



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS**



GREYCE YANE HONORATO SAMPAIO

**PRODUÇÃO DE MATRIZES TRIDIMENSIONAIS POROSAS DE
POLICAPROLACTONA-NANOHIĐROXIAPATITA**

Campina Grande – PB
2016

GREYCE YANE HONORATO SAMPAIO

**PRODUÇÃO DE MATRIZES TRIDIMENSIONAIS POROSAS DE
POLICAPROLACTONA-NANOHIĐROXIAPATITA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial à obtenção do título de **Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais.**

Orientadores: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook
Dr. Raúl García Carrodegua
Agência Financiadora: CAPES

Campina Grande – PB
2016

VITAE DO CANDIDATO

- Desenhista Industrial pela UFCG (2007).
- Especialista em Design de Interiores pela IESP (2012).
- Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais pela UFCG (2012).
- Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais pela UFCG (2016).

GREYCE YANE HONORATO SAMPAIO

PRODUÇÃO DE MATRIZES TRIDIMENSIONAIS DE
POLICAPROLACTONA/NANOHIĐROXIAPATITA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial à obtenção do título de **Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais**.

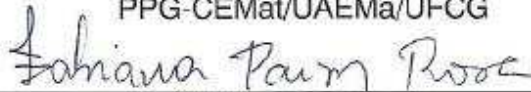
Aprovado em: 29/02/2016



Dr. Marcus Vinícius Lia Fook
Orientador
PPG-CEMat/UFCG



Dr.ª Lisiane Navarro de Lima Santana
Examinadora Interna
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG



Dr.ª Fabiana Palm Rosa
Examinadora Externa
PPG-PIOS/UFBA



Dr.ª Nadja Maria da Silva Oliveira
Examinadora Externa
PPGO/CCBSUEPB



Dr. Thiago Bizerra Fidélis
Examinador Externo
PNPD/UFCG

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

S192p Sampaio, Greyce Yane Honorato.
Produção de matrizes tridimensionais de policaprolactona/nanohidroxiapatita / Greyce Yane Honorato Sampaio. – Campina Grande, 2016.
171 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2016.

"Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook, Prof. Dr. Raúl García Carrodegua".

Referências.

1. Policaprolactona – Engenharia de Materiais.
2. Nanohidroxiapatita.
3. Matrizes Tridimensionais – Estruturadas por Esferas.
4. Regeneração Óssea. I. Fook, Marcus Vinícius Lia. II. Carrodegua, Raúl García. III. Título.

CDU 620.1:678.7(043)

Aos meu Pais,
Lina Sampaio e
Francisco Sampaio (*in memoriam*).

Ao meu esposo,
Matheus Pasquali.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde e vitalidade concedidas. Pela luz que clareia o meu caminhar e por todos os meios e colaboradores com os quais fui agraciada.

À minha família, pelos primorosos valores transmitidos, e pelo apoio incondicional nos momentos de escolhas. Em especial, às minhas avós Francisca Honorato e Antônia Sampaio (*in memoriam*), à minha mãe Lina Sampaio e aos meus irmãos Pablo e Franklin Sampaio.

Ao meu esposo e grande amor Matheus Pasquali, pela constante positividade transmitida e toda a dedicação e suporte no campo pessoal e também acadêmico.

Ao professor Dr. Marcus Vinicius Lia Fook, por todas as oportunidades especiais que me foram confiadas durante esta etapa e pelo esforço em estruturar e disponibilizar o laboratório CERTBIO, de onde levo grandes aprendizados.

Ao Dr. Raúl García Carrodegua, por me estimular a força de vontade, simplicidade e sinceridade, e por me fazer confiar que este trabalho seria possível. Agradeço imensamente a sua dedicação e contribuições para a minha formação profissional e pessoal, estimado professor.

Aos docentes e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, nomeadamente aos professores Dr. Gelmires de Araújo Neves, Dr. Romualdo Rodrigues de Menezes, Dr. Marcelo Silveira Rabello e Dr. Rômulo Feitosa Navarro, por contribuírem diretamente com o desenvolvimento desta tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

Ao Dr. Hugo Miguel Lisboa Oliveira, pelo importante incentivo durante o surgimento da ideia desta pesquisa.

À equipe do Instituto de Cerámica y Vidrio, pertencente ao Consejo Superior de Investigaciones Científicas, de Madrid, onde realizei doutoramento sanduíche e pude estruturar o meu crescimento acadêmico. Especialmente pela convivência e aprendizado com o Dr. Miguel Ángel Rodríguez, Dr. Eugenio García e Ms. Larissa Souza Mendes.

Aos professores Dr. Mário Eduardo Rangel Moreira Cavalcanti Mata e Dr. Andrés Vercik, e ao Dr. Thiago Bizerra Fidéles pelo apoio, conselhos e colaborações essenciais nas diversas fases deste trabalho.

A todos os que fazem parte do Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO), com os quais compartilhei momentos únicos de trabalho e de lazer. Em especial, a Glória Tamiris Furtado, Isabel Rabello, Mairly Souza, Rodrigo Lima, Daniel Bezerra, Willams Teles, Imarally Souza, Hudson Araújo, Antônio Fonseca, Lívia Marques, Jucélia Dantas, Milena Costa, Michele Leite, Ítalo Macedo, D. Val e Sr. Sérgio.

Aos grandes amigos que prestaram apoio fundamental no campo pessoal para que eu pudesse cumprir esta etapa: Anna Sylvia Cavalcanti, Ana Carolina Brasil, Dávila Andrade, Jacqueline Loureiro, Larissa Lira, Maria Eduarda Cavalcanti Rosa, Patrícia Lourenço, Rafaela Silva e Vanucia Dias.

“Abra seus braços para as mudanças.
Mas não abra mão dos seus valores.”
Dalai Lama

“Caminhante, não há caminho
Faz-se caminho ao andar”
Antônio Machado

RESUMO

A policaprolactona (PCL), utilizada como matriz biodegradável em combinação à nanohidroxiapatita (nHA), intrinsecamente bioativa, é uma alternativa promissora para a produção de matrizes tridimensionais (3D) porosas, visando a regeneração do tecido ósseo. No entanto, rotas de processamento visando otimizar a interação entre esses materiais devem ser investigadas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver matrizes 3D de PCL/nHA estruturadas por esferas, via agregação por aquecimento a baixas temperaturas. Para isto, foram produzidas nHA por precipitação química via úmida, utilizando o $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e o $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ como precursores, conduzido à 80 °C (pH>10). Estas foram caracterizadas por difração de Raios X (DRX), espectroscopia na região no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). A superfície das nHA foi modificada com ácido esteárico (AE), verificada pelos resultados de FTIR, MET e monitoramento de estabilidade. Esferas de PCL e PCL/nHA foram produzidas pelo método de emulsão simples com evaporação do solvente, o diclorometano, em 02 etapas, para obtenção de diâmetros entre 10-150 μm e maiores que 800 μm . Foram investigadas as influências da concentração de PCL, da adição de nHA com e sem AE, da concentração de álcool polivinílico e da velocidade de emulsificação. O material foi caracterizado por DRX, FTIR, microscopia eletrônica de varredura (MEV), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (ATG), sendo calculado também o rendimento. Matrizes 3D porosas de PCL e de PCL/nHA foram produzidas e analisadas por microscopia ótica (MO), MEV e ensaios *in vitro* de bioatividade e de adesão celular. nHA deficientes em cálcio, em formato de haste (~47 nm x ~8 nm) e com superfície específica de 90,1 m^2/g , foram obtidas. Esferas de PCL e PCL/nHA foram produzidas com diâmetros entre 2-3000 μm , densas ou porosas, contendo nHA distribuídas interna e externamente. Matrizes 3D foram obtidas a partir da agregação das esferas produzidas, estruturadas entre si a partir da formação de pescoços entre esferas adjacentes, com hierarquia de poros medindo até 1500 μm . As matrizes apresentaram capacidade bioativa e satisfatória adesão e desenvolvimento celular. Os resultados sugerem a aplicação vantajosa desses dispositivos para a regeneração de tecidos ósseos.

Palavras-chave: Policaprolactona. Nanohidroxiapatita. Esferas. Matriz tridimensional. Regeneração óssea.

ABSTRACT

Polycaprolactone (PCL) have been largely used as a biodegradable matrix. This polymer in a combination with bioactive calcium deficient nanohydroxyapatite (CD-nHA) represent promising materials to be applied for bone tissue engineering. Nevertheless, processing routes to optimize the interaction between these materials should be investigated. Thus, the aim of this work was to develop PCL/nHA sphere-based scaffolds structured by sinterization at low temperatures. For this, nHA were produced by wet chemical precipitation method, using the precursors $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, conducted at 80 °C (pH>10). The powder was characterized by X-ray diffraction (XRD), fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and transmission electron microscopy (TEM). nHA surface was modified with stearic acid (SA), verified with FTIR and TEM analysis and stability control in dichloromethane (DCM). PCL and PCL/nHA spheres were produced by oil-in-water and solid-in-oil-in-water emulsion solvent evaporation method. This production occurred in 02 steps, to obtain diameters ranging 10-150 μm and higher than 800 μm . The follow parameters were investigated: PCL concentration, nHA content with and without AE, polyvinyl alcohol concentration (stabilizing agent) and emulsification stirring. The material was characterized by DRX, FTIR, scanning electron microscopy (SEM), differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (ATG), and the percent yield was calculated. PCL and PCL/nHA porous scaffolds were produced and characterized by SEM, optical microscopy (MO), and in vitro bioactivity and cell adhesion assays. Calcium deficient nHA, shaped as rods ($\sim 47 \text{ nm} \times \sim 8 \text{ nm}$), with a specific surface of 90,1 m^2/g was obtained. PCL and PCL/nHA spheres were produced with diameters ranging 2-3000 μm , dense or porous, containing nHA effectively distributed internally and at the surface. Scaffolds were successfully obtained by sintering the spheres at low temperatures. It was observed connections shaped as necks in adjacent spheres, and a hierarchical porous architecture with pores measuring up to 1500 μm . It was demonstrated satisfactory bioactivities capacity, cellular adhesion, and cellular development. Our results suggested the advantageous applicability of these scaffolds to bone tissue regeneration.

Keywords: Polycaprolactone. Nanohydroxyapatite. Spheres. Scaffold. Bone regeneration.

PUBLICAÇÕES

- Artigo completo em anais de congresso:

SAMPAIO, G.Y.H.; SOUZA, M.K.S.; MELO, R.Q.C.; CARRODEGUAS, R.G.; FOOK, M.V.L. **Síntese de microesferas de policaprolactona/nanohidroxiapatita**. In: 13º Congresso Brasileiro de Polímeros (13º CBPOL). Natal-RN 2015. (Apresentação pôster)

- Resumo em anais de congresso:

SAMPAIO, G.Y.H.; FARIAS, K.A.S.; LIMA, R.J.S.; MENDES, L.S.; CARRODEGUAS, R.G.; FOOK, M.V.L. **Synthesis and characterization of nanoscale hydroxyapatite**, p.74. In: Proceedings of the International Symposium on Crystallography [Blucher Physics Proceedings, v.1, n.3]. São Paulo: Blucher, 2015. ISSN 2358-2359, DOI 10.5151/phypro-sic100-074. (Apresentação pôster)

SAMPAIO, G.Y.H.; FIDELIS, T.B.; CARRODEGUAS, R.G.; FOOK, M.V.L. **Preparation and characterization of polycaprolactone/nanohydroxyapatite microspheres**. In: 8º Congresso Latinoamericano de Órgãos Artificiais, Biomateriais e Engenharia de Tecidos (8º COLAOB). Rosario-AR 2014. (Apresentação pôster)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura hierárquica de um osso típico, demonstrando sua arquitetura em várias escalas, de acordo com o modelo hierárquico mais difundido, de Weiner e Wagner (1998) (SADAT-SHOJAI et al., 2013).	29
Figura 2 – Esquemas de representação da formação de esferas pelos métodos de emulsão com evaporação do solvente O/A, A/O e A/O/A (Adaptado de Sadat-Shojai et al. (2013)).	37
Figura 3 – Estrutura química em 3D da PCL (MARTINS, 2011).	38
Figura 4– Produtos fabricados a partir do PCL: nanoesferas (a,b); nanofibras (c,d); espumas tridimensionais porosas (e,f); malhas têxteis (g,h,i); scaffolds por sinterização seletiva a laser (j-o); scaffolds por modelagem por extrusão (p-u) (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010a).	39
Figura 5 – Possíveis nanoestruturas da hidroxiapatita: a) irregular; b) esférica; c) haste ou agulha; d) placa ou floco; e) bastões auto-organizados; f) feixe de fibras ou flor; g) aglomerados de placas ou flocos; h) flor; i) microesfera porosa ou esfera mesoporosa; j) laço ou bastões auto-organizados; k) haltere (SADAT-SHOJAI et al., 2013).	44
Figura 6 – (a) Célula unitária da HA vista ao longo da direção [001], apresentando o posicionamento dos elementos químicos; (b) Célula unitária da HA vista ao longo da direção [100] (RAMIREZ, 2010).	45
Figura 7 – Micro e nanoestrutura de osso típico e possíveis nanoestruturas de materiais utilizados para regeneração óssea. (a) estrutura macroscópica do osso, (b) Ósteon ou canais de Havers, (c) fibras de colágeno, (d) canais nanométricos (e) nanofibras, (f) nanotubos, (g) nanoporos, (h) nanoesferas, (i) nanocompósitos (Adaptado de Gong et al. (2015)).	46
Figura 8 – Esquema de síntese das nHA pelo método de precipitação via úmida.	52
Figura 9 – Síntese das nHA por precipitação via úmida: (A) processo de gotejamento sob agitação a 80 °C; (B) sistema em repouso após precipitação; (C) sistema após deposição completa da fase sólida.	53
Figura 10 – Esquema do procedimento de modificação de superfície das nHA com ácido esteárico.	54
Figura 11 – Esquema do processo de emulsão sólido/óleo/água, com evaporação do solvente, realizado nas etapas 01 e 02.	56

Figura 12 – Esquema do processo de emulsão sólido/óleo/água, com evaporação do solvente, realizado na etapa 03.....	57
Figura 13 – Representação de um sistema de empacotamento compacto de esferas idênticas não sobrepostas, com os espaços vazios contidos entre as mesmas preenchidos por esferas: A) arranjo tridimensional (JACOBSON, 2007); B) projeção bidimensional.	59
Figura 14 – Esquema geométrico da relação entre o raio do poro e o raio das esferas, considerando o centro do poro como centro do plano cartesiano (0,0).....	60
Figura 15 – Esquema do processo de obtenção das matrizes 3D pela agregação das esferas de PCL e de PCL/nHA a baixas temperaturas e dimensionamento básico do molde utilizado.	61
Figura 16 – Fluxograma experimental da pesquisa.....	70
Figura 17 – Nanopartículas de hidroxiapatita obtidas pelo processo de precipitação química via úmida, (a) na forma de blocos e (b) na forma de pó após ser moído e classificado.....	71
Figura 18 – Padrões de DRX experimentais e calculados por refinamento Rietveld da nHA, obtida por precipitação química.....	72
Figura 19 – Diagrama de equilíbrio de fases do sistema CaO-P ₂ O ₅ . A linha vermelha indica a HA estequiométrica (Razão Ca/P 1,67) (RIBOUD, 1973).	73
Figura 20 – Padrões de DRX da amostra nHA obtida por precipitação química, e da amostra nHA calcinada a 1100 °C. Os picos adicionais observados estão indicados pelas setas.	74
Figura 21 – Padrões de DRX experimentais e calculados por refinamento Rietveld, da amostra nHA obtida por precipitação química, calcinada a 1100 °C.....	74
Figura 22 – Imagem por MET da amostra nHA em diferentes regiões da grade de transmissão.....	76
Figura 23 – Histogramas das imagens por MET da amostra nHA.	76
Figura 24 – Espectro de FTIR das nanopartículas de HA obtidas por precipitação química.....	78
Figura 25 – Espectro de FTIR das nanopartículas de HA obtidas por precipitação química, com e sem modificação superficial por ácido esteárico.	80
Figura 26 – Imagem por MET das nHA não-modificadas (a) e modificadas por ácido esteárico (b,c).....	81

Figura 27 – Imagens referentes ao momento imediato à adição das nHA no DCM, sem agitação: (a,b) nHA sem AE; (c,d) nHA com AE.	82
Figura 28 – Padrão de DRX do TCP comercial.	83
Figura 29 – Micrografia obtida por MET, do TCP comercial.....	83
Figura 30 – Espectro de FTIR da policaprolactona.	84
Figura 31 – Curva de DSC da policaprolactona CAPA 6800, de 25 °C a 100 °C.....	86
Figura 32 – Curvas TG/ATD da policaprolactona CAPA 6800.	86
Figura 33 – Viabilidade dos macrófagos na presença das membranas de PCL.	87
Figura 34 – Aspecto físico das esferas de PCL obtidas por emulsão simples óleo/água.	88
Figura 35 – Micrografias por MEV de esferas de PCL 10 % obtidas com diferentes velocidades de agitação: 5000 rpm (a, b, c); 7000 rpm (d, e, f); 10000 (g, h, i).	89
Figura 36 – Histogramas referentes ao diâmetro das esferas medido para os Testes 01, 02 e 03, para avaliação da influência de diferentes velocidades de agitação.	90
Figura 37 – Micrografias por MEV de esferas de PCL 10 % obtidas em diferentes concentrações de solução aquosa de PVA: (a) 2,5 %(m/v); (b) 2,0 %(m/v); (c) 1,5 %(m/v).	91
Figura 38 – Histogramas referentes ao diâmetro das esferas calculado para os Testes 03, 04 e 05, para avaliação da influência de diferentes concentrações de PVA.	91
Figura 39 – Micrografias por MEV de esferas obtidas em diferentes concentrações de PCL: 10 % (a, b); 7,5 % (c, d); 5 % (e, f).	93
Figura 40 – Histogramas referentes ao diâmetro das esferas obtidos nos testes 06, 07 e 08, para avaliação da influência de diferentes concentrações de PCL.	94
Figura 41 – Micrografias por MEV de esferas PCL 10 % obtidas com diferentes velocidades de agitação: (a) 5000 rpm; (b) 10000 rpm.	95
Figura 42 – Aspecto físico das esferas de PCL/TCP obtidas por emulsão sólido/óleo/água.	97
Figura 43 – Micrografias por MEV de esferas de PCL/TCP obtidas com diferentes conteúdos de TCP: 28,5 % (a)100x, (b)1000x; 23 % (c) 100x, (d) 1000x, (e) secção 200x, (f) secção 800x.	98
Figura 44 – Histogramas referentes ao diâmetro das esferas obtidos nos testes 01(a) e 02(b), para avaliação da influência de diferentes conteúdos de TCP; e ao comprimento dos aglomerados presentes no interior das esferas obtidos do teste 02 (c).	99

Figura 45 – Micrografias por MEV de esferas de PCL/TCP 23 % obtidas com diferentes velocidades de agitação: 7000 (a) 200x, (b) 500x; 10000 (c) 200x, (d) 500x.	101
Figura 46 – Histogramas referentes ao diâmetro das esferas obtidos nos testes 03(a) e 04(b), para avaliação da influência de diferentes velocidades de agitação; e ao comprimento dos aglomerados presentes no interior das esferas obtidos do teste 03 (c).	102
Figura 47 – Curvas TG/DTG do PCL <i>pellet</i> (a), esferas de PCL 10 %(m/v) (b); e esferas de PCL/TCP com 23 %(m/m) de conteúdo de TCP, antes (c) e após (d) tratamento com ácido esteárico.....	103
Figura 48 – Aspecto físico das esferas de PCL/nHA (Etapa 02) obtidas por emulsão sólido/óleo/água.	105
Figura 49 – Micrografias por MEV de esferas de PCL/nHA obtidas com diferentes concentrações de PCL: nHA23% - (a)10 %-100x; (b)7,5 %-400x; nHA28,5% - (c)7,5 %-100x; (d)5 %-250x.....	107
Figura 50 – Micrografias por MEV de esferas de PCL/nHA obtidas com diferentes concentrações de PCL: nHA23% - 10 % (a)1500x (b)500x (c)1500x; 7,5 % (d)1800x (e)1500x; nHA28,5% - 7,5 % (f)1000x (g)1500x (h)1200x; 5 % (i)600x (j)1500x.....	108
Figura 51 – Histogramas referentes ao diâmetro das esferas obtidos nos testes 01(a) e 04(b), 03(c) e 06(d), para avaliação da influência de diferentes concentrações de PCL.	109
Figura 52 – Histogramas referentes ao diâmetro das esferas obtidos nos testes 03(a), 04(b), 05(c) e 07(d), para avaliação da influência de diferentes conteúdos de nHA.	110
Figura 53 – Micrografias por MEV de esferas de PCL/nHA obtidas com PCL 7,5% e diferentes conteúdos de nHA: 28,5% (a)1000x (b)1200x (c)3000x; 23% (d)1800x (e)1200x (f)3000x; 17% - (g)1500x (h)1000x (i)3000x; 23%S/AE (j)1000x (k)1200x (l)3000x.	111
Figura 54 – Curvas termogravimétricas das esferas de PCL/nHA obtidas na Etapa 02.	112
Figura 55 – Padrões de DRX das esferas de PCL 10%(m/v), de PCL/nHA 10%/23% e das nHA.....	114
Figura 56 – Espectro de FTIR das esferas de PCL 10%(m/v), de PCL/nHA 10%/23%, e das nHA.....	115

Figura 57 – Aspecto físico das esferas de PCL (a) e PCL/nHA45 (b) (Etapa 03) obtidas por emulsão sólido/óleo/água (> 800 µm).	116
Figura 58 – Micrografias por MEV de esferas de PCL/nHA 70/30: (a)40x (b)200x (c)1000x (d)200x (e)1000x.	118
Figura 59 – Micrografias por MEV de esferas de PCL/nHA 65/35: Com AE (a)40x (b)250x (c)1000x (d)200x (e)500x; Sem AE (f)40x (g)600x (h)1500x (i)250x (j)500x.	119
Figura 60 – Micrografias por MEV de esferas de PCL/nHA 60/40: (a)40x (b)250x (c)1000x (d)150x (e)200x.	120
Figura 61 – Micrografias por MEV de esferas de PCL/nHA 55/45: (a)40x (b)1000x (c)2000x (d)140x (e)500x.	120
Figura 62 – Micrografias por MEV de esferas de PCL/nHA 100/0: (a)150x (b)500x (c)800x (d)250x (e)800x.	121
Figura 63 – Histogramas referentes ao diâmetro das esferas obtidos na Etapa 03, para avaliação da influência de diferentes conteúdos de nHA.	122
Figura 64 – Histograma referente ao diâmetro das esferas de PCL (100/0) obtidas na Etapa 03.	123
Figura 65 – Micrografias de MEV obtidas das secções de esferas de PCL/nHA: 70/30 (a) 80x, (b) 400x, (c) 600x; 65/35 (d) 80x, (e)200x, (f) 500x, (g) 250x.	124
Figura 66 – Curvas termogravimétricas das esferas de PCL/nHA obtidas na Etapa 03.	125
Figura 67 – Padrões de DRX das esferas de PCL, de PCL/nHA 65/35 e PCL/nHA 55/45, comparados ao espectro das nHA.	128
Figura 68 – Espectro de FTIR das esferas de PCL, de PCL/nHA 65/35 e PCL/nHA 55/45, comparados ao espectro das nHA.	129
Figura 69 – Curvas de DSC da PCL em <i>pellet</i> , esferas de PCL e compósitos de PCL/nHA 55/45 e 65/35 obtidos na etapa 03, na faixa de 25 °C a 100 °C.	130
Figura 70– Micrografias obtidas por MEV e por MO obtidas das matrizes 3D de PCL(a-c) e de PCL/nHA 70/30 (d-f) 65/35 (g-i) 60/40 (j-l) 55/45 (m-o).	134
Figura 71 – Micrografias de MEV obtidas das matrizes 3D de PCL e de PCL/nHA 65/35 e 55/45 após ensaio de bioatividade <i>in vitro</i> , em 7,14 e 21 dias de avaliação.	136
Figura 72 – Micrografias de MEV obtidas das matrizes 3D de PCL e de PCL/nHA 65/35 e 55/45 após ensaio de bioatividade <i>in vitro</i> após 28 dias de avaliação.	137

Figura 73 – Micrografias por MEV de matrizes 3D de PCL/nHA 55/45: (a)2000x (b)5000x (c)4000x (d)15000.....	138
Figura 74 – Mecanismo de quebra de gota por estiramento.	146

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais fosfatos de cálcio e suas propriedades (OKADA; FURUZONO, 2012).	43
Tabela 2 – Relação de testes realizados para obtenção de esferas de PCL e PCL/nHA e suas respectivas variáveis.....	58
Tabela 3 – Parâmetros de processamento estabelecidos para obtenção das matrizes 3D de PCL e de PCL/nHA.	62
Tabela 4 – Concentração iônica do fluido corpóreo simulado e do plasma sanguíneo humano (10 ⁻³ mol/L) (RAMIREZ, 2010).....	67
Tabela 5 – Reagentes utilizados para preparação do SBF.	68
Tabela 6 – Dados dos parâmetros de rede e volume da célula unitária da nHA, obtidos por refinamento Rietveld.	72
Tabela 7 – Tamanho médio de cristalito estimado pela equação de Scherrer e tamanho médio de partícula estimado por MET para a amostra nHA.....	77
Tabela 8 – Atribuições das frequências vibracionais observadas no espectro de FTIR apresentado na Figura 24.	78
Tabela 9 – Atribuições das frequências vibracionais observadas no espectro de FTIR apresentado na Figura 25.	80
Tabela 10 – Atribuições das frequências vibracionais observadas no espectro de FTIR apresentado na Figura 30.	85
Tabela 11 – Percentuais de viabilidade celular obtidos das membranas de PCL.	87
Tabela 12 – Relação de testes realizados para obtenção de esferas de PCL e suas respectivas variáveis.	88
Tabela 13 – Faixa de diâmetro das esferas obtidas dos testes 01, 02 e 03, para avaliação da influência de diferentes velocidades de agitação.	89
Tabela 14 – Faixa de diâmetro das esferas obtidas dos testes 01, 02 e 03, para avaliação da influência de diferentes concentrações de PVA.	92
Tabela 15 – Faixas de diâmetro das esferas obtidas dos testes 06, 07 e 08, para avaliação da influência de diferentes concentrações de PCL.	93
Tabela 16 – Rendimento obtido para os testes 06, 07 e 08, da produção de esferas por emulsão simples óleo/água (Média ± desvio padrão).	95
Tabela 17 – Relação de testes realizados para obtenção de esferas de PCL/TCP e suas respectivas variáveis.....	97

Tabela 18 – Faixas de diâmetro obtidas dos testes 01 e 02, para avaliação da influência de diferentes conteúdos de TCP, e faixa de comprimento dos aglomerados de TCP no interior das esferas para o teste 02.	99
Tabela 19 – Dados de faixa de diâmetro das esferas obtidos dos testes 03 e 04, para avaliação da influência de diferentes velocidades de agitação, e faixa de comprimento dos aglomerados de TCP no interior das esferas para o teste 03.....	100
Tabela 20 – Dados das esferas de PCL/TCP 23% com e sem AE, obtidas na Etapa 01, relacionando o conteúdo teórico (inicial) e real no compósito, obtido por TG. ..	103
Tabela 21 – Relação de testes realizados para obtenção de micropartículas de PCL/nHA e suas respectivas variáveis.....	105
Tabela 22 – Dados de faixa de diâmetro das esferas obtidas dos testes 01, 04, 03 e 06, para avaliação da influência de diferentes concentrações de PCL.	108
Tabela 23 – Faixas de diâmetro das esferas obtidas dos testes 03, 04, 05 e 07, para avaliação da influência de diferentes conteúdos de nHA.	110
Tabela 24 – Dados das esferas de PCL/nHA obtidas na etapa 02, relacionando o conteúdo teórico (inicial) e real de nHA no compósito, obtido por TG.....	113
Tabela 25 – Rendimento obtido para as formulações de PCL/nHA(Etapa 02), da produção de esferas por emulsão sólido/óleo/água (Média ± desvio padrão).....	113
Tabela 26 – Relação de testes realizados para obtenção de esferas de PCL/nHA(Etapa 03) e suas respectivas variáveis.	117
Tabela 27 – Dados de faixa de diâmetro das esferas, fração de partículas irregulares e a razão de aspecto dessas partículas, obtidas na Etapa 03.	123
Tabela 28 – Dados das esferas de PCL/nHA obtidas na etapa 03, relacionando o conteúdo teórico (inicial) e real de nHA no compósito, obtido por TG.....	126
Tabela 29 – Rendimento obtido para as formulações de PCL/nHA(Etapa 03), da produção de esferas por emulsão S/O/A (Média ± desvio padrão).	127
Tabela 30 – Dados de temperatura de fusão (T_f) obtidos a partir das curvas de DSC.	130
Tabela 31 – Dados de ganho de peso das matrizes 3D submetidas ao ensaio de bioatividade in vitro, após avaliação durante 7, 14, 21 e 28 dias (Média ± desvio padrão).....	136

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 3D – Tridimensionais
- 3DP – Impressão tridimensional
- μ CT – Microtomografia Computadorizada de Raios X
- AE – Ácido esteárico
- A/O – Água/Óleo
- A/O/A – Água/Óleo/Água
- ATG – Análise termogravimétrica
- ATD – Análise térmica diferencial
- ATR – Refletância Total Atenuada
- BET – Brunauer, Emmett, Teller
- Ca/P – Cálcio/Fósforo
- DC – Deficiente em cálcio
- DRX – Difração de Raios X
- DSC – Calorimetria exploratória diferencial
- FTIR – Espectroscopia na região no infravermelho com transformada de Fourier
- FDA – *Food and Drug Administration*
- FDM – *Fused deposition modeling*
- GSAS – *General Structure Analysis System*
- HA – Hidroxiapatita
- ICDD – *International Centre for Diffraction Data*
- ICSD – *Inorganic Crystal Structure Data Base*
- ISO – *International Organization for Standardization*
- MET – Microscopia eletrônica de transmissão
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- MO – Microscopia ótica
- nHA – Nanohidroxiapatita
- O/A – Óleo/Água
- O/A/O – Óleo/Água/Óleo
- PBS – *Phosphate buffer saline*
- PCL – Policaprolactona
- PED – *Precision extrusion deposition*
- PGA – Ácido poli-glicólido

PLA – Ácido poli-láctido

PLGA – Ácido poli(láctido-co-glicólido)

RPM – Rotação por minuto

SBF – *Simulated body fluid*

S/O/A – Sólido/óleo/água

SLS – Sinterização seletiva a *laser*

STL – Estereolitografia

T_g – Temperatura de transição vítrea

T_f – Temperatura de fusão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	Objetivo Geral	27
1.1.1	Objetivos Específicos	27
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
2.1	Tecido Ósseo	28
2.2	Engenharia de Tecidos	30
2.3	Matrizes Tridimensionais Porosas	31
2.4	Métodos de fabricação de matrizes 3D.....	32
2.4.1	Sinterização Seletiva a Laser (SLS)	33
2.4.2	Agregação de partículas por aquecimento a baixas temperaturas.....	34
2.4.3	Obtenção de esferas por emulsão com evaporação do solvente.....	35
2.5	Policaprolactona	37
2.5.1	Microesferas de Policaprolactona	41
2.5.2	Matrizes 3D de Policaprolactona.....	42
2.6	Hidroxiapatita	42
2.7	Matrizes 3D de Policaprolactona/Hidroxiapatita.....	47
3	MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1	Local da pesquisa	50
3.2	Reagentes.....	50
3.3	Obtenção das nanopartículas de hidroxiapatita (nHA).....	51
3.3.1	Modificação de superfície das nHA com ácido esteárico.....	53
3.4	Obtenção das esferas de PCL e PCL/nHA	54
3.5	Obtenção das matrizes 3D de PCL e PCL/nHA.....	59
3.5.1	Planejamento da estrutura das matrizes 3D	59
3.5.2	Agregação das partículas por aquecimento a baixas temperaturas.....	61

3.6	Caracterização do material	62
3.6.1	Técnicas de Caracterização	62
4	RESULTADOS	71
4.1	Nanopartículas de hidroxiapatita (nHA)	71
4.1.1	nHA após modificação de superfície com ácido esteárico (AE).....	78
4.2	Fosfato Tricálcico (TCP)	82
4.3	Policaprolactona (PCL)	84
4.4	Esferas de policaprolactona.....	87
4.4.1	Influência da velocidade de agitação da emulsão	88
4.4.2	Influência da concentração do agente emulsificante (PVA).....	90
4.4.3	Influência da concentração de PCL.....	92
4.4.4	Morfologia interna das esferas	94
4.4.5	Rendimento	95
4.5	Esferas de policaprolactona/fosfato tricálcico (PCL/TCP) (Etapa 01)	96
4.5.1	Influência da adição de TCP.....	97
4.5.2	Influência da velocidade de agitação com a adição de TCP	99
4.5.3	Influência do tratamento do TCP com ácido esteárico	102
4.6	Esferas de policaprolactona/nanohidroxiapatita (PCL/nHA)	104
4.6.1	Esferas de PCL/nHA (Etapa 02).....	104
4.6.1.1	Influência da concentração de PCL	105
4.6.1.2	Influência do conteúdo de nHA	109
4.6.1.3	Morfologia interna das esferas.....	111
4.6.1.4	Rendimento.....	112
4.6.1.5	Caracterização físico-química	113
4.6.2	Esferas de PCL/nHA (Etapa 03).....	116
4.6.2.1	Influência do conteúdo de nHA.....	117
4.6.2.2	Morfologia interna das partículas	123

4.6.2.3	Rendimento	125
4.6.2.4	Caracterização físico-química.....	127
4.7	Matrizes 3D de PCL e de PCL/nHA	132
4.7.1	Análise morfológica	132
4.7.2	Ensaio de Bioatividade in vitro.....	135
4.7.3	Ensaio de Adesão Celular in vitro.....	137
5	DISCUSSÃO	139
6	CONCLUSÕES	151
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	153
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	154

1 INTRODUÇÃO

A Engenharia de Tecidos consiste em uma área de investigação emergente voltada para o auxílio de indivíduos cujos tecidos do corpo apresentem consequências traumáticas de doenças ou lesões, reparando e/ou regenerando suas respectivas partes e funções (MORENO et al., 2016; RAGHAVENDRA; VARAPRASAD; JAYARAMUDU, 2015). Nesse campo de pesquisa, células, matrizes tridimensionais, produzidas a partir de um biomaterial, e ambiente propício ao desenvolvimento celular, são os três elementos essenciais (BLACK et al., 2015; YAO et al. , 2015; O'BRIEN, 2011; WILLIAMS, 2008). As matrizes 3D, por se tratarem de dispositivos destinados a favorecer a adesão, crescimento e proliferação celular, até a formação do novo tecido, apresentam como requisitos básicos biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades superficiais apropriadas (RAGHAVENDRA; VARAPRASAD; JAYARAMUDU, 2015; BERNER et al., 2014; YANG et al., 2014; DASH; KONKIMALLA, 2012).

Os progressos em tecnologias convencionais ou avançadas, utilizadas para a fabricação de matrizes 3D, possibilitam a construção de suportes porosos com arquitetura complexa e boa reprodutibilidade (YAO et al., 2015; XU et al., 2014; WOODRUFF; HUTMACHER, 2010b). Além disso, a combinação entre essas técnicas têm permitido a busca e o desenvolvimento de materiais que possam se adaptar às especificidades do ambiente biológico (RAGHAVENDRA; VARAPRASAD; JAYARAMUDU, 2015; WANG et al., 2015; AMINI; LAURENCIN; NUKAVARAPU, 2012).

A poli(ϵ -caprolactona) (PCL) é um polímero biocompatível e biodegradável, cujas baixas temperaturas de transição vítrea (T_g de $-60\text{ }^\circ\text{C}$) e de fusão (T_m que pode variar de $45\text{ }^\circ\text{C}$ a $64\text{ }^\circ\text{C}$), e boa solubilidade em solventes orgânicos voláteis à temperatura ambiente, determinam sua processabilidade por uma vasta gama de tecnologias (MKHABELA; RAY, 2014; ABEDALWAFI et al., 2013). A PCL tem sido investigada como matriz polimérica em compósitos incluindo fases inorgânicas osteogênicas e osteoindutoras, tais como a hidroxiapatita (HA) (KOUPELI; KARKHANEH; DALIRI JOUPARI, 2015; REZAEI; MOHAMMADI, 2013; EOSOLY et al., 2012). A HA é um material atrativo para as aplicações no domínio da regeneração óssea devido às suas características bioativas e por apresentar semelhança com a HA presente na fase inorgânica do osso natural (BASILE et al., 2015; BLACK et al.,

2015; VALLET-REGÍ, 2010). Recentes avanços na síntese de nanopartículas de HA e na concepção de nanocompósitos utilizando polímeros reabsorvíveis têm ampliado as perspectivas no campo da regeneração óssea (MATESANZ et al., 2015; NITHYA; MEENAKSHI SUNDARAM, 2015; WANG et al., 2015; MKHABELA; RAY, 2014).

Considerando a gama de técnicas empregadas para a produção de matrizes 3D de PCL/HA, a estruturação por esferas vem se destacando. São abordados, principalmente, processos utilizando a sinterização seletiva a *laser* (SLS). A exemplo, nos estudos de Eshraghi e Das (2012), Eosoly et al. (2010) e Wiria et al. (2007), os compósitos sinterizados foram obtidos a partir de partículas de morfologia heterogênea. No entanto, é reportado que, para esses dispositivos, além do tamanho de poros gerado, tanto o formato do poro quanto a curvatura da superfície, influenciam no processo de crescimento celular (ZADPOOR, 2015; BIDAN et al., 2013; KNYCHALA et al., 2013).

Com base nesses indícios, uma abordagem mais recente para matrizes 3D de PCL/HA (DU et al., 2015) explorou o uso de microesferas de morfologia controlável, sinterizadas por SLS, que também podem ser vantajosamente utilizadas como carreadoras de moléculas bioativas. Ainda, a depender do processo utilizado, pode-se alcançar a distribuição homogênea da HA nanométrica na matriz polimérica (HOSSAIN; PATEL; AHMED, 2015; WANG et al., 2013; NAGAVARMA et al., 2012). No entanto, os equipamentos de SLS disponibilizados comercialmente demandam o uso de grandes quantidades de material, resultando em altos custos de produção (LEE, 2006). Além disso, as altas temperaturas utilizadas nesse método, impossibilitam a incorporação de um grande número de moléculas bioativas.

Nesse sentido, faz-se relevante a investigação de métodos alternativos para produção dessas matrizes. Métodos convencionais que permitam o encapsulamento de fármacos, tais como emulsão sólido/óleo/água (S/O/A) com evaporação do solvente, e a agregação de partículas por aquecimento a baixas temperaturas, podem ser explorados. Até o momento, na literatura, não são encontradas referências que tratem da produção de matrizes 3D de PCL/nHA por esses métodos, utilizando a nHA deficiente em cálcio (DC).

Com base nesse contexto, foram delineados os objetivos dessa pesquisa. Este trabalho propõe o desenvolvimento de matrizes 3D de PCL/nHA-DC via agregação de partículas por aquecimento a baixas temperaturas. Para isto, sugere-se a produção de esferas de PCL, contendo nanopartículas de HA distribuídas

homogeneamente interna e externamente à matriz polimérica, visando potencializar a aplicabilidade destes dispositivos para a regeneração de tecido ósseo.

1.1 Objetivo Geral

Desenvolver matrizes 3D de policaprolactona/nanohidroxiapatita deficiente em cálcio (PCL/nHA-DC) estruturadas por esferas utilizando a técnica de agregação de partículas por aquecimento a baixas temperaturas.

1.1.1 Objetivos Específicos

- Produzir nanopartículas de hidroxiapatita deficientes em cálcio por precipitação química via úmida.
- Estudar as características físico-químicas e microestruturais dos materiais de partida policaprolactona e nanohidroxiapatita.
- Desenvolver esferas de PCL e PCL/nHA e investigar as suas características físico-químicas e microestruturais.
- Produzir matrizes 3D de PCL e PCL/nHA utilizando a técnica de agregação de partículas por aquecimento a baixas temperaturas.
- Relacionar as propriedades físico-químicas e microestruturais das matrizes obtidas, de acordo com as variáveis de processamento definidas.
- Avaliar as matrizes 3D de PCL e PCL/nHA mediante ensaios biológicos *in vitro* de bioatividade e de adesão celular.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tecido Ósseo

O esqueleto humano é constituído por tecidos vivos e dinâmicos, que apresentam capacidade de crescer, de se adaptar a vários tipos de solicitações mecânicas, e de se autoreparar em caso de lesão ou desgaste natural (BENETTI, 2014; RODRIGUES, 2012; VALLET-REGÍ, 2010). O tecido ósseo consiste em um órgão vascularizado cujas funções principais são a proteção dos órgãos internos, o suporte das forças dinâmicas geradas pela atividade fisiológica, o armazenamento de cálcio e fósforo e a hematopoiese (ou produção de células sanguíneas na medula óssea) (AMINI; LAURENCIN; NUKAVARAPU, 2012; FONTES, 2010).

Logo, o osso é um tecido altamente diversificado, tanto estruturalmente como funcionalmente. Os mais de duzentos ossos do sistema esquelético humano podem variar em sua estrutura entre longos, curtos, planos e irregulares. Além disso, podem ter um arranjo compacto (osso cortical, com porosidade menor que 10 %) ou trabecular (osso esponjoso, com 50-90 % de porosidade), variando em sua arquitetura entre nano, micro e macro estruturas e, conseqüentemente, diferentes propriedades mecânicas (Figura 1) (GONG et al., 2015; BENETTI, 2014; BOSE; VAHABZADEH; BANDYOPADHYAY, 2013).

O osso é um nanocompósito orgânico-inorgânico natural, composto por fibras de colágeno resistentes e flexíveis, reforçadas por nanocristais de uma fase apatítica semelhante à hidroxiapatita rica em carbonato. A sua fase orgânica representa aproximadamente 1/4 a 1/3 do peso seco total do osso, enquanto a fase inorgânica constitui-se em cerca de 2/3 a 3/4 do peso seco total do osso. A matriz extracelular óssea é composta, principalmente, por colágeno tipo-1 e placas nanométricas de minerais apatíticos (Figura 1) (XU et al., 2014; ZHOU; LEE, 2011; MISTRY; SHI; MIKOS, 2006).

A reparação e a regeneração do osso podem ser caracterizadas como uma seqüência de atividades celulares, que pode se iniciar com uma resposta inflamatória aguda, que ocorre com base em sinais mecânicos e biológicos. O sucesso dessa remodelação dependerá da regeneração das cascatas de sinalização molecular necessárias, da disponibilidade e da viabilidade das células progenitoras, de suporte nutricional adequado e de um ambiente mecânico favorável. O osso em crescimento

possui duas linhagens de células: a osteoblástica, que inclui as células osteoprogenitoras e seus derivados, os osteoblastos e osteócitos, que iniciam e controlam o processo de mineralização osteoide; e a osteoclástica, que derivam de células monocíticas, responsável pelo remodelamento e renovação óssea (BLACK et al., 2015; GONG et al., 2015; BENETTI, 2014; BOSE; VAHABZADEH; BANDYOPADHYAY, 2013).

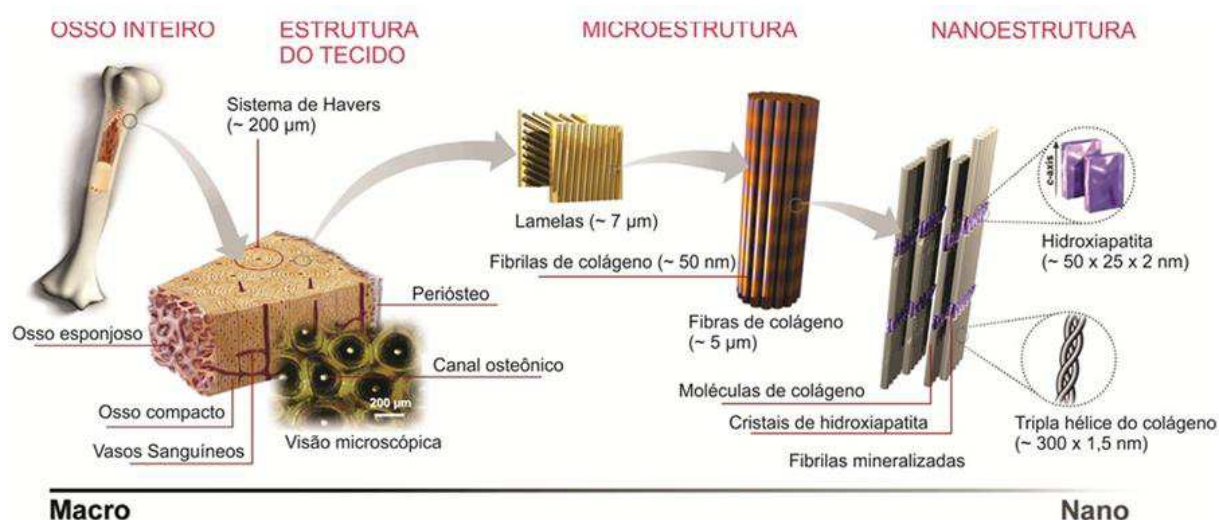


Figura 1 – Estrutura hierárquica de um osso típico, demonstrando sua arquitetura em várias escalas, de acordo com o modelo hierárquico mais difundido, de Weiner e Wagner (1998) (SADAT-SHOJAI et al., 2013).

A formação de novo osso pode ocorrer por duas vias distintas, intramembranosa ou endocondral. Em ambos os casos, primeiramente ocorre a condensação de células mesenquimais que atuam como um molde para subsequente formação do tecido. A formação intramembranosa envolve a diferenciação direta das células mesenquimais progenitoras em osteoblastos. Isto ocorre em partes do corpo como mandíbula, clavícula e alguns tecidos cranianos. No entanto, muitos dos ossos do organismo são formados pela via endocondral. Esta via envolve primeiramente a diferenciação de células mesenquimais progenitoras em condrócitos, os quais serão responsáveis por depositar o molde cartilaginoso que, posteriormente, será mineralizado e substituído por osso. Embora existam diferenças entre essas vias, vários regulares moleculares são compartilhados, tais como: Indian Hedgehog (Ihh), peptídeo relacionado ao paratormônio (PTHrP), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e fatores de crescimento

fibrolástico (FGFs) (BLACK et al., 2015; AMINI; LAURENCIN; NUKAVARAPU, 2012; AOKI et al., 2012).

Porém, nem todos os danos no sistema esquelético, sejam eles provocados por acidente, patologia ou envelhecimento, podem ser reparados pelo próprio organismo, sendo necessária a intervenção especializada de tratamentos ou cirurgias. Até o ano de 2012, nos Estados Unidos, o atendimento a pacientes com casos de reparo de defeitos ósseos representou um custo superior a 2,5 bilhões de dólares. É esperado que esse número duplique até 2020 tanto nos EUA quanto globalmente, tendo em vista o crescimento demográfico e o aumento da expectativa de vida (BLACK et al., 2015; XU et al., 2014; BOSE; VAHABZADEH; BANDYOPADHYAY, 2013; AMINI; LAURENCIN; NUKAVARAPU, 2012).

Em se tratando de cirurgias reconstrutoras do tecido ósseo, a reparação e a regeneração de grandes defeitos representam o maior desafio na atualidade. Comumente, são realizados procedimentos com a utilização de osso autólogo ou alógeno, e os pontos positivos e limitações desses métodos têm sido extensivamente explorados. Embora as intervenções clínicas em vigor venham atendendo, parcialmente, as demandas da população, continua-se buscando soluções mais vantajosas que apresentem, simultaneamente: alto potencial osteoindutor e angiogênico, baixa morbidade do paciente, ausência de restrições de tamanho e forma, livre acesso às clínicas e cirurgias, longa vida útil, segurança biológica e custo razoável. Esse complexo contexto têm direcionado os pesquisadores à investigação de substitutos para os enxertos ósseos com base nas novas abordagens apresentadas pela Engenharia de Tecidos (MORENO et al., 2016; WANG et al., 2015; XU et al., 2014; SENEDESE, 2011).

2.2 Engenharia de Tecidos

O conceito de Engenharia de Tecidos tal como conhecemos hoje, teve início em meados da década de 1980, a partir das investigações de Dr. Joseph Vacanti e Dr. Robert Langer, com o surgimento da ideia de projetar dispositivos tridimensionais específicos para o crescimento celular e a formação de tecidos, em substituição às células ou mistura de células semeadas em matrizes 3D de ocorrência natural. Essas apresentavam propriedades físicas e químicas difíceis de ser manipuladas, resultando

em grandes variações dos resultados produzidos *in vitro* e *in vivo* (MORENO et al., 2016; YANG et al., 2014; WOODRUFF; HUTMACHER, 2008).

Dessa forma, a Engenharia de Tecidos visa a criação ou formação induzida de um tecido específico, numa localização específica, por meio da seleção e manipulação de células, biomateriais estruturados tridimensionalmente, e estímulos biológicos. Os tecidos vivos construídos, por sua vez, devem exibir histoquímica, propriedades químicas e biomecânicas semelhantes às do tecido que se pretende substituir (RAGHAVENDRA; VARAPRASAD; JAYARAMUDU, 2015; PUPPI et al., 2010).

Nesse campo de pesquisa, algumas estratégias aplicáveis têm sido desenvolvidas, tais como: (I) matrizes 3D, com ou sem células e/ou moléculas biológicas sinalizadoras (fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e genes), são aplicadas a um defeito corporal para induzir a regeneração *in vivo*; (II) um sistema de liberação controlada de fármacos que permite que moléculas biológicas auxiliem na sinalização celular e na eficácia terapêutica *in vivo*; (III) matrizes 3D utilizadas para a fixação e proliferação celular, combinadas com dispositivos de cultura de células (por exemplo, um bioreator) para crescimento eficiente do tecido maturado *in vitro* e posterior reimplante; (IV) inserção de uma barreira física feita de um biomaterial, que mantém as células funcionais transplantadas isoladas do ataque imunológico e mantém um espaço para indução à regeneração (BLACK et al., 2015; YANG et al., 2014; SENEDESE, 2011; BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005).

2.3 Matrizes Tridimensionais Porosas

Matrizes 3D podem ser definidas como sendo, essencialmente, estruturas tridimensionais porosas com composição e morfologia pré-especificadas. São dispositivos projetados para mimetizar e substituir temporariamente a matriz extracelular do tecido a ser reconstruído. A matriz extracelular, e a sua forma especializada, a membrana basal, têm a função principal de atuar como substrato fisiológico para adesão celular, servindo também para organizar as células espacialmente (BLACK et al., 2015; FRANCOIS; DORCEMUS; NUKAVARAPU, 2015; WU et al., 2014; VEISEH; TURLEY; BISSELL, 2008).

As matrizes 3D devem proporcionar, portanto: a adesão, crescimento, proliferação, migração e diferenciação das células, agindo como um veículo para

facilitar a retenção e distribuição, tanto das células quanto dos nutrientes, na região onde o crescimento de tecido novo é desejado; e, ainda, servir como delimitadores do espaço para que ocorra a vascularização, formação e remodelagem de novo tecido. Dessa forma, os requisitos indispensáveis à elaboração de matrizes 3D são: biocompatibilidade, biodegradabilidade (com taxa de degradação proporcional ao crescimento do novo tecido), propriedades mecânicas e de superfície consistentes com a aplicação pretendida, e arquitetura porosa adequada (em termos de tamanho dos poros, porosidade e interconectividade entre os poros), em conjunto com a composição de qualquer componente biológico que possa ser adicionado à matriz 3D para melhorar a sua função (RANA et al., 2015; YANG et al., 2014; BURG; ORR, 2008; KARANDE; AGRAWAL, 2008).

Matrizes 3D direcionadas à reparação do tecido ósseo devem apresentar ainda, propriedades osteocondutivas e osteoindutivas. De modo geral, a osteocondutividade está relacionada à capacidade do material de permitir o crescimento ósseo ao longo de sua superfície, enquanto a osteoindutividade se refere à faculdade para induzir a osteogênese (AMINI; LAURENCIN; NUKAVARAPU, 2012; ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001).

Com efeito, uma vez que alguns tecidos executam múltiplos papéis funcionais, é pouco provável que uma única matriz 3D sirva como uma base universal para a regeneração de vários tipos de tecido. Por isso, as considerações para o projeto desses suportes, tal como a escolha do material de composição, são complexas (WOODRUFF; HUTMACHER, 2008).

2.4 Métodos de fabricação de matrizes 3D

Nesta perspectiva, um considerável número de técnicas têm sido desenvolvidas ou adaptadas para processar materiais biodegradáveis e/ou bioreabsorvíveis, sintéticos ou naturais, incluindo: evaporação de solvente com adição e lixiviação de sal (*solvent casting – particulate leaching*), *gas foaming*, agregação de fibras ou partículas, liofilização pós congelamento, extrusão, prensagem e outras (FRANCOIS; DORCEMUS; NUKAVARAPU, 2015; RAGHAVENDRA; VARAPRASAD; JAYARAMUDU, 2015; RANA et al., 2015). Estas técnicas são descritas como métodos convencionais e, devido à relativa facilidade de acesso e manipulação, são comumente aplicadas. A principal limitação dessas tecnologias é realizar um controle

preciso sobre especificações essenciais das matrizes, tais como tamanho, forma, distribuição e interconectividade dos poros (RODRIGUES, 2012; KUMAR; KRUTH, 2010).

A manufatura aditiva, também nomeada de manufatura rápida, fabricação livre de sólidos, entre outras denominações, é uma expressão que designa um conjunto de tecnologias aditivas baseadas na construção, camada-a-camada, de estruturas tridimensionais físicas, a partir de seus respectivos modelos digitais (MARRO; BANDUKWALA; MAK, 2016; YAO et al., 2015; WOODRUFF; HUTMACHER, 2008). As técnicas de fabricação por manufatura aditiva permitem o projeto e fabricação de matrizes 3D com formato anatômico e microestrutural complexo, variando a arquitetura interna em diversos níveis. São, dessa forma, bastante exploradas atualmente nesse campo. No entanto, a maioria delas necessita de altas temperaturas de trabalho, o que inviabiliza a incorporação de biomoléculas.

Os diferentes tipos de técnicas englobadas pela manufatura aditiva incluem: modelagem por extrusão (*fused deposition modeling*, FDM), deposição por extrusão (*precision extrusion deposition*, PED), sinterização seletiva a laser (*selective laser sintering*, SLS), estereolitografia (*stereolithography*, STL), e impressão tridimensional (*3D printing*, 3DP) (CHIA; WU, 2015; YANG et al., 2014; BETTINGER; BORENSTEIN; R. LANGER, 2008; KARANDE; AGRAWAL, 2008).

Embora a técnica de SLS não tenha sido aplicada neste trabalho para a fabricação das matrizes 3D, havendo disponibilidade do equipamento, as partículas produzidas podem ser sinterizadas por este método. Por isso, uma breve abordagem especificamente sobre este processo foi acrescentada a esta revisão.

2.4.1 Sinterização Seletiva a Laser (SLS)

A Sinterização Seletiva a Laser (SLS) utiliza um feixe de laser de CO₂ focalizado, para sinterização de áreas de um pó levemente compactado. Neste método, uma camada fina de pó de um material é espalhada uniformemente sobre uma superfície plana através de um mecanismo de rolo, e o pó é então varrido por um feixe de laser de alta potência. O material em pó que é atingido pelo feixe de laser é fundido, ao passo que as outras áreas do pó permanecem dissociadas. Depois de concluída a camada, a plataforma de construção desce uma distância igual à espessura pré-determinada das camadas, repetindo se o processo. Sucessivas

camadas de pó são depositadas e varridas até que o produto seja completamente construído, e cada camada é sinterizada profundamente o suficiente para se ligar à camada precedente. O processo ocorre em atmosfera de nitrogênio, e os principais parâmetros de operação são: a velocidade de varredura (mm/s), a intensidade do feixe (W), a temperatura do leito (°C) e a espessura das camadas a serem construídas (MARRO; BANDUKWALA; MAK, 2016; GANERIWALA; ZOHDI, 2014; VAN BAEL et al., 2013; XIA et al., 2013).

É reportado que a faixa de diâmetro de partículas mais adequada para este procedimento é de 10-150 μm , e que estas apresentem boa fluidez, para que possam ser uniformemente sinterizadas. A morfologia dessas partículas deve, também, facilitar a retirada do pó não sinterizado (DU et al., 2015; DUAN et al., 2010).

Devido, principalmente, à capacidade de processamento de materiais variados, o processo de SLS é atualmente considerado uma alternativa às técnicas de fabricação convencionais, utilizado para materiais cerâmicos, metálicos ou poliméricos, ou para combinações entre eles (MARRO; BANDUKWALA; MAK, 2016; CHIA; WU, 2015).

2.4.2 Agregação de partículas por aquecimento a baixas temperaturas

O desenvolvimento de matrizes 3D estruturadas por partículas tem sido reportado como uma alternativa viável e vantajosa por permitir: a formação de arquiteturas porosas complexas; a combinação de materiais de naturezas diversas, sejam esses naturais ou sintéticos; a funcionalização utilizando tratamentos superficiais e/ou a incorporação de moléculas bioativas; o processamento por métodos convencionais e/ou avançados. Nesse processo, primeiramente, são produzidas partículas, que podem ser tanto de formato esférico quanto irregulares (macro ou micrométricas), densas ou porosas. Posteriormente, estas são submetidas a processos de ligação via interações físicas e/ou químicas (HOSSAIN; PATEL; AHMED, 2015; WANG et al., 2013; DHANDAYUTHAPANI et al., 2011; KHAN; KATTI; LAURENCIN, 2004).

A agregação de partículas pode ser realizada por: sinterização a altas temperaturas (EOSOLY et al., 2010a; ZHOU et al., 2010), tecnologia de gás supercrítico (BHAMIDIPATI et al., 2013), sistemas solvente/não solvente (BROWN; NAIR; LAURENCIN, 2008), reticulação (VAN TOMME et al., 2008), agentes

aglutinantes (FIDELES, 2014) e aquecimento a baixas temperaturas (LUCIANI et al., 2008; BORDEN et al., 2003). A exemplo, Lu et al. (2003) produziram matrizes porosas pelo aquecimento a baixas temperaturas de microesferas de poli(lactido-co-glicolido)/45S5 BG (vidro bioativo), Duan et al. (2010) desenvolveram matrizes 3D via SLS a partir de microesferas de fosfato de cálcio/poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) e HA carbonatada/poli(ácido láctico), e Zhou, Wang e Cheung (2011) fabricaram matrizes porosas via SLS utilizando microesferas de poli(L-láctido)/HA carbonatada, com a obtenção de microestruturas mais homogêneas.

O processo de aquecimento a baixas temperaturas, direcionado a materiais compostos por uma matriz polimérica, tem como base a aplicação de temperaturas próximas à T_m do material, possibilitando a mobilidade parcial de suas cadeias e a fusão e agregação das partículas utilizadas, sem fundí-las completamente ou degradá-las. Assim, são criadas pontes entre as partículas, que resultam em uma arquitetura tridimensional porosa. As principais variáveis e fatores a serem considerados neste processo são: o tipo de molde utilizado (geralmente de aço inoxidável), a fonte de calor, a temperatura e tempo de aquecimento e a intensidade e tempo da pressão aplicada ao molde, quando existir (CAI et al., 2013; REZWAN et al., 2006; LU et al., 2003; BORDEN; ATTAWIA; LAURENCIN, 2002).

Analisando-se as abordagens descritas na literatura sobre esse método, pode-se inferir que ainda permanecem lacunas no que diz respeito à precisão da temperatura aplicada e ao tempo de exposição ao calor. Ainda que a morfologia das partículas possa ser controlada em processos anteriores, possibilidades de predição da faixa de tamanho de poros gerada na arquitetura final das matrizes podem ser melhor exploradas. Assim, a relativa simplicidade de execução e baixo custo associados a este método, podem estar também aliados a uma boa reprodutibilidade.

2.4.3 Obtenção de esferas por emulsão com evaporação do solvente

Conforme já mencionado, as partículas utilizadas para a estruturação de matrizes 3D podem apresentar uma morfologia esférica, densa ou porosa. Na última década, maior enfoque tem sido direcionado às esferas, especialmente às microesferas, compreendidas entre 1-1000 μm , devido à sua aplicação potencial como carreadoras de agentes bioativos, seja quando utilizadas como produtos autônomos ou agregados. As principais vantagens associadas ao uso de microesferas como

dispositivos biomédicos são: boa fluidez resultante da uniformidade na morfologia (tamanho, forma), que facilitam a sua mobilidade e arranjo nos locais de tratamento *in vivo* ou *in vitro*, ou de subsequente processamento; maior área superficial, permitindo suficiente incorporação e entrega de moléculas terapêuticas; versatilidade na produção de formas densas, ocas, porosas ou com canais, que permitem o encapsulamento de mais componentes. Esferas apresentando porosidade exibem maior área superficial, melhor capacidade de adesão e proliferação celular, melhor adsorção e cinética de liberação de fármacos em comparação com esferas densas (HOSSAIN; PATEL; AHMED, 2015; CAI et al., 2013; SAHIL et al., 2011; SANGWAN; JALWAL; SAVITA, 2011; SINHA et al., 2004).

Em se tratando de polímeros ou de compósitos polímero/cerâmica, a preparação de microesferas pode ser realizada, principalmente, pelos seguintes métodos: a polimerização de monômeros dispersos em meio aquoso ou oleoso, utilizando técnicas de emulsão, suspensão ou precipitação (CAI et al., 2013; FREIBERG; ZHU, 2004); secagem por atomização (*spray drying*) associada à técnica eletrofiação e/ou de liofilização pós congelamento (CHEOW *et al.*, 2011; VASIR; TAMBWEKAR; GARG, 2003); gelificação ionotrópica (FIDELES, 2014); emulsificação da solução polimérica com evaporação do solvente (TULI et al., 2012; QIU et al., 2007).

Emulsões são sistemas coloidais contendo dois ou mais líquidos imiscíveis. Estas geralmente contêm um ou mais agentes de ativação interfacial (ou agentes estabilizantes) que têm a função de diminuir a tensão interfacial entre as fases, facilitando assim a formação homogênea e estável de gotículas. Emulsões podem ser classificadas em dois grupos: simples e múltiplas. As emulsões simples podem ser divididas em dois tipos, água em óleo (A/O) e óleo em água (O/A). Emulsões múltiplas consistem em sistemas mais complexos, nos quais as fases O/A ou A/O são inicialmente dispersas e, em seguida, novamente dispersas na fase inicial do sistema, resultando em emulsionamentos O/A/O ou A/O/A (Figura 2). Neste trabalho, o processo de emulsão simples O/A com evaporação do solvente foi escolhido pela relativa facilidade de execução, já que é almejada a produção de material em maiores escalas. Esse método consiste na dissolução e/ou dispersão dos materiais de partida em solventes voláteis (fase oleosa ou dispersa) que, posteriormente, são dispersos em outro solvente (fase aquosa ou contínua), o qual não é miscível com o anterior. A completa evaporação do solvente inicial conduz à formação de partículas, geralmente

esféricas. À fase oleosa inicial podem ser adicionadas partículas sólidas, resultando em emulsões sólido/óleo/água (S/O/A) (CHEVALIER; BOLZINGER, 2013; HU et al., 2013; KUNDU et al., 2013; BOUYER et al., 2012; PAL, 2011).

Os principais parâmetros de trabalho atribuídos a esse método são: a concentração da solução polimérica (fase oleosa), o tipo de solvente orgânico, a proporção em volume entre as fases óleo e água, o tipo e concentração do agente estabilizante utilizado na fase aquosa, e a velocidade de emulsificação das duas fases (fluxo de gotejamento e agitação mecânica). Acrescenta-se, o controle das condições de temperatura e pressão, e o conteúdo de partículas sólidas adicionadas, quando existir. Assim, é possível controlar a morfologia do material produzido (BOLOURTCHIAN; KARIMI; ABOOFAZELI, 2005).

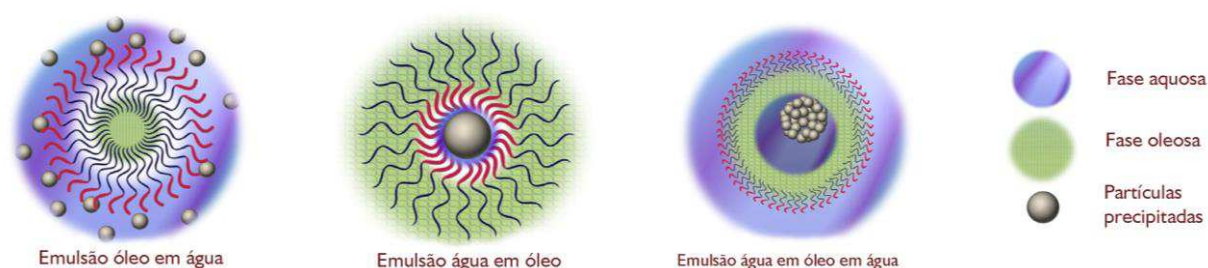


Figura 2 – Esquemas de representação da formação de esferas pelos métodos de emulsão com evaporação do solvente O/A, A/O e A/O/A (Adaptado de Sadat-Shojai et al. (2013)).

2.5 Policaprolactona

Os polímeros têm sido amplamente utilizados como biomateriais para a fabricação de dispositivos médicos, sendo que os polímeros sintéticos representam a maioria dos biomateriais desenvolvidos. Apresentam propriedades químicas, físicas e de degradação previsíveis e reprodutíveis, que podem ser modificadas para satisfazer as necessidades específicas de diferentes aplicações, o que representa maior flexibilidade de processamento. Entre os polímeros sintéticos mais utilizados nessa área estão os poli α -hidroxiácidos, policarbonatos, poliuretanos e poliésteres. O poliéster alifático policaprolactona é o foco de estudo desta pesquisa (MARTINS, 2011; PUPPI et al., 2010; CHUNG; BURDICK, 2008; SHI, 2006).

A Poli (ϵ -caprolactona), consiste em um poliéster alifático linear semi-cristalino, pertencente à família dos poli (ω -hidroxi-ésteres). Pode ser preparado a partir do monômero ϵ -caprolactona, um éster cíclico, por abertura do anel utilizando,

principalmente, catalizadores aniônicos ou catiônicos; ou por polimerização por abertura de anel via radical livre do 2-metileno-1-3-dioxepano. Sua cristalinidade é inversamente proporcional ao valor do seu peso molecular (normalmente entre 1.000 e 100.000 g/mol) (REZAEI; MOHAMMADI, 2012; WOODRUFF; HUTMACHER, 2010b; HUTMACHER; LAM, 2008; KOLESKE, 1978).

A PCL apresenta várias propriedades intrínsecas não encontradas em outros poliésteres alifáticos, tais como: baixa temperatura de transição vítrea (T_g de $-60\text{ }^\circ\text{C}$), baixa temperatura de fusão (T_m que pode variar de $45\text{ }^\circ\text{C}$ a $64\text{ }^\circ\text{C}$) e uma estabilidade térmica elevada, com temperaturas de decomposição de $\sim 350\text{ }^\circ\text{C}$. A sua estrutura molecular possui uma unidade de repetição com cinco grupos não-polares de metileno (CH_2) e um único grupo éster relativamente polar (Figura 3) (MARTINS, 2011; TAY et al., 2007; YOON; FISHER, 2007).

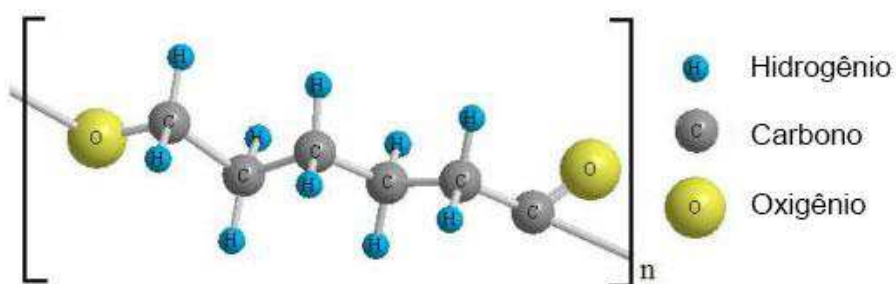


Figura 3 – Estrutura química em 3D da PCL (MARTINS, 2011).

Este polímero pode ser diluído em solventes como o clorofórmio, cloreto de metileno, diclorometano, benzeno, tolueno, ciclohexano e 2-nitropropano à temperatura ambiente. Tem solubilidade mais baixa em acetona, 2-butanona, etilacetato, dimetilformamida, acetonitrila e ácido acético, sendo insolúvel em álcool (VAN DER SCHUEREN et al., 2011; BORDES et al., 2010; WOODRUFF; HUTMACHER, 2010b; YOON; FISHER, 2007).

O processamento ao qual seja submetido um polímero envolve variações na sua energia interna, ao longo da cadeia polimérica, que levam a diferentes estados térmicos e termodinâmicos. Nesse contexto, duas grandezas importantes para os polímeros são, a temperatura de fusão cristalina (T_f) e a temperatura de transição vítrea (T_g). No caso dos polímeros semicristalinos como o PCL, sua estrutura apresenta regiões amorfas e regiões cristalinas. Até a T_f , somente as regiões cristalinas permanecem sem movimento; nas proximidade da T_f e a partir dela, as

ligações que formam a estrutura cristalina do material são afetadas, e este se funde (MANRICH, 2005; STEVENS, 1999).

A baixa temperatura de transição vítrea (T_g) da PCL caracteriza a alta mobilidade de sua fase amorfa à temperatura corporal e determina sua utilização como plastificante na formação de blends (ALBINI, 2012). Esta característica associada à sua estabilidade térmica elevada, que determina a processabilidade do polímero em temperaturas superiores à de fusão sem que haja perda significativa de peso molecular, o torna um dos polímeros com aplicação na área biomédica mais versáteis quanto ao processamento (DASH; KONKIMALLA, 2012; FABBRI et al., 2010; HUTMACHER; LAM, 2008). Produtos podem ser fabricados com esse material utilizando, principalmente, as técnicas de injeção, extrusão e compressão de polímeros, micro e nano emulsões, eletrofiiação, secagem por atomização e métodos de manufatura aditiva. São produzidas nano e micropartículas, estruturas tridimensionais densas ou porosas, nano e micro fibras, filmes ou membranas (ABEDALWAFa et al., 2013; WOODRUFF; HUTMACHER, 2010). Algumas dessas estruturas podem ser visualizadas na Figura 4.

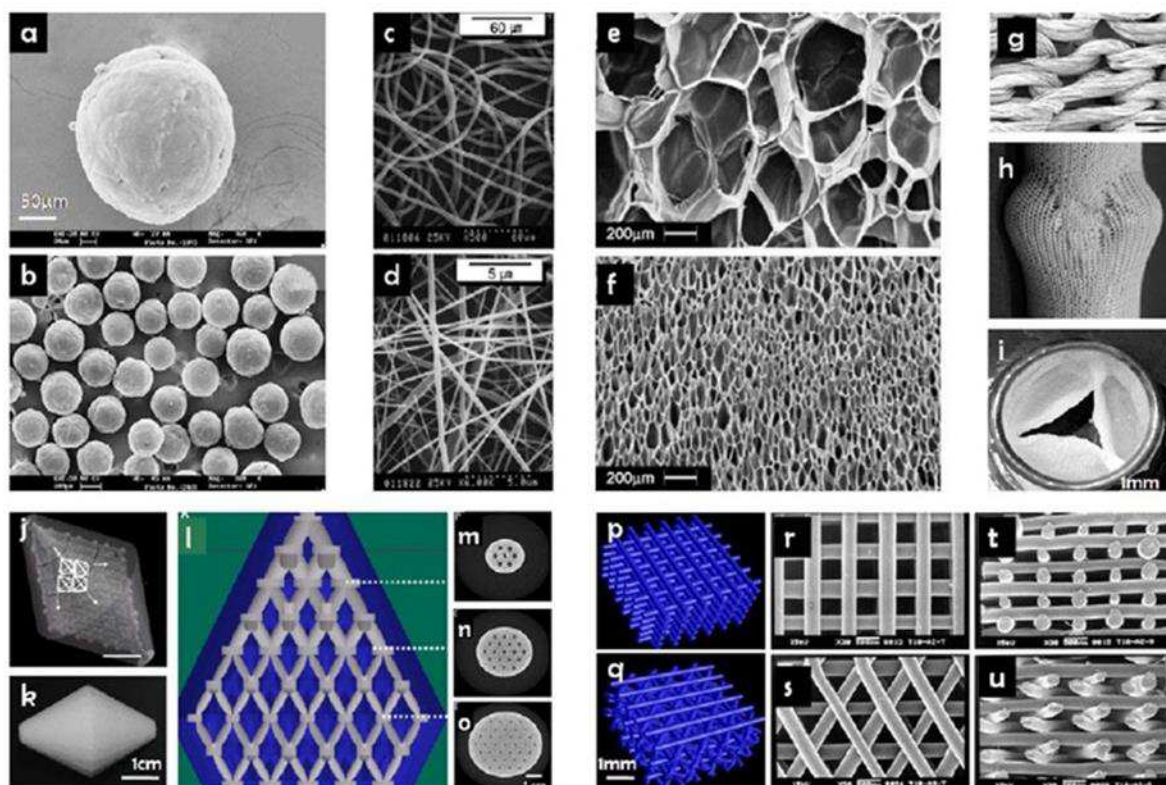


Figura 4— Produtos fabricados a partir do PCL: nanoesferas (a,b); nanofibras (c,d); espumas tridimensionais porosas (e,f); malhas têxteis (g,h,i); scaffolds por sinterização seletiva a laser (j-o); scaffolds por modelagem por extrusão (p-u) (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010a).

Sob o aspecto de sua biodegradação, a PCL pode degradar em períodos que podem durar desde semanas a meses, sendo esta afetada pelo seu peso molecular, cristalinidade, meio ambiente e temperatura. Este material pode ser degradado por organismos vivos como bactérias e fungos presentes no meio ambiente. Em se tratando do interior do corpo de humanos e animais, essa biodegradação ocorre em tempo diferenciado, devido à ausência de enzimas adequadas, ocorrendo por hidrólise e clivagem das suas ligações ésteres (HUNG, 2011).

Woodruff e Hutmacher (2010), Sun et al. (2006) e Goldberg (1995), investigaram a degradação *in vivo* da PCL em diferentes pesos moleculares por três anos e observaram modificações na estrutura do material após 2 anos para o peso molecular de 66.000 g/mol. Chen, Bei e Wang (2000) estudaram a biodegradação de microesferas e filmes de PCL, com e sem lipase. Nesse caso, não foram observadas diferenças na biodegradação com a mudança de forma do PCL, porém a presença da enzima provocou modificações no material em 9 semanas. You et al. (2005) fizeram um estudo de biodegradação comparando nanofibras de ácido poli-láctido (PLA), ácido poli-glicólido (PGA) e ácido poli(láctido-co-glicólido) (PLGA), que apresentaram alteração de estrutura em 4 semanas na ordem PGA>PLGA>>PLA. Esses resultados em comparação com outros estudos (GUNATILLAKE; ADHIKARI, 2003; HOLLAND; TIGHE, 1992) indicam a taxa de degradação do homopolímero PCL como a mais lenta entre os poliésteres alifáticos (2-4 anos), que ocorre de forma homogênea em toda a superfície do material, tornando-o adequado como carreador de fármacos a longo prazo e com previsibilidade do processo.

Quanto à sua biocompatibilidade, atualmente o PCL é um material aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso como dispositivo para liberação controlada de drogas (*Capronor*) e como suturas (*Ethicon: Monocryl[®] Suture*), o que sugere seu potencial para aplicação biomédica. De acordo com o estudo de Woodward et al. (1985), fragmentos de PCL de peso molecular de até 3000 g/mol são completamente reabsorvidos e degradados por mecanismo intracelular, sendo este considerado como um polímero bioreabsorvível. Neste estudo, o único metabólito encontrado foi o ácido 6-hidroxicapróico. Além disso, segundo Woodruff e Hutmacher (2010), o PCL apresenta baixa capacidade de gerar um meio ácido no local de implantação quando comparado ao PLA e PGA.

Com a expansão da Engenharia Tecidual, esse polímero vem sendo investigado no que diz respeito à sua implantação *in vivo* para reconstrução e/ou

regeneração, sobretudo, de tecido ósseo, cartilaginoso e epitelial (ABEDALWAFa et al., 2013). Os resultados encontrados apontam o PCL como material aplicável, porém esses resultados são potencializados com a utilização do PCL em combinação a outros polímeros sintéticos ou naturais, a materiais cerâmicos, e a medicamentos (DASH; KONKIMALLA, 2012; FU et al., 2012a; CIARDELLI et al., 2005).

Dessa forma, o policaprolactona é utilizado geralmente como uma matriz polimérica em compósitos com fase inorgânica, como por exemplo, com as cerâmicas de fosfato de cálcio, para formação de copolímeros e blendas, e como dispositivos para administração controlada de medicamentos (REZAEI; MOHAMMADI, 2013; BRETCANU; CHEN; BOCCACCINI, 2008).

2.5.1 Microesferas de Policaprolactona

Microesferas de PCL são aplicadas para fins diversos dentro do campo dos biomateriais, seja para a administração controlada de fármacos, por injeção ou ingestão das partículas, seja para estruturação de matrizes 3D. Destaca-se a importância do uso de microesferas para o encapsulamento de drogas, tais como ácidos nucleicos e proteínas, protegendo-as de rápida destruição pelo corpo, assim como para administração controlada de vacinas (HOSSAIN; PATEL; AHMED, 2015). Nesse contexto, Tuli et al. (2012), estudaram o processamento de microesferas de PCL utilizadas para liberação de drogas com aplicações em doenças pulmonares, quanto à influência do tamanho de partícula na dispersão de sulfato de salbutamol para formulação de inalações de pó seco. Kemala, Budianto e Soegiyono (2012), investigaram a influência das variáveis de preparação de microesferas obtidas de blendas de PLA/PCL, para utilização como carreadoras de fármacos. Bolourtchian, Karimi e Aboofazeli (2005), estudaram a obtenção de microesferas de EUDRAGIT®RS para liberação de ibuprofeno. Wang e Guo (2008), prepararam microesferas de PCL com incorporação de disódio norcantaridato, por dupla emulsão com evaporação do solvente, avaliando a influência da adição de NaCl no processamento. Recentemente, micropartículas, em especial, microesferas, produzidas a partir de polímeros sintéticos biodegradáveis a longo prazo têm sido utilizadas como carreadores de fármacos. São reportadas melhorias no efeito terapêutico, prolongando a atividade biológica pelo controle da taxa de liberação de fármaco, com diminuição da frequência de administração (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

2.5.2 Matrizes 3D de Policaprolactona

A versatilidade de processamento do PCL, com propriedades reológicas favoráveis à manipulação por diversas técnicas, sejam elas convencionais ou avançadas, tem permitido o desenvolvimento diversificado de dispositivos no campo da engenharia tecidual. Tay et al.(2007), investigaram o processamento de matrizes 3D de PCL utilizando impressão 3D associada à lixiviação de partículas, obtendo estruturas de alta porosidade. Atualmente, a maior parte das matrizes 3D de PCL são produzidas por técnicas de manufatura aditiva. Williams et al. (2005), e Eshraghi e Das (2012), produziram e avaliaram suportes porosos obtidos por SLS, ressaltando a relevância da interferência computacional no processo de produção desses dispositivos. Também Van bael et al. (2013), produziram matrizes utilizando essa técnica e avaliaram a performance *in vitro* após a funcionalização com tratamento de superfície por plasma, comparado ao recobrimento com proteína. Os resultados foram desfavoráveis para o plasma aplicado. Luciani et al. (2008), desenvolveu microesferas de PCL funcionalizadas com proteínas e produziu matrizes 3D estruturadas com essas partículas, que permitiu o controle da arquitetura do material, além da incorporação de moléculas bioativas.

2.6 Hidroxiapatita

Os ossos e dentes presentes em todos os vertebrados são materiais compósitos naturais, formados por aproximadamente 65 % de massa inorgânica, onde é identificada a presença de uma fase apatítica com estrutura cristalográfica e composição química próxima à hidroxiapatita, cerâmica pertencente à família dos fosfatos de cálcio. Na composição restante é encontrada a matéria orgânica, em sua maioria colágeno, e água. Os cristais de hidroxiapatita presentes nesses tecidos estão dispersos na matriz orgânica, apresentam entre 4 % e 8 % de carbonato, e medem, em média, 20-50 nm de comprimento, 15-30 nm de largura, com espessura de 1,4 a 5 nm (Figura 1) (GÓMEZ-MORALES et al., 2013; SADAT-SHOJAI et al., 2013; VALLET-REGÍ; GONZÁLEZ-CALBET, 2004). Sua composição química pode variar dependendo do tipo de tecido calcificado, da sua localização e do tempo de duração nesse tecido (RAMIREZ, 2010).

Na família dos fosfatos de cálcio, os principais parâmetros que os diferenciam são a razão molar cálcio/fósforo (Ca/P) e a solubilidade. A razão Ca/P pode variar entre 0,5 e 2 sendo que, quanto menor o valor dessa razão, mais solúvel é o material na água. A Tabela 1 relaciona esses parâmetros com os fosfatos de cálcio mais utilizados (CARVALHO, 2012; ZHOU; LEE, 2011; FONTES, 2010).

Tabela 1 – Principais fosfatos de cálcio e suas propriedades (OKADA; FURUZONO, 2012).

Razão molar Ca/P	Fórmula Química	Nome	Abreviação	Solubilidade (H ₂ O a 25°C, g/L)
0.5	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ .H ₂ O	Fosfato Monocálcico Monohidratado	MCPM	~18
0.5	Ca(H ₂ PO ₄) ₂	Fosfato Monocálcico Anidro	MCPA	~17
1.0	CaHPO ₄ .2H ₂ O	Fosfato Dicálcico Dihidratado (Brushita)	DCPD	~0.088
1.0	CaHPO ₄	Fosfato Dicálcico Anidro (Monetita)	DCPA	~0.0048
1.2-2.2	Ca _x H _y (PO ₄) _z .nH ₂ O (n = 3-4.5)	Fosfato de Cálcio Amorfo	ACP	(a)
1.33	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ .5H ₂ O	Fosfato Octacálcio	OCP	~0.0081
1.5	α-Ca ₃ (PO ₄) ₂	α-Fosfato Tricálcico	α-TCP	~0.0025
1.5	β-Ca ₃ (PO ₄) ₂	β-Fosfato Tricálcico	β-TCP	~0.0005
1.5-1.67	Ca _{10-x} (HPO ₄) _x (PO ₄) _{6-x} (OH) ₂ (0 < x < 1)	Hidroxiapatita Deficiente em Cálcio	CDHA	~0.0094
1.67	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	Hidroxiapatita	HA	~0.0003
2.0	Ca ₄ (PO ₄) ₂ ^o	Fosfato Tetracálcico	TTCP	~0.0007

(a) Não pode ser medido precisamente.

Apatita é um termo geral aplicado para os materiais cristalinos que podem ser representados pela fórmula M₁₀(ZO₄)₆X₂, na qual cada componente (M, ZO₄ e X) pode ser substituído por diferentes íons. Na hidroxiapatita, M, ZO₄ e X são Ca²⁺, PO₄³⁻ e OH⁻, respectivamente. A apatita biológica consiste em uma hidroxiapatita não estequiométrica deficiente em cálcio contendo íons de substituição que incluem cátions (como Mg²⁺, Na⁺ e K⁺) e ânions (como CO₃²⁻, Cl⁻ e F⁻). A substituição mais comum é o carbonato (CO₃²⁻), nos grupos OH⁻ e PO₄³⁻ (OKADA; FURUZONO, 2012).

A hidroxiapatita pode ser sintetizada por variados tipos de reações utilizando precursores de cálcio e fósforo, que incluem, em sua maioria, métodos a seco (reações em estado sólido, processos mecanoquímicos e plasma-*spray*) e em meios úmidos (precipitação química, conversão hidrotérmica, método sol-gel e microemulsão). As reações a seco requerem a aplicação de temperaturas relativamente elevadas (acima de 700 °C), e geralmente resultam em material estequiométrico e bem cristalizado. Os métodos via úmida podem ser realizados sob baixas temperaturas e resultam mais facilmente em partículas nanométricas, porém

geralmente de baixa cristalinidade e razão Ca/P baixa. A partir desses métodos podem ser obtidas partículas nanométricas de morfologia variada, exemplificadas na Figura 5 (GÓMEZ-MORALES et al., 2013; OKADA; FURUZONO, 2012; REZAEI; MOHAMMADI, 2012; FATHI; HANIFI, 2007).

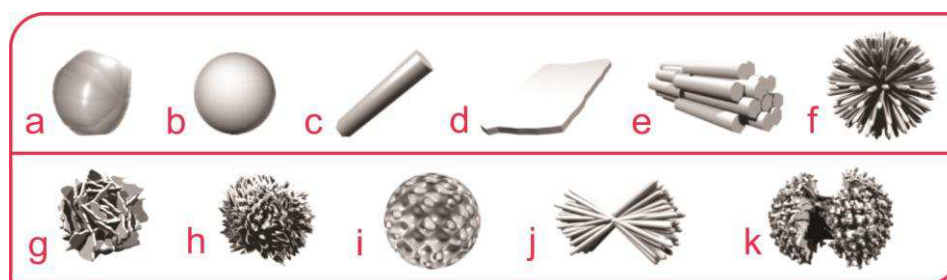


Figura 5 – Possíveis nanoestruturas da hidroxiapatita: a) irregular; b) esférica; c) haste ou agulha; d) placa ou floco; e) bastões auto-organizados; f) feixe de fibras ou flor; g) aglomerados de placas ou flocos; h) flor; i) microesfera porosa ou esfera mesoporosa; j) laço ou bastões auto-organizados; k) haltere (SADAT-SHOJAI et al., 2013).

Dentre os métodos via úmida utilizados, o processo de precipitação é bastante explorado devido à sua simplicidade para execução e consequente reprodutibilidade, além de possibilitar a síntese de grandes quantidades do material. Nesse método, a mistura entre soluções aquosas contendo cálcio e fósforo, a um pH maior que 7, resulta em soluções supersaturadas que induzem a rápida precipitação de nanopartículas, de morfologia controlável (OKADA; FURUZONO, 2012; WANG et al., 2010).

De acordo com Sudarsanan e Young (1969), a estrutura cristalina da HA sintética tem simetria hexagonal, descrita pelo grupo espacial P63/m, com parâmetros de rede $a = b = 9,424 \text{ \AA}$ e $c = 6,879 \text{ \AA}$. Conforme descrito por Ramirez (2010), a HA pode ser representada como $\text{Ca(I)}_4^{2+}\text{Ca(II)}_6^{2+}[\text{PO(I)O(II)O(III)}_2]_6^{3-}(\text{OH})_2$; onde quatro cálcios alinham-se ao longo do eixo c , conhecido como canal I, e seis ficam dispostos formando dois triângulos perpendiculares ao eixo c em $1/4$ e $3/4$, e cuja projeção no plano ab formam figuras hexagonais, definindo um espaço cristalográfico conhecido como canal II, onde localizam-se as hidroxilas (Figura 6).

Além da similaridade que a hidroxiapatita sintética apresenta com a fase inorgânica encontrada no tecido ósseo, sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e, principalmente, bioatividade, tem levado à ampla utilização como biomaterial para fins de substituição e regeneração desse tecido (ZHOU; LEE, 2011; HUTMACHER et al., 2007). Quando implantada em sistemas *in vivo*, a atividade celular provoca a

dissolução parcial da HA, havendo liberação dos íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} e aumento da saturação nos fluidos biológicos, que conduz à precipitação de apatitas carbonatadas. Estas, por sua vez, localizadas na superfície do implante, facilitam a adesão de proteínas e contribuem para a adesão, proliferação e diferenciação de células osteogênicas.

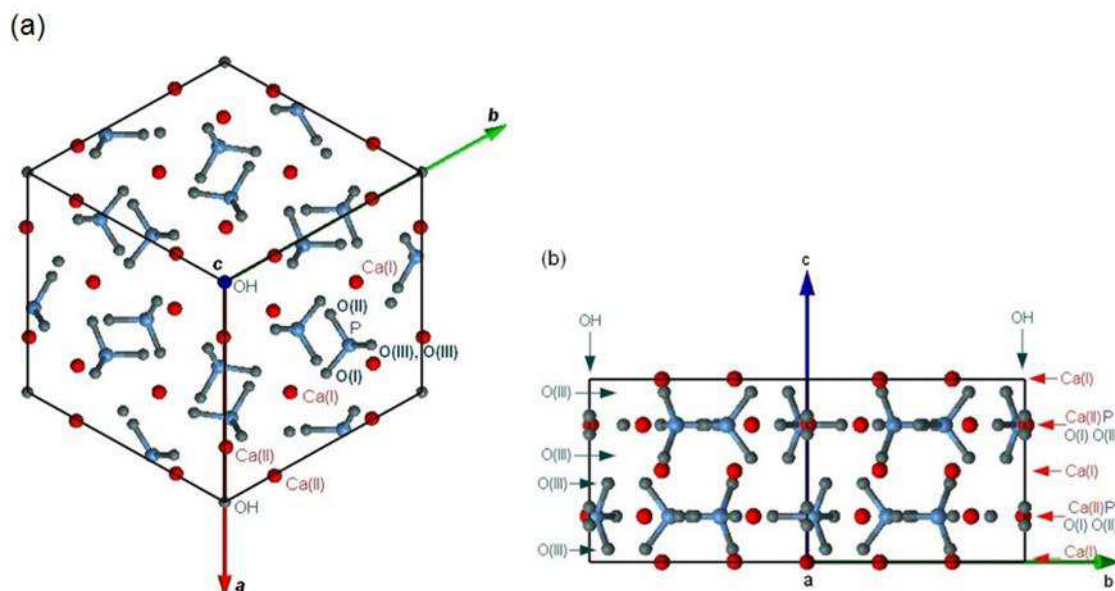


Figura 6 – (a) Célula unitária da HA vista ao longo da direção [001], apresentando o posicionamento dos elementos químicos; (b) Célula unitária da HA vista ao longo da direção [100] (RAMIREZ, 2010).

Assim, o tecido ósseo recém formado é capaz de ligar-se ao material implantado. Esse mecanismo, também associado à capacidade de adsorção da HA, determina a capacidade osteocondutora/osteointutora desse material, que favorece o crescimento ósseo no sentido de sua localização (PEDROSA, 2011; CARRODEGUAS, 2000; CHRISTOFFERSEN et al., 1997; LEGEROS, 1993).

No entanto, quando comparada às demais fases de fosfato de cálcio citadas na Tabela 1, apresenta taxa de degradação lenta, já que esta propriedade está diretamente ligada à solubilidade da cerâmica, sendo esta considerada como bioestável (CARRODEGUAS, 2000; LEGEROS, 1993). Assim, a taxa de degradação da HA estequiométrica geralmente não coincide com a taxa de remodelagem do tecido ósseo, causando conflitos no processo de reparo. Por isso, a HA com substituições, especialmente a deficiente em cálcio, por apresentar maior reatividade, tem tomado destaque (MATESANZ et al., 2015; ZHANG; ZHANG, 2011; GUO et al., 2009; KHAN; KATTI; LAURENCIN, 2004).

A ênfase dada ao estudo da HA nanométrica, principalmente desde a década de 90, tem base nas vantagens decorrentes do aumento da área superficial do material que, de acordo com os resultados de Wang et al. (2010), Cai et al. (2007), Balasundaram, Sato, Webster (2006) e Webster et al. (2001), favorecem o processo de formação de novo tecido ósseo. Quando utilizada enquanto produto autônomo, a HA apresenta limitações quanto à modelagem em formas e estruturas específicas e fragilidade, que dificultam o seu emprego como matrizes 3D (ZHANG et al., 2014). Logo, dentre as potenciais aplicações das nanopartículas de HA, tais como suportes para liberação de medicamentos, proteínas e genes, seu principal emprego tem sido como material de preenchimento e/ou recobrimento em nanocompósitos. Pesquisas realizadas com essa abordagem estão descritas no tópico 2.7 e a Figura 7 apresenta possíveis nanoestruturas aplicáveis à regeneração óssea (OKADA; FURUZONO, 2012; ROOHANI-ESFAHANI et al., 2010; MOTSKIN et al., 2009; MISTRY; SHI; MIKOS, 2006).

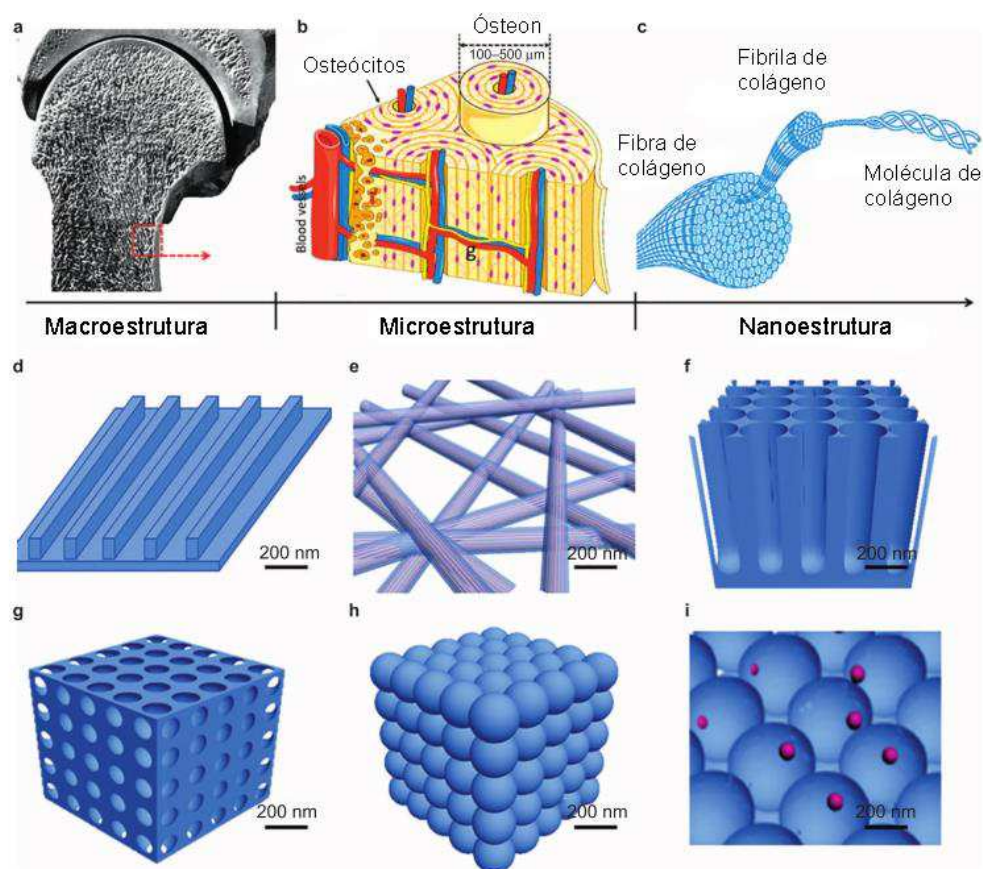


Figura 7 – Micro e nanoestrutura de osso típico e possíveis nanoestruturas de materiais utilizados para regeneração óssea. (a) estrutura macroscópica do osso, (b) Ósteon ou canais de Havers, (c) fibras de colágeno, (d) canais nanométricos (e) nanofibras, (f) nanotubos, (g) nanoporos, (h) nanoesferas, (i) nanocompósitos (Adaptado de Gong et al. (2015)).

2.7 Matrizes 3D de Policaprolactona/Hidroxiapatita

Do ponto de vista biológico, a combinação entre polímeros e cerâmicas para a fabricação de matrizes 3D na perspectiva da regeneração óssea, é uma estratégia natural, já que o osso nativo consiste na combinação entre um polímero natural e uma apatita biológica. Do ponto de vista da ciência dos materiais, um único material pode não fornecer todas as propriedades necessárias para uma aplicação particular. Neste caso, os materiais compósitos, projetados para combinar as vantagens de ambos os componentes, podem ser mais apropriados (KUMAR; KRUTH, 2010; BRETCANU; CHEN; BOCCACCINI, 2008; MISTRY; SHI; MIKOS, 2006).

Com base nas propriedades intrínsecas da PCL e da HA, previamente explanadas, faz-se relevante, tanto para a área acadêmica quanto para a industrial, a investigação de compósitos PCL/HA. Especificamente, a versatilidade de processamento da PCL e suas propriedades mecânicas, aliadas à bioatividade e osteocondutividade da HA, viabilizam a aplicação desses compósitos como matrizes 3D e o seu processamento em variadas formas. Também, as propriedades de adsorção e biodegradabilidade do compósito final podem ser balanceadas conforme as proporções matriz/reforço estudadas. Para este compósito, o maior desafio encontrado está na baixa interação entre a matriz polimérica e as partículas de HA, em consequência das diferentes naturezas químicas e energia superficial desses componentes. Além disso, a HA e, especialmente, as nHA, apresentam uma forte tendência para formar aglomerados, o que dificulta a obtenção de nanocompósitos com alto grau de dispersão de partículas (ZHANG et al., 2014; LEUNG; NAGUIB, 2013; LIUYUN et al., 2012; FABBRI et al., 2010; GUARINO et al., 2008; AZEVEDO; REIS, 2003).

Estratégias para a otimização da interface entre esses materiais, que permitam uma melhor interação física e química entre as fases orgânica/inorgânica, têm sido alvo de inúmeras investigações. Atualmente, métodos livres do uso de surfactantes são buscados, evitando assim a toxicidade proveniente da maioria desses agentes (FUJII et al., 2012). São encontrados estudos baseados principalmente na: precipitação da HA *in situ* na solução polimérica (REZAEI; MOHAMMADI, 2013; FABBRI et al., 2010); adição da HA à solução polimérica utilizando vibração ultrassônica ou agitação magnética (DU et al., 2015; ZHANG et al., 2014; FU et al., 2012b); mistura em estado fundido (XU et al., 2014; PARK; LEE; KIM,

2011); e mistura a seco (XU et al., 2014; EOSOLY et al., 2010b). Respectivamente a esses métodos estão associadas as seguintes limitações: dificuldade no controle da morfologia das partículas de HA, rápida sedimentação da HA, aglomeração da HA, e baixa interação e heterogeneidade na mistura final.

Nesse contexto, estratégias para a modificação superficial da HA vêm sendo abordadas, que envolvem: enxerto (*grafting*) com polímeros, adsorção de íons ou moléculas, dissolução/re-precipitação, encapsulamento, reações de superfície e/ou combinações entre esses métodos (LIUYUN et al., 2012; LI; WENG, 2008; BORUM-NICHOLAS; WILSON JR., 2003). Dentre elas, a utilização de um agente de acoplamento, o ácido esteárico (AE), pode aumentar a estabilidade coloidal das nHA em solventes não aquosos e melhorar a interação com poliésteres. O ácido esteárico é um ácido graxo saturado, que não apresenta toxicidade, amplamente utilizado no processamento de biomateriais (BERNHARDT et al., 2013; ZHANG et al., 2012, ZHANG et al., 2004). Também foi demonstrado que a presença do AE não interfere significativamente na bioatividade das nHA (LI; WENG, 2008). É importante que a modificação das nHA não altere substancialmente as propriedades físico-químicas e biológicas do material.

Buscando produzir compósitos de PCL/nHA com interface melhorada, distribuição homogênea das nHA na matriz polimérica (interna e externamente) e ao longo da matriz 3D, e mínimo desperdício de material durante o processamento, optou-se neste trabalho pela produção de esferas de PCL/nHA. A morfologia dessas partículas pode ser finamente controlada aplicando-se o método de emulsão com evaporação do solvente, conforme descrito no tópico 2.3.3. Micro e nanoestruturas específicas podem contribuir para a reparação tecidual a longo prazo, considerando-se que as nHA encapsuladas nas partículas podem ser liberadas gradualmente conforme a degradação do PCL (GONÇALVES et al., 2015).

Na pesquisa de Eosoly et al. (2010), matrizes 3D de PCL/HA com 15 % (m/t) e 30 % (m/t) de HA foram fabricadas por Sinterização Seletiva a Laser (SLS). Wiria et al. (2007) e Eshraghi e Das (2012) fabricaram matrizes de PCL/HA via SLS com a adição de 10 % (m/t), 20 % (m/t) e 30 % (m/t) de HA. Os resultados de Eosoly et al. (2012) e Wiria et al. (2007) indicaram a influência positiva da adição da HA na capacidade bioativa das matrizes, enquanto Eosoly et al. (2012) e Eshraghi e Das (2012) obtiveram aumento da resistência à compressão conforme aumento de conteúdo da HA. Nesses estudos, os compósitos sinterizados foram obtidos por meio

de mistura a seco desses materiais, a partir de partículas de morfologia heterogênea. Na literatura, são encontrados resultados favoráveis quanto ao aumento da resistência à compressão até limites de conteúdo de HA de ~50 % (m/m) no compósito (GUARINO et al., 2008). Porém, esse fator depende também diretamente do método de processamento aplicado.

No contexto da produção de esferas, Fujii et al. (2012), desenvolveram microesferas de PCL recobertas com nHA, utilizando as nHA como agente de estabilização do sistema de emulsão, processo nomeado de emulsão de *Pickering*, eliminando assim o uso de agentes surfactantes. Kim e Koh (2013), produziram compósitos de PCL/HA na forma de microesferas, com poros na forma de canais, resultado da combinação entre os métodos de emulsão óleo/água, congelamento e liofilização da emulsão. O estudo a respeito das microesferas é crescente, assim como da sua aplicação como estruturantes de matrizes 3D.

Quanto às propriedades biológicas apresentadas por matrizes 3D de PCL/HA, avaliadas *in vitro* e *in vivo*, têm sido encontrados resultados favoráveis quanto à capacidade bioativa dos dispositivos, conforme o aumento do conteúdo de HA. Além disso, esses são capazes de suportar o crescimento e a diferenciação osteogênica. No entanto, alguns resultados contraditórios são encontrados quanto à relação entre o conteúdo real de HA presente no material e o desenvolvimento celular. Isso é atribuído aos diferentes métodos de processamento, ao tipo celular e fonte de células avaliado, assim como aos diferentes protocolos de cultura celular. Portanto, permanece a necessidade de aprofundamento desses estudos (CHUENJITKUNTAWORN et al., 2015; GONÇALVES et al., 2015; ZHANG et al., 2014; RÓDENAS-ROCHINA; RIBELLES; LÉBOURG, 2013; XIA et al., 2013; FU et al., 2012).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local da pesquisa

A obtenção e caracterização das nHA e as etapas 01 e 02 de obtenção e caracterização das esferas de PCL e PCL/nHA foram realizadas no Instituto de Cerâmica y Vidrio – ICV, pertencente ao Consejo Superior de Investigaciones Científicas – CSIC, em Madrid, Espanha. A síntese e caracterização físico-química e biológica das esferas (etapa 03) e das matrizes 3D de PCL e PCL/nHA foram concretizadas no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO, localizado na Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, em Campina Grande. As etapas de sinterização das matrizes 3D, recobrimento metálico do material com ouro, e análise térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial foram realizadas no Laboratório de Tecnologia dos Materiais – LTM, Laboratório de Caracterização dos Materiais e Laboratório de Termoanálises, localizados na UFCG, respectivamente.

3.2 Reagentes

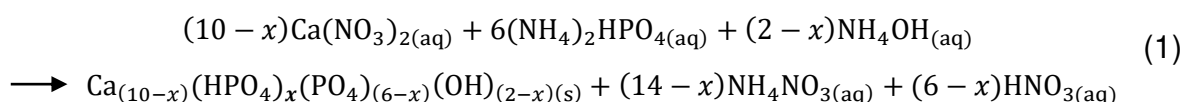
Para a síntese e o tratamento superficial das nanopartículas de hidroxiapatita foram utilizados: Nitrato de Cálcio Tetra hidratado (99,0-103,0 %, Ref.131231, Panreac), Di-Amônio Hidrogênio Fosfato (>98,0 %, Ref.131127, Panreac), Amônia (28,0-30,0 %, Ref. 131130, Panreac) e Ácido Esteárico (>95,0 %, Ref. 175366, Sigma-Aldrich).

Para a produção das esferas de policaprolactona e de policaprolactona/nanohidroxiapatita foram utilizados: Policaprolactona (PM 80.000 g/mol, CAPA™ 6800, Perstorp), Álcool Polivinílico (PM 31.000-50.000, Ref. 363138, Sigma-Aldrich), Antiespumante A (Polímero de silicone, Ref. 10794, Sigma-Aldrich), Diclorometano (>99,5 %, Ref. 141254, Panreac), Fosfato tricálcico (Ref. 330407, Carlo Erba, Usado nos testes preliminares), Nanohidroxiapatita deficiente em cálcio (sintetizada nesta pesquisa), Ácido Clorídrico (36,5-38,0 %, Ref.103, ISOFAR), Álcool etílico absoluto 99,5° GL (Ref. 01A108401BJ, Synth) e Álcool etílico hidratado 70° INPM (22071000, ISOFAR).

Todos os reagentes foram utilizados como recebidos do fabricante, sem etapas prévias de purificação.

3.3 Obtenção das nanopartículas de hidroxiapatita (nHA)

As nHA foram sintetizadas utilizando método de precipitação via úmida, adaptado das pesquisas de Wang et al. (2010) e Khalid et al. (2013), representado na Figura 8. A reação química para a síntese da hidroxiapatita obtida pode ser descrita de acordo com a seguinte equação:



Para realização do processo, foi preparada uma solução de nitrato de cálcio tetrahidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), dissolvendo 262,5 g (1,11 mol) em 1600 mL de água deionizada, por agitação magnética constante (pH 5,22). Para preparação da segunda solução, 76,0 g (0,58 mol) de di-amônio hidrogênio fosfato ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) foram dissolvidos em 400 mL de água deionizada, sob agitação magnética. A esta dissolução parcial foram adicionados 180 mL de solução de amônia (NH_4OH), para ajuste de pH. De acordo com Wang et al. (2010), o pH acima de 10 é favorável à formação de partículas nanométricas. A esta solução foi adicionado água deionizada, para um volume total de 1100 mL (pH 10,4).

Em seguida, a solução contendo $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ foi transferida para um reator e aquecida à temperatura de 80 °C. A solução de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ foi adicionada ao sistema por gotejamento a um fluxo de 10 mL/min (bomba peristáltica Masterflex L/S – Easy Load II/ Cole Parmer – Modelo 77200-60), sob agitação mecânica constante a 500 rpm (agitador IKA RW16 Basic). Após a finalização do gotejamento, a mistura permaneceu por 2 horas sob agitação nas mesmas condições.

Ao final do processo, o aquecimento e a agitação foram interrompidos, e o sistema permaneceu em repouso para sedimentação do precipitado formado. Então, a fase líquida não precipitada foi retirada, foram adicionados 1,5 L de água deionizada, o sistema foi homogeneizado e continuou em repouso durante 24 horas.

Após essas etapas, o sobrenadante foi removido e o material sólido foi filtrado à vácuo, utilizando água deionizada e álcool etílico hidratado 70°. A hidroxiapatita obtida permaneceu em estufa, a 80 °C por 24 horas, para desidratação. O material foi moído e classificado, utilizando almofariz de ágata e malha de 100 µm,

respectivamente, resultando em um pó de coloração branca. A Figura 9 apresenta imagens do procedimento realizado e do material obtido.

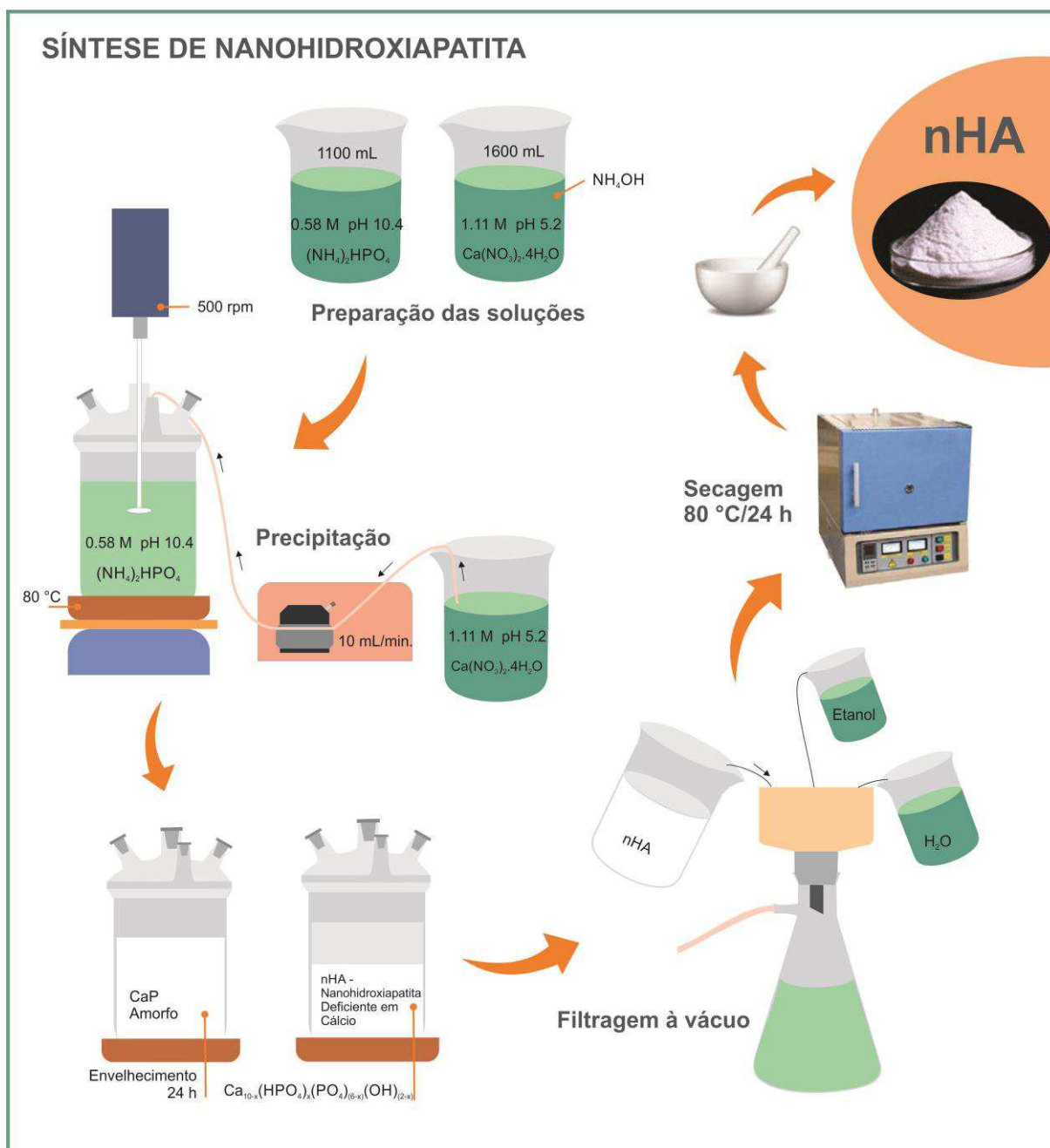


Figura 8 – Esquema de síntese das nHA pelo método de precipitação via úmida.

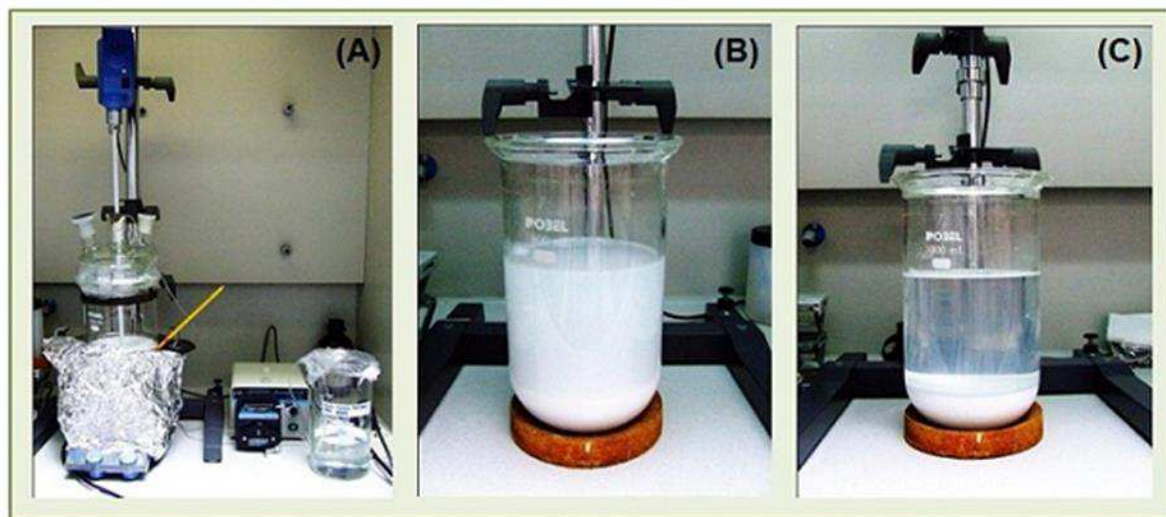


Figura 9 – Síntese das nHA por precipitação via úmida: (A) processo de gotejamento sob agitação a 80 °C; (B) sistema em repouso após precipitação; (C) sistema após deposição completa da fase sólida.

3.3.1 Modificação de superfície das nHA com ácido esteárico

Durante os estudos experimentais preliminares realizados com o fosfato de cálcio comercial para obtenção de esferas de PCL/nHA, foi observado que quantidades consideráveis do fosfato de cálcio não foram incorporadas às esferas. Com o objetivo de melhorar o aproveitamento da fase inorgânica na formação do compósito, as nanopartículas de hidroxiapatita foram tratadas com ácido esteárico. Para o método de modificação de superfície aplicado foram tomados como base os estudos de Li e Weng (2008) e Liuyun et al. (2012).

O ácido esteárico na forma de pó foi adicionado a 200 mL de etanol absoluto, sob agitação magnética a 60 °C (2 h), a uma concentração de 5 % (m/m) com relação à massa da HA. Em seguida, a HA foi adicionada à solução de ácido esteárico e permaneceu sob agitação nas mesmas condições por 20 minutos. O conteúdo foi transferido para um balão de rotaevaporador (BUCHI, R-210) onde permaneceu sob agitação (12 horas; 60 °C) sob pressão atmosférica e, por fim, a uma pressão de 175 mbar para completa evaporação do etanol (Figura 10).

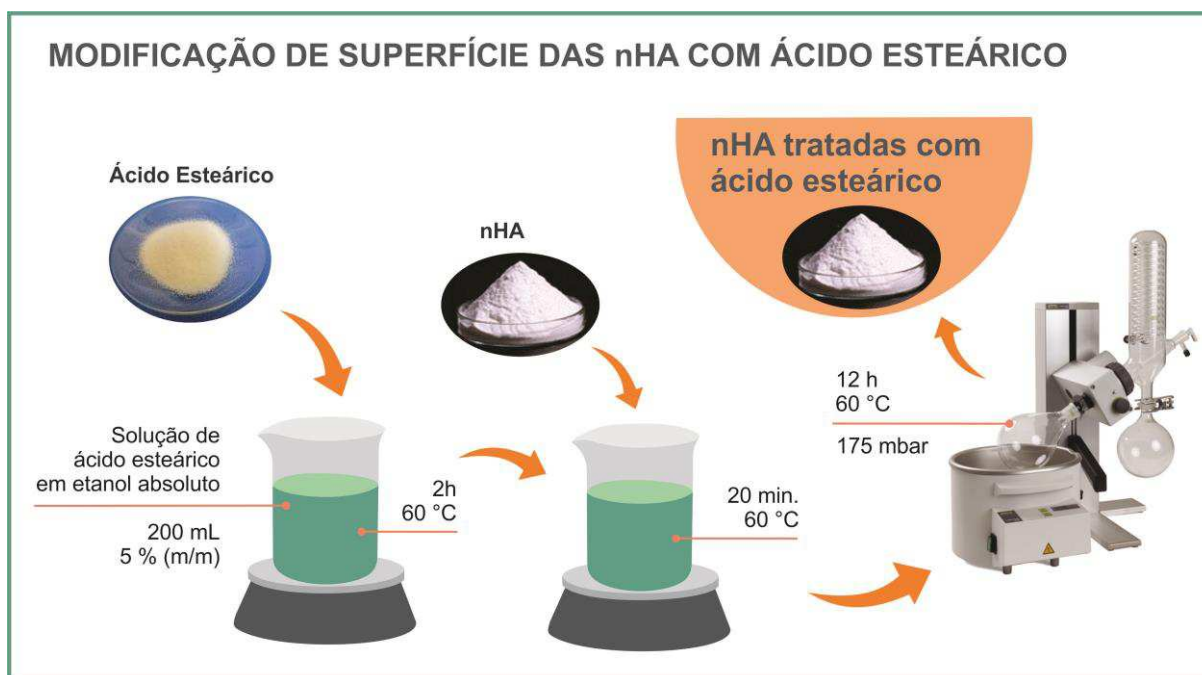


Figura 10 – Esquema do procedimento de modificação de superfície das nHA com ácido esteárico.

3.4 Obtenção das esferas de PCL e PCL/nHA

Para obtenção das esferas de PCL e de PCL/nHA foram utilizados os métodos de emulsão óleo/água (O/A) e sólido/óleo/água (S/O/A), respectivamente, com evaporação do solvente. Os procedimentos foram realizados com base nas pesquisas de Kemala, Budianto e Soegiyono (2012), Qiu et al. (2007), Tuli et al. (2012) e Zhu et al. (2005), e estão ilustrados nas Figura 11 e Figura 12.

Primeiramente, foram preparadas soluções de PCL ou dispersões de PCL/nHA. Para preparação das soluções de PCL, o polímero foi dissolvido em diclorometano, sob agitação magnética (25 ± 2 °C), visando-se obter soluções com concentrações finais de 5 % (m/v), 7,5 % (m/v) e 10 % (m/v). Para obtenção das dispersões de PCL/nHA, os pós de nHA foram adicionados ao diclorometano, e dispersos sob agitação magnética (25 ± 2 °C) por 30 minutos. Em seguida, o PCL foi adicionado e a dispersão permaneceu sob agitação até a completa dissolução do polímero.

A produção de esferas de PCL/nHA dividiu-se em 03 etapas. Na etapa 01 foram realizados testes preliminares com um fosfato de cálcio comercial, no intuito de evitar o desperdício das nHA obtidas, e na etapa 02 foram utilizadas as nHA produzidas. Nessas duas etapas buscou-se a obtenção de microesferas variando

entre 10 μm e 150 μm de diâmetro, adicionando-se os conteúdos de nHA de 17 % (m/m), 23 % (m/m) e 28,5 % (m/m). Na etapa 03 objetivou-se produzir esferas com diâmetros maiores que 800 μm , adicionando-se 30 % (m/m), 35 % (m/m), 40 % (m/m) e 45 % (m/m) de nHA. As variáveis de concentração de PCL estudadas foram mantidas.

Soluções aquosas de PVA foram utilizadas como fase contínua. O polímero foi dissolvido em água destilada, sob agitação magnética (12 h; 60 ± 2 °C), nas concentrações de 1,5 % (m/v), 2 % (m/v) e 2,5 % (m/v). As soluções foram filtradas à vácuo para retirada do material insolúvel. Devido à capacidade espumante do PVA em solução, um agente antiespumante foi adicionado, a 0,1 % (v/v).

Nas etapas 01 e 02, a fase oleosa foi adicionada por gotejamento à solução de PVA, a um fluxo de 3 mL/min (PCL) ou de 2 mL/min (PCL/nHA) (bomba Masterflex L/S, Easy Load II, Cole Parmer, Modelo 77200-60; Tubos Masterflex 96410-14 e 6411-16; conector LABBOX TCLP 006-012), sob agitação mecânica à temperatura ambiente. Essa agitação foi mantida durante 10 minutos após a finalização do gotejamento, investigada a 5000 rpm, 7000 rpm e 10000 rpm (homogeneizador L5 Series, Silverson; 25 ± 2 °C), e a proporção entre as fases óleo/água foi fixada em 1/20. Em seguida, a emulsão permaneceu sob agitação mecânica (IKA Eurostar RW 20 Digital; 2000 rpm; 25 ± 2 °C) durante 120 minutos, para evaporação do solvente.

Já na etapa 03, o gotejamento (~ 3 mL/min PCL; ~ 2 mL/min PCL/nHA) foi realizado manualmente utilizando seringas de vidro (Yale B-D B0125, 20mL, bico de vidro tipo luer slip) contendo tubo acoplado ao bico (Tubos Masterflex 96410-14 e 6411-16; 6 cm de comprimento), sob agitação mecânica (IKA Eurostar RW 20 Digital; 250 rpm) à $34 \pm 0,5$ °C. O sistema permaneceu sob agitação nas mesmas condições por 18 horas, com proporção óleo/água fixada em 1/20. As esferas obtidas foram coletadas por filtração à vácuo, lavadas com água destilada e etanol, e secadas à temperatura ambiente em dessecador. Ainda, nas etapas 01 e 02, antes da filtração foi adicionado HCl (0,1 M) à suspensão final (o pH foi ajustado para 3.3), no intuito de remover a hidroxiapatita não incorporada às microesferas. Esse procedimento não foi adotado na etapa 3. Na Tabela 2 estão listados os testes realizados em cada etapa e seus respectivos parâmetros experimentais. Todas as formulações foram experimentadas três vezes ($n=3$) para avaliação da reprodutibilidade do processo. O rendimento foi calculado para as formulações das Etapas 02 e 03, pela razão entre a massa obtida após a preparação das esferas e a soma das massas teóricas da PCL e das nHA no compósito, conforme Equação 2.

$$\%R = \left[\frac{m_{ESF}}{(m_{PCL} + m_{nHA})} \right] \cdot 100 \quad (2)$$

Onde: %R é a porcentagem de rendimento, m_{ESF} é a massa de esferas obtidas por emulsão, m_{PCL} e m_{nHA} são as massas iniciais teóricas de PCL e nHA.

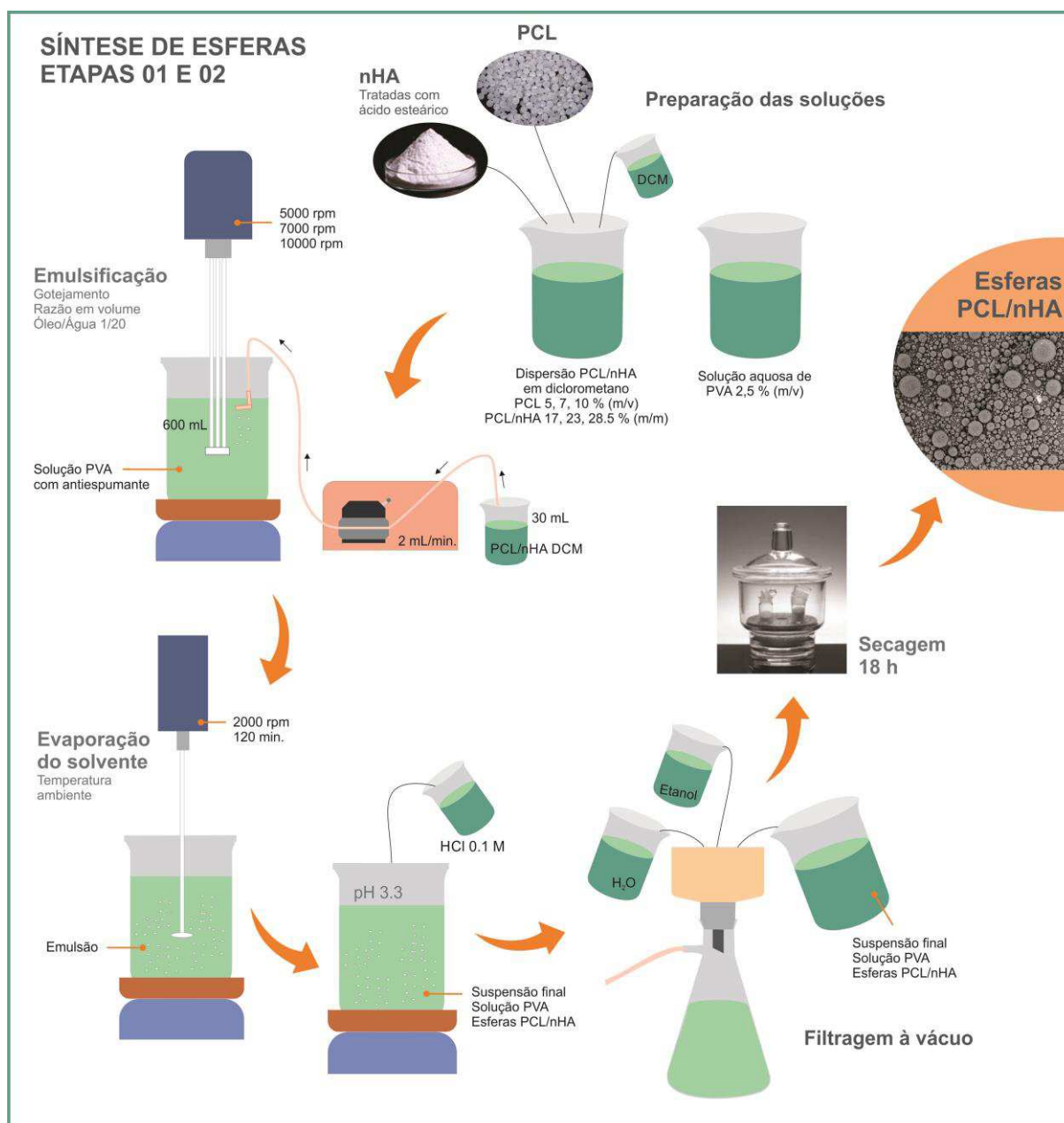


Figura 11 – Esquema do processo de emulsão sólido/óleo/água, com evaporação do solvente, realizado nas etapas 01 e 02.

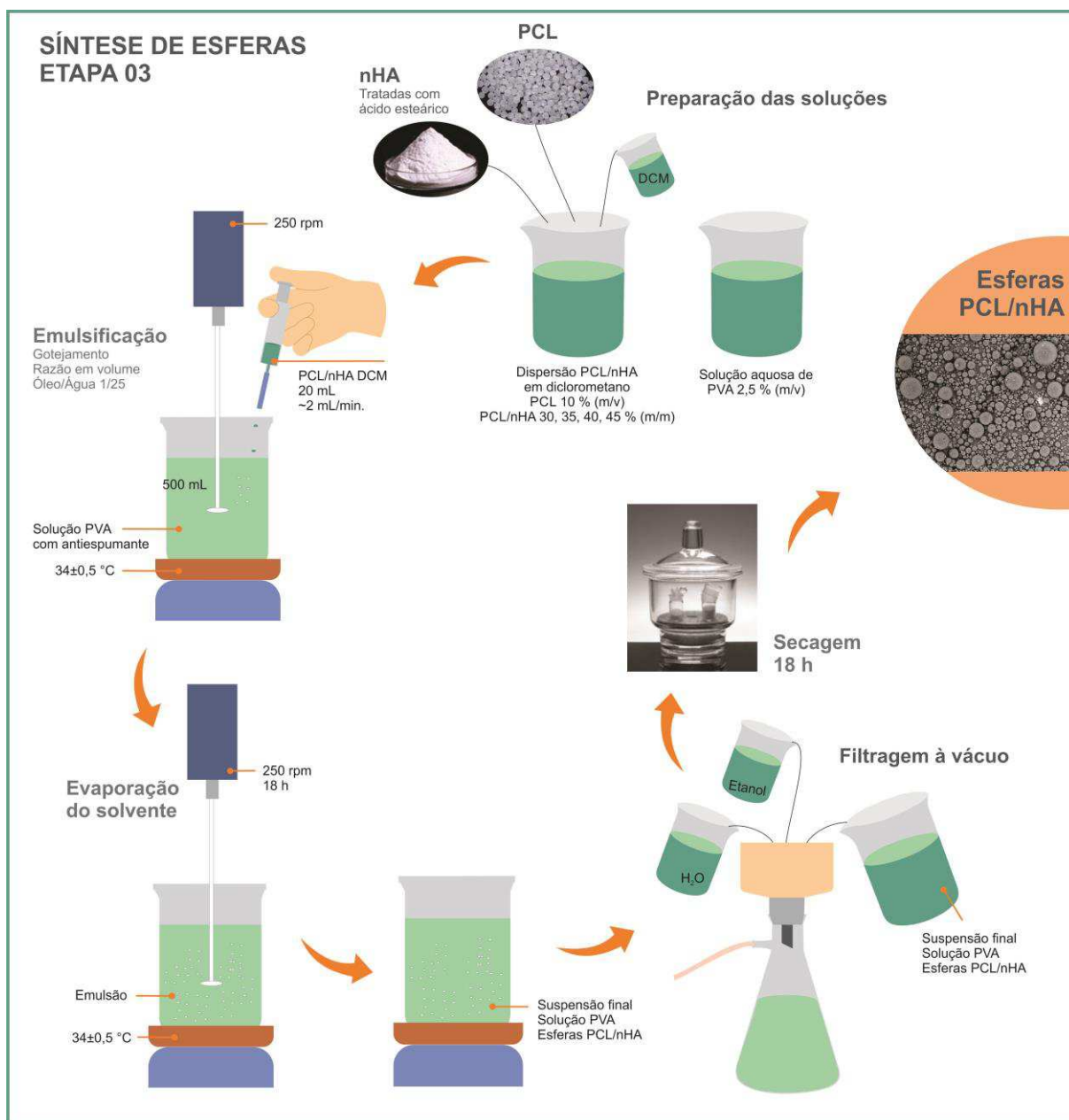


Figura 12 – Esquema do processo de emulsão sólido/óleo/água, com evaporação do solvente, realizado na etapa 03.

Tabela 2 – Relação de testes realizados para obtenção de esferas de PCL e PCL/nHA e suas respectivas variáveis.

Número do teste	Conc. PCL (%m/v)	Razão nHA(ou TCP)/ Á. Esteárico (%m/m)	Conc. PVA (%m/v)	Velocidade de agitação inicial (RPM)	Parâmetros fixados
ESFERAS DE PCL (Ø 10-150 µm)					
PCL 01	10,0	-	2,5	5000	
PCL 02	10,0	-	2,5	7000	
PCL 03	10,0	-	2,5	10000	
PCL 04	10,0	-	2,0	10000	
PCL 05	10,0	-	1,5	10000	
PCL 06*	10,0	-	2,5	10000	
PCL 07	7,5	-	2,5	10000	
PCL 08	5,0	-	2,5	10000	Antiespumante: 0,1 % (v/v)
* Aumento do volume óleo/água para 30 mL/600 mL			Fluxo de gotejamento 3 mL/min.		
ESFERAS DE PCL/TCP (TCP comercial) – ETAPA 01 (Ø 10-150 µm)					
PCL/HA 01	10,0	28,5/--	2,5	5000	Razão óleo/água: 1/20 (20 mL/400 mL)
PCL/HA 02	10,0	23,0/--	2,5	5000	
PCL/HA 03	10,0	23,0/5	2,5	7000	Vel. de agitação final: 2000 rpm
PCL/HA 04*	10,0	23,0/5	2,5	10000	
* Aumento do volume Óleo/Água para 30 mL/600 mL			Fluxo de gotejamento 2 mL/min.		
ESFERAS DE PCL/nHA (nHA) – ETAPA 02 (Ø 10-150 µm)					
PCL/nHA 01*	7,5	28,5/5	2,5	10000	Tempo de agitação inicial/final: 15 min./ 80 min.
PCL/nHA 02	10,0	23,0/5	2,5	10000	Temperatura ambiente: 25±2 °C
PCL/nHA 03	5,0	28,5/5	2,5	10000	
PCL/nHA 04	7,5	23,0/5	2,5	10000	
PCL/nHA 05	10,0	17,0/5	2,5	10000	
PCL/nHA 06	7,5	17,0/5	2,5	10000	
PCL/nHA 07	7,5	23,0/--	2,5	10000	
* Aumento do volume óleo/água para 30 mL/600 mL			Fluxo de gotejamento 2 mL/min.		
ESFERAS DE PCL/nHA (nHA) – ETAPA 03 (Ø > 800 µm)					
PCL/nHA 08	10,0	--	2,5	250	Antiespumante: 0,1 % (v/v)
PCL/nHA 09	10,0	30/5	2,5	250	
PCL/nHA 10	10,0	30/--	2,5	250	Razão óleo/água: 1/20 (20 mL/400 mL)
PCL/nHA 11	10,0	35/5	2,5	250	
PCL/nHA 12	10,0	35/--	2,5	250	Tempo de agitação total: 18 h
PCL/nHA 13	10,0	40/5	2,5	250	
PCL/nHA 14	10,0	45/5	2,5	250	Temperatura: 34±0,5 °C
Fluxo de gotejamento ~2 mL/min.					

3.5 Obtenção das matrizes 3D de PCL e PCL/nHA

3.5.1 Planejamento da estrutura das matrizes 3D

Para o planejamento da arquitetura das matrizes 3D, sendo essencial estimar o diâmetro dos poros e, por conseguinte, o diâmetro das esferas a serem utilizadas no processamento, foi considerado um sistema teórico de empacotamento compacto, regular, de esferas idênticas não sobrepostas, no qual há um mínimo desperdício de espaço (HALES, 2005). A Figura 13 representa o arranjo tridimensional e bidimensional deste sistema, contido em um espaço vetorial real de dimensão finita.

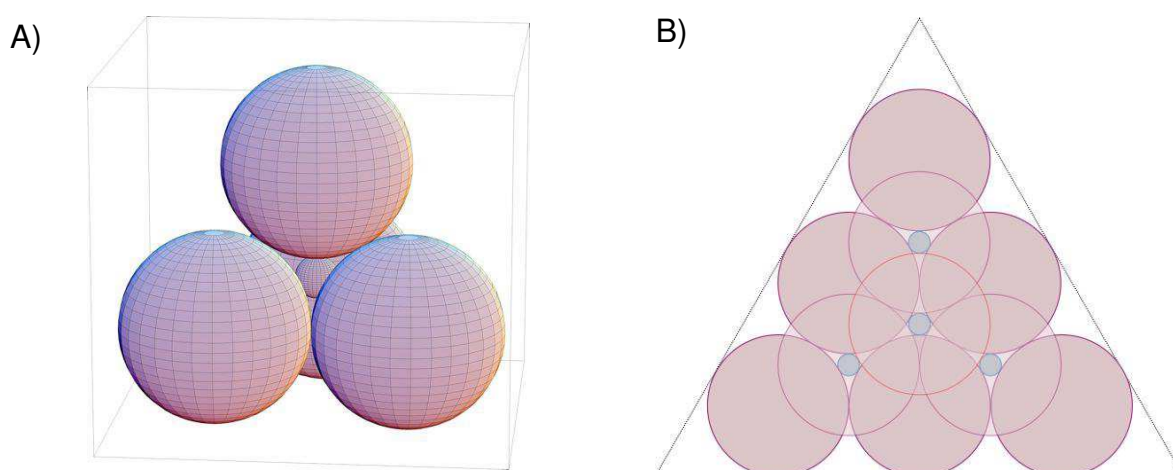


Figura 13 – Representação de um sistema de empacotamento compacto de esferas idênticas não sobrepostas, com os espaços vazios contidos entre as mesmas preenchidos por esferas: A) arranjo tridimensional (JACOBSON, 2007); B) projeção bidimensional.

Partindo-se da planificação do sistema descrito, por geometria, é possível determinar o raio da esfera contida no espaço vazio com relação ao raio da esfera principal, uma representação do raio dos poros e do raio das esferas de PCL/nHA, respectivamente. Conforme ilustrado na Figura 14, considerando um plano cartesiano, onde o centro do poro é o centro do plano (0,0), e os três centros das esferas têm a mesma distância (D) ao centro do poro, tem-se:

$$D = R + r \rightarrow r = D - R \quad (3)$$

Onde: D é a distância do centro da esfera 01 ao centro da esfera 02; R é o raio da esfera 01 e r é o raio da esfera 02.

Unindo os centros das esferas 01 pela menor distância entre eles, tem-se um triângulo equilátero com lado (L) igual a duas vezes o raio da esfera 01(2R). Circunscrito a esse triângulo tem-se um círculo de raio igual a D. Por geometria, é sabido que:

$$D = \frac{\sqrt{3}}{3} L, \text{ logo: } D = \frac{\sqrt{3}}{3} 2R \quad (4)$$

Substituindo (4) em (3):

$$r = 2R \frac{\sqrt{3}}{3} - R \quad (5)$$

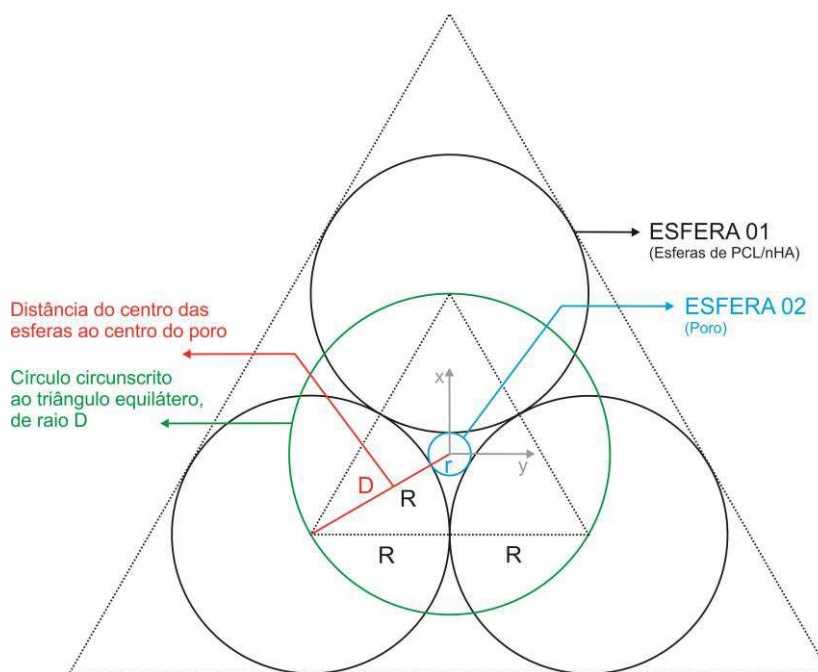


Figura 14 – Esquema geométrico da relação entre o raio do poro e o raio das esferas, considerando o centro do poro como centro do plano cartesiano (0,0).

Baseando-se nas pesquisas de Mehr et al. (2015), Zadpoor (2015), e Loh e Choong (2013), a faixa de diâmetro de poros considerada nesta pesquisa, visando a regeneração do tecido ósseo, foi de 100 μm a 500 μm . A partir da equação (5) foi estimada uma faixa de diâmetro das esferas do biocompósito de 800 μm a 3100 μm . Desse modo, as esferas de PCL e de PCL/nHA obtidas foram classificadas utilizando malhas de 600, 850 e 1500 μm , resultando nas seguintes faixas de classificação: ≤ 600 μm , 601-850 μm , 851-1500 μm e >1500 μm . Devido à quantidade muito reduzida de

esferas maiores que 1500 μm , estas não foram utilizadas, sendo a faixa de 851-1500 μm adotada para esta pesquisa.

3.5.2 Agregação das partículas por aquecimento a baixas temperaturas

As matrizes 3D foram produzidas a partir do método de agregação a baixas temperaturas, tomando-se como base a pesquisa realizada por Luciani et al. (2008). Logo, esferas de PCL e de PCL/nHA pré selecionadas foram colocadas em molde cilíndrico de aço inoxidável (\varnothing 8 mm), pré aquecido em estufa por 2 horas a $63\pm 0,5$ °C e $60\pm 0,5$ °C, respectivamente. As esferas foram compactadas pelo êmbolo do molde (0,9 N) durante 2 minutos. Em sequência, a matriz 3D formada foi retirada do interior do molde e esfriada até a temperatura ambiente (Figura 15). A Tabela 3 relaciona os parâmetros de processamento estabelecidos nesta fase e as amostras obtidas.

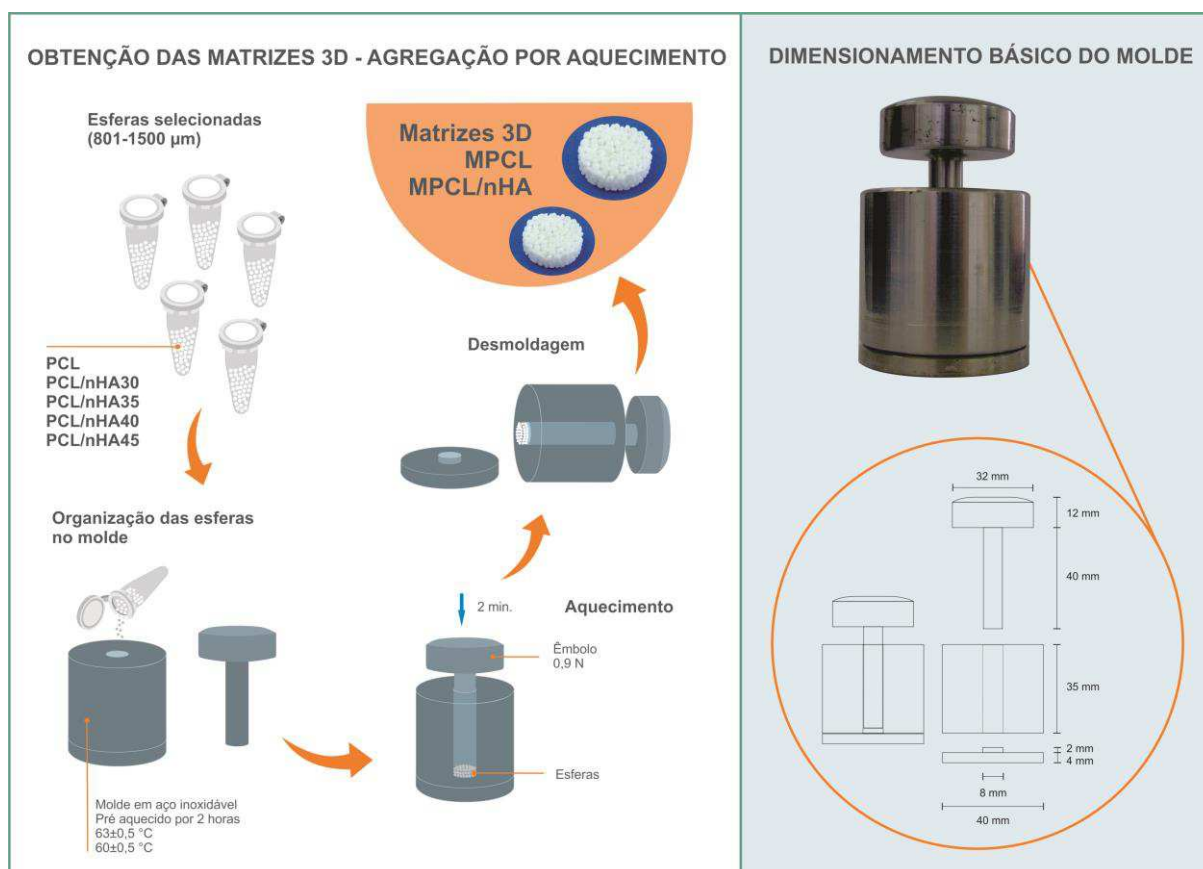


Figura 15 – Esquema do processo de obtenção das matrizes 3D pela agregação das esferas de PCL e de PCL/nHA a baixas temperaturas e dimensionamento básico do molde utilizado.

Tabela 3 – Parâmetros de processamento estabelecidos para obtenção das matrizes 3D de PCL e de PCL/nHA.

Esferas selecionadas (Razão PCL/nHA)	Temperatura (°C)	Massa (g)	Parâmetros fixados	Matrizes 3D obtidas
PCL	63±0,5	0,2	Diâmetro das esferas:	MPCL
PCL/nHA (70/30)	60±0,5	0,15	801-1500 µm	MPCL/HA30
PCL/nHA (65/35)	60±0,5	0,15	Diâmetro do molde: 8 mm	MPCL/HA35
PCL/nHA (60/40)	60±0,5	0,15	Força submetida: 0,9 N	MPCL/HA40
PCL/nHA (55/45)	60±0,5	0,15	Tempo de aquecimento: 2 min.	MPCL/HA45

3.6 Caracterização do material

Foram estabelecidas três etapas de caracterização. A primeira etapa consistiu na caracterização dos materiais de partida, a segunda etapa abordou a caracterização das esferas de PCL e de PCL/nHA, e na terceira etapa foi realizada a caracterização das matrizes 3D desenvolvidas. A Figura 16 apresenta o fluxograma experimental deste trabalho.

Neste trabalho foram utilizadas as seguintes técnicas: Difração de Raios X (DRX), Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia Óptica (MO), Determinação de Tamanho de Partícula, Superfície Específica e Densidade, Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Análise Termogravimétrica (ATG). Para caracterização biológica *in vitro* dos materiais foram aplicados: a Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos, o Ensaio de Bioatividade e o Ensaio de Adesão Celular.

3.6.1 Técnicas de Caracterização

- Difração de Raios X (DRX)

A Difração de Raios X é um fenômeno de espalhamento da radiação eletromagnética, provocado pela interação entre o feixe de raios X incidente e os elétrons dos átomos componentes de um material. Este método pode identificar as fases cristalinas de um composto, e fornecer informações sobre a natureza e os

parâmetros do reticulado, assim como detalhes a respeito do tamanho, da perfeição e da orientação dos cristais (MOURA, 2012).

A técnica de Difração de Raios X foi utilizada para estudo das fases cristalinas e cristalinidade das nanopartículas de hidroxiapatita, do fosfato de cálcio comercial e das esferas de PCL/nHA. Foi utilizado um difratômetro Bruker D8 Advance, com radiação $\text{CuK}\alpha$, voltagem de 40 kV e corrente de 30 mA. Os dados foram coletados à temperatura ambiente (25 °C), sistema θ -2 θ com varredura angular variando de 10° a 70°, com um tamanho de passo de 0.02 °/s.

A identificação qualitativa de fases cristalinas foi realizada utilizando o *software X-Pert*, por meio da comparação entre os padrões de DRX obtidos e aqueles disponibilizados pelo ICDD (*International Centre for Diffraction Data*).

A partir dos padrões de DRX obtidos também foi possível determinar o tamanho do cristalito do material, utilizando a equação de Scherrer (LIMA, 2013; PATTERSON, 1939):

$$tc(nm) = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (6)$$

Onde tc é o tamanho médio do cristalito, k é uma constante que depende de fatores cristalográficos de forma e reflexão da amostra, λ o comprimento de onda da radiação, β é a largura à meia altura do pico de difração, medida à meia altura, e θ é o ângulo de Bragg.

Para determinação da largura instrumental foi utilizada uma amostra padrão de corindon (Al_2O_3) de alta pureza e cristalinidade (HPA-0.5, Ceralox® Aluminas), preparadas nas seguintes condições: o material foi moído em moinho vibratório de alumina a 200 rpm (30 min.), calcinado a 1100 °C (6 h) em cadinho de platina, moído novamente (5 min.) e novamente calcinado a 1200 °C (6 h). Por fim, foi moído e classificado com peneira de 35 μm . Para tal determinação foi empregado o método de refinamento Rietveld (RIETVELD, 1969), usando o *software* GSAS-II (General Structure Analysis System-II), a partir da base de dados ICSD (*Inorganic Crystal Structure Data Base*).

- Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus principais objetivos o estudo dos níveis de energia de átomos ou moléculas. A análise vibracional de polímeros fornece informações sobre três importantes características estruturais: a composição química, a estrutura configuracional e conformacional, e as forças interatômicas associadas às ligações de valência ou interações intermoleculares (BENETTI, 2014).

A técnica foi aplicada para investigação das nHA, da policaprolactona e das esferas de PCL e PCL/nHA. Os espectros na região do infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro (Spectrum 400, FT-IR/ FT-NIR Spectrometer, Perkin Elmer), em modo de Refletância Total Atenuada (ATR) na região de 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 20 varreduras.

- Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O Microscópio Eletrônico de Transmissão utiliza um feixe de elétrons partindo de tungstênio aquecido e sob vácuo que, em conjunto com o sistema de lentes (objetiva e projetoras) e condensadores, é capaz de permitir uma iluminação de elevada intensidade em pequenas áreas, conforme o aumento da magnitude de observação da imagem. Isso determina uma alta capacidade de ampliação das imagens, com o alcance de boa resolução, possibilitando a análise de materiais de dimensões muito reduzidas (RAMIREZ, 2010).

Dessa forma, essa técnica foi utilizada para investigação da morfologia das nHA sintetizadas, e do fosfato de cálcio comercial, na forma de pó, previamente dispersos em etanol absoluto. Foi utilizado o microscópio HITACHI H-7100, sob tensões de aceleração de 100 kV e 125 kV. O tamanho das partículas foi medido utilizando o *software ImageJ*. A distribuição de tamanho das partículas foi calculada a partir da medição de 05 imagens de diferentes regiões para cada formulação.

- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura é geralmente utilizado para observações de amostras espessas, basicamente não transparentes ao feixe de elétrons incidente. A razão principal de sua utilização está associada à alta resolução e à grande profundidade de foco, resultando em imagens com aparência tridimensional (YANG et al., 2008). Dessa maneira, foi a técnica aplicada para o estudo das esferas e matrizes 3D de PCL e de PCL/nHA, utilizando os microscópios HITACHI TM-1000 e Phenom ProX, empregando voltagens de aceleração de 5kV, 10kV ou 15 kV. Ainda, para visualização da estrutura interna das esferas, estas foram embutidas em resina epóxi transparente (utilizando moldes apropriados) e as peças resultantes foram cortadas, lixadas e polidas até tornar-se aparentes as secções transversais das esferas. Quando necessário, as amostras receberam recobrimento metálico com ouro utilizando os equipamentos: BIORAD SC-500 *Sputter coater* e Quick Coater SC-701 Sanyu Electron. O dimensionamento das esferas e matrizes 3D foi realizado utilizando o *software ImageJ*. Para gerar os histogramas referentes à faixa de diâmetro das esferas produzidas, a contagem de partículas foi realizada a partir de 05 imagens obtidas de diferentes regiões do material.

- Microscopia Ótica (MO)

Análises morfológicas das esferas e das matrizes 3D foram realizadas utilizando um microscópio ótico (Advanced 3D Digital, Hirox - KH 7700).

- Determinação do Tamanho de Partícula

Para determinação da distribuição do tamanho de partícula das nHA e fosfato de cálcio comercial, foi utilizado o método de difração (Masterizer S, Malvern) com laser de He-Ne e $\lambda=632,8$ nm, empregado para análise do fosfato de cálcio comercial. As amostras foram submetidas às análises sob a forma de pó, dispersas em água e banho ultrasônico (20 min.) antes da medição.

- Determinação da Superfície Específica

A superfície específica das nHA e fosfato de cálcio comercial foi determinada por método cromatográfico (Monosorb Surface Area Analyser MS-13, Quantachrome) utilizando BET isotérmico, a partir das medidas de adsorção de N₂ correspondentes.

- Determinação da Densidade

A densidade real das nHA e fosfato de cálcio comercial foi medida por picnometria de Hélio (Multipycnometer, Quantachrome).

- Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial é um tipo de análise térmica que permite o estudo quantitativo das transições térmicas em materiais, por meio do registro das diferenças dos fluxos de calor, associadas às transições de fase apresentadas pelas amostras. Todos os eventos térmicos registrados em DSC são apresentados como desvios da linha de base, na absorção ou liberação de calor (CARVALHO, 2012; STEVENS, 1999).

Neste trabalho, esta análise foi empregada para caracterizar o polímero policaprolactona, na forma de pellet e de esferas, e as esferas do compósito PCL/nHA. Para realização das medições foi utilizado o equipamento DSC Q20 (TA Instruments), com taxa de aquecimento de 10 °C por minuto, de 25 °C até 100 °C, e atmosfera inerte de nitrogênio.

- Análise Termogravimétrica (ATG)

A Análise Termogravimétrica (Equipamento ATD-TG Setsys Evolution, SETARAM, França) foi utilizada para medir a quantidade de hidroxiapatita encapsulada na matriz polimérica. A variação de massa é observada mediante processo de aquecimento com atmosfera controlada, em um sistema fechado (HUNG, 2011; BROWN, 2001;). As medições foram realizadas sob atmosfera de ar a um fluxo contínuo de 50 mL/min, em cadinhos de platina de 100 µL, com amostras na faixa de 50-100 µg, e aquecimento de 40 °C a 600 °C (10 °C/min).

- Ensaio de Bioatividade *in vitro*

A capacidade de ligação entre o tecido ósseo e um material específico pode ser avaliada examinando-se a habilidade de formação de apatita na superfície deste material, a partir da imersão controlada em fluido fisiológico artificial (SBF), de concentrações iônicas semelhantes às do plasma sanguíneo humano (Tabela 4) (KOKUBO; TAKADAMA, 2006). Este ensaio foi realizado com base na norma ISO 23317-2007: “Implants for surgery – In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials”.

Tabela 4 – Concentração iônica do fluido corpóreo simulado e do plasma sanguíneo humano (10^{-3} mol/L) (RAMIREZ, 2010).

ÍON	SBF*	PLASMA SANGUÍNEO
Sódio (Na ⁺)	142,0	142,0
Potássio (K ⁺)	5,0	5,0
Magnésio (Mg ²⁺)	1,5	1,5
Cálcio (Ca ²⁺)	2,5	2,5
Cloro (Cl ⁻)	147,8	103,0
Hidrogenocarbonato (HCO ₃ ⁻)	4,2	27,0
Hidrogenofosfato (HPO ₄ ²⁻)	1,0	1,0
Sulfato (SO ₄ ²⁻)	0,5	0,5

Para a preparação do SBF, em 700 mL de água deionizada sob agitação magnética a $36,5 \pm 0,1$ °C, utilizando um recipiente de polietileno, foram dissolvidos os reagentes listados na Tabela 5, na ordem em que se encontram. Os reagentes são adicionados cautelosamente, após a completa dissolução do anterior. O controle de pH é realizado a partir da adição do TRIS, pelo qual se ajusta ao valor final de 7,4. Em seguida, a solução é ajustada ao volume final de 1000 mL pela adição das águas de lavagem e água deionizada, e conservada a 5-10 °C.

As matrizes 3D, previamente lavadas com água destilada e etanol 70 %, secadas em estufa a 37°C (24 h) e pesadas, foram imersas em SBF utilizando recipientes de polietileno tampados. O volume (V) de SBF utilizado foi calculado em função da área superficial aparente (AS_a) da amostra, a uma razão V/AS_a de 14/1, e estas posicionadas com a superfície plana perpendicular ao fundo do recipiente. As composições MPCL e MPCL/nHA 30, 35, 40 e 45 foram submetidas ao ensaio (n=2), armazenadas a 37 °C, e avaliadas a 7, 14, 21 e 28 dias, havendo troca das soluções

de SBF a cada 7 dias. Ao final, as matrizes foram secadas em estufa a 37°C por 24 horas, pesadas e armazenadas. Para avaliação dos resultados, as amostras foram observadas por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Tabela 5 – Reagentes utilizados para preparação do SBF.

Ordem	Reagente	Quantidade	Pureza	Fornecedor
1	Cloreto de Sódio (NaCl)	8,035 g	99,5 %	P.A. Nuclear
2	Bicarbonato de Sódio (NaHCO ₃)	0,355 g	99,5 %	P.A. Nuclear
3	Cloreto de Potássio (KCl)	0,255 g	99,5 %	P.A. Nuclear
4	Fosfato de Potássio Dibásico (K ₂ HPO ₄)	0,176 g	99,0 %	P.A. Nuclear
5	Cloreto de Magnésio Hexahidratado (MgCl ₂ .6H ₂ O)	0,311 g	98,0 %	P.A. Vetec
6	Ácido Clorídrico (HCl; 1M)	39 mL	-	P.A. Isofar
7	Cloreto de Cálcio Dihidratado (CaCl ₂ .2H ₂ O)	0,387 g	95,0 %	P.A. Nuclear
8	Sulfato de Sódio (Na ₂ SO ₄)	0,072 g	99,0 %	P.A. Nuclear
9	TRIS (Hidroximetil) Aminometano	6,118 g	99,0 %	P.A. Nuclear
10	Ácido Clorídrico (HCl; 1M)	0 a 5 mL	-	P.A. Isofar

- Cultura Celular

As células das linhagem fibroblástica L929 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro - BCRJ, armazenadas e cultivadas no CERTBIO. As células são cultivadas em placas de Petri ou frascos de cultura, em meio de cultura RPMI-1640 (composto por 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibiótico e antimicótico) em incubadoras com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C, com umidade. É efetuada a troca de meio de cultura de 2 a 3 vezes por semana.

- Avaliação da Viabilidade Celular

Para avaliar a viabilidade das células em presença do PCL, foi realizado o teste de citotoxicidade, seguindo a norma ISO 10993-5: “Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity”. Membranas de PCL foram produzidas a partir da dissolução do polímero em diclorometano a uma concentração de 10 %(m/v) sob agitação magnética à temperatura ambiente. Em seguida, 20 mL da solução polimérica foram vertidos em placas de Petri e mantidos em capela de

exaustão até a completa evaporação do solvente. Amostras circulares ($\varnothing \approx 3,2$ mm) obtidas das membranas foram lavadas com água deionizada, etanol 70 % e solução tampão fosfato salina (PBS) antes do teste. Primeiramente, células da linhagem fibroblástica L929 foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços com meio de cultura RPMI-1640 (composto por 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibiótico e antimicótico) durante 24 horas. Após 24 horas, o meio de cultura foi trocado e as amostras foram inseridas nos poços de cultura, permanecendo 24 horas em contato. Após esse período, o meio de cultura e as amostras foram retirados e foi adicionada uma solução de MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium) a 1 mg/mL em PBS (a solução final de MTT é filtrada em membrana com poro de 0,22 μm). As placas foram novamente incubadas por um período de 3 horas. Após essa incubação, foram descartados o sobrenadante e adicionados 100 μL de álcool isopropílico por poço. Como controle da viabilidade celular foi utilizado somente a linhagem celular em meio de cultura.

A leitura da densidade ótica foi determinada em espectrofotômetro (Victor X3, Perkinelmer) a 570 nm com filtro de referência de 650 nm. O cálculo da viabilidade celular foi realizado mediante teste de Grubbs ($n=12$), em porcentagem, considerando-se o controle como 100 % de viabilidade.

- Ensaio Biológico de Adesão Celular

Para a realização do ensaio de adesão celular, primeiramente as matrizes 3D foram mantidas em etanol 70 % durante 24 horas e, posteriormente, lavadas em PBS estéril 03 vezes. Em seguida, as amostras foram colocadas em placas de 48 poços e mantidas em estufa a 37 °C por 24 horas. Após secagem, as amostras foram mantidas em meio de cultura durante 24 horas. Em sequência, as células da linhagem fibroblástica L929 foram plaqueadas diretamente sobre as matrizes 3D ($n=5$), com uma densidade celular inicial de 1×10^5 células/poço. Após 07 dias de cultivo, a adesão celular foi avaliada pela observação da superfície das amostras por Microscopia eletrônica de varredura (MEV). Células cultivadas diretamente sobre a superfície da placa de cultura celular foram utilizadas como referência. Para controle da interferência do meio de cultura no material foram avaliadas matrizes 3D submetidas ao mesmo procedimento, na ausência de células. Para observação dos resultados por MEV, as células foram fixadas pela imersão das matrizes em solução de formaldeído

3,7 % (PBS) durante 10 minutos. Em sequência, as amostras foram imersas em etanol 98 %, secadas e recobertas com ouro.

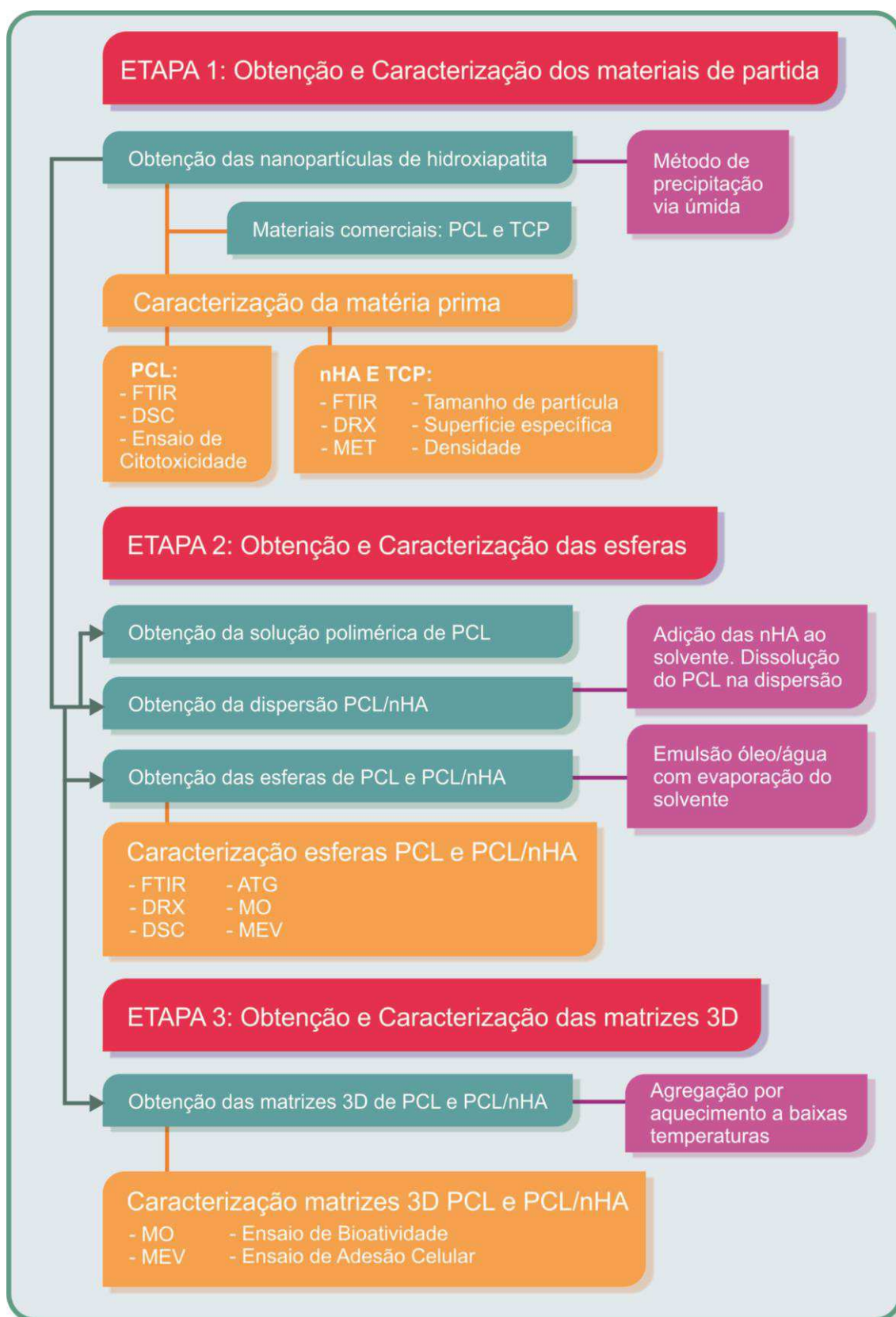


Figura 16 – Fluxograma experimental da pesquisa.

4 RESULTADOS

4.1 Nanopartículas de hidroxiapatita (nHA)

A partir do método de precipitação química via úmida empregado foi obtido com êxito um material com aspecto físico de um pó de coloração branca, conforme apresentado na Figura 17.

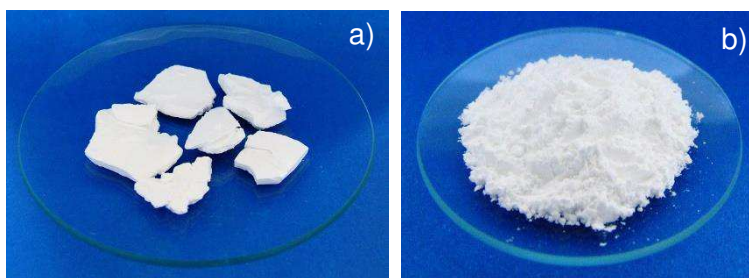


Figura 17 – Nanopartículas de hidroxiapatita obtidas pelo processo de precipitação química via úmida, (a) na forma de blocos e (b) na forma de pó após ser moído e classificado.

A partir dos resultados obtidos por DRX da amostra nHA, foi identificada a presença de uma única fase cristalina, correspondente à hidroxiapatita deficiente em cálcio ($\text{Ca}_9\text{HPO}_4(\text{PO}_4)_5\text{OH}$; JCPDS 00-046-0905). No padrão de DRX obtido foram observados picos alargados em todo o intervalo 2θ , característicos de nanocristalitos (KHALID et al., 2013; RAJKUMAR; SUNDARAM; RAJENDRAN, 2011). A análise quantitativa da amostra foi realizada pelo método de refinamento Rietveld, com o arquivo do banco de dados ICSD (*Collection Code* n°.151939; $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5,55}(\text{HPO}_4)_{0,45}\text{O}_{0,53}(\text{OH})_{1,39}$). A Figura 18 apresenta os padrões de difração experimentais e calculados por refinamento Rietveld para as nHA. Na Tabela 6 estão relacionados os resultados obtidos pelo refinamento Rietveld para os parâmetros de rede e volume da célula unitária.

Ao longo do plano (002), com índice de Miller (0 0 1), observou-se uma diminuição significativa da largura à meia altura com relação aos demais picos, resultado da difração de maior quantidade de unidades do cristal, indicando um crescimento preferencial do cristalito ao longo do eixo Z. O tamanho médio de cristalito calculado a partir da equação de Scherrer foi de 21,19 nm.

A sinterização a temperaturas elevadas tende a eliminar o grupo funcional OH da estrutura da HA, provocando a decomposição da fase HA e formação das fases α -

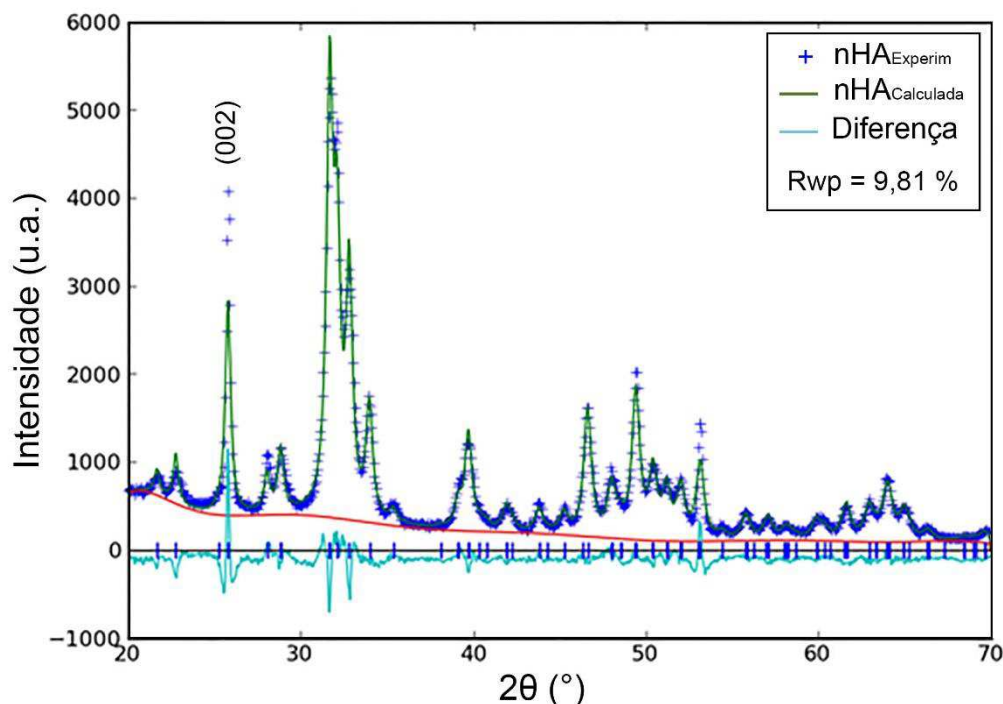


Figura 18 – Padrões de DRX experimentais e calculados por refinamento Rietveld da nHA, obtida por precipitação química.

Tabela 6 – Dados dos parâmetros de rede e volume da célula unitária da nHA, obtidos por refinamento Rietveld.

Parâmetro	nHA
a=b (Å)	9,42079
c (Å)	6,87732
$\alpha = \beta$ (°)	90
γ (°)	120
Volume (Å ³)	528,598

TCP, β -TCP e TTCP (MURALITHRAN; RAMESH, 2000). Conforme indicado no diagrama de equilíbrio de fases do sistema CaO-P₂O₅ (Figura 19), a HA estequiométrica, permanece estável até temperaturas superiores a 1200 °C (QUE et al., 2008). Com a razão Ca/P menor que 1,67, ocorre a decomposição de fase da HA em TCP e HA, enquanto se essa razão for maior que 1,67, ocorre a decomposição de fase da HA em CaO e HA. Logo, no intuito de estimar a relação Ca/P da nHA sintetizada nesta pesquisa, esta foi calcinada a 1100 °C (15 h) e foi obtido o padrão de DRX apresentado na Figura 20, onde pode ser observado o surgimento de dois picos adicionais localizados a 2 θ 24,1° (d=3,689 Å) e 2 θ 30,7° (d=2,912 Å). A Figura 21 apresenta os padrões de difração experimentais e calculados por refinamento Rietveld para a nHA calcinada. Foram identificadas duas fases cristalinas, correspondentes em 83,2 % à hidroxiapatita (Ca₁₀(PO₄)₆OH₂) (JCPDS 09-0432) e 16,8 % ao α -fosfato tricálcico (α -Ca₃(PO₄)₂; JCPDS 09-0348), correspondendo os picos

anteriores com as difrações de índice de Miller (2 4 1) e (1 7 0), respectivamente. A análise quantitativa da amostra foi realizada com os arquivos do banco de dados ICSD (*Collection Code*: n°.26205 - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; n°.923 - $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Esses resultados confirmaram a deficiência em cálcio apresentada pelo material, com razão Ca/P de 1,64. Resultados consonantes a estes foram encontrados por Zhang e Zhang (2011).

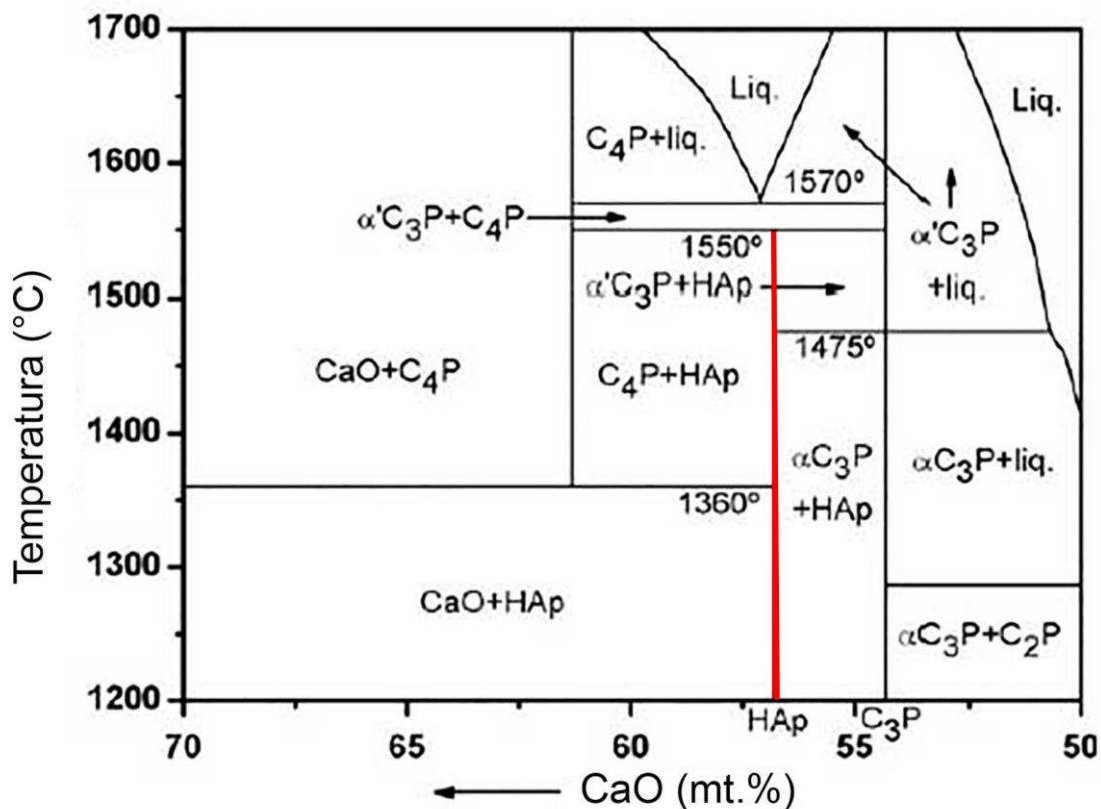


Figura 19 – Diagrama de equilíbrio de fases do sistema CaO-P₂O₅. A linha vermelha indica a HA estequiométrica (Razão Ca/P 1,67) (RIBOUD, 1973).

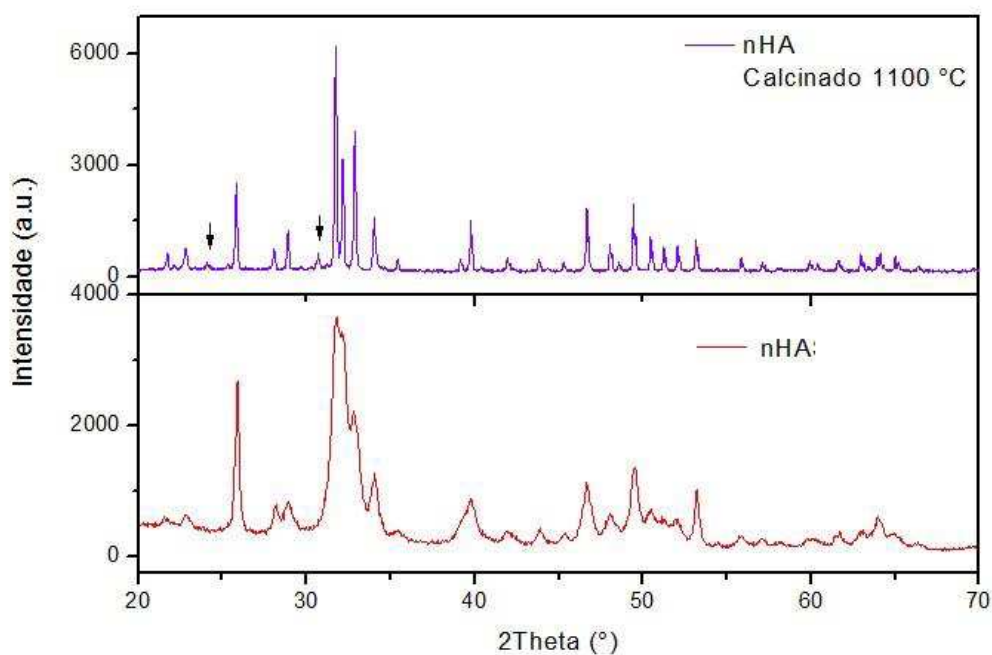


Figura 20 – Padrões de DRX da amostra nHA obtida por precipitação química, e da amostra nHA calcinada a 1100 °C. Os picos adicionais observados estão indicados pelas setas.

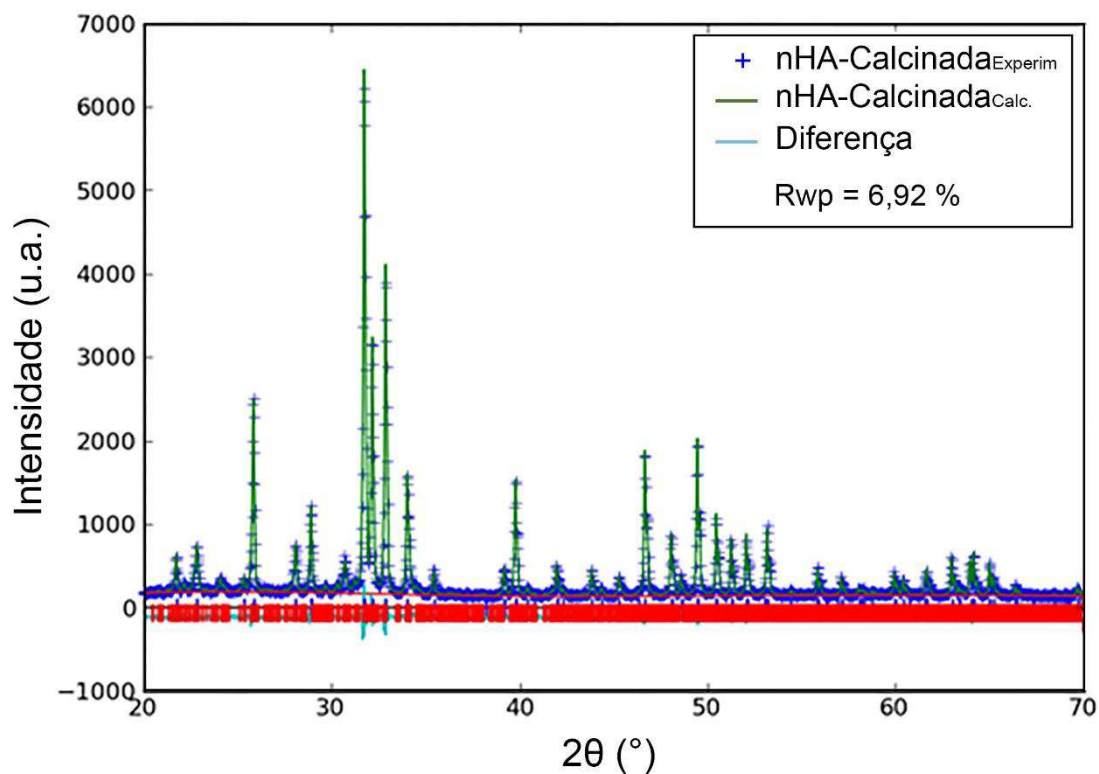


Figura 21 – Padrões de DRX experimentais e calculados por refinamento Rietveld, da amostra nHA obtida por precipitação química, calcinada a 1100 °C.

A morfologia (forma e tamanho) das nanopartículas de hidroxiapatita depende das condições de síntese tais como a concentração dos precursores, condições de mistura, pH inicial e temperatura (PAZ et al., 2012).

Análises por microscopia eletrônica de transmissão da amostra nHA foram realizadas, para caracterização da morfologia das partículas obtidas. As micrografias estão apresentadas na Figura 22, obtidas de diferentes regiões, nas quais foi observada a presença de aglomerados de nanopartículas de característica anisotrópica, predominantemente na forma de hastes/bastões, com vértices arredondados. Nessas imagens foram observadas estruturas nanométricas de forma circular e ovalar, distribuídas ao longo das partículas, conforme indicado nas imagens 22(c) e 22(d), com ampliação nas imagens 22(e) e 22(f). De acordo com Ramirez (2010) e Xin, Leng e Wang (2006), o feixe de elétrons do microscópio induziria a liberação de água no interior das partículas, originando estruturas semelhantes a bolhas.

A partir dessas imagens foram medidos a largura e o comprimento das partículas, conforme observado no histograma da Figura 23. Esse histograma exhibe centro deslocado, resultado do formato alongado dessas nanopartículas, que apresentaram, majoritariamente, dimensões médias de $42 \pm 14,5$ nm de comprimento e 8 ± 2 nm de largura. Esses resultados estão em consonância com os observados nos difratogramas de DRX, que indicaram crescimento preferencial ao longo do eixo z nos cristais da hidroxiapatita. A Tabela 7 relaciona os valores para o tamanho médio de cristalito calculados a partir da equação de Scherrer, e os tamanhos médios de partícula medidos a partir das imagens de MET.

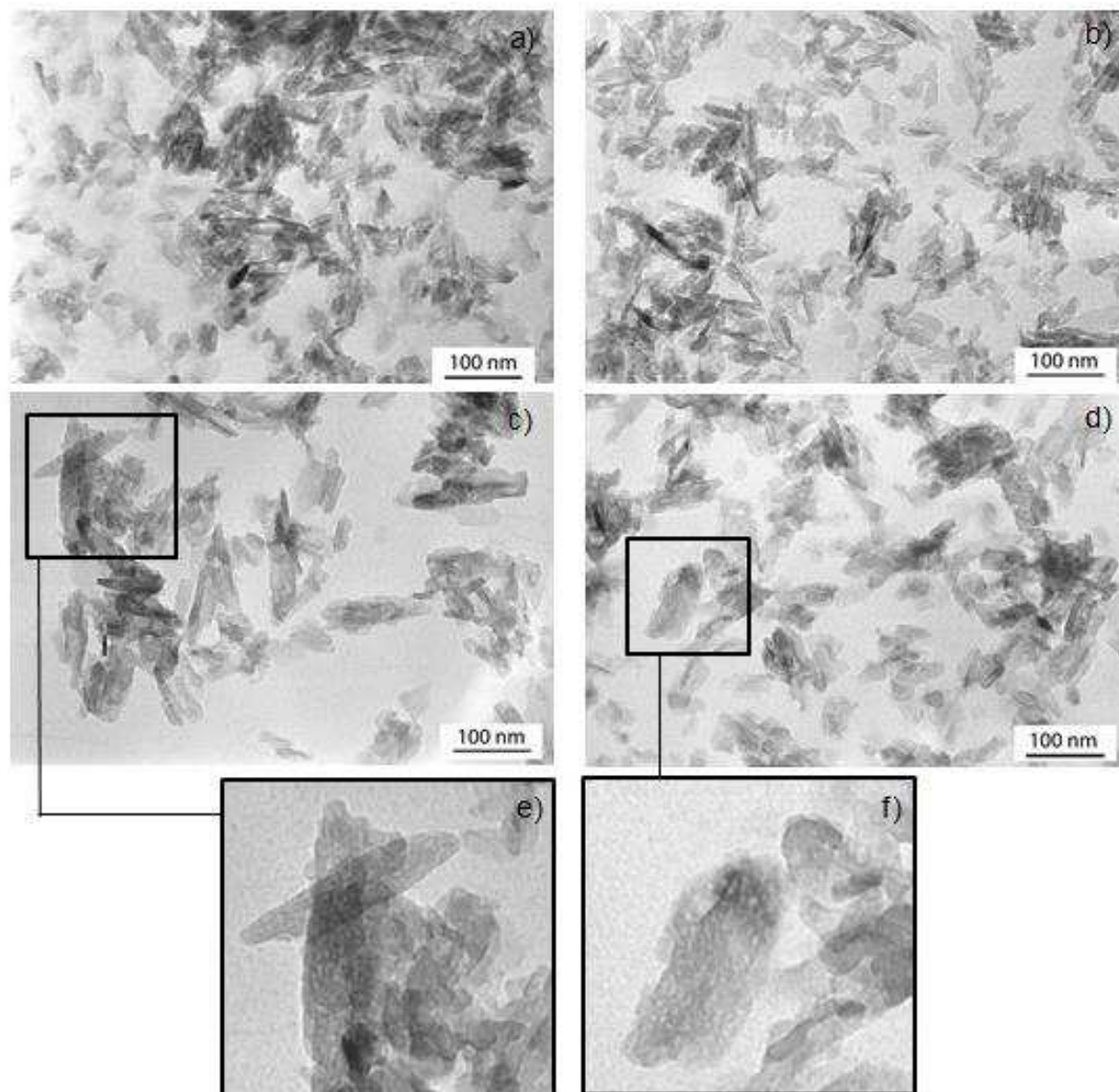


Figura 22 – Imagem por MET da amostra nHA em diferentes regiões da grade de transmissão.

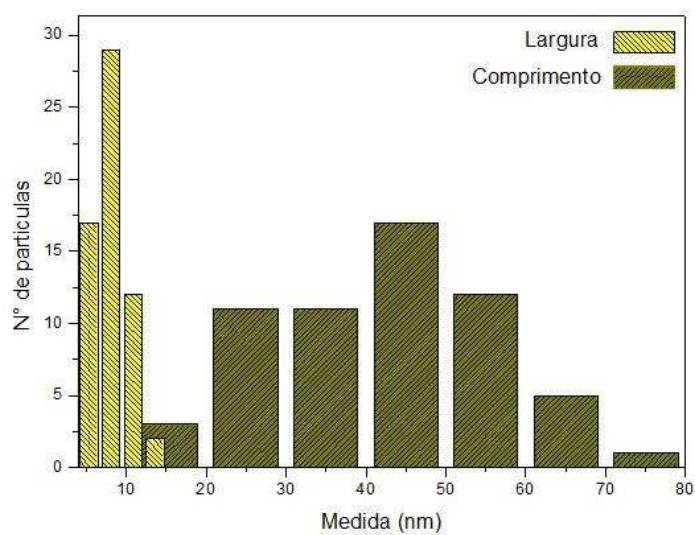


Figura 23 – Histogramas das imagens por MET da amostra nHA.

Tabela 7 – Tamanho médio de cristalito estimado pela equação de Scherrer e tamanho médio de partícula estimado por MET para a amostra nHA.

Método	Direção	Medida (nm)
Scherrer	Tamanho médio de cristalito	21,19
MET	Comprimento	42,0 ($\pm 14,5$)
	Largura	8,0 ($\pm 2,0$)

Os resultados obtidos por DRX e MET demonstraram que foram produzidas partículas de hidroxiapatita em escala nanométrica, condizentes com o valor de superfície específica medido, de 90,1 m²/g. Comparando-se o valor da densidade da amostra nHA, de 3,08 g/cm³, com a densidade teórica de 3,156 g/cm³ da hidroxiapatita estequiométrica, tem-se uma diminuição causada pelas diferenças do cristal de nHA, decorrentes da deficiência em cálcio (ELLIOTT, 1994).

O espectro de infravermelho da amostra de nHA está apresentado na Figura 24, enquanto as atribuições identificadas no espectro, estão relacionadas na Tabela 8. Com base no estudo de Mochales et al. (2011) acerca de nanocristais de hidroxiapatita deficiente em cálcio, foram identificadas as bandas correspondentes ao grupo fosfato (PO₄³⁻) em 1089 cm⁻¹ e 1123 cm⁻¹ (deformação axial assimétrica, ν_3), e em 962 cm⁻¹ (deformação axial simétrica, ν_1). A banda de absorção detectada em 874 cm⁻¹ corresponde à deformação axial simétrica (ν_1) do grupo HPO₄²⁻. As bandas de absorbância características do grupo hidroxila da HA foram observadas em 3570 cm⁻¹ (estiramento) (PETER et al., 2010).

As bandas indicadas pela absorção na região de 1364 a 1556 cm⁻¹ correspondem à deformação axial assimétrica (ν_3) do grupo CO₃²⁻, incorporadas aos sítios estruturais PO₄³⁻ e OH. A presença do carbonato na estrutura se deve provavelmente ao gás carbônico proveniente da atmosfera de reação (WANG et al., 2010; WANG et al., 2006).

No intervalo de 2675 cm⁻¹ a 3535 cm⁻¹, e de 1570 a 1740 cm⁻¹, foram observadas bandas de absorção largas referentes à presença de água no material, estrutural e adsorvida (adsorvida) na superfície, respectivamente (RAMIREZ, 2010). Em comparação com os espectros obtidos por Mochales et al. (2011) e Wang, Liu e Guo (2010), devido à intensidade das referidas bandas, observa-se a baixa presença de água nas amostras.

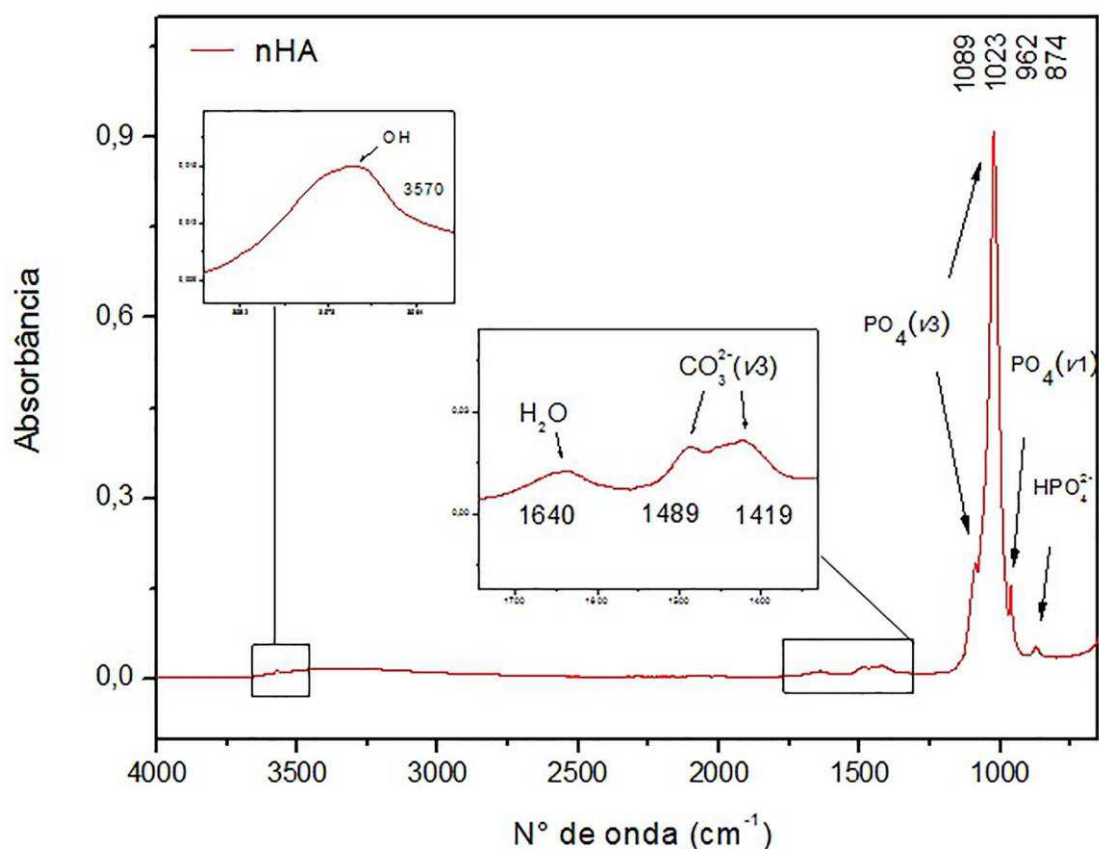


Figura 24 – Espectro de FTIR das nanopartículas de HA obtidas por precipitação química.

Tabela 8 – Atribuições das frequências vibracionais observadas no espectro de FTIR apresentado na Figura 24.

Atribuições	Frequências vibracionais (cm ⁻¹)
OH estrutural	3570
H ₂ O absorvida	3535-2675
H ₂ O absorvida (ν ₂)	1740-1570
Grupo CO ₃ ²⁻ (ν ₃)	1556-1364
PO ₄ ³⁻ (ν ₃)	1089
PO ₄ ³⁻ (ν ₃)	1023
PO ₄ ³⁻ (ν ₁)	962
HPO ₄ ²⁻	874

4.1.1 nHA após modificação de superfície com ácido esteárico (AE)

Durante os testes realizados para a produção das esferas do compósito PCL/nHA, foi observado que quantidades consideráveis de HA das dispersões não chegavam a ser bombeadas juntamente com a solução polimérica, para formação da emulsão. A amostra nHA foi modificada superficialmente por ácido esteárico, na tentativa de obter um melhor aproveitamento do material, além de melhor interação

com o polímero. Macroscopicamente, o pó de nanohidroxiapatita apresentou aspecto físico idêntico ao das nHA sem tratamento.

O espectro de infravermelho obtido para as nHA modificadas com ácido esteárico pode ser observado na Figura 25, em comparação às nHA sem modificação. As atribuições identificadas estão relacionadas na Tabela 9.

Foi observado o surgimento de quatro bandas de absorção, a 2960 cm^{-1} , 2922 cm^{-1} , 2852 cm^{-1} e 720 cm^{-1} , referentes aos grupos CH_3 e CH_2 da molécula de AE. O aparecimento de uma banda a 1550 cm^{-1} também foi identificado, correspondente ao carboxilato de cálcio (grupo COOCa , deformação axial assimétrica) formado devido à interação entre o Ca^{2+} da HA e o COOH do AE. Ainda, a banda de absorção observada a 1740 cm^{-1} corresponde, provavelmente, à vibração $\text{C}=\text{O}$ característica do AE (LIUYUN et al., 2012; ZHANG et al., 2012 LI; WENG, 2008). As demais bandas características da HA, previamente identificadas, também foram observadas, indicando que não houve alteração na estrutura da HA. Além disso, comparando-se estes resultados com o estudo de Li e Weng (2008), que experimentou variadas concentrações de AE (1 %, 3 %, 5 %, 7 %, 9 % e 11 %), os picos adicionais aqui descritos não apresentaram forte intensidade, compatíveis com o espectro de 5 % do autor.

O resultado obtido para superfície específica da nHA modificada, foi de $61,3\text{ m}^2/\text{g}$. A diminuição da superfície específica com relação às nHA não modificadas ($90,1\text{ m}^2/\text{g}$) também revela a efetividade do tratamento realizado.

No intuito de observar a morfologia das nanopartículas de HA após a modificação por ácido esteárico, foram realizadas análises por MET, obtendo-se as imagens apresentadas na Figura 26. De acordo com as micrografias, a forma e o tamanho das partículas não foi alterado, porém o tamanho dos aglomerados de partículas foi reduzido significativamente. Esse efeito também foi observado nos resultados de Liuyun et al. (2012).

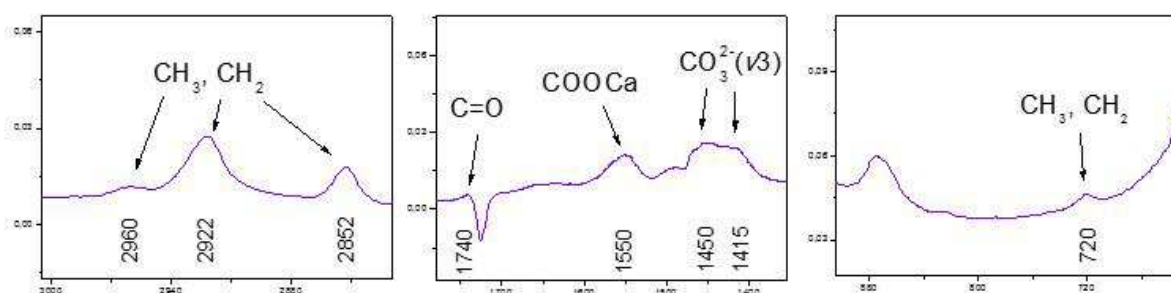
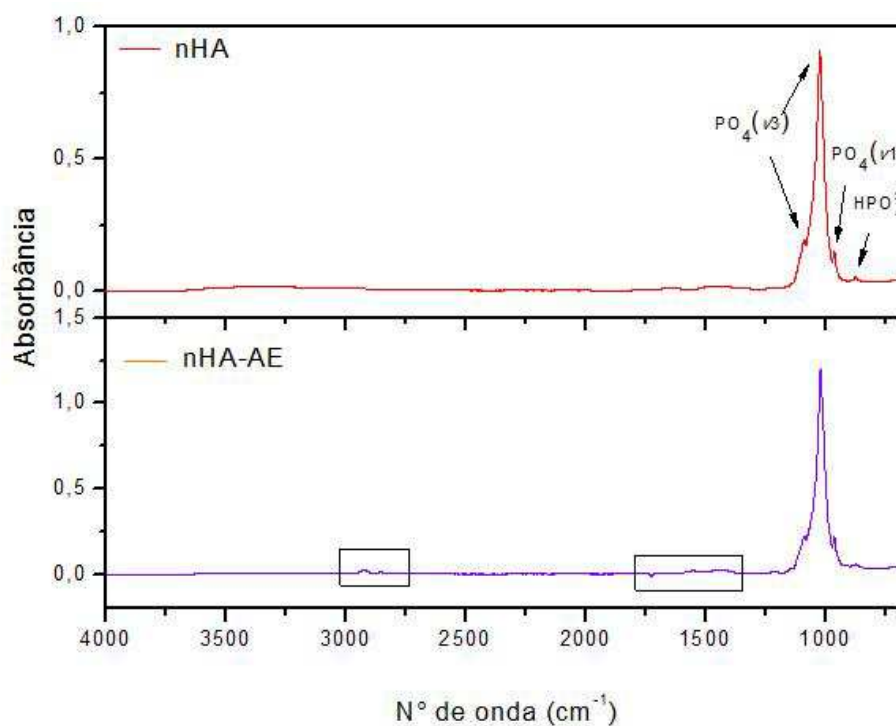


Figura 25 – Espectro de FTIR das nanopartículas de HA obtidas por precipitação química, com e sem modificação superficial por ácido esteárico.

Tabela 9 – Atribuições das frequências vibracionais observadas no espectro de FTIR apresentado na Figura 25.

Atribuições	Frequências vibracionais (cm^{-1})
CH ₃ , CH ₂	2960, 2922, 2852, 720
C=O	1740
COOCa	1550

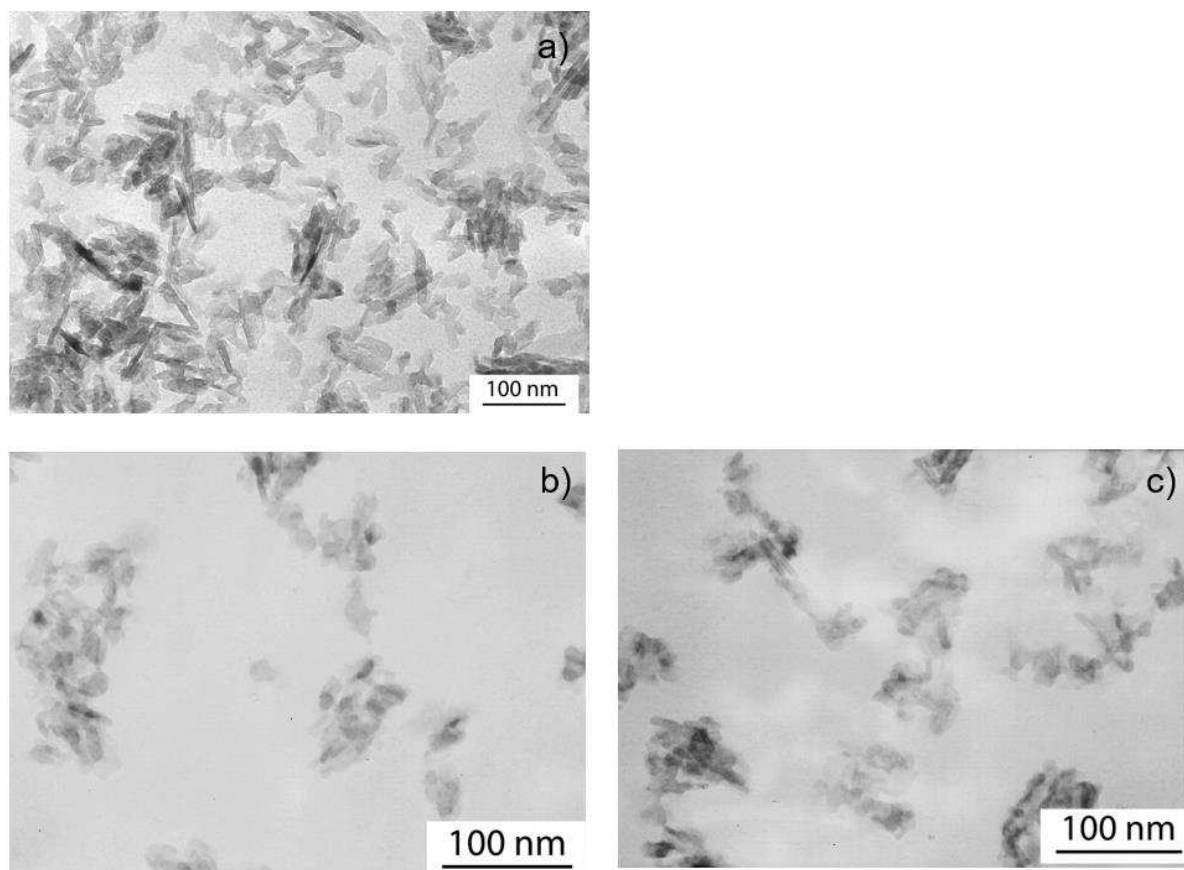


Figura 26 – Imagem por MET das nHA não-modificadas (a) e modificadas por ácido esteárico (b,c).

Com o objetivo de observar possíveis modificações no comportamento das nHA em soluções não aquosas, foi realizado um experimento controle entre dispersões de nHA em diclorometano, avaliando-se o tempo de sedimentação dessas partículas. Para isto, nHA com e sem ácido esteárico foram dispersas em diclorometano por agitação em ultrassom durante 30 minutos. O comportamento da dispersão foi monitorado à temperatura ambiente em função do tempo. Ao serem adicionadas, as nHA sem AE sedimentaram imediatamente, enquanto as nHA com AE dispersaram no DCM sem a aplicação de agitação (Figura 27). Após a agitação foi observado que as partículas sem ácido esteárico levaram 5 minutos para atingir o fundo do recipiente, enquanto às nHA modificadas, permaneceram dispersas 1 hora após a agitação. Isso indica a mudança na polaridade das partículas após a modificação, corroborando com os resultados de DRX, FTIR, MET e superfície específica.

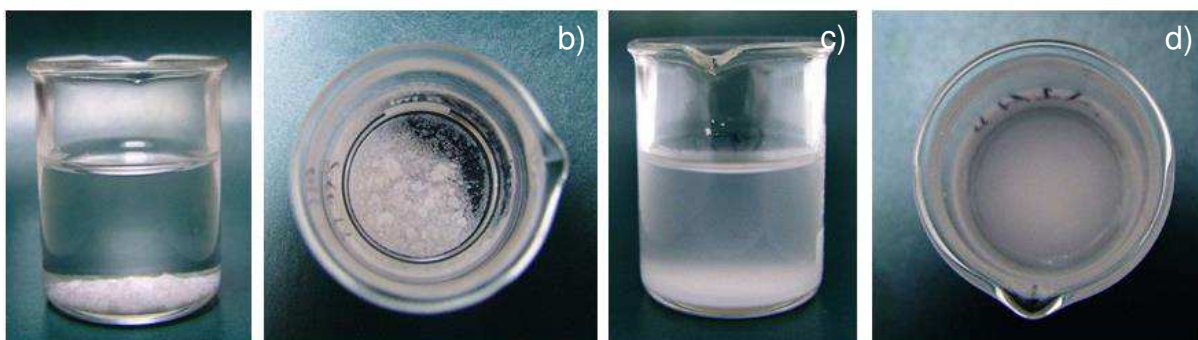


Figura 27 – Imagens referentes ao momento imediato à adição das nHA no DCM, sem agitação: (a,b) nHA sem AE; (c,d) nHA com AE.

4.2 Fosfato Tricálcico (TCP)

O fosfato tricálcico comercial utilizado para realizar os testes anteriores aos de obtenção do compósito PCL/nHA foi analisado por Difração de Raios X e por Microscopia Eletrônica de Transmissão, para identificação das fases cristalinas presentes no material, assim como para conhecimento da morfologia das partículas.

De acordo com a análise de DRX foi determinada a presença de duas fases cristalinas, correspondentes em 50 % à monetita (CaHPO_4 , PDF 009-0080), e 50 % à hidroxiapatita deficiente em cálcio ($\text{Ca}_9\text{HPO}_4(\text{PO}_4)_5\text{OH}$, PDF 046-0905) (Figura 28). A partir da micrografia obtida por MET (Figura 29), é possível identificar aglomerados de partículas em formato de hastes, com vértices arredondados, medindo 300 ± 20 nm de comprimento e 50 ± 10 nm de largura. O resultado para a superfície específica do TCP analisado foi de $17,17 \text{ m}^2/\text{g}$, com densidade de $3,007 \text{ g}/\text{cm}^3$.

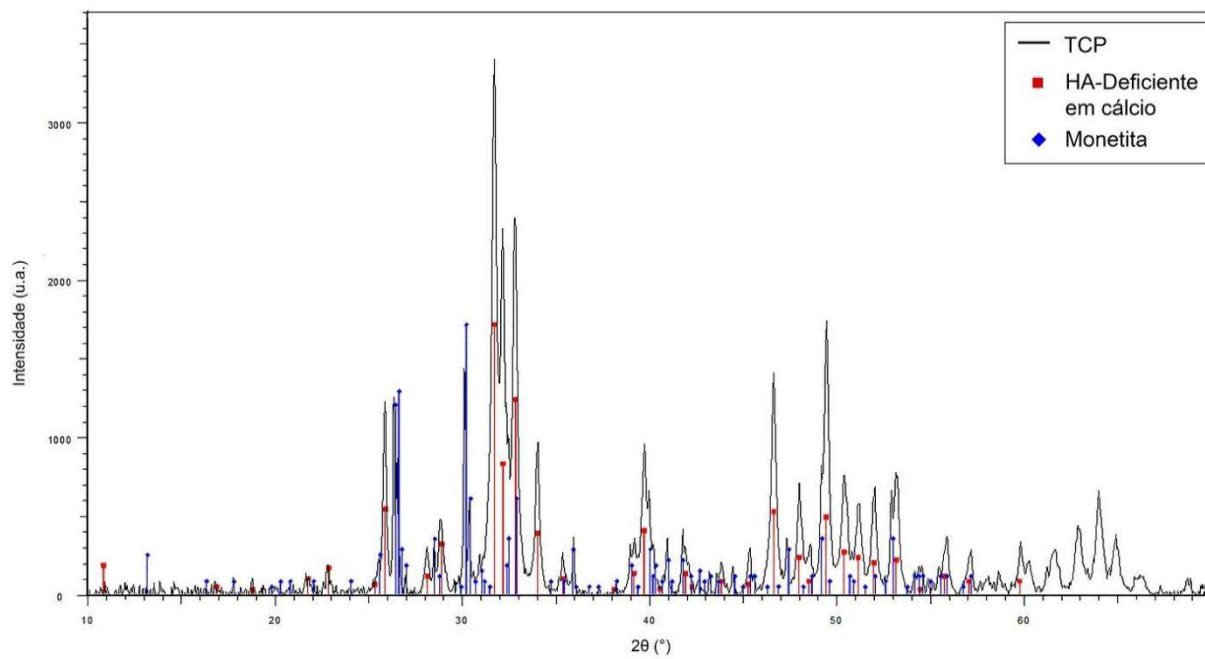


Figura 28 – Padrão de DRX do TCP comercial.

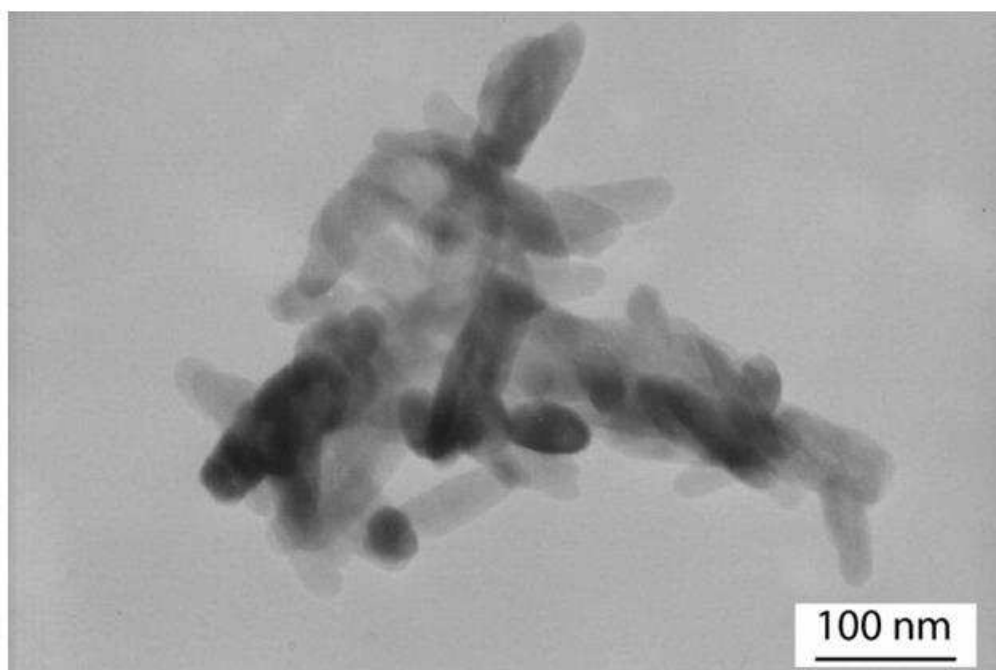


Figura 29 – Micrografia obtida por MET, do TCP comercial.

4.3 Policaprolactona (PCL)

A investigação da organização da cadeia polimérica é de fundamental importância, já que os parâmetros identificados estão diretamente relacionados às propriedades físico-químicas do material e suas possibilidades de processamento, sendo essenciais para a determinação do potencial de reatividade e compatibilidade com outros sistemas (LOPES; FASCIO, 2004).

Na Figura 30 é apresentado o espectro obtido por FTIR da PCL utilizado na pesquisa, que exibem as bandas de absorção de um poliéster linear alifático. Na Tabela 10 estão relacionadas as atribuições identificadas. É possível identificar inicialmente uma banda de forte intensidade a 1722 cm^{-1} , referente ao grupo carbonila. As bandas de absorção observadas a 2942 cm^{-1} e 2868 cm^{-1} , correspondem à deformação axial assimétrica e simétrica do grupo CH_2 , respectivamente. As bandas de absorção identificadas a 1170 cm^{-1} e 1165 cm^{-1} , correspondem à vibração OC-O simétrica. A banda característica da vibração COC assimétrica foi observada a 1249 cm^{-1} (PHILLIPSON; HAY; JENKINS, 2014; SENEDESE, 2011; ELZEIN et al., 2004). Segundo Coleman e Zarian (1979), a banda identificada a 1293 cm^{-1} é atribuída aos sítios estruturais C-C e C-O da fase cristalina da PCL. Ainda, a banda identificada a 1107 cm^{-1} corresponde às vibrações C-O e C-C da fase amorfa do polímero. Logo, as bandas a 1293 cm^{-1} e 1107 cm^{-1} podem ser utilizadas para investigar possíveis alterações na cristalinidade do polímero após o processamento.

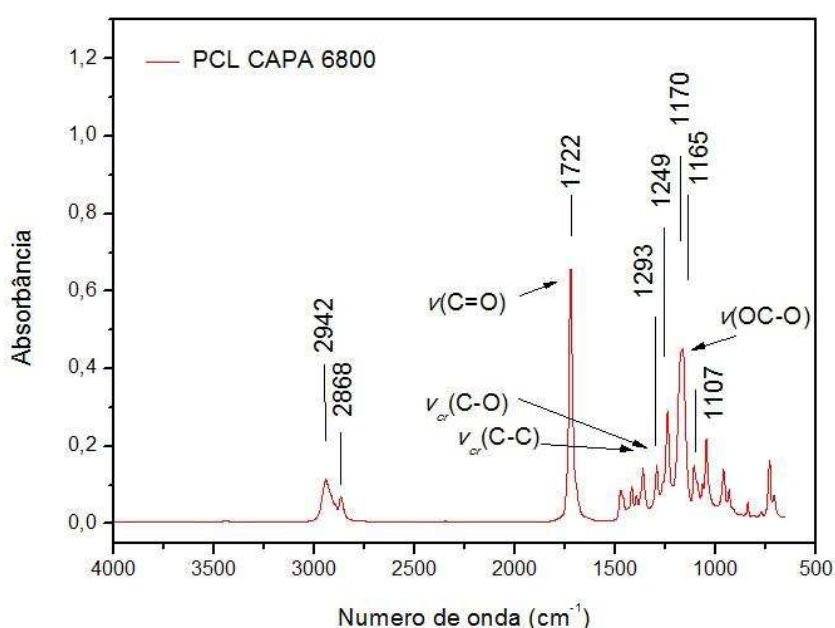


Figura 30 – Espectro de FTIR da policaprolactona.

Tabela 10 – Atribuições das frequências vibracionais observadas no espectro de FTIR apresentado na Figura 30.

Atribuições	Frequências vibracionais (cm ⁻¹)
CH ₂ (<i>v</i> _{as})	2942
CH ₂ (<i>v</i> _s)	2868
<i>v</i> (C=O)	1722
C-C e C-O (<i>v</i> _{cr})	1293
<i>v</i> _{as} (COC)	1249
<i>v</i> (OC-O)	1170
<i>v</i> (COC)	1165
C-C e C-O (<i>v</i> _{am})	1107

Utilizando a técnica de DSC, é possível obter informações referentes às variações de entalpia do material analisado. A curva de DSC obtida para a faixa de temperatura de 25 °C a 100 °C está representada na Figura 31. A temperatura de fusão do polímero é indicada pelo ponto máximo de liberação de calor do evento exotérmico observado, a ≈58,15 °C, valor este de acordo com a faixa apontada pelo fabricante e reportada na literatura (REZAEI; MOHAMMADI, 2013; DASH; KONKIMALLA, 2012; WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

A partir das curvas de TG/ATD referentes ao PCL *pellet* (Figura 32) observa-se que sua degradação térmica ocorre em três etapas. A primeira acontece de 40°C a ~245 °C, relativos à desidratação do material e volatilização de possíveis resíduos presentes, e início da degradação do polímero, ocorrendo uma perda de massa de ~0,5 %. Na segunda etapa ocorre a maior perda de massa (~90 %) até ~405 °C, havendo nesta fase uma reação de fragmentação de grupos éster da cadeia principal. De acordo com a pesquisa de Persenaire et al. (2001), nessa etapa ocorre a produção dos gases H₂O, CO₂ e ácido 5-hexenóico. A terceira etapa (até ~535 °C) é resultante de um processo de despolimerização, havendo completa degradação da PCL e perda de massa total. Esse comportamento também é reportado nas pesquisas de Agudelo (2015), Álvarez (2012) e Persenaire et al. (2001).

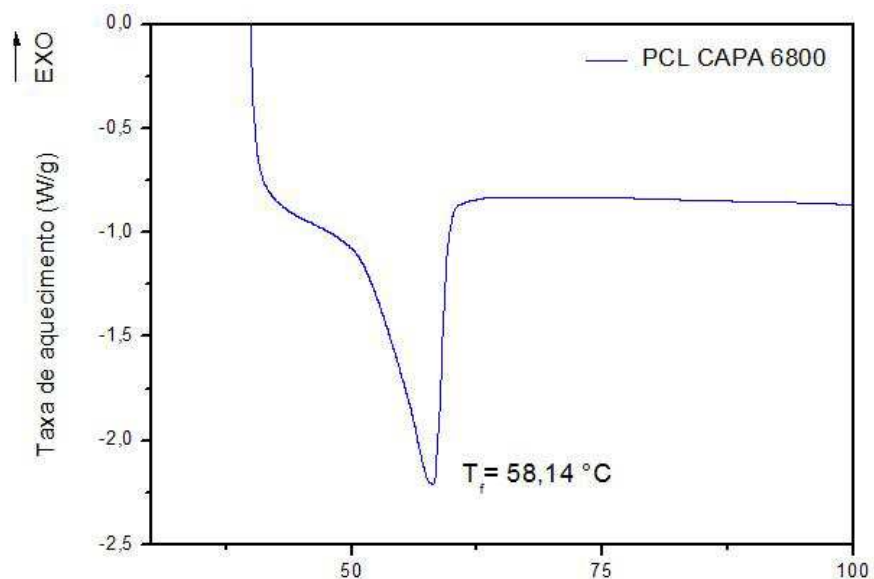


Figura 31 – Curva de DSC da policaprolactona CAPA 6800, de 25 °C a 100 °C.

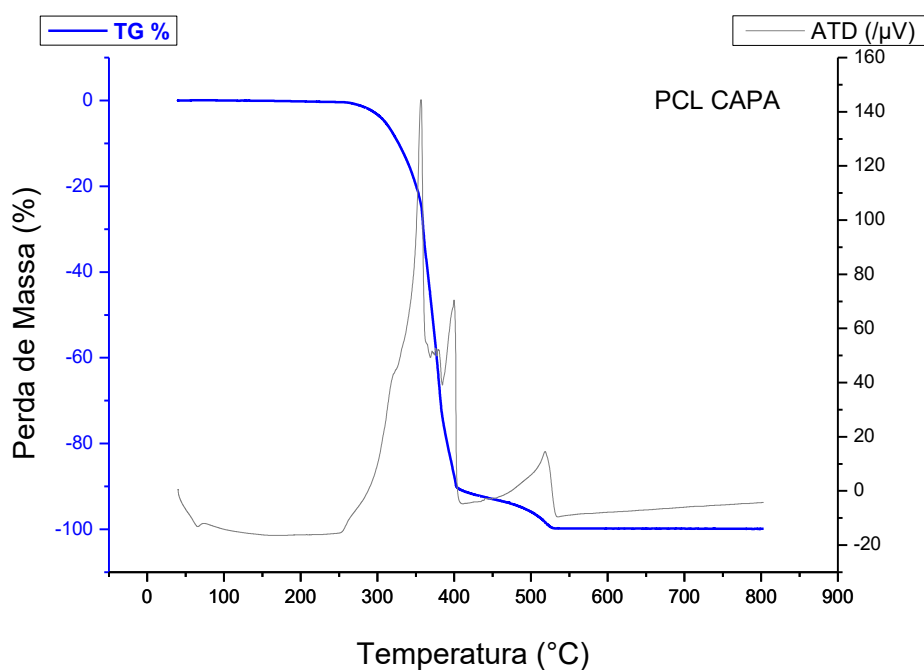


Figura 32 – Curvas TG/ATD da policaprolactona CAPA 6800.

Para avaliar a citotoxicidade da PCL adquirida, foi realizado o teste de viabilidade celular. O teste consistiu em quantificar a viabilidade das células após um período de 24 horas de incubação das membranas de PCL (10% m/v) com as células. Os resultados encontrados (Figura 33), demonstraram que a PCL não apresentou alteração na viabilidade celular. Os valores estão sumarizados na Tabela 11. Essa

análise *in vitro* é uma das variáveis mais utilizadas na literatura para descrever a biocompatibilidade de biomateriais e de moléculas bioativas.

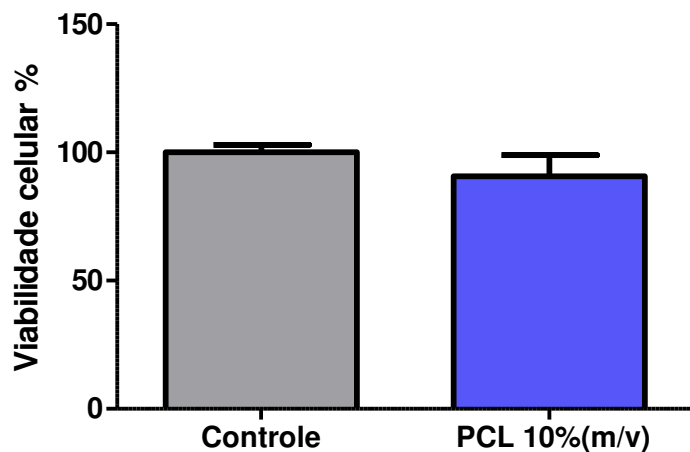


Figura 33 – Viabilidade dos macrófagos na presença das membranas de PCL.

Tabela 11 – Percentuais de viabilidade celular obtidos das membranas de PCL.

Amostra	Média (%)	Desvio Padrão (%)
Membranas de PCL	90,67	8,38
Controle	100	2,88

4.4 Esferas de policaprolactona

Esferas de PCL foram obtidas com sucesso aplicando-se o método de emulsão simples óleo/água com evaporação do solvente. Para todas as formulações experimentadas, foi verificada a ocorrência de um material de aspecto físico de um pó fino de cor aproximada ao branco (Figura 34). Aglomerados de esferas e fios poliméricos foram também obtidos, ainda que em pequenas quantidades, e descartados. Dentre as formulações apresentadas a seguir, apenas no teste 05 foram geradas maiores quantidades de aglomerados, macroscopicamente observadas. Ao final do processo, resíduos da solução polimérica foram verificados no recipiente inicial, mangueira e conector de gotejamento, retirados com facilidade após a evaporação do solvente. Os dados experimentais investigados estão descritos na Tabela 12. A morfologia das esferas de PCL foi estudada a partir da velocidade de agitação da emulsão, da concentração do agente estabilizante e da concentração da solução polimérica, utilizando análises por MEV.



Figura 34 – Aspecto físico das esferas de PCL obtidas por emulsão simples óleo/água.

Tabela 12 – Relação de testes realizados para obtenção de esferas de PCL e suas respectivas variáveis.

Número do teste	Conc. PCL (%m/v)	Razão nHA(ou TCP)/ Á. Esteárico (%m/m)	Conc. PVA (%m/v)	Velocidade de agitação inicial (rpm)	Parâmetros fixados
ESFERAS DE PCL (Ø 10-150 µm)					
01	10,0	—	2,5	5000	Antiespumante: 0,1 %
02	10,0	—	2,5	7000	(v/v)
03	10,0	—	2,5	10000	Proporção óleo/água:
04	10,0	—	2,0	10000	1/20 – 20 mL/400 mL
05	10,0	—	1,5	10000	Velocidade de agitação
06*	10,0	—	2,5	10000	final: 2000 rpm
07	7,5	—	2,5	10000	Tempo de agitação
08	5,0	—	2,5	10000	inicial/final: 15 min./ 80 min.
* Aumento do volume Óleo/Água para 30 mL/600 mL Fluxo de gotejamento 3 mL/min.					

4.4.1 Influência da velocidade de agitação da emulsão

As micrografias obtidas por MEV para os Testes 01, 02 e 03, em diferentes aumentos, estão apresentadas na Figura 35. Foi observado a predominância de partículas de formato esférico (razão de aspecto ≈ 1), densas e com superfície lisa. Para cada velocidade de agitação empregada foram obtidas esferas em diferentes faixas de diâmetro. As faixas produzidas estão relacionadas na Tabela 13, e seus respectivos histogramas estão apresentados na Figura 36. Com o aumento da velocidade de 5000 rpm para 7000 rpm foi observado que, em ambas velocidades, ~55 % das esferas apresentaram diâmetro de até 20 µm. A 7000 rpm foram produzidas esferas de até 140 µm, enquanto que a 5000 rpm esse valor foi de até 120 µm. Com o aumento para 10000 rpm, ~70 % das esferas apresentaram até 20 µm e diâmetro máximo de até ~120 µm. Os resultados indicam que, nessas condições, maiores velocidades de emulsão induzem a menores diâmetros das esferas, não havendo diferenças significativas entre 5000 e 7000 rpm.

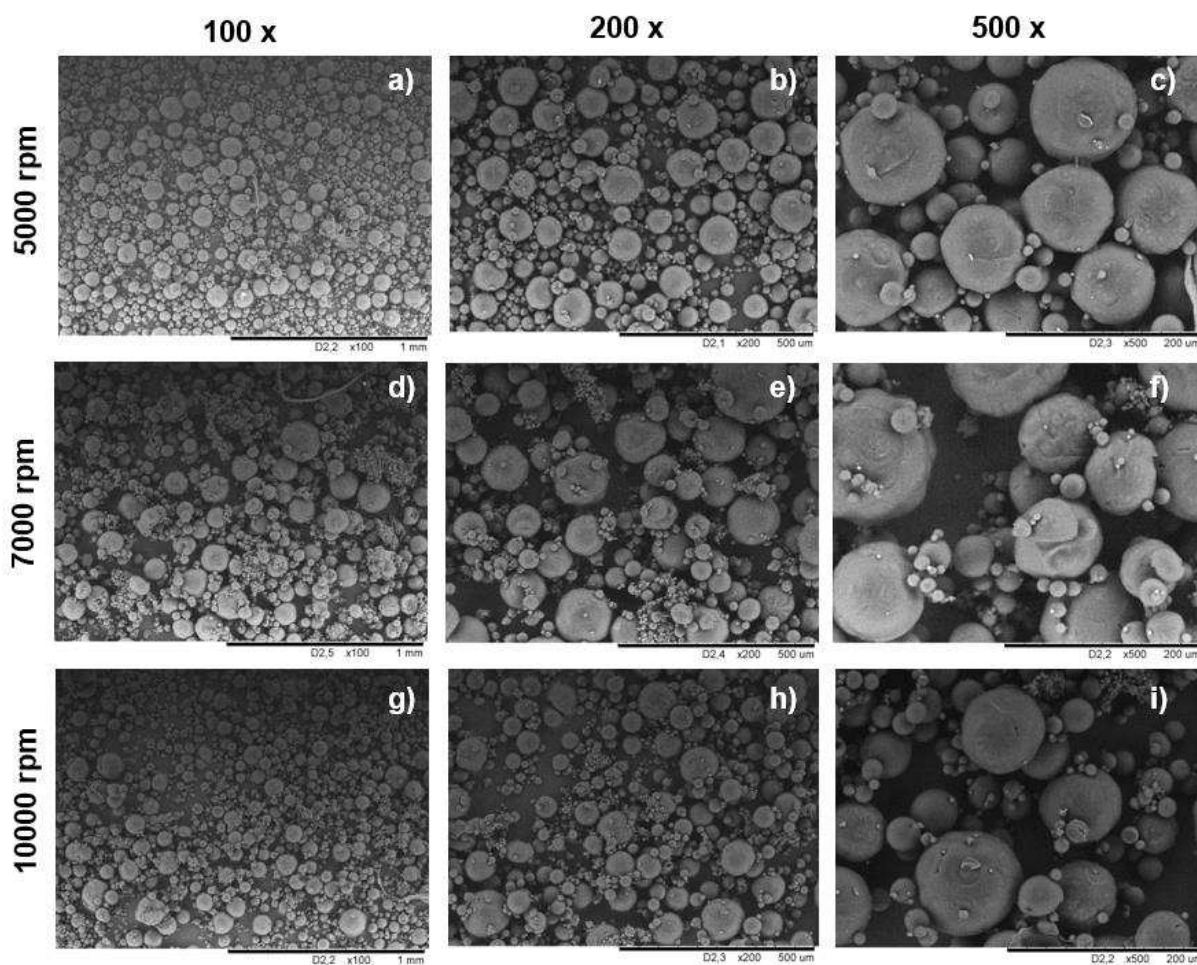


Figura 35 – Micrografias por MEV de esferas de PCL 10 % obtidas com diferentes velocidades de agitação: 5000 rpm (a, b, c); 7000 rpm (d, e, f); 10000 (g, h, i).

Tabela 13 – Faixa de diâmetro das esferas obtidas dos testes 01, 02 e 03, para avaliação da influência de diferentes velocidades de agitação.

	Velocidade (rpm)	Faixa de diâmetro (μm)	Intervalo de maior frequência (μm)/ Quantidade de partículas (%)
T01	5000	5-120	$\leq 20/\sim 55$
T02	7000	5-140	$\leq 20/\sim 55$
T03	10000	5-120	$\leq 20/\sim 70$

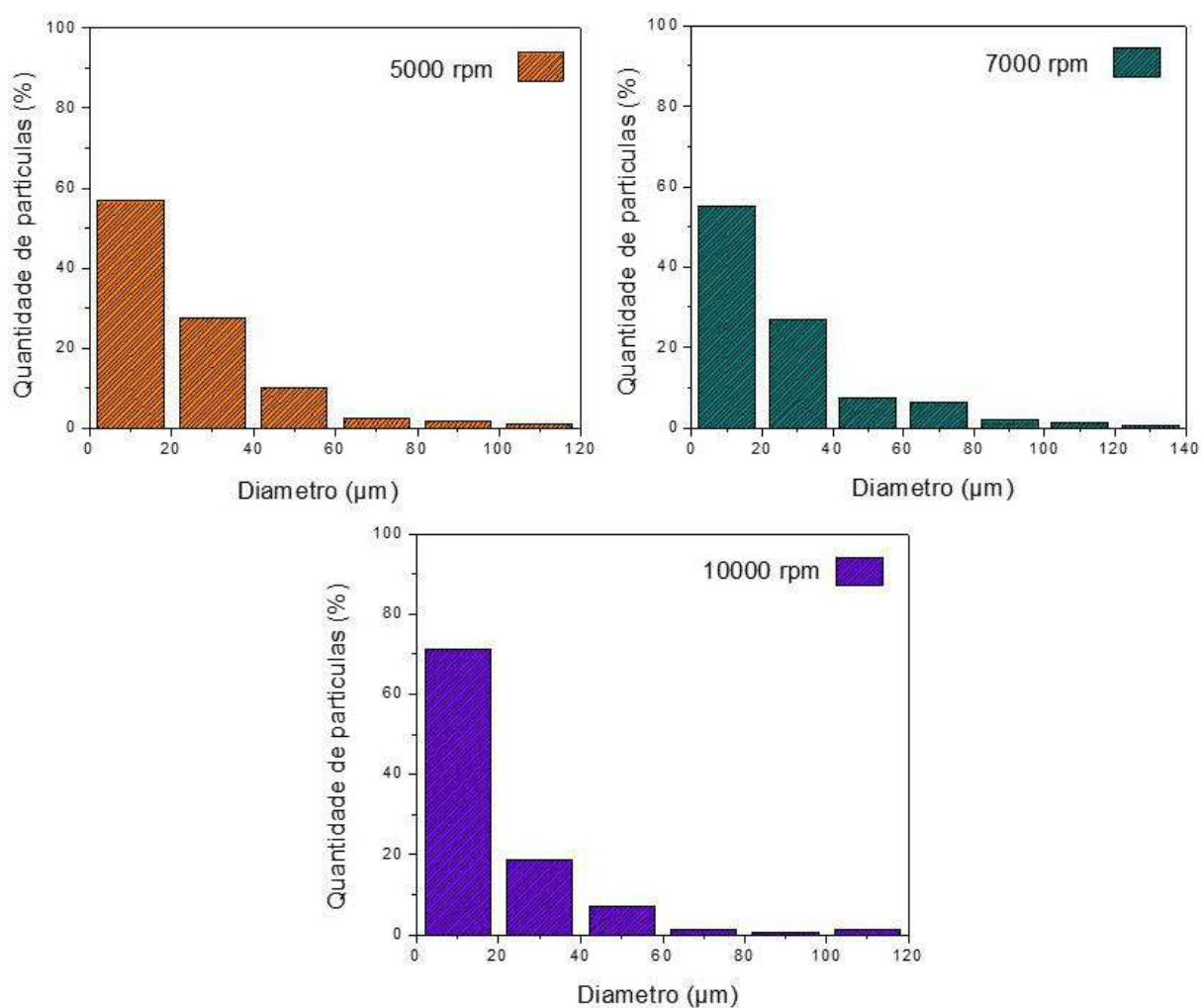


Figura 36 – Histogramas referentes ao diâmetro das esferas medido para os Testes 01, 02 e 03, para avaliação da influência de diferentes velocidades de agitação.

4.4.2 Influência da concentração do agente emulsificante (PVA)

Foi avaliado a influência da concentração de PVA na morfologia das esferas de PCL, a 1,5 % (m/v), 2,0 % (m/v) e 2,5 % (m/v), e as micrografias obtidas por MEV estão apresentadas na Figura 37. De acordo com as micrografias, observa-se a predominância de partículas esféricas para todas as concentrações, sendo que a 1,5 % percebe-se a presença de esferas irregulares e a formação de aglomerados. De acordo com os histogramas apresentados na Figura 38, a fração de esferas de até 20 µm diminuiu de ~70 % (2,5 %) para ~35 % (1,5 %), enquanto a fração compreendida entre 20-40 µm, aumentou de ~20 % (2,5 %) para ~40 % (1,5 %) (Tabela 14). Esses resultados apontam que a diminuição da concentração de PVA na fase contínua, ocasionou a produção de faixas de diâmetro mais largas, assim como a formação de esferas irregulares.

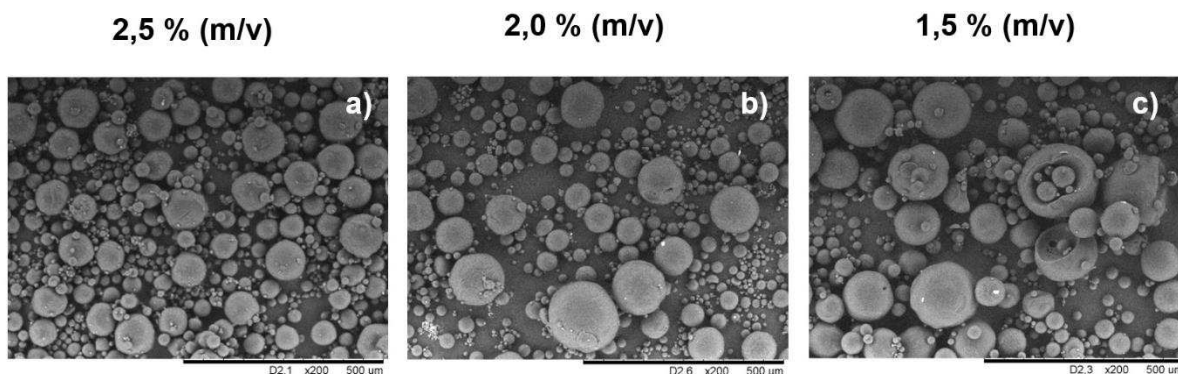


Figura 37 – Micrografias por MEV de esferas de PCL 10 % obtidas em diferentes concentrações de solução aquosa de PVA: (a) 2,5 %(m/v); (b) 2,0 %(m/v); (c) 1,5 %(m/v).

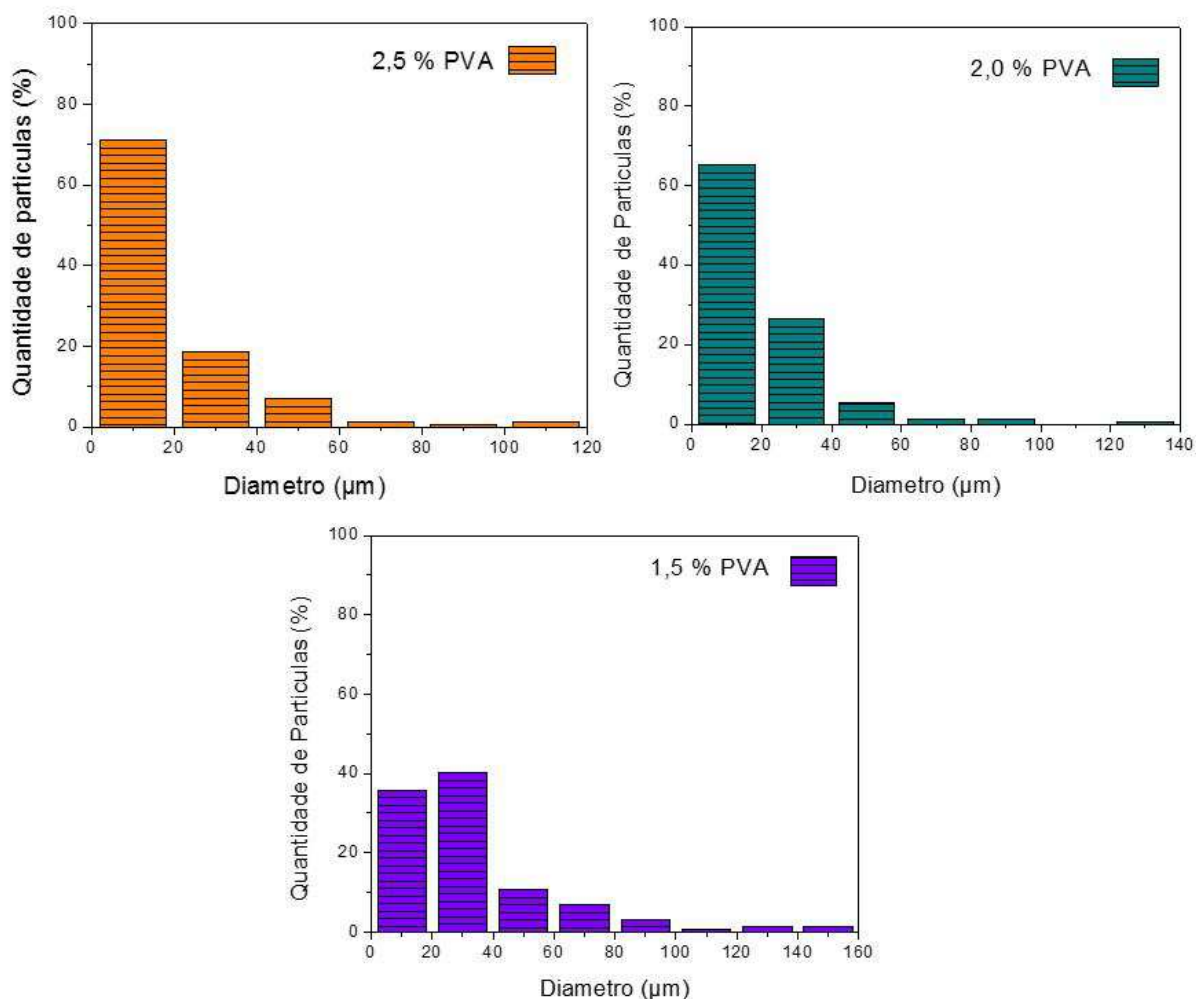


Figura 38 – Histogramas referentes ao diâmetro das esferas calculado para os Testes 03, 04 e 05, para avaliação da influência de diferentes concentrações de PVA.

Tabela 14 – Faixa de diâmetro das esferas obtidas dos testes 01, 02 e 03, para avaliação da influência de diferentes concentrações de PVA.

	Concentração de PVA (% m/v)	Faixa de diâmetro (μm)	Intervalo de maior frequência (μm)/ Quantidade de partículas (%)
T01	2,5	5-120	$\leq 20/\sim 70$
T02	2,0	5-140	$\leq 20/\sim 65$
T03	1,5	5-160	20-40

4.4.3 Influência da concentração de PCL

Na sequência de testes realizados, também foi investigada a influência de diferentes concentrações de PCL na solução polimérica inicial, a 5 %(m/v), 7,5 %(m/v) e 10 %(m/v). As micrografias obtidas por MEV, em diferentes aumentos, estão apresentadas na Figura 39.

Foram identificadas partículas de formato esférico em todas as formulações, havendo diferenciações na superfície das esferas conforme a mudança na concentração de PCL. Nesse caso, com o aumento da concentração são geradas superfícies mais rugosas. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 15 e na Figura 40, com o aumento da concentração foram geradas distribuições de tamanho mais estreitas. Para 10 % de PCL, ~ 70 % das esferas apresentaram diâmetro de até 20 μm , enquanto que para 7,5% esse valor caiu para ~ 60 %. Para 5 % de PCL, ~ 55 % das esferas exibiram diâmetro entre 20-40 μm . A partir desses resultados, pode-se inferir que com o aumento da concentração de PCL em solução, distribuições de tamanho mais largas foram produzidas.

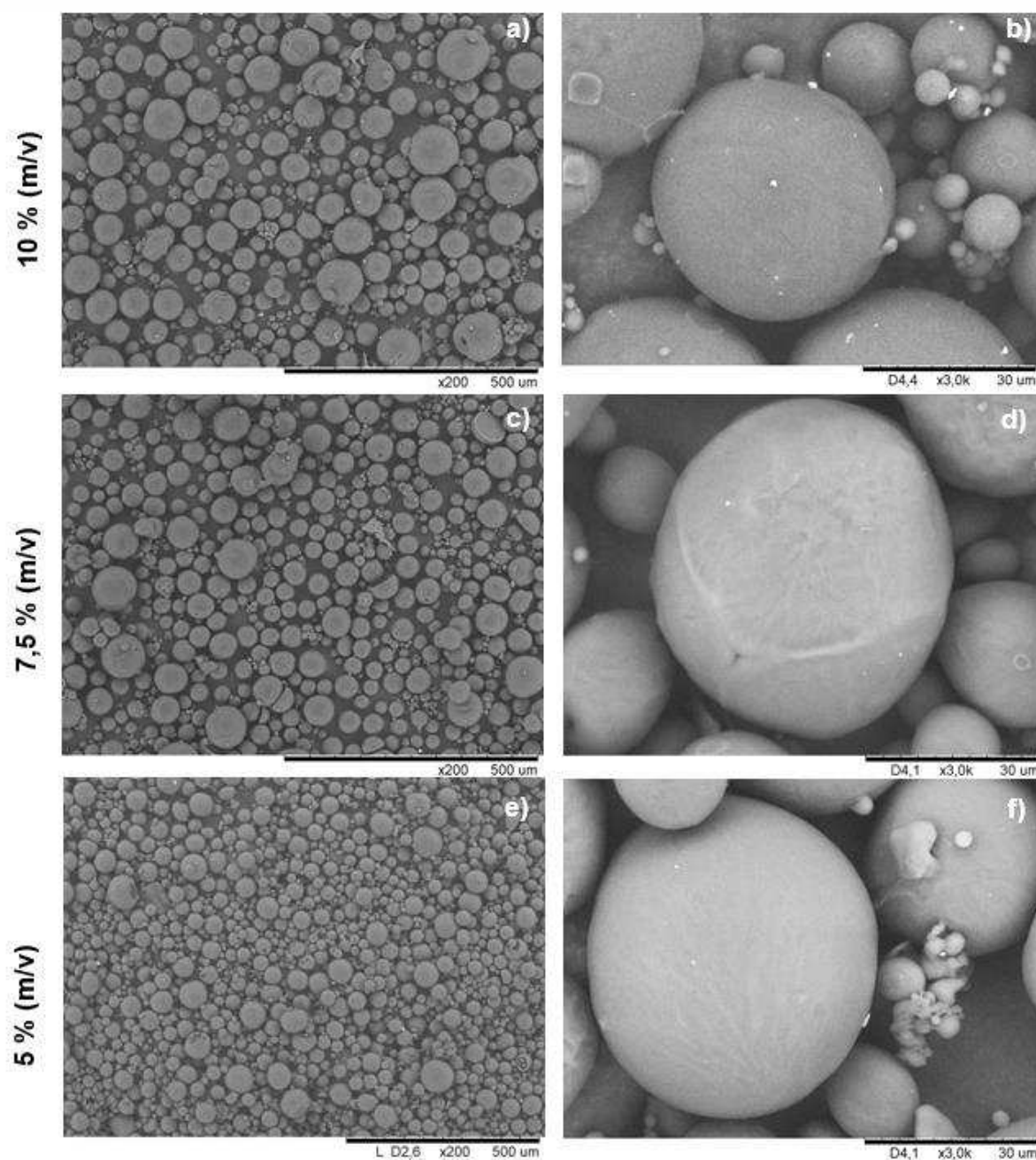


Figura 39 – Micrografias por MEV de esferas obtidas em diferentes concentrações de PCL: 10 % (a, b); 7,5 % (c, d); 5 % (e, f).

Tabela 15 – Faixas de diâmetro das esferas obtidas dos testes 06, 07 e 08, para avaliação da influência de diferentes concentrações de PCL.

	Concentração de PCL (% m/v)	Faixa de diâmetro (µm)	Intervalo de maior frequência (µm)/ Quantidade de partículas (%)
T06	10	5-120	≤ 20/~70
T07	7,5	5-60	≤ 20/~60
T08	5	5-60	20-40/~55

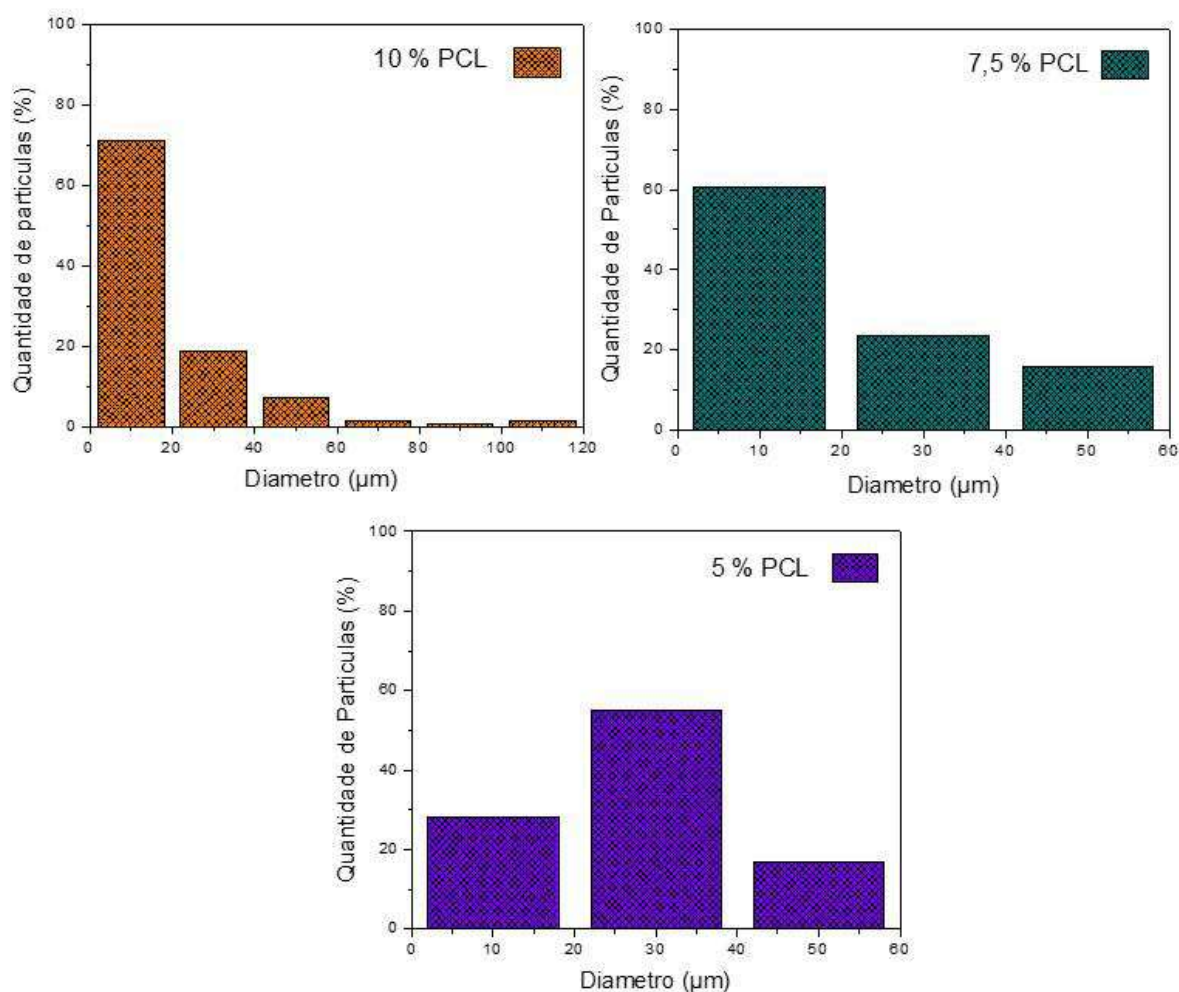


Figura 40 – Histogramas referentes ao diâmetro das esferas obtidos nos testes 06, 07 e 08, para avaliação da influência de diferentes concentrações de PCL.

4.4.4 Morfologia interna das esferas

Para análise da estrutura interna das esferas obtidas, estas foram seccionadas (conforme descrito no tópico 3.6.1). Na Figura 41 observa-se a superfície de secção transversal, a qual apresenta estrutura predominantemente densa, não expressando diferenças significativas em sua estrutura interna independentemente das variáveis experimentadas.

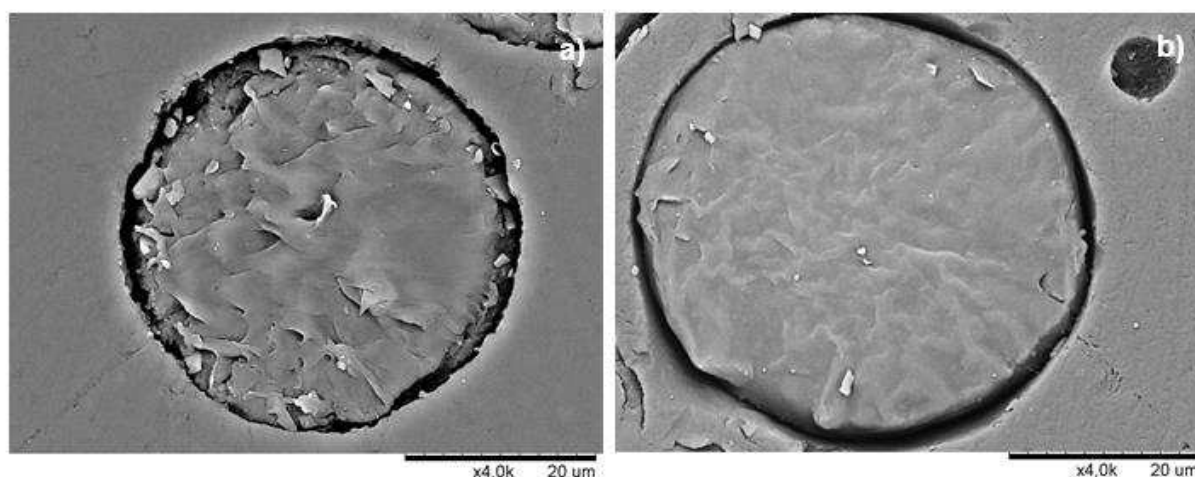


Figura 41 – Micrografias por MEV de esferas PCL 10 % obtidas com diferentes velocidades de agitação: (a) 5000 rpm; (b) 10000 rpm.

4.4.5 *Rendimento*

Os rendimentos foram calculados com base na equação 2 para os testes 06, 07 e 08. Devido à similaridade do aspecto físico das esferas obtidas para todas as formulações, observado macroscopicamente, o cálculo do rendimento foi restringido a esses testes, para fins de comparação ao rendimento da esferas produzidas na etapa 02. A Tabela 16 sumariza os resultados percentuais, apresentados na forma de valor médio (n=3) e desvio padrão.

Todas as formulações avaliadas apresentaram rendimento acima de 60 %, resultado aceitável tendo em vista o método de produção aplicado, havendo aumento do rendimento conforme a diminuição da concentração de PCL. As perdas se devem aos aglomerados formados e aos resíduos de solução polimérica remanescentes no equipamento de síntese.

Tabela 16 – Rendimento obtido para os testes 06, 07 e 08, da produção de esferas por emulsão simples óleo/água (Média \pm desvio padrão).

	Concentração de PCL (% m/v)	Rendimento (%)
T06	10	62,2 \pm 4,2
T07	7,5	64,4 \pm 1,8
T08	5	66,2 \pm 5,5

▪ **Condições estabelecidas**

A partir desse estudo foram estabelecidas as condições mais apropriadas para o processamento de microesferas de PCL, tais como: concentração de PCL de 10 % (m/v)¹, concentração de PVA de 2,5 % (m/v), proporção em volume óleo/água (1/20), utilizando os volumes de 30 mL e 600 mL, e velocidade de agitação inicial de 10000 rpm, sendo o teste 06 considerado como referência.

4.5 Esferas de policaprolactona/fosfato tricálcico (PCL/TCP) (Etapa 01)

Os testes para produção de esferas de PCL/nHA foram iniciados utilizando o PCL em combinação a um material comercial, o TCP, a fim de economizar as nanopartículas de HA produzidas na pesquisa. Após a análise dos testes realizados para obter esferas de PCL, foram estabelecidos alguns parâmetros experimentais, tais como a concentração de PVA e a proporção em volume óleo/água. No entanto, o conteúdo de TCP a ser adicionado, juntamente com a velocidade de agitação do sistema foram investigados, já que a adição das partículas sólidas interfere diretamente na estabilidade da emulsão.

A partir do processo de emulsão S/O/A foi obtido com êxito um material de aspecto físico pulverulento, branco (Figura 42). Durante o processo, aglomerados do compósito foram produzidos juntamente com as esferas em todas as condições, sendo que o teste 04 apresentou menos aglomerados. Por se tratar de uma etapa exploratória do método de processamento, o rendimento não foi calculado para estas formulações. Com a finalidade de observar a possível influência das variáveis de processamento na morfologia das partículas, foram obtidas micrografias por MEV das esferas em diferentes magnificações. Os dados experimentais estão relacionados na Tabela 17.

¹ Neste trabalho, as esferas de PCL serão utilizadas como controle para fins de comparação com as esferas de PCL/nHA. Por isso, a concentração de PCL de 10 % foi escolhida com base nos resultados mais favoráveis obtidos também nas Etapas 02 e 03.



Figura 42 – Aspecto físico das esferas de PCL/TCP obtidas por emulsão sólido/óleo/água.

Tabela 17 – Relação de testes realizados para obtenção de esferas de PCL/TCP e suas respectivas variáveis.

No. do teste	Conc. PCL (%m/v)	Razão TCP/ Á. Esteárico (%m/m)	Conc. PVA (%m/v)	Velocidade de agitação inicial (RPM)	Parâmetros fixados
ESFERAS DE PCL/TCP (Ø 10-150 µm)					Antiespumante: 0,1 % (v/v)
T01	10,0	28,5/ --	2,5	5000	Proporção óleo/água: 1/20 – 20 mL/400 mL
T02	10,0	23,0/ --	2,5	5000	Velocidade de agitação final: 2000 rpm
T03	10,0	23,0/ 5	2,5	7000	Tempo de agitação inicial/final: 15 min./ 80 min.
T04*	10,0	23,0/ 5	2,5	10000	
* Aumento do volume Óleo/Água para 30 mL/600 mL		Fluxo de gotejamento 2 mL/min.			

4.5.1 Influência da adição de TCP

A velocidade de agitação inicial foi de 5000 rpm, a concentração de PCL de 10 % (m/v), variando-se o conteúdo de TCP adicionado em 28,5 % e 23 % (m/m), sem tratamento com ácido esteárico, correspondentes aos Testes 01 e 02. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 43.

De acordo com as micrografias, foram obtidas partículas de formato esférico ou aproximado, predominantemente densas e com superfície rugosa. Diferentemente das esferas de PCL, estas apresentaram ranhuras em sua superfície, com pontos semelhantes a concavidades (Figura 43d) que podem ser originados devido aos espaços ocupados pelo TCP dissolvido da superfície após adição do HCl. É importante ressaltar que, com a adição da HA ao sistema, foi gerado um maior número de partículas irregulares (Figura 43b). A partir dos histogramas obtidos apresentados

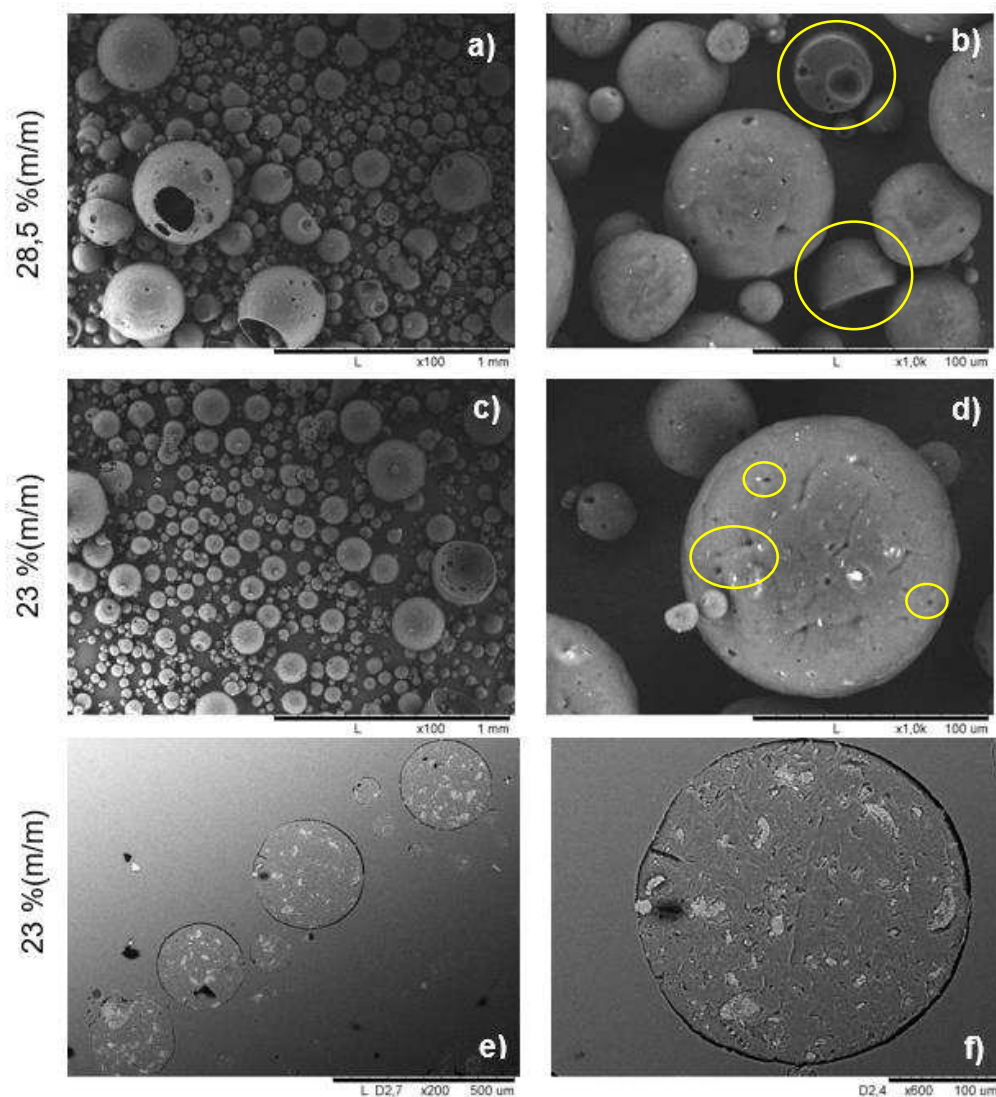


Figura 43 – Micrografias por MEV de esferas de PCL/TCP obtidas com diferentes conteúdos de TCP: 28,5 % (a) 100x, (b) 1000x; 23 % (c) 100x, (d) 1000x, (e) secção 200x, (f) secção 800x.

na Figura 44 (a,b) e sumarizados na Tabela 18, foram obtidas maiores frações de esferas, ~40 % (a 28,5 %) e ~50 % (a 23 %), para a faixa de diâmetro de 30-50 μm , com distribuição de tamanho mais estreita a 23 % de TCP. Quanto à estrutura interna das esferas, foi observada a efetividade da incorporação do TCP na forma de aglomerados, com comprimento médio de 8 μm , em uma faixa de 1-50 μm , distribuídos por toda a partícula. Ainda, a partir do histograma obtido (Figura 44c), ~75 % dos aglomerados apresentaram comprimento de até 10 μm .

Comparando-se estes resultados aos obtidos para as esferas de PCL sob as mesmas condições, observa-se que faixas de diâmetro mais estreitas foram produzidas com a adição do TCP.

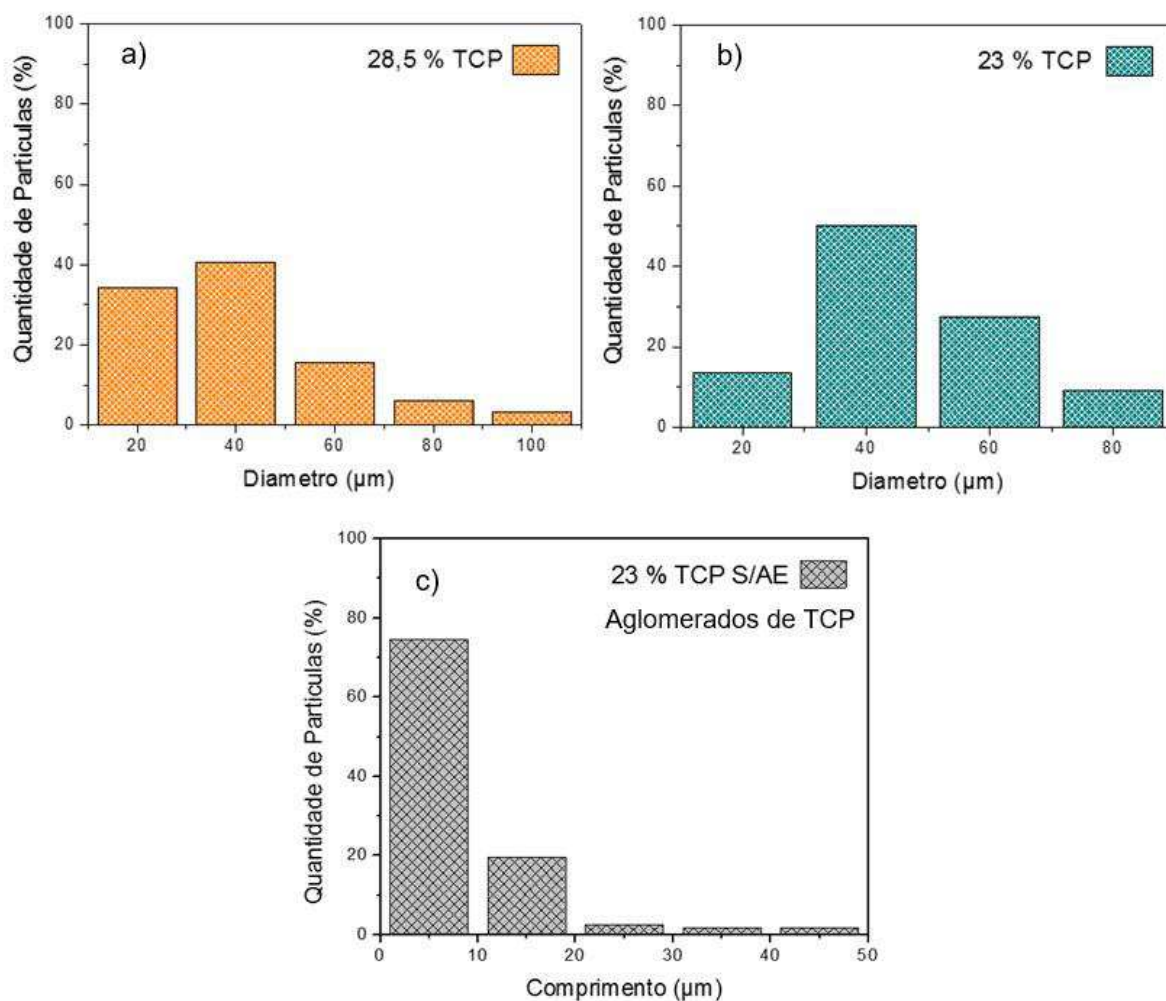


Figura 44 – Histogramas referentes ao diâmetro das esferas obtidos nos testes 01(a) e 02(b), para avaliação da influência de diferentes conteúdos de TCP; e ao comprimento dos aglomerados presentes no interior das esferas obtidos do teste 02 (c).

Tabela 18 – Faixas de diâmetro obtidas dos testes 01 e 02, para avaliação da influência de diferentes conteúdos de TCP, e faixa de comprimento dos aglomerados de TCP no interior das esferas para o teste 02.

	Conteúdo de TCP (% m/m)	Faixa de diâmetro (µm)	Intervalo de maior frequência (µm)/ Quantidade de partículas (%)	Faixa de comprimento dos aglomerados de TCP (µm)
T01	28,5	5-110	30-50/~40	-
T02	23,0	5-90	30-50/~50	0,5-50

4.5.2 Influência da velocidade de agitação com a adição de TCP

Foi estabelecida a concentração de PCL de 10 %, com adição de TCP a 23% (tratado com ácido esteárico), e velocidade de agitação inicial de 7000 rpm e 10000 rpm, correspondentes aos testes 03 e 04. As consequências na morfologia das esferas foi avaliada por MEV e os resultados obtidos estão apresentados na Figura

45. Os respectivos histogramas podem ser visualizados na Figura 46, com os dados sumarizados na Tabela 19.

Pode-se observar que foram produzidas partículas esféricas, e que a 10000 rpm formou-se uma menor quantidade de partículas irregulares. Assim como nos testes realizados para obtenção de esferas de PCL, com o aumento da velocidade de agitação, foram produzidas faixas de diâmetro mais estreitas, o que demonstra a semelhança de comportamento da emulsão, independentemente da adição do TCP, para esta variável. Em contrapartida, uma distribuição de tamanho mais larga foi observada a 7000 rpm. A 7000 rpm, ~85 % das esferas apresentaram diâmetro de até 70 μm , e a 10000 rpm, ~80 % exibiram até 50 μm . Internamente, as esferas apresentaram aglomerados de TCP medindo uma faixa de comprimento entre 0,5-20 μm . As composições com TCP tratado com AE exibiram distribuição de tamanho dos aglomerados mais estreita, com ~98 % medindo até 10 μm , quando comparados com o TCP modificado. Essa redução do tamanho dos aglomerados também pode estar associada ao aumento da velocidade de agitação entre os testes 02 e 03.

Tabela 19 – Dados de faixa de diâmetro das esferas obtidos dos testes 03 e 04, para avaliação da influência de diferentes velocidades de agitação, e faixa de comprimento dos aglomerados de TCP no interior das esferas para o teste 03.

	Velocidade de agitação (rpm)	Faixa de diâmetro (μm)	Intervalo de maior frequência (μm)/ Quantidade de partículas (%)	Faixa de comprimento dos aglomerados de TCP (μm)
T03	7000	5-150	50-70/~30	0,5-20
T04	10000	5-110	30-50/~50	-

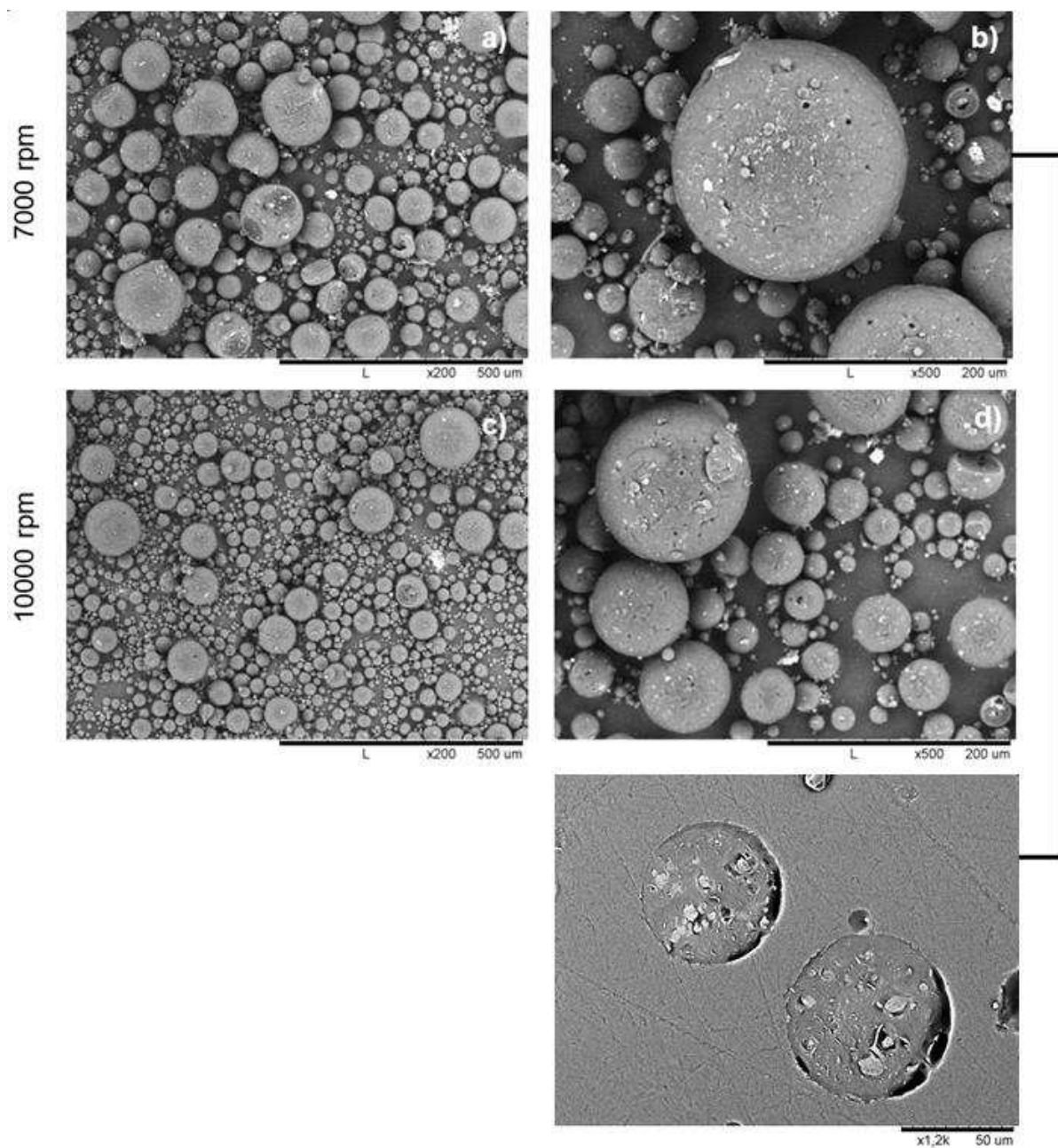


Figura 45 – Micrografias por MEV de esferas de PCL/TCP 23 % obtidas com diferentes velocidades de agitação: 7000 (a) 200x, (b) 500x; 10000 (c) 200x, (d) 500x.

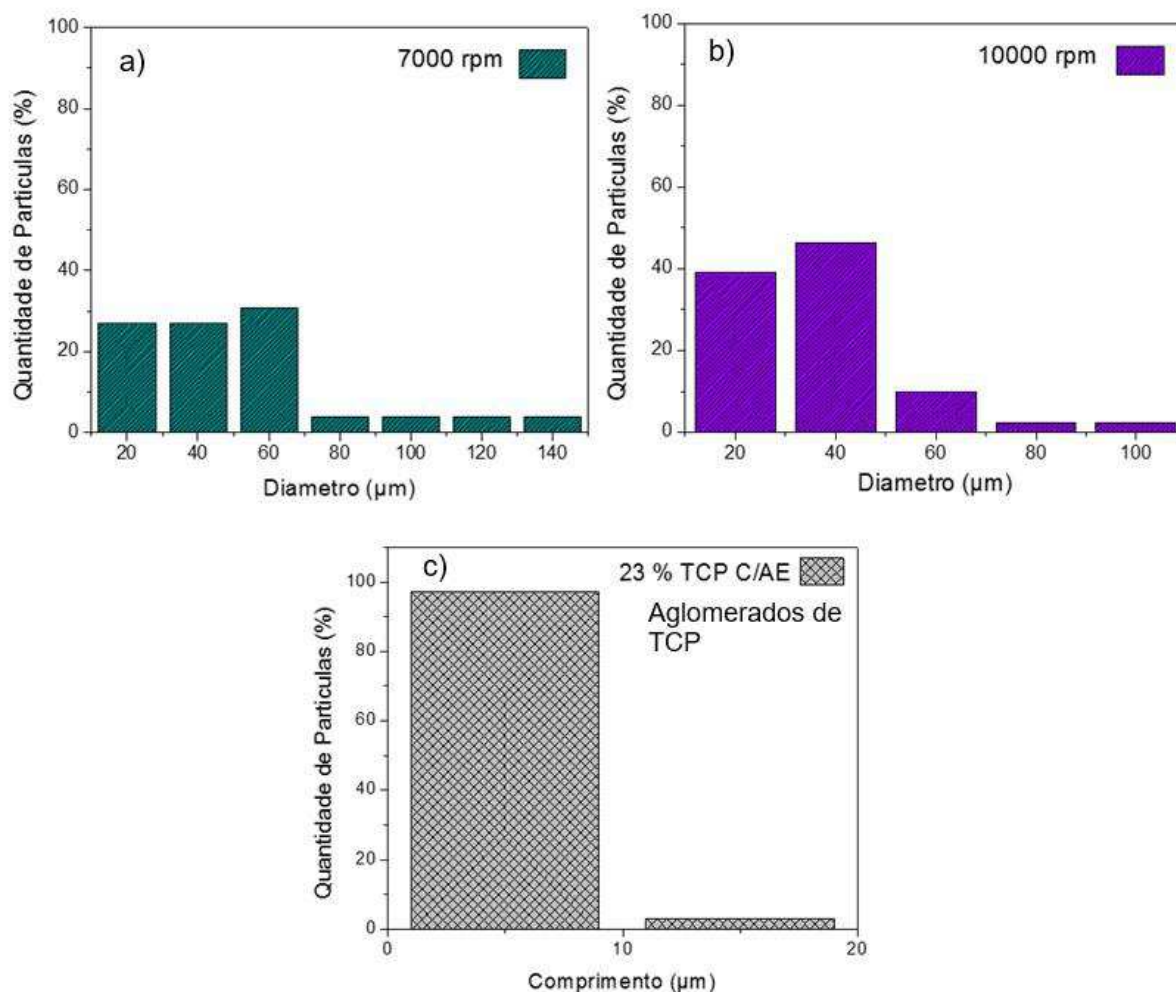


Figura 46 – Histogramas referentes ao diâmetro das esferas obtidos nos testes 03(a) e 04(b), para avaliação da influência de diferentes velocidades de agitação; e ao comprimento dos aglomerados presentes no interior das esferas obtidos do teste 03 (c).

4.5.3 Influência do tratamento do TCP com ácido esteárico

No intuito de investigar a efetividade do tratamento com ácido esteárico na incorporação do TCP à matriz polimérica nas esferas PCL/TCP, a análise por TG foi empregada. Esta análise é baseada na contínua medição de peso do material analisado, enquanto este é submetido ao aumento de temperatura. Altas temperaturas resultam na decomposição do polímero. No caso do compósito estudado, com a decomposição do PCL é possível identificar o percentual de massa remanescente, relativo ao TCP presente no material. As curvas de TG obtidas das esferas de PCL/TCP em comparação às esferas de PCL estão apresentadas na Figura 47. As curvas referentes às esferas de PCL e PCL/TCP indicam a ocorrência das mesmas etapas de degradação descritas para o PCL *pellet* no tópico 4.3. Na Tabela 20 estão relacionados os conteúdos percentuais teóricos e reais de TCP nas esferas. Mesmo

que a diferença não tenha sido significativa (de 16,3 % para 16,7 %), com o tratamento do TCP com AE obteve-se a incorporação de maior conteúdo deste à matriz polimérica.

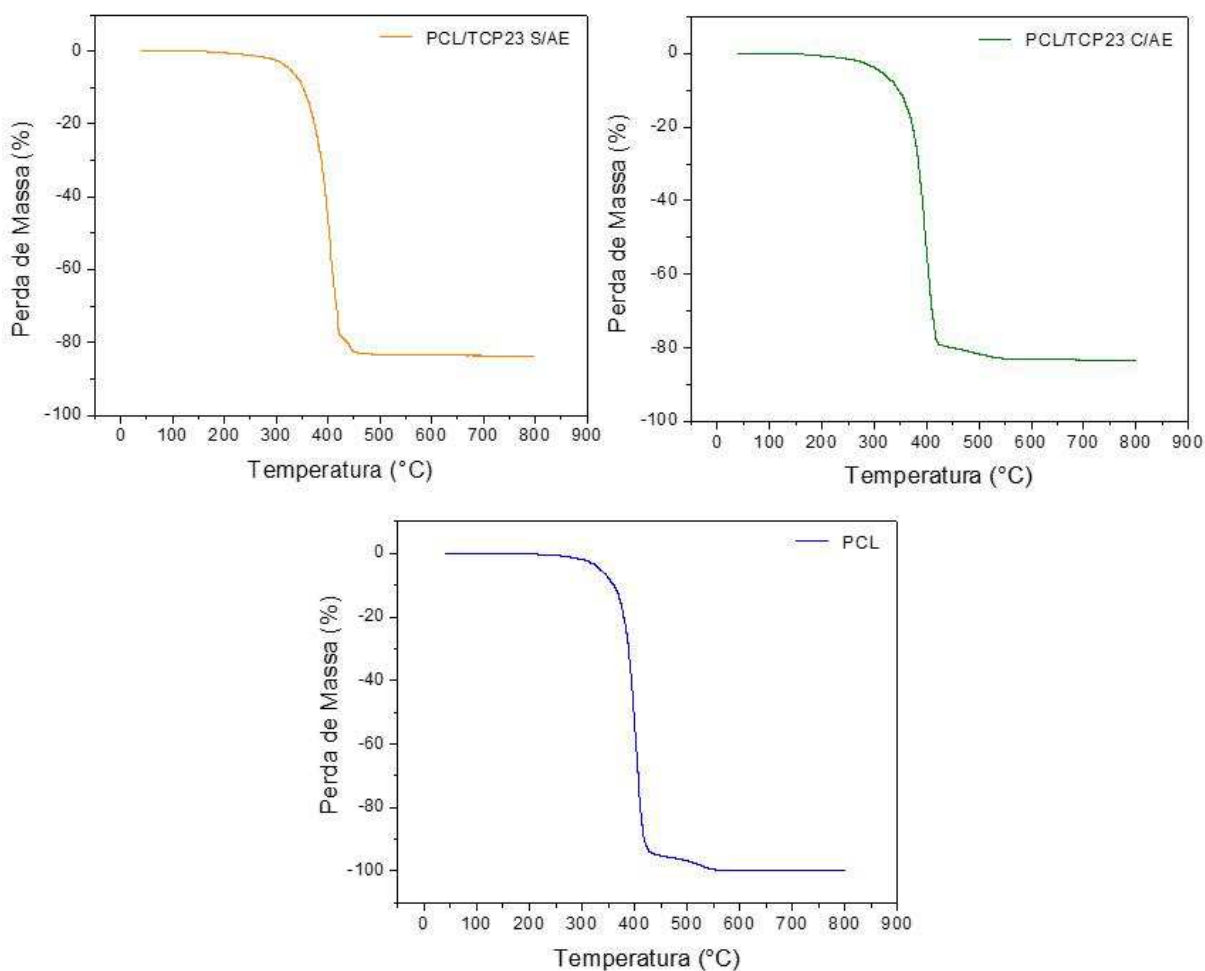


Figura 47 – Curvas TG/DTG do PCL *pellet* (a), esferas de PCL 10 % (m/v) (b); e esferas de PCL/TCP com 23 % (m/m) de conteúdo de TCP, antes (c) e após (d) tratamento com ácido estéarico.

Tabela 20 – Dados das esferas de PCL/TCP 23% com e sem AE, obtidas na Etapa 01, relacionando o conteúdo teórico (inicial) e real no compósito, obtido por TG.

	Conteúdo de nHA no compósito (%)	
	Teórico	Real
T02	23 (S/AE)	16,3
T03	23 (C/AE)	16,7

Os resultados obtidos para as esferas de PCL/TCP, comparados aos obtidos para as esferas de PCL, indicaram que a adição de partículas sólidas à emulsão interfere na sua estabilidade, já que o material cerâmico, pela sua polaridade, tende a

migrar para a interface óleo/água, interferindo na morfologia final do material produzido (CHEVALIER; BOLZINGER, 2013). Além disso, essa estabilidade é modificada conforme a variação na morfologia dessas partículas e nas suas características físico-químicas. Os resultados obtidos da caracterização das nHA sintetizadas e do TCP comercial, demonstraram as suas diferenças quanto à composição e morfologia, sendo o TCP um material com superfície específica aproximadamente 5 vezes menor que as nHA, além de mais solúvel. Dessa forma, a Etapa 01 foi considerada como exploratória do método, e as discussões acerca da emulsão S/O/A foram embasadas nos experimentos das Etapas 02 e 03, para os compósitos PCL/nHA.

▪ **Condições estabelecidas**

Com os testes realizados nesta etapa, algumas condições experimentais apropriadas puderam ser estabelecidas para o início da produção de esferas de PCL/nHA: a velocidade de agitação inicial de 10000 rpm, a necessidade de melhorar o rendimento de HA no experimento, de avaliar a influência da mudança de concentração de PCL no encapsulamento das nHA e dos diferentes conteúdos de nHA.

4.6 Esferas de policaprolactona/nanohidroxiapatita (PCL/nHA)

4.6.1 Esferas de PCL/nHA (Etapa 02)

Compósitos de PCL/nHA foram obtidos por meio do método de emulsão S/O/A com evaporação do solvente. Nesta etapa, os valores de concentração do PVA e a velocidade de agitação inicial foram mantidos constantes, variando-se a concentração de PCL e de nHA das dispersões. As formulações experimentadas estão listadas na Tabela 21. Um pó de coloração branca foi produzido (Figura 48) e aglomerados do compósito se formaram em todas as composições, mesmo que em pequenas quantidades, com maiores incidências nos testes 01 e 03. Formulações com PCL 10 % e nHA 28,5 % não foram alcançadas, devido a excessivas aglomerações. Macroscopicamente, as dispersões com nHA tratadas com ácido esteárico exibiram mais estabilidade, não ocorrendo a sedimentação de partículas

antes da finalização do gotejamento. Porém, ao término do processo, após a filtragem à vácuo, quantidades consideráveis de nHA permaneceram não incorporadas. Optou-se, então, pela adição do HCl ao sistema, para dissolução do excesso de nHA.



Figura 48 – Aspecto físico das esferas de PCL/nHA (Etapa 02) obtidas por emulsão sólido/óleo/água.

Tabela 21 – Relação de testes realizados para obtenção de micropartículas de PCL/nHA e suas respectivas variáveis.

Número do teste	Razão nHA/Á. Esteárico (%m/m)	Conc. PVA (%m/v)	Velocidade de agitação inicial (RPM)	Parâmetros fixados
ESFERAS DE PCL/nHA (nHA) – ETAPA 02 (Ø 10-150 µm)				
T01*	10,0	23,0 / 5,0	2,5	10000
T02	10,0	17,0 / 5,0	2,5	10000
T03	7,5	28,5 / 5,0	2,5	10000
T04	7,5	23,0 / 5,0	2,5	10000
T05	7,5	17,0 / 5,0	2,5	10000
T06	5,0	28,5 / 5,0	2,5	10000
T07	7,5	23,0 / --	2,5	10000
Proporção Óleo/Água 1/20 – 30 mL/600 mL		Fluxo de gotejamento 2 mL/min.		Antiespumante: 0,1 % (v/v) Velocidade de agitação final: 2000 rpm Tempo de agitação inicial/final: 15 min./ 80 min.

4.6.1.1 Influência da concentração de PCL

Para avaliação da influência de diferentes concentrações de PCL, as formulações 01 e 04, e 03 e 06 foram comparadas. A morfologia das partículas obtidas foi analisada por MEV (

Figura 49). Nota-se que, para todas as formulações, foram produzidas partículas esféricas, densas ou porosas. Ainda, as micrografias de partículas individuais (

Figura 50) indicam a formação de superfícies rugosas, sendo essas rugosidades semelhantes a colmeias. Observa-se que “colmeias” mais definidas ocorreram independentemente da concentração de PCL (Fig.50 a,g,j), porém a ocorrência dessa estruturação variou para diferentes conteúdos de nHA (Fig.50 d,f). As imagens (Fig. 50 b,c) sugerem que, esferas precipitadas e floculadas menores, penetraram nas gotículas maiores antes da completa evaporação do solvente, gerando poros de diâmetros variados.

Analisando os histogramas obtidos para estas formulações (Figura 51), observa-se que conforme a diminuição da concentração de PCL, foram produzidas distribuições de tamanho mais estreitas. No teste 01 (Fig.51a), ~75 % das esferas apresentaram diâmetros distribuídos até 80 μm , sendo ~30 % entre 20-40 μm ; e no teste 04 (Fig.51b) ~70 % foram menores que 20 μm . Comparando-se os testes 03 (Fig.51c) e 06 (Fig.51d), observa-se que no teste 03, frações de ~20 % das esferas exibiram diâmetros desde 20 μm até 140 μm , enquanto no teste 06, ~50 % das esferas exibiram até 20 μm . É esperado que maiores quantidades de nHA sejam incorporadas às esferas, com o aumento da concentração do PCL. Ademais, aumentando-se a concentração de PCL, obtêm-se uma distribuição de tamanho mais larga e heterogênea, que podem ser decorrentes do aumento da viscosidade da dispersão.

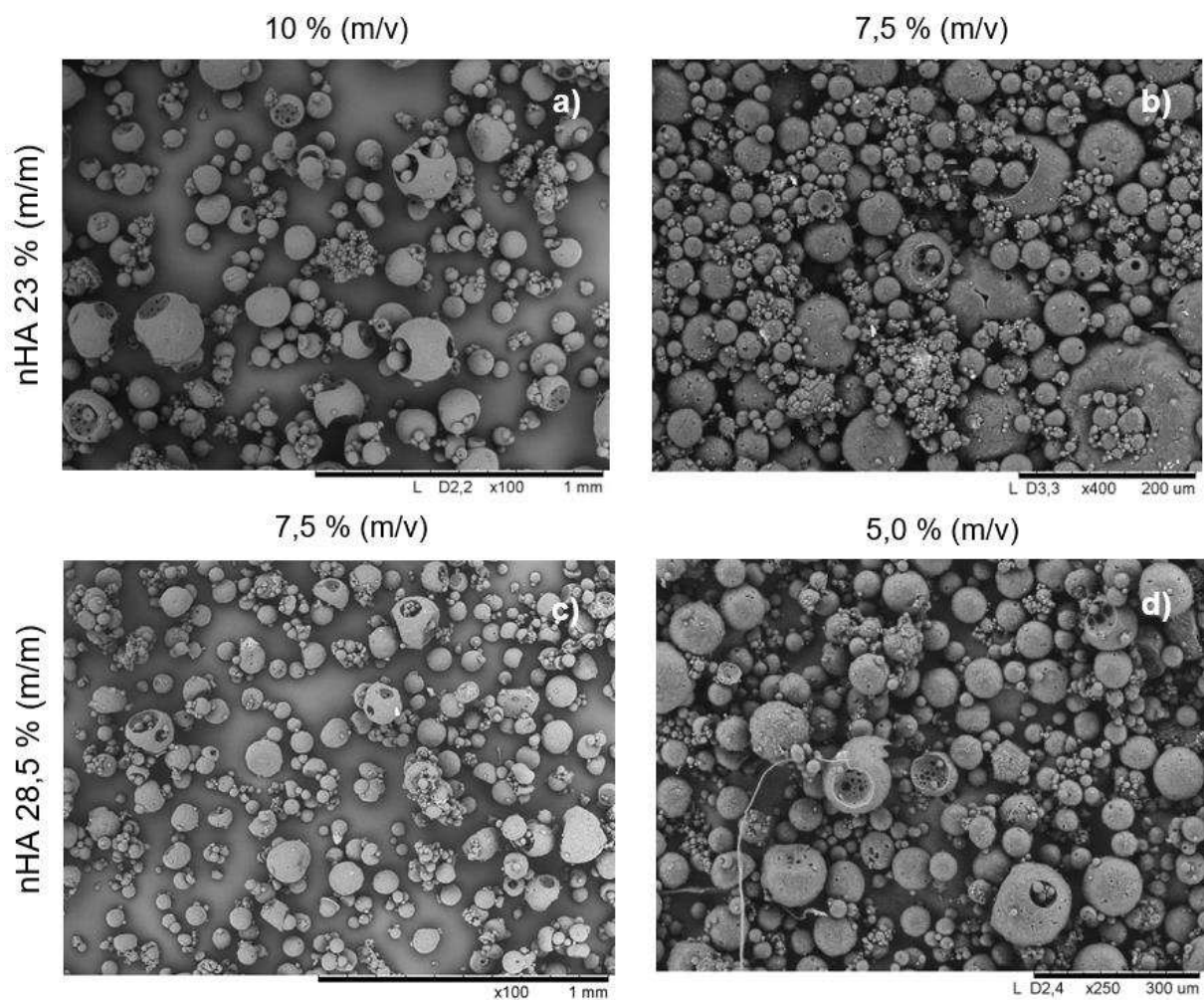


Figura 49 – Micrografias por MEV de esferas de PCL/nHA obtidas com diferentes concentrações de PCL: nHA23% - (a)10 %-100x; (b)7,5 %-400x; nHA28,5% - (c)7,5 %-100x; (d)5 %-250x.

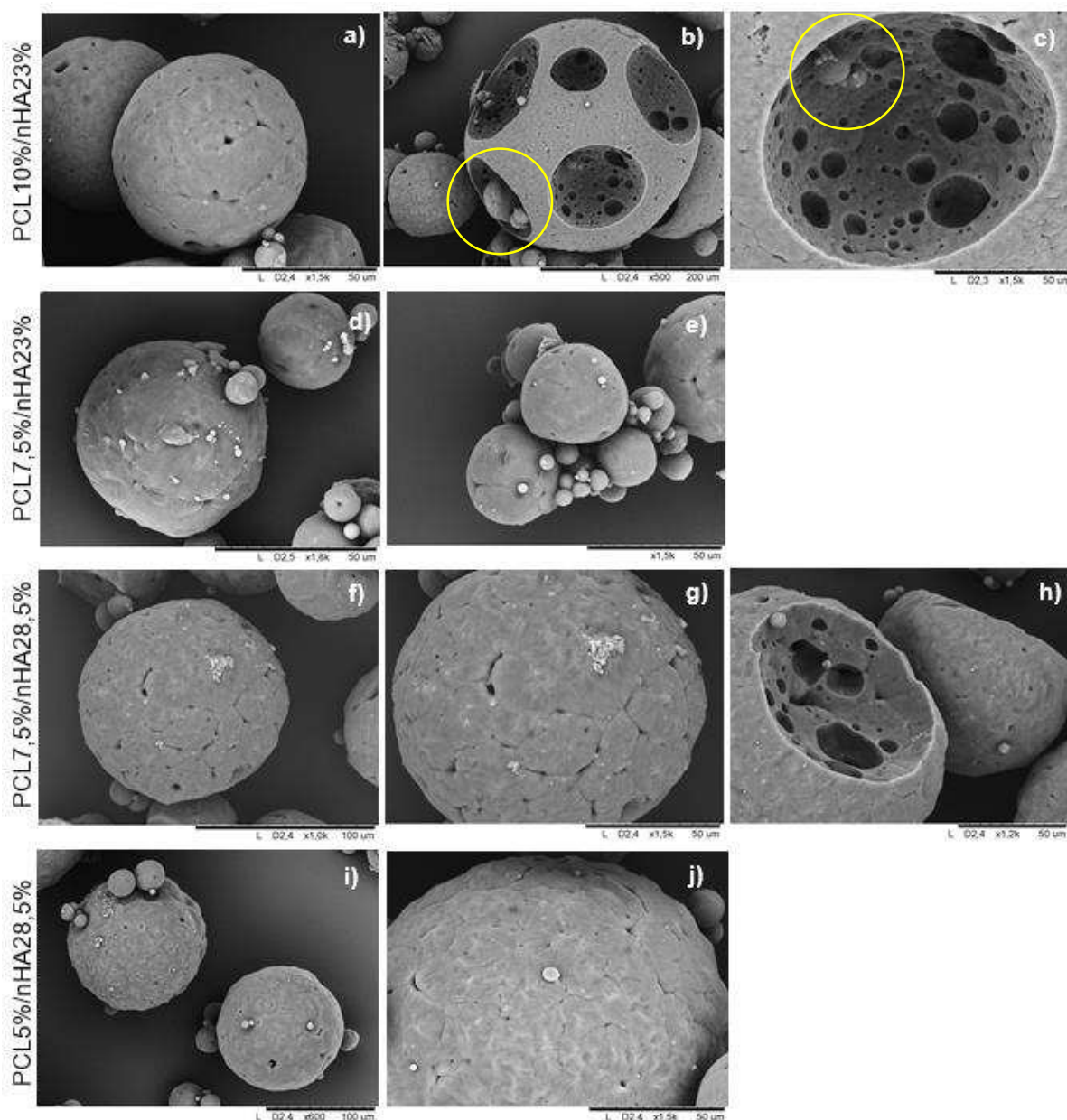


Figura 50 – Micrografias por MEV de esferas de PCL/nHA obtidas com diferentes concentrações de PCL: nHA23% - 10 % (a)1500x (b)500x (c)1500x; 7,5 % (d)1800x (e)1500x; nHA28,5% - 7,5 % (f)1000x (g)1500x (h)1200x; 5 % (i)600x (j)1500x.

Tabela 22 – Dados de faixa de diâmetro das esferas obtidas dos testes 01, 04, 03 e 06, para avaliação da influência de diferentes concentrações de PCL.

	Concentração de PCL (% m/v)/ Conteúdo de nHA(%m/m)	Faixa de diâmetro (μm)	Intervalo de maior frequência (μm)/ Quantidade de partículas (%)
T01	10,0/23,0	5-260	20-40/~30
T04	7,5/23,0	5-120	≤ 20 /~75
T03	7,5/28,5	5-140	100-120/~25
T06	5,0/28,5	5-120	≤ 20 /~50

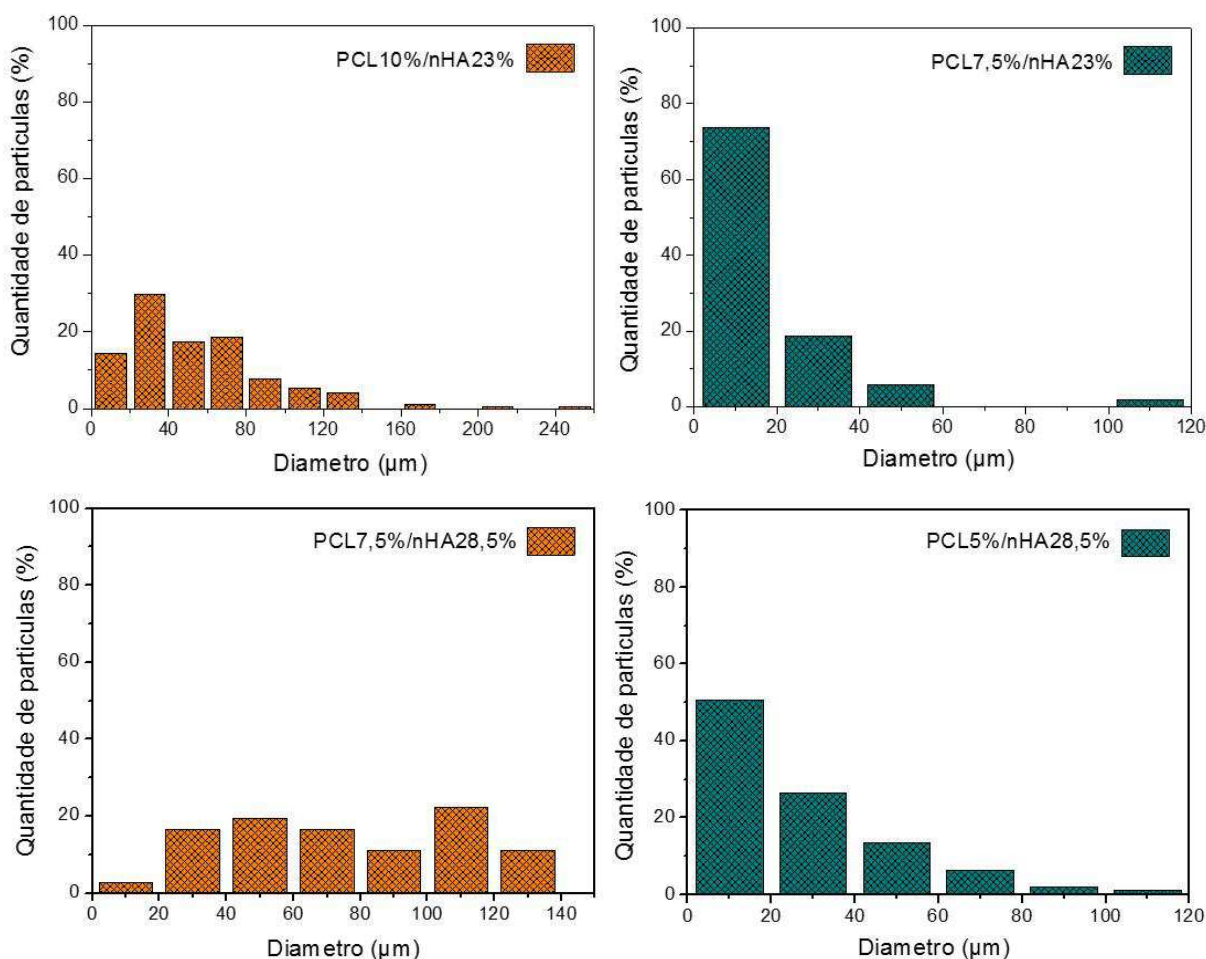


Figura 51 – Histogramas referentes ao diâmetro das esferas obtidos nos testes 01(a) e 04(b), 03(c) e 06(d), para avaliação da influência de diferentes concentrações de PCL.

4.6.1.2 Influência do conteúdo de nHA

Os efeitos da adição de diferentes conteúdos de nHA no compósito, na morfologia das esferas, foi avaliado. Os testes 03, 04, 05 e 07 foram comparados, fixando-se a concentração de PCL a 7,5 % (m/v). Os histogramas obtidos a partir das micrografias de MEV estão apresentados na Figura 52, e os faixas de diâmetro estão relacionadas na Tabela 23.

Comparando-se os histogramas dos conteúdos de nHA de 28,5 % e 17,0 %, observa-se que a 17 % foi obtida uma distribuição de tamanho mais larga, com ~80 % das esferas medindo entre 40-100 µm. No entanto, com 23 % de nHA com e sem tratamento com AE, faixas de diâmetro mais estreitas foram produzidas.

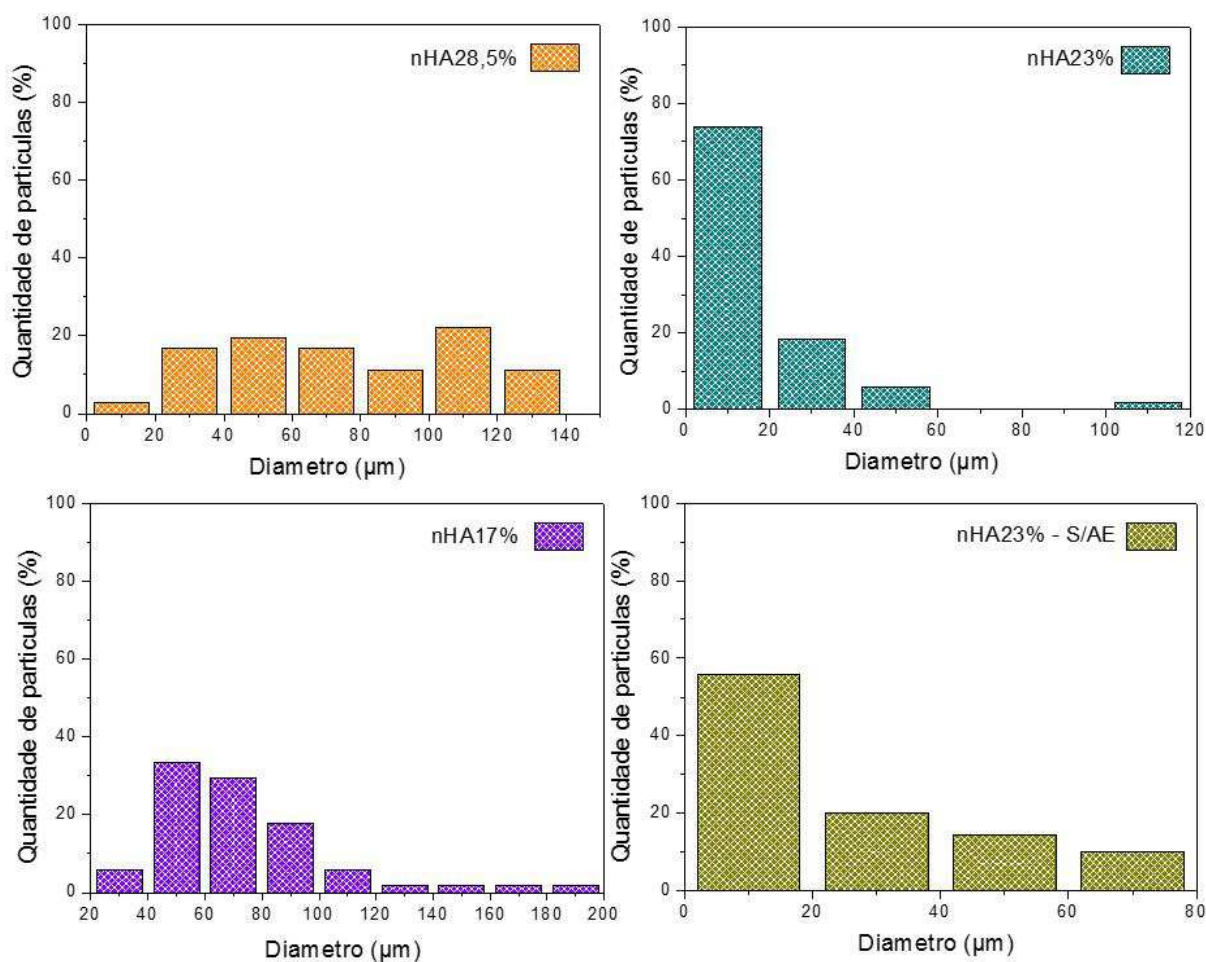


Figura 52 – Histogramas referentes ao diâmetro das esferas obtidos nos testes 03(a), 04(b), 05(c) e 07(d), para avaliação da influência de diferentes conteúdos de nHA.

Tabela 23 – Faixas de diâmetro das esferas obtidas dos testes 03, 04, 05 e 07, para avaliação da influência de diferentes conteúdos de nHA.

	Conteúdo de nHA(%/m)	Faixa de diâmetro (μm)	Intervalo de maior frequência (μm)/ Quantidade de partículas (%)
T03	28,5	5-140	100-120/~20
T04	23,0	5-120	≤ 20/~75
T05	17,0	5-200	40-60/~35
T07	23,0 (S/AE)	3-80	≤ 20/~55

4.6.1.3 Morfologia interna das esferas

A estrutura interna das esferas foram analisadas por MEV, obtendo-se as micrografias apresentadas na Figura 53. Em todas as amostras foi observada a efetiva incorporação das nHA na matriz polimérica, exibida na forma de aglomerados de diferentes formatos, medindo entre 1-30 μm . Como esperado, a quantidade de aglomerados aumenta proporcionalmente ao conteúdo de nHA adicionado. Uma importante evidência é notada nas Figura 53(k,l), correspondentes à adição de nHA não modificadas com AE, nas quais são exibidas menores quantidades de aglomerados, de maiores tamanhos ($\sim 65 \mu\text{m}$), resultado esperado.

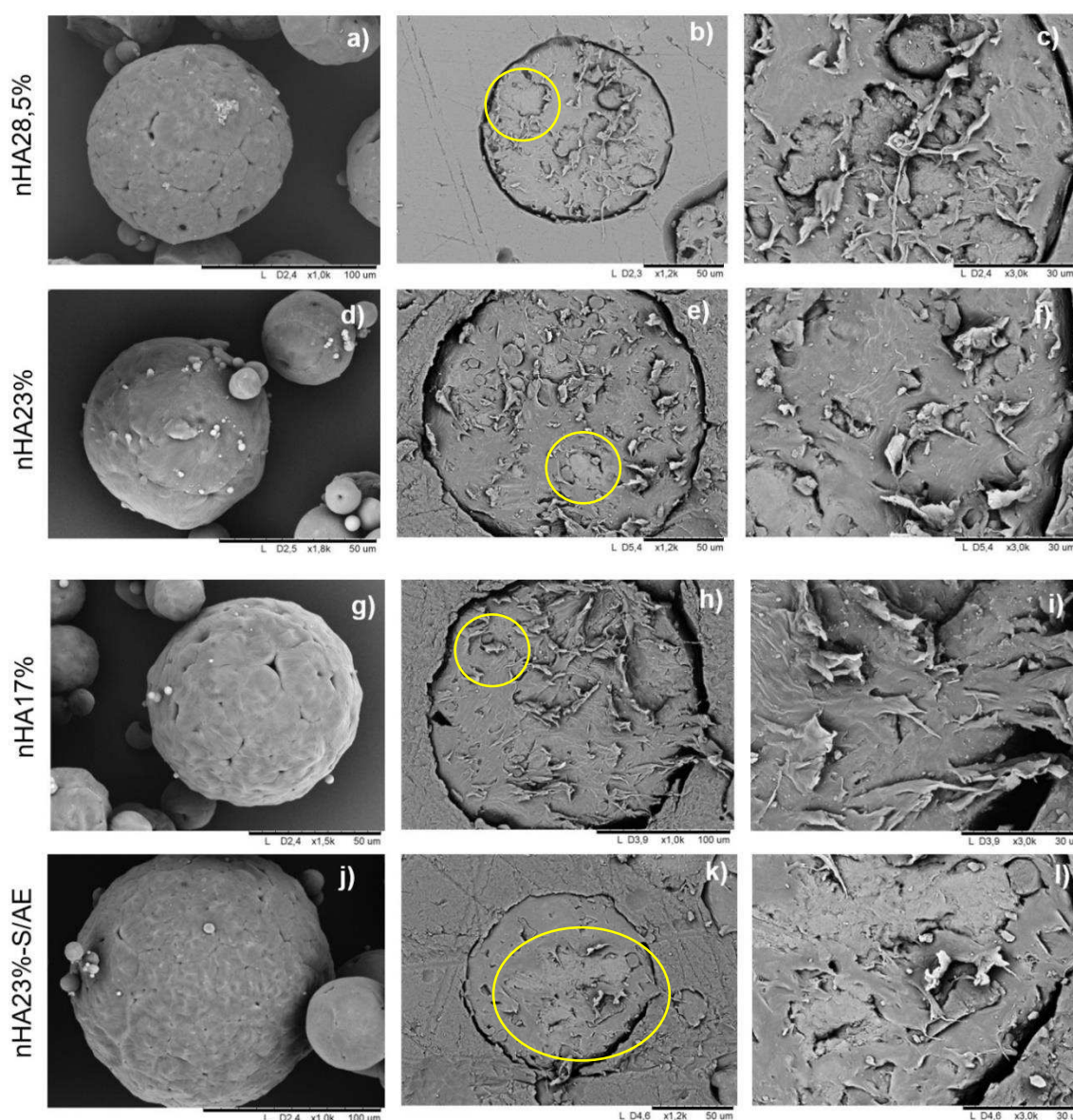


Figura 53 – Micrografias por MEV de esferas de PCL/nHA obtidas com PCL 7,5% e diferentes conteúdos de nHA: 28,5% (a)1000x (b)1200x (c)3000x; 23% (d)1800x (e)1200x (f)3000x; 17% - (g)1500x (h)1000x (i)3000x; 23%S/AE (j)1000x (k)1200x (l)3000x.

4.6.1.4 Rendimento

Todas as formulações de PCL/nHA foram analisadas por Termogravimetria, para quantificação do conteúdo real de nHA incorporado à matriz polimérica e as curvas obtidas estão apresentadas na Figura 54. As curvas exibem um comportamento térmico semelhante ao descrito no item 4.3. A Tabela 24 relaciona as formulações e seus respectivos conteúdos percentuais (m/m) de nHA teóricos e reais. Para os testes 03, 04 e 05, foram incorporados 47,4 %, 45,6 % e 35,9 % de nHA com relação ao conteúdo teórico esperado, respectivamente. Para esses testes, a concentração de PCL é fixa, o que indicou que reduzindo-se o conteúdo de nHA inicial, reduz-se também a porcentagem final incorporada à matriz, o que corrobora com os resultados obtidos por MEV. Ainda, aumentando-se o conteúdo de nHA de 23% para 28,5%, observou-se um aumento de 2% na incorporação efetiva. Resultados semelhantes foram encontrados para os testes 01 e 02, com concentração de PCL fixa, resultando na inclusão de 60,0 % e 48,2 % do conteúdo teórico. Comparando-se os Testes 01 e 04, e os testes 03 e 06, nos quais o conteúdo teórico de nHA é fixo, observou-se que concentrações maiores de PCL permitiram o encapsulamento de maiores conteúdos de nHA, conforme esperado. Quanto aos resultados referentes à utilização de nHA modificada com AE, comparando-se os testes 04 e 07, o teste 07 apresentou 34,3 % de incorporação real de nHA, muito a menos que o teste 04 (45,6 %). Esse dado indica que o emprego do ácido esteárico foi efetivo para facilitar a inclusão da nHA na matriz de PCL, o que confirma os resultados obtidos por MEV. Ainda, o teste 01 apresentou maior percentual de incorporação (60%).

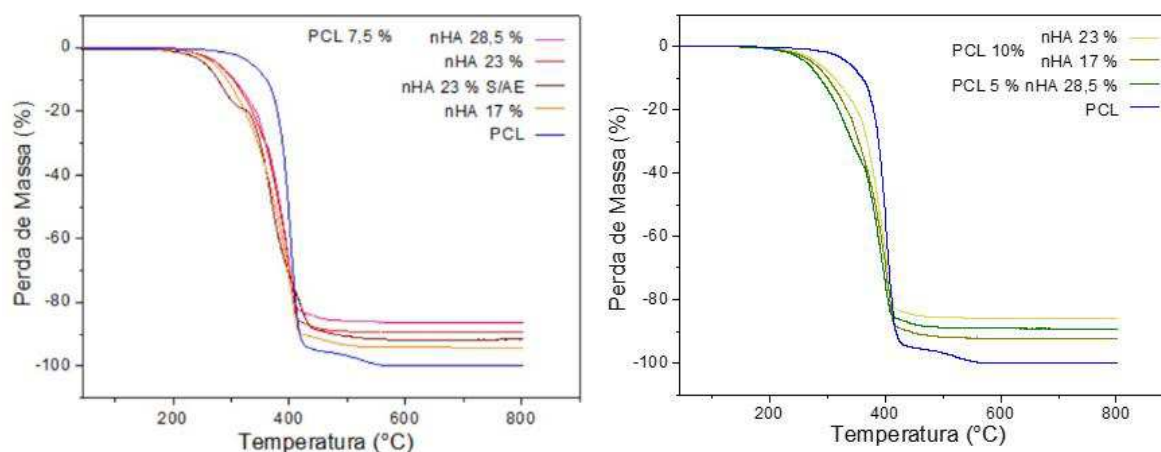


Figura 54 – Curvas termogravimétricas das esferas de PCL/nHA obtidas na Etapa 02.

Tabela 24 – Dados das esferas de PCL/nHA obtidas na etapa 02, relacionando o conteúdo teórico (inicial) e real de nHA no compósito, obtido por TG.

Teste	Concentração de PCL (%m/v)	Conteúdo da nHA no compósito (%)	
		Teórico	Real
01	10,0	23,0	13,8
02	10,0	17,0	8,2
03	7,5	28,5	13,5
04	7,5	23,0	10,5
05	7,5	17,0	6,1
07	7,5	23,0*	7,9
06	5,0	28,5	3,1

* Sem ácido esteárico.

O rendimento das formulações foi calculado, obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 25. Rendimentos maiores que 50 % são considerados aceitáveis mediante o método empregado, observado para os testes 01, 02, 03 e 05. Percentuais de rendimento maiores foram encontrados com o aumento da concentração de PCL, enquanto que conteúdos de nHA de 17 % geraram melhores rendimentos. Também com a adição do AE, o rendimento aumentou. Os resultados mais favoráveis foram encontrados para os testes 01 e 02, referentes a esferas com 10 % de PCL, com ~66 % e ~68 % de rendimento, respectivamente.

Tabela 25 – Rendimento obtido para as formulações de PCL/nHA(Etapa 02), da produção de esferas por emulsão sólido/óleo/água (Média ± desvio padrão).

	Concentração de PCL (% m/v)	Conteúdo de nHA (%m/m)	Rendimento (%)
T01	10,0	23,0	65,9 ± 1,8
T02	10,0	17,0	68,3 ± 1,0
T03	7,5	28,5	53,6 ± 1,0
T04	7,5	23,0	48,2 ± 1,3
T05	7,5	17,0	60,0 ± 2,9
T06	5,0	28,5	33,8 ± 1,4
T07	7,5	23,0*	41,5 ± 1,7

* Sem ácido esteárico.

4.6.1.5 Caracterização físico-química

As esferas produzidas na etapa 02 foram analisadas por DRX, e a Figura 55 apresenta os padrões de DRX das esferas de PCL/nHA e de PCL, e das nHA. No padrão referente às esferas de PCL, picos de maior intensidade foram detectados a $2\theta=21,3^\circ$ e a $2\theta=23,6^\circ$, referentes à fase cristalina desse material. O padrão referente

à esferas de PCL/nHA apresentou os picos referentes às nHA, conforme indicado (REZAEI; MOHAMMADI, 2012; WIRIA et al., 2007). Esse resultado aponta a presença das nHA no compósito produzido.

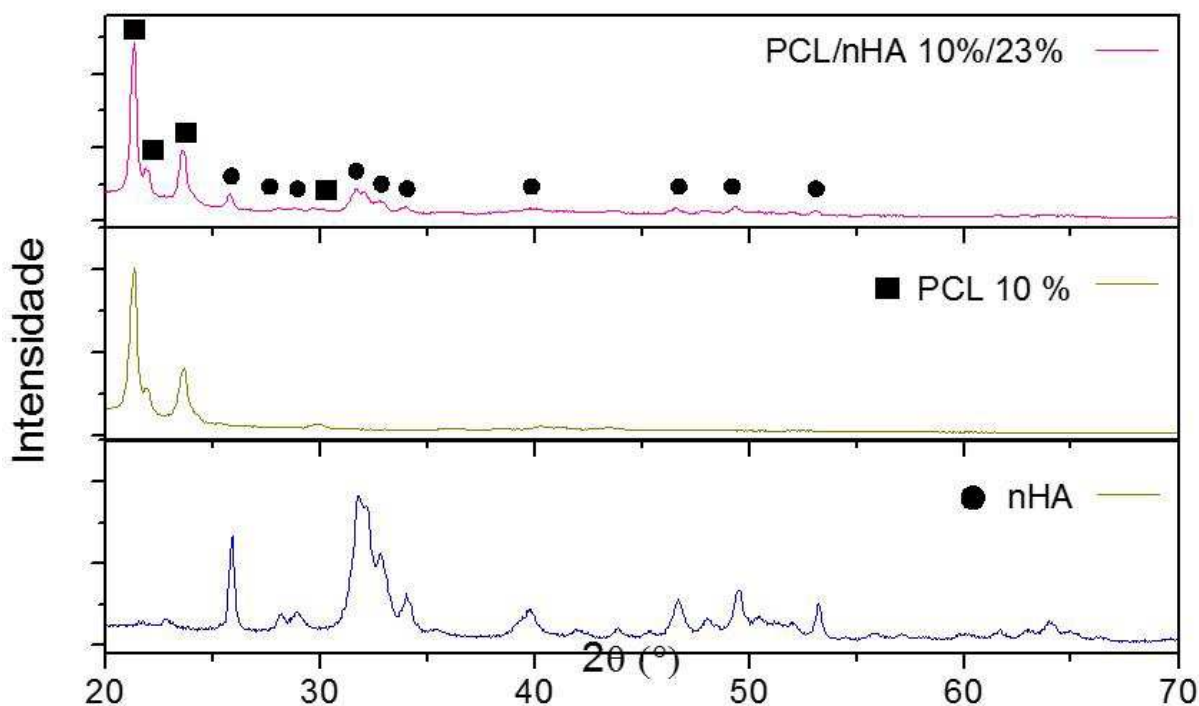


Figura 55 – Padrões de DRX das esferas de PCL 10%(m/v), de PCL/nHA 10%/23% e das nHA.

Análises por FTIR foram realizadas com as esferas de PCL e PCL/nHA, visando observar as possíveis mudanças nos espectros obtidos que indiquem a forma de interação ocorrida entre as nHA e a PCL. Os espectros podem ser visualizados na Figura 56. No espectro das esferas de PCL, foram identificadas as atribuições correspondentes às vibrações moleculares da PCL, conforme analisado no tópico 4.3. Quanto ao espectro referente ao compósito PCL/nHA, foi observado o aumento da absorvância a 1044 cm^{-1} , provavelmente referente ao PO_4^{3-} das nHA, assim como uma diminuição da absorvância a 1163 cm^{-1} (vibração COC do PCL) (REZAEI; MOHAMMADI, 2012; WIRIA et al., 2007). Vibrações adicionais foram observadas a 1600 cm^{-1} e 1580 cm^{-1} , que podem ser atribuídos a grupos carboxilato possivelmente resultantes da interação entre os grupos carboxila do PCL com o Ca^{2+} da superfície da nHA. A ocorrência dessa interação também foi reportada nas pesquisas de Du et al. (2015), Martins et al. (2014) e Fujii et al. (2012).

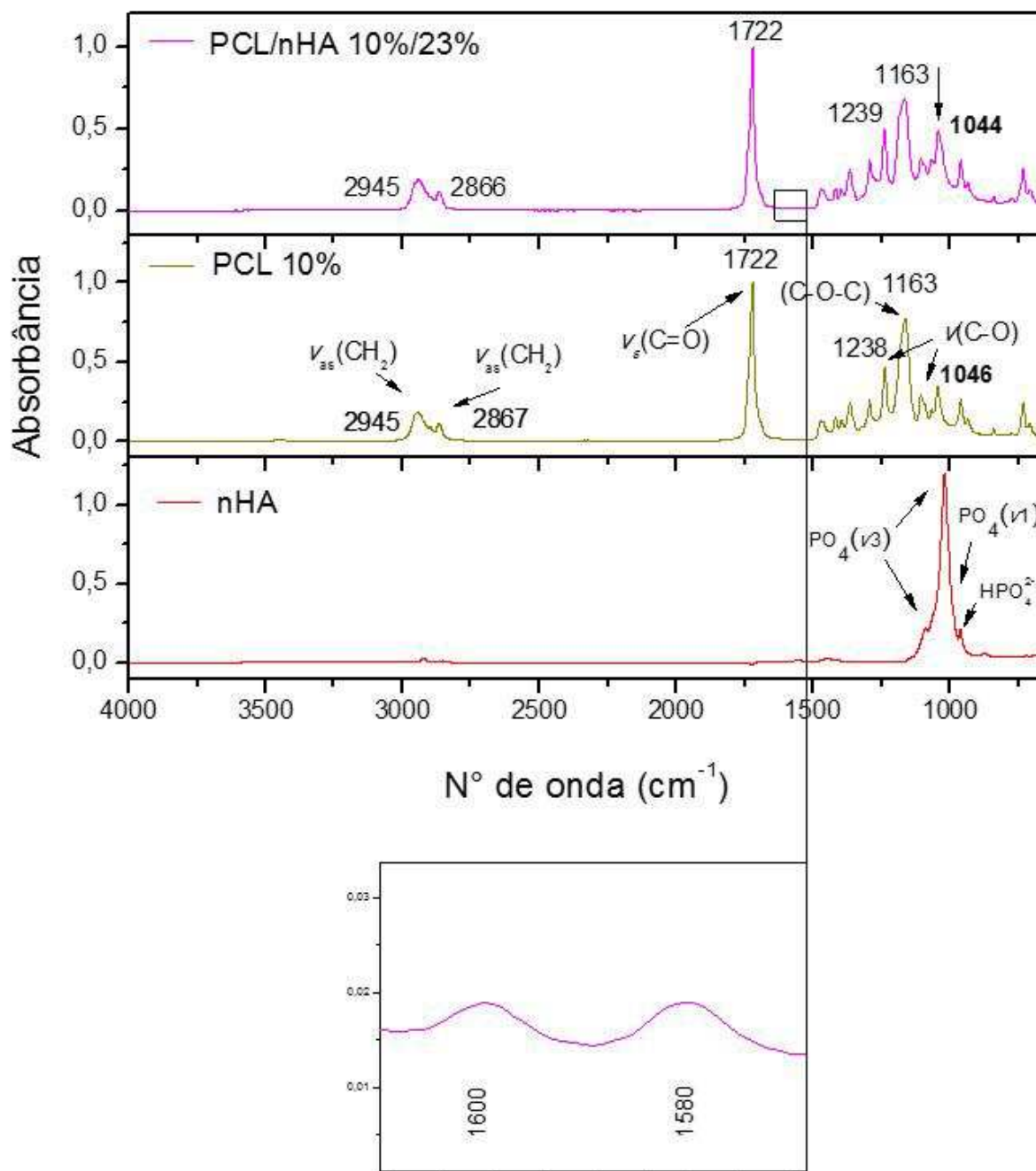


Figura 56 – Espectro de FTIR das esferas de PCL 10%(m/v), de PCL/nHA 10%/23%, e das nHA.

▪ Condições estabelecidas

Com base nesse estudo, foram ajustados os parâmetros mais apropriados para o desenvolvimento de esferas de PCL/nHA de diâmetro na faixa de 10-150 μm , considerando a reprodutibilidade do experimento para produção de esferas de formato e tamanho homogêneos, e com a produção de maiores quantidades de partículas em comparação aos métodos de microemulsão empregados convencionalmente. Dessa

forma, foram estabelecidos: concentração de PCL de 10 % (m/v), conteúdo de nHA de 23%(m/m), adição de ácido esteárico a 5 %(m/m), razão em volume das fases óleo/água de 1/20 utilizando volumes de 30 mL e 600 mL, velocidade de agitação de 10000 rpm, sendo o teste 01 considerado como referência.

4.6.2 Esferas de PCL/nHA (Etapa 03)

Com o objetivo de produzir esferas de PCL e PCL/nHA de diâmetros maiores que 800 μm , uma nova etapa de emulsão S/O/A foi iniciada. Nesta etapa, a concentração de PCL foi fixada a 10 %(m/v), variando-se o conteúdo de nHA adicionado. Visando a formação de gotículas maiores durante a emulsificação, a velocidade de agitação foi reduzida para 250 rpm e, no intuito de acelerar a evaporação do solvente orgânico, a emulsão foi aquecida a ~ 34 °C. Nos primeiros testes desta etapa permaneceu-se com os volumes O/A de 30 mL e 600 mL, no entanto, devido às demasiadas aglomerações observadas, esse volume foi fixado em 20 mL e 400 mL. Os parâmetros experimentais estão relacionados na Tabela 26. Macroscopicamente, o material obtido apresentou aspecto heterogêneo, com formação de pós finos e esferas de diferentes tamanhos e formatos, mais esbranquiçados e opacos conforme o aumento do conteúdo de nHA. Aglomerados de partículas foram observados para todas as formulações em pequenas quantidades. Ao final do processo, quantidades de nHA remanescentes foram notadas apenas para os testes realizados com nHA não modificada com AE, indicando a efetiva incorporação destas à matriz polimérica independentemente do conteúdo de nHA inicial. Imagens do material obtido após classificação em malha de 850 μm podem ser visualizadas na Figura 57.

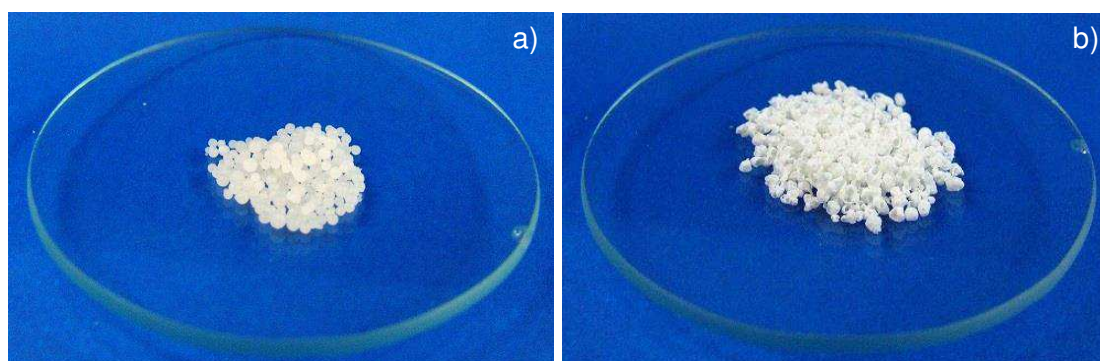


Figura 57 – Aspecto físico das esferas de PCL (a) e PCL/nHA45 (b) (Etapa 03) obtidas por emulsão sólido/óleo/água (> 800 μm).

Tabela 26 – Relação de testes realizados para obtenção de esferas de PCL/nHA(Etapa 03) e suas respectivas variáveis.

Número do teste	Conc.PCL (%m/v)	Razão nHA/ Á. Esteárico (%m/m)	Conc. PVA (%m/v)	Velocidade de agitação (RPM)	Parâmetros fixados
ESFERAS DE PCL/nHA (nHA) – ETAPA 03 ($\varnothing > 800 \mu\text{m}$)					
T01*	10,0	--	2,5	250	Antiespumante: 0,1 % (v/v) Razão óleo/água: 1/20 (20 mL/400 mL) Tempo de agitação total: 18 h Temperatura: 34±0,5 °C
T02	10,0	30,0 / 5,0	2,5	250	
T03	10,0	30,0 / --	2,5	250	
T04	10,0	35,0 / 5,0	2,5	250	
T05	10,0	35,0 / --	2,5	250	
T06	10,0	40,0 / 5,0	2,5	250	
T07	10,0	45,0 / 5,0	2,5	250	
Fluxo de gotejamento ~2 mL/min.					

4.6.2.1 Influência do conteúdo de nHA

Os efeitos da adição de diferentes conteúdos de nHA na morfologia das esferas obtidas foi avaliado por MEV. As micrografias obtidas estão apresentadas nas Figura 58-62. Para todas as formulações foram obtidas tanto partículas esféricas quanto irregulares, densas ou porosas. É observado que, conforme o aumento do conteúdo de nHA, foram produzidas maiores quantidades de partículas irregulares. Além disso, o conteúdo de nHA localizado na superfície das partículas, aumentou proporcionalmente à adição das nHA. Todas as partículas esféricas densas apresentaram nHA distribuídas homoganeamente ao longo da superfície. No caso das composição 65/35 S/AE (Fig.59 g,h), as nHA apresentaram excessivas aglomerações, assim como aglomerações de nHA não incorporadas. Com o aumento do conteúdo de nHA para 55/45 (Fig.61 b,c), aglomerados maiores na superfície (medindo até ~35 μm) são observados.

Analisando a morfologia das partículas irregulares, percebe-se que estas tanto apresentam regiões lisas quanto porosas em sua superfície, e evidenciam maiores regiões com aglomerações de nHA. Esferas somente de PCL também foram produzidas como controle (Figura 62 a-e). É notado que foram obtidas partículas de formato unicamente esférico, majoritariamente densas, com rugosidades, com algumas esferas apresentando superfície porosa.

Poros de até ~35 μm na superfície das esferas de PCL/nHA estão relacionados a aglomerados de nHA que podem se soltar após a precipitação, enquanto poros, concavidades ou deformações medindo a partir de ~50 μm estão

relacionados aos eventos de floculação da emulsão. Já para as esferas de PCL, os poros apresentados podem estar relacionados aos eventos de floculação.

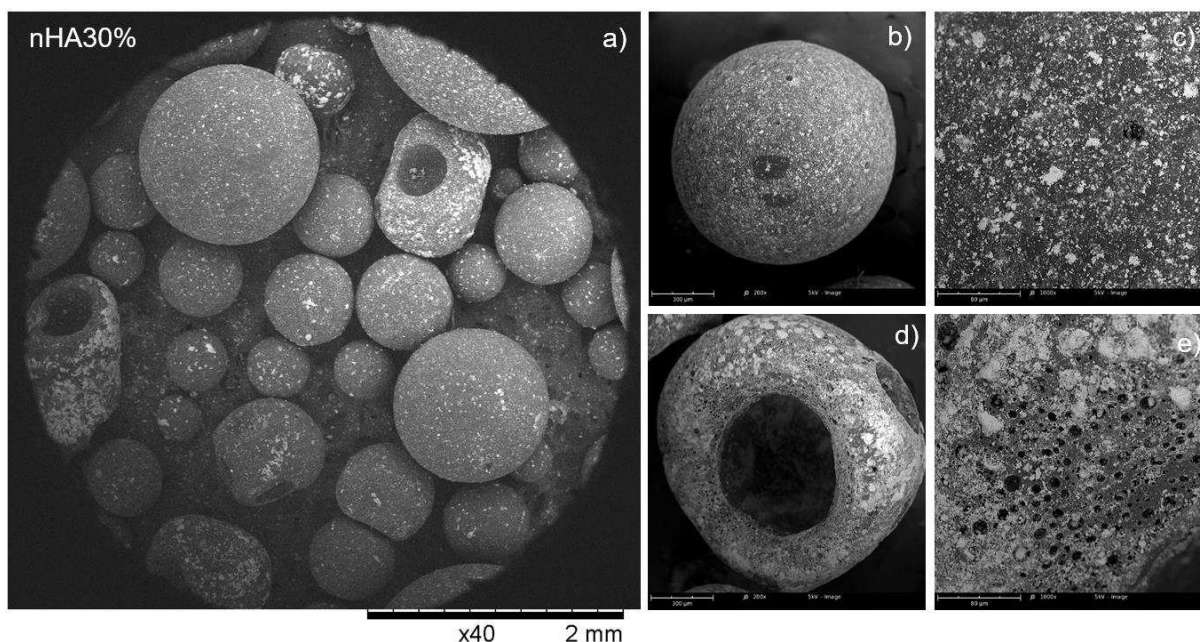


Figura 58 – Micrografias por MEV de esferas de PCL/nHA 70/30: (a)40x (b)200x (c)1000x (d)200x (e)1000x.

Comparando-se às esferas de PCL/nHA obtidas na etapa 02, é observado que as rugosidades na forma de “colmeias” não aconteceram. Foram obtidos histogramas referentes à fração de esferas produzidas e seus diâmetros. O percentual de partículas irregulares por formulação foi calculado. As partículas irregulares foram medidas separadamente, calculando-se a razão de aspecto média dessas partículas. Os histogramas obtidos estão apresentados na Figura 63, e a Tabela 27 relaciona os dados descritos acima.

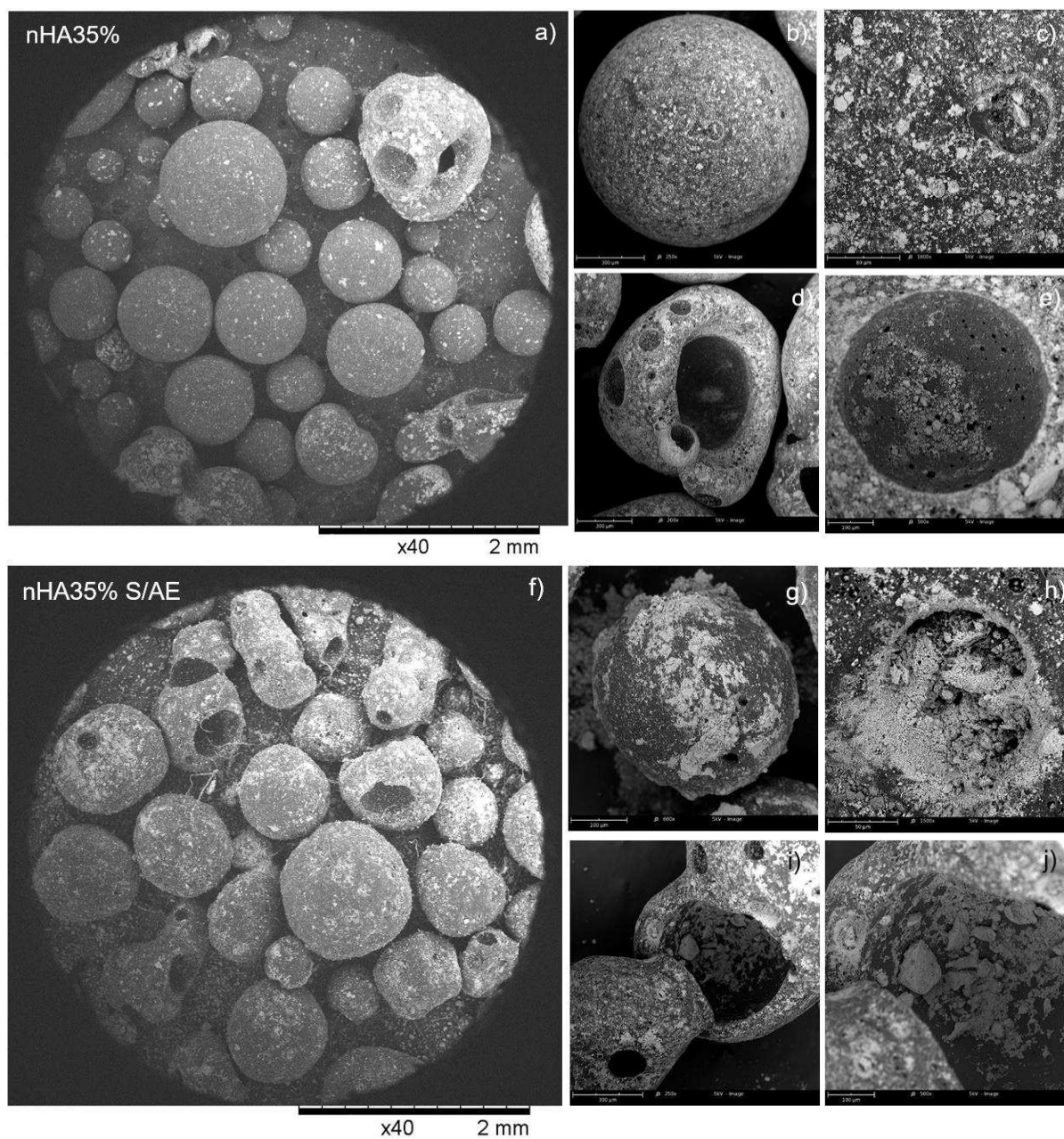


Figura 59 – Micrografias por MEV de esferas de PCL/nHA 65/35: Com AE (a)40x (b)250x (c)1000x (d)200x (e)500x; Sem AE (f)40x (g)600x (h)1500x (i)250x (j)500x.

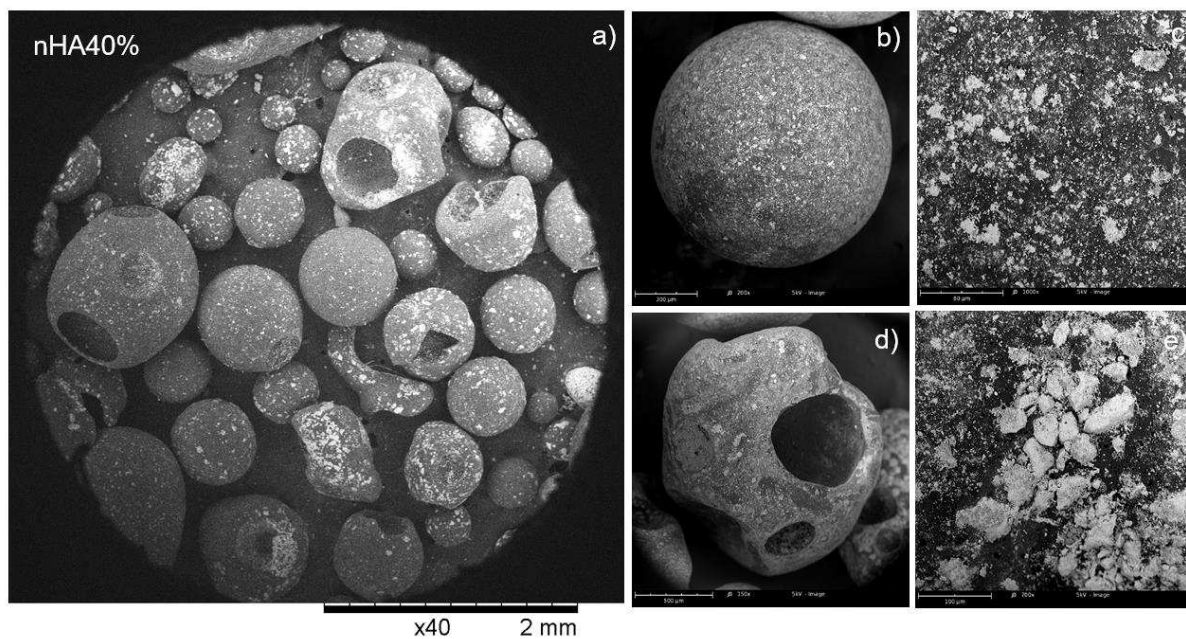


Figura 60 – Micrografias por MEV de esferas de PCL/nHA 60/40: (a)40x (b)250x (c)1000x (d)150x (e)200x.

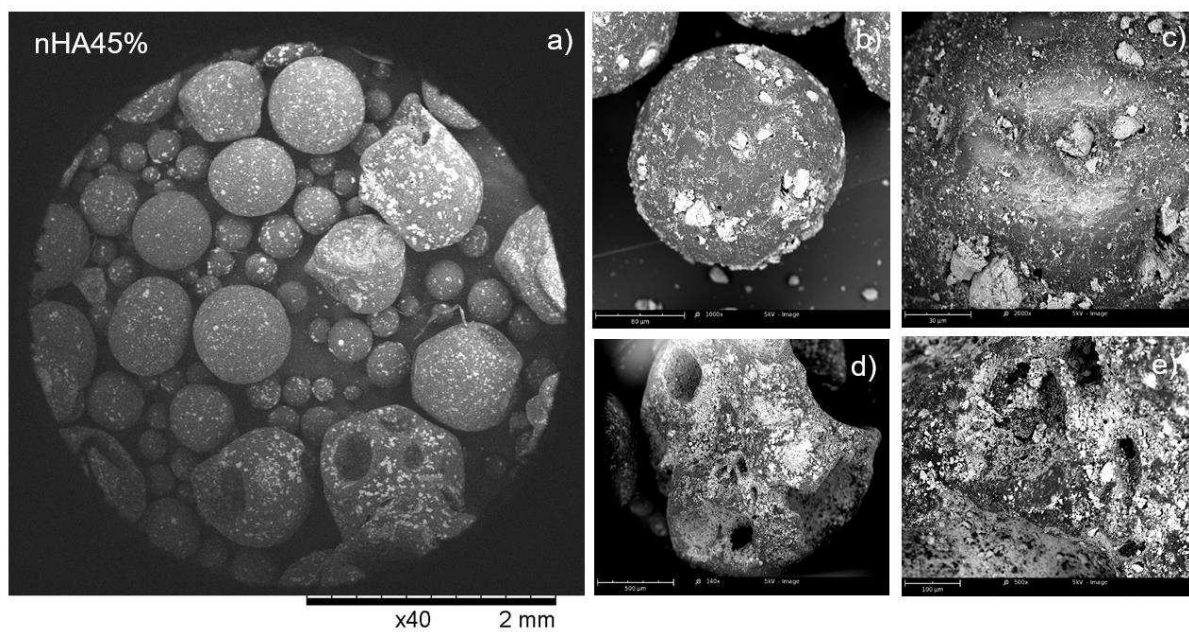


Figura 61 – Micrografias por MEV de esferas de PCL/nHA 55/45: (a)40x (b)1000x (c)2000x (d)140x (e)500x.

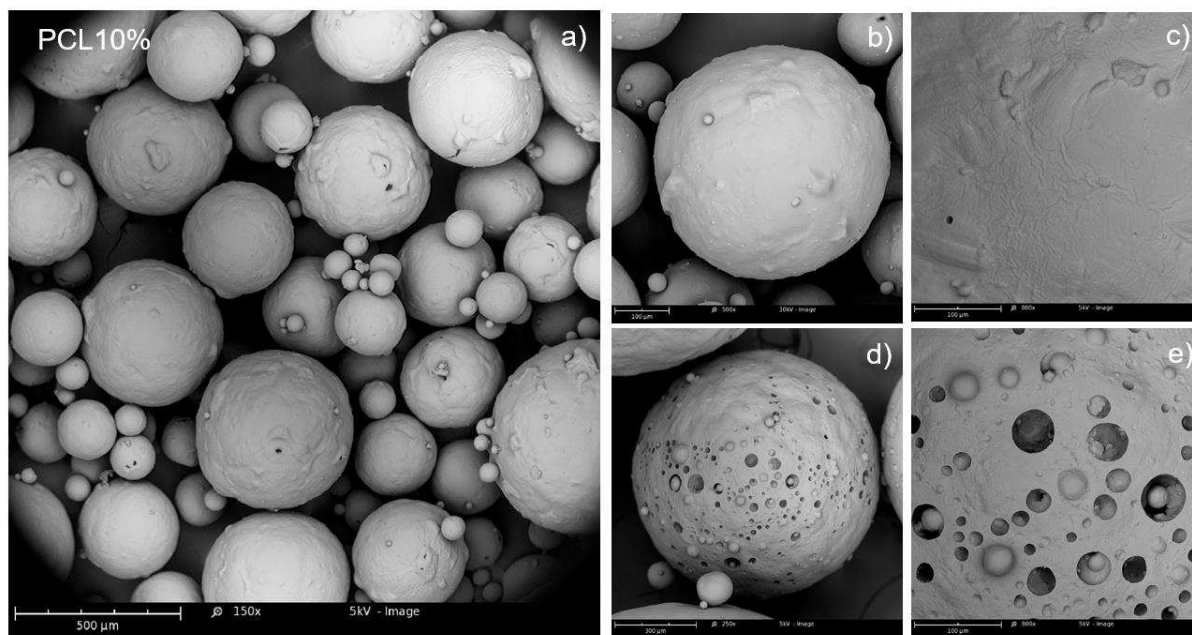


Figura 62 – Micrografias por MEV de esferas de PCL/nHA 100/0: (a)150x (b)500x (c)800x (d)250x (e)800x.

Com o aumento do conteúdo de nHA as maiores frações de esferas apresentaram valores de diâmetro mais altos, exceto para a composição 55/35. Neste caso, quantidades excessivas de nHA provocam a migração destas para a extremidade das gotas que, distribuídas na superfície podem agir como um co-emulsificante, protegendo-as de coalescer, conforme já discutido. Pela mesma razão, as formulações contendo nHA sem AE, exibiram distribuição de tamanho mais estreita. Distribuição de tamanho mais homogênea foi produzida na composição 70/30, na qual ~80 % das esferas situaram-se entre 400-1000 μm . As demais formulações exibiram distribuição de tamanho heterogênea, com maiores percentuais de esferas compreendidos entre 800-1800 μm (65/35), 1100-2100 μm (60/40) e 1000-2200 μm (55/45). Com o aumento do conteúdo de nHA também foi observado que a fração de partículas irregulares aumentou, com resultados equivalentes para as composições 65/35 e 65/40. A razão de aspecto média calculada a partir dessas partículas cresceu conforme o aumento da quantidade de nHA. Para as nHA sem AE, a razão de aspecto diminuiu com o aumento do conteúdo de nHA.

No caso das esferas somente de PCL observa-se, a partir do histograma apresentado na Figura 64, que ~85 % das esferas exibiram diâmetros de até 1000 μm , com valores de diâmetro bem abaixo dos obtidos para os compósitos PCL/nHA.

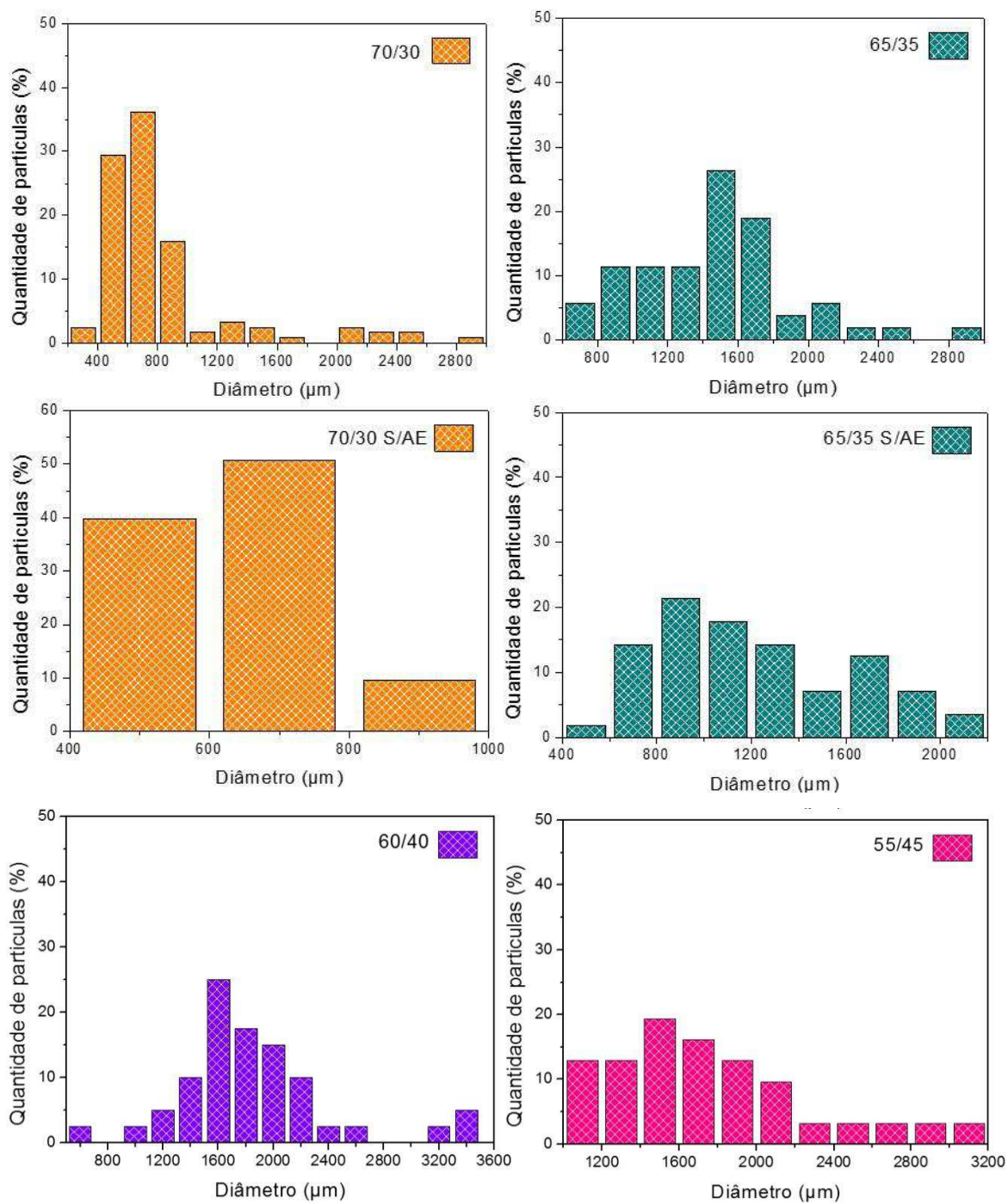


Figura 63 – Histogramas referentes ao diâmetro das esferas obtidos na Etapa 03, para avaliação da influência de diferentes conteúdos de nHA.

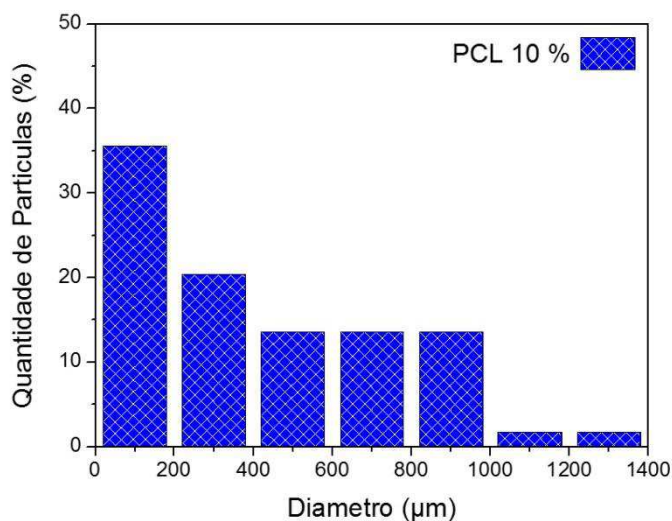


Figura 64 – Histograma referente ao diâmetro das esferas de PCL (100/0) obtidas na Etapa 03.

Tabela 27 – Dados de faixa de diâmetro das esferas, fração de partículas irregulares e a razão de aspecto dessas partículas, obtidas na Etapa 03.

Razão PCL/nHA	Faixa de diâmetro (µm)	Intervalo de maior frequência (µm)/ Quantidade de partículas (%)	Fração de partículas irregulares (%)	Razão de aspecto média (µm) ± Desvio padrão
70/30	200-3000	600-800/~35	18	1,2 ± 0,3
70/30 S/AE	400-1000	600-800/~50	14	1,8 ± 0,5
65/35	600-3000	1400-1600/~25	33	1,6 ± 0,4
65/35 S/AE	400-2200	800-1000/~20	19	1,5 ± 0,3
60/40	400-3600	1500-1700/~25	33	1,6 ± 0,4
55/45	1000-3200	1400-1600/~20	37	1,7 ± 0,4
100/0	40-1400	≤ 200/~35	-	-

4.6.2.2 Morfologia interna das partículas

A morfologia interna das esferas foi analisada por MEV, e as micrografias obtidas estão apresentadas na Figura 65. Essa análise foi acessível às composições de PCL/nHA 70/30 e 65/35. A partir das imagens 65(a,d) é possível observar que, conforme o aumento do diâmetro das esferas, a nHA é incorporada às extremidades

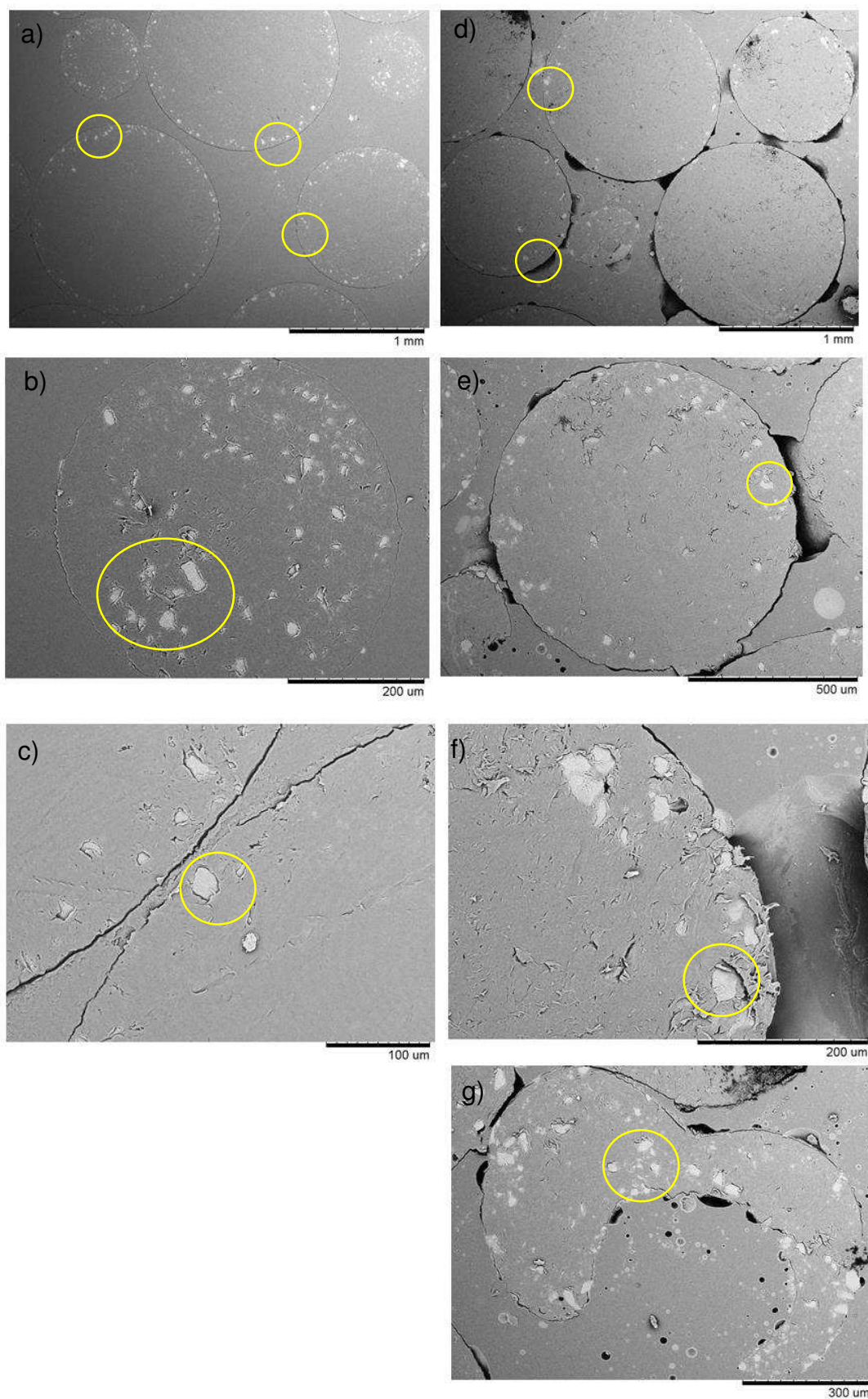


Figura 65 – Micrografias de MEV obtidas das secções de esferas de PCL/nHA: 70/30 (a) 80x, (b) 400x, (c) 600x; 65/35 (d) 80x, (e) 200x, (f) 500x, (g) 250x.

das partículas, não sendo observadas em nas regiões mais internas da matriz polimérica. Conforme imagem 65(b), percebe-se que esferas de menores diâmetros ($< 600 \mu\text{m}$), apresentam nHA distribuídas homogeneamente em toda a esfera, consonante com os resultados obtidos no item 4.6.1.3 (Etapa 02) deste trabalho. A imagem 65 (g) evidencia que as partículas de formato irregular, no entanto, apresentam nHA distribuída em toda a estrutura. Isso pode significar que, mesmo com a modificação das nHA com ácido esteárico, estas permanecem com cargas positivas e tendem a permanecer o mais próximo da interface óleo/água, o que ocasiona serem incorporadas a menores esferas ou partículas irregulares com largura reduzida.

4.6.2.3 Rendimento

Todas as formulações da etapa 03 foram analisadas por Termogravimetria, com o objetivo de quantificar o conteúdo real de nHA incorporado à matriz polimérica e as curvas obtidas estão apresentadas na Figura 66. Todas as curvas apresentaram três eventos de perda de massa característicos, conforme discutido no item 4.3.

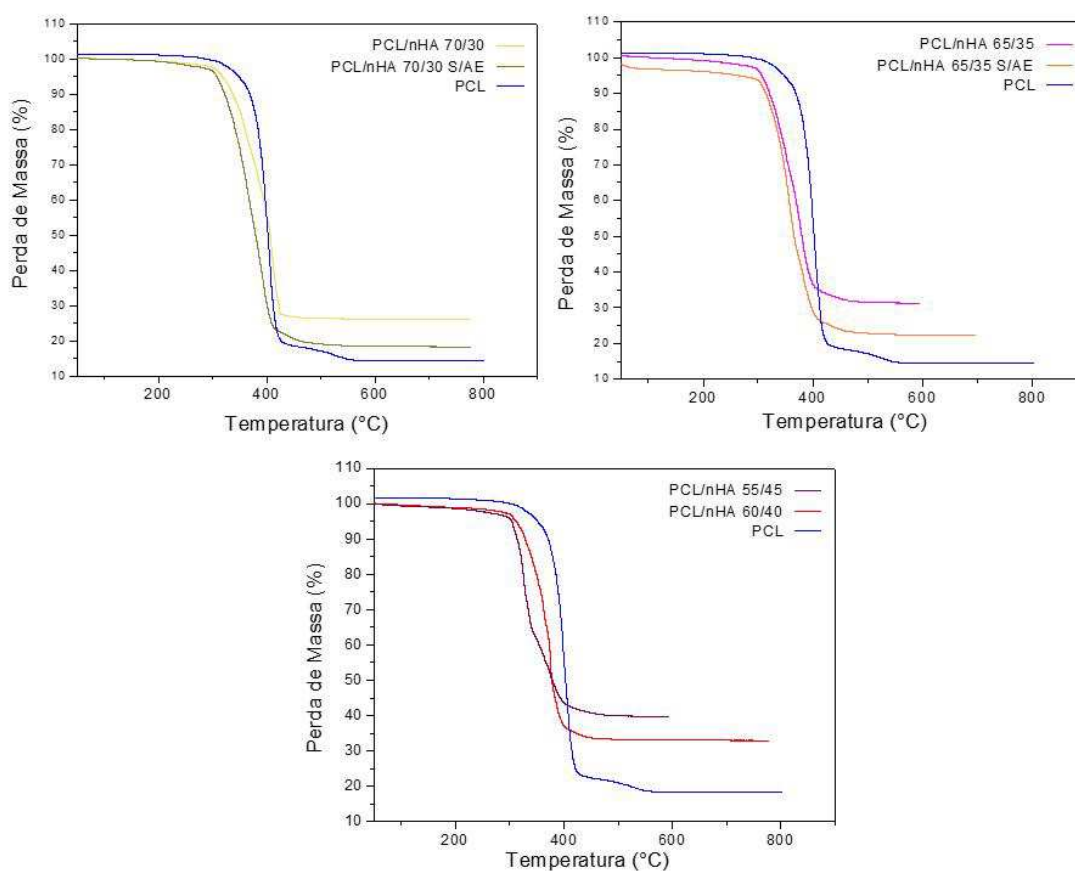


Figura 66 – Curvas termogravimétricas das esferas de PCL/nHA obtidas na Etapa 03.

A Tabela 28 relaciona as formulações e seus respectivos conteúdos percentuais (m/m) de nHA teóricos e reais. Para as formulações 70/30 e 65/35 foram encapsulados 87 % e 87,8 % de nHA com relação ao conteúdo teórico, respectivamente, o que indicou um aumento proporcional à quantidade de nHA adicionada. A composição 60/40 exibiu uma queda no conteúdo real incorporado, apresentando 82,4 %. Para a composição 55/45 foi obtida uma incorporação de 87,4 %. Ainda que esse resultado demonstre uma pequena queda no conteúdo real de nHA encapsulado com relação à composição 65/35, proporcionalmente, a composição 55/45 exibe melhor resultado quanto à efetiva nHA incorporada. Ao confrontar as formulações contendo nHA com e sem AE, nota-se que as porções de nHA efetivamente incluídas na matriz polimérica foram bastante reduzidas na ausência no AE, 61,1%(70/30) e 63 %(65/35).

Com estes resultados, observa-se que até o limite de conteúdo estudado, de 45 % (m/m) de nHA modificada com AE, estas foram continuamente incorporadas à matriz polimérica. Comparando este fato à análise da morfologia interna dessas partículas (item 4.6.2.2), pode-se supor que as nHA podem ter sido encapsuladas por esferas de maiores diâmetros (>800 μm) e pelas partículas irregulares formadas (que foram produzidos em maior quantidade conforme o aumento de conteúdo das nHA).

Tabela 28 – Dados das esferas de PCL/nHA obtidas na etapa 03, relacionando o conteúdo teórico (inicial) e real de nHA no compósito, obtido por TG.

Concentração de PCL (%m/v)	Conteúdo da nHA no compósito (%)	
	Teórico	Real
10,0	30	26,1
10,0	30*	18,3
10,0	35	30,7
10,0	35*	22,0
10,0	40	33,0
10,0	45	39,4

* Sem ácido esteárico.

O rendimento das emulsões foi avaliado, a fim de identificar a rentabilidade dos experimentos para a produção de matrizes 3D. Os valores obtidos estão relacionados na Tabela 29. Valores de rendimento acima de 75 % foram encontrados para todas as formulações, excetuando-se aquelas contendo nHA sem AE. O melhor resultado foi obtido para a composição 70/30, evidenciando maior estabilidade do sistema, observado por MEV pela formação de maiores quantidades de partículas

esféricas. O rendimento decresceu conforme o aumento do conteúdo de nHA, resultando em valores acima de 80%, favoráveis mediante a técnica empregada. Quanto à produção de esferas de PCL, foi alcançado um rendimento vantajoso, de 77,5 %. Os resultados observados na etapa 03 foram melhores quando comparados com a etapa 02. Reduzindo-se a área superficial percorrida pela dispersão PCL/nHA/DCM durante o gotejamento, o rendimento do processo é favorecido.

Tabela 29 – Rendimento obtido para as formulações de PCL/nHA(Etapa 03), da produção de esferas por emulsão S/O/A (Média \pm desvio padrão).

Razão PCL/nHA	Rendimento (%)
70/30	91 \pm 0,7
70/30*	46,2 \pm 1,6
65/35	82,9 \pm 1,6
65/35*	60,0 \pm 3,6
60/40	85,7 \pm 3,7
55/45	81,3 \pm 0,2
100/0	77,5 \pm 1,1

* Sem ácido esteárico.

4.6.2.4 Caracterização físico-química

O material obtido na etapa 03 foi analisado por DRX, para identificação das fases cristalinas presentes. Similarmente aos resultados apresentados no item 4.6.1.4 para as esferas de PCL/nHA obtidas na etapa 02, foram observados os picos referentes à fase cristalina da PCL e picos adicionais referentes às nHA, conforme identificado na Figura 67. Nos padrões obtidos nesta etapa, os picos relacionados às nHA foram mais pronunciados e mais intensos conforme o aumento da quantidade de nHA, como esperado. Ainda, para a amostra 55/45, observa-se uma redução na intensidade dos picos relacionados à fase cristalina do PCL.

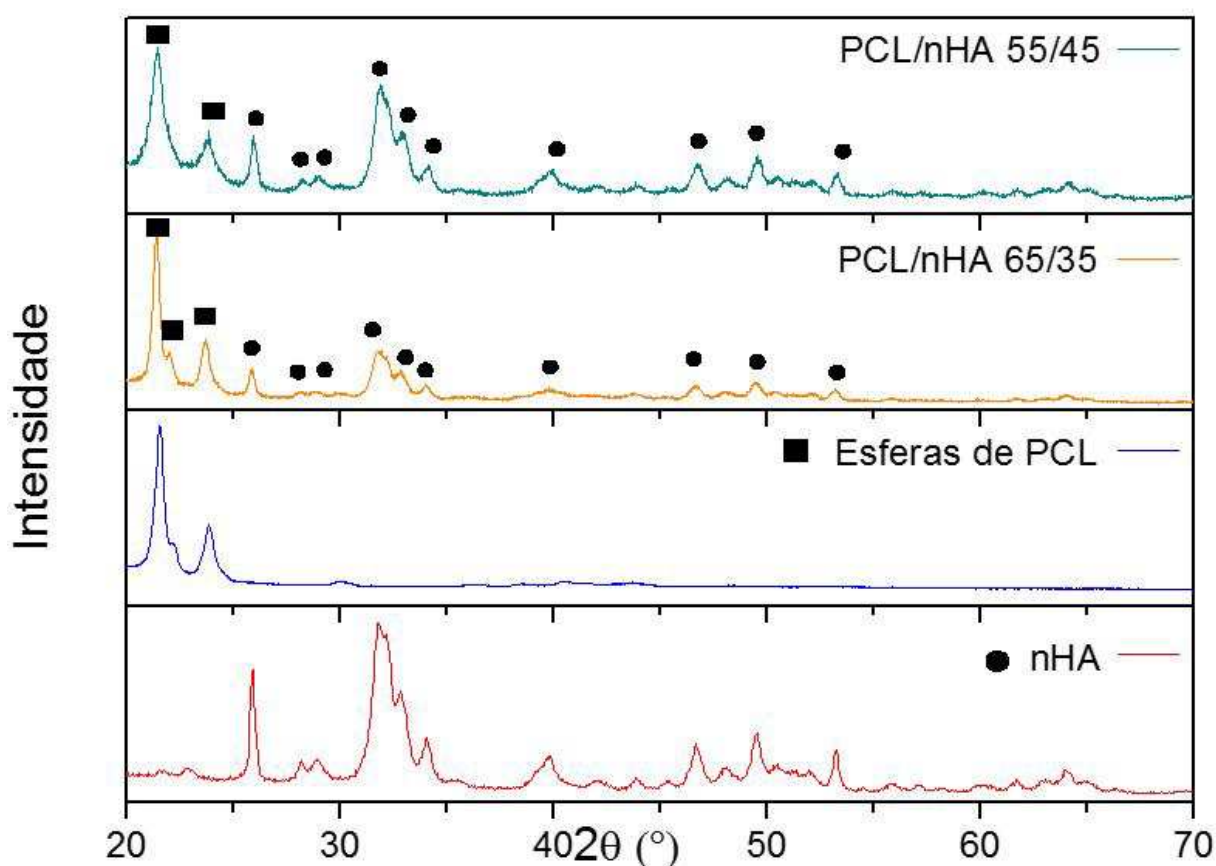


Figura 67 – Padrões de DRX das esferas de PCL, de PCL/nHA 65/35 e PCL/nHA 55/45, comparados ao espectro das nHA.

As possíveis interações ocorridas entre o PCL e as nHA nos compósitos foram estudadas a partir de análises por FTIR, e os espectros obtidos podem ser visualizados na Figura 68. A partir dos espectros obtidos foram identificadas tanto as bandas de absorção características da PCL quanto às da nHA, conforme estudo previamente realizado nos itens 4.1, 4.3 e 4.6.1.4. Nos compósitos produzidos nesta etapa, quantidades de nHA em maiores proporções foram adicionadas e também incorporadas às esferas, de acordo com os resultados obtidos por MEV e TG. Logo, como esperado, os espectros obtidos apresentaram maiores valores de absorbância para o pico a 1031 cm^{-1} , referente ao grupo PO_4^{3-} , conforme o aumento do conteúdo de nHA. De acordo com os resultados de Du et al. (2015), o aumento da quantidade de nHA levou à diminuição dos valores de absorbância das bandas a 2945 cm^{-1} , 2866 cm^{-1} e a 1722 cm^{-1} , características da estrutura da PCL. Isto pode ser observado no espectro de IV da composição PCL/nHA 55/45. Também as bandas adicionais previamente identificadas na região de 1650 a 1500, correspondentes à possível interação entre os grupos carboxila da PCL e o Ca^{2+} da superfície da nHA, foram obser

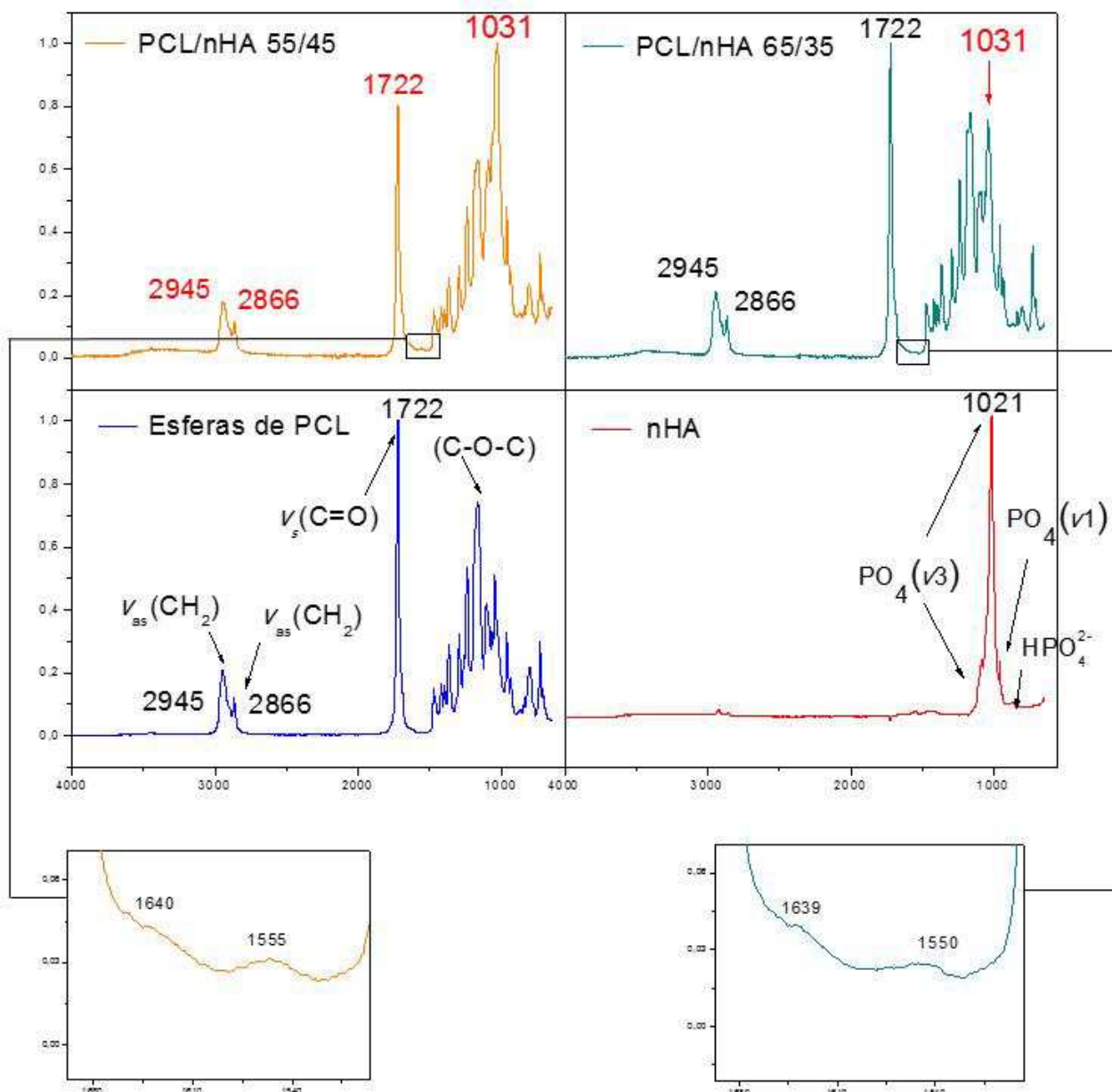


Figura 68 – Espectro de FTIR das esferas de PCL, de PCL/nHA 65/35 e PCL/nHA 55/45, comparados ao espectro das nHA.

vadas nos espectros das amostras de PCL/nHA.

As esferas produzidas nesta etapa foram submetidas a análises por DSC, com a finalidade de determinar a temperatura mais adequada para o processamento das matrizes 3D pelo método de agregação por aquecimento a baixas temperaturas. As curvas obtidas estão apresentadas na Figura 69, comparadas à curva de DSC da PCL na forma de *pellet*. A temperatura de fusão das amostras, obtida a partir dessas curvas, estão relacionados na Tabela 30. É observado que todas as amostras analisadas após o processamento apresentaram T_f maiores que para o PCL *pellet*. Isso é esperado, já que a dissolução do polímero em DCM e sua precipitação durante

o emulsão a partir da evaporação do solvente, levam à reorganização das cadeias poliméricas, especialmente da fase cristalina do polímero, resultando no deslocamento da T_f .

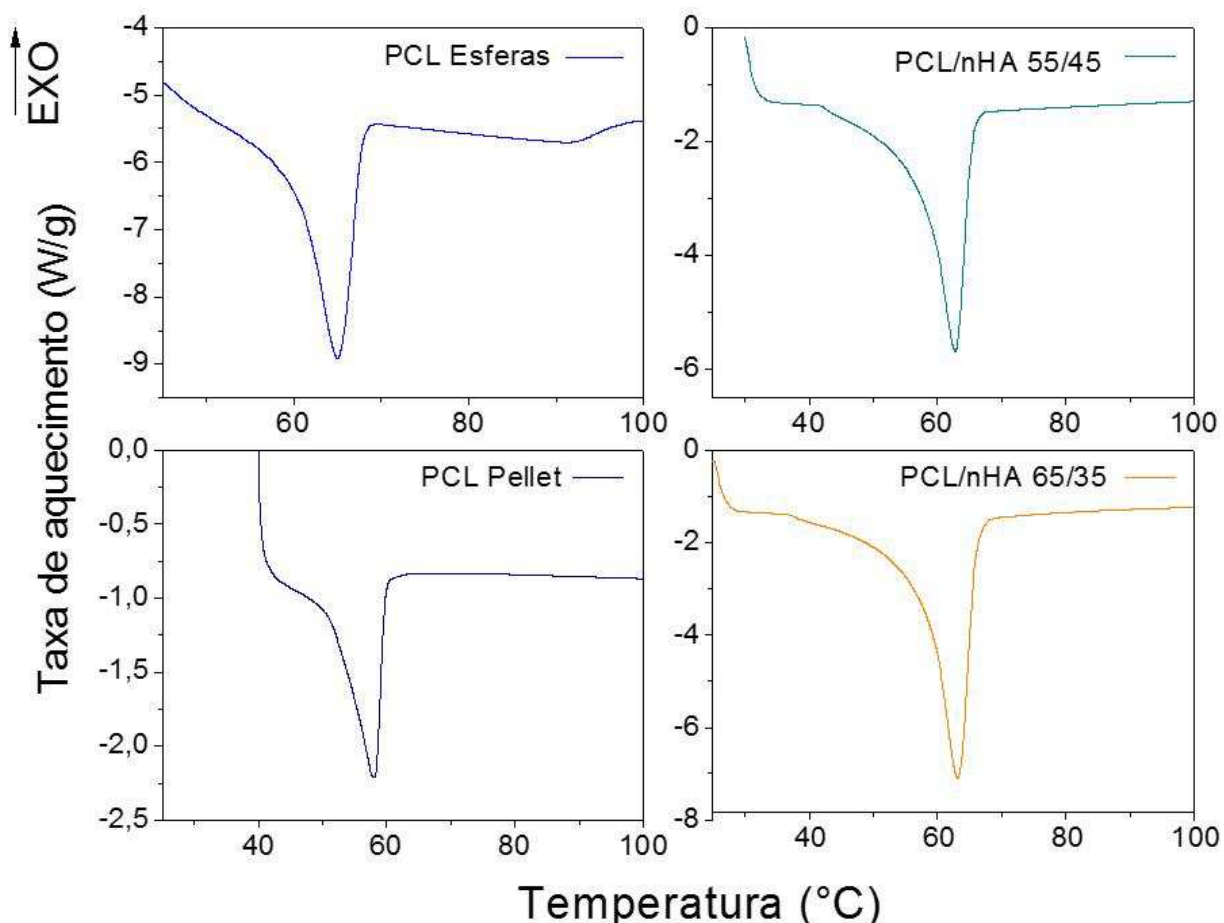


Figura 69 – Curvas de DSC da PCL em *pellet*, esferas de PCL e compósitos de PCL/nHA 55/45 e 65/35 obtidos na etapa 03, na faixa de 25 °C a 100 °C.

Tabela 30 – Dados de temperatura de fusão (T_f) obtidos a partir das curvas de DSC.

Material	T_f (°C)
PCL <i>pellet</i>	58,15
PCL esferas	65,02
PCL/nHA 65/35	63,15
PCL/nHA 55/45	62,80

A nucleação e crescimento da fase cristalina ocorre ao longo da evaporação do DCM na emulsão. É observado por Zhou, Wang e Cheung (2011), que a rápida difusão do solvente orgânico durante a precipitação das esferas leva à formação de nanoporos na superfície das mesmas, e provoca uma diminuição na cristalinidade do polímero, referente ao tempo para reorganização das cadeias da fase cristalina.

Com a adição das nHA, as curvas de DSC obtidas exibem picos na região de fusão mais definidos, que indicam a presença de cristais mais uniformes no material (SENEDESE, 2011). Conforme o aumento do conteúdo de nHA, a T_f diminuiu com relação às esferas de PCL, com mínimas diferenças nos valores finais. Resultados semelhantes foram encontrados por Kim e Koh (2013), que produziram microesferas porosas de PCL/HA com 5, 10 e 20 %(m/m) de HA.

Nanopartículas em pequenas cargas podem comportar-se como um agente núcleo-generativo, resultando no aumento da cristalinidade do compósito e, alterando assim, suas propriedades térmicas (LIU et al., 2011). De acordo com Shokrollahi et al. (2014), aumentando-se o teor de carga para quantidades superiores a 20 %, o efeito contrário é produzido, e as nanopartículas podem prejudicar a reordenação da fase cristalina da PCL. Isso também foi demonstrado no trabalho de Kim e Koh (2013). Logo, para uma avaliação mais aprofundada dos efeitos da adição das nHA à matriz de PCL, estudos da cristalinidade do material a partir de análises da cristalização do polímero e do compósito devem ser conduzidos.

▪ **Condições estabelecidas**

Com base nesse estudo, foram ajustados os parâmetros mais apropriados para o desenvolvimento de esferas de PCL/nHA de diâmetros maiores que 800 μm . Foram consideradas, principalmente, a reprodutibilidade e rendimento da produção, tendo em vista que maiores conteúdos de nHA dispersos interna e externamente às partículas poderão conferir melhorias na bioatividade dos dispositivos. Ainda que uma fração das partículas tenha apresentado formas irregulares, estas não foram descartadas, já que a porosidade apresentada deverá induzir à formação de uma estrutura 3D porosa interconectada nas matrizes. Dessa forma, foram estabelecidos: concentração de PCL de 10 % (m/v), conteúdo de nHA de 45%(m/m), adição de ácido esteárico a 5 %(m/m), razão em volume das fases óleo/água de 1/20 utilizando volumes de 20 mL e 400 mL, velocidade de agitação de 250 rpm, temperatura de 34 °C, sendo o teste 07 considerado como referência.

4.7 Matrizes 3D de PCL e de PCL/nHA

Para aplicação do método de agregação de partículas por aquecimento a baixas temperaturas e definição dos parâmetros de processamento mais adequados para este trabalho, testes preliminares foram conduzidos. Na literatura, são descritas metodologias utilizando, principalmente, moldes de aço inoxidável e fontes de calor tais como fornos e estufas. As partículas são submetidas a aquecimento por 1 hora. Logo após, o molde é mantido à temperatura ambiente até o resfriamento da amostra, que é desmoldada.

As tentativas de execução dessa metodologia foram insatisfatórias, pois a oscilação de temperatura dos equipamentos disponíveis, ainda que no valor de 0,5 °C, causaram a completa fusão das partículas. Mesmo sem a ocorrência de oscilações, o calor absorvido pelo molde metálico continuou a aquecer as partículas após serem retiradas da fonte de calor, causando também a fusão do material. Logo, o tempo de exposição ao calor foi experimentado a 40, 50 e 60 minutos, sem que pudesse ser estabelecida uma metodologia precisa.

Diferentes temperaturas (entre 58-63 °C) também foram experimentadas, considerando a T_f e a T_f inicial das partículas, associadas a tempos diferentes de exposição. Quanto à pressão submetida ao êmbolo do molde, forças de 3 e 1,5 N também foram testadas, que levaram a significativas deformações na morfologia das partículas ou sua fusão por excessiva prensagem.

A partir dessa experimentação preliminar foram determinados: pré-aquecimento dos moldes a temperaturas a $2\pm 0,5$ °C abaixo da T_f do material, e aquecimento das partículas durante 2 minutos sob a pressão do êmbolo do molde.

4.7.1 Análise morfológica

Matrizes tridimensionais porosas foram eficazmente produzidas pelo de agregação de partículas a baixas temperaturas. As imagens a seguir (Figura 70) apresentam a estrutura obtida após a agregação das partículas de diferentes composições. As micrografias obtidas por MO e por MEV revelam a efetiva estruturação das matrizes a partir da formação de “pescoços” entre as esferas. Essas estruturas de ligação, decorrentes do aumento da temperatura de sinterização o suficiente para provocar a mobilidade das cadeias poliméricas em partículas

adjacentes, sem deformá-las ou fundi-las totalmente, são mais pronunciadas quanto menor o conteúdo de nHA no compósito. Isso é esperado, já que as análises por MEV evidenciaram o aumento do conteúdo de nHA distribuído na superfície das partículas proporcionalmente à sua adição. No entanto, isto não prejudicou a formação das estruturas tridimensionais, mesmo para a composição 55/45. Também é observado pelas micrografias que, devido às formas e tamanhos variados das partículas utilizadas, algumas delas formaram “pescoços” apenas com uma partícula adjacente, enquanto outras ligaram-se a duas ou mais partículas. Nos trabalhos realizados por Luciani et al. (2008), Borden, Attawia e Laurencin (2002), e Borden et al. (2003), utilizando o mesmo método, foi observada a formação de estruturas 3D semelhantes.

Por essas imagens é observado que poros de variados tamanhos e formatos foram gerados, medindo até 500 μm nas amostras MPCL e MPCL/nHA 70/30 e 65/35. Nas amostras MPCL/nHA 60/40 e 55/45 formaram-se também poros maiores que 500 μm , resultantes da morfologia das partículas utilizadas. Logo, a equação 5 demonstrada no item 3.5.1 é eficaz para prever o tamanho dos poros para este método de processamento. Para essas composições também é mais evidente a existência de interconexões.

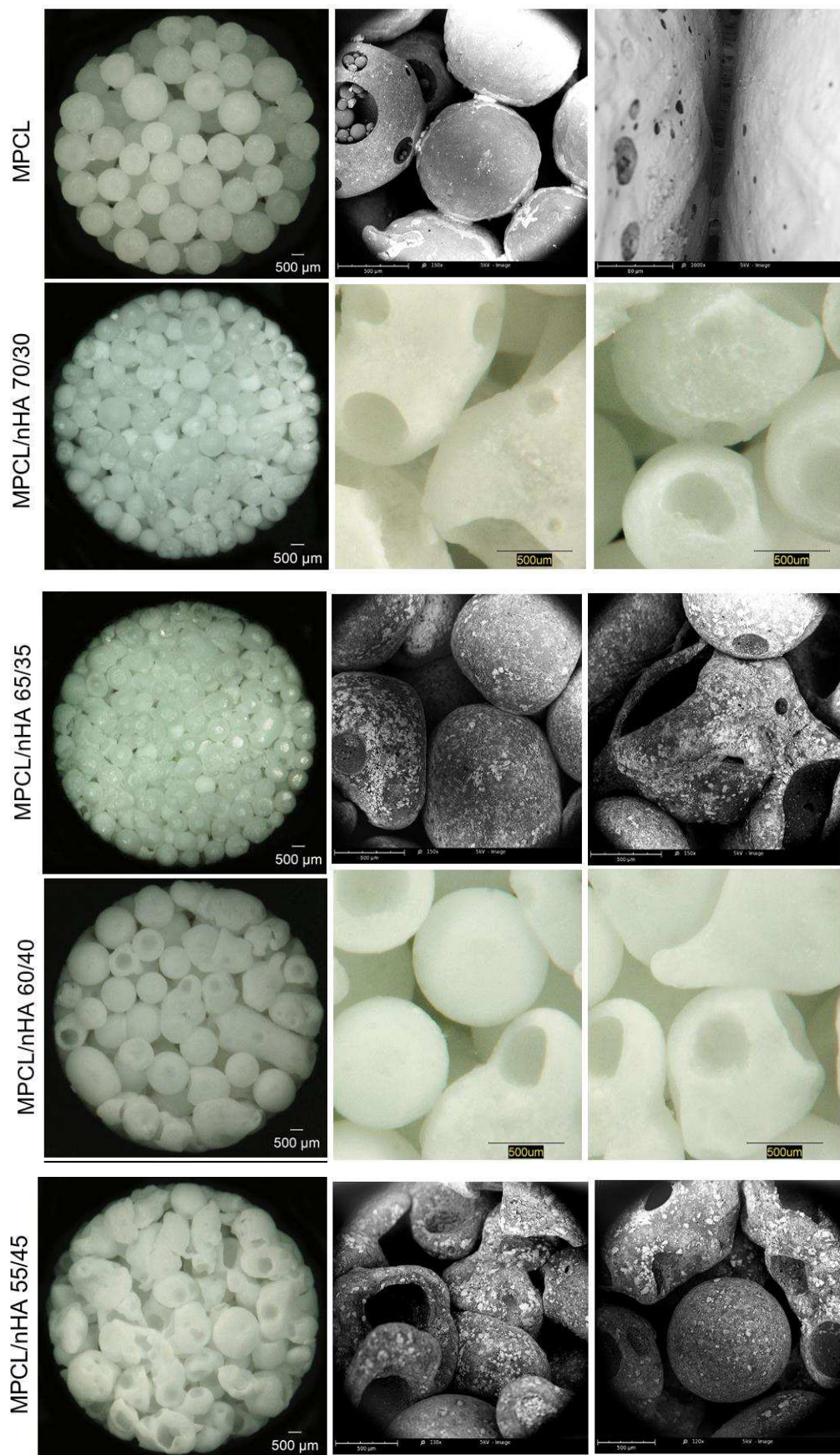


Figura 70– Micrografias obtidas por MEV e por MO obtidas das matrizes 3D de PCL(a-c) e de PCL/nHA 70/30 (d-f) 65/35 (g-i) 60/40 (j-l) 55/45 (m-o).

4.7.2 Ensaio de Bioatividade *in vitro*

As matrizes 3D produzidas neste trabalho foram submetidas à avaliação da bioatividade *in vitro*, pela imersão controlada em SBF. As amostras de PCL e PCL/nHA foram pesadas antes e após o ensaio, avaliadas a 7, 14, 21 e 28 dias, e os resultados estão relacionados na Tabela 31. A superfície das amostras foi analisada por MEV, e as micrografias obtidas estão ilustradas nas Figura 71 e 72.

A amostra 55/45, como esperado, apresentou maior percentual de ganho de peso, de ~1,33 % a partir do 7º dia de avaliação, chegando a ~6,71 % ao 28º dia. As amostras 70/30, 65/35 e 60/40, apresentaram peso bastante semelhante a partir do 21º dia, sendo que, após 7 dias foi verificado um aumento no peso ganho conforme o aumento do conteúdo de nHA. A amostra 70/30 exibiu ganho de peso expressivo somente após 14 dias de avaliação. As matrizes 3D de PCL não apresentaram diferença significativa no peso após o ensaio, o que indica que esse material não apresentou capacidade bioativa, consonante com os dados reportados na literatura (XIA et al., 2013; MARTINS, 2011; WIRIA et al., 2007). Os resultados descritos foram confirmados após a análise por MEV, nos quais as Figura 71(f,i) e 72 (b,c) exibem a superfície das matrizes 3D quase completamente recobertas por camadas de apatita depositadas. Na amostra 55/45, ao 21º dia de avaliação nota-se que a superfície do material já se encontra quase totalmente recoberta (71-i). A partir das imagens 72 (d,e), observa-se que a camada de apatita se apresenta na forma de agregados esféricos, morfologia típica, conforme pesquisas já publicadas (MARTINS, 2011; ROOHANI-ESFAHANI et al., 2010; KOKUBO; TAKADAMA, 2006).

Um aspecto importante consiste na influência da modificação superficial das nHA com ácido esteárico na bioatividade das nanopartículas. Li e Weng (2008) avaliaram o material tratado e verificaram que o ácido esteárico retarda a deposição de apatita em 40 h com relação às HA sem modificação. Com os resultados obtidos, é observado que o método de processamento abordado neste trabalho não interfere na capacidade bioativa das nHA.

Tabela 31 – Dados de ganho de peso das matrizes 3D submetidas ao ensaio de bioatividade *in vitro*, após avaliação durante 7, 14, 21 e 28 dias (Média \pm desvio padrão).

Amostra	Ganho de Peso (%)			
	7D	14D	21D	28D
MPCL	0,59 \pm 0,23	0,32 \pm 0,05	0,21 \pm 0,02	0,25 \pm 0,13
MPCL/nHA 70/30	0,26 \pm 0,65	0,68 \pm 0,05	2,31 \pm 0,65	3,70 \pm 0,16
MPCL/nHA 65/35	0,83 \pm 0,02	0,83 \pm 0,34	2,10 \pm 0,96	4,00 \pm 1,20
MPCL/nHA 60/40	1,02 \pm 0,02	1,11 \pm 0,22	2,79 \pm 0,06	3,70 \pm 0,17
MPCL/nHA 55/45	1,33 \pm 0,01	2,26 \pm 0,18	4,80 \pm 1,30	6,71 \pm 0,15

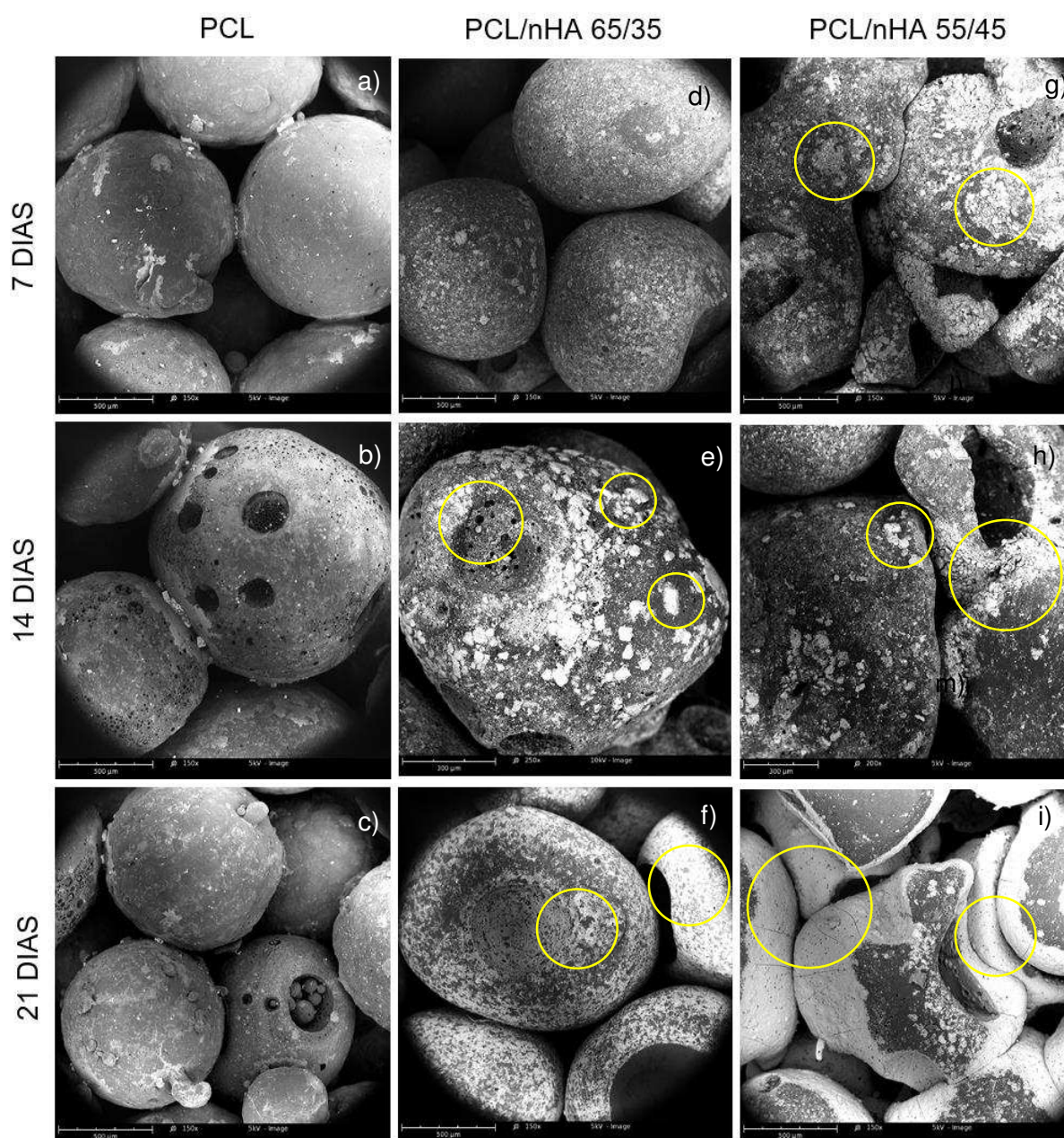


Figura 71 – Micrografias de MEV obtidas das matrizes 3D de PCL e de PCL/nHA 65/35 e 55/45 após ensaio de bioatividade *in vitro*, em 7, 14 e 21 dias de avaliação.

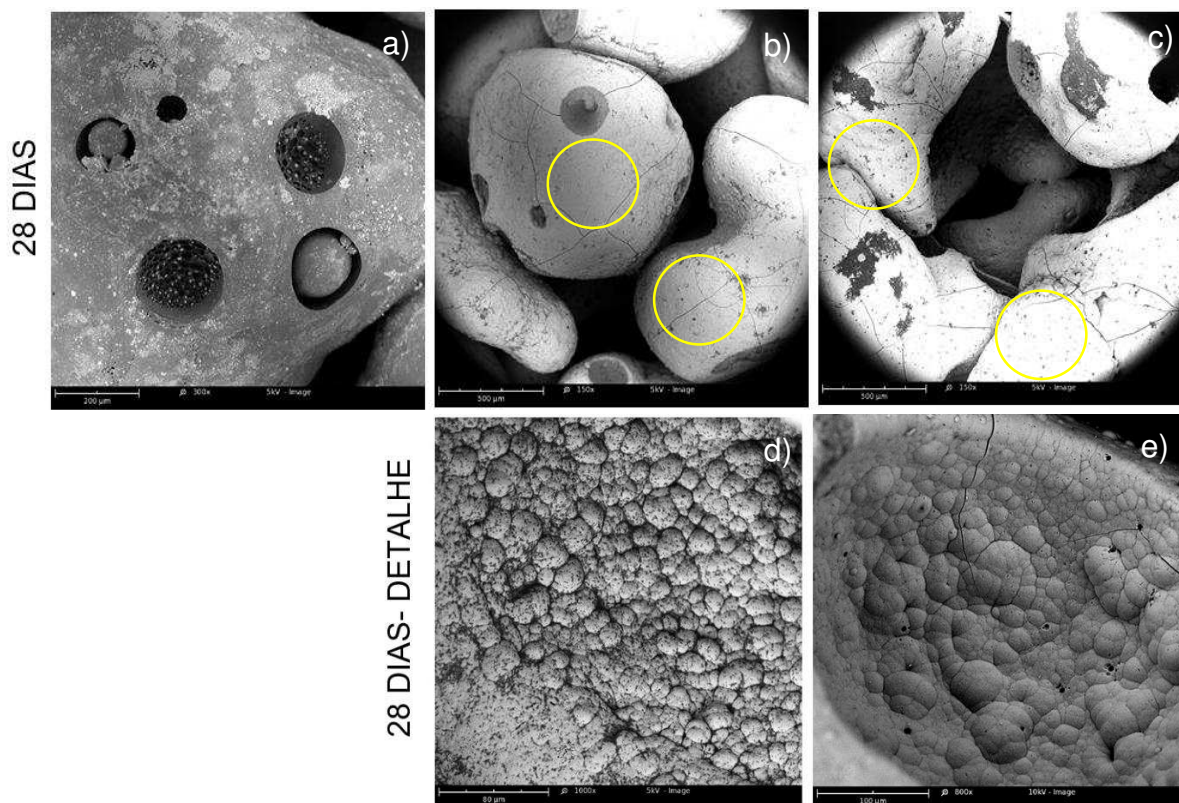


Figura 72 – Micrografias de MEV obtidas das matrizes 3D de PCL e de PCL/nHA 65/35 e 55/45 após ensaio de bioatividade *in vitro* após 28 dias de avaliação.

4.7.3 Ensaio de Adesão Celular *in vitro*

A morfologia das matrizes 3D de PCL/nHA 55/45 após o ensaio de adesão celular *in vitro* realizado foi analisada por MEV e as imagens obtidas de diferentes regiões do material estão apresentadas na Figura 73.

Com base nas micrografias de MEV obtidas das matrizes 3D de PCL/nHA 55/45 após o ensaio de adesão celular realizado, foi possível observar que após 7 dias de cultivo celular, as células se apresentaram aderidas à matriz. Além de aderidas, estas também exibiram prolongamentos celulares os quais são característicos de seu desenvolvimento e viabilidade. Através desses prolongamentos, as células realizam interações célula/célula e desencadeiam mecanismos de sinalização que serão responsáveis pela síntese e secreção de matriz extracelular. Todas essas características são necessárias para manutenção do tecido celular e seu desenvolvimento. Portanto, as matrizes desenvolvidas se mostraram um bom substrato para aderência e desenvolvimento celular.

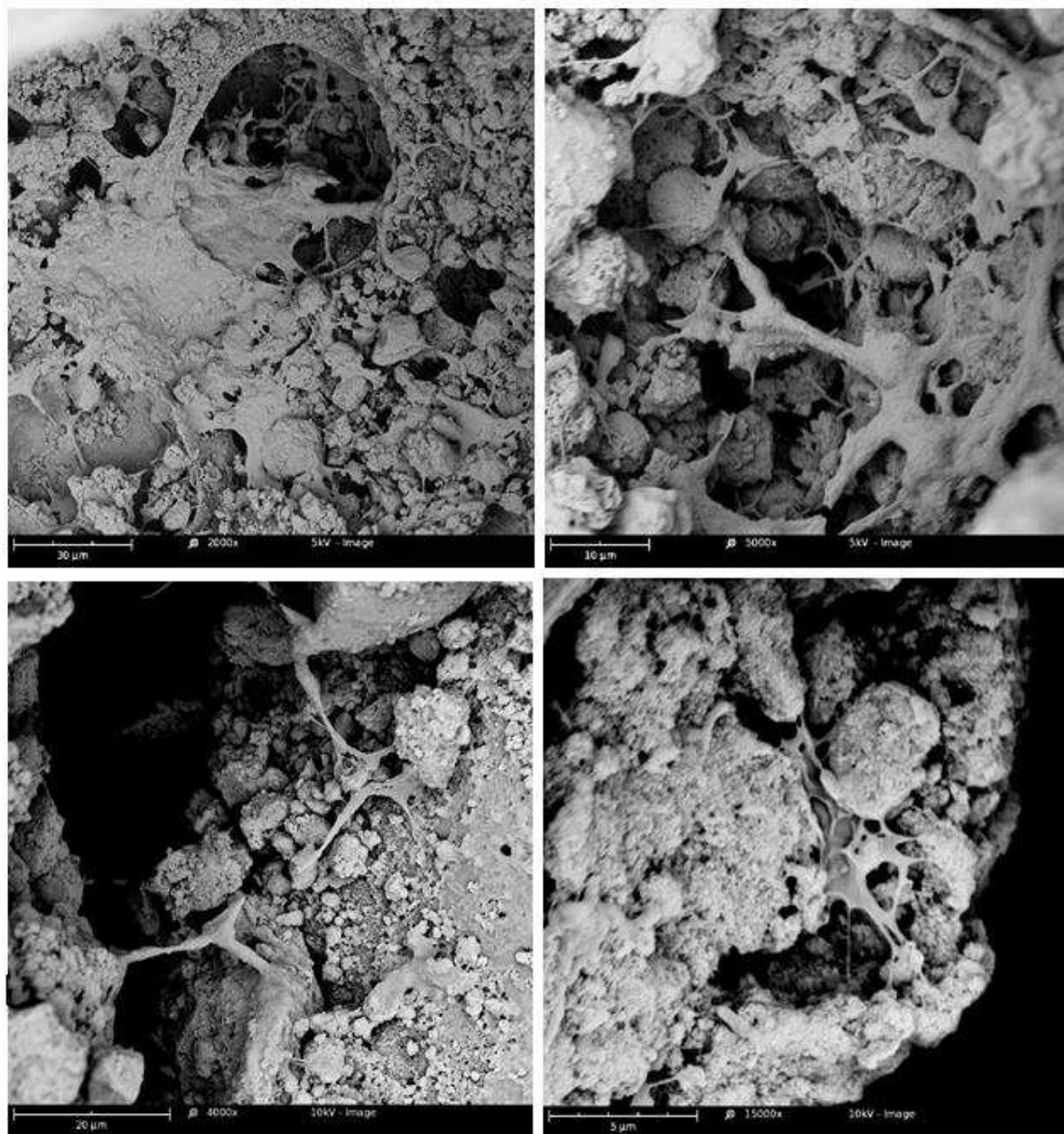


Figura 73 – Micrografias por MEV de matrizes 3D de PCL/nHA 55/45: (a)2000x (b)5000x (c)4000x (d)15000.

5 DISCUSSÃO

Materiais bioativos baseados no uso de nanopartículas de hidroxiapatita têm sido extensivamente investigados e utilizados no campo biomédico. Rotas diversas para síntese dessas nanopartículas levam à formação de materiais com características físico-químicas, morfológicas e biológicas específicas. Os métodos realizados via úmida podem ser conduzidos a baixas temperaturas, favorecendo a formação de nanopartículas. Neste trabalho, o método de precipitação química via úmida foi escolhido, tendo em vista a sua simplicidade de execução, reprodutibilidade e produção de maiores quantidades de nHA. Neste método, particular atenção deve ser direcionada à taxa de adição dos precursores, pH inicial e temperatura da reação. A mistura dos precursores deve ser realizada lentamente, enquanto o pH acima de 10 e temperaturas de até 80 °C são mais adequadas, conforme estudos previamente realizados e reportados (KHALID et al., 2013; SADAT-SHOJAI et al., 2013; OKADA; FURUZONO, 2012; PAZ et al., 2012; WANG et al., 2010).

Wang et al. (2010) investigou o efeito do valor inicial de pH das soluções precursoras da hidroxiapatita na morfologia das partículas precipitadas. Seus resultados evidenciaram a formação de partículas nanométricas com pH inicial a partir de 10. O autor discute que o crescimento do cristal de HA é orientado pelo cátion OH-Ca_6 nas direções *a* e *b*, enquanto o crescimento na direção *c* é orientado pelo ânion $\text{Ca-P}_6\text{O}_{24}$, ambos formados após a mistura entre os dois precursores. Com pH menores que 10 a concentração de OH^- é mais baixa, havendo formação prioritária do ânion $\text{Ca-P}_6\text{O}_{24}$, e crescimento preferencial no eixo *z* (direção *c*). Com o aumento de pH das soluções há maior concentração de OH^- , que causa a formação mais rápida de OH-Ca_6 em relação ao $\text{Ca-P}_6\text{O}_{24}$. Como a superfície do núcleo da HA apresenta carga negativa, esses cátions são facilmente adsorvidos, ocasionando crescimento uniforme em *a*, *b* e *c*.

Apatitas produzidas sob baixas temperaturas possuem maior superfície específica (de 20 a 100 m^2/g), mais similares à apatita biológica, as quais, de acordo a literatura, apresentam maior capacidade bioativa e de reabsorção, além de melhor adesão celular (SADAT-SHOJAI et al., 2013; ZHOU; LEE, 2011; CATROS et al., 2010). Nesta pesquisa, foram obtidas nanopartículas de hidroxiapatita deficientes em cálcio. Seus cristais são menos estáveis devido às substituições de íons em sua estrutura, apresentando maior capacidade de reabsorção. É um material mais reativo

que a HA estequiométrica e, portanto, mais solúvel e biodegradável (ZHANG; ZHANG, 2011; GUO et al., 2009; ELLIOTT, 1994; LEGEROS, 1993).

No contexto da aplicação de matrizes 3D para a regeneração óssea, o desenvolvimento de dispositivos a partir de nanocompósitos formados por poliésteres, a exemplo da policaprolactona estudada neste trabalho, associados à nanohidroxiapatita, têm sido estudados sob diferentes formas de processamento. Devido à relativa hidrofobicidade característica da PCL, a combinação com fases de fosfato de cálcio menos estáveis e, conseqüentemente, mais solúveis, tem sido buscada. No entanto, ainda que as nanopartículas de HA sejam vantajosamente aplicadas como material de preenchimento em compósitos com matrizes poliméricas, a interação entre esses materiais é baixa, devido às diferenças de polaridade. Neste trabalho, buscou-se a otimização da interface entre a PCL e as nHA, seja por interação química ou física. Quanto a melhorias na interação química, o ácido esteárico foi empregado como agente de acoplamento, adicionado à superfície das nHA.

De acordo com Li e Weng (2008), a interação entre a HA e o ácido esteárico pode ocorrer por adsorção ou por reação química. A interação por adsorção é considerada fraca, podendo o AE ser removido por lavagem utilizando etanol em alta temperatura, enquanto a reação química consiste na formação de ligações químicas. De acordo com o espectro de FTIR estudado (Figura 25), ocorreu uma reação química envolvendo a Ca^{2+} da HA e o COOH do AE, condizente com os resultados encontrados na literatura (LIUYUN et al., 2012; ZHANG et al., 2012; LI; WENG, 2008).

As nanopartículas de HA apresentam forte tendência à formação de aglomerados devido às forças de van der Waals e pontes de hidrogênio envolvidas na interação entre as partículas (ELLIOTT, 1994). Assim, quando dispersas em solventes, mesmo após intensa dispersão, tendem a se agregar. Com a efetividade da modificação da superfície das nHA por ácido esteárico realizada neste trabalho, sua estabilidade em soluções não aquosas pôde ser melhorada.

No que diz respeito a melhorias na interação física entre a PCL e as nHA, o método de precipitação de microesferas por emulsão simples S/O/A com evaporação do solvente foi empregado. Esferas de PCL e de PCL/HA foram obtidos com sucesso, apresentando morfologia densa ou porosa e, no caso dos compósitos, com nHA dispersa interna e externamente às partículas.

O processo de formação das esferas se inicia com a evaporação do solvente orgânico da superfície das gotículas, formadas durante a agitação do sistema. Com

isto, a concentração do polímero aumenta, atingindo um ponto crítico no qual essa concentração excede a sua solubilidade no solvente, resultando na precipitação do material na fase aquosa (BOLOURTCHIAN; KARIMI; ABOOFAZELI, 2005).

Dentre os possíveis solventes a serem utilizados para dissolução da PCL, o clorofórmio e o diclorometano são os mais aplicáveis ao processo de emulsão devido à temperatura de ebulição, de ~61 °C e ~40 °C, respectivamente. No entanto, o DCM, por apresentar uma evaporação mais rápida, facilita a formação das esferas durante o processo. Acrescenta-se a isso, os limites residuais aceitáveis para esses solventes na formulação de produtos farmacêuticos, por se tratarem de compostos tóxicos (BORDES et al., 2010). De acordo com o “Guia sobre impurezas provenientes de solventes”, emitido pela Agência Europeia de Medicina em 2009, o clorofórmio e o diclorometano podem ser utilizados desde que obedeçam às restrições de exposição máxima permitida de 0.6 mg/dia (60 ppm) e 6 mg/dia (600 ppm), respectivamente. Fujii et al. (2012), desenvolveram microesferas de PCL recobertas com hidroxiapatita e utilizaram o DCM como solvente. Para avaliar o DCM residual nas amostras finais, utilizaram a cromatografia gasosa e detectaram um limite de concentração de 10 ppm, sendo este valor abaixo do limite recomendado. Ainda que nesta pesquisa este método não tenha sido aplicado, esse resultado é favorável, e o DCM apresenta menor restrição se comparado com o clorofórmio.

Emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, sendo que vários processos levam a alterações na distribuição de tamanho das gotas e/ou estrutura da emulsão (TCHOLAKOVA et al., 2006). Nesse processo, deve-se considerar que a interface entre dois líquidos imiscíveis é um espaço de energia livre resultante de um desequilíbrio nas forças de coesão entre ambos. Esta energia induz à contração da interface, para formar a menor área interfacial possível. Logo, em uma emulsão, a fase dispersa tende a formar gotículas esféricas, que são a menor área interfacial por unidade de volume. Ademais, essas gotículas tendem a coalescer, reduzindo assim a área interfacial. A coalescência pode ser evitada, reduzindo-se a tensão interfacial entre as fases pela utilização de um agente emulsificante, tendo este um papel fundamental na efetividade do processo (BOUYER et al., 2012; PAL, 2011). Para esta pesquisa foi estabelecido o álcool polivinílico (PVA) como estabilizante, amplamente empregado para este fim (KEMALA; BUDIANTO; SOEGYONO, 2012).

Nesse contexto, Chen, Bei e Wang (2000) investigaram a influência da utilização da gelatina, álcool polivinílico e poliacrilamida hidrofobicamente modificada (PAM), como emulsificantes, e obtiveram partículas esféricas em todas as condições. Porém, os resultados mais promissores foram encontrados com o uso da gelatina, obtendo-se diâmetros menores, superfície mais lisa e estreita distribuição de tamanho das partículas. Com o PVA, foram obtidas partículas irregulares. Esse resultado se deve, provavelmente, à maior hidrofiliabilidade do PVA com relação à gelatina. Sabe-se, no entanto, que o efeito da concentração do agente emulsificante é também um resultado da combinação entre os demais parâmetros da emulsão (HUNG, 2011; LEE et al., 2010; HENRY; ABAZINGE, 2009; JEONG; ZHU et al., 2005; LEE; CHO, 2003). Na presente pesquisa, o PVA foi escolhido por permitir a obtenção de faixas de maiores valores de diâmetro das esferas, necessárias para a produção posterior de matrizes 3D.

Quanto à utilização do PVA como estabilizante de emulsões em presença do diclorometano, os grupos hidroxila do PVA interagem com a água, enquanto suas cadeias vinílicas interagem com o diclorometano, tornando a emulsão mais estável. Por isso, a variação na concentração do PVA e no volume da solução, influencia nas características finais das partículas, conforme também reportado por Kemala, Budianto e Soegiyono (2012). Estes autores pesquisaram a influência da concentração de PVA (0,5 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 % e 3 %) e da razão em volume entre as fases óleo/água (1/10, 1/20, 1/30, 1/40 e 1/50) na produção de microesferas de PLA/PCL. Foi demonstrado que o tamanho das partículas é inversamente proporcional à concentração de PVA, com resultados desfavoráveis a 3 %. Os melhores resultados quanto à uniformidade da forma e diâmetro das microesferas foram encontrados para 2,5 %, condizentes com os dados encontrados nesta pesquisa e por outros autores (HUNG, 2011; BOLOURTCHIAN; KARIMI; ABOOFAZELI, 2005; ZHU et al., 2005; AHLIN et al., 2002; CHEN; BEI; WANG, 2000b).

Com o aumento da concentração de PVA, mais moléculas se sobrepõem à superfície das gotas, protegendo-as de coalescer. No entanto, em altas concentrações de PVA, essa sobreposição pode causar a precipitação de partículas irregulares. As razões óleo/água de 1/40 e 1/50 propiciaram a formação de partículas não esféricas, e a pesquisa de Kemala, Budianto e Soegiyono (2012) indicou as demais razões como favoráveis à produção de esferas. Dentre os estudos buscados como referência para

determinação da razão óleo/água mais adequada (LEE et al., 2010; HENRY; ABAZINGE, 2009), foram apontadas as proporções de volume de 1/5, 1/10 e 1/20 como mais apropriadas para alcançar microesferas com forma e tamanho homogêneos. No entanto, os volumes utilizados são bem inferiores aos adotados neste trabalho, para fins de produção de maiores quantidades de esferas por emulsão (3 mL/60 mL e 5 mL/100 mL comparados a 20 mL/400 mL e 30 mL/600 mL). Dessa forma, a proporção de 1/20 foi tomada como padrão.

No estudo da influência da velocidade de agitação e da concentração da solução polimérica, Tuli et al. (2012) utilizaram concentrações de PCL de 10 % (m/v) e 15 % (m/v), para uma solução de PVA de 1 % (m/v), sob agitação a 2000 rpm, 8000 rpm e 15000 rpm. Seus resultados demonstraram que o diâmetro das esferas foi inversamente proporcional à velocidade de agitação, e diretamente proporcional à concentração da solução polimérica. Hung (2011) estudou a influência de diferentes velocidades de agitação (6000, 5000, 4000 e 3000 rpm) na obtenção de microesferas de PCL por emulsão, a uma concentração de 3 % (m/v) de PCL em solução aquosa de PVA a 2 % (m/v). Os resultados apresentados apontaram o aumento do diâmetro das esferas para velocidades mais lentas, sem influências significativas na distribuição de tamanho.

Maiores velocidades de agitação causam o cisalhamento das gotas da solução polimérica em gotículas menores que, por sua vez, geram esferas de tamanho reduzido. Ademais, maiores velocidades geram maior circulação de ar atmosférico na emulsão, induzindo à evaporação mais rápida do solvente, o que contribui para a formação de esferas menores. Maiores velocidades em combinação a baixas concentrações do agente emulsificante (alta tensão interfacial), levarão à coalescência entre gotículas ou mesmo, à penetração de bolhas de ar em esferas em processo de precipitação, como demonstrado pelos resultados deste trabalho (Fig.37).

O aumento da concentração da solução polimérica acarreta o aumento da viscosidade da fase oleosa, gerando gotas mais viscosas e densas. Desse modo, o solvente orgânico encontra maiores resistências à evaporação durante o emulsão. Com isso, as gotas formadas levam mais tempo para precipitar, permitindo que sejam continuamente cisalhadas pela hélice de agitação, gerando esferas de diâmetros menores. Simultaneamente, as gotas em processo de precipitação podem coalescer, gerando distribuições de tamanho mais largas. Além disso, o aumento da concentração de PCL demanda a reorganização de um maior

número de cadeias poliméricas para formar as esferas finais, o que pode ser o motivo das diferenças de rugosidade percebidas na superfície (STROBL, 2007; SCHMIDELL et al., 2001). O aumento do rendimento das formulações conforme a diminuição da concentração de PCL pode estar associado à evaporação mais rápida do diclorometano, resultando na precipitação mais instantânea das esferas, com maior estabilidade do sistema.

Na literatura, vários processos que conduzem a alterações na distribuição de tamanho das gotas na emulsão são descritos. Entre eles, os processos de floculação, de sedimentação, de formação de uma camada semelhante a um creme (“*creaming*”), de coalescência de gotículas e de envelhecimento de Ostwald, são os mais comuns. Este último ocorre com frequência em emulsões do tipo água/óleo, enquanto a floculação é mais comum nas do tipo óleo/água (CHEVALIER; BOLZINGER, 2013; TCHOLAKOVA et al., 2006). O termo floculação descreve a formação de grupos de duas ou mais partículas, sendo que estas podem se unir ou separar-se do grupo a qualquer momento. Já a coalescência consiste em um processo irreversível resultante da ruptura dos filmes finos formados entre duas gotas, para gerar gotas maiores.

Nesse contexto, partículas sólidas finamente divididas podem agir como estabilizantes de emulsões pois quando adsorvidas na superfície das gotas, ocasionam uma barreira física que pode impedir a coalescência. O sucesso dessa estabilização depende do balanço hidrofílico/lipofílico das partículas. Emulsões nas quais os surfactantes são substituídos por partículas sólidas, são denominadas emulsões de *Pickering*. É reportado que a alta resistência à coalescência é uma das maiores vantagens da adição dessas partículas que, em escala nanométrica, possibilitam principalmente a estabilização de gotículas de tamanho reduzido (<10 µm), podendo estabilizar também gotículas maiores (CHEVALIER; BOLZINGER, 2013; FUJII et al., 2012).

Em sistemas de emulsão S/O/A, as partículas sólidas, além de serem utilizadas como co-emulsificantes, são também empregadas como agente porogênico para obtenção de microesferas porosas. A inserção de partículas sólidas com afinidade tanto com a fase oleosa quanto com a fase aquosa influencia na velocidade de difusão do solvente volátil, levando à formação de estruturas porosas (CAI et al., 2013). Nesta pesquisa, os processos de coalescência e de floculação são percebidos para as formulações de esferas de PCL, PCL/TCP e PCL/nHA, sendo que, com a adição das nHA, esses eventos foram mais pronunciados. Foram também geradas

partículas porosas e observou-se a tendência das nHA à incorporarem-se às extremidades das partículas. Isso evidencia os efeitos do aumento da área superficial associados à afinidade das nHA tanto com as fases oleosa e aquosa da emulsão.

Foi apontado por Zhou, Wang e Cheung (2011) e por Duan et al. (2010), que a introdução de nanopartículas às emulsões S/O/A diminuiu o diâmetro médio das microesferas, provavelmente porque estas agem como um surfactante de *Pickering* (um co-emulsificante) em combinação com o PVA, formando gotículas menores durante o emulsionamento. Nesta tese, a modificação superficial das nHA as tornou mais hidrofóbicas. Logo, evitou-se em parte a migração natural dessas partículas para a interface óleo/água, o que justifica o aumento no diâmetro médio das esferas de PCL/TCP e PCL/nHA com relação às esferas de PCL.

Quanto às micro rugosidades formadas na superfície das esferas de PCL/nHA, estas podem surgir devido à evaporação do DCM das gotículas, acompanhada de uma diminuição da área interfacial entre as fases O/A e de retração do material. No momento da retração, as nHA situadas próximo às extremidades da gotícula são dispensadas ou permanecem recobrando a superfície das esferas (FUJII et al., 2012; ZHOU et al., 2010). As micro rugosidades conferidas ao material pela presença das nHA mas também observadas na superfície das esferas de PCL, são favoráveis à diferenciação e proliferação de osteoblastos, conforme demonstrado na literatura (GONÇALVES et al., 2015; WANG et al., 2011; GENTILE et al., 2010).

São descritos, na literatura, variados mecanismos de quebra da gota em emulsões. De modo geral, nas gotas com viscosidade maior que da fase contínua, o mecanismo acontece preferencialmente por estiramento da gota na direção axial, podendo ocorrer também pela formação de canais na parte posterior da gota (Figura 74). Porém, simultâneos mecanismos podem ocorrer, causando a deformação. Por cisalhamento, ocorre a deformação devido ao gradiente de velocidade (SMITH, 1974). Esses fenômenos associados à possível ação estabilizante das nanopartículas e à floculação, tendem a ser mais pronunciados com a redução da velocidade de agitação do sistema acompanhada de aquecimento, que permite a volatilização de solvente orgânico das partículas antes que sejam cisalhadas em gotículas menores. Isso pode justificar a obtenção de partículas tanto de formato esférico quanto irregular, sintetizadas na Etapa 03.

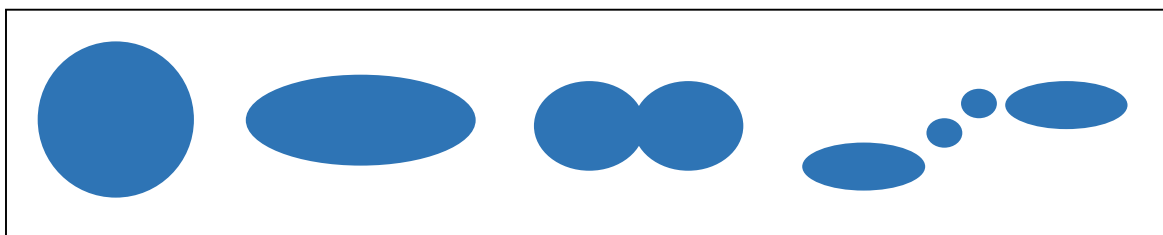


Figura 74 – Mecanismo de quebra de gota por estiramento.

Zhou, Wang e Cheung (2011) desenvolveram microesferas de PLLA/HA carbonatada (CHA) para estruturação de matrizes 3D visando a regeneração óssea, a partir do método de emulsão, utilizando o DCM como solvente e o PVA como emulsificante. Ao avaliar a influência da adição de diferentes conteúdos de CHA, observou que com adição de até 10 %(m/t), não foram observadas CHA remanescentes, não incorporadas à matriz polimérica. Esse fato foi notado para conteúdos a partir de 15 %(m/t), o que corrobora com os resultados desta tese, obtidos pelas análises por TG na Etapa 02.

Qiu et al.(2007) investigou a produção de microesferas de PLLA/HA, utilizando HA enxertadas com PLLA em sua superfície para avaliar o encapsulamento destas na matriz polimérica. Obtiveram microesferas em uma faixa de 200 nm-7,7 μ m e, variando o conteúdo de HA de ~9 a ~33,3 %(m/m), obtiveram menos de 4 % de incorporação com as HA não enxertadas. Com a modificação superficial, o conteúdo de HA encapsulado aumentou para até 29,7 %. Ainda, os resultados de Qiu et al.(2007) demonstraram que, para a adição de conteúdos de HA a partir de 23 %, a quantidade de HA incorporada foi influenciada pela concentração de PVA, obtendo-se melhores resultados para 2 % que para 4 %, o que é resultante da saturação do sistema emulsionado. Kim e Koh (2013) prepararam microesferas de PCL/HA porosas utilizando um método de emulsão S/O/A modificado, e apontaram um aumento no diâmetro médio das microesferas conforme o aumento do conteúdo de HA, resultado atribuído ao aumento da viscosidade das dispersões.

De acordo com os resultados encontrados na literatura, o rendimento das formulações de PCL/nHA na Etapa 02 quanto ao conteúdo real de nHA incorporado à matriz polimérica foi bastante satisfatório com a utilização do ácido esteárico como agente de acoplamento. Com relação à Etapa 03, o rendimento foi potencializado aumentando-se a faixa de diâmetro das esferas e incluindo-se a produção de partículas irregulares. Ademais, o rendimento da produção de partículas tanto na

Etapa 02 quanto na Etapa 03 foram satisfatórios mediante o método de emulsão empregado, alcançando-se valores maiores que 60 % e 80 %, respectivamente.

É importante citar que as esferas produzidas na Etapa 02 (faixa de 10-150 μm) podem ser utilizadas para a produção de matrizes 3D pelo método de SLS. Duan et al.(2010) descreve que o pó utilizado para este tipo de fabricação deve apresentar boa fluidez, para que possa ser uniformemente espalhado e organizado na câmara de sinterização, sendo a faixa de 10-150 μm mais adequada. Devido às grandes quantidades de pó necessárias para o processamento em equipamentos de SLS convencionais disponibilizados comercialmente, esse método se torna inviável, dependendo da composição do material, resultando em altos custos de produção. Visando reduzir esse consumo, Lee (2006) modificou o equipamento de SLS Sinterstation® 2000 para permitir o uso de menores quantidades de material de partida, visando especificamente a produção de matrizes 3D para a engenharia de tecidos. No entanto, o acesso a esse equipamento ainda é limitado.

As caracterizações físico-químicas das esferas de PCL/nHA-DC obtidos nas Etapas 02 e 03, realizadas por DRX e FTIR, indicaram a presença de ambos materiais na composição final. As análises por FTIR evidenciaram que uma possível interação entre os grupos carboxila da PCL com o Ca^{2+} da superfície das nHA ocorreu. Essa interação química pode ter sido acentuada devido à modificação superficial das nHA com ácido esteárico.

Estudos utilizando a emulsão com evaporação do solvente para produção de esferas acima de 800 μm , compostos de PCL/nHA-DC não foram encontrados na literatura até o momento, indicando o caráter pioneiro desta abordagem. Estas partículas (Etapa 03) foram utilizadas neste trabalho para estruturar matrizes 3D porosas a partir do método de agregação por aquecimento a baixas temperaturas. A partir desse método, partículas adjacentes ligaram-se pela formação de “pescoços”, resultando em uma arquitetura 3D porosa com estrutura hierárquica de poros. No entanto, os “pescoços” formados não conferiram às matrizes propriedades mecânicas satisfatórias para aplicações como dispositivos de suporte de carga e preenchimento no corpo. Logo, as matrizes produzidas neste trabalho são direcionadas à cultura de células e maturação de tecidos *in vitro*, em bioreatores, para posterior reimplante.

Este trabalho descreve uma simples abordagem no diz respeito ao planejamento da arquitetura 3D das matrizes. Foi possível estabelecer uma equação (Equação 5) na qual o diâmetro de poros final da estrutura pode ser estimado a partir

do diâmetro das esferas utilizadas. O diâmetro de poros encontrado nas matrizes produzidas foi compatível aos valores previstos pela equação. No trabalho de Luciani et al. (2008), por exemplo, foi realizado um estudo da relação diâmetro da esfera/diâmetro dos poros finais por tentativa e erro. As esferas foram classificadas em diferentes faixas de diâmetro, e matrizes foram produzidas. Posteriormente, avaliou-se a morfologia de cada matriz. Esse processo pode ser facilitado utilizando a equação indicada neste trabalho.

O papel da estrutura porosa (tamanho e formato dos poros, porosidade e interconectividade) é crucial para o efetivo funcionamento das matrizes 3D na regeneração tecidual. Uma estrutura porosa interconectada adequada pode favorecer a adesão e desenvolvimento celular, a migração de células e interação célula/célula, além de facilitar a difusão de nutrientes e fluidos, para formação da matriz extracelular. Também pode beneficiar a osteocondutividade e vascularização durante a remodelagem do tecido ósseo (ZADPOOR, 2015; AMINI; LAURENCIN; NUKAVARAPU, 2012).

Para o tecido ósseo, a arquitetura ideal dos suportes têm sido alvo de discussões, tendo em vista a ambiguidade gerada pelos resultados de variados estudos *in vitro* e *in vivo* (MEHR et al., 2015; XU et al., 2014; BARTNIKOWSKI et al., 2014; LOH; CHOONG, 2013; ANNABI et al., 2010). Isto é gerado principalmente porque as condições mais adequadas são diferentes para aplicações *in vitro* ou *in vivo*. (ZADPOOR, 2015; KARAGEORGIU; KAPLAN, 2005).

Por exemplo, é reportado que poros no mínimo $\approx 100 \mu\text{m}$ são necessários para o desenvolvimento do tecido. Uma estrutura com poros menores ou pouca interconexão pode não disponibilizar espaço suficiente para o transporte de fluidos até a completa angiogênese. Um tamanho médio de poros de $300 \mu\text{m}$ pode ser mais adequado (KARAGEORGIU; KAPLAN, 2005). De acordo com Guo et al. (2009), maiores quantidades de tecido foram observadas em implantes com poros na faixa de $300\text{-}500 \mu\text{m}$. Por isso, de modo geral, foi estabelecida uma faixa de $100\text{-}500 \mu\text{m}$ como base para este trabalho. Esta faixa foi alcançada, assim como poros maiores que $500 \mu\text{m}$, demonstrando a formação de uma hierarquia porosa.

Os estudos mais recentes têm enfatizado não somente o tamanho dos poros mas também a sua geometria, baseados na influência da curvatura da superfície. Rumpler et al. (2008) demonstrou que curvaturas com diâmetros muito maiores que as células podem melhorar a interação com elas e influenciar no seu comportamento.

Além disso, tem sido demonstrado que superfícies côncavas são mais favoráveis que as convexas e as planas (BOCCACCIO et al., 2016; BIDAN et al., 2013). No entanto, esses resultados ainda devem ser melhor confirmados por ensaios *in vivo* (ZADPOOR, 2015). Com base nesses estudos, este trabalho buscou construir uma estrutura microporosa adequada, tendo em vista as curvaturas geradas pela estruturação por microesferas porosas contendo, ainda, nanopartículas distribuídas em sua superfície.

Em 1991 foi proposto que o requisito essencial para um material destinado à regeneração óssea seria a sua capacidade de ligar-se ao tecido ósseo pela formação de uma camada apatítica em sua superfície *in vivo*, e que esta formação poderia ser reproduzida em SBF (KOKUBO; TAKADAMA, 2006). A partir dos ensaios de bioatividade *in vitro* realizados neste trabalho, foi verificada a capacidade bioativa dos suportes com a adição das nHA. Os melhores resultados foram encontrados para a composição PCL/nHA 55/45, conforme esperado, devido às maiores quantidades de nHA dispostas na superfície do material. Portanto, essa composição foi determinada como mais adequada para a construção das matrizes 3D.

Para o desenvolvimento tecidual é necessário que as células tenham à sua disposição os fatores e condições necessárias para o seu metabolismo, crescimento e diferenciação. Os biomateriais a serem utilizados com a finalidade de reposição tecidual devem, portanto, oferecer essas condições, sendo que uma das principais características que um biomaterial deve propiciar é a disponibilidade de uma superfície ideal para a aderência celular. A interação entre a célula e a superfície da matriz oferecida é fundamental na regulação do comportamento celular. Nesse contexto, a utilização do compósito PCL/nHA como matriz emerge com grande potencial, pois o material oferece condições para adesão celular sem alterar a viabilidade celular. Além disso, já foi demonstrado que células, após aderidas ao compósito PCL/nHA, passaram a secretar matriz extracelular, fundamental não somente para a sobrevivência da própria célula secretora, como para migração e adesão de novas células (KUPPAN; SETHURAMAN; KRISHNAN, 2015).

As interações que passam a existir entre o compósito PCL-nHA/célula/matriz extracelular propiciam um microambiente suscetível para a regeneração celular e tecidual. Muitas dessas interações são mediadas através de proteínas como as integrinas, que estão presentes na membrana celular, sendo elas responsáveis por mediar a interação das células com a matriz extracelular (HAN et al., 2014). Com a

adição da hidroxiapatita, a carga positiva gerada na superfície do compósito também pode favorecer a adesão celular acelerando assim a fixação das células em sua estrutura. Esses efeitos podem ser acompanhados por outros processos celulares como proliferação e diferenciação celular, como já foi demonstrado por Du et al. (2015), Shinto et al. (2013) e Shor et al. (2007).

Portanto, essas características biológicas de manutenção e proliferação celular, além de citocompatibilidade, as quais podem ser observadas em materiais compostos com PCL/nHA, tornam evidente o grande potencial que esse material apresenta para a utilização na produção de biomateriais. Desta forma, os resultados da avaliação da viabilidade celular da PCL, e da adesão celular *in vitro* das matrizes 3D de PCL/nHA-DC encontrados nesta tese corroboram com os dados já descritos na literatura, e demonstram que, após o processo de produção empregado, as características biológicas de compatibilidade e de não produção de efeitos citotóxicos se mantêm. Além disso, as matrizes demonstraram ser um bom substrato para a adesão e desenvolvimento celular.

6 CONCLUSÕES

Este trabalho de pesquisa teve como foco a produção de matrizes 3D para utilização como suporte na reparação tecidual com ênfase no tecido ósseo, buscando novas perspectivas quanto ao aprimoramento da microestrutura desses dispositivos a partir de nanocompósitos. A policaprolactona e a nanohidroxiapatita deficiente em cálcio são materiais promissores, passíveis de processamento no campo dos materiais avançados utilizando meios fabris convencionais mais acessíveis. Com base nos objetivos definidos para este trabalho, conclui-se que:

- O método de precipitação química via úmida conduzido a baixas temperaturas foi efetivo reprodutível, obtendo-se nanopartículas de hidroxiapatita deficientes em cálcio no formato de haste, medindo ~47 nm de comprimento e ~8 nm de largura, com superfície específica de 90,1 m²/g. Ainda, foi possível modificar a superfície dessas nanopartículas com ácido esteárico, melhorando sua interação com a PCL no compósito, sem prejuízos à sua capacidade bioativa.
- O método de emulsão O/A e S/O/A utilizado para produzir partículas esféricas na faixa de 10-150 µm e maiores que 800 µm, compostas de PCL e de PCL/nHA, foi apropriado e eficaz. Foi possível estabelecer os parâmetros de processamento específicos à produção de diferentes faixas de diâmetro, controlando-se a morfologia final das partículas. Todas as formulações experimentadas apresentaram rendimento satisfatório, acima de 60 % para partículas entre 10-150 µm, e acima de 80 % para diâmetros maiores que 800 µm.
- As partículas compostas de PCL apresentaram formato unicamente esférico, medindo na faixa de 2-1000 µm, predominantemente densas, com micro rugosidades.
- Quanto às partículas compostas por PCL/nHA-DC, foram produzidos diâmetros na faixa de 3-250 µm, que apresentaram formato predominantemente esférico, com microrugosidades. Na faixa de 300-3300 µm, foram obtidas tanto esferas quanto partículas de formato irregular. Em ambos os casos, formaram-se partículas densas ou porosas.

- As análises por DRX, FTIR, MEV, MO e TG evidenciaram a presença das nHA-DC no compósito, distribuídas interna e externamente às partículas. A partir dos espectros de FTIR foi observada uma possível interação entre os grupos carboxila da PCL com o Ca^{2+} da superfície das nHA. Esses resultados demonstraram interações físicas e químicas entre a PCL e as nHA favoráveis.
- Matrizes 3D porosas de PCL e de PCL/nHA foram obtidas pelo método de agregação de partículas por aquecimento a baixas temperaturas, utilizando partículas maiores que 800 μm . O método utilizado foi simples e reprodutível, capaz de produzir uma arquitetura 3D previsível, com hierarquia de poros medindo até 1500 μm .
- Os ensaios biológicos *in vitro* de bioatividade, avaliação da viabilidade celular e de adesão celular evidenciaram a capacidade bioativa dos dispositivos com a adição das nHA e indicaram que o material se mostrou um substrato favorável para adesão e desenvolvimento celular.
- A composição PCL/nHA-DC 55/45 foi a mais satisfatória para produção das matrizes 3D, devido ao maior conteúdo de nHA incorporado à matriz polimérica que resultou em melhores propriedades biológicas.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para que as esferas e matrizes 3D de PCL/nHA-DC desenvolvidos neste trabalho de investigação possam vir a atender os requisitos necessários para a efetiva aplicação como biomaterial para regeneração do tecido ósseo, tem-se como perspectiva o aperfeiçoamento do material e do processo de produção no que diz respeito:

- Ao processamento das partículas: liofilização para retirada de possíveis resíduos do solvente orgânico; modificação superficial ou funcionalização visando melhorar a afinidade do PCL por biomoléculas e células, mediante hidrólise alcalina e ácida na presença de agentes oxidantes (NaOH, NaOH+KMnO₄, H₂SO₄+ KMnO₄); encapsulamento de fármacos às microesferas visando sua utilização como produtos autônomos;

- À análise das partículas: por cromatografia gasosa para quantificação do teor de solvente residual no material.

- Ao processamento das matrizes 3D: utilizar o método de lixiviação de partículas, aplicando como estruturantes as microesferas na faixa de 10-150 µm e 350-800 µm, buscando alcançar uma arquitetura com maior hierarquia de poros e propriedades mecânicas mais favoráveis; funcionalização com moléculas bioativas favoráveis ao desenvolvimento do tecido ósseo, tais como a osteostatina e o peptídeo de crescimento osteogênico (OGP); estudos de esterilização.

- À análise das matrizes 3D: realização de ensaios mecânicos.

- Aos ensaios biológicos: Avaliação da viabilidade celular *in vitro* na presença do compósito; adesão e proliferação celular *in vitro* avaliada por Microscopia Confocal de Fluorescência e utilizando diferentes linhagens celulares; posteriores estudos de implante *in vivo*.

- À composição do material: produzir o compósito utilizando outras fases de fosfato de cálcio, vitro-cerâmicas, cerâmicas bifásicas ou trifásicas, com aplicação favorável ao desenvolvimento do tecido ósseo; favorecer as propriedades da matriz polimérica a partir da formação de blends do PCL com o PLGA ou o PLA, por exemplo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDALWAFI, M.; WANG, F.; WANG, L.; LI, C. Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: A review. **Reviews on Advanced Materials Science**, v. 34, p. 123-140, 2013.

AGUDELO, R. **Preparação e caracterização de matrizes de liberação controlada de doxicilina à base de nanofibras de policaprolactona e gelatina carregadas com nanopartículas de hidroxiapatita**. 2015. 70f. Dissertação (Mestrado em Química). Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG, Belo Horizonte-Minas Gerais.

AHLIN, P.; KRISTL, J.; KRISTL, A.; VRECER, F. Investigation of polymeric nanoparticles as carriers of enalaprilat for oral administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 239, n.1-2, p.113–20, 2002.

ALBINI, L. T. **Solubilidade do biopolímero PCL em solventes para aplicação no processo de microencapsulação**. 2012. 88f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná-UFPR, Curitiba-Paraná.

ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **European Spine Journal**, v. 10, n.2, p.96–101, 2001.

ÁLVAREZ, Í. L. **Desarrollo de nuevas estrategias para la preparación de nanocomposites con propiedades antimicrobianas**. 2012. 210f. Tesina (Doctorado en Química Molecular Aplicada). Posgrado em Química Molecular Aplicada, Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.

AMINI, A. R.; LAURENCIN, C. T.; NUKAVARAPU, S. P. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. **Critical reviews in biomedical engineering**, v. 40, n. 5, p. 363–408, 2012.

ANNABI, N.; NICHOL, J.W.; ZHONG, X.; JI, C.; KOSHY, S.; KHADEMHOSEINI, A.; DEHGHANI, F. Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. **Tissue engineering: Part B**, v. 16, n. 4, p. 371–383, 2010.

AOKI, K.; ALLES, N.; SPYSA, N.; OHYA, K. Peptide-based delivery to bone. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 12, p. 1220–1238, 2012.

AZEVEDO, M. C.; REIS, R. L. Development and properties of polycaprolactone/hydroxyapatite composite biomaterials. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 14, p. 103–107, 2003.

BALASUNDARAM, G.; SATO, M.; WEBSTER, T. J. Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with {RGD}. **Biomaterials**, v. 27, n. 14, p. 2798–2805, 2006.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 13–21, 2005.

BARTNIKOWSKI, M.; KLEIN, T.J.; MELCHELS, F.P.W.; WOODFRUFF, M.A. Effects of scaffold architecture on mechanical characteristics and osteoblast response to static and perfusion bioreactor cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 7, p. 1440–1451, 2014.

BASILE, M. A.; D'AYALA, G.G.; MALINCONICO, M.; LAURIENZO, P.; COUDANE, J.; NOTTELET, B.; RAGIONE, F.D.; OLIVA, A. Functionalized PCL/HA nanocomposites as microporous membranes for bone regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 48, p. 457–468, 2015.

BENETTI, C. **Estudo da reparação óssea por espectroscopia ATR-FTIR após remoção de fragmento da região mandibular com laser de Er,Cr:YSGG ou broca multilaminada**. 2014. 88f. Tese (Doutorado em Ciências). Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear-Materiais, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia associada à Universidade de São Paulo-USP, São Paulo-São Paulo.

BERNER, A.; WOODRUFF, M.A.; LAN, C.X.F.; ARAFAT, M.T.; SAIFZADEH, S.; STECK, R.; REN, J.; NERLICH, M.; EKAPUTRA, A.K.; GIBSON, I.; HUTMACHER, D.W. Effects of scaffold architecture on cranial bone healing. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 43, n. 4, p. 506–513, 2014.

BERNHARDT, A.; DITTRICH, R.; LODE, A.; DESPANG, F.; GELINSKY, M. Nanocrystalline spherical hydroxyapatite granules for bone repair: in vitro evaluation with osteoblast-like cells and osteoclasts. **Journal of materials science: Materials in medicine**, v. 24, n. 7, p. 1755–66, 2013.

BETTINGER, C. J.; BORENSTEIN, J. T.; LANGER, R. Microfabrication Techniques in Scaffold Development. In: NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. (Eds.) **Nanotechnology and Tissue Engineering: The Scaffold**. Boca Raton: CRC Press-Taylor & Francis Group, 2008. p. 87–119.

BHAMIDIPATI, M.S.M.; SRIDHARAN; B.S.B; SCURTO, A.M.; DETAMORE, M.S. Subcritical CO₂ sintering of microspheres of different polymeric materials to fabricate scaffolds for tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 8, p. 4892–4899, 2013.

BIDAN, C. M.; KOMMAREDDY, K.P.; RUMPLER, M.; KOLLMANNNSBERGER, P.; FRATZL, P.; DUNLOP, J.W.C. Geometry as a factor for tissue growth: towards shape optimization of tissue engineering scaffolds. **Advanced Healthcare Materials**, v. 2, n. 1, p. 186–194, 2013.

- BLACK, C. R. M.; GORIAINOV, V.; GIBBS, D.; KANGZLER, J.; TARE, R.S.; OREFFO, R.O.C. Bone Tissue Engineering. **Current Molecular Biology Reports**, v. 1, n. 3, p. 132–140, 2015.
- BOCCACCIO, A.; UVA, A.E.; FIORENTINNO, M.; MORI, G.; MONNO, G. Geometry Design Optimization of Functionally Graded Scaffolds for Bone Tissue Engineering: A Mechanobiological Approach. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1-20, 2016.
- BOLOURTCHIAN, N.; KARIMI, K.; ABOOFAZELI, R. Preparation and characterization of ibuprofen microspheres. **Journal of microencapsulation**, v. 22, n. 5, p. 529–538, 2005.
- BORDEN, M.; EL-AMIN, S.F.; ATTAWIA, M.; LAURENCIN, C.T. Structural and human cellular assessment of a novel microsphere-based tissue engineered scaffold for bone repair. **Biomaterials**, v. 24, n. 4, p. 597–609, 2003.
- BORDEN, M.; ATTAWIA, M.; LAURENCIN, C. T. The sintered microsphere matrix for bone tissue engineering: In vitro osteoconductivity studies. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 61, n. 3, p. 421–429, 2002.
- BORDES, C.; FRÉVILLE, V.; RUFFIN, E.; MAROTE, P.; GAUVRIT, J.Y.; BRIANÇON, S.; LANTÉRI, P. Determination of poly(ϵ -caprolactone) solubility parameters: application to solvent substitution in a microencapsulation process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, p. 236–243, 2010.
- BORUM-NICHOLAS, L.; WILSON JR., O. C. Surface modification of hydroxyapatite. Part I. Dodecyl alcohol. **Biomaterials**, v. 24, n. 21, p. 3671–3679, 2003.
- BOSE, S.; VAHABZADEH, S.; BANDYOPADHYAY, A. Bone tissue engineering using 3D printing. **Materials Today**, v. 16, n. 12, p. 496–504, 2013.
- BOUYER, E.; MEKHLOUFI, G.; ROSILIO, V.; GROSSIORD, J-L.; AGNELY, F. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, p. 359–378, 2012.
- BRETCANU, O.; CHEN, Q.-Z.; BOCCACCINI, A. R. Inorganic and Composite Bioactive Scaffolds for Bone Tissue Engineering. In: LIU, X.; CHU, P. K. (Eds.). **Biomaterials Fabrication and Processing Handbook**. Boca Raton: CRC Press-Taylor & Francis Group, 2008. p. 3–43.
- BROWN, J. L.; NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Solvent/non-solvent sintering: a novel route to create porous microsphere scaffolds for tissue regeneration. **Journal of biomedical materials research: Part B**, v. 86, n. 2, p. 396–406, 2008.
- BROWN, M. E. **Introduction to Thermal Analysis: Techniques and Applications**. Kluwer Academic Publishers, 2001. ISBN 1402004729.

BURG, K. J. L.; ORR, D. E. An overview of bioresorbable materials. In: BUCHANAN, F. (Ed.). **Degradation Rate of Bioresorbable Materials**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2008. p. 3–18.

CAI, Y.; LIU, Y.; YAN, W.; HU, Q.; TAO, J.; ZHANG, M.; SHI, Z.; TANG, R. Role of hydroxyapatite nanoparticle size in bone cell proliferation. **Journal of Materials Chemistry**, v. 17, n. 36, p. 3780–3787, 2007.

CAI, Y.; CHEN, Y.; HONG, X.; LIU, Z.; YUAN, W. Porous microsphere and its applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 1111–1120, 2013.

CARRODEGUAS, R. G. **Cementos óseos de fosfatos de calcio**. 2000. 149 f. Tesina (Doctorado en Ciencias Químicas). Centro de biomateriales, Faculdade de Química, Univerisdad de La Habana, Havana.

CARVALHO, A. R. R. **Desenvolvimento de substitutos ósseos à base de cerâmicos porosos**. 2012. 58 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

CATROS, S.; GUILLEMOT, F.; LEBRAUD, E.; CHANSEAU, C.; PEREZ, S.; BAREILLE, R.; AMÉDÉE, J.; FRICAIN, J.C. Physico-chemical and biological properties of a nano-hydroxyapatite powder synthesized at room temperature. **IRBM**, v. 31, n. 4, p. 226–233, 2010.

CHEN, D. R.; BEI, J. Z.; WANG, S. G. Polycaprolactone microparticles and their biodegradation. **Polymer Degradation and Stability**, v. 67, n. 3, p. 455–459, 2000a.

CHEN, H.; BEI, J.; WANG, J. Study on biodegradation behavior of PCL/PEO/PLA tri-component copolymer. **Acta Polymerica Sinica**, v. 1, n. 5, p. 626–631, 2000b.

CHEOW, W. S.; NG, M.L.L.; KHO, K.; HADINOTO, K. Spray-freeze-drying production of thermally sensitive polymeric nanoparticle aggregates for inhaled drug delivery: effect of freeze-drying adjuvants. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, n. 1-2, p. 289–300, 2011.

CHEVALIER, Y.; BOLZINGER, M.-A. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 439, p. 23–34, 2013.

CHIA, H. N.; WU, B. M. Recent advances in 3D printing of biomaterials. **Journal of Biological Engineering**, v. 9, n.4, p. 1-14, 2015.

CHRISTOFFERSEN, J.; CHRISTOFFERSEN, M.R.; KOLTHOFF, N.; BARENHOLDT, O. Effects of strontium ions on growth and dissolution of hydroxyapatite and on bone mineral detection. **Bone**, v. 20, n. 1, p. 47–54, 1997.

CHUENJITKUNTAWORN, B.; OSATHANON, T.; NOWWAROTE, N.; SUPAPHOL, P.; PAVASANT, P. The efficacy of polycaprolactone/hydroxyapatite scaffold in combination with mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 104, n. 1, p. 264–71, 2015.

CHUNG, C.; BURDICK, J. A. Engineering Cartilage Tissue. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 2, p. 243–262, 2008.

CIARDELLI, G.; CHIONO, V.; VOZZI, G.; PRACELLA, M.; AHLUWALIA, A.; BARBANI, N.; CRISTALLINI, C.; GIUSTI, P. Blends of poly-(epsilon-caprolactone) and polysaccharides in tissue engineering applications. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 4, p. 1961–1976, 2005.

COLEMAN, M. M.; ZARIAN, J. Fourier-transform infrared studies of polymer blends. II. Poly(ϵ -caprolactone)–poly(vinyl chloride) system. **Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition**, v. 17, n. 5, p. 837–850, 1979.

DASH, T. K.; KONKIMALLA, V. B. Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 1, p. 15–33, 2012.

DHANDAYUTHAPANI, B.; YOSHIDA, Y.; MAEKAWA, T.; KUMAR, D.S. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. **International Journal of Polymer Science**, v. 2011, p. 1–19, 2011.

DU, Y.; LIU, H.; SHUANG, J.; WANG, J.; MA, J.; ZHANG, S. Microsphere-based selective laser sintering for building macroporous bone scaffolds with controlled microstructure and excellent biocompatibility. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 135, p. 81–89, 2015.

DUAN, B.; WANG, M.; ZHOU, W.Y.; CHEUNG, W.L.; LI, Z.Y.; LU, W.W. Three-dimensional nanocomposite scaffolds fabricated via selective laser sintering for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 12, p. 4495–4505, 2010.

ELLIOTT, J. C. **Studies in Inorganic Chemistry 18: Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates**. Elsevier Science B.V., 1994. ISBN 0444815821.

ELZEIN, T.; NASSER-EDDINE, M.; DELAITE, C.; BISTAC, S.; DUMAS, P. FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 273, n. 2, p. 381–387, 2004.

EOSOLY, S.; BRABAZON, D.; LOHFELD, S.; HINDIE, M.; LOONEY, L. Selective laser sintering of hydroxyapatite/poly- ϵ -caprolactone scaffolds. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 7, p. 2511–2517, 2010.

EOSOLY, S.; VRAN, N.E.; LOHFIELD, S.; HINDIE, M.; LOONEY, L. Interaction of cell culture with composition effects on the mechanical properties of polycaprolactone-hydroxyapatite scaffolds fabricated via selective laser sintering (SLS). **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 8, p. 2250–2257, 2012.

ESHRAHGI, S.; DAS, S. Micromechanical finite-element modeling and experimental characterization of the compressive mechanical properties of polycaprolactone-hydroxyapatite composite scaffolds prepared by selective laser sintering for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 8, p. 3138–3143, 2012.

FABBRI, P.; BONDIOLI, F.; MESSORI, M.; BARTOLI, C.; DINUCCI, D.; CHIELLINI, F. Porous scaffolds of polycaprolactone reinforced with in situ generated hydroxyapatite for bone tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 1, p. 343–351, 2010.

FATHI, M. H.; HANIFI, A. Evaluation and characterization of nanostructure hydroxyapatite powder prepared by simple sol–gel method. **Materials Letters**, v. 61, n. 18, p. 3978–3983, 2007.

FIDELES, T. B. **Scaffolds de quitosana para aplicação na engenharia de tecidos**. 2014. 121f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande-UFCG, Campina Grande-Paraíba.

FONTES, R. A. M. **Fabrico e Caracterização de Scaffolds à Base de Fosfatos de Cálcio**. 2010. 81f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica). Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

FRANCOIS, E.; DORCEMUS, D.; NUKAVARAPU, S. Biomaterials and scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. In: NUKAVARAPU, S. P.; LAURENCIN, J. W. F. T. (Eds.). **Regenerative Engineering of Musculoskeletal Tissues and Interfaces**. Woodhead Publishing, 2015. p. 3–23.

FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 282, p. 1–18, 2004.

FU, S.; NI, P.; WANG, B.; CHU, B.; ZHENG, L.; LUO, J.; QIAN, Z. Injectable and thermo-sensitive PEG-PCL-PEG copolymer/collagen/n-HA hydrogel composite for guided bone regeneration. **Biomaterials**, v. 33, n. 19, p. 4801–4809, 2012a.

FU, S.; NI, P.; WANG, B.; CHU, B.; PENG, J.; ZHENG, L.; ZHAO, X.; LUO, F.; WEI, Y.; QIAN, Z. In vivo biocompatibility and osteogenesis of electrospun poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethyleneglycol)-poly(ϵ -caprolactone)/nano-hydroxyapatite composite scaffold. **Biomaterials**, v. 33, n. 33, p. 8363–8371, 2012b.

FUJII, S.; OKADA, M.; NISHIMURA, T.; MAEDA, H.; SUGIMOTO, T.; HAMASAKI, H.; FURUZONO, T.; NAKAMURA, V. Hydroxyapatite-armored poly(epsilon-caprolactone) microspheres and hydroxyapatite microcapsules fabricated via a Pickering emulsion route. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 374, n. 1, p. 1–8, 2012.

GANERIWALA, R.; ZOHDI, T. I. Multiphysics Modeling and Simulation of Selective Laser Sintering Manufacturing Processes. **Procedia CIRP**, v. 14, p. 299–304, 2014.

GENTILE, F.; TIRINATO, L.; BATTISTA, E.; CAUSA, F.; LIBERALE, C.; DI FABRIZIO, E.M.; DECUZZI, P. Cells preferentially grow on rough substrates. **Biomaterials**, v. 31, n. 28, p. 7205–7212, 2010.

GOLDBERG, D. A review of the biodegradability and utility of poly(caprolactone). **Journal of Environmental Polymer Degradation**, v. 3, n. 2, p. 61–67, 1995.

GÓMEZ-MORALES, J.; IAFISCO, M.; DELGADO-LÓPEZ, J.M.; SARDA, S.; DROUET, C. Progress on the preparation of nanocrystalline apatites and surface characterization: Overview of fundamental and applied aspects. **Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials**, v. 59, n. 1, p. 1–46, 2013.

GONÇALVES, E. M.; OLIVEIRA, F.J.; SILVA, R.F.; NETO, M.A.; FERNANDES, M.H.; AMARAL, M.; VALLET-REGÍ, M.; VILA, M. Three-dimensional printed PCL-hydroxyapatite scaffolds filled with CNTs for bone cell growth stimulation. **Journal of Biomedical Materials Research Part B**, p. 1–10, 2015.

GONG, T.; XIE, J.; LIAO, J.; ZHANG, T.; LIN, S.; LIN, Y. Nanomaterials and bone regeneration. **Bone research**, v. 3, p. 1-7, 2015.

GUARINO, V.; CAUSA, F.; NETTI, P.A.; CIAPETTI, G.; PAGANI, S.; MARTINI, D.; BALDINI, N.; AMBROSIO, L. The role of hydroxyapatite as solid signal on performance of PCL porous scaffolds for bone tissue regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research Part B**, v. 86, n. 2, p. 548–557, 2008.

GUNATILLAKE, P. A.; ADHIKARI, R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. **European cells & materials**, v. 5, p. 1–16, 2003.

GUO, H.; SU, J.; WEI, J.; KONG, H.; LIU, C. Biocompatibility and osteogenicity of degradable Ca-deficient hydroxyapatite scaffolds from calcium phosphate cement for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 1, p. 268–278, 2009.

HALES, T. C. A Proof of the Kepler conjecture. **Annals of Mathematics**, v. 162, n. 3, p. 1065–1185, 2005.

HAN, Y.; LI, S.; CAO, X.; YUAN, L.; WANG, Y.; YIN, Y.; QIU, T.; DAI, H.; WANG, X. Different inhibitory effect and mechanism of hydroxyapatite nanoparticles on normal cells and cancer cells in vitro and in vivo. **Scientific reports**, v. 4, p. 7134, 2014.

HENRY, N. D.; ABAZINGE, M. D. Poly epsilon-Caprolactone Microparticles Containing Biosurfactants: Optimization of Formulation Factors. **Bioremediation Journal**, v. 13, n. 2, p. 79–91, 2009.

HOLLAND, S. J.; TIGHE, B. J. Biodegradable polymers. In: GANDERTON, D.; JONES, T. (Eds.). **Advances in Pharmaceutical Science**. London: Academic Press, 1992. p. 101–164.

HOSSAIN, K. M. Z.; PATEL, U.; AHMED, I. Development of microspheres for biomedical applications: a review. **Progress in Biomaterials**, v. 4, n. 1, p. 1–19, 2015.

HU, Y.; YANG, Y.; NIMG, Y.; WANG, C.; TONG, Z. Facile preparation of artemisia argyi oil-loaded antibacterial microcapsules by hydroxyapatite-stabilized pickering emulsion templating. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 112, p. 96–102, 2013.

HUNG, Y. P. **Encapsulation of nanomagnetite within polycaprolactone microspheres for bone replacement**. 2011. 168f. Thesis (Doctorate in Chemical Engineering). Postgraduate in Chemical Engineering, College of Engineering & Physical Sciences, University of Birmingham, Birmingham.

HUTMACHER, D. W.; SCHANTZ, J.T.; LAM, C.X.F.; TAN, K.C.; LIM, T.C. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 1, p. 245–260, 2007.

HUTMACHER, D. W.; LAM, C. X. F. Scaffold and implant design: Considerations relating to characterization of biodegradability and bioresorbability. In: BUCHANAN, F. (Ed.). **Degradation Rate of Bioresorbable Materials**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2008. p. 319–356.

JACOBSON, A. **Sphere Packing Lattice Generation**. <Disponível em: <http://alecjacobson.com/programs/sphere-packing/alecjacobson-sphere-packing-lattice-generation.pdf>>.

JEONG, J.-C.; LEE, J.; CHO, K. Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly(epsilon-caprolactone) microspheres. **Journal of Controlled Release**, v. 92, n. 3, p. 249–58, 2003.

KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v. 26, n. 27, p. 5474–5491, 2005.

KARANDE, T.S.; AGRAWAL, C.M. Functions and Requirements of Synthetic Scaffolds in Tissue Engineering. In: NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. (Eds.). **Nanotechnology and Tissue Engineering: The Scaffold**. Boca Raton: CRC Press-Taylor & Francis Group, 2008. p. 53–86.

KEMALA, T.; BUDIANTO, E.; SOEGIYONO, B. Preparation and characterization of microspheres based on blend of poly(lactic acid) and poly(epsilon-caprolactone) with poly(vinyl alcohol) as emulsifier. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 103–108, 2012.

KHALID, M.; MUJAHID, M.; AMIN, S.; RAWAT, R.S.; NUSAIR, A.; DEEN, G.R. Effect of surfactant and heat treatment on morphology, surface area and crystallinity in hydroxyapatite nanocrystals. **Ceramics International**, v. 39, n. 1, p. 39–50, 2013.

KHAN, Y. M.; KATTI, D. S.; LAURENCIN, C. T. Novel polymer-synthesized ceramic composite-based system for bone repair: an in vitro evaluation. **Journal of biomedical materials research Part A**, v. 69, n. 4, p. 728–737, 2004.

KIM, M.-J.; KOH, Y.-H. Synthesis of aligned porous poly(ϵ -caprolactone) (PCL)/hydroxyapatite (HA) composite microspheres. **Materials science and engineering C: Materials for biological applications**, v. 33, n. 4, p. 2266–2272, 2013.

KNYCHALA, J.; BOUROPOULOS, N.; CATT, C.J.; KATSAMENIS, O.L.; PLEASE, C.P.; SENEGERS, B.G. Pore geometry regulates early stage human bone marrow cell tissue formation and organisation. **Annals of biomedical engineering**, v. 41, n. 5, p. 917–930, 2013.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, n. 15, p. 2907–2915, 2006.

KOLESKE, J. V. Blends containing poly(ϵ -caprolactone) and related polymers. In: PAUL, D. R.; NEWMAN, S. (Eds.). **Polymer Blends**. London: Academic Press, 1978. p. 369–389.

KOUPAEI, N.; KARKHANEH, A.; DALIRI JOUPARI, M. Preparation and characterization of (PCL-crosslinked-PEG)/hydroxyapatite as bone tissue engineering scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 103, n. 12, p. 3919–3926, 2015.

KUMAR, S.; KRUTH, J.-P. Composites by rapid prototyping technology. **Materials and Design**, v. 31, n. 2, p. 850–856, 2010.

KUNDU, P.; AGRAWAL, A.; MATEEN, H.; MISHRA, I.M. Stability of oil-in-water macro-emulsion with anionic surfactant: Effect of electrolytes and temperature. **Chemical Engineering Science**, v. 102, p. 176–185, 2013.

KUPPAN, P.; SETHURAMAN, S.; KRISHNAN, U. M. Interaction of human smooth muscle cells with nanofibrous scaffolds: Effect of fiber orientation on cell adhesion, proliferation, and functional gene expression. **Journal of biomedical materials research Part A**, v. 103, n. 7, p. 2236–2250, 2015.

LEE, S.-H. **Feasibility Study of Selective Laser Sintering of Biopolymer Scaffolds for Tissue Engineering**. 2006. 152f. Thesis. University of Hong Kong, Hong Kong.

LEE, W. L.; FOO, W.L.; WIDJAJA, E.; LOO, S.C.J. Manipulation of process parameters to achieve different ternary phase microparticle configurations. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 4, p. 1342–1352, 2010.

LEGEROS, R. Z. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. **Clinical Materials**, v. 14, n. 1, p. 65–88, 1993.

LEUNG, L. H.; NAGUIB, H. E. Viscoelastic properties of poly(ϵ -caprolactone)-hydroxyapatite micro- and nano-composites. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 24, n. 2, p. 144–150, 2013.

LI, Y.; WENG, W. Surface modification of hydroxyapatite by stearic acid: characterization and in vitro behaviors. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 1, p. 19–25, 2008.

LIMA, R.J.S. **Efeito de agentes quelantes no processo de crescimento de nanopartículas de alfa-Fe₂O₃**. 2013. 121f. Tese (Doutorado em Física). Núcleo de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju-Sergipe.

LIU, J. Y.; RENI, L.; WEI, Q.; WU, J.L.; LIU, S.; WANG, Y.J.; LI, G.Y. Fabrication and characterization of polycaprolactone/calcium sulfate whisker composites. **Express Polymer Letters**, v. 5, n. 8, p. 742–752, 2011.

LIUYUN, J.; CHENGDONG, X.; DONGLIANG, C.; LIXIN, J.; XIUBING, P. Effect of n-HA with different surface-modified on the properties of n-HA/PLGA composite. **Applied Surface Science**, v. 259, p. 72–78, 2012.

LOH, Q. L.; CHOONG, C. Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. **Tissue Engineering Part B**, v. 19, n. 6, p. 485–502, 2013.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670–673, 2004.

LU, H.H.; EL-AMIN, S.F.; SCOTT, K.D.; LAURENCIN, C.T. Three-dimensional, bioactive, biodegradable, polymer-bioactive glass composite scaffolds with improved mechanical properties support collagen synthesis and mineralization of human osteoblast-like cells in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 64, p. 465–474, 2003.

LUCIANI, A.; COCCOLI, V.; ORSI, S.; AMBROSIO, L.; NETTI, P.A. PCL microspheres based functional scaffolds by bottom-up approach with predefined microstructural properties and release profiles. **Biomaterials**, v. 29, n. 36, p. 4800–4807, 2008.

MANRICH, S. **Processamento de Termoplásticos - Rosca Única, Extrusão e Matrizes, Injeção e Moldes**. São Paulo: Artliber, 2005. ISBN 9788588098305.

MARRO, A.; BANDUKWALA, T.; MAK, W. Three-Dimensional Printing and Medical Imaging: A Review of the Methods and Applications. **Current problems in diagnostic radiology**, v. 45, n. 1, p. 2–9, 2016.

MARTINS, J. D. S. **Membranas Compósitas de Policaprolactona / Hidroxiapatite para Aplicação Estomatológica**. 2011. 73f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica). Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

MARTINS, K.F.; MESSIAS, A.D.; FÁBIO, L.L.; DUEK, E.A.R. Preparation and characterization of paclitaxel-loaded PLDLA microspheres. **Materials Research**, v. 17, n. 3, p. 650–656, 2014.

MATESANZ, M. C.; LINARES, J.; OÑADERRA, M.; FEITO, M.J.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, F.J.; SÁNCHEZ-SLACEDO, S.; ARCOS, D.; PORTOLÉS, M.T.; VALLERREGÍ, M. Response of osteoblasts and preosteoblasts to calcium deficient and Si substituted hydroxyapatites treated at different temperatures. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 133, p. 304–313, 2015.

MEHR, N. G.; LI, X.; CHEN, G.; FAVIS, B.; HOEMANN, C.D. Pore size and LbL chitosan coating influence mesenchymal stem cell in vitro fibrosis and biomineralization in 3D porous poly(epsilon-caprolactone) scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 103, n. 7, p. 2449–2459, 2015.

MISTRY, A. S. .; SHI, X.; MIKOS, A. G. Nanocomposite Scaffolds for Tissue Engineering. In: BRONZINO, J. D. (Ed.). **Tissue Engineering and Artificial Organs**. Boca Raton: CRC Press-Taylor & Francis Group, 2006. p. 40–51.

MKHABELA, V. J.; RAY, S. S. Poly(ε-caprolactone) Nanocomposite Scaffolds for Tissue Engineering: A Brief Overview. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, p. 1–11, 2014.

MOCHALES, C.; WILSON, R.M.; DOWKER, E.P.S.; GINEBRA, M.-P. Dry mechanosynthesis of nanocrystalline calcium deficient hydroxyapatite: Structural characterisation. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 509, p. 7389–7394, 2011.

MORENO, M.; AMARAL, M.H.; LOBO, J.M.S.; SILVA, A.C. Scaffolds for bone regeneration: state of the art. **Current pharmaceutical design**, v.22, n.46, p.1-11, 2016.

MOTSKIN, M.; WRIGHT, D.M.; MULLER, K.; KYLE, N.; GARD, T.G.; PORTER, A.E.; SKEPPER, J.N. Hydroxyapatite nano and microparticles: Correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability. **Biomaterials**, v. 30, n. 19, p. 3307–3317, 2009.

MOURA, K. O. **Efeito do dopante nas propriedades estruturais e magnéticas de nanopartículas de Ni_{1-x}AxO (A=Fe e Cr)**. 2012. 63f. Dissertação (Mestrado em Física). Núcleo de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju-Sergipe.

MURALITHRAN, G.; RAMESH, S. The effects of sintering temperature on the properties of hydroxyapatite. **Ceramics International**, v. 26, n. 2, p. 221–230, 2000.

NAGAVARMA, B.V.N.; HEMANT, K.S.Y.; AYAZ, A.; VASUDHA, L.S.; SHIVAKUMAR, H.G. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles- A review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, n.3, p. 16–23, 2012.

NITHYA, R.; MEENAKSHI SUNDARAM, N. Biodegradation and cytotoxicity of ciprofloxacin-loaded hydroxyapatite-polycaprolactone nanocomposite film for sustainable bone implants. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 119–127, 2015.

O'BRIEN, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Materials Today**, v. 14, n. 3, p. 88–95, 2011.

OKADA, M.; FURUZONO, T. Hydroxylapatite nanoparticles: fabrication methods and medical applications. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 13, n. 6, p. 1–15, 2012.

PAL, R. Rheology of simple and multiple emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, n. 1, p. 41–60, 2011.

PARK, S.A.; LEE, S.H.; KIM, W.D. Fabrication of porous polycaprolactone/hydroxyapatite (PCL/HA) blend scaffolds using a 3D plotting system for bone tissue engineering. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 4, p. 505–513, 2011.

PATTERSON, A. The Scherrer Formula for X-Ray Particle Size Determination. **Physical Review**, v. 56, n. 10, p. 978–982, 1939.

PAZ, A.; GUADARRAMA, D.; LÓPEZ, M.; GONZÁLEZ, J.E.; BRIZUELA, N.; ARAGÓN, J. A comparative study of hydroxyapatite nanoparticles synthesized by different routes. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1724–1727, 2012.

PEDROSA, A.S.M. **Influência da polarização eléctrica no crescimento de hidroxiapatite para implantes ósseos**. 2011. 74f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica). P's-Graduação em Engenharia Biomédica, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

PERSENAIRE, O.; ALEXANDRE, M.; DEGÉE, P.; DUBOIS, P. Mechanisms and Kinetics of Thermal Degradation of Poly(ϵ -caprolactone). **Biomacromolecules**, v. 2, n. 1, p. 288–294, 2001.

PETER, M.; GANESH, N.; SELVAMURUGAN, N.; NAIR, S.V.; FURIKE, T.; TAMURA, H.; JAYAKUMAR, R. Preparation and characterization of chitosan–gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 687–694, 2010.

PHILLIPSON, K.; HAY, J. N.; JENKINS, M. J. Thermal analysis FTIR spectroscopy of poly (ϵ -caprolactone). **Thermochimica Acta**, V.595, P.74-82, 2014.

PUPPI, D.; CHIELLINI, F.; PIRAS, A.M.; CHIELLINI, E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 4, p. 403–440, 2010.

QIU, X.; HAN, Y.; ZHUANG, X.; CHEN, X.; LI, Y.; JING, X. Preparation of nano-hydroxyapatite/poly(L-lactide) biocomposite microspheres. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 9, n. 5, p. 901–908, 2007.

QUE, W.; KHORB, K.A.; XUB, J.L.; YO, L.G. Hydroxyapatite/titania nanocomposites derived by combining high-energy ball milling with spark plasma sintering processes. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 28, n. 16, p. 3083–3090, 2008.

RAGHAVENDRA, G. M.; VARAPRASAD, K.; JAYARAMUDU, T. Biomaterials: Design, development and biomedical applications. In: THOMAS, S.; GROHENS, Y.; NINAN, N. (Eds.). **Nanotechnology applications for tissue engineering**. Elsevier Inc., 2015. p.21-44.

RAJKUMAR, M.; SUNDARAM, N. M.; RAJENDRAN, V. Preparation of size controlled, stoichiometric and bioresorbable hydroxyapatite nanorod by varying initial pH, Ca/P ratio and sintering temperature. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 6, n. 1, p. 169–179, 2011.

RAMIREZ, C. A. O. **Estudo por microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução de nanopartículas de hidroxiapatita e hidroxiapatita carbonatadas em diferentes estagios de cristalização**. 2010. 155 f. Tese (Doutorado em Física). Programa de Pós-Graduação em Física, Centro Brasileir de Pesquisas Físicas, Rio de Janeiro-Rio de Janeiro.

RANA, D.; ARULKUMAR, S.; VISHWAKARMA, A.; RAMALINGAM, M. Considerations on Designing Scaffold for Tissue Engineering. In: RAMALINGAM, A.V.S.S. (Ed.). **Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences**. Boston: Academic Press, 2015. p. 133–148.

REZAEI, A.; MOHAMMADI, M. R. Development of hydroxyapatite nanorods-polycaprolactone composites and scaffolds derived from a novel in-situ sol-gel process. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 9, n. 6, p. 295–303, 2012.

REZAEI, A.; MOHAMMADI, M. R. In vitro study of hydroxyapatite/polycaprolactone (HA/PCL) nanocomposite synthesized by an in situ sol-gel process. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 1, p. 390–396, 2013.

REZWAN, K.; CHEN, Q.Z.; BLAKER, J.J.; BOCCACCINI, A.R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 18, p. 3413–3431, 2006.

RIBOUD, P. V. Composition et stabilité des phase à structure d'apatite dans le système CaO-P2O5-oxyde de fer-H2O à haute température. **Annales de Chimie**, v. 8, n. 6, p. 381–390, 1973.

RIETVELD, H. M. A profile refinement method for nuclear and magnetic structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 2, n. 2, p. 65–71, 1969.

RÓDENAS-ROCHINA, J.; RIBELLES, J. L. G.; LEBOURG, M. Comparative study of PCL-HAp and PCL-bioglass composite scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, n. 5, p. 1293–1308, 2013.

RODRIGUES, A.M.C.M. **Análise e projecto de estruturas para substituição do disco intervertebral**. 2012. 181f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica). Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

ROOHANI-ESFAHANI, S.-I.; NOURI-KHORSANI, S.; LU, Z.; APPLEYARD, R.; ZREIQAT, H. The influence hydroxyapatite nanoparticle shape and size on the properties of biphasic calcium phosphate scaffolds coated with hydroxyapatite–PCL composites. **Biomaterials**, v. 31, n. 21, p. 5498–5509, 2010.

RUMPLER, M.; WOESZ, A.; DUNLOP, J.W.C; VON DONGEN, J.T.; FRATZL, P. The effect of geometry on three-dimensional tissue growth. **Journal of the Royal Society**, v. 5, n. 27, p. 1173–1180, 2008.

SADAT-SHOJAI, M. et al. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 8, p. 7591–7621, 2013.

SAHIL, K.; KHORASANI, M.-T.; DINPANA-KHOSHARGI, E.; JAMSHIDI, A. Microsphere: a Review. **International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry**, v. 1, n. 4, p. 1184–1198, 2011.

SANGWAN, Y.; JALWAL, P.; SAVITA. Microspheres: An overview. **Pharma Research**, v. 4, n. 2, p. 232–240, 2011.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. Editora Edgard Blücher, 2001. ISBN 8521202792.

SENEDESE, A.L.C. **Estruturação tridimensional de scaffolds de policaprolactona via manufatura aditiva**. 2011. 94f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-São Paulo.

SHI, D. **Introduction to Biomaterials**. Tsinghua University Press, 2006. ISBN 9812566279.

SHINTO, H.; HIRATA, T.; FUKASAWA, T.; FUJII, S.; MAEDA, H. OKADA, M.; NAKAMURA, Y.; FURUZONO, T. Effect of interfacial serum proteins on melanoma cell adhesion to biodegradable poly(l-lactic acid) microspheres coated with hydroxyapatite. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 108, p. 8–15, 2013.

SHOKROLLAHI, P.; MEHMANCHI, M.; ATAI, M.; OMIDIAM, H.; SHOKROLAHI, F. Effect of interface on mechanical properties and biodegradation of PCL HAp supramolecular nano-composites. **Journal of Materials Science: Materials in medicine**, v. 25, n. 1, p. 23–35, 2014.

SHOR, L.; GUCERI, S.; WEN, X.; GANDHI, M.; SUN, W. Fabrication of three-dimensional polycaprolactone/hydroxyapatite tissue scaffolds and osteoblast-scaffold interactions in vitro. **Biomaterials**, v. 28, n. 35, p. 5291–5297, 2007.

SINHA, V.R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, A. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 1, p. 1–23, 2004.

SMITH, A. L. **Theory and practice of emulsion technology**. Academic Press, 1974. ISBN 9780126512502.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 23317: Implants for surgery - in vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials**. Geneva, 13f., 2007.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**. Geneva, 3ed., 34f., 2009.

STEVENS, M. P. **Polymer Chemistry: An Introduction**. Oxford University Press, 1999. ISBN 0195124448.

STROBL, G. **The Physics of Polymers: concepts for understanding their structures and behaviour**. Springer Berlin Heidelberg, 2007. ISBN 9783540252788.

SUDARSANAN, K.; YOUNG, R. A. Significant precision in crystal structural details: Holly Springs hydroxyapatite. **Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry**, v. 25, n. 8, p. 1534–1543, 1969.

SUN, H.; MEI, L.; SONG, C.; CUI, X.; WANG, P. The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 1735–1740, 2006.

TAY, B.Y.; ZHANG, S.X.; MYINT, M.H.; NG, F.L.; CHANDRASEKARAN, M.; TAN, L.K.A. Processing of polycaprolactone porous structure for scaffold development. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 182, n. 1-3, p. 117–121, 2007.

TCHOLAKOVA, S.; IVANOV, I.B.; CAMPBELL, B. Coalescence stability of emulsions containing globular milk proteins. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 123-126, p. 259–293, 2006.

TULI, R.A.; GEORGE, G.A.; DARGAVILLE, D.R.; ISLAM, N. Studies on the Effect of the Size of Polycaprolactone Microspheres for the Dispersion of Salbutamol Sulfate from Dry Powder Inhaler Formulations. **Pharmaceutical Research**, v.29, n.9, p.2445–2455, 2012.

VALLET-REGÍ, M. Evolution of bioceramics within the field of biomaterials. **Comptes Rendus Chimie**, v. 13, n. 1-2, p. 174–185, 2010.

VALLET-REGÍ, M.; GONZÁLEZ-CALBET, J. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. **Progress in Solid State Chemistry**, v.32, p.1-31, 2004.

VAN BAEL, S.; DESMET, T.; CHAI, Y.C.; PYKA, G.; DUBRUEL, P.; KRUTH, J.-P.; SCHROOTEN, J. In vitro cell-biological performance and structural characterization of selective laser sintered and plasma surface functionalized polycaprolactone scaffolds for bone regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 6, p. 3404–3412, 2013.

VAN DER SCHUEREN, L.; DE SCHOENMAKER, B.; KALAOGLU, Ö.I.; DE CLERCK, K. An alternative solvent system for the steady state electrospinning of polycaprolactone. **European Polymer Journal**, v. 47, n. 6, p. 1256–1263, 2011.

VAN TOMME, S. R.; VAN NONSTRUM, C.F.; DIJKSTRA, M.; DE SMEDT, S.C.; HENNINK, W.E. Effect of particle size and charge on the network properties of microsphere-based hydrogels. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 70, n. 2, p. 522–530, 2008.

VASIR, J. K.; TAMBWEKAR, K.; GARG, S. Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 255, p. 13–32, 2003.

VEISEH, M.; TURLEY, E. A.; BISSELL, M. J. Top–Down Analysis of a Dynamic Environment: Extracellular Matrix Structure and Function. In: LAURENCIN, C.T.; NAIR, L. S. (Eds.). **Nanotechnology and Tissue Engineering: The Scaffold**. CRC Press-Taylor & Francis Group, 2008. p. 6387–6392.

WANG, G.; LIU, X.; ZREIQAT, H.; DING, C. Enhanced effects of nano-scale topography on the bioactivity and osteoblast behaviors of micron rough ZrO₂ coatings. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, n. 2, p. 267–274, 2011.

WANG, J.; WU, D.; ZHANG, Z.; LI, J.; SHEN, Y.; WANG, Z.; LI, Y.; ZHANG, Z.; SUN, J. Biomimetically Ornamented Rapid Prototyping Fabrication of an Apatite-Collagen-Polycaprolactone Composite Construct with Nano-Micro-Macro Hierarchical Structure for Large Bone Defect Treatment. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 7, n. 47, p. 26244–26256, 2015.

WANG, M.; MA, L.; LI, D.; JIANG, P.; GAO, C. Preparation of polycaprolactone microspheres-aggregated scaffold with ultra big pores and fuzzy sphere surface by a one-step phase separation method. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v.101, n.11, p. 3219–3227, 2013.

WANG, P.; LI, C.; GONG, H.; JIANG, X.; WANG, H.; LI, K. Effects of synthesis conditions on the morphology of hydroxyapatite nanoparticles produced by wet chemical process. **Powder Technology**, v. 203, n. 2, p. 315–321, 2010.

WANG, S.; GUO, S. Disodium norcantharidate-loaded poly(caprolactone) microspheres. II. Modification of morphology and release behavior. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 353, p. 15–20, 2008.

WANG, Y.; LIU, L.; GUO, S. Characterization of biodegradable and cytocompatible nano-hydroxyapatite/polycaprolactone porous scaffolds in degradation in vitro. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 2, p. 207–213, 2010.

WEBSTER, T.J.; ERGUN, C.; DOREMUS, R.H.; SIEGEL, R.W.; BIZIOS, R. Enhanced osteoclast-like cell functions on nanophase ceramics. **Biomaterials**, v. 22, n. 11, p. 1327–1333, 2001.

WEINER, S.; WAGNER, H.D. The material bone: structure-mechanical function relations. **Annual Review of Materials Science**, v. 28, n. 1, p. 271–298, 1998.

WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, n. 20, p. 2941–2953, 2008.

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

WIRIA, F.E.; LEONG, K.F.; CHUA, C.K.; LIU, Y. Poly- ϵ -caprolactone/hydroxyapatite for tissue engineering scaffold fabrication via selective laser sintering. **Acta Biomaterialia**, v. 3, n. 1, p. 1–12, 2007.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer- Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 10, p. 1217–1256, 2010.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. Design, Fabrication, and Characterization of Scaffolds via Solid Free-Form Fabrication Techniques. In: LIU, X.; CHU, P. K. (Eds.). **Biomaterials Fabrication and Processing Handbook**. Boca Raton: CRC Press-Taylor & Francis Group, 2008. p. 45–67.

WOODWARD, S.C.; BREWER, P.S.; MOATAMED, F.; SCHINDLER, A.; PITT, C.G. The intracellular degradation of poly(epsilon-caprolactone). **Journal of biomedical Materials Research**, v. 19, n. 4, p. 437–444, 1985.

WU, S.; LIU, X.; YEUNG, K.W.K.; LIU, C.; YANG, X. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering R: Reports**, v. 80, p. 1–36, 2014.

XIA, Y.; ZHOU, P.; CHENG, X.; XIE, Y.; LIANG, C.; LI, C.; XU, S. Selective laser sintering fabrication of nano-hydroxyapatite/poly- ϵ -caprolactone scaffolds for bone tissue engineering applications. **International journal of nanomedicine**, v. 8, p. 4197–4213, 2013.

XIN, R.; LENG, Y.; WANG, N. In situ TEM examinations of octacalcium phosphate to hydroxyapatite transformation. **Journal of Crystal Growth**, v. 289, p. 339–344, 2006.

XU, N.; YE, X.; WEI, D.; ZHONG, J.; CHEN, Y.; XU, G.; HE, D. 3D artificial bones for bone repair prepared by computed tomography-guided fused deposition modeling for bone repair. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 6, n. 17, p. 14952–14963, 2014.

YAMAMOTO, M.; RAFII, S.; RABBANY, S. Y. Scaffold biomaterials for nanopathophysiology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 74C, p. 104–114, 2014.

YANG, F.; NEELEY, W.L.; MOORE, M.J.; KARP, J.M.; SHUKLA, A.; LANGER, R. Tissue Engineering: the therapeutic strategy of the twenty-first century. In: LAURENCIN, C.T.; NAIR, L.S. (Eds.). **Nanotechnology and Regenerative Engineering**. Boca Raton: CRC Press, 2014. p. 3–38.

YANG, Y.; CUNHA-REIS, C.; BAGNANINCHI, P.O.; AYDIN, H.M. Control and Monitoring of Scaffold Architecture for Tissue Engineering. In: CHU, P.K.; LIU, X. (Eds.). **Biomaterials Fabrication and Processing Handbook**. Boca Raton: CRC Press-Taylor & Francis Group, 2008. p. 69–94.

YAO, Q.; WEI, B.; LIU, N.; LI, C.; GUO, Y.; SHAMIE, A.N.; CHEN, J.; TANG, C.; JIN, C.; XU, Y.; BIAN, X.; ZHANG, X.; WANG, L. Chondrogenic regeneration using bone marrow clots and a porous polycaprolactone-hydroxyapatite scaffold by three-dimensional printing. **Tissue Engineering: Part A**, v. 21, n. 7-8, p. 1388–1397, 2015.

YOON, D. M.; FISHER, J. P. Chondrocyte Signaling and Artificial Matrices for Articular Cartilage Engineering. In: FISHER, J.P. (Ed.). **Tissue Engineering: Advances in Experimental Medicine and Biology**. Boston: Springer, 2007. p. 67–86.

YOU, Y.; BYUNG-MOO, M.; SEUNG, J.L.; TAEK, S.L.; WON, H.P. In vitro degradation behavior of electrospun polyglycolide, polylactide, and poly(lactide-co-glycolide). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 95, n. 2, p. 193–200, 2005.

ZADPOOR, A.A. Bone tissue regeneration: the role of scaffold geometry. **Biomaterials Science**, v. 3, n. 2, p. 231–245, 2015.

ZHANG, H.; ZHANG, M. Characterization and thermal behavior of calcium deficient hydroxyapatite whiskers with various Ca/P ratios. **Materials Chemistry and Physics**, v. 126, n. 3, p. 642–648, 2011.

ZHANG, Q.; YIE, G.; LI, Y.; YANG, Q.; NAGAI, T. Studies on the cyclosporin A loaded stearic acid nanoparticles. **International journal of pharmaceuticals**, v. 200, n. 2, p. 153–9, 2000.

ZHANG, X.; LI, Q.; LI, L.; ZHANG, P.; WANG, Z.; CHEN, F. Fabrication of hydroxyapatite/stearic acid composite coating and corrosion behavior of coated magnesium alloy. **Materials Letters**, v. 88, p. 76–78, 2012.

ZHANG, X.; CHANG, W.; LEE, P.; WANG, Y.; YANG, M.; LI, J.; KUMBAR, S.G.; YOU, X. Polymer-ceramic spiral structured scaffolds for bone tissue engineering: Effect of hydroxyapatite composition on human fetal osteoblasts. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. 2–11, 2014.

ZHANG, Y.; HE, P.; XU, X.; LI, J. Use of atomic force microscopy for imaging the initial stage of the nucleation of calcium phosphate in Langmuir–blodgett films of stearic acid. **Thin Solid Films**, v. 468, n. 1-2, p. 273–279, 2004.

ZHOU, H.; LEE, J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 7, p. 2769–2781, 2011.

ZHOU, W.Y.; WANG, M. Selective Laser Sintering of Poly (L-Lactide)/Carbonated Hydroxyapatite Nanocomposite Porous Scaffolds for Bone Tissue Engineering. In: EBERLI, D. (Ed.). **Tissue Engineering**. Viena: In Tech, 2010. p. 179–204.

ZHOU, W. Y.; WANG, M.; CHEUNG, W. L. Selective Laser Sintered Poly(L-Lactide)/Carbonated Hydroxyapatite Nanocomposite Scaffolds: A Bottom-up Approach. In: REDDY, B. (Ed.). **Advances in Diverse Industrial Applications of Nanocomposites**. Viena: InTech, 2011. p. 203–230.

ZHU, K.J.; LI, Y.; JIANG, H.L.; YASUDA, H.; ICHIMARU, A.; YAMAMOTO, K.; LECOMTE, P.; JEROME, R. Preparation, characterization and in vitro release properties of ibuprofen-loaded microspheres based on polylactide, poly(epsilon-caprolactone) and their copolymers. **Journal of microencapsulation**, v. 22, n. 1, p. 25–36, 2005.