódio também tiveram uma resposta citotóxica com leve efeito tóxico para linhagem celular NCTC Clone 929 (ATCC CCL-1- tecido conjuntivo de camundongo).

Conforme o laudo de avaliação citotoxicidade *in vitro* (reatividade biológica), para os dois tipos de scaffolds com fibras apresentaram efeito citotóxico leve.

Santos, utilizou este método para avaliar a citotoxicidade de cimentos de fosfato de cálcio sintetizados por solução sólida e obteve respostas similares aos do controle negativo, sendo que ambos apresentaram Índice de Zona igual à zero. Podendo o material a ser avaliado *in vivo*.

Conforme os resultados obtidos por Volkmer, o cimento de fosfato tricálcico obtido via síntese de combustão, não apresentou nenhum sinal de citotoxicidade para a linhagem celular utilizada neste estudo (NCTC Clone 929, que são células de tecido conjuntivo de camundongo), o que permitiria levar os materiais sintetizados nesta tese para etapas de avaliação *in vivo* também (VOLKMER, 2011).

Mesmo obtendo o cimento de fosfato tricálcico com métodos diferentes, os dois casos apresentaram o Índice de Zona (IZ) igual à zero. Levando-nos a concluir que o IZ igual a dois obtidos, neste trabalho, uma reação citotóxica leve devido às fibras em sua composição, mas não é conclusivo, pois há necessidade de uma avaliação futura citotóxica das fibras de PLGA e Alginato de Sódio.

4.10. Análise *in vivo* com células-tronco dos Scaffolds de Alginato de Sódio

Nesta etapa do trabalho, foram confeccionados *scaffolds* de 100% de fibras de Alginato de Sódio. A incubação das células digeridas com collagenase, com manutenção da fração aderente, originou em todos os casos culturas de células-tronco com morfologia típica, com aspecto fibroblastóide em todas as passagens analisadas onde é apresentada na figura 32.

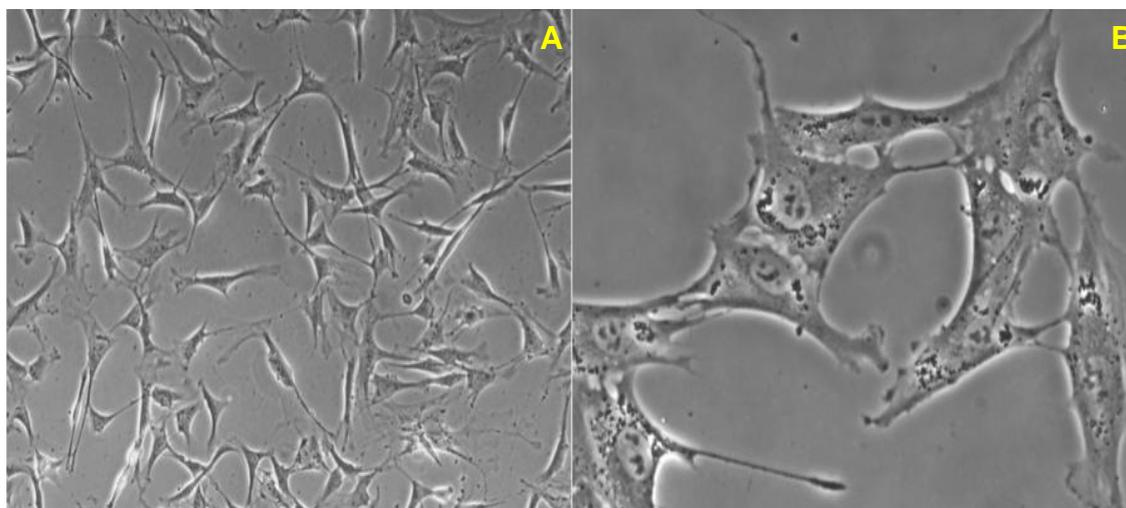


Figura 32: Morfologia das culturas de células-tronco mesenquimais dos camundongos. (A) Aumento 200X no microscópio optico. (B) Aumento 400X no microscópio optico.

A microscopia das culturas celulares mostraram um potencial de proliferação característico deste tipo celular, com pronunciada expansão durante todo o tempo em que foram acompanhadas, cerca de 45 dias. Após incubação das células-tronco nos *scaffolds* 100% de Alginato durante 3 horas a

37°C, observou-se 100% de aderência das células ao *scaffold* fabricado neste trabalho.

Com um processo simples conseguimos obter estas estruturas (*scaffolds*), que não requer equipamentos sofisticados, nem mesmo utiliza os equipamentos tradicionalmente utilizados de fiação, que são mais custosos do que no processo desenvolvido. Isso deve reduzir significativamente os custos de produção, notadamente de investimento em equipamentos.

5. CONCLUSÕES

No presente trabalho foi obtido o aumento da resistência mecânica dos cimentos ósseos de fosfato de cálcio (α -TCP) através da adição de fibras de PLGA e Alginato de Sódio e a partir destas fibras foram construídos *scaffolds*. O estudo envolveu dois tipos de compósitos: α -TCP + PLGA e Alginato de Sódio + α -TCP com 1 a 4% de fibras (m/v). Também ao longo do trabalho foi possível obter *scaffolds* com apenas o Alginato de Sódio.

Os resultados de difração de raios X, infravermelho e granulometria a laser mostraram que o pó de α -TCP utilizado no trabalho foi similar ao encontrado em literatura, tanto na sua composição química e tamanho do grão que ficou na média de 8 μ m. O método de Impedância para determinação do tempo de pega foi realizado em cimento de α -TCP para verificar o seu tempo de presa ou pega que foi de sessenta minutos.

Nos testes de resistência a compressão dos compósitos com fibras de PLGA diminuiu a resistência à compressão em relação à amostra pura de α -TCP. Para os compósitos com fibras de Alginato de Sódio se obteve um aumento a resistência à compressão nos valores de 1% e 2% e após a diminuição da sua resistência. O fato da diminuição a resistência à compressão pode ter ocorrido em ambos compósitos, devido à formação de bolhas durante o processo de conformação dos compósitos diminuindo a sua resistência e consequentemente aumentando a sua porosidade.

Nas análises de módulo de ruptura dos cimentos com 3 % de fibras de PLGA foi considerada a melhor composição, pois foi observada durante os ensaios mecânicos a ruptura do cimento, mas as duas partes da amostra continuavam ligadas pelas fibras de PLGA. Já para os cimentos com fibras de Alginato de Sódio a melhor composição foi a de 2% de fibras na matriz de cimento de α -TCP, pois a partir da composição de 3% ocorreu a saturação de fibras na matriz causando a diminuição nos valores de módulo de ruptura.

Os valores de tenacidade à fratura (K_{IC} e J_{IC}) para os compósitos com fibras de PLGA não ocorreu variações significativas, isto é coerente, pois o

PLGA como outros polímeros possuem baixos valores de módulo de elasticidade não reforçando o cimento na região plástica do material. Para os cimentos com fibras de Alginato de Sódio os resultados de K_{IC} foram significativos, pois se aproximaram do valor de K_{IC} do osso cortical humano. E para os valores de J_{IC} aumentaram e isso nos leva a concluir que ocorreu um aumento da tenacidade à fratura para os cimentos com as fibras Alginato de Sódio.

O processo TIPS não permitiu a obtenção de fibras de PLGA e Alginato de Sódio. O PLGA forma um filme fino (similar a um filme de PVC) que não foi possível caracterizá-lo, e para as amostras de Alginato de Sódio formou após a liofilização uma estrutura esponjosa, com flocos e lamelar. Também foi constatado que com o aumento da concentração de Alginato de Sódio (0,8%) formou uma estrutura mais compacta, favorecendo a obtenção de estruturas potencialmente utilizáveis como *scaffolds* de 100% de Alginato de Sódio.

Pelo gotejamento de soluções em álcool isopropílico, etílico e metanol foram obtidas fibras tanto de PLGA quanto de Alginato de Sódio. As fibras que apresentaram uma maior homogeneidade, fácil manipulação foram as gotejadas em álcool etílico, isto para os dois tipos de materiais (PLGA e Alginato de Sódio). Os infravermelhos do PLGA e Alginato de Sódio apresentaram suas bandas características e não sofreram mudanças químicas após o gotejamento e liofilização. A única mudança (que as fibras de PLGA e Alginato de Sódio) foi a sua mudança física, comprovada pelas micrografias (MEV).

Os *compósitos* de cimento de α -TCP com fibras de Alginato de Sódio apresentaram melhores resultados na composição de 2%. Nas micrografias de MEV realizadas não foi possível distinguir as fibras da sua matriz, sendo assim constatou-se uma integração de fibra com a sua matriz, também verificado pelos ensaios mecânicos realizados onde o valor de tenacidade foram os melhores.

Nos *compósitos* de cimento de α -TCP com fibras de PLGA a melhor composição foi a de concentração de 3%, foi possível através dos MEV distinguir os grãos de α -TCP, a hidroxiapatita deficiente, mas não foram

observadas as fibras poliméricas. Observou-se a integração e homogeneidade entre as fibras e a matriz e uma estrutura de porosa.

Os ensaios de citotoxicidade do cimento de fosfato tricálcico com 3% de PLGA e do cimento de fosfato tricálcico com 2% de Alginato de Sódio apresentaram a graduação de índice de zona (IZ) igual a dois, o que indica citotoxicidade leve. Com os *scaffolds* puros de Alginato os resultados obtidos com as células-tronco mesenquimais de camundongos transgênicos foram de 100% de adesão aos *scaffolds*. Ensaio complementares de citotoxicidade e proliferação celular são necessários para uma melhor avaliação dos cimentos e das fibras obtidas.

6. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

1. AHSAN, T.; NEREM, R.M. *Bioengineered tissues: the science, the technology, and the industry*. Orthod. Craniofacial Res., v. 8, 2005, p. 134 – 140;
2. AUGUST, A. D. *et al.*, *Alginate hydrogels as biomaterials*. Macromolecular Bioscience, v. 6, n. 8, p. 623-633, 2006;
3. AVELLA, M. *et al.* *Addition of glycerol plasticizer to seaweeds derived alginates: Influence of microstructure on chemical-physical properties*. Carbohydrate Polymers, v. 69, n. 3, p. 503-511, 2007;
4. BERMÚDEZ, O.; PLANELL, J. A., *Formulation and setting times of some calcium orthophosphate cements: a pilot study*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine , v. 4, p. 503-508, 1994;
5. BLOM, A., *Which scaffold for which application?* Curr. Orthop., v. 21, 2007, p. 280 – 287;
6. BOHNER, M.; GBURECK, U. BARRALET, J.E., *Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: A critical assessment*. Biomaterial, v.26, p. 6423, 6429, 2005;
7. BROWN, W. E.; CHOW, L. C., Patent 4, 518, 430, 1985;
8. BURG, K.J.L.; PORTER, S.; KELLAM, J.F., *Biomaterial developments for bone tissue engineering*. Biomaterials, v. 21, 2000, p. 2347 – 2359;
9. CÁCERES C.A., CANEVAROLO S. V., Polym. Degrad. Stab., 86, 2004, p. 437;
10. CHOI, J.Y.; CHOI, J.H. ; KIM, N.K.; KIM, Y.; LEE, J.K.; KIM, M.K.; LEE, J.H. CLEMENTI, F., CRUDELE, M. A., PARENTE, E., MANCINI, M., MORESI, M. *Production and characterization of alginate by azotobacter vinelan*, J. Science Food Agr., v. 79, n. 4, p. 602-610, 1999;
11. CONSTANTINO, P. D.; FRIEDMAN, C. D.; JONES, K.; CHOW, L. C.; PELZER, H. J.; SISSON, G. A. *Hydroxyapatite cement: I. Basic*

chemistry and histologic properties. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg., v. 117, p. 379-384, 1991;

12. DA ROSA, E. L. S., *Avanços tecnológicos em cirurgia ortognática*, Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, v.4, s.1, 2004;

13. DRIESSENS, F. C. M.; FERNÁNDEZ, E.; GINEBRA, M. P.; BOLTONG, M. G.; PLANELL, J. A. *Calcium phosphates and ceramic bone cements vs. acrylic cements*. Anal. Quim. Int. Ed., v. 93, p. S38 - S43, 1997;

14. EDWARDS, S.L. *et al.*, *Design of nonwoven scaffold structures for tissue engineering of the anterior cruciate ligament*. Research Journal, v.4, n.2, p.86-94, 2004;

15. ERTESVÁG, H., VALLA, S. *Biosynthesis and applications of alginates*, Polymer Degradation and Stability, v. 59, p. 85-91, 1998;

16. FOGGIATTO, J. A., *O Uso da Prototipagem Rápida na Área Médico-Odontológica*, NUPES/CITEC/UTFPR, São Paulo, 2004;

17. GINEBRA, M. P.; FERNÁNDEZ, E.; DRIESSENS, F. C. M.; BOLTONG, M. G.; MUNTASELL, J.; FONT, J.; PLANELL, J. A., *The effects of temperature on the behaviour of an apatitic calcium phosphate cement*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 6, p. 857-860, 1995;

18. GOMIDE, V. S., *Desenvolvimento e caracterização mecânica de compósitos hidroxiapatita-zircônia, hidroxiapatita-alumina e hidroxiapatita-titânia para fins biomédicos*, 2005, 121p, Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas;

19. GRANT, G. T., MORRIS, E. R., REES, D. A., SMITH, P. J. C., THOM, D. *Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model*, Febs Letters, v. 32, p. 195-198, 1973;

20. GROOT, J.H.; KUIJPER, H.W.; PENNING, A.J., *A novel method for fabrication of biodegradable scaffolds with high compression moduli* Journal of materials science: materials in medicine 8 (1997) 707-712;

21. GRUNINGER, S. E.; SIEW, C.; CHOW, L. C.; O'YOUNG, A.; TS'AO, N. K.; BROWN, W. E., *Evaluation of the biocompatibility of a new calcium-phosphate setting cement*. J. Dent. Res., v. 63, p. 200, 1984;
22. GUERRA, F. L. B., SOARES, M. M.; COSENZA, F.R., *Distração Osteogênica em Região Posterior de Mandíbula*, International Osseointegration Conference, São Paulo, 2005;
23. HENCH, L. L., *Biomaterials: a forecast for the future*. Biomaterials, v. 19, 1998, p. 1419– 1423;
24. HENCH, L. L., POLAK, J. M., XYNOS, I. D., BUTTERY, L. D., *Biomactive materialsto control cell cycle*, Mat. Res. Innovat, v. 3, 2000, p. 313 – 323;
25. HENCH, L. L.; WILSON, J., *Introduction to bioceramics*. Singapore: Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 1993, p. 1-15;
26. HEREDIA, M. A. L, SOHIER , J, CEDRIC, G., S. QUILLARD ,M., DORGET, P., LAYROLLE, *Rapid prototyped porous titanium coated with calcium phosphate as a scaffold for bone tissue engineering*, Biomaterials 29 (2008) 2608–2615;
27. IKEDA, A., TAKEMURA, A., ONO, H. *Preparation of low-molecular weight alginic acid by acid hydrolysis*. Carbohydrate, Polymer, v. 42, p. 421-425, 2000;
28. KAIGLER, D.; MOONEY, D., *Tissue engineering's impact on dentistry*. J. Dent. Educ.,v. 65, n. 5, 2001, p.456 – 462;
29. KELLOMAKI, M. TORMALA, P., *Processing of resorbable poly-alpha-hydroxy acids for use as tissue engineering scaffolds*, Methods in Molecular Biology, v. 238, 2004, p. 1 – 10;
30. KELLY, A., *Interface effects and the work of fracture of a fibrous composite*. Proc. R. Soc. London Ser. A., v. 319, p. 95-116, 1970;
31. KIM, M.J., *Analysis of errors in medical rapid prototyping models*, Int. J. Oral Maxilo fac. Surg. 2002; 31: 23–32;

32. KING, A. H., *Brown seaweed extracts (Alginates)*. Food Hydrocolloids, v. 2, p. 115-188, 1983;
33. KO, H.F. *et al. Novel synthesis strategies for natural polymer and composite biomaterials as potential scaffolds for tissue engineering*. Philosophical Transactions of the Royal Society A, v. 368, p. 1981-1997, 2010;
34. KOKUBO, T.; KUSHITANI, H.; SAKKA, S.; KITSUGI, T.; YAMAMURO, T., *Solutions able to reproduce in vivo surface-structure change in bioactive glass-ceramic A-W*. Journal of Biomedical Materials Research, v.24, p. 721-734, 1990;
35. PINHEIRO L.A., CHINELATTO M.A. CANEVAROLO S.V., *Polymer. Degrad. Stab.* 86 (2004) 445;
36. LAZARUS, C. R., WEST, R. L., OBLINGER, J. L., PALMER, A. Z., *Evaluation of a calcium alginate coating and a protective plastic wrapping for the control of Lamb carcass shrinkage*. Journal of Food Science, v. 41, p. 639-641, 1976;
37. LEE, K. G. *et al. Structural and physical properties of silk fibroin/alginate blend sponges*. Journal of Applied Polymer Science, v. 93, n. 5, p. 2174-2179, 2004a;
38. LEE, K. Y. *et al., Controlled degradation of hydrogels using multi-functional cross-linking molecules*. Biomaterials, v. 25, n. 13, p. 2461-2466, 2004b;
39. LEE, S. M. *et al., Novel silk/poly (butylene succinate) biocomposites: the effect of short fibre content on their mechanical and thermal properties*. Composites Science and Technology, v. 65,n. 3-4, p. 647-657, 2005;
40. LI, V. C.; CHAN, C.; LEUNG, C. K. Y. *Experimental determination of the tension-softeningrelations for cementitious composites*. Cement and Concrete Research, v. 17, p. 441-52, 1987;
41. MA, P.X., *Scaffolds for tissue fabrication Materials Today*, May, 2004;

42. MANCINI, M., MORESI, M. e SAPPINO, F. *Rheological behaviour of aqueous dispersions of algal sodium alginates*. Journal of Food Engineering, v. 28, p.283-295, 1996;
43. DE PAOLI, M. A., *Degradação e Estabilização de Polímeros - 2ª versão on-line – 2008*, Chemkeys, p. 228;
44. MARINS, L. V.; CESTARI, T. M.; SOTTOVIA, A. D.; GRANJEIRO, J. M; TAGA, R. *Radiographic and histological study of perennial bone defect repair in rat calvária after treatment with blocks of porous bovine organic graft material*. Journal of Applied Oral Science, v. 12, n. 1, 2004, p. 62 – 69;
45. MAY, T., HAUSER, H., WIRTH, D., *In vitro expansion of tissue cells by conditional proliferation*, In: Hauser, H., Fussenegger, M., Tissue Engineering, second edition., Totowa: Humana Press Inc, 2007. P. 1 – 15;
46. MEURER, E., *As Tecnologias CAD-CAM em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial*, Tese (Doutorado em Odontologia) - Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2002;
47. MINDESS, S.; LAWRENCE, F. W.; KESLER, C. E. *The J-integral as a fracture criterion for fiber reinforced concrete*. Cement and Concrete Research, v. 7, p. 731-42, 1977;
48. MIRTCHI, A., LEMAITRE, J., MUNTING, E., *Calcium Phosphate Cements: Study of the β -Tricalcium Phosphate-Dicalcium Phosphate- Calcite Cements*. Biomaterials 1989, 11, 83-88;
49. MOE, S. T., DRAGET, K. I. SKJAK-BRAEK, G., SMIDSROD, O. *Alginates. Food polysaccharides and their applications*, Stephen (Ed.), New York: Marcel Dekker, p. 245-286. 1995;
50. MUNTING, E.; MIRTCHI, A.; LEMAITRE, J. *Bone repair of defects filled with phosphocalcic hydraulic cement: an in vivo study*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 4, p. 337-344, 1993;

51. OHTSUKI, C.; KUSHITANI, H.; KOKUBO, T.; KOTANI, S. YAMAMURO, T. *Apatite formation on the surface of Ceravital-type glass ceramic in the body*. Journal of Biomedical Materials Research, v. 25, p. 1363-1370, 1991;
52. OLIVEIRA, A. P. C. *Produção e caracterização de partículas de hidrogéis para aplicações em cosméticos*. (2004). 158 f. (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004;
53. PARATT, N.J., *Defects in glass fibers and their effect on the strenght of plastic moldings*, Rubber Plast. Age, v. 41(3), p. 263-265, 1960;
54. PARK, J. B. *Biomaterials, an introduction*. New York: Plenum Press, 1979;
55. PARRIS, N., COFFIN, D. R., JOUBRAN, R. F., PESSEN, H. *Composition factors affecting the water vapor permeability and tensile properties of hydrophilic films*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 43, p. 1432-1435, 1995;
56. PAVLATH, A. E. VOISIN, A., ROBERTSON, G. H. *Pectin-based biodegradable water insoluble films*. Macromolecular Symposium, 140, p. 107-113, 1999;
57. QIN, Y. M. *Alginate fibres: an overview of the production processes and applications in wound management*. Polymer International, v. 57, n. 2, p. 171-180, 2008;
58. Rajesh V., et.al., *Surface hydrophilization of electrospun PLGA micro-nano-fibers by blending with Pluronic, F-108*, Polymer, 2010;
59. RATNER, B. D., HOFFMAN, A. S., SCHOEN, F. J., LEMONS, J. E., *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*, London: Academic Press, 1996, 864p;
60. RAVAGLIOLI, A.; KRAJEWSKI, A. *Bioceramics: materials, properties, applications*, New York: Chapman & Hall, 1992;

61. RILEY, V.R.; REDDAWAY, J.L. *Tensile strength and failure mechanics of fiber composites*. J. Mater. Sci., v. 3(1), p. 41-46, 1968;
62. RINAUDO, M. *Characterization and properties of some polysaccharides used as biomaterials*. Macromolecules Symposia, v. 245-246, p. 549-557, 2006;
63. YANG, H., YANG, X., CHI, X., I. THOMPSON, COOK R. J., ROBINSON, P., *Rapid prototyping of ceramic lattices for hard tissue scaffolds*, Materials and Design 29 (2008) 1802–1809;
64. SACHLOS, E; CZERNUSZKA, J.T., *Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds*. Eur. Cell Mater., v.5, 2003, p.29 – 40;
65. SANTOS, L. A., *Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área médico-odontológica*, 2002. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Brasil;
66. SCHEFFLER, M., COLOMBO, P., *Cellular Ceramics*, Weinheim: Wiley-Vch Verlag GmbH & Co., 2005, 670p;
67. SMIDSRÖD, O. *Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state*. Faraday Discuss. Chemical Society, v. 57, p. 263-274, 1974;
68. SOLOMÃO, Z, *Desenvolvimento e Caracterização de Compósitos de Poli (ϵ -Caprolactona) (PCL) e α -Fosfato Tricálcico (α -TCP) para Uso em Biomateriais*, 2011, Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas;
69. SUNG J. K., *et al.*, *Fabrication and characterization of 3D PLGA nanofiber/microfiber composite scaffolds*, Polymer, 2010;
70. TELLIS, B. C., SZIVEK, BLISS, C. L., MARGOLIS, R. K., VAIDYANATHAN, CALVERT, P., *Trabecular Scaffolds Created Using Micro CT Guided Fused Deposition Modeling*, Materials Science e Engineering, C 28, p. 171-178, 2008;

71. TOPOLESKI, L. D. T.; DUCHEYNE, P.; CUCKLER, J. M. *The effects of centrifugations and titanium fiber reinforcement on fatigue failure mechanism in poly (methyl methacrylate) bone cement*. Journal of Biom. Mat. Research, v. 29, p. 299-307, 1995;
72. TURBIANI, F. R. B., *Desenvolvimento e caracterização de filmes ativos de Alginato de Sódio reticulados com benzoato de cálcio*, Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2007;
73. VANUSCA D.J., FERNANDA J. S. ANNELISE K.A., CARLOS B., ROSANE L., SANDRA E, JEFFERSON B. S., *Preparação de Nanofibras de PLLA para uso como Biomaterial*, III Mostra de Pesquisa da Pós-Graduação PUCRS, 2008;
74. CHEN V. J., et.al., *Nano-fibrous poly(L-lactic acid) scaffolds with interconnected spherical macropores*, Polymer, 2004;
75. VOLKMER T. M., *Obtenção e Caracterização de α -Fosfato Tricálcico por Síntese de Combustão e Aplicação em Cimentos Ósseos e Arcabouços de Criogéis*, Tese de Doutorado, PPGE3M, UFRGS, 2011.
76. WILLIAMS, D.F. *Definitions in biomaterials*, Progress in Biomedical Engineering, v.4, 1987;
77. WILLIAMS, S. K., OBLINGER, J. L., WEST, R. L. *Evaluation of a calcium alginate film for use on beef cuts*. Journal of Food Science, v. 43, p. 292-296, 1978;
78. WOHLERS, T. *Rapid Prototyping & Tooling, state of the industry annual*, 2004 Worldwide Progress Report, Wohlers Associates, Inc., 2004;
79. XIXUE H., et.al., *Preparation and cell affinity of microtubular orientation-structured PLGA(70/30) blood vessel scaffold*, Biomaterials, 2008;
80. ZANDONÁ, M. *Otimização de enxertos ósseos aposicionais com auxílio de imagens tomográficas computadorizadas e engenharia simultânea*, Monografia - Especialização em Implantodontia, PUCRS, 2009.

