



Stella Aparecida de Andrade Pinto

**MALHA COMPÓSITA DE POLICAPROLACTONA (PCL) COM
BIOCERÂMICA BETA-FOSFATO TRICÁLCICO
(β -TCP) OBTIDA POR PROCESSO DE ROTOFIAÇÃO.**

32/2015

CAMPINAS
2015



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA**

Stella Aparecida de Andrade Pinto

**MALHA COMPÓSITA DE POLICAPROLACTONA (PCL) COM
BIOCERÂMICA BETA-FOSFATO TRICÁLCICO
(β -TCP) OBTIDA POR PROCESSO DE ROTOFIAÇÃO.**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica, na área de Materiais e Processos de Fabricação.

Orientadora: Prof.^ª Dr.^ª Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA STELLA APARECIDA DE ANDRADE PINTO E ORIENTADA PELA PROF.^ª DR.^ª CECÍLIA AMÉLIA DE CARVALHO ZAVAGLIA.


ASSINATURA DA ORIENTADORA

CAMPINAS
2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

P658m Pinto, Stella Aparecida de Andrade, 1979-
Malha compósita de polycaprolactona (PCL) com biocerâmica beta-fosfato
tricálcico (Beta-TCP) obtida por processo de rotofiação / Stella Aparecida de
Andrade Pinto. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Engenharia Mecânica.

1. Matriz óssea. 2. Biomateriais. 3. Enxerto ósseo. I. Zavaglia, Cecília Amélia
de Carvalho, 1954-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Mecânica. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Composite scaffold of polycaprolactone (PCL) with bioceramic Beta-tricalcium phosphate obtained by jet-spinning

Palavras-chave em inglês:

Bone matrix

Biomaterials

Bone graft

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Titulação: Mestra em Engenharia Mecânica

Banca examinadora:

Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia [Orientador]

Marcos Akira D'Ávila

Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior

Data de defesa: 11-02-2015

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Mecânica

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MANUFATURA E MATERIAIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO

**MALHA COMPÓSITA DE POLICAPROLACTONA (PCL) COM
BIOCERÂMICA BETA-FOSFATO TRICÁLCICO
(β -TCP) OBTIDA POR PROCESSO DE ROTOFIAÇÃO.**

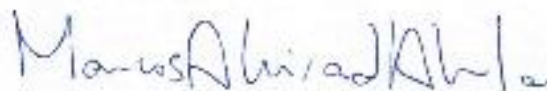
Autor(a): Stella Aparecida de Andrade Pinto

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:



Prof.^a Dr.^a Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, Presidente
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS (UNICAMP/FEM)



Prof. Dr. Marcos Akira d'Ávila
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS (UNICAMP/FEM)



Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC (UFABC)

Campinas, 11 de fevereiro de 2015.

Dedico este trabalho a Deus e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que mais esta etapa de minha formação acadêmica fosse alcançada.

AGRADECIMENTOS:

À minha orientadora **Prof.^a Dr.^a Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia** que proporcionou todas as oportunidades necessárias para meu crescimento e formação profissional e acadêmica;

À **Guinea Brasil de Camargo Cardoso** que sempre esteve disposta a me ajudar e orientar na realização deste;

Aos meus pais e irmãos: **José, Maria Aparecida, Andréa e José Henrique**, por terem me apoiado e incentivado em todas as decisões que tive que tomar para chegar até aqui;

Ao meu namorado **Francisco José de Nadai Dias** que de forma formidável me ajudou e incentivou a cada passo para a concretização deste trabalho;

Ao **Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues Júnior**, pela disposição e empenho para realização dos ensaios de citotoxicidade me acompanhando desde o início do trabalho;

Aos **colegas do Labiomec** que estiveram presentes em minha pesquisa tornando-a produtiva e a enriquecendo. Em especial ao **Felipe de Carvalho Zavaglia**;

Aos colegas do **DEMA** que contribuíram de maneira imensurável para a realização deste trabalho. Em especial à **Claudenete Leal**, ao **Cláudio Roberto Silveira** e todos que direta ou indiretamente participaram deste trabalho;

A **UFABC** que através da figura do Prof. Dr. Arnaldo proporcionou os testes de cultura e análise citoquímica;

Ao **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - BIOFABRIS** pelo apoio durante o desenvolvimento deste projeto.

*"Tudo aquilo que o homem ignora, não existe para ele.
Por isso, o universo de cada um se resume ao tamanho do seu saber."*

Albert Einstein

RESUMO:

A engenharia de tecidos é um conceito no tratamento de doenças e ferimentos. Tal área engloba o uso de tecnologias da biologia molecular e celular, combinando as vantagens da ciência dos materiais e processamento com a finalidade de produzir a regeneração de tecidos em situações onde a evolução tenha determinado que as células não tenham a capacidade regenerativa ao longo do tempo. A essência da engenharia de tecidos é que todas as células sejam viáveis e a capacidade de iniciação, sustentação e processo de regeneração estão diretamente ligados através de fatores de crescimento ou genes de modo que elas produzam um novo tecido de variedade requerida. Isto pode ser alcançado com a ajuda de um *scaffold* (matriz de forma geométrica guiada) ou uma arquitetura de um novo tecido, permitindo personalizar um lugar básico sobre um ferimento em um paciente isolado ou em escala industrial maior, nos quais o tecido resultante pode ser reimplantado sobre o paciente. Este trabalho de pesquisa científica teve como objetivo desenvolver malhas poliméricas de PCL com β -TCP obtidas através do processo de rotofiação. Para tal foram desenvolvidas 3 amostras para estudo: AMOSTRA 1 - malha rotofiada de PCL (controle), AMOSTRA 2 - malha rotofiada de PCL com β -TCP 5% e AMOSTRA 3 - malha rotofiada de PCL com β -TCP 10%, sendo que as referidas amostras foram também imersas em solução de Kokubo (fluido corpóreo simulado). As características físico-químicas e estruturais da cerâmica β -TCP foram avaliadas através de ensaios de difração de RX (DRX), granulometria e microscopia eletrônica de varredura (MEV), enquanto as malhas compósitas obtidas neste estudo foram caracterizadas por microscopia óptica (MO) e MEV. Como resultados tivemos a obtenção de malhas poliméricas com biocerâmica β -TCP que caracterizam-se como materiais promissores para enxertia visando ao reparo ósseo, visto que demonstraram sua bioatividade pela precipitação de apatita em sua superfície após imersão em fluido corpóreo simulado, servindo de base científica para estudos futuros que viabilizem a reconstrução de defeitos ósseos em seres humanos.

Palavras-chave: Matriz óssea, Biomateriais, Enxerto ósseo.

ABSTRACT:

Tissue engineering is a concept in injuries and diseases treatment. It uses biomolecular and celular technologies, combining the materials science advantages aiming tissue regeneration in situations that human evolution had determinated that the cells can't regenerate over time. The essence of tissue engineering is that all cells are viable and their ability of initiation, sustenance and regeneration process are directly linked through growth factors or genes to produce new tissue of the required variety. This can be achieved with an scaffold or matrix geometrically guided or an architecture of a new personalized tissue in a pacient or a bioreactor in industrial scale, that the new tissue can be reimplanted in the patient. The aim of this study was the development of polymer based scaffolds of PCL with β -TCP obtained by rotary jet-spinning. Three samples were developed: SAMPLE 1 - scaffold of PCL (control), SAMPLE 2 - scaffold of PCL with 5% wt. of β -TCP and SAMPLE 3 - scaffold of PCL with 10% wt. of β -TCP, where all of them were immersed in Kokubo's solution (simulated body fluid). The physico-chemical and structural characteristics of the β -TCP ceramic were evaluated by x-ray diffraction (XRD), granulometry and scanning electron microscopy (SEM) and the scaffolds of this study were characterized by optical microscopy (OM) and SEM. The results include polymer based scaffolds with bioceramic β -TCP that can be considered as promising biomaterials to be used as grafting materials for bone healing and have demonstrated their bioactivity by the apatite precipitation in their surface after immersion in simulated body fluid, acting as scientific basis for future studies in reconstruction of osseous defects in humans.

Keywords: Bone Matrix, Biomaterials, Bone Grafts.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Letras Gregas:

- α - alfa
- β - beta

Abreviaturas:

- BCP - fosfato de cálcio bifásico
- BMC - célula(s) de origem medular
- CaPs - fosfato de cálcio
- CO₂ - dióxido de carbono
- DRX - difração de raio-x
- FEM - Faculdade de Engenharia Mecânica
- HA - hidroxiapatita
- JCPDS: *Joint Comitee for Powder Diffraction Studies* (banco de dados de padrões de difração de raios X em materiais particulados)
- MEV - microscopia eletrônica de varredura
- MSC - célula(s) de origem mesenquimal
- OCP - octacálcio fosfato
- PCL - policaprolactona
- rpm - rotação(ões) por minuto
- RX - raio-x

- SBF - *Simulated Body Fluid* (Fluído Corpóreo Simulado)
- SFB - Soro Fetal Bovino
- TCP - fosfato tricálcico
- UFABC - Universidade Federal do ABC
- UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas
- α -TCP - biocerâmica alfa-fostato tricálcico
- β -TCP - biocerâmica beta-fosfato tricálcico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO:	1
2. OBJETIVO:	3
3. REVISÃO DA LITERATURA:	4
3.1 ENGENHARIA DE TECIDOS	4
3.2 TECIDO ÓSSEO	6
3.3 ENXERTOS ÓSSEOS	7
3.4 POLÍMEROS E BIOCERÂMICAS	9
3.4.1 Polycaprolactone ou policaprolactona (PCL)	9
3.4.2 Beta-Fosfato Tricálcico (β -TCP)	10
3.5 APLICABILIDADE DA ENGENHARIA DE TECIDOS	12
3.5.1 Scaffold (arcabouço)	14
3.5.2 Rotofiação	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS:	18
4.1 ROTOFIAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE SCAFFOLDS	18
4.2 DIFRAÇÃO DE RAIO-X (DRX)	20
4.3 GRANULOMETRIA POR DIFRAÇÃO A LASER	20
4.4 SOLUÇÃO DE KOKUBO (SBF)	21
4.5 MICROSCOPIA ÓPTICA	21
4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	22
4.7 CULTURA CELULAR NAS AMOSTRAS	22
4.7.1 Cultura celular	22
4.7.2 Análise por microscopia de luz	22
4.7.3 Análise citoquímica	23
4.7.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO:	25
5.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE B-TCP POR DIFRAÇÃO DE RAIO-X	25
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE B-TCP POR GRANULOMETRIA POR DIFRAÇÃO A LASER	26
5.3 MICROSCOPIA ÓPTICA DAS AMOSTRAS	28
5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DAS AMOSTRAS	29
5.4.1 Histogramas dos resultados obtidos por MEV	32
5.4.1.1 Histogramas da amostra 1	32
5.4.1.2 Histogramas da amostra 2	33
5.4.1.3 Histogramas da amostra 3	34
5.4.2 MEV APÓS IMERSÃO EM SOLUÇÃO DE FLUÍDO CORPÓREO SIMULADO (SBF)	36
5.5 ANÁLISE CITOQUÍMICA - CARBOIDRATOS	38
5.6 ANÁLISE CITOQUÍMICA - PROTEÍNAS	39
5.7 ANÁLISE CELULAR NAS AMOSTRAS - MEV	41
5.8 APLICABILIDADE DO BIOMATERIAL OBTIDO:	42
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS:	43
6.1 CONCLUSÕES:	43
6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS:	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	44

1. INTRODUÇÃO:

O tecido ósseo não serve somente como suporte mecânico, mas também como uma reserva de minerais, particularmente cálcio e fosfato, sendo um tecido dinâmico que possui as capacidades de auto-regeneração e remodelamento, viabilizando seu reparo sem presença de tecido cicatricial (Murugan & Ramakrishna, 2005).

Muitas situações clínicas que envolvem grande perda de tecido ósseo como, por exemplo, fraturas causadas por graves acidentes, prejudicam e muitas vezes inviabilizam o reparo ósseo. No ano 2.000 a literatura relata que eram esperados 1.000.000 de procedimentos de enxertia óssea realizados pelo mundo, sendo que 15% desses procedimentos envolviam enxertia óssea sintética (ApaPore® Impaction Grafting Hip Study, 2005).

Os relatos acima justificam a crescente curva de crescimento da engenharia de tecidos de compósitos associados à células osteogênicas e fatores de crescimento. Em defeitos menores o tecido ósseo tem a capacidade de auto-regeneração em curto período de tempo (poucas semanas). Já em casos nos quais o defeito ou a perda de volume se dá em maiores proporções, onde o osso não consegue se recuperar por si só, os enxertos são necessários para viabilizar a restauração da função, sem prejudicar a viabilidade dos tecidos adjacentes (Lakes, 1993).

Como alternativas para enxertia óssea temos relatados na literatura como métodos terapêuticos, porém com algumas limitações os auto e alo-enxertos. Essas limitações justificam o estudo de biomateriais, incluindo a hidroxiapatita com base colágena, que têm ganhado reconhecimento como substituto ósseo não somente por sua composição e estrutura similares ao osso natural, mas também por suas propriedades funcionais como grande área de superfície de contato e sua superior força mecânica (Hartgerink *et al.* 2001).

Atualmente é consenso na literatura que o estudo de biomateriais para enxertia óssea é uma área promissora para desenvolvimento de substitutos ósseos das mais variadas e sofisticadas funções. Na obtenção de biomateriais para enxertia insere-se o processo de rotofiação, que consiste na obtenção de fibras poliméricas associadas ou não à outros biocomponentes. Na intenção de enxertia para propiciar o reparo ósseo, destaca-se a biocerâmica β -TCP associada neste estudo ao polímero policaprolactona (PCL). Assim, o presente estudo na área de engenharia

tecidual, envolvendo nano e micro partículas cerâmicas como alternativa para tratamento de perdas ósseas tem respaldo na literatura e se encontra inserido no contexto de busca de novas opções de tratamento para os referidos casos.

2. OBJETIVO:

Este trabalho foi realizado visando ao estudo da utilização do compósito formado pelo polímero PCL e β -TCP desenvolvido no laboratório de biomateriais da FEM - UNICAMP, na formação de matrizes porosas tridimensionais através do processo de rotofiação para aperfeiçoar o processo de formação de *scaffolds* na utilização em engenharia tecidual.

3. REVISÃO DA LITERATURA:

3.1 Engenharia de Tecidos

A essência da engenharia de tecidos é que todas as células sejam viáveis e a capacidade de iniciação, sustentação e processo de regeneração estão diretamente ligados através de fatores de crescimento ou genes de modo que elas produzam um novo tecido do tipo requerido. Entretanto, um novo conceito de terapia médica tornou-se disponível e é extremamente importante ser aplicado em alguns tipos de doenças relevantes e em condições condizentes com as necessidades do paciente.

A engenharia de tecidos, por suas características e recentes avanços, caracteriza-se como um novo desafio para a área científica, com grande expectativa nos resultados que podem servir para uso em seres humanos. Por outro lado, há uma abordagem onde a engenharia de tecidos deveria focar nas condições médicas prejudicadas como tentativas para as quais não existe sucesso terapêutico atualmente. A discussão recente está sobre essas condições onde o conceito deveria ser focado, ou seja, nos estudos necessários para viabilizar o uso da engenharia tecidual na reabilitação médica.

Uma descrição das oportunidades clínicas em potencial, entretanto, exige que sejam consideradas situações amplas de benefícios e riscos clínicos. Os tipos de tecidos mais comumente utilizados na engenharia de tecidos são pele, cartilagem e osso. Como descrito na literatura, a pele é capaz de se reparar, regenerando-se por toda sua extensão. Conceitualmente, o reparo é o processo de cura de lesões teciduais e pode ocorrer por regeneração ou cicatrização, sendo que na regeneração o tecido morto é substituído por outro morfofuncionalmente idêntico e na cicatrização existe a formação de um novo tecido, diferente do original, para sua substituição. Porém existem muitas condições onde é impossível a reparação e a regeneração da pele de forma que seja alcançada relevância clínica aceitável. A reconstrução de pele está indicada onde grande extensão da mesma tenha sido danificada, como por exemplo, em queimaduras e escoriações,

sendo que nessas situações geralmente ocorrem mudanças irreversíveis para vascularização do tecido adjacente, de tal maneira que a pele é privada da sua fonte de nutrição, criando uma ferida.

Tais situações clínicas de grande extensão incluem-se nas indicações para tentativas de reabilitação através do uso da engenharia de tecidos. A primeira geração de produtos na engenharia de tecidos comercialmente disponível tem atentado para esta área de regeneração de pele, com algum grau de sucesso.

Outro tecido de interesse para reconstrução com auxílio da engenharia tecidual é o tecido cartilaginoso, tecido este que por tratar-se de tecido conectivo específico, não possui característica intrínseca de regeneração, sendo que são conhecidas condições nas quais a regeneração poderia ter enormes benefícios clínicos. A cartilagem de articulação como a coxo-femural, o joelho, articulação têmporo-mandibular, esta última foco de muitos estudos na Odontologia, entre outras, sofrem doenças degenerativas, tais como osteoartrites e traumas de diversas causas. Uma grande atenção tem sido voltada para a o tratamento de doenças articulares, sendo que nas últimas décadas a tecnologia de dispositivos médicos tem produzido muitos e efetivos métodos de tratamento, possibilitando inclusive a substituição dessas articulações.

O mais importante na engenharia de tecidos é a possibilidade de tratamento relativamente rápido e eficaz de pequenas lesões incluindo defeitos maxilo-faciais de diversas origens, sendo que atualmente os avanços derivados de estudos científicos aplicados na área, tem tornado os tratamentos associados à engenharia tecidual uma realidade para profissionais de saúde e pacientes, assim como economicamente viável.

Existe espaço no meio científico para discutir todo potencial de aplicação para engenharia de tecidos, assunto este que pode ser discutido associado à muitas doenças não infecciosas e não cancerígenas, especialmente aquelas envolvendo tecido congênito danificado, tecido traumatizado, condições degenerativas, metabólicas, doenças associadas ao envelhecimento, são alvos potenciais. Tais condições apresentam-se como assuntos de relevância científica, multiprofissional, visto que são causas de morbidade e mortalidade na população mundial.

Atualmente, sucessos clínicos são amplamente alcançados e muito atrativos. A avaliação risco *versus* benefício é construtiva considerando que o estado da ciência sob a luz da engenharia

de tecidos está evidenciando múltiplas possibilidades de aplicação de biomateriais, quando devidamente indicada.

3.2 Tecido Ósseo

Outro tecido que se objetiva regenerar através das técnicas da engenharia de tecidos é o tecido ósseo, o qual é composto basicamente por hidroxiapatita e proteínas sendo esta última representada basicamente pelo colágeno. O colágeno tem ação de arcabouço estrutural no qual os minúsculos cristais de hidroxiapatita estão dispostos para fortalecer a matriz orgânica no tecido ósseo, ou seja, o colágeno é responsável pela resistência enquanto a hidroxiapatita proporciona rigidez (Currey, 2002).

Para a viabilização do reparo ósseo através de biomateriais, faz-se necessário que sejam usadas estratégias tanto na estrutura, quanto na composição dos compósitos biocompatíveis, de tal forma que a reparação óssea seja alcançada com sucesso. A biomineralização comumente inicia após 10 dias de contato com a matriz orgânica. Este processo de biomineralização é essencial para determinar o componente biomecânico do tecido ósseo. Os componentes celulares do tecido ósseo são fatores essenciais para ativação e controle do metabolismo ósseo (Aubin & Liao, 1996).

Os osteoblastos são responsáveis pela formação de um novo osso (osteoprogenitores), sendo que possuem a função de secretar colágeno e revestir com proteínas não-colágenas com a propriedade de obter minerais como o cálcio e o fósforo da corrente sanguínea direcionando a nova formação óssea. Os osteócitos são células maduras derivadas dos osteoblastos que são responsáveis pela manutenção do tecido ósseo. Sua principal função é transportar os agentes minerais entre o osso e o sangue. Os osteoclastos são as células maiores que são encontradas na superfície do osso mineral próximos às zonas de reabsorção óssea, sendo os próprios responsáveis pelo processo de reabsorção óssea.

As células que revestem o osso são encontradas ao longo da superfície dos ossos maduros, regulando os transportes de minerais de dentro para fora do tecido ósseo. Elas também respondem à ação hormonal de proteínas exclusivas que ativam as células osteoclásticas. Todas as células

ósseas descritas, fazem parte da constituição do tecido ósseo que, hierarquicamente e de forma equilibrada, mantém o osso saudável.

No estudo do osso é sabido da existência de dois tipos de tecidos ósseos: medular ou esponjoso e cortical ou compacto, sendo diferenciados pela sua densidade óssea. De acordo com a organização de suas porosidades, são estabelecidas suas múltiplas funções que incluem transporte de minerais, oxigênio e fluídos corpóreos. O osso esponjoso ocupa aproximadamente 20% do osso total, sendo também denominado de trabeculado ósseo, possuindo característica de ser mais leve e menos denso que o osso cortical ou compacto. Apresenta ainda maior porosidade e maior concentração de vasos sanguíneos quando comparado ao osso cortical.

Osso cortical é mais denso que o osso esponjoso, também chamado de compacto, ocupa aproximadamente 80% do osso total, possuindo por sua vez, menor porosidade e menor concentração de vasos sanguíneos quando comparado ao osso medular. A arquitetura dos poros do osso cortical não é visível a olho nu e este tipo de osso tem a função mecânica de suporte de tensão, compressão e torção, enquanto o osso medular mecanicamente auxilia somente na compressão.

3.3 Enxertos Ósseos

Os enxertos ósseos proveem suporte mecânico ou estrutural em defeitos de falta ou ausência óssea ou em defeitos oriundos da má-formação óssea. A enxertia óssea é usada largamente em cirurgias ortopédicas, plásticas, maxilo-faciais e cirurgia oral. O tecido ósseo é considerado o segundo tecido mais transplantado em seres humanos.

Os materiais de enxertia não são simplesmente para repor a substância perdida, mas também possibilitam a regeneração óssea. Como uso deste método de enxertia, o tempo de cura é reduzido e a força de formação de áreas defeituosas são estimuladas como uma ponte entre o enxerto enxertado e o osso em processo de reparação.

A restauração de defeitos ósseos por regeneração de tecidos é a novidade em relação aos enxertos ósseos. Os enxertos autógenos são a primeira opção de tratamento. A função do enxerto

é promover um arcabouço para a regeneração de um novo tecido ósseo, tecidos moles, vasculares e outros componentes metabólicos (Alamein *et al.*, 2013). As características osteogênicas são ideais para enxertia óssea. Os enxertos ósseos podem ser classificados em três tipos de acordo com a resposta que geram no tecido ósseo *in vivo*, podendo ser osteocondutor, osteoindutor ou osteogênico.

O enxerto osteocondutor permite a infiltração e regeneração de um novo tecido ósseo, o enxerto osteoindutor tem a capacidade de induzir a diferenciação de uma célula indiferenciada por células osteogênicas ou por indução de células proliferativas. Segundo Bianco *et al.* em 2001, existem ainda os enxertos osteogênicos, os quais possuem potencial similar aos ossos autógenos.

Como métodos de enxertia óssea, além dos auto e alo-enxertos, são relatados na literatura os xeno-enxertos e enxertos aloplásticos ou sintéticos. Os auto-enxertos fazem parte de um método no qual o tecido é transplantado de uma área doadora para uma área receptora em um mesmo indivíduo. Os alo-enxertos são transplantes teciduais entre indivíduos da mesma espécie. Os xeno-enxertos são transplantes de tecidos de espécies diferentes (geralmente animal-humano). Os enxertos sintéticos têm ganhado interesse como alternativa para realização de enxertos, sendo que o método cirúrgico que utiliza substâncias sintéticas para reparar ou regenerar o defeito do tecido ósseo é conhecido como aloplástico ou enxertia óssea sintética.

Os benefícios dos enxertos sintéticos incluem sua disponibilidade, possibilidade de esterilização, custo efetivo e redução da morbidade, não exigindo área doadora. Os enxertos sintéticos ainda eliminam algumas falhas dos auto ou alo-enxertos, associadas à menor dano e menores chances de rejeição ou transmissão de doenças infectocontagiosas (Murugan & Hamakrishna, 2005).

Muitos biomateriais têm sido desenvolvidos com sucesso para uso em enxertos ósseos. Os ossos e articulações são substituídos comumente por materiais metálicos, cerâmicos, poliméricos e compósitos. Na maioria dos casos os metálicos e cerâmicos são utilizados em tecidos que recebem alta carga de força, enquanto os polímeros são aplicados em tecidos de menor carga, sendo que ambos são utilizados em tecidos que recebem forças mecânicas. Os compósitos são usados em ambos os casos, ou seja, tanto em tecidos de alta quanto em tecidos de baixa carga de força recebida (Park & Bronzino, 2000).

3.4 Polímeros e biocerâmicas

As cerâmicas foram introduzidas nas cirurgias ortopédicas devido sua alta resistência à compressão, sua alta força estrutural e sua alta biocompatibilidade e resposta tecidual. São também denominadas biocerâmicas e divididas em três categorias: bioinerte, bioativa e bioabsorvível. Grande biocompatibilidade é encontrada na hidroxiapatita e nos biovidros que são frequentemente utilizados como substitutos ósseos ou como agentes de revestimento nos materiais biometálicos ou biocompósitos. Ainda como propriedades destes materiais temos a grande interação interfacial com o tecido hospedeiro, caracterizando sua bioatividade, sendo assim considerados estimuladores ósseo-integrativos. No entanto os referidos materiais são bem menos bioabsorvíveis e o tricálcio-fosfato é usado como enxerto ósseo bioabsorvível.

A reabsorção das cerâmicas acontece de forma que o tecido ósseo vai crescendo enquanto o arcabouço cerâmico é reabsorvido, restando após a reabsorção do biomaterial, somente tecido ósseo saudável. As biocerâmicas possuem algumas desvantagens devido suas pobres propriedades mecânicas como sua fragilidade e baixa dureza (Bohner, 2000).

Em relação aos polímeros, os mesmos são usados como enxertos ósseos devido sua biocompatibilidade, flexibilidade de modelação, baixo peso e ductibilidade. Possuem como desvantagem sua baixa rigidez, sendo que o interesse em seu uso advém de sua flexibilidade e biodegradação que podem ser controladas. Por sua vez, os polímeros também são classificados em biodegradáveis e não-biodegradáveis (Pachence & Kohn, 2000).

3.4.1 Polycaprolactone ou policaprolactona (PCL)

Este polímero consiste em um poliéster biorreabsorvível com baixa temperatura de transição vítrea, sendo que sua degradação ocorre por hidrólise de suas ligações do tipo éster em condições fisiológicas. É utilizado como base dos *scaffolds* em diversos estudo, ou seja, como

componente sintético sem capacidade de interagir com as células e dar suporte de adesão e migração celular (Badrossamay *et al.*, 2014).

3.4.2 Beta-Fosfato Tricálcico (β -TCP)

No desenvolvimento de novos implantes e preenchimentos ósseos, os fosfatos de cálcio (CaPs) possuem um perfil biológico altamente atrativo, pois apresentam composição química muito semelhante à fase mineral dos ossos e dentes. Podem, então participar ativamente do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica, apresentando grande habilidade em formar ligações com o tecido hospedeiro sem, no entanto, apresentar toxicidade local ou sistêmica, resposta inflamatória ao implante e formação de um tecido fibroso envoltório. Sendo assim, CaPs conseguem fornecer um grau de integridade estrutural ao implante com a finalidade de mantê-lo no lugar e intacto até que o novo osso cresça. Além disso estimulam o crescimento de um novo osso e são solúveis, de maneira que podem ser reabsorvidos pelo organismo permitindo que o novo osso substitua o implante (Orr *et al.*, 2005).

Os CaPs são biomateriais disponíveis em diferentes formas físicas (partículas ou blocos; densas ou porosas). Uma das principais características é a porosidade ideal para uma biocerâmica semelhante à parte esponjosa do osso. CaPs sintéticos como substitutos ósseos, são classificados como hidroxiapatita (HA): $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, fosfato tricálcico (β -TCP): $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e fosfato de cálcio bifásico (BCP) para misturas de HA e β -TCP com deficiência de cálcio. Fosfato de cálcio possui diferentes solubilidades *in vitro* e uma velocidade de dissolução em solução tampão ácida, o que pode refletir na comparação de dissolução ou na degradação *in vitro* (LeGeros, 1991 e LeGeros & LeGeros, 1996).

O fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, (TCP) que pode ser encontrado em quatro formas distintas estáveis em diferentes intervalos de temperatura: o α -TCP estável entre 1120°C e 1470°C, porém metaestável em temperaturas abaixo de 1120°C; o α' -TCP estável apenas acima de 1470°C; o β -TCP estável abaixo de 1120°C e o β' -TCP estável apenas em elevadas pressões. Sabe-se que nenhum desses compostos é formado nos sistemas biológicos, porém a relevância destes CaPs está no fato de que o β -TCP facilmente hidrolisa a octacálcio fosfato (OCP),

$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e o α -TCP a hidroxiapatita deficiente de cálcio (CDHA, $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$), materiais que são facilmente encontrados em tecidos biológicos mineralizados. No pH do organismo, o β -fosfato tricálcico, é muito solúvel e libera íons de cálcio e de fosfato que podem promover a osteogênese. De fato, íons cálcio possuem alguns mecanismos, como precursores da diferenciação das células osteogênicas para células ósseas. A saturação dos íons encoraja a precipitação de micro cristais de fosfato de cálcio, facilitando a nucleação para a osteogênese. O TCP é considerado altamente bioativo (Hench & Wilson, 1993). O polimorfo do fosfato tricálcico mais conhecido e mais fácil de ser obtido é o β -TCP, que apresenta propriedades muito semelhantes às calcificações encontradas em cálculos patológicos (LeGeros, 1991). O β -TCP apresenta-se como uma cerâmica reabsorvível sintetizada a partir do hidróxido de cálcio - $\text{Ca}(\text{OH})_2$ - e ácido fosfórico (H_3PO_4), sendo um material biorreabsorvível e biocompatível parcialmente reabsorvido entre 06 à 15 semanas após implantado no organismo, dependendo esta reabsorção de sua porosidade, estrutura química e tamanho das partículas (Wang *et al.*, 2014).

A reabsorção do β -TCP ocorre através da dissolução, a qual depende diretamente da solubilidade do material, do pH local no meio fisiológico, desintegração física em partículas menores e fatores biológicos. O β -TCP tem sido utilizado em técnicas regenerativas, ou seja, em procedimentos médicos e/ou odontológicos que necessitem de formação de tecido ósseo, sendo considerado um biomaterial para enxerto ósseo designado para preenchimento e reconstrução de defeitos de paredes ósseas traumáticas ou degenerativos.

Esta biocerâmica tem tido destaque na utilização em procedimentos que visem à reconstrução óssea devido sua ausência de toxicidade local ou sistêmica, ausência de respostas de corpo estranho ou inflamações e aparente habilidade de se ligar ao tecido hospedeiro. Esta característica ocorre pela sua natureza química da qual é formado basicamente por íons cálcio e fosfato que participam ativamente do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica.

3.5 Aplicabilidade da engenharia de tecidos

A medula óssea é um tecido rico em capilares sinusóides, bem organizado, composto por diversos tipos celulares. As células podem ser encontradas na cavidade medular de ossos longos e em porções esponjosas de ossos vertebrais. Em experimentos anteriores (Ogawa *et al.*, 2004 *apud* Salgado, 2009), foi demonstrado que as células-tronco mesenquimais podem se diferenciar rapidamente em linhagens do tipo conjuntivo, como osteoblastos, condrócitos e adipócitos. Por isso, a medula óssea é um compartimento que preserva células no estado indiferenciado.

Os estudos recentes têm procurado avaliar os enxertos aloplásticos ou sintéticos em estudos com células-tronco. A efetividade dessas células depende da densidade e da atividade das células indiferenciadas. As vantagens sobre os ossos autógenos é de que podem ser colhidas do próprio paciente sem complicações cirúrgicas e podem ser empregadas no osso defeituoso. Este tipo de transplante é minimamente invasivo para enxertia óssea, sendo que eficiência das células-tronco depende do sistema que carregam. Elas podem ser associadas com outros materiais de enxertia óssea, em particular os enxertos osteocondutores, podendo serem transplantadas na própria região de defeito ósseo. Tem sido relatado na literatura que existe a possibilidade de aumento da taxa de diferenciação e proliferação do osso medular em conjunto com as células-tronco (Tiedmann *et al.*, 1991), colágeno (Cornell *et al.*, 1991) e hidroxiapatita (Bozic *et al.*, 1999) na forma de compósitos de enxertia óssea.

Os biomateriais para aplicação na regeneração óssea na técnica de engenharia tecidual devem possuir algumas características tais como:

- **Biocompatibilidade:** o material deve ser atóxico, não promover reação de inflamação aguda ou crônica, favorecer a regeneração tecidual e, portanto, não promover rejeição do hospedeiro;
- **Bioabsorção:** o material deve possuir degradabilidade que irá acompanhar a formação de um novo tecido;
- **Porosidade:** deve ter uma densidade de poros de 75 % com tamanhos médios de 200- 400 μm de diâmetro e interconectados, possuindo uma grande área superficial, para favorecer a adesão protéica e aumentar a formação de colágeno;
- **Osteocondução:** deve viabilizar liberação e controle de proteína osteocondutiva,

com liberação de agentes osteoindutivos, bioquimicamente inertes à proteína osteocondutiva, promovendo o crescimento ósseo, favorecido pela estrutura de poros;

- **Quimiotaxia:** característica de atrair células-tronco mesenquimais e fornecer meios de adesão celular, facilitando a proliferação e a diferenciação celulares;
- **Angiogênese:** característica de promover vascularização, sendo hidrofílico, para absorver fluido sanguíneo e reforçar a coagulação inicial após a implantação;
- **Baixo custo:** não pode exceder o valor do autoenxerto, deve possuir materiais constituintes em abundância e de esterilização eficiente (Coelho *et al.*, 2002; Valério *et al.*, 2004 *apud* Salgado, 2009).

Atualmente, as aplicações da engenharia de tecidos vêm permitindo entre outras, a utilização de células do próprio paciente (Parenteau, 2002). Essa técnica vem sendo utilizada ultimamente com a agregação de células-tronco adultas diferenciadas ou células progenitoras para o tecido que se deseja regenerar. A fonte celular pode ser obtida do próprio indivíduo, por meio das diversas áreas doadoras de células-tronco adultas (Salgado, 2009).

Novas abordagens terapêuticas através do uso de engenharia de tecidos através de estudos celulares para formação de tecido ósseo, têm sido de relevância para o tratamento de defeitos ósseos. No referido contexto, a engenharia de tecidos envolvendo células-tronco mesenquimais (MSC) é uma das mais promissoras linhas de pesquisa para regeneração óssea, principalmente quando são utilizadas células ósseas de origem medular (BMC) .

O uso de BMC tem proporcionado regeneração óssea em diferentes tipos de defeitos, incluindo a região maxilo-facial. Este trabalho foi idealizado considerando esta nova linha de estudo com a estratégia de uso de implantes de biomateriais associados à células-tronco para tratamento de defeitos ósseos (Ribeiro *et al.*, 2012).

Todos elementos acima descritos fazem parte da engenharia de tecidos, sendo que a mesma envolve os princípios de bioengenharia e biociência em direção ao desenvolvimento de novos substitutos biológicos capazes de restaurar, manter ou aumentar a função tecidual a qual falha em sua regeneração ou cura espontânea.

3.5.1 *Scaffold* (arcabouço)

O primeiro conceito da engenharia de tecidos é isolar uma célula específica de um paciente para permitir a cultura desta célula em um *scaffold*, que será implantado em área de defeito ósseo no corpo do paciente que precisa de regeneração e para guiar ou direcionar essa nova formação tecidual dentro do *scaffold*, o qual deve ser todo biorreabsorvido (Lee & Mooney, 2001).

Três fatores devem ser considerados para o sucesso da engenharia de tecido ósseo: células, *scaffold* e a matriz celular interagindo com o *scaffold*. O *scaffold* é uma matriz tridimensional artificial que tem a principal função em acomodar as células. Essas devem proliferar, migrar e diferenciarem-se conduzindo a formação de um tecido específico enquanto secretam matriz extracelular necessária para regeneração tecidual. O emprego direto de suspensão de células sem *scaffold* tem sido utilizado em alguns casos (Brittberg *et al.*, 1994; Ponder *et al.*, 1991), porém estes processos encontram dificuldades por terem um pobre controle da localização das células transplantadas. O *scaffold* é utilizado como um fator que regula o crescimento celular e proporciona um arcabouço para desenvolvimento celular mais organizado, com a capacidade de mimetizar a arquitetura tridimensional do tecido nativo. Esta matriz provida pelo *scaffold* proporciona suporte estrutural para desenvolvimento celular *in vitro* ou *in vivo* em relação à adesão celular e regeneração tecidual (Badrossamay *et al.*, 2014).

Na cultura *in vitro*, as células são obtidas pela remoção de tecido do paciente e são colocadas em contato com os biomateriais, podendo ou não serem associados a um biorreator (FIGURA 1). Os parâmetros de cultura devem ser controlados por computador e um técnico responsável. Quando o material possuir uma quantidade suficiente de células aderidas e diferenciadas, o conjunto é implantado no paciente por um profissional cirurgião.

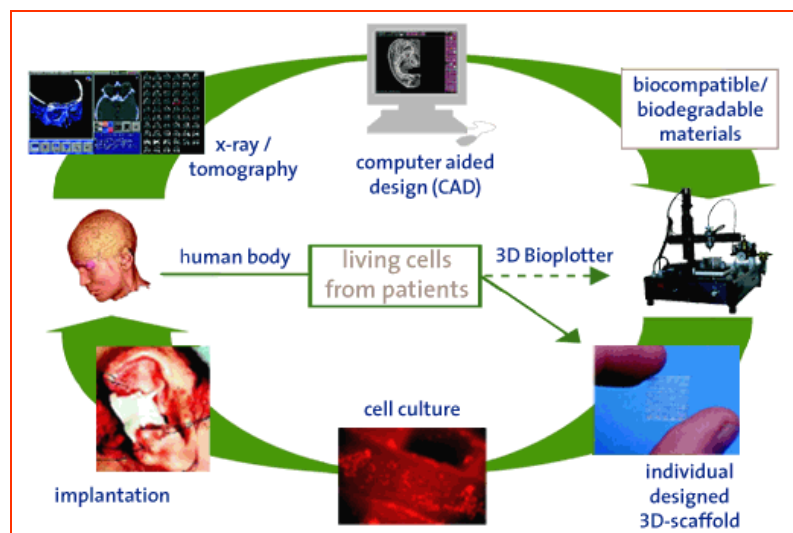


Figura 1: exemplo esquemático do Bioplotter, mecanismo para obtenção de estruturas 3D e deposição de células com crescimento em biorreator (Fonte: http://www.caldeaz.co.za/Tissue_Engineering.aspx).

Os materiais empregados na engenharia de tecidos são denominados biomateriais e provêm uma superfície para proliferação celular, regenerando tecidos vivos perdidos. Como a engenharia de tecidos é uma ciência interdisciplinar, os trabalhos envolvem conhecimentos das áreas de biologia, ciências da saúde, de engenharia e ciência dos materiais (Roether *et al.*, 2002; Langer, 1993 *apud* Salgado, 2009). A engenharia de tecidos trata os defeitos ósseos principalmente com o uso de *scaffold* osteocondutor com células osteogênicas e fatores de crescimento osteoindutor, o que cria uma estrutura semelhante a um enxerto ósseo. As células osteogênicas em conjunto com *scaffold* de compósito biocompatível são desenvolvidas usando técnicas de cultura (exemplo FIGURA 2), assim como métodos convencionais, podendo serem investigadas as funções celulares *in vitro* (Du *et al.*, 1999).

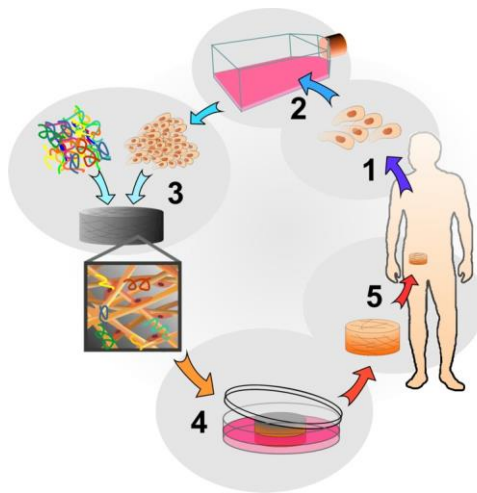


Figura 2: esquema ilustrativo da engenharia de tecidos, visando à formação do novo tecido requerido (1: células humanas, 2: meio de cultura, 3: células humanas multiplicadas com fatores de crescimento em *scaffold*, 4: desenvolvimento do novo tecido e 5: enxertia do tecido obtido).

Fonte: http://www.bw-i.de/uploads/tx_cal/media/04_Fachvortrag_Tovar_FhG_03072014.pdf

3.5.2 Rotofiação

A rotofiação é uma alternativa ao uso da eletrofiação que é a técnica mais popular na produção de fibras ultrafinas e utiliza-se do carregamento elétrico de partículas de polímero. A eletrofiação necessita de um campo elétrico de alta voltagem, o controle da orientação das fibras é impreciso, é sensível à variações na condutividade da solução empregada, possui baixa produtividade e dificuldade de produção de estruturas tridimensionais, fatores estes que limitam a sua aplicação. A eletrofiação proporciona um pobre controle do alinhamento das fibras, suas propriedades químicas e físicas são menos harmoniosas quando comparadas ao processo de rotofiação e alguns biomateriais não são passíveis de fabricação pelo método de alta voltagem de eletrofiação, devido sua cura em alta temperatura e baixa viscosidade da solução (Badrossamay *et al.*, 2014; Alamein *et al.*, 2013).

Com a finalidade de produzir fibras em maior escala foi desenvolvido um método que utiliza rotação em alta velocidade, na qual um bico ejeta o polímero que sofre extensivo

alongamento antes de solidificar-se, constituindo-se no processo de rotofiação (Badrossamay *et al.*, 2010).

Este processo consiste em um reservatório com quatro orifícios alocados em suas paredes acoplado a um motor que controla sua velocidade de rotação. Durante o processo o reservatório que contém a solução polimérica deve ser continuamente alimentado para garantir uma pressão hidrostática constante e um fluxo contínuo, resultando em fibras que serão removidas da parede do coletor cilíndrico.

O solventes utilizados na solução polimérica evaporam de acordo com sua volatilidade. No caso do uso de solventes altamente voláteis, os jatos formarão fibras mais espessas que passarão por uma rápida solidificação, dificultando a extensão do jato. Para a produção de fibras adequadas fazem-se necessários o controle da velocidade de rotação, o rápido jateamento da solução polimérica e utilização de solvente adequado.

No processo de rotofiação os fios são formados pela expulsão da solução polimérica através dos orifícios de vazão, quando o conjunto gira em seu próprio eixo e sofre uma aceleração centrípeta e um processo de centrifugação, onde o efeito causado é o lançamento da solução para fora, formando os fios (Zavaglia *et al.*, 2012).

Devido às características acima descritas associadas ao seu baixo custo, a rotofiação consiste em um processo rápido e fácil para fabricação de fibras compósitas sem necessidade de propulsor elétrico, sendo capaz inclusive de fabricar estruturas de fibras alinhadas tridimensionalmente de uma extensa variedade de polímeros (Badrossamay *et al.*, 2010).

4. MATERIAIS E MÉTODOS:

Para a realização do experimento idealizado para a confecção desta dissertação, foram utilizados três grupos de estudo para avaliar a proliferação celular de células fibroblásticas em malha compósita de PCL com biocerâmica β -TCP, sendo eles:

- AMOSTRA 1 (controle): obtenção de malha rotofiada de PCL;
- AMOSTRA 2: obtenção de malha rotofiada de polímero PCL e biocerâmica β -TCP (5%);
- AMOSTRA 3: obtenção de malha rotofiada de polímero PCL e biocerâmica β -TCP (10%).

As malhas compósitas de polímero PCL e PCL com β -TCP, foram enviadas para cultura celular e análise citoquímica no Centro de Ciências Naturais e Humanas da Universidade Federal do ABC (UFABC).

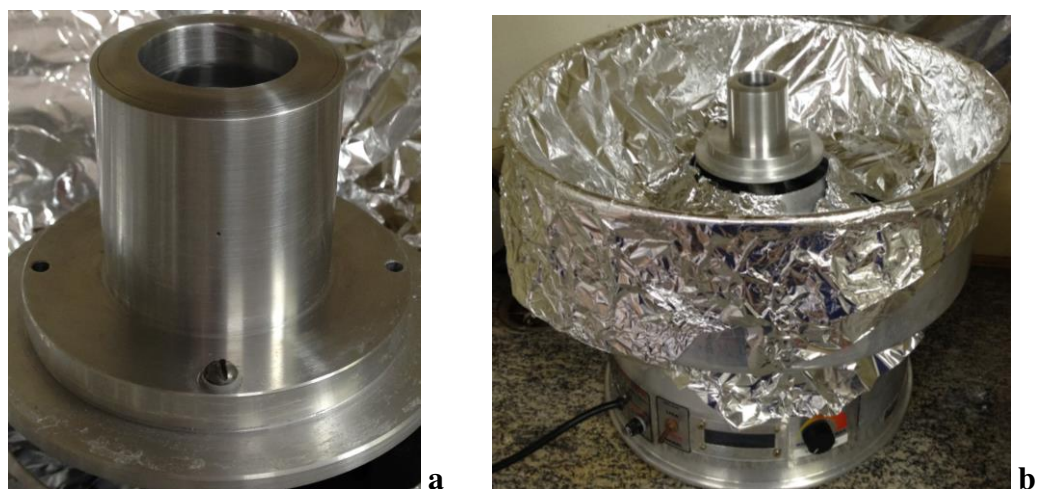
A avaliação das características mecânicas e funcionais (caracterização e análise de desempenho) do compósito foram realizadas através de análise microscópica, avaliação citoquímica e bioatividade. As características físico-químicas e estruturais da biocerâmica foram avaliadas através de ensaios de difração de RX, granulometria por difração à laser e microscopia eletrônica de varredura.

4.1 Rotofiação para obtenção de scaffolds

O processo de rotofiação foi utilizado neste estudo para obtenção de malhas de PCL e de PCL com β -TCP. Para a obtenção da malha de PCL (AMOSTRA 1) foram utilizados 08ml de clorofórmio e 1,5g de PCL em um Erlenmeyer de 50ml, sendo que sob agitação magnética foi aguardada a dissolução total do PCL por aproximadamente 1 hora. A solução obtida foi depositada lentamente no reservatório (FIGURA 3), submetida à rotação de 3.500rpm e à partir deste processo foi obtida malha do polímero PCL.

A AMOSTRA 2, que consiste em polímero PCL com β -TCP, foi obtida através de 0,075g de β -TCP (5%) diluído em 08ml de clorofórmio em agitação magnética constante, sendo que após a dispersão total do β -TCP foram adicionados à solução em questão (ainda em agitação) 1,5g de PCL até sua dissolução total. Essa solução de PCL com β -TCP foi depositada lentamente no reservatório, submetida à rotação de 3.500rpm e à partir deste processo foi obtida malha do polímero PCL com β -TCP 5%.

A AMOSTRA 3, que consiste em polímero PCL com β -TCP, foi obtida através de 0,150g de β -TCP (10%) diluído em 08ml de clorofórmio em agitação magnética constante, sendo que após a dispersão total do β -TCP foram adicionados à solução em questão (ainda em agitação) 1,5g de PCL até sua dissolução total. Essa solução de PCL com β -TCP foi depositada lentamente no reservatório, submetida à rotação de 3.500rpm e à partir deste processo foi obtida malha do polímero PCL com β -TCP 10%.



Figuras 3 (a e b): Reservatório do equipamento de rotofiação (Figura 3a). Equipamento de rotofiação completo: reservatório, coletor e motor (Figura 3b).

4.2 Difração de Raio-X (DRX)

Quando um feixe de raio-x monocromático incide sobre um material cristalino ocorre o fenômeno da difração. Imaginemos inicialmente que a incidência ocorra em um único átomo isolado. Os elétrons deste átomo ficariam excitados e vibrariam com a mesma frequência do feixe incidente. Estes elétrons vibrando emitiriam raio-x em todas as direções com a mesma frequência do feixe incidente. O átomo pode ser visto como uma fonte de emissão esférica de radiação.

Ao incidir-se um feixe de raio-x em um cristal, no qual átomos estão regularmente espaçados, cada átomo será uma fonte de emissão esférica de radiação. Nestas condições poderá haver interferências construtivas ou destrutivas entre as ondas eletromagnéticas se estiverem em fase entre si ou defasadas, respectivamente. O comprimento de onda da radiação incidente deve ser da mesma ordem de grandeza do tamanho da partícula a ser analisada.

4.3 Granulometria por difração a laser

A difração a laser mede as distribuições de tamanho das partículas por medição da variação angular na intensidade da luz difundida à medida que um feixe de laser interage com as partículas dispersas da amostra. Partículas grandes dispersam a luz em pequenos ângulos em relação ao feixe de laser e partículas pequenas dispersam a luz em ângulos grandes. Os dados sobre a intensidade da dispersão angular são então analisados para calcular o tamanho das partículas responsáveis por criar o padrão de dispersão. O tamanho das partículas é indicado como o diâmetro de uma esfera de volume equivalente e, assim sendo, é uma técnica amplamente utilizada para determinação do tamanho de partículas para materiais que vão desde centenas de nanômetros a vários milímetros de tamanho.

4.4 Solução de Kokubo (SBF)

Kokubo, em 1990, desenvolveu uma nova solução aquosa para testes de bioatividade contendo concentrações de íons semelhantes às aquelas presentes no plasma humano e tamponamento com tris-hidroximetil-amino-metano. A referida solução possui capacidade de induzir alterações estruturais na superfície de materiais bioativos semelhantes às apresentadas *in vivo*. Esta solução, denominada cientificamente de "*Simulated Body Fluid*" (SBF) é acelular, livre de proteínas e apresenta um pH de 7,40. Sua composição é comparada à composição iônica do plasma sanguíneo (Andrade & Domingues, 2006), tendo sido utilizada neste estudo para verificação do comportamento do biomaterial obtido em ambiente compatível com o do plasma sanguíneo. Neste estudo as amostras foram imersas na referida solução, tendo sido mantida temperatura controlada em 36,5°C (estufa) por 14 dias. Após a imersão, as amostras foram lavadas com água deionizada e secas em dissecador sem aquecimento por 24h para serem preparadas e submetidas à análise por microscopia eletrônica de varredura.

4.5 Microscopia Óptica

A microscopia óptica é uma técnica muito utilizada para observação em extensão do que se vê a olho nu, proporcionando aumentos através de lentes específicas. Neste trabalho as amostras foram submetidas a microscopia óptica em microscópio da marca *Olympus SZ 40* (modelo GX51) para visualização e análise da estrutura e morfologia das fibras produzidas por rotofiação.

4.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As avaliações da morfologia de todas as fibras obtidas e a observação de precipitação de apatita nas amostras que continham β -TCP foram realizadas através de MEV. As amostras foram recobertas com ouro, por meio do Sputer Coater (Bal-Tec: SCD050) com corrente de 40 mA durante 200s, com tensão de operação em 10kV e as imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura da marca Zeiss (modelo EVO MA-15).

4.7 Cultura celular nas amostras

4.7.1 Cultura celular

Foram utilizadas células Vero, uma linhagem celular fibroblástica estabelecida a partir de células do rim do macaco verde africano (*Cercopithecus aeothlops*), obtidas no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil. As mesmas foram cultivadas em meio de cultura 199 (Lonza Group Ltd, USA) com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas, SP, Brasil) a 37° C em estufa com 5% de CO₂. A troca do meio foi realizada sempre que houvesse acidificação do mesmo e os subcultivos foram efetuados duas vezes por semana. As células Vero são recomendadas para estudos sobre citotoxicidade e interações entre células em biomateriais (ISO 10993-5, Kirkpatrick, 1992).

4.7.2 Análise por microscopia de luz

As células Vero foram inoculadas na concentração de cerca de $1,0 \times 10^5$ células/ml (1,5ml por poço) sobre os diferentes biomateriais estudados. As células foram mantidas em meio 199 com 10% de SFB a 37° C com 5% CO₂. Após 48 horas de incubação o meio contido nos poços

foi retirado e as amostras foram fixadas em formol 10% (em PBS 0,1M em pH 7,2) ou etanol/acido acético 3:1 (v/v) na própria placa de cultura e lavadas em água destilada duas vezes. Nesta análise a placa de cultura também foi utilizada como controle de células cultivadas em lamínulas de vidro. Foi realizada a análise citoquímica e as amostras foram então montadas e analisadas em Microscópio Óptico (Nikon, modelo 80i) em objetiva de 10x a 20x. As imagens foram fotografadas através da Câmera (Nikon digital sight, DS- Ri1) acoplada ao microscópio e foram obtidas através do *software NIS Elements* (Nikon Corporation, Tóquio, Japão). Dada às irregularidades dos substratos, foram feitas de 14 a 40 imagens do mesmo campo de cada material, sendo fotografados em objetiva de 10x a cada 0,5µm de intervalo. Para objetiva de 20x, foram capturadas imagens a cada 0,3µm. Todas as imagens capturadas foram fundidas em *software Combine ZP* (Alan Hadley, Reino Unido) e processadas nos programas *AxioVision* (ZEISS, Jena, Alemanha) e *Adobe Photoshop* (Adobe Systems, San Jose - CA, Estados Unidos).

4.7.3 Análise citoquímica

As amostras previamente processadas e fixadas foram coradas com azul de toluidina em pH 4,0 (identificação de glicosaminoglicanos e ácidos nucléicos), azul de toluidina em pH 2,5 (identificação de glicosaminoglicanos apenas), a técnica do ácido periódico mais reativo de Schiff (PAS, para açúcares neutros), xylydine ponceau em pH 2,5 (para proteínas totais), reação de prata para fibras reticulares e sirius red/hematoxilina para colágeno (Lison, 1960; Módis, 1991; Mello, 1997).

4.7.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para analisar o padrão de adesão, espalhamento e crescimento, uma suspensão celular na concentração de $1,0 \times 10^5$ células/ml (1,5ml por poço) foi inoculada sobre os diferentes biomateriais por 48h nas condições de cultura descritas anteriormente. Em seguida, as amostras foram fixadas por 2h em temperatura ambiente em solução de paraformaldeído 2,5%,

glutaraldeído 2,5% (Sigma, St Louis, MO, USA) dissolvidos em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,4. Em seguida os materiais foram lavados em três banhos com solução de PBS por 15 minutos, pós-fixados com tetróxido de ósmio 1% (Sigma, St Louis - MO, USA), lavados em três banhos com água por 15 minutos e desidratados em concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 95% e 100%). Em seguida, as lamínulas e os materiais foram secos em equipamento de Ponto Crítico (Balzers, CTD-030), submetidos à metalização a ouro (Balzers, CTD-050) e observados em Microscópio Eletrônico (JEOL, JCM-6000).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

5.1. Caracterização da amostra de β -TCP por Difração de Raio-X

A difração de Raio-X constitui-se em uma das principais técnicas de caracterização microestrutural de materiais cristalinos. Esta técnica foi utilizada neste estudo para caracterização das amostras de β -TCP antes da obtenção das fibras poliméricas de PCL com β -TCP por rotofiação, conforme gráficos que seguem:

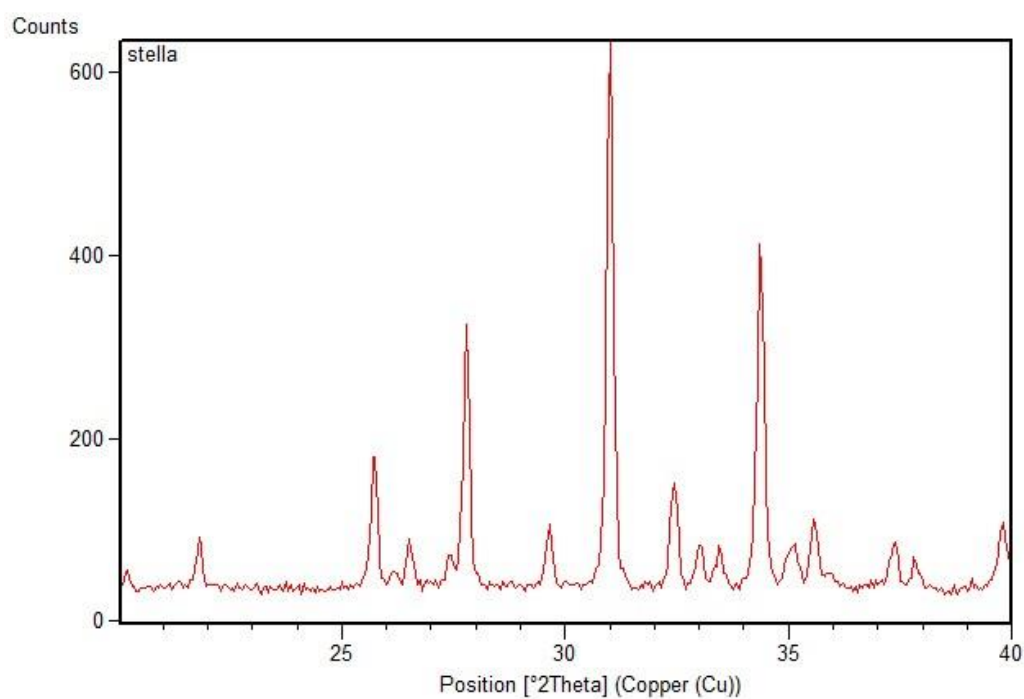


Figura 4: difratograma de raio-x da amostra de β -TCP.

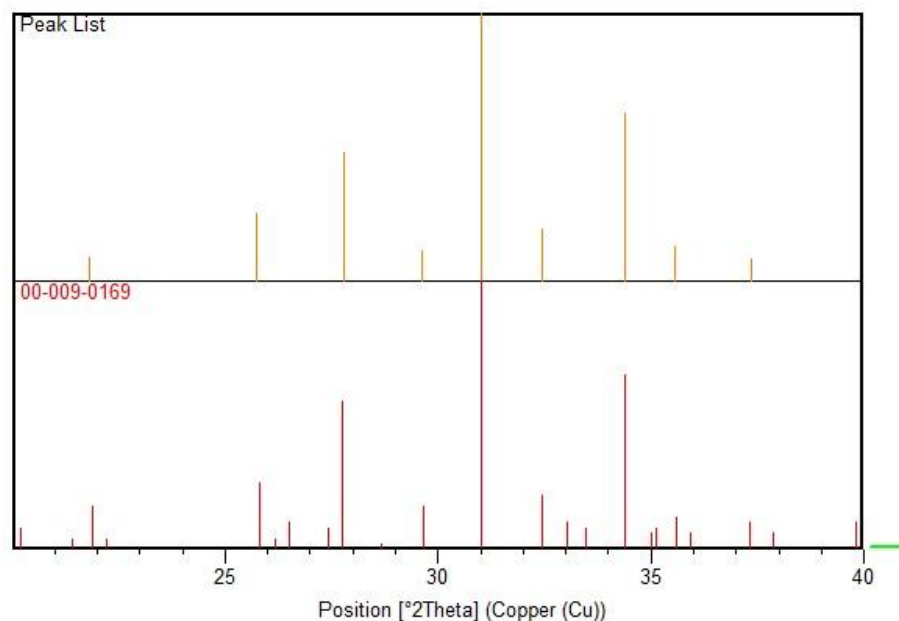


Figura 5: Padrão JCPDS comparando seus principais picos com a amostra do β -TCP.

Tendo como base o padrão JCPDS para β -TCP (00-009-0169), a comparação dos picos do difratograma de Rx da amostra de β -TCP (Figura 4) obtida no laboratório de biomateriais da FEM-UNICAMP e utilizada neste estudo, evidencia cristalinidade confirmando que a amostra consiste em β -TCP (Figura 5). A difração de Raio-X tem sua importância fundamentada na comprovação da cristalinidade da estrutura, visto que permite, através da comparação dos picos, determinar a pureza da composição do β -TCP em estudo (Chiono *et al.*, 2007).

5.2 Caracterização da amostra de β -TCP por Granulometria por difração a laser

Esta técnica foi utilizada para verificar o tamanho médio das partículas de β -TCP da amostra através do equipamento MASTERSIZER-S da marca Malvern do modelo: LONG BENCH-MAM 5005 (WORCESTERSHIRE, U.K.). Como dispersante foi utilizado o álcool isopropanol com agitação de 50% e bombeamento de 60%. Pelo gráfico e tabela abaixo

(FIGURAS 6 e 7) observa-se partículas de tamanhos variados de nano à micropartículas, sendo que a média é de 5,49 μ m. Evidenciam-se dois picos pela proporção dos quais, favorece o empacotamento da biocerâmica utilizada neste estudo. Isto ocorre, pelo fato das partículas menores ocuparem os espaços entre as maiores.

As partículas da biocerâmica não apresentaram homogeneidade, visto que foram trituradas em moinho de bolas.

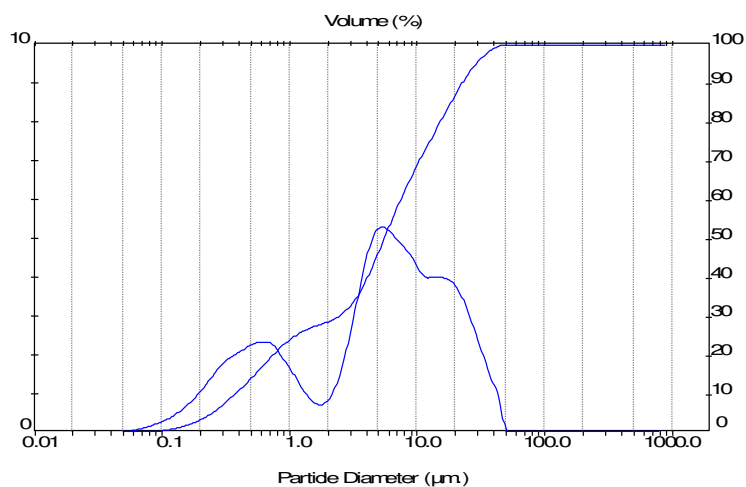


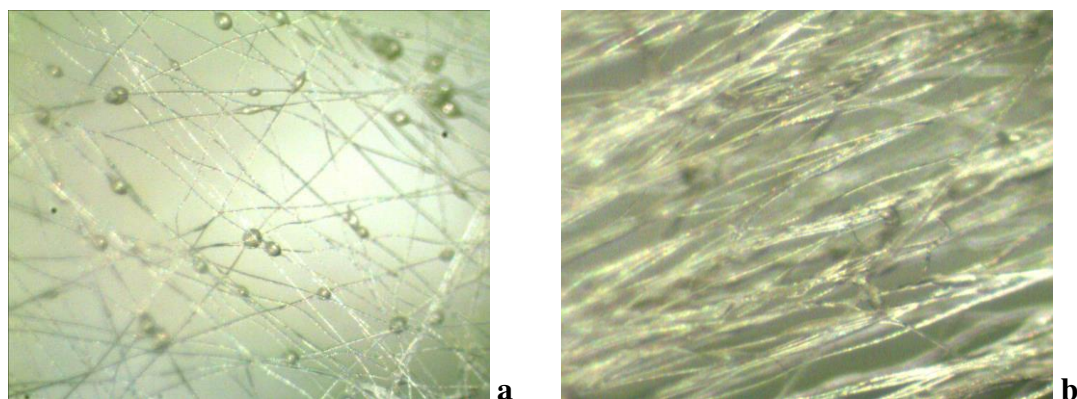
Figura 6: Granulograma da amostra de β -TCP.

Result: Analysis Table							
ID: B-TCP Guinea		Run No: 3		Measured: 17/3/2014 14:40			
File: 170314		Rec. No: 3		Analysed: 17/3/2014 14:40			
Path: C:\SIZERS\ANALISES\0010_1~1\				Source: Analysed			
Range: 300RF mm		Beam: 2.40 mm		Sampler: MS14		Obs: 20.9 %	
Presentation: 3OHD				Analysis: Polydisperse		Residual: 1.955 %	
Modifications: None							
Conc. = 0.0089 %Vol		Density = 1.000 g/cm^3				S.S.A. = 5.3229 m^2/g	
Distribution: Volume		D[4, 3] = 8.68 um				D[3, 2] = 1.13 um	
D(v, 0.1) = 0.37 um		D(v, 0.5) = 5.49 um				D(v, 0.9) = 22.47 um	
Span = 4.024E+00		Uniformity = 1.212E+00					
Size (um)	Volume Under%	Size (um)	Volume Under%	Size (um)	Volume Under%	Size (um)	Volume Under%
0.05	0.00	0.67	18.61	9.00	66.01	120.67	100.00
0.06	0.04	0.78	20.92	10.48	70.37	140.58	100.00
0.07	0.14	0.91	22.94	12.21	74.40	163.77	100.00
0.08	0.28	1.06	24.65	14.22	78.40	190.80	100.00
0.09	0.50	1.24	26.01	16.57	82.40	222.28	100.00
0.11	0.80	1.44	27.04	19.31	86.33	258.95	100.00
0.13	1.20	1.68	27.82	22.49	90.02	301.68	100.00
0.15	1.74	1.95	28.56	26.20	93.27	351.46	100.00
0.17	2.45	2.28	29.51	30.53	95.89	409.45	100.00
0.20	3.38	2.65	30.98	35.56	97.88	477.01	100.00
0.23	4.57	3.09	33.27	41.43	99.25	555.71	100.00
0.27	6.04	3.60	36.58	48.27	100.00	647.41	100.00
0.31	7.78	4.19	40.89	56.23	100.00	754.23	100.00
0.36	9.71	4.88	45.94	65.51	100.00	878.67	100.00
0.42	11.77	5.69	51.24	76.32	100.00		
0.49	13.97	6.63	56.41	88.91	100.00		
0.58	16.28	7.72	61.33	103.58	100.00		

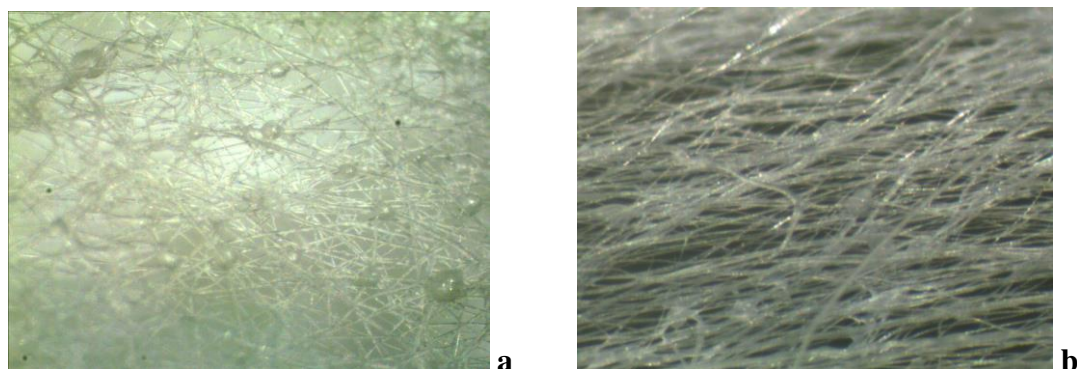
Figura 7: Tabela com dados obtidos através da granulometria por difração a laser da amostra de β -TCP.

5.3 Microscopia Óptica das amostras

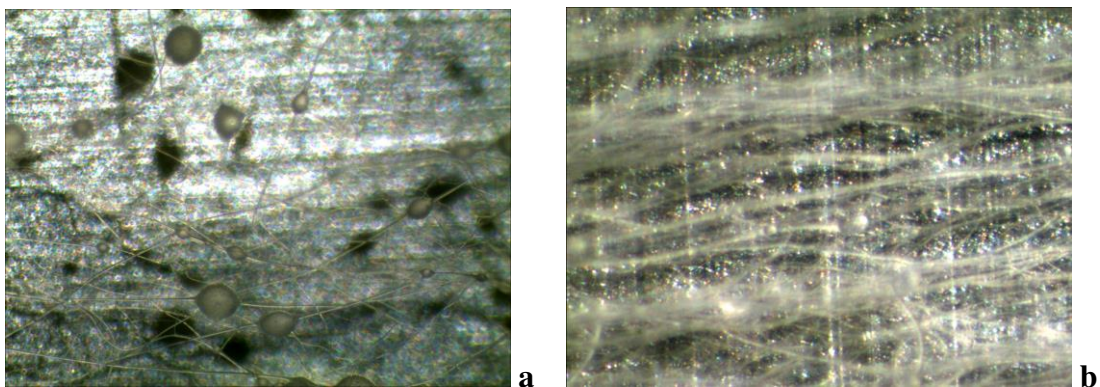
Todas as amostras foram analisadas por microscopia óptica com aumentos de 20X, 30X e 40X. Nas imagens obtidas pode-se observar o alinhamento das fibras, assim como estruturas em formato de pérola denominadas *beads* que consistem em defeitos que podem apresentar pontos de fragilidade afetando a resistência mecânica das fibras, sendo que as fibras coletadas em volta do reservatório são mais bem alinhadas do que as demais coletadas na periferia do reservatório (Badrossamay *et al.*, 2010).



Figuras 8 (a e b): AMOSTRA 1 em microscopia óptica com aumento de 40X, sendo que a figura 8a é a malha obtida na parte externa do equipamento de rotofiação, enquanto a figura 8b representa a malha obtida na parte interna do equipamento de rotofiação junto ao reservatório.



Figuras 9 (a e b): AMOSTRA 2 em microscopia óptica com aumento de 40X, sendo que a figura 9a é a malha obtida na parte externa do equipamento de rotofiação, enquanto a figura 9b representa a malha obtida na parte interna do equipamento de rotofiação junto ao reservatório.



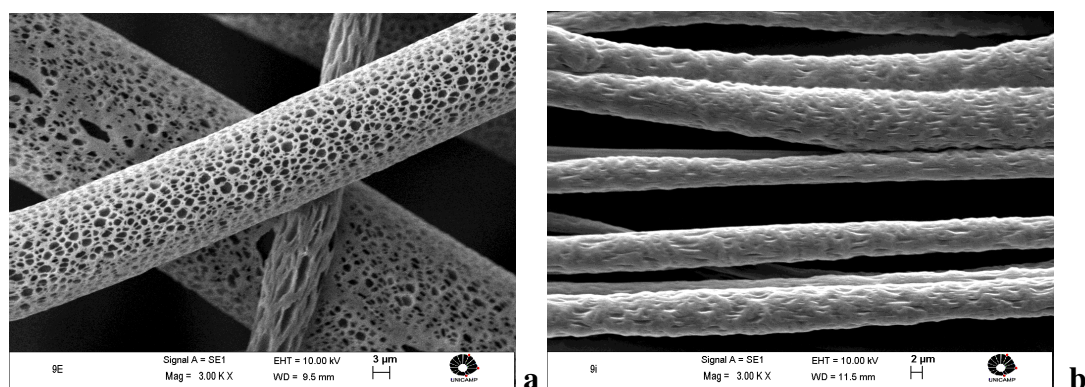
Figuras 10 (a e b): AMOSTRA 3 em microscopia óptica com aumento de 40X, sendo que a figura 10a é a malha obtida na parte externa do equipamento de rotofiação, enquanto a figura 10b representa a malha obtida na parte interna do equipamento de rotofiação junto ao reservatório.

5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das amostras

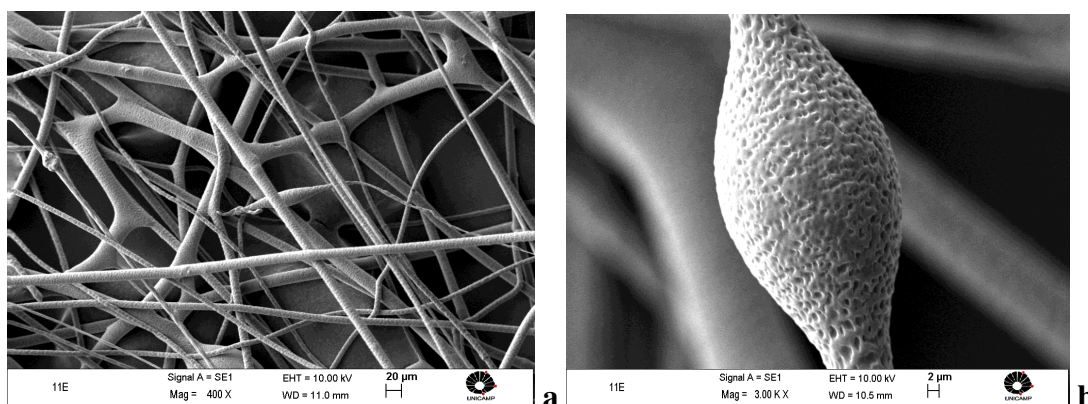
Todas as amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura com aumentos de 100X, 400X e 3000X. Nas imagens obtidas através desta técnica que permite visualização em aumentos maiores, pode-se confirmar as mesmas características descritas nos achados em microscopia óptica, ou seja, houve a confirmação de que as fibras obtidas próximas ao reservatório apresentam-se mais alinhadas que as fibras obtidas na parte externa do equipamento de rotofiação. Este fato pode ser explicado pelo fato do equipamento de rotofiação produzir fibras a partir de um recipiente em rotação que ejeta a solução viscoelástica, no qual a força centrípeta induz a solução polimérica à extensão e afinamento, resultando em fibras mais finas. Contudo, o equipamento utilizado trabalha em baixa velocidade (3.500rpm) fazendo com

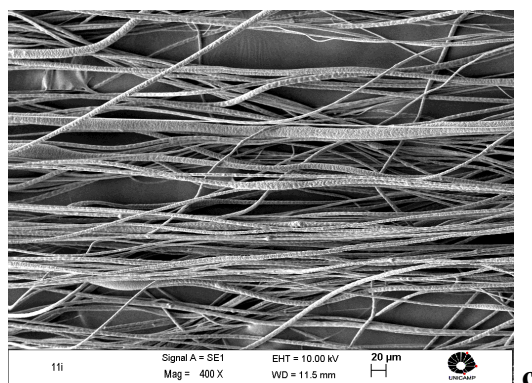
que a tensão superficial possa causar instabilidade no jato e gerar fibras em padrão aleatório (Badrossamay *et al.*, 2010).

Através da MEV, podemos também avaliar a porosidade das fibras produzidas, sendo que esta é uma característica considerada benéfica para aderência celular durante sua utilização em engenharia tecidual, viabilizando o desenvolvimento de novo tecido e facilitando a transferência de nutrientes e fluídos (Qinggang *et al.*, 2011).

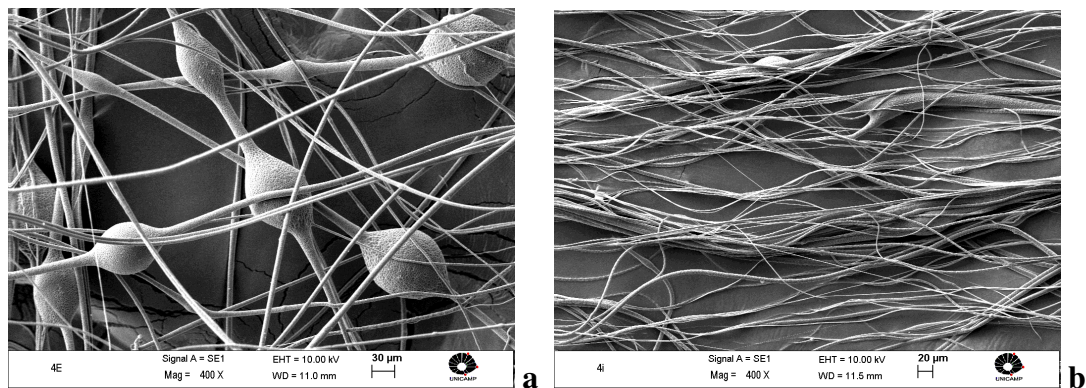


Figuras 11 (a e b): AMOSTRA 1 em microscopia eletrônica de varredura com aumento de 3000X, sendo que a figura 11a é a malha obtida na parte externa do equipamento de rotofiação, enquanto a figura 11b representa a malha obtida na parte interna do equipamento de rotofiação junto ao reservatório.





Figuras 12 (a, b e c): AMOSTRA 2 em microscopia eletrônica de varredura, sendo que a figura 12a (400X) é a malha obtida na parte externa do equipamento de rotofiação, enquanto a figura 12b (3.000X) representa a de formação de beads na malha obtida na parte externa do equipamento de rotofiação. A figura 12c (400X) representa malha obtida na parte interna do equipamento de rotofiação junto ao reservatório.

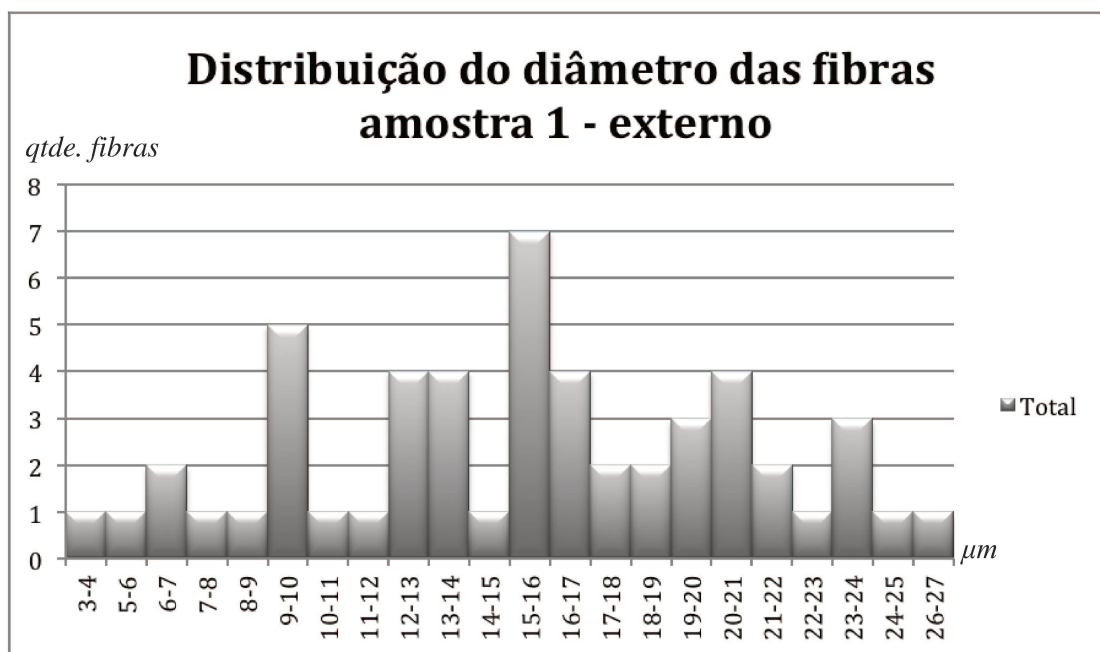


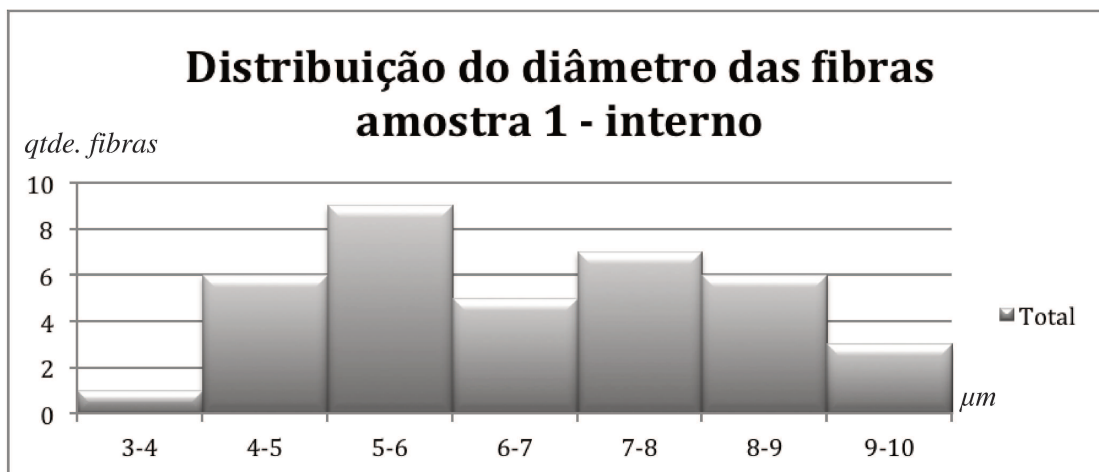
Figuras 13 (a e b): AMOSTRA 3 em microscopia eletrônica de varredura com aumento de 400X, sendo que a figura 13a é a malha obtida na parte externa do equipamento de rotofiação, enquanto a figura 13b representa a malha obtida na parte interna do equipamento de rotofiação junto ao reservatório.

5.4.1 Histogramas dos resultados obtidos por MEV

Para mensuração do diâmetro das fibras das amostras as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura foram analisadas através do uso do *software IMAGE J 1.48v* (National Institutes of Health, Estados Unidos da América). Os resultados encontrados foram organizados e, através dos mesmos, foram realizados histogramas que permitem a visualização e interpretação da distribuição das fibras de acordo com seu respectivo diâmetro.

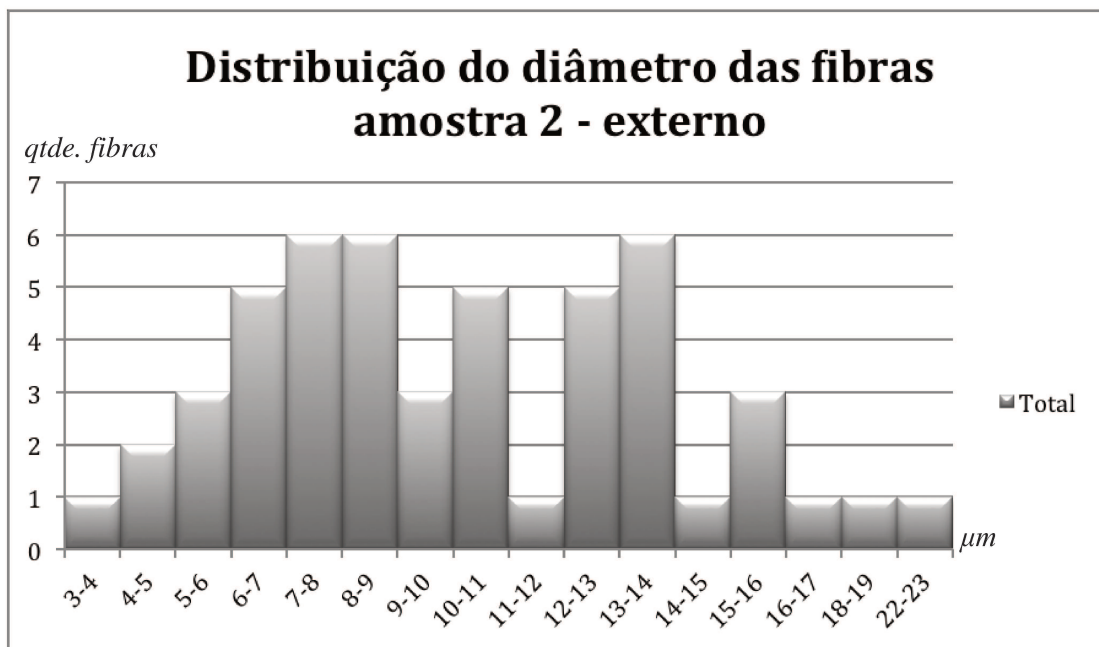
5.4.1.1 Histogramas da amostra 1

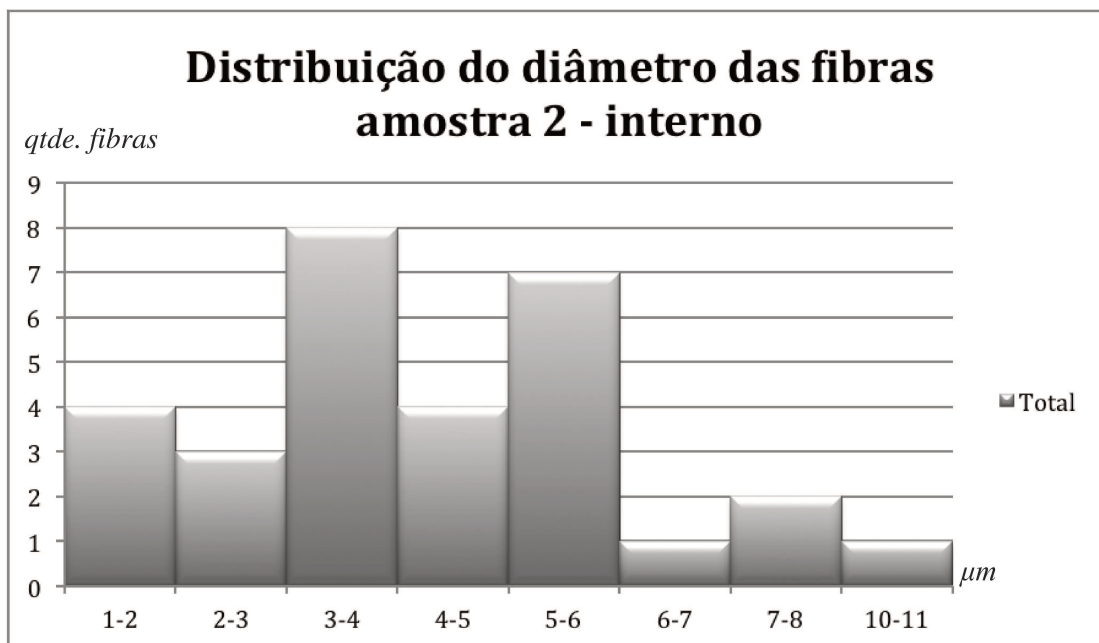




Os histogramas acima, da AMOSTRA 1 (PCL), demonstram que o diâmetro das fibras obtidas na parte interna do reservatório possuem menor diâmetro e são mais homogêneas, sendo que o diâmetro das fibras da parte interna variam de 3 a 10 μ m, enquanto o diâmetro das fibras obtidas da parte externa variam de 3 a 27 μ m.

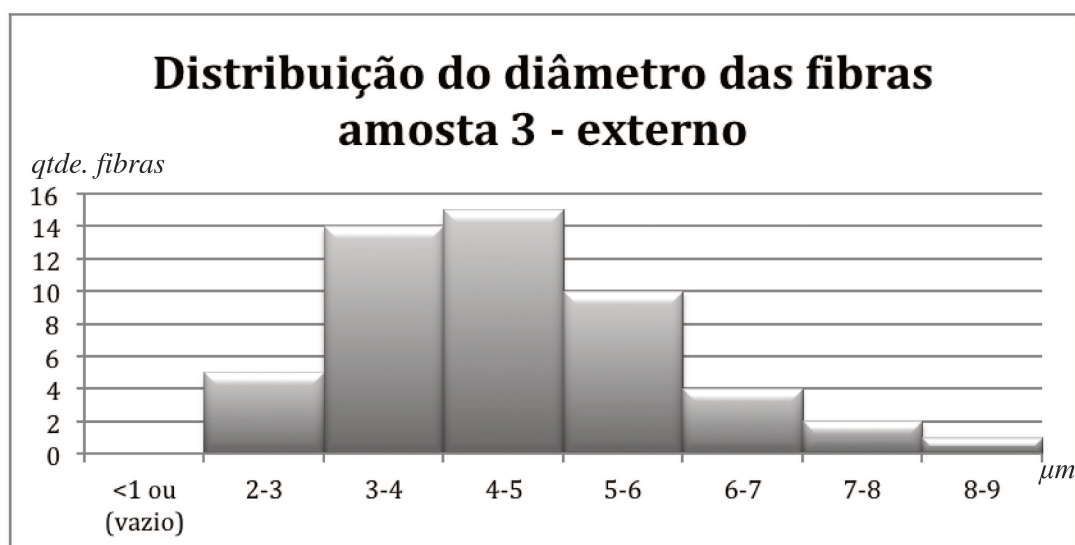
5.4.1.2 Histogramas da amostra 2

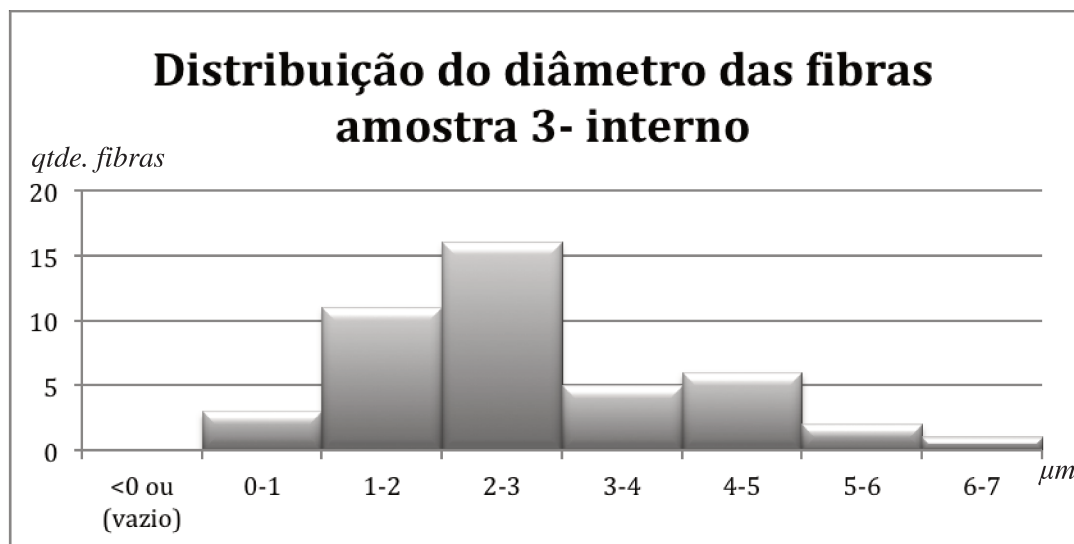




Os histogramas da AMOSTRA 2 (PCL com β -TCP 5%), demonstram que o diâmetro das fibras obtidas na parte interna do reservatório possuem menor diâmetro e são mais homogêneas, sendo que o diâmetro das fibras da parte interna variam de 1 a 11 μ m e o diâmetro das fibras obtidas da parte externa variam de 3 a 23 μ m.

5.4.1.3 Histogramas da amostra 3



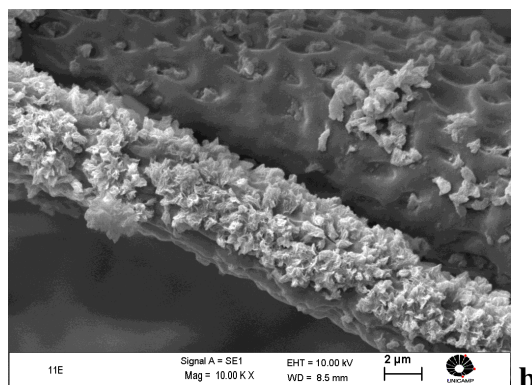
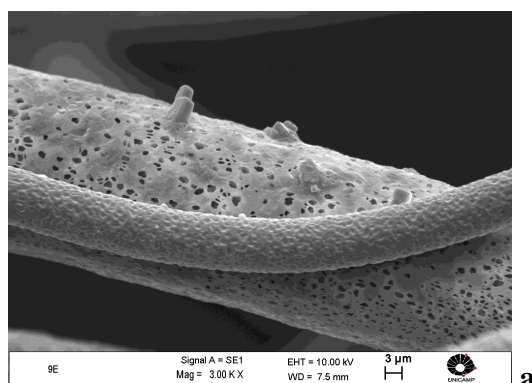


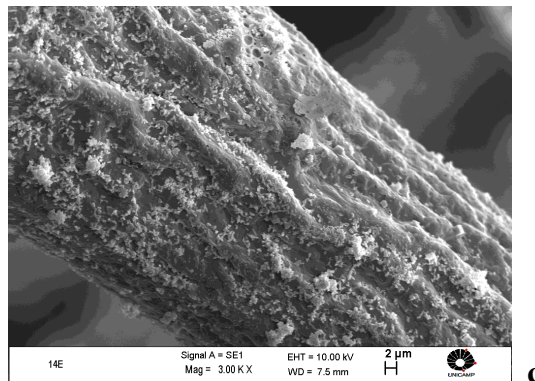
Os histogramas referentes à AMOSTRA 3 (PCL com β -TCP 10%), demonstram que o diâmetro das fibras obtidas na parte interna do reservatório possuem menor diâmetro e são mais homogêneas, porém possuem diâmetros mais próximos das fibras obtidas da parte externa do equipamento de rotofiação quando comparadas com os resultados das AMOSTRAS 1 e 2, sendo que o diâmetro das fibras da parte interna variam de 1 a 7 μm , enquanto o diâmetro das fibras obtidas da parte externa variam de 2 a 9 μm . Este fato, associado à maior formação de *beads* na malha compósita da AMOSTRA 3, demonstra que o aumento da quantidade β -TCP dificultou, neste estudo, a confecção da malha compósita, podendo estar ou não associado à velocidade do equipamento de rotofiação, ou seja, sabendo-se que quanto maior a velocidade de rotação, menor será o diâmetro das fibras obtidas, o objetivo sempre será a busca de fibras de menor tamanho sem formação de *beads*.

Nas AMOSTRAS 1, 2 e 3 desenvolvidas em equipamento de rotofiação com velocidade de 3.500rpm, as fibras foram obtidas em microescala e comparando-se à literatura pertinente, temos relatado que equipamentos com capacidade de rotação em 35.000rpm permitem obtenção de nanofibras (Badrossamay, 2010).

5.4.2 MEV APÓS IMERSÃO EM SOLUÇÃO DE FLUÍDO CORPÓREO SIMULADO (SBF)

O estudo de imersão em SBF tem por finalidade verificar a formação de uma camada de apatita na superfície do biomaterial em estudo. Conforme o esperado, na AMOSTRA 1 (PCL) não observou-se a precipitação de apatita na superfície das fibras. Por sua vez, as AMOSTRAS 2 e 3 (PCL com β -TCP 5% e 10%, respectivamente), as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura evidenciaram a precipitação de apatita na superfície das fibras. Em 1991, Kokubo relatou que o requisito básico para a osteointegração dos biomateriais é a formação de uma superfície com camada de apatita. Assim sendo a bioatividade de um biomaterial pode ser analisada pela formação de apatita em sua superfície quando imersa em SBF (Kokubo & Takadama, 2006).





c

Figuras 14 (a, b e c): A figura 14a representa MEV da AMOSTRA 1, sem precipitação de apatita. As figuras 14b e 14c evidenciam a precipitação de apatita na AMOSTRA 2 e AMOSTRA 3, respectivamente.

5.5 Análise citoquímica - carboidratos

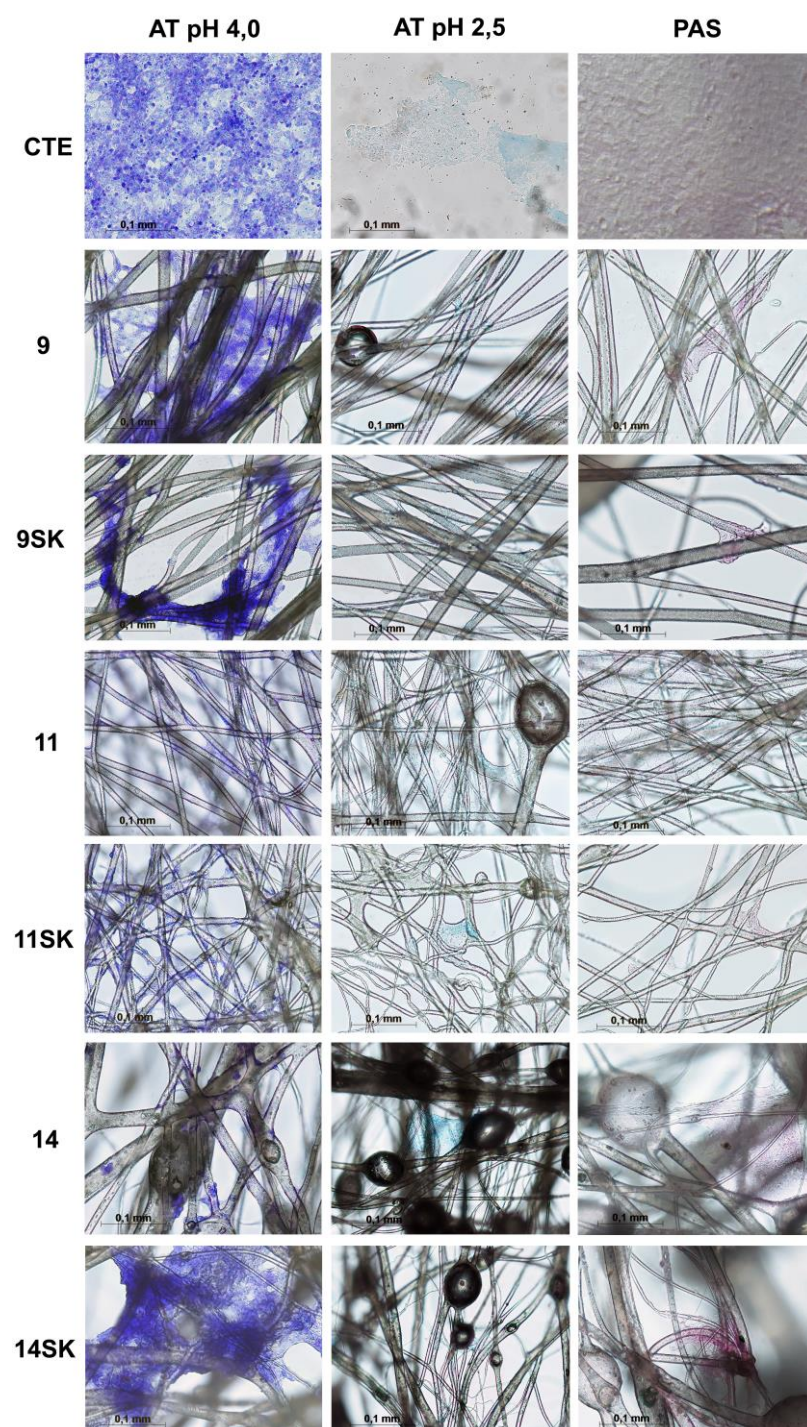


Figura 15: resultados da análise citoquímica - carboidratos.

A coloração celular é utilizada para facilitar o estudo citoquímico e a visualização através de microscopia. Os corantes atuam em estruturas celulares específicas, possibilitando sua identificação. O azul de toluidina é um corante básico que reage com compostos poliméricos ricos em grupamento sulfato e o ácido periódico de Schiff (PAS) é principalmente utilizado para colorir estruturas contendo alta proporção de moléculas de carboidratos (glicogênio e glicoproteínas).

Nas imagens integrantes da FIGURA 15, observa-se a pigmentação das amostras, evidenciando a presença de células em desenvolvimento nas amostras estudadas. Pode-se também observar a adesão celular não somente sobre uma única fibra polimérica, mas também ligando-se de uma fibra polimérica à outra, demonstrando a importância da disposição obtida na confecção das fibras poliméricas pelo processo de rotofiação.

5.6 Análise citoquímica - proteínas

O Sirius Red/Hematoxilina (PSH) é um corante ácido capaz de ligar-se paralelamente à moléculas de colágenos intensificando consideravelmente sua birrefringência normal, produzindo uma cor amarela forte. Devido à esta propriedade o Sirius Red/Hematoxilina é utilizado como método seletivo para detecção de colágeno. O colágeno tipo I apresenta coloração amarelo-alaranjado à vermelho e o colágeno tipo III, que está presente em tecidos jovens, apresenta cor amarelo-esverdeado ao verde. O xylidine ponceau (XP) é um corante ácido aniônico que reage com elementos que possuem cargas positivas nas células, como por exemplo, as proteínas, que podem apresentar radicais básicos de seus aminoácidos ionizados. A deposição de prata (RET) é uma deposição de pigmento ao redor da estrutura celular, servindo para visualização de fibras reticulares.

Na FIGURA 16 podemos observar a presença de células em desenvolvimento entre as fibras poliméricas das amostras estudadas, sendo que a arquitetura das fibras obtidas pelo processo de rotofiação também mostra-se como um fator facilitador para a adesão celular que ocorre, inclusive, entre mais de uma fibra polimérica da amostra.

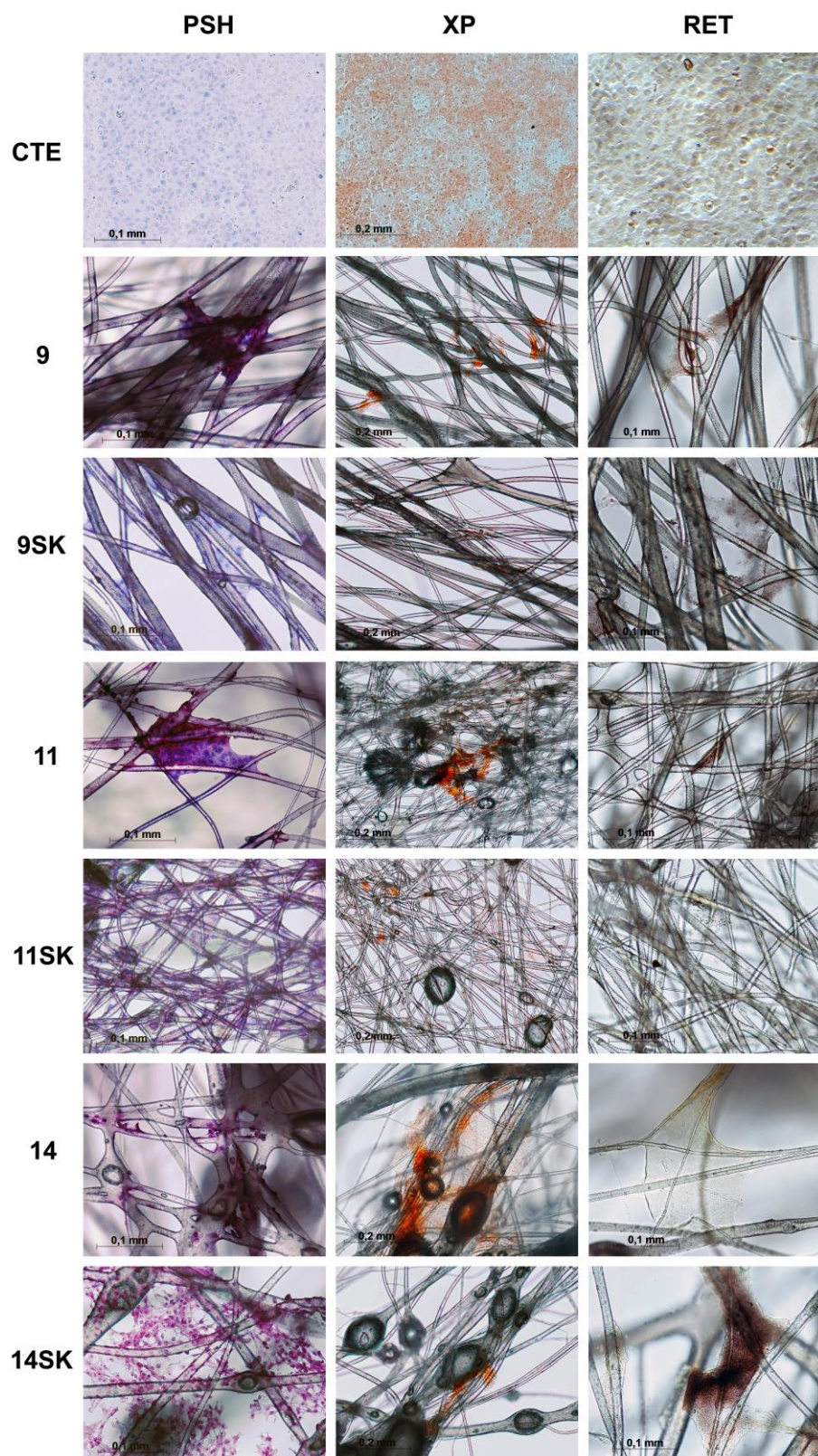
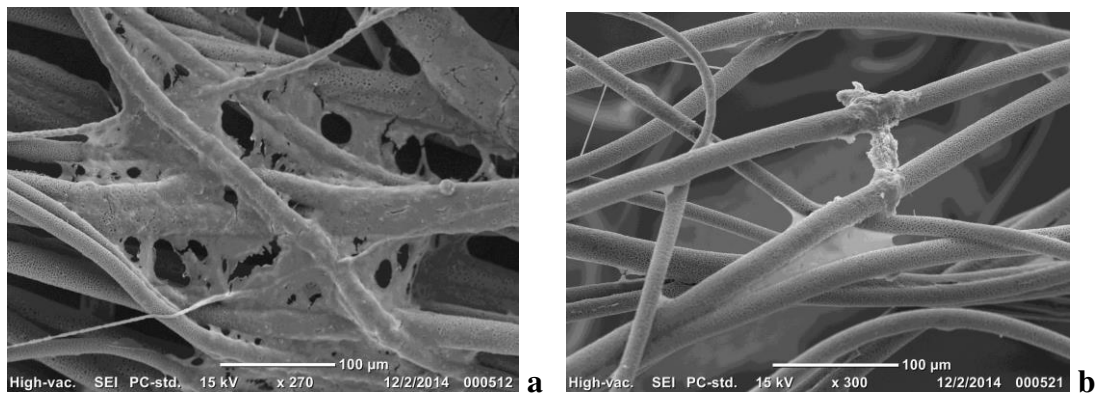
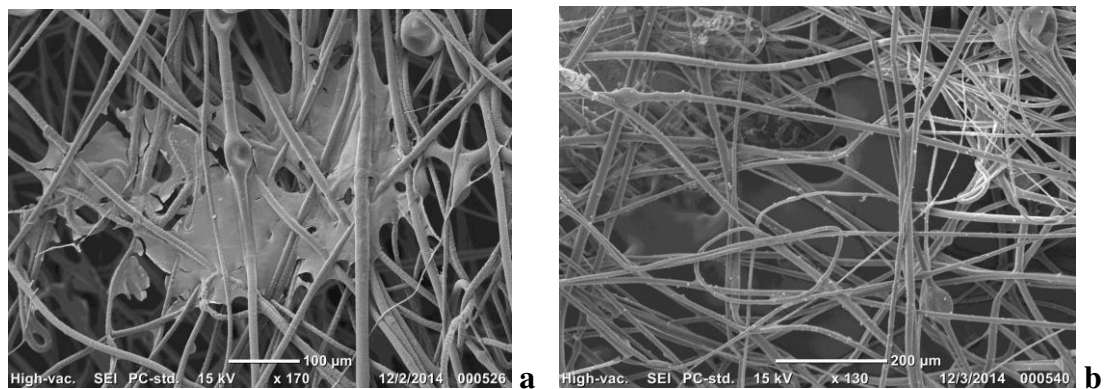


Figura 16: resultados da análise citoquímica - proteínas.

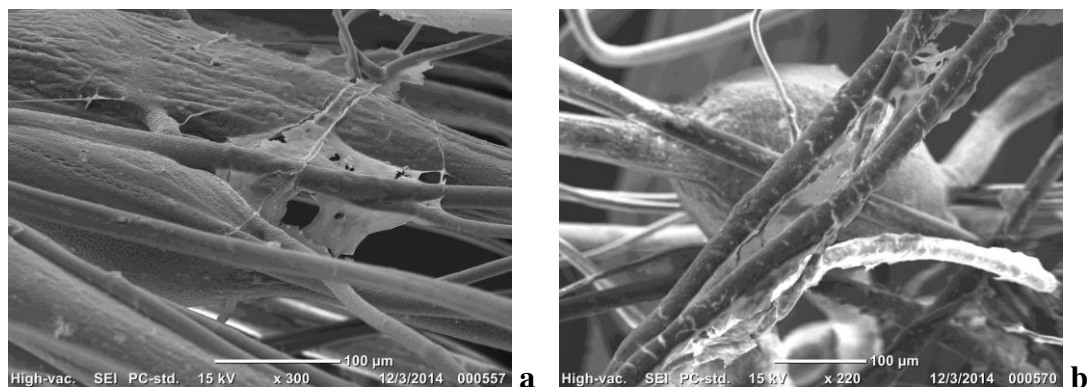
5.7 Análise celular nas amostras - MEV



Figuras 17 (a e b): A figura 17a representa a adesão, crescimento e espalhamento celular nas fibras de PCL, assim como a figura 17b, que evidencia a mesma situação nas fibras de PCL após imersão em SBF.



Figuras 18 (a e b): A figura 18a representa a adesão, crescimento e espalhamento celular nas fibras de PCL com β -TCP 5%, assim como a figura 18b, que evidencia a mesma situação nas fibras de PCL com β -TCP 5% após imersão em SBF.



Figuras 19 (a e b): A figura 19a representa a adesão, crescimento e espalhamento celular nas fibras de PCL com β -TCP 10%, assim como a figura 19b, que evidencia a mesma situação nas fibras de PCL com β -TCP 10% após imersão em SBF.

5.8 Aplicabilidade do biomaterial obtido:

Através dos resultados obtidos no estudo das malhas compósitas de policaprolactona (PCL) com beta-fosfato tricálcico (β -TCP) fabricadas neste estudo, espera-se que o referido biomaterial sirva como material de enxerto para pequenas reconstruções ósseas, nas quais não se faça necessária grande resistência mecânica, visto que este biomaterial se destaca pela sua bioatividade e maleabilidade para enxertia. Como exemplos de possíveis leitos receptores que poderiam se beneficiar de enxertia com materiais com estas características temos: pequenas reabsorções ósseas pré reabilitação com implantes osteointegráveis, enxertia para fechamento de pequenas fenestrações ósseas peri-dentais ou peri-implantares e pequenas reconstruções ósseas que se façam necessárias na cavidade bucal.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS:

6.1 Conclusões:

- Foi possível produzir, com tecnologia nacional, malhas poliméricas de PCL com β -TCP pelo processo de rotofiação;
- As malhas poliméricas de PCL com β -TCP obtidas apresentaram arquitetura viável para uso como arcabouço (*scaffold*) em engenharia tecidual;
- A disposição e a porosidade apresentada pelas fibras que compõem as malhas compósitas em estudo propicia o crescimento celular;
- As fibras das malhas compósitas da face interna do reservatório são mais alinhadas e com diâmetro menor em comparação às fibras obtidas na face externa;
- A bioatividade das malhas compósitas com β -TCP foi comprovada pela deposição de apatita em sua superfície após imersão em SBF.
- As malhas demonstraram-se atóxicas e receptivas ao cultivo celular.

6.2 Sugestões para trabalhos futuros:

- Estudo da influência da viscosidade em diferentes concentrações de solução (polímero/biocerâmica);
- Realização de ensaios de biodegradação;
- Avaliação *in vivo* do crescimento celular nas malhas compósitas com β -TCP em biorreatores.
- Avaliação da influência da velocidade do equipamento de rotofiação na morfologia das fibras obtidas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALAMEIN, M.A., STEPHENS, S., LIU, Q., SKABO, S., WARNKE, P.H. Mass Production of Nanofibrous Extracellular Matrix with Controlled 3D Morphology for Large-Scale Soft Tissue Regeneration. **Tissue Engineering**. 2013; 19(6): 458-472.

ANDRADE, A.L., DOMINGUES, R.Z. Cerâmicas Bioativas - estado da arte. **Química Nova**. 2006; 29(1). Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010040422006000100019&script=sci_arttext [05/04/2014]

APAPORE® Impaction grafting hip study (AIGHS). Available from: http://www.bioportfolio.com/news/Apatech%20ltd_1.htm [as on 15/03/2005] In Murugan, R. Hamakrishna, S. Development of nanocomposites for bone grafting. **Composites Science and Technology**. 2005; 65: 2385-2406.

AUBIN, J.E., LIAU, F. Principles of bone biology. **1st. Ed. San Diego: Academic Press**. 1996.

BADROSSAMAY, M.R., BALACHANDRAN, K., CAPULLI, A.K., GOLECKI, H.N., AGARWAL, A., GOSS, J.A., KIM, H., SHIN, K., PARKER, K.K. Engineering hybrid polymer-protein super-aligned nanofibers via rotary jet spinning. **Biomaterials**. 2014; 35: 3188-3197.

BADROSSAMAY, M.R., MCILWEE, H.A., GOSS, J.A., PARKER, K.K. Nanofiber Assembly by Rotary Jet-Spinning. **American Chemical Society**. Nano Lett: 2010; 10: 2257-2226.

BARBANTI, S.H., ZAVAGLIA, C.A.C., DUEK, E.A.R. **Polímeros Bioabsorvíveis como Suporte na Engenharia de Tecidos**. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Mecânica (FEM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). 2005.

BIANCO, P., RIMINUCCI, M., GRONTHOS, S., ROBEY, P.G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**. 2001; 19: 180-92.

BOHNER, M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. **Injury**. 2000; 31:SD37-47.

BOZIC, K.J., GLAZER, P.A., ZURAKOWSKI, D., SIMON, B.J., LIPSON, S.J., HAYES, W.C. In vivo evaluation of coralline hydroxiapatite and direct current electrical stimulation in lumbar spinal fusion. **Spine**. 1999; 24: 2127-33.

BRITTBERG, M., LINDAHL, A., NILSSON, A., OHLSSON, C., ISAKSSON, O., PETERSON, L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocytes transplantation. **N Engl J Med**. 1994; 331: 889-95.

CASATI, M.Z., SALLUM, E.A., NOCITI JR, F.H., CAFFESSE, R.G., SALLUM, A.W. Enamel matrix derivative and bone healing after guided bone regeneration in dehiscence-type defects around implants. A histomorphometric study in dogs. **J. Periodontol**. 2002; 73: 789-96.

CHASE, G.G., VARABHAS, J.S., RENEKER, D.H. New methods to electrospin nanofibers. **Journal of Engineered Fibers and Fabrics**. 2011; 06(3): 32-38.

CHIONO, V., CIARDELLI, G., VOZZI, G., SOTGIU, M.G., VINCE, B., DOMENICI, C., GIUSTI, P. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/poly(ϵ -caprolactone) blends for tissue engineering applications in the form of hollow fibers. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, Wiley Periodicals INC. 2007; 938-953.

CORNELL, C.N., LANE, J.M., CHAPMAN, M., MERKOW, R., SELIGSON, D., HENRY, S. Multicenter trial of collagraft as bone graft substitute. **J. Orthop. Trauma**. 1991; 5: 1-8.

CURREY, J.D. **Bones: structure and mechanics**. New Jersey: Princeton University Press. 2002.

DU, C., CUI, F.Z., ZHU, X.D., DE GROOT, K. Three-dimensional nano-HAp/collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture. **J Biomed Mater Res**. 1999; 44: 407-15.

HARTGERINK, J.D., BENIASH, E., STUPP, S. Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphilic nanofibers. **Science**. 2001; 294: 1684-8.

HENCH, L. L.; WILSON, J. **Introduction to bioceramics**. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 1993, p. 1-13. ISO 10993-5, (2009). International Standard. Biological evaluation of medical devices - Part 5. Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods.

KELLMÄKI, M., NIIRANEN, H., PUUMANEN, K., ASHAMMAKHI, N., WARIS, T., TÖRMÄLÄ, P. Bioabsorbable Scaffolds for Guided Bone Regeneration and Generation. **Biomaterials**, Elsevier. 2000; 2495-2505.

KIRKPATRICK, C.J. Biological testing of materials and medical devices - A critical view of current and proposed methodologies for biocompatibility testing: cytotoxicity *in vitro*. **Regulatory Affairs**. 1992; 4: 13-32.

KOKUBO, T. Bioactive glass ceramics: properties and application. **Biomaterials**, Elsevier. 1991; 12: 155-163.

KOKUBO, T., TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity. **Biomaterials**, Elsevier. 2006; 27: 2907-2915.

LAKES, R. Materials with structural hierarchy. **Nature**. 1993; 351: 511-5.

LEE, K.Y., MOONEY, D.J. Hydrogels for tissue engineering. **Chem Rev**. 2001; 101:1869-79.

LEGEROS, R.Z. **Calcium phosphates in oral biology and medicine**. Meyers, São Francisco.1991.

LEGEROS, R. Z., LEGEROS, J. P. Calcium phosphate biomaterials in medical application. **Bioceramics**. 1996; 9: 7-10.

LISON, L. Histochemie et Cytochemie Animales – Principes et Methodes. Gauthier Villars, Paris, 1960. Mello M.L.S. Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. **Braz. J. Genet**. 1997; 20: 257-264.

MASSAI, D., PENNELLA, F., GENTILE, P., GALLO, D., CIARDELLI, G., BIGNARDI, C. AUDENINO, A., MORBIDUCCI, U. Image-based three-dimensional analysis to characterize the texture of porous scaffolds. **BioMed Research International**. 2014; ID: 161437.

MERETOJA, V.V., TIRRI, T., MALIN, M., SEPPÄLÄ, J.V., NÄRHI, T.O. Enhanced osteogenicity of bioactive composites with biomimetic treatment. **BioMed Research International**. 2014; Article ID: 207676.

MÓDIS, L. **Organization of the Extracellular Matrix: A polarization Microscopic Approach.** CRC Press, Boca Raton, 1991.

MURUGAN, R., RAMAKRISHNA, S. Development of nanocomposites for bone grafting. **Composites Science and Technology**, Elsevier. 2005; 65: 2385-2406.

MURUGAN, R., RAMAKRISHNA, S. *In*: Nalwa HS, Editor. **Handbook of nanostructured biomaterials and their applications in nano-biotchenology.** California: American Scientific Publishers; 2005: 141-68.

ORII, H., SOTOME, S., CHEN. J., WANG. J., S, K. Beta tricalcium phosphate (beta-TCP) graft combined with bone marrow stromal cells (MSCs) for posterolateral spine fusion. **J.Med.Dent. Sci.** 2005; 52:51-57.

PACHENCE, J.M., KOHN, J. *In*: Lanza, R.P., Lenger, R., Vacanti, J. editors. **Principles of tissue engeneering.** San Diego: Academic Press. 2000.

PARK, J.B., BRONZINO, J.D. **Biomaterials: principles and applications.** Boca Roton: CRC Press. 2000.

PEREA, Geraldine Nancy Rodrigues. **Eletrofição de Nanocompósito de Poli(L-Ácido Láctico) com Hidroxiapatita para Regeneração Óssea.** Dissertação (mestrado) - Faculdade de Engenharia Mecânica (FEM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2011.

PONDER, K.P., GUPTA, S., LELAND, F., DARLINGTON, G., FINEGOLD, M., DEMAYO, J. Mouse hepatoocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation. **Proc Natl Acad Sci. USA.** 1991; 88:1217-21.

QINGGANG, T., SONGGANG, L., JIE, R., CHU, C. Fabrication of porous scaffolds with a controllable microstructure and mechanical properties by porogen fusion technique. **International Journal of Molecular Sciences.** MDPI AG. 2011; 12: 890-904.

RIBEIRO, F.V., SUAID, F.F., RUIZ, K.G., RODRIGUES, T.L., CARVALHO, M.D., NOCITI JR, F.H., SALLUM, E.A., CASATI, M.Z. Peri-implant reconstruction using autologous periosteum-derived cells and guided bone regeneration. **J. Clin. Periodontol.** 2010; 37(12): 1128-36.

RIBEIRO, F.V., SUAID, F.F., RUIZ, K.G.S., RODRIGUES, T.L., CARVALHO, M.D., NOCITI JR, F.H., SALLUM, E.A., CASATI, M.Z. Effect of autologous bone marrow-derived cells associated with guided bone regeneration or not in the treatment of peri-implant defects. **Int. J. Oral Maxillofac Surg.** 2012; 41: 121-127.

RIBEIRO, F.V., SUAID, F.F., RUIZ, K.G.S., SALMON, C.R., PAPAROTTO, T., NOCITI JR, F.H., SALLUM, E.A., CASATI, M.Z. Periosteum-derived cells as an alternative to bone marrow cells for bone tissue engineering around dental implants. A histomorphometric study in beagle dogs. **J. Periodontol.** 2010; 81(6): 907-16.

RIGON, Guacira dos Reis. **Matrizes de compósitos de PLDLA com hidroxiapatita obtidas por rotofiação para utilização em engenharia tecidual.** Dissertação (mestrado) - Faculdade de Engenharia Mecânica (FEM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). 2013.

SALGADO, Christiane Laranjo. **Desenvolvimento de Matrizes Tridimensionais para Aplicação em Engenharia de Tecido Ósseo.** Tese (doutorado) -Faculdade de Engenharia Mecânica (FEM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). 2009.

SANDBERG, E., DAHLIN, C., LIND, A. Bone regeneration by the osteopromotion technique using bioabsorbable membranes, an experimental study in rats. **J. Oral Maxillofac. Surg.** 1993; 51: 1106.

SUNG, H-J., MEREDITH, C., JOHNSON, C., GALIS, Z. S. The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. **Biomaterials**, Elsevier. 2004; 25: 5735-5742.

TAY, A. G., FARHADI, J., SUETTERLIN, R., PIERER, G., HEBERER, M., MARTIN, I. Cell yield, proliferation, and postexpansion differentiation capacity of human ear, nasal, and rib chondrocytes. **Tissue Engineering.** 2004; 10: 762-770.

TIEDMANN, J.J., CONNOLLY, J.F., STRATES, B.S., LIPPIELLO, L. Treatment of nonunion by percutaneous injection of bone marrow and demineralized bone matrix. An experimental study in dogs. **Clin. Orthop. Relat. Res.** 1991; 268:294-302.

VIRDEN, A. **Method Development for Laser Diffraction Particle Size Analysis** [Internet]. Malvern Instruments, Enigma Business Park, Grovewood Road, Malvern, Worcestershire. Disponível em: <http://www.malvern.com/br/Assets/AR110121MethodDevLaserDiffParticleSizeAnalysis.pdf> [16/07/2014]

WANG, L., MA, X., ZHANG, Y., FENG, Y., LI, X., HU, Y., WANG, Z., MA, Z., LEI, W. **Repair of Segmental Bone Defect Using Totally Vascularized Tissue Engineered Bone Graft by a Combined Perfusion Seeding and Culture System**. PLoS ONE. 2014; 9(4): e94276. doi:10.1371/journal.pone.0094276.

WEBSTER, T.J., SIEGEL, R.W., BIZIOS, R. Enhanced functions of osteoblasts on monophasic ceramics. **Biomaterials**, Elsevier. 2000; 21: 1803-10.

XUE, M., HU, H., JIANG, Y., LIU, J., HE, H., YE, X. Biodegradable polymer-coated, gelatin hydrogel/bioceramics ternary composites for antitubercular drug delivery and tissue regeneration. **Journal of Nanomaterials**. 2012; ID: 530978.

ZAVAGLIA, C.A.C., RODRIGUES, L. R., DIAS, C.G.B.T., RODRIGUEZ, G.N.P., LOMBELLO, C. B., D'ÁVILA, M.A. **Dispositivo modular de rotificação, método de operação e uso**. 2012, pedido de patente: BR1020120084040.