

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

Michele Dayane Rodrigues Leite

**ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS POROSAS DE POLICAPROLACTONA/MEL
PRODUZIDAS A PARTIR DO SISTEMA BIOEXTRUDER**

Campina Grande – PB

2016

Michele Dayane Rodrigues Leite

**ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS POROSAS DE POLICAPROLACTONA/MEL
PRODUZIDAS A PARTIR DO SISTEMA BIOEXTRUDER**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

Agência Financiadora: CNPq

Campina Grande – PB

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

L533e Leite, Michele Dayane Rodrigues.
Estruturas tridimensionais porosas de policaprolactona/mel produzidas a partir do sistema BioExtruder / Michele Dayane Rodrigues Leite. – Campina Grande, 2016.

66 f. : il.

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

"Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook".

Referências.

1. Polímero Sintético – Engenharia de Materiais. 2. Estruturas Tridimensionais – Engenharia de Tecidos. 3. Sistema BioExtruder. 4. Policaprolactona. 5. Mel – Matriz Polimérica. I. Fook, Marcus Vinicius Lia. II. Título.

CDU 620.1:678.7(043)

VITAE DO CANDIDATO

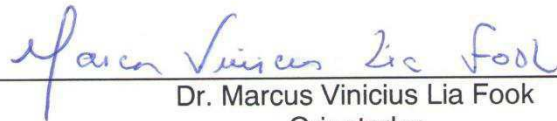
- Engenharia de Materiais pela UFCG (2014).

MICHELE DAYANE RODRIGUES LEITE


ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS POROSAS DE POLICAPROLACTONA/MEL
PRODUZIDAS A PARTIR DO SISTEMA BIOEXTRUDER

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

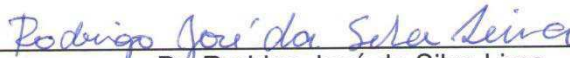
Aprovado em: 08/03/2016



Dr. Marcus Vinicius Lia Fook
Orientador,
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG



Dr. Rossemberg Cardoso Barbosa
Examinador Externo
UAEMa/UFCG



Dr. Rodrigo José da Silva Lima
Examinador Externo
UFCG

*“Espere em Javé, seja firme!
Fortaleça seu coração, e confie em Javé!”
(Salmos 27:14)*

AGRADECIMENTOS

Ao término de mais uma etapa da vida acadêmica, agradecer aos que contribuíram e me ajudaram durante a caminhada faz-se necessário, afinal “*nunca se vence uma guerra lutando sozinho*”.

Agradeço primeiramente a DEUS, por tão grande amor, por me capacitar, me dar forças e me acolher em seus braços quando, em silêncio, rogo por sua infinita misericórdia em minha vida. A Ti, Senhor, toda honra e glória, além de minha eterna gratidão.

Aos meus pais, Ricardo e Luciene, por todo apoio, incentivo, dedicação, esforço e doação, e por serem presença em todos os momentos da minha vida. Saibam que cada vitória alcançada por mim jamais teria acontecido sem vocês, que são meu alicerce e fonte de motivação. Muito obrigada, amo vocês!

À minha irmã, Danielle, que me acompanha desde que nasci e atura meus melhores e piores momentos durante todos esses anos, me ajudando da forma que lhe cabe e sendo um suporte para mim, mesmo que por muitas vezes em silêncio.

Ao professor e orientador Dr. Marcus Vinícius Lia Fook, a quem sou imensamente grata pela orientação e oportunidades que me foram oferecidas e confiadas. Agradeço por todo carinho, apoio e compreensão a mim prestados. O tempo de convívio e contato me fez vê-lo como um pai, sempre disposto a ajudar. Muito obrigada!

A Thiago Fideles, minha sincera gratidão, por toda ajuda, disponibilidade e contribuição ao longo do desenvolvimento deste trabalho, pois nunca hesitou em prestar seu apoio e atenção quando solicitado, mesmo em meio aos seus afazeres próprios.

Às minhas amigas Milena, Suelem, Mayelli e Jucélia que me acompanham desde a graduação e que tive o prazer de conviver mais intensamente durante os últimos dois anos. Agradeço a vocês pela amizade, ajuda, incentivo, suporte, inúmeras risadas e pela presença, até na ausência, de cada uma. Por estes e outros tantos motivos vocês têm um lugarzinho eternamente reservado em meu coração.

À Thaís, em especial, por toda cumplicidade e tão sincera amizade desde o início da graduação, pelo companheirismo e carinho que sempre teve por mim, tornando-se mais que uma amiga, mas sim uma mãe que cuida e se preocupa e que me faltam palavras para agradecer tamanho afeto. “Mirmã”, saiba que independente

dos caminhos que venhamos a percorrer daqui pra frente, sempre irei torcer por seu sucesso e felicidade. Agradeço também a Samilla, que mesmo distante fisicamente, se faz presente em meio à correria diária, sempre reforçando os laços fraternos que criamos.

A todos os alunos, professores, técnicos e funcionários que fazem parte do Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO, sem exceções, pelo bom relacionamento que pude manter com a grande maioria, e por terem contribuído direta ou indiretamente para a realização do meu trabalho.

A todos os pesquisadores do Centro para o Desenvolvimento Rápido e Sustentado do Produto – CDRsp, do Instituto Politécnico de Leiria – IPL, pela acolhida e contribuição para poder realizar a primeira parte de minha pesquisa.

Aos docentes do Departamento de Engenharia de Materiais e ao programa e funcionários do Programa de Pós graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, em especial a André e Márcia, por nunca negarem esforços para me ajudar em qualquer situação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo suporte financeiro.

RESUMO

O campo da engenharia de tecidos envolve a utilização de estruturas tridimensionais capazes de simular o ambiente ideal para a acomodação, fixação, proliferação, diferenciação e orientação das células, a fim de permitir o crescimento e a regeneração, de forma organizada, do novo tecido. O sistema BioExtruder, que relaciona baixo custo e alta reprodutibilidade e é capaz de controlar a porosidade das estruturas, tem sido uma das técnicas de manufatura aditiva mais utilizadas para produzir tais estruturas tridimensionais. Assim, biomateriais biodegradáveis são as alternativas mais eficazes para o desenvolvimento desses materiais, como a Policaprolactona, um polímero sintético que vem sendo bastante utilizado na engenharia de tecidos. O mel apresenta propriedades físico-químicas que contribuem diretamente em sua atividade antibacteriana, antibiótica, anti-inflamatória e cicatrizante. Portanto, este trabalho teve como objetivo produzir estruturas tridimensionais de Policaprolactona e Policaprolactona/Mel a partir do sistema Bioextruder, avaliando a influência do mel na matriz polimérica. As estruturas obtidas foram caracterizadas pelas técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Termogravimetria (TG), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Ensaio de Porosidade, Ensaio Mecânico de Compressão, Citotoxicidade e Adesão Celular. As análises morfológicas por MEV mostraram estruturas com tamanhos de poros definidos, interconectados e uma geometria interna regular, com porosidade em torno de 54%. Através dos resultados por FTIR foi possível identificar as bandas de absorção características de cada material, indicando que a técnica utilizada para a obtenção das estruturas tridimensionais não provocou alterações químicas nos materiais após o seu processamento. Pelas técnicas de TG e DSC observou-se que as estruturas apresentaram comportamento térmico estável e, pela análise da curva tensão-deformação obtida no ensaio mecânico de compressão, apresentaram comportamento característico de materiais porosos. Os testes de Citotoxicidade para as estruturas de PCL puro e PCL/Mel 5% apresentaram viabilidade celular em torno de 90%, caracterizando-as como não tóxicas quando em contato com as células, viabilizando sua utilização como biomaterial.

Palavras-chave: Estruturas tridimensionais. BioExtruder. Policaprolactona. Mel.

ABSTRACT

The field of tissue engineering encompasses the use of three-dimensional structures able to simulate the ideal environment for accommodating, fixing, proliferation, differentiation and cell orientation, to enable the growth and regeneration, in an organized manner, of the new tissue. The Bioextruder system, relates low cost and high reproducibility, and is capable of controlling the porosity of the structures, this additive manufacturing technique has been commonly used to produce such three dimensional structures. Thus, biodegradable biomaterials are the most efficient alternatives for the development of these materials, such as polycaprolactone, a synthetic polymer which has been widely used in tissue engineering. Honey has physicochemical properties that directly contribute to its antibacterial, antibiotic, anti-inflammatory and healing activities. Therefore, this study aimed to produce three-dimensional structures of Polycaprolactone and Polycaprolactone/Honey by means of the Bioextruder system, assessing the influence of honey in the polymer matrix. The obtained structures were characterized by the following techniques: Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Thermogravimetry (TG), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Porosity, Compression Strength, Cytotoxicity and Cell Adhesion. Morphological analysis by SEM showed structures with defined and interconnected pore sizes, and a regular internal geometry, with porosity around 54%. By the FTIR results it was possible to identify the characteristic absorption bands of each material, indicating that the technique used for obtaining the three-dimensional structures did not cause chemical changes in the material after processing. TG and DSC techniques showed that the structures presented a stable thermal behavior, and analyzing the stress-strain curve by the mechanical compression test, the characteristic behavior of porous materials was observed. Cytotoxicity test for pure PCL structures and PCL / Honey 5% showed cell viability around 90%, characterizing them as non-toxic when in contact with the cells, enabling its use as a biomaterial.

Keywords: Three-dimensional Structures. BioExtruder. Polycaprolactone. Honey.

PUBLICAÇÕES

Periódicos

LEITE, M. D. R.; MARINHO, T. M. A., FOOK, M. V. L. Obtenção e caracterização de Scaffolds de Policaprolactona produzidos a partir do sistema BioExtruder. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**. *Artigo aceito para publicação*.

MARINHO, T. M. A.; CARDOSO, M. J. B.; EULALIO, H. Y. C.; **LEITE, M. D. R.**; LIMA, R. J. S.; SWARNAKAR; R.; FOOK, M. V. L. Imobilização de urease com a quitosana pelo método de gotejamento sobre um eletrodo transdutor amperométrico. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**. *Artigo aceito para publicação*.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

SILVA, M. C.; OLIVEIRA, S. S. L.; **LEITE, M. D. R.**; FIDELES, T. B.; FOOK, M. V. L. **Análise das propriedades térmicas e mecânica de estruturas tridimensionais de quitosana com a inclusão do fármaco Curcumina**. In: 21 Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2014, Cuiabá.

SILVA, M. C.; OLIVEIRA, S. L.; **LEITE, M. D. R.**; FIDELES, T. B.; FOOK, M. V. L.; **Avaliação da adsorção do fármaco curcumina em esferas de quitosana**. 4ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais, 2015, Paraíba.

Resumos publicados em anais de congressos

LEITE, M. D. R.; SILVA, M. C.; MARINHO, T. M. A.; FIDELES, T. B.; FREITAS, D. M. F.; BÁRTOLO, P. J.; ALMEIDA, H. A.; FOOK, M. V. L. **Obtenção e Caracterização de Scaffolds de PCL e PCL/Mel a partir do Sistema De Bioextrusão**. In: 21 Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2014, Cuiabá.

LEITE, M. D. R.; SILVA, M. C.; FIDELES, T. B.; FREITAS, D. M. F.; BÁRTOLO, P. J.; ALMEIDA, H. A.; FOOK, M. V. L. **Avaliação da Influência do Mel nas propriedades**

Térmicas E Químicas Do PCL. In: 4ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais, 2015, Paraíba.

LEITE, M. D. R.; MARINHO, T. M. A.; FIDELES, T. B; FREITAS, D. M. F.; BÁRTOLO, P. J.; ALMEIDA, H. A.; FOOK, M. V. L. **Avaliação da Citotoxicidade de scaffolds PCL/Mel.** In: 4ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais, 2015, Paraíba.

MARINHO, T. M. A.; **LEITE, M. D. R.;** FOOK, M. V. L. **Avaliação da atividade da enzima urease extraída do jack bean comercial e Imobilizada em Acetato de Celulose para desenvolvimento de Um biossensor de uréia.** In: 4ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais, 2015, Paraíba.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Prótese de madeira para reabilitar indivíduo que teve o dedo amputado, há cerca de 3.000 anos.....	21
Figura 2 – Utilização de estruturas tridimensionais como alternativa para promover o reparo e a regeneração de novos tecidos.	23
Figura 3 – Estruturas tridimensionais com diferentes arquiteturas e aplicabilidade na Engenharia de Tecidos.....	24
Figura 4 - Sistema de extrusão para vários materiais (a) ou apenas um (b).	27
Figura 5 – Sistema BioExtruder.....	28
Figura 6 - Estratégias de deposição do material no sistema BioExtruder.	28
Figura 7 - (a) Estrutura cíclica da ϵ -caprolactona; (b) Poli(ϵ -caprolactona).	32
Figura 8 – Mel.	34
Figura 9 - (a) Adição do mel ao polímero; (b) Mistura homogênea PCL/mel.....	37
Figura 10 - (a) Deposição do material, camada a camada e (b) estrutura tridimensional obtida.....	38
Figura 11 - Fluxograma das etapas do trabalho.	38
Figura 12 – Micrografias das estruturas de PCL/Mel com 5% (a), 10% (b), 20% (c) e 30% (d) de mel em sua composição.	43
Figura 13 - Micrografias das estruturas de PCL puro: (a) última camada de deposição dos filamentos, aumento de 165x; (b) primeira camada de deposição, que entra em contato com a superfície da placa em que é depositado, aumento de 160x.	44
Figura 14 – Micrografias da superfície das estruturas PCL/Mel 5%: (a) última camada de deposição com aumento de 160x; (b) primeira camada de deposição indicando o tamanho dos poros e aumento de 160x; (c) presença de pequenos poros superficiais e aumento de 550x.....	45
Figura 15 - Espectro de FTIR do PCL com suas bandas de absorção características.	46
Figura 16 - Espectro de FTIR do Mel com suas bandas de absorção características.	48
Figura 17 - Espectro de FTIR para a amostra de PCL/Mel 5%.	49
Figura 18 - Curvas TG para as amostras de PCL (a) e Mel (b).....	50
Figura 19 - Curva TG para as estruturas de PCL/Mel 5%.	51
Figura 20 - Curvas DSC para o PCL (a) e para o mel (b).....	52

Figura 21 - Curvas DSC para o PCL, Mel e PCL/Mel 5%.....	53
Figura 22: Histograma de distribuição de poros em função da distribuição de tamanhos de poros obtidos por MEV para as estruturas de PCL puro e PCL/Mel 5%.	54
Figura 23: Curva tensão-deformação para as amostras de PCL Puro.	56
Figura 24: Curva tensão-deformação para as amostras de PCL/Mel 5%.....	57
Figura 25 - Viabilidade celular dos scaffolds de PCL puro e PCL/Mel 5%	58
Figura 26: Micrografias por MEV das estruturas de PCL puro (a) e PCL/Mel 5% (b) com aumento de 2000x.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Vibrações relacionadas aos principais grupos químicos do espectro do PCL.	47
Tabela 2 - Vibrações relacionadas aos principais grupos químicos do espectro do Mel.	48
Tabela 3: Porosidade das estruturas de PCL Puro.	53
Tabela 4: Porosidade das estruturas de PCL/Mel 5%.	54
Tabela 5: Módulo de Young (E) para as amostras de PCL puro.	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Número de transplantes de órgãos sólidos, tecidos e células durante o período de janeiro a setembro de 2015.....	22
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	Engenharia de Tecidos	21
2.2	Estruturas Tridimensionais Porosas	23
2.3	Técnicas de Fabricação de Estruturas	26
2.4	Biomateriais	28
2.5	Polímeros Biodegradáveis	30
2.5.1	<i>Policaprolactona</i>	31
2.6	Mel	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1	Local da pesquisa	36
3.2	Materiais	36
3.3	Procedimento experimental	36
3.3.1	<i>Preparação e obtenção das composições</i>	37
3.3.2	<i>Obtenção das estruturas tridimensionais</i>	37
3.4	Caracterização das estruturas tridimensionais	38
3.4.1	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	39
3.4.2	<i>Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	39
3.4.3	<i>Termogravimetria (TG)</i>	40
3.4.4	<i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i>	40
3.4.5	<i>Porosidade</i>	40
3.4.6	<i>Ensaio Mecânico de Compressão</i>	41
3.4.7	<i>Ensaio de Citotoxicidade</i>	41
3.4.8	<i>Adesão Celular</i>	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	43
4.2	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	45

4.3	Termogravimetria (TG).....	49
4.4	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	52
4.5	Porosidade	53
4.6	Ensaio Mecânico de Compressão.....	55
4.7	Ensaio de Citotoxicidade.....	58
4.8	Adesão Celular.....	59
5	CONCLUSÃO	60
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	61
	REFERÊNCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

Diariamente inúmeras intervenções cirúrgicas são realizadas com a finalidade de substituir ou reparar tecidos e/ou órgãos danificados por doença ou trauma. A grande demanda por transplantes de órgãos e tecidos tem motivado inúmeras pesquisas acerca de novas técnicas para a solução destes problemas. A engenharia de tecidos compreende um novo campo da ciência biomédica que pretende regenerar tecidos danificados por meio da combinação de células do corpo associadas a estruturas porosas produzidas a partir biomateriais, que atuarão como suporte para a regeneração tecidual, guiando assim o novo tecido em desenvolvimento (O'Brien, 2011).

Em outras palavras, a engenharia de tecidos consiste, preferencialmente, no desenvolvimento de uma estrutura tridimensional, com poros em variadas direções, a partir de um biomaterial associado a células, para propiciar o processo de regeneração, guiando o novo tecido de forma organizada (Williams, 2004).

A estrutura tridimensional que guia o tecido fornece o suporte inicial para que as células adiram, proliferem e diferenciem-se, formando assim uma matriz extracelular, que mantém a integridade estrutural do tecido. Os biomateriais utilizados no desenvolvimento de tais estruturas geralmente são biodegradáveis, naturais ou sintéticos (Liu *et al.*, 2007).

Para os implantes de longa duração, com taxa de biodegradação superior a um ano, a policaprolactona (PCL) é um dos polímeros sintéticos mais utilizados. É um polímero processável, apresenta estabilidade térmica e química adequadas ao sistema biológico, biocompatibilidade, baixa toxicidade, imunogenicidade e riscos de infecções (Domingos, 2012).

A associação de polímeros com outros materiais tem despertado o interesse de pesquisadores pela possibilidade de, conjugando propriedades, mimetizar órgãos e tecidos. Há muito tempo o mel tem sido usado por diferentes culturas, e vem ganhando reconhecimento como uma opção terapêutica no tratamento de feridas agudas e crônicas, tanto pela variedade de estudos *in vitro* e *in vivo* quanto em estudos de investigação que estão sendo desenvolvidos. As propriedades terapêuticas do mel estão relacionadas à sua atividade antimicrobiana, anti-

inflamatória, antioxidante, ação desodorizante e elevada taxa de cicatrização (Gethin *et al.*, 2008).

Entre os métodos de fabricação de estruturas tridimensionais, duas tecnologias podem ser empregadas: as convencionais e as não-convencionais. A prototipagem rápida está inserida nas técnicas não-convencionais de obtenção de estruturas tridimensionais porosas, e baseia-se na construção camada a camada de objetos tridimensionais (3D) que, entre outros processos, pode ser feito por meio da extrusão do material. Essa técnica apresenta maior precisão no controle da dimensão, geometria e arquitetura dos poros (Liu *et al.*, 2007; Domingos, 2012).

Inúmeras técnicas de processamento vêm sendo desenvolvidas e estudadas a fim de se obter estruturas tridimensionais para implantes na engenharia de tecidos (Corden *et al.*, 2000; Hou *et al.*, 2003; Yoshimoto *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2007; Malheiro *et al.*, 2010; Elomaa *et al.*, 2011), porém, apesar das técnicas convencionais apresentarem algumas vantagens quando comparadas às não-convencionais, não permitem um maior controle na fabricação das estruturas tridimensionais, como por exemplo, uma rede de poros totalmente interconectada e sua elevada reprodutibilidade (Hutmacher *et al.*, 2001).

Associar a conjugação de diferentes materiais, como a policaprolactona e o mel, com uma técnica não-convencional, constitui-se na motivação deste trabalho, onde pretende-se obter estruturas tridimensionais para aplicação na engenharia de tecidos, avaliando a interação entre os materiais utilizados para a sua fabricação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Engenharia de Tecidos

Desde os tempos mais primórdios a humanidade busca uma melhor qualidade de vida para sua existência, sempre em busca de alternativas que aperfeiçoem as condições humanas (Figura 1). Na ânsia de melhorias, o avanço da ciência possibilitou o entendimento do meio biológico, que foi vinculado à compreensão científica da doença e do trauma. Assim, materiais artificiais ou próteses para substituição de membros, órgãos ou outros tecidos danificados foram desenvolvidos, resultando na restauração parcial da função previamente perdida, bem como a utilização de um tecido como substituto para outro através de um transplante (Lanza *et al.*, 2011).



Figura 1 – Prótese de madeira para reabilitar indivíduo que teve o dedo amputado, há cerca de 3.000 anos (Jacoby, 2001).

Porém, de acordo com a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO), a doação e alocação de órgãos, tecidos e células trata-se de um processo que envolve inúmeros fatores, desde a não autorização familiar até dificuldades na manutenção e/ou demora na notificação ou diagnóstico da morte encefálica por parte dos profissionais de saúde, impossibilitando assim um aumento na taxa de

transplantes no Brasil, que de janeiro a setembro de 2015 chegou a 33.139, como mostra o Quadro 1.

Quadro 1: Número de transplantes de órgãos sólidos, tecidos e células durante o período de janeiro a setembro de 2015 (ABTO, 2016).

ÓRGÃOS					
Órgãos	Total	Vivo	Falecido	PMP	Nº Equipes
Coração	264		264	1,7	30
Fígado	1326	107	1219	8,7	56
Pâncreas	18		18	0,1	
Pâncreas/Rim	72		72	0,5	12
Pulmão	53	3	50	0,3	5
Rim	4158	911	3247	27,3	125
Total	5.891	1.021	4.870		

TECIDOS		
Tecidos	Total	PMP
Córnea	10.494	69,0
Ossos	15.227	100,1
Valva	117	0,8
Pele	22	0,1
Total	25.860	

MEDULA ÓSSEA					
Células	Total	Autólogo	Alogênico	PMP	Nº Equipes
Medula Óssea	1.388	890	498	9,1	48

Nesse cenário, e diante da problemática envolvida nos transplantes, emerge a engenharia de tecidos, uma área multidisciplinar que envolve a utilização e a combinação do conhecimento e da tecnologia das células, da engenharia de materiais e de fatores bioquímicos, para a criação de órgãos e tecidos artificiais, ou para regenerar tecidos danificados em situações onde acredita-se que humanos adultos já não têm esta capacidade (Williams, 2004; Liu *et al*, 2007).

A engenharia de tecidos combina estratégias que melhor aplicam os seus princípios, como por exemplo: o uso de células isoladas e previamente manipuladas para substituir aquelas que eventualmente venham a perder a sua função; a liberação de substâncias estimuladoras, como fatores de crescimento e diferenciação; e o desenvolvimento de estruturas tridimensionais (3D) para o cultivo, proliferação e

adesão celular *in vitro*, com a conseqüente vascularização e amadurecimento do tecido (Ma, 2004; Cheung *et al*, 2007; Senedese, 2011).

Deste modo, a engenharia de tecidos combina uma estrutura preferencialmente tridimensional ou uma matriz, biocompatível e biodegradável, com células vivas e/ou moléculas biologicamente ativas (Figura 2), para dar forma a um tecido de engenharia, que promova a reparação e/ou regeneração de outros tecidos (Melchels *et al*, 2012; Domingos, 2012).

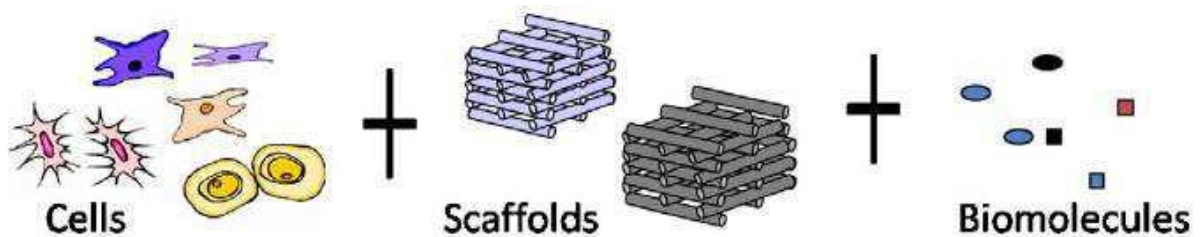


Figura 2 – Utilização de estruturas tridimensionais como alternativa para promover o reparo e a regeneração de novos tecidos (Woodruff e Hutmacher, 2010).

Os tecidos do corpo humano são compostos fundamentalmente pelas células, pelas matrizes extracelulares (ECM) que permitem a proliferação e diferenciação celular, e pelos fatores de crescimento. Portanto, para se ter um substituto biológico eficaz, as estruturas tridimensionais porosas mimetizam as ECM, ou seja, o ambiente natural onde as células se organizam nos tecidos (Tabata, 2005; Sampaio, 2012).

2.2 Estruturas Tridimensionais Porosas

As condições essenciais para que uma estrutura 3D desempenhe seu papel no desenvolvimento de novos tecidos vêm evoluindo ao longo dos anos, exercendo agora funções que vão além do suporte do novo tecido, mas também como substrato para a adesão, crescimento, proliferação, migração e diferenciação celular, e como delimitador do espaço para que ocorra a vascularização, formação e remodelagem do tecido em desenvolvimento (Domingos, 2012; Sampaio, 2012).

Devido à complexidade dos tecidos e às abordagens ainda em fases experimentais, não é possível definir parâmetros que estabeleçam uma estrutura tridimensional “ideal”, pois deve-se considerar fatores que incluam propriedades químicas, morfológicas, mecânicas e biológicas adequadas, bem como

biocompatibilidade, biodegradabilidade, apropriada taxa de degradação com subprodutos não tóxicos, adequada arquitetura, tamanho de poro, porosidade e interconectividade entre os poros (Hutmacher *et al.*, 2004; Sampaio, 2012).

A Figura 3 ilustra algumas estruturas tridimensionais com diferentes arquiteturas e que possuem potencial para serem utilizadas na engenharia de tecidos como suporte celular para reconstituição tecidual.

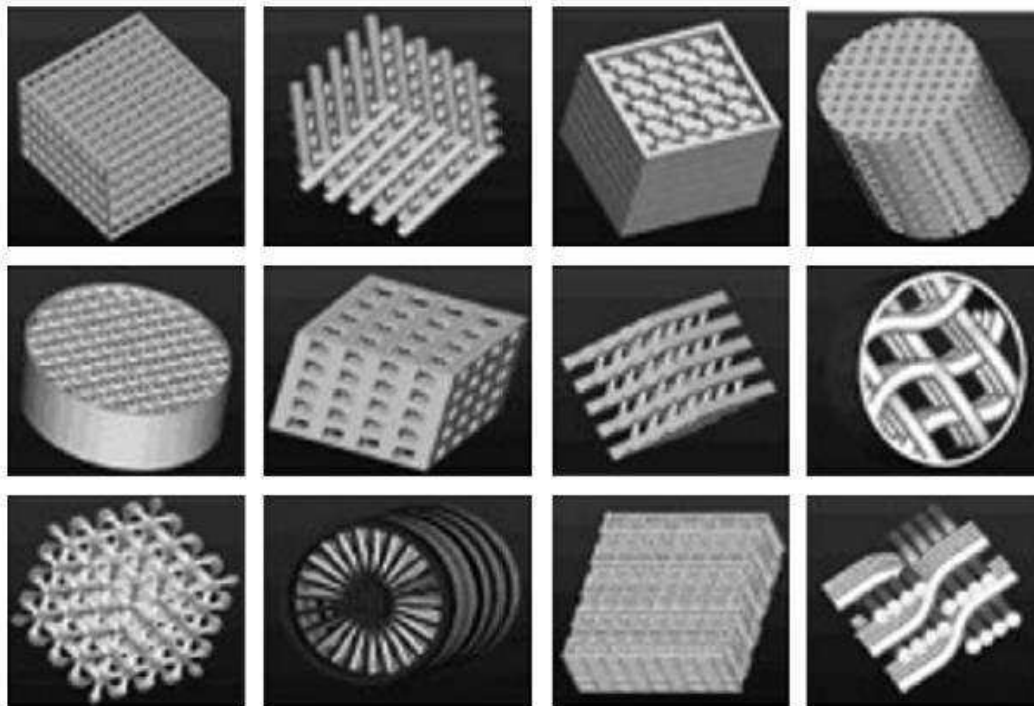


Figura 3 – Estruturas tridimensionais com diferentes arquiteturas e aplicabilidade na Engenharia de Tecidos (Giannitelli *et al.*, 2014).

Desse modo, os seguintes requisitos devem ser criteriosamente avaliados e definidos, para se obter estruturas tridimensionais com o comportamento adequado à sua utilização:

- Biocompatibilidade – sistemas biocompatíveis são aqueles onde o material atua como parte do corpo, mimetizando as funções vitais do organismo sem causar reações inflamatórias ou danos ao paciente, ou seja, a interação entre o material e o meio biológico deve ser aceitável e estável para terapias a longo prazo (Woodruff e Hutmacher, 2010; Domingos, 2012).
- Biodegradabilidade – os materiais pelos quais as estruturas são confeccionadas devem apresentar uma taxa de degradação controlada e

compatível com a regeneração do novo tecido, para que atuem como suporte de carga e apoio ao tecido que está sendo formado. Se essa taxa for acelerada, poderá ocasionar um comprometimento na integridade do novo tecido, que estará susceptível a esforços incompatíveis com os quais ele pode suportar. Taxas de degradação mais lentas, por sua vez, ocasionam em esforços compressivos prematuros no tecido em desenvolvimento. Além disso, os subprodutos de degradação devem ser aceitos pelo corpo humano, sem causar efeitos colaterais ao paciente (Woodruff e Hutmacher, 2010; Sampaio, 2012).

- Adesão celular – a adesão das células nas estruturas tridimensionais é essencial para uma interação desse sistema, porém, a similaridade entre a matriz extracelular e a estrutura não é obrigatória para que ocorra essa adesão, apesar de desejável para uma maior eficácia no local do implante (Senedese, 2011).
- Porosidade – por definição, a porosidade consiste no percentual de espaços vazios no interior de um corpo sólido e independe do material pelo qual ele é formado. Uma elevada porosidade permite um aumento na área superficial do sólido, resultando em melhor adesão, migração e proliferação celular, assim como a vascularização do novo tecido. A dimensão e geometria adequada dos poros aliadas à uma estrutura com poros interconectados para difusão de nutrientes e resíduos, são parâmetros fundamentais para que haja viabilidade celular e regeneração tecidual (Domingos, 2012).
- Propriedades mecânicas – estas devem ser compatíveis à localidade anatômica do implante e, deve ser suficientemente forte para permitir a manipulação cirúrgica no momento da implantação. O desenvolvimento de estruturas tridimensionais para aplicações ortopédicas apresentaram grande evolução nas últimas décadas e, conseqüentemente, estas estruturas foram produzidas com boas propriedades mecânicas e alta porosidade, demonstrando assim um alto potencial *in vitro*. Porém, quando implantadas *in vivo*, falharam devido à sua insuficiente capacidade de vascularização. Portanto, a busca pelo equilíbrio entre as propriedades mecânicas e a

porosidade é essencial para que haja a infiltração das células e vascularização dentro dessas estruturas (O'Brien, 2011; Sousa *et al.*, 2013)

O suporte para o reparo e reconstrução de um tecido ou órgão necessita de uma estrutura compatível com o local, com o tamanho e com o tipo da lesão, e pode ser aplicado seguindo dois mecanismos fundamentais. O primeiro trata-se de uma estrutura capaz de suportar de forma física e mecânica as células, desde a sua inserção na estrutura, até o seu reimplante no organismo, já com um tecido prematuro em desenvolvimento. Dessa forma o conjunto (estrutura + células) proporciona suporte ao crescimento celular e à solicitação mecânica exigida à medida que a estrutura é remodelada com a degradação *in vivo* da mesma. O segundo mecanismo envolve o implante no organismo de um tecido maduro já formado. A estrutura tridimensional utilizada é produzida contendo as propriedades mecânicas e tempo de degradação necessários desde a inserção das células até o bioreator, onde estas proliferam na cultura *in vitro* à medida que a estrutura é degradada e reabsorvida até a formação do tecido (Barbanti *et al.* 2005).

Atualmente, a técnica para deposição de células nas estruturas ainda é manual e depende diretamente do manuseador, onde o seu controle e reprodutibilidade é extremamente baixo, associado a baixas eficiências de deposição celular e distribuição homogênea ao longo da superfície e do interior da estrutura. Uma alternativa para minimizar esses problemas tem sido a utilização de bioreatores, que permitem obter uma alta eficiência das estratégias de deposição e cultura celular com uma distribuição celular homogênea, condicionamento mecânico das células e controle dos fluxos de oxigênio e nutrientes para as células e tecidos em desenvolvimento. Porém, trata-se de uma técnica mais cara e com variáveis mais complexas de controle (Domingos, 2012).

A tecnologia envolvida na produção dessas estruturas tridimensionais está diretamente ligada ao biomaterial escolhido e ao processo utilizado para sua confecção (Hutmacher, 2001; Liu *et al.*, 2007; O'Brien, 2011; Domingos, 2012).

2.3 Técnicas de Fabricação de Estruturas

A prototipagem rápida está inserida entre as técnicas avançadas de manufatura aditiva, como sendo uma alternativa viável no controle detalhado sobre a arquitetura

da estrutura que se deseja obter. Ao contrário dos processos convencionais de subtração, que removem material de um bloco tridimensional, na fabricação aditiva constrói-se a peça final através da adição de camadas de material, a partir de um modelo computacional em 3D. O modelo 3D é "fatiado" em camadas bidimensionais (2D), e transferidos para o aparelho de fabricação aditiva para a fabricação do objeto final. Algumas das técnicas de fabricação aditiva comercialmente disponíveis utilizadas para obtenção de estruturas tridimensionais para aplicações em engenharia de tecidos incluem: a sinterização seletiva a laser (SLS), estereolitografia (SLA), modelagem por fusão e deposição (FDM), deposição precisa por extrusão (PED) e impressão tridimensional (3DP) (Yeong *et al.*, 2004; Giannitelli *et al.*, 2014).

Na modelagem por fusão e deposição, o material adequado é depositado no recipiente da máquina, previamente aquecido, até a sua fusão e em seguida é extrusado através de uma agulha (Figura 4), camada por camada, até a completa construção da estrutura desejada. Uma grande vantagem desse tipo de modelagem está relacionada à não necessidade de se usar solventes orgânicos com potencial tóxico para fundir o material. Porém, é restrita ao uso de materiais termoplásticos com viscosidade do fundido apropriada, sendo assim, células e outros fatores de crescimento não podem ser integrados no processo de fabricação das estruturas (Yeong *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007).

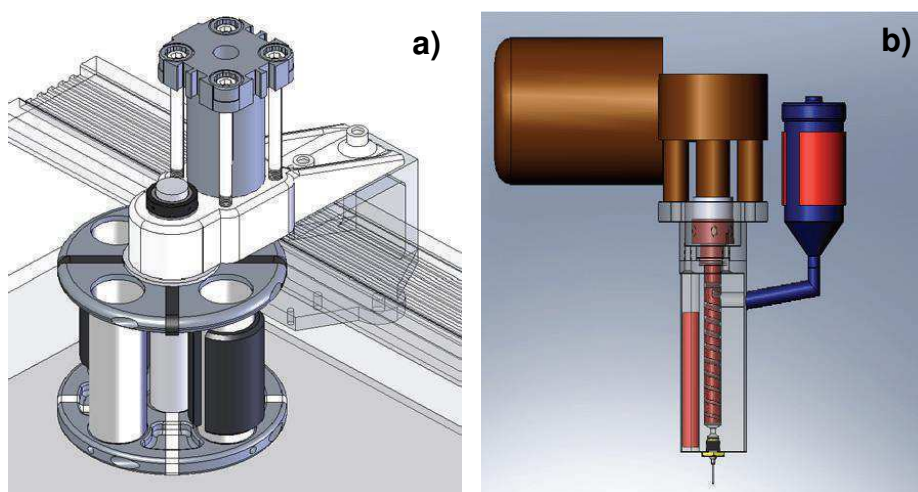


Figura 4 - Sistema de extrusão para vários materiais (a) ou apenas um (b) (Domingos *et al.*, 2009).

O Instituto Politécnico de Leiria (Portugal) desenvolveu um equipamento denominado BioExtruder (Figura 5), utilizado para fabricar estruturas tridimensionais

pré-definidas e desenvolvidas a partir de um software específico. Trata-se de um sistema de baixo custo e alta reprodutibilidade, capaz de controlar a porosidade das estruturas (Domingos *et al.*, 2009).



Figura 5 – Sistema BioExtruder.

Essas estruturas são produzidas seguindo as estratégias de deposição apresentadas na Figura 6.

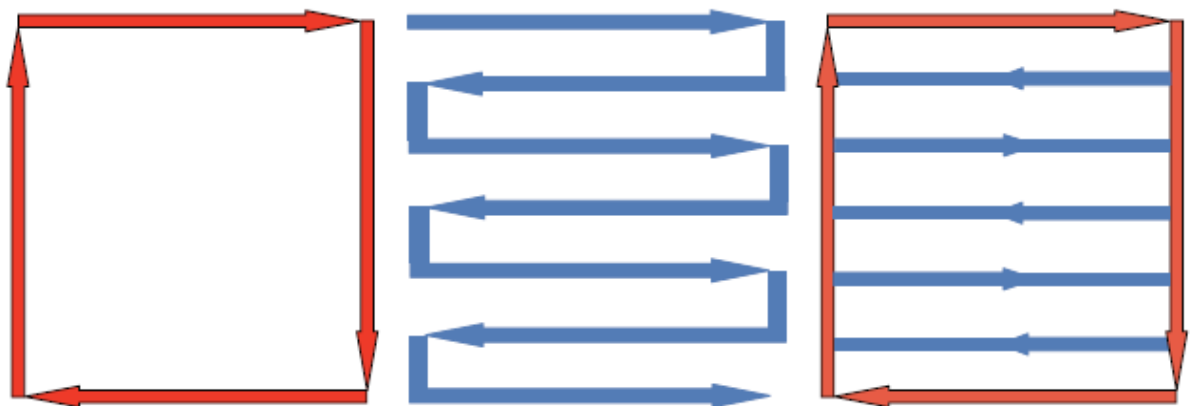


Figura 6 - Estratégias de deposição do material no sistema BioExtruder (Domingos *et al.*, 2009).

2.4 Biomateriais

Os biomateriais utilizados na fabricação de estruturas 3D para a engenharia de tecidos podem ser divididos na ampla categoria dos materiais sintéticos ou naturais, e dos semissintéticos, que vêm crescendo rapidamente. A maioria desses materiais são adaptações de materiais previamente utilizados na área médica, como fios de sutura, agentes hemostáticos e curativos (Liu *et al.*, 2007).

De acordo com O'Brien (2011), na primeira Conferência de Consenso da Sociedade Européia de Biomateriais (ESB) em 1976, um biomaterial foi definido como

sendo “um material não viável utilizado num dispositivo médico que destina-se a interagir com sistemas biológicos”. Com o passar do tempo, e a consequente evolução acerca dos conhecimentos relacionados aos biomateriais, essa definição foi reformulada de modo que, agora “trata-se de um material destinado a interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo”. Portanto, o conceito de biomateriais que antes era de apenas interagir com o corpo, passa a influenciar os processos biológicos afim de se ter uma regeneração tecidual.

Chen e Liu (2015), definiram um biomaterial como sendo uma substância capaz, ou que tenha sido projetada para assumir uma forma que, por si só ou como parte de um sistema complexo, é usado para dirigir, pelo controle das interações com os componentes de sistemas vivos, a trajetória de qualquer procedimento terapêutico ou de diagnóstico, em medicina humana ou veterinária.

Assim, a engenharia de tecidos baseada na produção de estruturas tridimensionais, é totalmente dependente do biomaterial escolhido para a sua fabricação e, os mais utilizados nesse campo, pertencem a três classes principais: materiais poliméricos naturais, materiais poliméricos sintéticos e materiais cerâmicos. Os polímeros sintéticos apresentam estrutura mais flexível devido à sua composição, e são adaptáveis de acordo com as necessidades requeridas (Senedese, 2011; Domingos, 2012).

Os biomateriais são utilizados para inúmeras aplicações, como em biossensores, implantes, lentes intraoculares, suportes para regeneração de tecidos, sistemas para liberação controlada de fármacos e, de forma geral, para atuarem em áreas comprometidas do corpo. E, para que um biomaterial possa ser assim chamado, deve ser capaz de estar em contato com tecidos do corpo humano sem causar danos, ou seja, apresente biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioabsorção e bioreabsorção (Sampaio, 2012).

Assim, um biomaterial biocompatível refere-se àquele que tem a capacidade de atuar como suporte para uma adequada atividade celular, como facilitador de sistemas moleculares e mecânicos de sinalização, a fim de otimizar a regeneração tecidual sem que haja respostas indesejadas no local do implante. Nesse contexto, Williams (2008) define biocompatibilidade como sendo a capacidade de um biomaterial desempenhar uma função específica sem desencadear efeitos danosos,

tanto no destinatário quanto no beneficiário, porém, gerando a mais apropriada resposta em cada situação, em particular.

A biodegradabilidade de um biomaterial, por sua vez, é o termo utilizado para produtos que sofrem degradação macromolecular e, cujos subprodutos se dispersam *in vivo*, porém, não são eliminados pelo organismo. No caso dos biomateriais poliméricos, a biodegradação acontece com a clivagem de ligações hidroliticamente ou enzimaticamente sensíveis, que resultam na erosão do polímero e na sua classificação como hidroliticamente degradável ou enzimaticamente degradável (Barbanti *et al.*, 2005; Nair e Laurencin, 2007).

Os biomateriais bioabsorvíveis, são aqueles capazes de se desintegrarem nos fluidos corpóreos sem que haja clivagem da cadeia macromolecular ou diminuição da massa molecular. Dispositivos bioabsorvíveis são alternativas para a fixação interna de fraturas, ligamentos e lesões meniscais, pois, mantêm a fixação, decompõem-se gradualmente e as tensões são transferidas para o tecido de cicatrização. Além disso, estes dispositivos não necessitam de uma intervenção cirúrgica para a sua retirada (Rokkanen *et al.*, 2000; Barbanti *et al.*, 2005).

No caso dos biomateriais bioreabsorvíveis, há a completa eliminação do material e dos subprodutos de degradação. Nesse tipo de material a degradação ocorre através da diminuição do tamanho do dispositivo, que são reabsorvidos pelo organismo e excretados pelo corpo (Barbanti *et al.*, 2005).

2.5 Polímeros Biodegradáveis

Tanto os polímeros naturais (biopolímeros) quanto os sintéticos têm sido largamente estudados como biomateriais poliméricos biodegradáveis, com o objetivo de mimetizar funções da matriz extracelular e promover o desenvolvimento celular durante a regeneração do tecido. Os polímeros naturais são considerados os primeiros biomateriais biodegradáveis utilizados clinicamente, porém, a degradação enzimática *in vivo* desses materiais varia de forma significativa de acordo com o local do implante, dependendo da disponibilidade e concentração das enzimas. Os polímeros sintéticos, por sua vez, apresentam-se mais facilmente adaptáveis quanto às suas propriedades e aplicações específicas *in vivo*, podendo formar estruturas tridimensionais sólidas, estáveis e porosas que são degradadas e reabsorvidas pelo

organismo sob uma taxa controlada de tempo. (Hutmacher, 2000; Nair e Laurencin, 2007; Fidèles, 2014).

Polímeros sintéticos biodegradáveis apresentam maior biocompatibilidade quando comparados à muitos biopolímeros, além disso, são largamente reproduzidos, podem ser conformados sob condições controladas, geralmente são biologicamente inertes e apresentam maior uniformidade. Dispositivos implantáveis são comumente fabricados a partir de polímeros biodegradáveis com degradação hidrolítica, devido às suas mínimas variações locais e de paciente para paciente (Nair e Laurencin, 2007).

Alguns dos biomateriais poliméricos sintéticos biodegradáveis mais utilizados na engenharia de tecidos são os poliésteres lineares alifáticos – Poliácido glicólico (PGA), Poliácido láctico (PLA) e seus copolímeros Poliácido (láctico-co-glicólico) (PLGA), que se degradam através da hidrólise das ligações éster. Além destes, tem-se ainda a Policaprolactona (PCL) e o Polihidroxibutirato (PHB) que também são alvo de pesquisa na engenharia de tecidos, porém, apresentam maior tempo de degradação e são mais atrativos para implantes a longo prazo (Ma, 2004).

2.5.1 Policaprolactona

Os poliésteres biodegradáveis sintéticos foram adotados na cirurgia como materiais para suturas e dispositivos de fixação óssea há mais de 30 anos e permanecem entre os polímeros biodegradáveis sintéticos mais utilizados. Todos os polímeros dessa classe são insolúveis em água, porém, degradáveis por ataque hidrolítico da ligação éster. Os polímeros dessa categoria (exceto o PGA) são solúveis em uma gama de solventes orgânicos comuns e podem ser processados por uma variedade de métodos térmicos e à base de solventes (Griffith, 2000).

A policaprolactona (PCL) foi um dos primeiros polímeros sintetizados pelo grupo Carothers nos anos 1930 e tornou-se disponível comercialmente como sendo um dos polímeros sintéticos que podem ser degradados por microorganismos. Porém, devido à sua lenta degradação, foi esquecido por algum tempo pelos pesquisadores, que voltavam suas atenções aos polímeros com tempo de degradação mais curtos, para utilização como liberadores de fármaco. Com o surgimento da engenharia de tecidos e o conseqüente avanço nesse campo, o PCL voltou a ser alvo de estudo uma vez que possui boas propriedades reológicas e viscoelásticas, que permite a utilização

desse polímero na produção de estruturas tridimensionais para regeneração tecidual (Woodruff e Hutmacher, 2010; Senedese, 2011).

O PCL é um poliéster linear alifático, semicristalino, hidrofóbico, biodegradável e bioreabsorvível, composto por unidades repetidas de hexanoato. Suas propriedades físicas, mecânicas e térmicas são dependentes do seu peso molecular e do seu grau de cristalinidade, que pode atingir 69% e tende a diminuir com o aumento do peso molecular, que geralmente varia de 3.000 a 80.000 g/mol. Apresenta temperatura de transição vítrea (T_g) de $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, o que caracteriza um estado borrachoso em temperatura ambiente e ponto de fusão variando entre 59 e $64\text{ }^{\circ}\text{C}$, devido à natureza cristalina do PCL, que permite a fácil moldabilidade a temperaturas relativamente baixas, e uma elevada temperatura de degradação ($\sim 350\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Hayashi, 1994; Labet e Thielemans, 2009).

Em temperatura ambiente apresenta-se solúvel em clorofórmio, diclorometano, benzeno, tolueno, ciclohexano e 2-nitropropano; fracamente solúvel em acetona, 2-butanona, acetato de etila e dimetilformamida; e insolúvel em álcoois e éteres (Lili, 2007; Domingos, 2012).

A Figura 7 apresenta a estrutura cíclica do monômero ϵ -caprolactona (a) e a unidade estrutural molecular do seu homopolímero PCL, constituída por cinco grupos metileno apolares e um grupo éster relativamente polar (b).

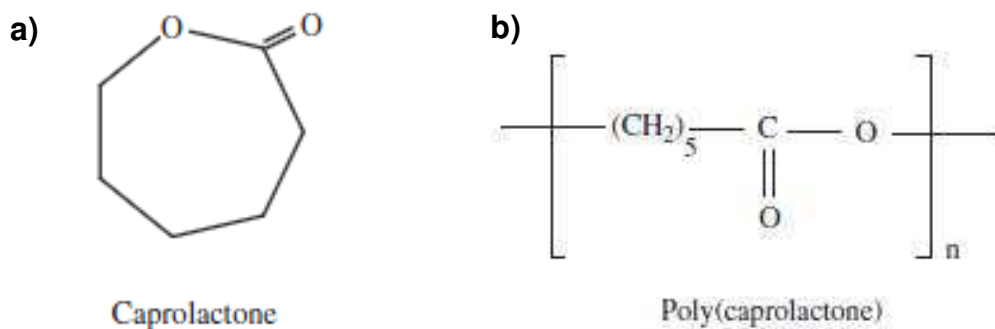


Figura 7 - (a) Estrutura cíclica da ϵ -caprolactona; (b) Poli(ϵ -caprolactona) (Lakshmi, 2007).

Existem dois métodos de polimerização do PCL: a partir da condensação do ácido 6-hidroxicapróico (6-hidroxi-hexanóico) e a polimerização por abertura do anel da ϵ -caprolactona (Woodruff e Hutmacher, 2010; Labet e Thielemans, 2009).

PCL é amplamente utilizado para a produção de estruturas tridimensionais porosas para engenharia de tecidos, devido à sua biocompatibilidade,

biodegradabilidade, estabilidade estrutural e propriedades mecânicas adequadas. Porém, apresenta baixa bioatividade e baixa energia de superfície (alta hidrofobicidade), resultando numa redução da afinidade celular e em pequenas taxas de regeneração de tecidos. Dessa forma, uma alternativa viável trata-se da produção de compósitos para regeneração óssea à base de materiais cerâmicos, a fim de aumentar a resistência mecânica, osteocompatibilidade/osteocondutividade e a taxa de degradação dos implantes (Domingos, 2012; Patricio *et al.*, 2013).

Domingos *et al.* (2009) produziram estruturas tridimensionais de policaprolactona através do sistema de BioExtrusão e observaram que os poros estavam totalmente interconectados e com geometria e dimensões regulares, sem alteração do material devido às altas temperaturas e forças de cisalhamento envolvidas no processo de extrusão. Resultados também mostraram um alto percentual de proliferação celular (>80%) indicando a ausência de componentes tóxicos e a eficácia do método.

Williams *et al.* (2005) produziram estruturas de policaprolactona pelo método de sinterização seletiva a laser para reparação óssea e cartilaginosa e obtiveram resultados com grande potencial para a substituição desse tipo de tecido.

2.6 Mel

As propriedades medicinais do mel de abelha e outros produtos da colméia, como por exemplo, pólen, geléia real, própolis e larvas de abelha, têm sido mencionados por suas variedades nas áreas medicinais e nutricionais (Silva *et al.*, 2006).

O mel é uma solução aquosa concentrada de açúcares contendo aproximadamente 200 substâncias diferentes, sendo composto basicamente de uma solução supersaturada em açúcares, a frutose (38%) e a glucose (31%) são as mais importantes, com teor de umidade de cerca de 17,7%. Há também uma grande variedade de outros componentes em menores quantidades, incluindo os ácidos fenólicos e flavonóides, glucose-oxidase, enzimas catalase, ácido ascórbico, carotenóides, ácidos orgânicos, aminoácidos, proteínas, e α -tocoferol, sais minerais, vitaminas, os grãos de pólen, as ceras e outros fitoquímicos, que desempenham um papel vital, contra a ação de deterioração dos radicais livres nos organismos, que leva a deficiência de antioxidantes nos organismos vivos. Os antioxidantes naturais são

eficazes contra a inflamação, doenças coronárias, queimaduras, envelhecimento, cicatrização de feridas, gastrointestinais e doenças do coração. A composição do mel é influenciada pelos tipos de espécies de plantas, o clima, as condições ambientais e a contribuição do apicultor (Martos *et al.*, 2008; Manzanares *et al.*, 2014; Noor *et al.*, 2014; Habib *et al.*, 2014).

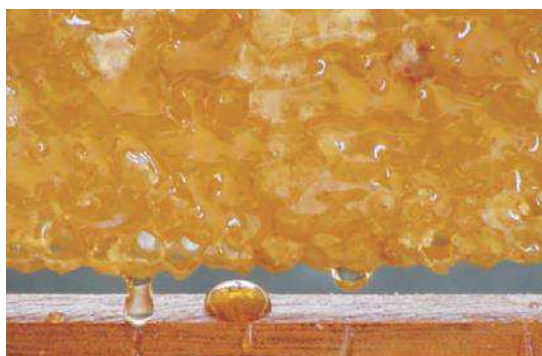


Figura 8 – Mel (Camargo *et al.*, 2006).

As características medicinais do mel têm sido documentadas na literatura desde os tempos antigos, ao observar propriedades antimicrobianas nesse produto. Este aspecto antimicrobiano ocorre devido à elevada viscosidade do mel que proporciona uma barreira de proteção evitando infecções (Mandal *et al.*, 2011).

Além do seu efeito antibacteriano outras propriedades têm sido atribuídas ao mel, como redução de inflamação, neutralização de maus odores, e cicatrização de feridas (Vandamme *et al.*, 2013).

O mel é higroscópico, o que significa que ele pode retirar a umidade do ambiente e desidratar as bactérias, como também apresenta um elevado teor de açúcar. Ele também apresenta característica osmótica promovendo, portanto, a diminuição do edema, pela absorção da umidade na região, melhorando a microcirculação indiretamente no local (Mandal *et al.*, 2011; Couquet *et al.*, 2013).

Na maioria dos méis encontra-se o peróxido de hidrogênio que é produzido pela reação enzimática devido à oxidação da glicose por glicose-oxidase, que é uma enzima segregada pelas abelhas, possuindo a função antisséptica. Méis não-peróxido, no entanto, são menos comuns. (Couquet *et al.*, 2013; Cooper, 2014).

O pH do mel é relativamente ácido, entre 3,5 e 6. Embora muitas bactérias sejam capazes de suportar um pH baixo, o pH retarda ou elimina o crescimento de certas espécies de bactérias patogênicas (Couquet *et al.*, 2013).

A sua cristalização depende de inúmeros fatores, tais como a origem (botânica e geográfica), temperatura, teor de umidade e teor de açúcar. Altas concentrações de açúcar total e D-glicose ou baixa quantidade de dextrina favorecem a cristalização do mel. A temperatura é o fator ambiente principal que afeta a cristalização. A formação de núcleos cristalinos na primeira fase de cristalização acontece entre 5° e 8°C. A taxa de crescimento dos cristais é mais alta a temperaturas entre 13° e 17°C. A temperatura de armazenamento não só afeta a fase líquida, mas também a maneira de cristalização, podendo ser formados cristais maiores em méis com menos núcleos cristalinos, que tendem a precipitar-se no fundo do recipiente. Méis com umidade inferior a 17% tendem a cristalizar mais rápido do que méis com 18%. Méis com menos do que 30% de glicose raramente cristalizam (Silva *et al.*, 2006; Escriche *et al.*, 2014; Camargo *et al.*, 2006).

O mel é facilmente contaminado durante o seu processo de produção, portanto, o mel de grau médico deve ser esterilizado, não por meio de aquecimento, mas por meio de radiação gama. Através deste processo, os microrganismos são mortos sem comprometer a atividade antibacteriana do mel de grau médico (Vandamme *et al.*, 2013).

Maleki *et al.*, 2013 produziram malhas de nanofibras a partir de misturas aquosas de poli (álcool vinílico) (PVA) e mel por electrospinning para aplicação como curativos. Resultados mostraram que mel pode ser utilizado como um antibiótico natural para melhorar a eficiência do curativo e aumentar a taxa de cicatrização.

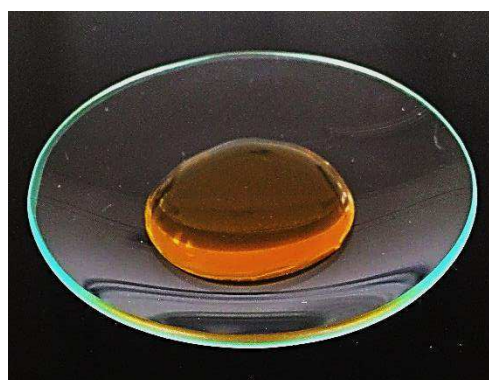
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local da pesquisa

A pesquisa foi realizada em duas etapas, sendo a primeira, a produção das estruturas no Centro para o Desenvolvimento Rápido e Sustentado do Produto – CDRsp, Instituto Politécnico de Leiria, Portugal; e a segunda, a caracterização das mesmas, no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO, situado na Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Campina Grande – PB.

3.2 Materiais

- Policaprolactona em pó (CAPA 6506) com peso molecular 50.000g/mol, fornecido pela Perstorp Caprolactones (Cheshire, UK);
- Mel comercial produzido pela colmeia Belchior, Mértola, Portugal.



3.3 Procedimento experimental

A primeira etapa da pesquisa teve como objetivo preparar composições homogêneas de PCL em pó com diferentes concentrações de mel e processá-las a partir do sistema BioExtruder para se obter estruturas tridimensionais porosas e, posteriormente, avaliar a melhor concentração do mel no biocompósito. As estruturas de PCL puro foram obtidas diretamente a partir do pó, sem que houvesse a necessidade de fundir o material antes do mesmo ser processado.

3.3.1 Preparação e obtenção das composições

Primeiramente 12g do PCL em pó foi depositado em um almofariz refratário aquecido até aproximadamente 85 °C por 15 min até que o pó estivesse completamente fundido para então adicionar o mel (Figura 9a). Diferentes concentrações de mel foram adicionadas ao polímero e misturadas manualmente até que uma mistura visualmente homogênea fosse obtida (Figura 9b).

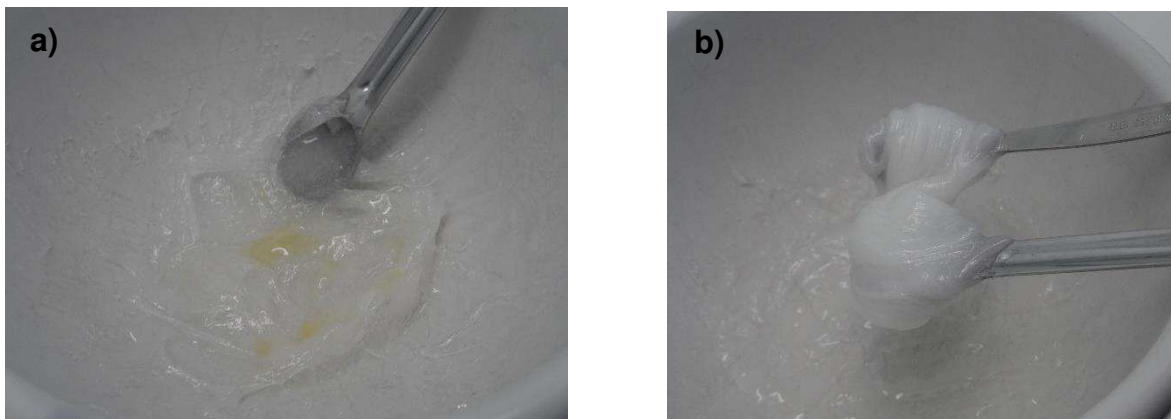


Figura 9 - (a) Adição do mel ao polímero; (b) Mistura homogênea PCL/mel.

3.3.2 Obtenção das estruturas tridimensionais

Após a obtenção das composições, o biocompósito foi inserido no depósito do sistema BioExtruder e aquecido até 85 °C por cerca de 45 min. Em seguida, o material foi extrusado através da compressão de ar por uma agulha de aproximadamente 0,30 mm de diâmetro e o filamento depositado camada a camada (Figura 10a), com velocidade de 20 mm/s, velocidade de rotação do fuso de 13 rpm, dimensões de 30 x 30 x 3,36 mm, arquitetura 0/90° e tamanho de poro de 350 µm. A Figura 10b mostra a estrutura finalizada.

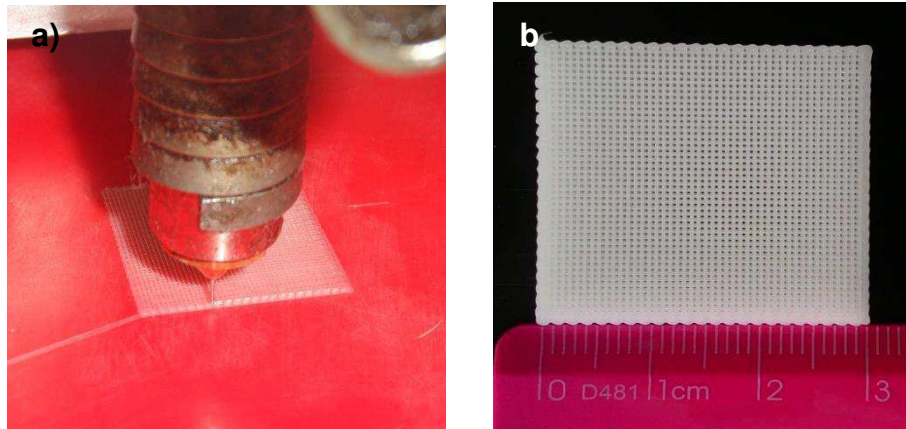


Figura 10 - (a) Deposição do material, camada a camada e (b) estrutura tridimensional obtida.

O fluxograma das etapas do trabalho é apresentado na Figura 11.

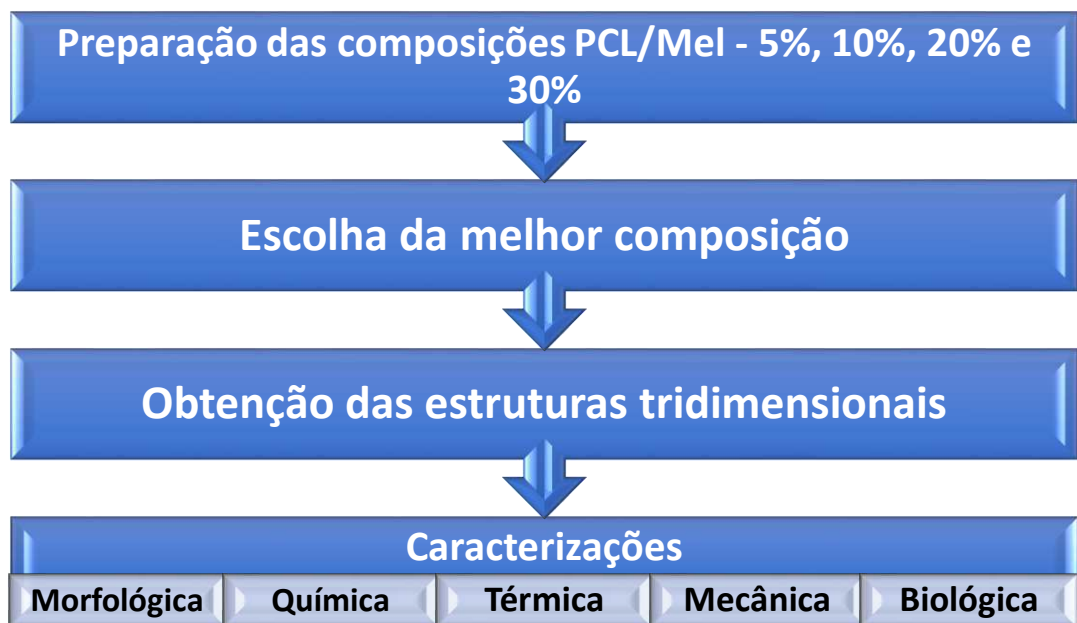


Figura 11 - Fluxograma das etapas do trabalho.

3.4 Caracterização das estruturas tridimensionais

As estruturas foram caracterizadas pelas técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Termogravimetria (TG), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Ensaio de Porosidade, Ensaio Mecânico de Compressão, Citotoxicidade e Adesão Celular.

3.4.1 *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

O microscópio eletrônico de varredura é um aparelho que pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida além de ser um dos aparelhos mais versáteis disponíveis para a observação e análise de características microestruturais. Alguns microscópios eletrônicos de varredura permitem analisar pequenas amostras utilizando aumentos de 300.000 vezes ou mais, devido à sua alta resolução, e formam imagens tridimensionais da amostra, resultado da grande profundidade de campo do equipamento (Dedavid *et al.*, 2007).

As estruturas foram analisadas morfologicamente por MEV utilizando um Microscópio Eletrônico PRO X Phenon com aumento de até 40000x, profundidade de foco de 1 mm, resolução de 30 nm, tensão de 15 KV, baixo vácuo e pressão variada (1 a 270 Pa).

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

A espectroscopia é a ciência que estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, e suas medidas são baseadas na quantidade de radiação produzida ou absorvida pelas moléculas ou átomos presentes na amostra de interesse. A espectrofotometria na faixa do infravermelho apresenta-se como uma poderosa ferramenta na identificação de compostos orgânicos e inorgânicos puros, devido à sua capacidade de identificar diferentes ligações químicas entre átomos pelas deformações rotacionais e vibracionais, as quais absorvem energia em determinada frequência de ressonância, de acordo com as características químicas dos átomos envolvidos (Souza, 2015).

Neste trabalho, as matérias-primas e as estruturas foram caracterizadas por FTIR e registrados em um espectrofotômetro Spectrum 400, FT-IR/ FT-NIR Spectrometer Perkin Elmer – CERTBIO/UFCEG na região de 4000 a 650 cm^{-1} no modo ATR, com resolução de 4 cm^{-1} e 16 varreduras.

3.4.3 Termogravimetria (TG)

A Termogravimetria é uma técnica da análise térmica que permite medir as variações de massa de uma amostra durante o seu aquecimento (ou resfriamento) ou quanto mantida em uma temperatura específica.

O material e as estruturas foram analisados por TG utilizando um equipamento termogravimétrico modelo Pyris 1 TGA da Perkin Elmer – CERTBIO/UFCG, com faixa de temperatura de 30 a 600 °C, razão de aquecimento de 10 °C/min, atmosfera de nitrogênio e fluxo de 20 mL/min. Todas as amostras foram acondicionadas em cadinho de alumina.

3.4.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise térmica por DSC permite medidas da diferença de energia fornecida a uma substância e a um material de referência, em função da temperatura, enquanto a substância e o material de referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura. Estas medidas fornecem dados qualitativos e quantitativos em relação a mudanças físicas e químicas que envolvem processos endotérmicos e exotérmicos.

Os materiais e as estruturas foram analisados em um equipamento DSC 8500 Perkin Elmer, com faixa de temperatura de 20 a 150 °C, razão de aquecimento de 10 °C/min, em atmosfera de gás nitrogênio e fluxo de 20 mL/min.

3.4.5 Porosidade

A porosidade das estruturas foi determinada a partir do método geométrico, onde as amostras (n=3) foram pesadas e medidas. A densidade das estruturas ($\rho_{scaffolds}$) foi calculada a partir da seguinte equação:

$$\rho_{scaffold} = \frac{\text{Massa do scaffold}}{\text{Volume do scaffold}} \quad \text{Equação (1)}$$

Posteriormente, a porosidade total das estruturas foi calculada de acordo com a equação que segue, onde ρ_0 é o valor da densidade teórica da policaprolactona (1,14 g/cm³):

$$\text{Porosidade (\%)} = 1 - \frac{\rho_{scaffold}}{\rho_0} \quad \text{Equação (2)}$$

Com o auxílio do programa ImageJ foi possível verificar a distribuição do tamanho dos poros das estruturas a partir de 40 medições, e avaliar se houve influência da adição do mel na porosidade dos *scaffolds*.

3.4.6 Ensaio Mecânico de Compressão

O ensaio mecânico de compressão foi realizado em uma máquina universal de ensaios INSTRON, modelo 3366, com uma célula de carga de 10kN e taxa de deformação constante de 1,0mm/min, obtendo o limite máximo de resistência e o percentual de deformação máxima para a carga utilizada. A resistência à compressão foi calculada a partir da divisão entre a tensão máxima e a área original. Foram testadas três amostras e o valor médio do módulo de Young com seu respectivo desvio foi calculado para até 20% de deformação.

3.4.7 Ensaio de Citotoxicidade

Como os biomateriais não devem causar reações adversas e nem lesar o organismo do paciente, há a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de dispositivos para uso em seres humanos, principalmente aqueles de aplicação clínica (Rogerio *et al.* 2003).

Os testes de citotoxicidade foram realizados com a finalidade avaliar a resposta celular das estruturas de PCL puro e PCL/Mel 5% segundo a norma ISO 10993-5: "Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods" através da viabilidade celular pelo método da redução do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], que estabelece uma correlação entre a atividade metabólica celular e o número de células viáveis em cultura *in vitro*, utilizando células do tipo fibroblastos L929.

3.4.8 Adesão Celular

A organização das células do corpo humano segue um padrão tridimensional, onde é necessário que haja a adesão celular para que ocorra o seu crescimento e formação dos tecidos. Isso acontece de forma organizada, seguindo padrões distintos e vários mecanismos de adesão celular, responsáveis pela junção das células entre si e entre as conexões do citoesqueleto e determinam a arquitetura geral do tecido (Gumbiner, 1996).

Para o ensaio de adesão celular, primeiramente as estruturas foram esterilizadas por 1 hora em UV, onde cada superfície da amostra foi submetida por 30 minutos à radiação. Posteriormente, as amostras foram colocadas em placas de 24 poços e mantidas em estufa a 37 °C sob atmosfera de CO₂ a 5%, por 24 horas. Em seguida, as células da linhagem fibroblástica L929 foram plaqueadas diretamente sobre as estruturas tridimensionais, com uma densidade celular inicial de 1×10^5 células/poço. Após 7 dias de cultivo, as estruturas foram secadas em estufa a 37 °C por 24 horas, recobertas com ouro, e 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.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi utilizada neste trabalho a fim de avaliar o aspecto morfológico e geométrico das estruturas obtidas, bem como a arquitetura dos seus poros.

A partir das imagens obtidas por MEV e do aspecto visual das amostras, foi possível estabelecer uma composição padrão para dar continuidade aos ensaios. A composição escolhida foi a de 5% (Figura 12a), pois apresentou filamentos mais homogêneos e regulares quando comparados às demais composições. Além disso, as composições com 10, 20 e 30% de mel mostraram-se úmidas visualmente, indicando uma possível migração do mel para a superfície das estruturas, como pode ser visualizado também pelas Figuras 12b, 12c e 12d.

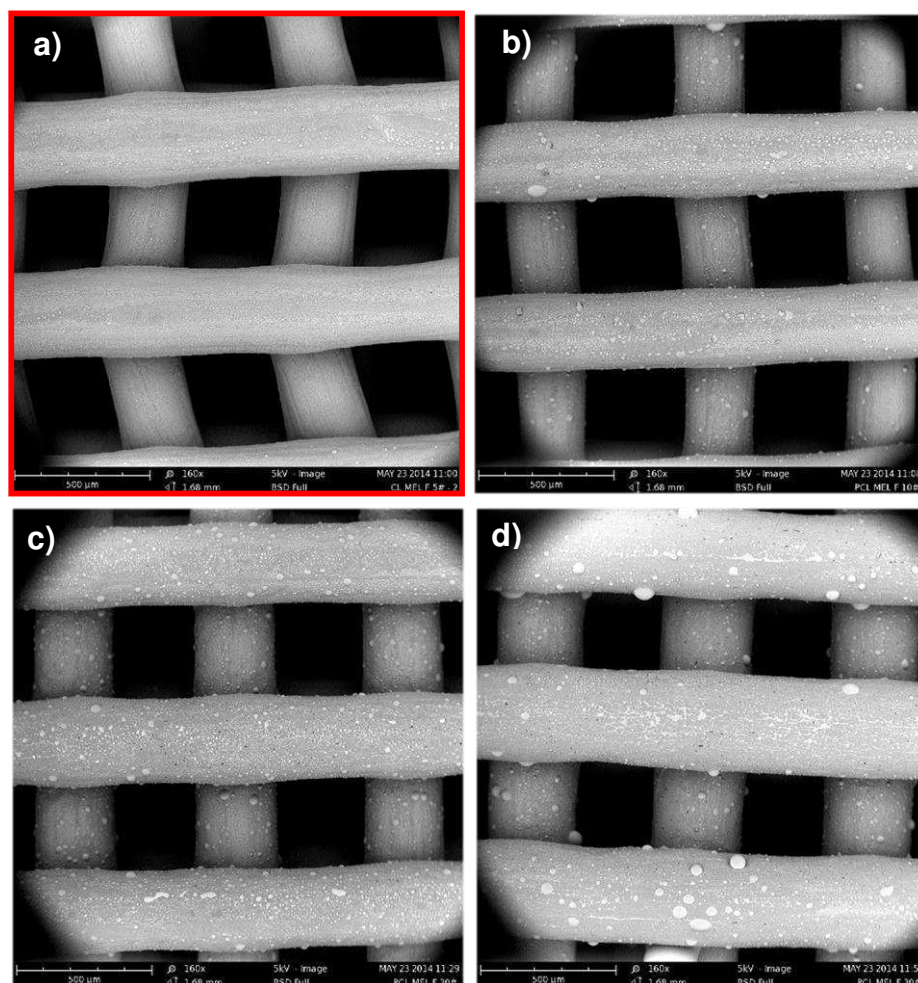


Figura 12 – Micrografias das estruturas de PCL/Mel com 5% (a), 10% (b), 20% (c) e 30% (d) de mel em sua composição.

As demais análises foram realizadas nas amostras de PCL puro e PCL/Mel 5%. Assim, a morfologia superficial das estruturas de PCL puro foram analisadas por MEV e estão apresentadas nas Figuras 13 (a) e (b). A Figura 13 (a) mostra a última camada de deposição dos filamentos, e a 13 (b) a primeira, que fica em contato com a superfície da placa em que é depositado.

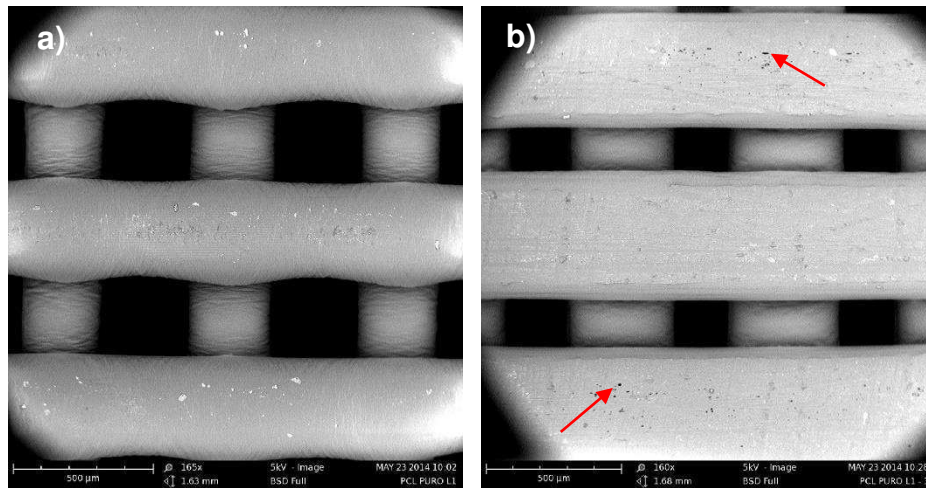


Figura 13 - Micrografias das estruturas de PCL puro: (a) última camada de deposição dos filamentos, aumento de 165x; (b) primeira camada de deposição, que entra em contato com a superfície da placa em que é depositado, aumento de 160x.

A partir das imagens obtidas por MEV, é possível verificar que as estruturas apresentaram uma geometria interna definida, mantendo o padrão $0/90^\circ$ de arquitetura, com interconectividade entre os poros e distribuição uniforme entre si. Porém, quanto aos filamentos, estes apresentaram intumescimento e uma certa rugosidade e irregularidade em sua superfície (Figura 13a), que pode ser associada ao cisalhamento e esforços mecânicos que o material sofre no momento em que é depositado, ou ainda, à falta de material no interior do depósito, resultando assim na descontinuidade do filamento. A Figura 13 (b) mostra uma superfície mais lisa e uniforme, pois trata-se da primeira camada de filamentos a ser depositada e que entra em contato com a superfície lisa da placa de deposição. A presença de pequenos poros (setas vermelhas) também pode ser verificada e podem estar relacionados a bolhas de ar aprisionadas no material durante a extrusão, bem como ao processo de remoção da estrutura da placa de deposição (Mota, 2008).

A Figura 14 apresenta a morfologia superficial das estruturas de PCL/Mel 5%.

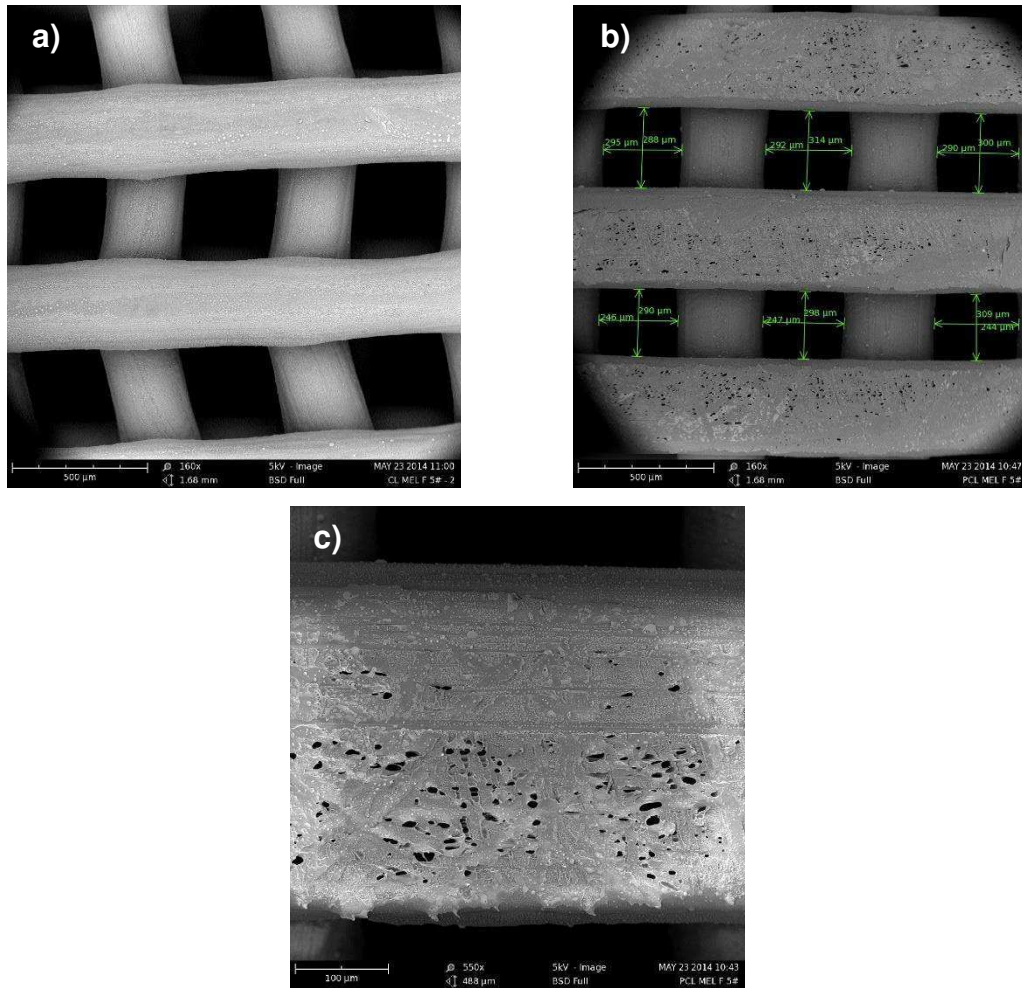


Figura 14 – Micrografias da superfície das estruturas PCL/Mel 5%: (a) última camada de deposição com aumento de 160x; (b) primeira camada de deposição indicando o tamanho dos poros e aumento de 160x; (c) presença de pequenos poros superficiais e aumento de 550x.

Com base na análise morfológica das estruturas com 5% de mel, é possível observar a presença de pequenas bolhas na superfície das amostras. Essas bolhas podem ser associadas à migração do mel do interior das estruturas até a superfície das mesmas, pela má homogeneização das misturas ou pela quantidade de mel na composição.

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

A análise por Espectroscopia do Infravermelho permite observar as bandas de absorção características dos materiais e das estruturas produzidas, a partir das

vibrações que os principais grupos da estrutura apresentam. A Figura 15 ilustra o espectro das estruturas de PCL.

A partir da análise dos resultados, pode-se identificar uma banda de forte intensidade em aproximadamente 1725 cm^{-1} , característica do alongamento do grupo carbonila, presente na estrutura química do polímero. Bandas de absorção também são observadas em 2946 cm^{-1} e 2870 cm^{-1} , correspondentes ao estiramento assimétrico e simétrico do grupo CH_2 , respectivamente. A banda localizada na região de 1238 cm^{-1} e 1160 cm^{-1} são referentes à vibração assimétrica e simétrica do C-O-C , respectivamente (Elzein *et al.*, 2004; Senedese, 2011).

De acordo com Coleman e Zarian (1979), o fato de o PCL ser um polímero semicristalino no estado sólido, pode-se assumir que seu espectro apresenta contribuições tanto de sua fase cristalina quanto amorfa, que é o que se observa em aproximadamente 1300 cm^{-1} , onde a banda característica do estiramento C-O e C-C na fase cristalina do PCL é identificada. Já em 1107 cm^{-1} , observa-se o estiramento C-O e C-C na fase amorfa do PCL.

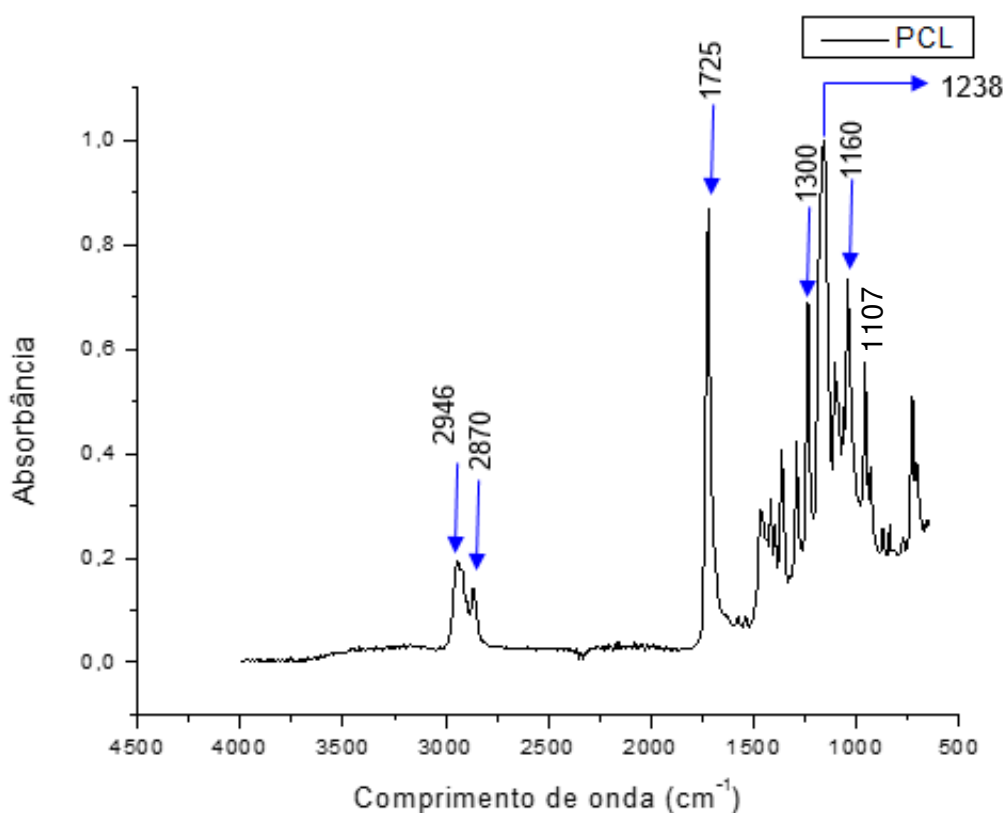


Figura 15 - Espectro de FTIR do PCL com suas bandas de absorção características.

As vibrações correspondentes aos principais grupos químicos são apresentados na Tabela 1, e corroboram com os valores encontrados por Elzein *et al.* (2004), Wu (2005) e Senedese (2011).

Tabela 1 - Vibrações relacionadas aos principais grupos químicos do espectro do PCL.

Posição (cm^{-1})	Vibração
2946	Estiramento assimétrico do CH_2
2860	Estiramento simétrico do CH_2
1725	Estiramento da carbonila
1300	Estiramento na fase cristalina de C-O e C-C
1238	Estiramento assimétrico C-O-C
1160	Estiramento simétrico C-O-C
1107	Estiramento na fase amorfa de C-O e C-C

O espectro de infravermelho para a amostra de mel estudada pode ser observado na Figura 16.

A partir da análise dos resultados, é possível identificar bandas de absorção em aproximadamente 918, 1043, 1110, 1254, 1321, 1411, 1641, 2932 e 3474 cm^{-1} . A região entre 750-900 cm^{-1} corresponde à região anomérica característica da configuração dos sacarídeos. As bandas encontradas em 904-1153 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento do grupo C-O e C-C , enquanto as que são identificados na região de 1474-1199 cm^{-1} podem ser atribuídas aos modos de flexão dos grupos O-C-H , C-C-H e C-O-H . A banda localizada em aproximadamente 918 cm^{-1} é característica da ligação C-H dos carboidratos, e em 1043 e 1254 cm^{-1} , do estiramento O-H no grupo C-OH , bem como o estiramento C-C na estrutura dos carboidratos. Em 1110 cm^{-1} localiza-se a banda correspondente ao estiramento da banda C-O da ligação C-O-C e 1321 cm^{-1} tem-se a flexão da ligação O-H do grupo C-OH . Em 1411 cm^{-1} é possível observar a região de absorção da combinação da ligação O-H do grupo C-OH e da ligação C-H dos alcenos. A banda na região entre 1500-1200 cm^{-1} pode ser resultado da deformação da ligação $-\text{CH}_2$ e da deformação angular de C-C-H e H-C-O (Anjos *et al.*, 2014; Sivakesava e Irudayaraj, 2001a, 2001b; Tewari e Irudayaraj, 2004).

De acordo com Velázquez *et al.* (2009) e Anjos *et al.* (2015), a região do espectro entre 750-1500 cm^{-1} corresponde à região de absorção mais sensível da maioria dos monossacarídeos presentes no mel, como a frutose e a glicose, e dissacarídeos como a sacarose.

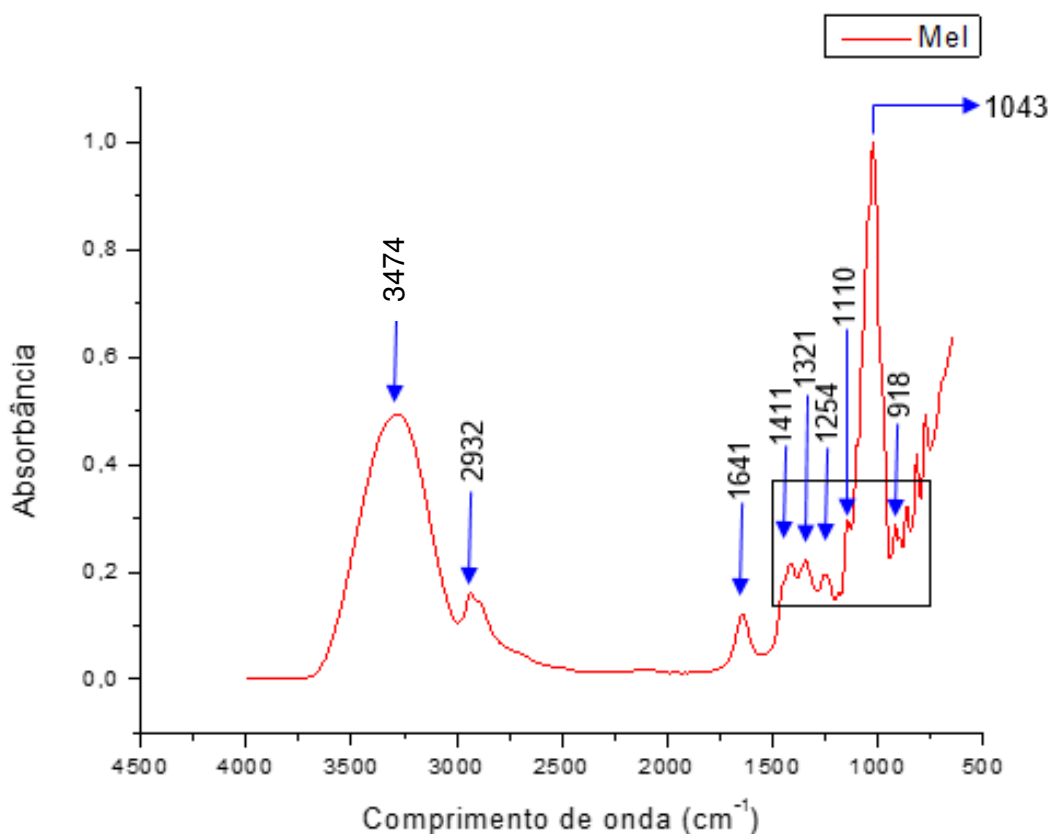


Figura 16 - Espectro de FTIR do Mel com suas bandas de absorção características.

A Tabela 2 apresenta um resumo das vibrações correspondentes aos principais grupos químicos identificados no espectro do mel.

Tabela 2 - Vibrações relacionadas aos principais grupos químicos do espectro do Mel.

Posição (cm^{-1})	Vibração
3474	Estiramento de OH
2932	Estiramento da ligação C–H dos ácidos carboxílicos e banda de estiramento do NH_3 de aminoácidos livres
1641	Deformação de OH
1411	Combinação da ligação O–H do grupo C–OH e da ligação C–H dos alcenos
1321	Ligação O–H do grupo C–OH

1254 e 1043	Estiramento C–O no grupo C–OH, bem como o estiramento C–C na estrutura do carboidrato
1110	Estiramento da banda C–O da ligação C–O–C
918	Ligação C–H dos carboidratos

A Figura 17 apresenta o espectro de infravermelho para a amostra de PCL/Mel 5% e, a partir de sua análise é possível verificar a presença das mesmas vibrações características apresentadas nos espectros de PCL e mel, separadamente, porém, com leves aumentos em suas intensidades, indicando que houve apenas o aumento quantitativo dos grupos químicos presentes.

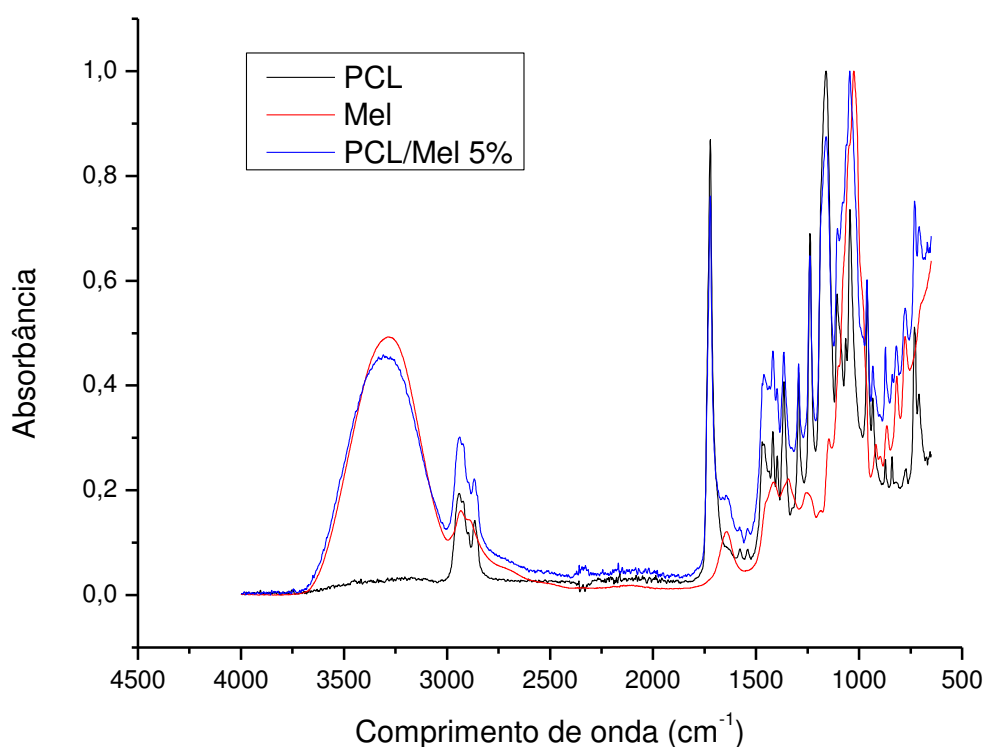


Figura 17 - Espectro de FTIR para a amostra de PCL/Mel 5%.

4.3 Termogravimetria (TG)

A Termogravimetria tem se mostrado a técnica adequada para investigar a estabilidade térmica dos sistemas poliméricos, pois permite que se tenha o conhecimento da degradação e o modo de decomposição do material sob a influência

do calor (Mano *et al.*, 2003). As Figuras 18 (a) e (b) mostram as curvas obtidas através da TG das amostras de PCL e Mel.

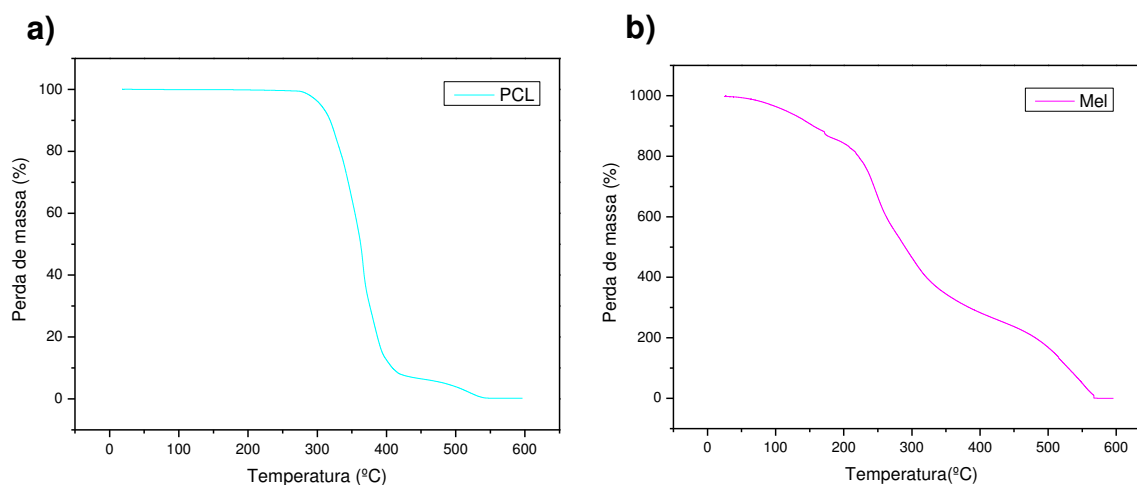


Figura 18 - Curvas TG para as amostras de PCL (a) e Mel (b).

A partir do resultado obtido por TG para o PCL (Figura 18a), é possível verificar uma única etapa de decomposição que se estende de 250 °C a 450 °C, com perda de massa total acima de 93% e máximo em aproximadamente 360 °C. Esse evento é caracterizado pela degradação térmica do PCL. Estes resultados corroboram com os que foram encontrados por Elzubair *et al.* (2006).

Para a curva TG do mel (Figura 18b), é possível observar uma série de eventos consecutivos que podem ser divididos em quatro etapas: a primeira etapa de decomposição apresentou uma perda de massa de 15%, que vai da temperatura ambiente até cerca de 200 °C, com máximo em aproximadamente 160 °C, e está relacionada à eliminação da umidade e dos materiais voláteis presentes no mel; a segunda etapa ocorre entre 200 e 300 °C, com máximo em 250 °C e perda de massa de aproximadamente 38%; a terceira etapa acontece entre 300 e 450 °C com perda de massa de 22% e com um pico máximo em 420 °C; a quarta e última etapa apresenta 23% de perda de massa com um evento que vai de aproximadamente 450 à 600 °C e máxima temperatura em 520 °C. As etapas de decomposição que ocorrem entre 200 e 600 °C podem ser relacionadas à degradação térmica dos açúcares presentes no mel, como a glicose, frutose e sacarose, à carbonização e à oxidação da matéria orgânica, sendo o produto final, estável a 600 °C considerado como teor de cinzas.

A Figura 19 apresenta os resultados de TG obtidos para as estruturas de PCL/Mel 5%.

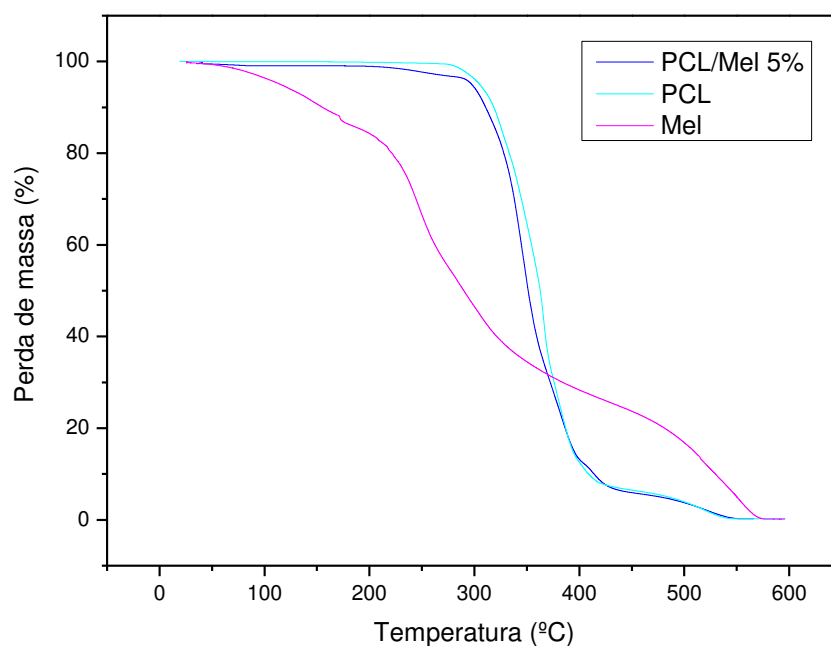


Figura 19 - Curva TG para as estruturas de PCL/Mel 5%.

A partir dos resultados obtidos pelas curvas TG das estruturas de PCL/Mel 5%, é possível observar três eventos consecutivos: o primeiro com perda de massa de aproximadamente 70% entre a temperatura ambiente e 360 °C, com máximo em 348 °C; o segundo evento ocorre entre 360 e 410 °C com perda de 18% de massa e temperatura máxima em 400 °C; e o terceiro evento, ocorre entre 410 e 600 °C com 12% de perda de massa e com máximo em aproximadamente 500 °C.

Com a análise destas curvas, é possível observar nos resultados do biocompósito PCL/Mel 5% que a presença do mel provocou um pequeno deslocamento na curva dos eventos térmicos do PCL, que indica uma diminuição da estabilidade térmica do polímero, uma vez que as temperaturas de degradação tornaram-se menores em comparação ao polímero puro. Apesar dessa diminuição na temperatura, a presença do mel não causou mudanças significativas nas propriedades térmicas do PCL, pois, como mostrado nos resultados de FTIR, não houve ligação química entre os componentes, e isto pode ser atribuído à baixa concentração de mel na matriz polimérica.

4.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O DSC é uma análise em que se acompanha a variação da energia entre a amostra e a referência, mantendo-se a temperatura de ambas igual (Lili, 2007). A Figura 20 (a) e (b) ilustram os resultados de DSC para o PCL e o mel, respectivamente.

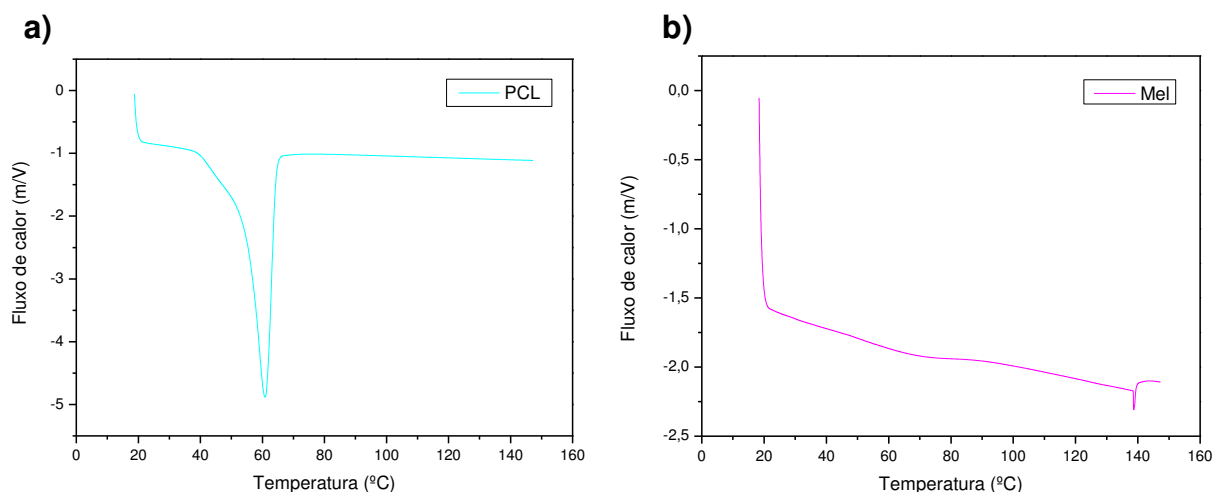


Figura 20 - Curvas DSC para o PCL (a) e para o mel (b).

A partir dos resultados obtidos para o PCL (Figura 20a), foi possível verificar a presença de um pico endotérmico em 60,83 °C, caracterizado pela temperatura de fusão cristalina do polímero. Senedese (2011) e Domingos (2012) estudaram as propriedades térmicas do PCL a partir da análise por DSC e seus resultados corroboram com os que são apresentados neste trabalho.

A Figura 20b apresenta uma curva típica para uma amostra de mel, onde pode-se observar duas transições na sua curva: a primeira trata-se de um fenômeno endotérmico relativamente fraco entre 20 e 80 °C, que pode ser atribuído à eliminação da umidade da amostra; a segunda transição refere-se a um pico endotérmico mais intenso, com máximo em 138,68 °C, referente à temperatura de fusão cristalina dos açúcares do mel. Cordella *et al.* (2002) e Cordella *et al.* (2003) estudaram o comportamento térmico para diferentes tipos de méis e apresentaram resultados semelhantes.

A curva DSC apresentada na Figura 21 ilustra o comportamento térmico de estruturas de PCL com 5% de mel. Pode-se verificar que houve um pequeno deslocamento no pico endotérmico de fusão cristalina do polímero, com máximo em 63 °C, que pode ser atribuído à presença do mel na matriz polimérica.

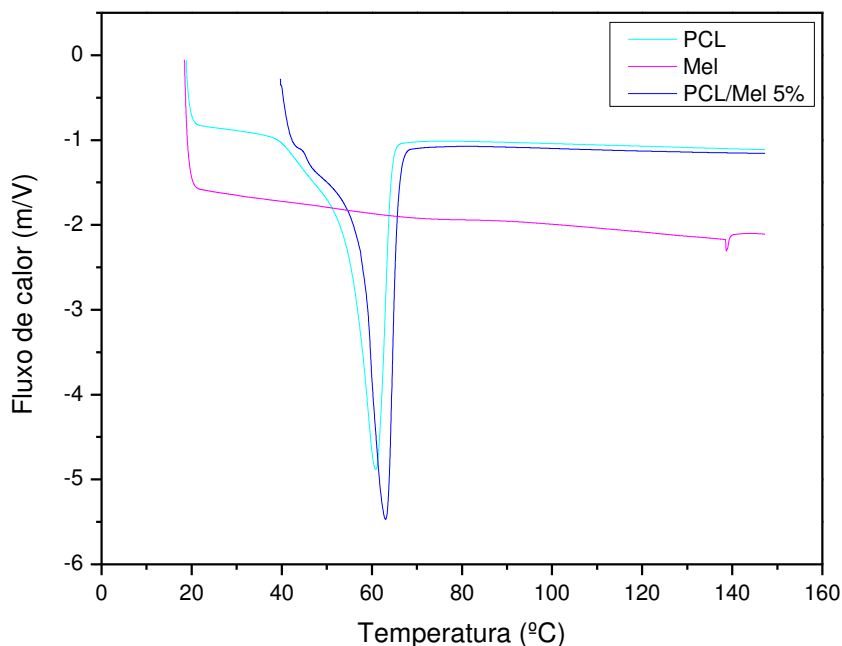


Figura 21 - Curvas DSC para o PCL, Mel e PCL/Mel 5%.

4.5 Porosidade

A porosidade das estruturas foi avaliada a partir da Equação 1, pesando-as e em seguida calculando o volume de cada amostra. Após essa etapa, a densidade aparente das estruturas foi calculada e o resultado aplicado na Equação 2, para se obter a porosidade total das estruturas. As Tabelas 3 e 4 apresentam os resultados obtidos a partir do método geométrico e são referentes à porosidade das estruturas de PCL Puro e PCL/Mel 5%, respectivamente.

Tabela 3: Porosidade das estruturas de PCL Puro.

	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Altura (mm)	Massa (g)	Porosidade (%)
Amostra 1	30,65	30,44	3,45	1,7912	51
Amostra 2	30,42	30,38	3,41	1,5965	56
Amostra 3	30,50	30,38	3,45	1,6893	54
Média	30,52	30,4	3,44	1,6923	54

Tabela 4: Porosidade das estruturas de PCL/Mel 5%.

	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Altura (mm)	Massa (g)	Porosidade (%)
Amostra 1	30,53	30,46	3,56	1,7565	53
Amostra 2	30,64	30,72	3,61	1,7922	54
Amostra 3	30,62	30,57	3,73	1,7823	55
Média	30,59	30,58	3,63	1,7777	54

A partir dos resultados apresentados é possível verificar que ambas as estruturas apresentaram uma porosidade média de 54%.

Com o auxílio do programa ImageJ, identificou-se as porcentagens de tamanhos de poros em relação à sua distribuição de tamanhos a partir das imagens por MEV (n=40). De acordo com a Figura 22, verifica-se que as estruturas de PCL puro apresentaram 5 faixas de distribuição de poros, com tamanhos variando de aproximadamente 150 a >300 μ m, sendo a faixa de 250-300 μ m com a maior quantidade de poros, aproximadamente 39% deles apresentaram diâmetros nessa faixa, seguida da faixa >300 μ m, com cerca de 28% dos poros. Já para a amostra de PCL/Mel 5%, foi possível verificar uma menor quantidade de faixas de distribuição de poros, variando de 200 a >300 μ m, sendo que 50% deles encontram-se na faixa entre 250-300 μ m, como acontece para a amostra de PCL puro.

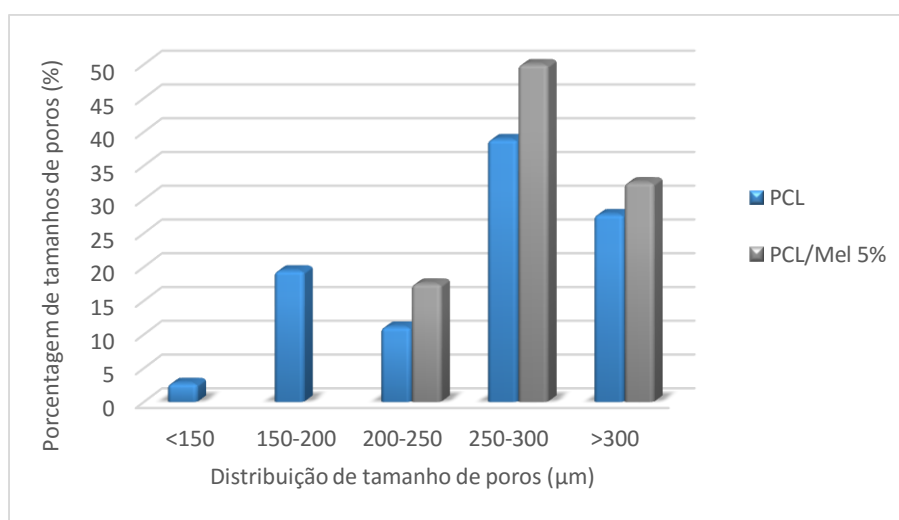


Figura 22: Histograma de distribuição de poros em função da distribuição de tamanhos de poros obtidos por MEV para as estruturas de PCL puro e PCL/Mel 5%.

Oh *et al.*, (2007) desenvolveram estruturas tridimensionais de PCL para avaliar a influência do tamanho dos poros nas interações celulares utilizando vários tipos de células, como condrócitos, osteoblastos e fibroblastos e, a partir dos seus resultados, foi possível verificar que as estruturas com tamanho de poro entre 290-310 μ m apresentaram uma nova formação óssea mais rápida que as estruturas com outros tamanhos de poros. Zein *et al.* (2002) utilizaram a modelagem de deposição por fusão para produzir estruturas tridimensionais de policaprolactona e avaliaram o efeito da porosidade obtida e sua relação com as propriedades mecânicas por compressão baseando-se nesses parâmetros. Os resultados obtidos mostraram estruturas com poros geométricos regulares, com tamanhos variando entre 160-700 μ m, filamentos com diâmetros entre 260-370 μ m e porosidade entre 48-77% e resistência à compressão variando de 4 a 77Mpa, comprovando a relação existente entre as propriedades compressivas e a porosidade.

4.6 Ensaio Mecânico de Compressão

Fornecer um suporte mecânico adequado consiste em um dos principais requisitos que um scaffold necessita para ser aplicado na engenharia de tecidos. Se a estrutura produzida não oferecer uma resistência compatível aos tecidos duros ou moles do corpo humano, então qualquer tecido em desenvolvimento provavelmente falhará devido à deformação excessiva a que estará submetido. Assim, inovações nas técnicas de processamento do material têm promovido melhorias no desempenho mecânico das estruturas produzidas (Hollister, 2005).

Os ensaios mecânicos de compressão realizados neste trabalho, tiveram o intuito de apresentar as curvas tensão-deformação das amostras analisadas e, a partir delas, calcular o Módulo de Young (E).

As amostras de PCL puro e PCL/Mel 5% foram ensaiadas observando-se a deformação máxima, tensão máxima (limite máximo de resistência à compressão) e o módulo de elasticidade, que pode ser observado entre 10 e 20% de deformação, pois sua região elástica pode ser visualizada em valores baixos de deformação.

A Figura 23 ilustra a curva tensão-deformação para as amostras de PCL puro.

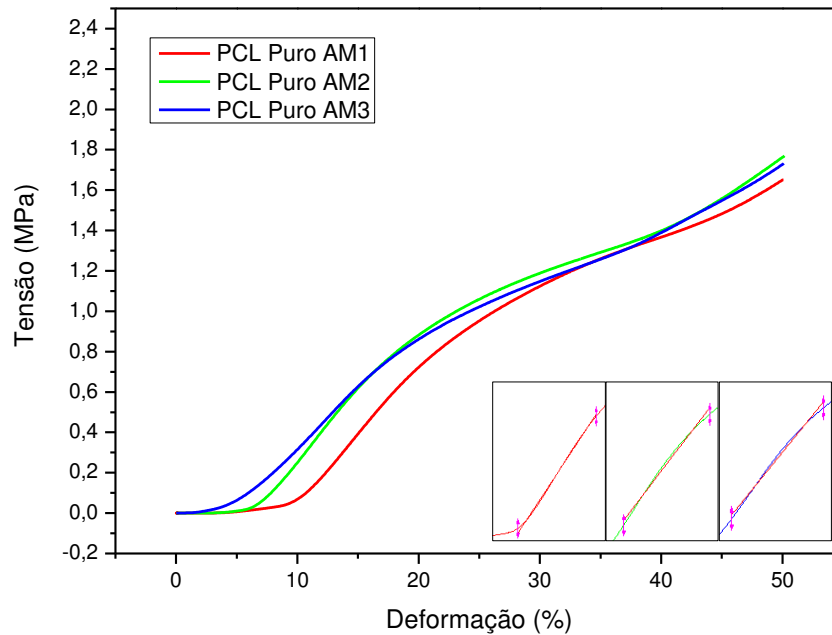


Figura 23: Curva tensão-deformação para as amostras de PCL Puro.

As curvas obtidas para as amostras de PCL puro apresentaram o comportamento esperado para materiais porosos sob compressão. Cada curva apresentou três regimes distintos, sendo o primeiro um regime linear elástico até aproximadamente 10% de deformação, que ocorre provavelmente em consequência da compactação dos poros, seguido por um platô com deformação constante, resultando, por fim, em um regime final com tensão crescente. Este comportamento da curva recebe o nome de densificação, caracterizado por uma maior resistência à tensão devido ao fato de as paredes dos poros tocarem umas nas outras. No caso das estruturas analisadas, o alto grau de alinhamento dos filamentos permitiu uma maior resistência mecânica à compressão, com valores médios do módulo de Young atingindo 0,0628 MPa. Resultados semelhantes foram obtidos por Zein *et al.* (2002) e Fideles (2014).

Para as amostras de PCL/Mel 5%, as curvas obtidas estão ilustradas na Figura 24 e apresentaram um comportamento semelhante ao que já foi exposto, porém variando entre si.

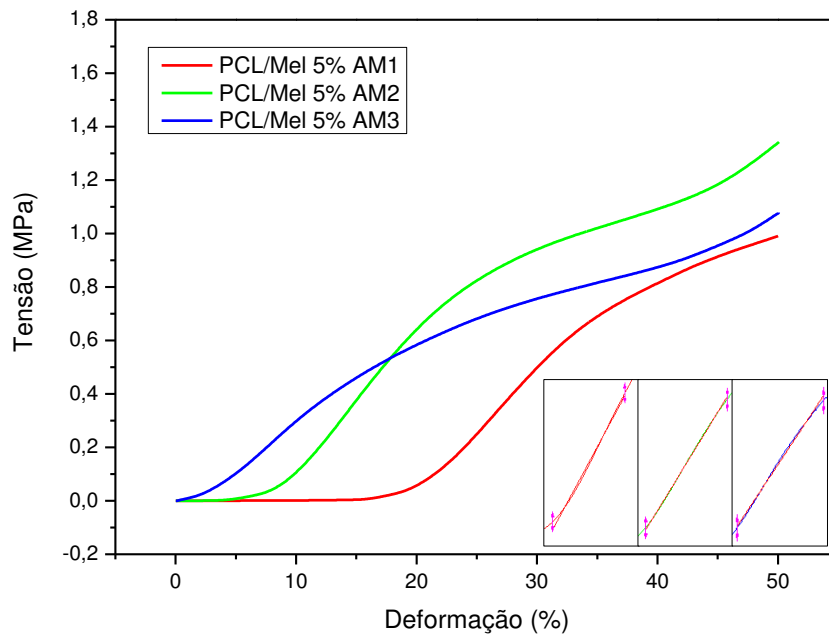


Figura 24: Curva tensão-deformação para as amostras de PCL/Mel 5%.

O comportamento apresentado pela curva tensão-deformação para as amostras de PCL/Mel 5% pode estar diretamente relacionado à presença do mel na matriz polimérica, agindo assim como um lubrificante, que afasta as cadeias poliméricas, diminuindo suas forças de ligação e, conseqüentemente suas propriedades mecânicas. Os valores do módulo de Young (E) para as amostras de PCL puro e PCL/Mel 5% são apresentados na Tabela 5, onde é possível verificar uma leve redução nos valores médios de E .

Tabela 5: Módulo de Young (E) para as amostras de PCL puro.

Módulo de Young (MPa)		
Amostra 1	0,0686	0,0460
Amostra 2	0,0642	0,0552
Amostra 3	0,0556	0,0368
Média	0,0628	0,046

Além do tipo de material, uma série de fatores influenciam as propriedades mecânicas de uma estrutura porosa, bem como sua porosidade, tamanho e distribuição de poros e interconectividade ao longo da estrutura. Assim, relacionando

os resultados obtidos para a resistência mecânica, porosidade e tamanho de poros das amostras estudadas, pode-se sugerir que este tipo de estrutura pode favorecer o crescimento tecidual de qualquer região que necessite de um suporte mecânico por um período maior de tempo, uma vez que a Policaprolactona apresenta uma taxa de degradação mais lenta quando comparada a outros polímeros biodegradáveis (FIDELES, 2014).

4.7 Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado a fim de se avaliar a viabilidade das células do tipo fibroblastos L929 na presença das estruturas de PCL e PCL/Mel, e está representado na Figura 25. As células em meio de cultura (RPMI-16400) foram utilizadas como controle e são equivalentes a 100% de viabilidade.

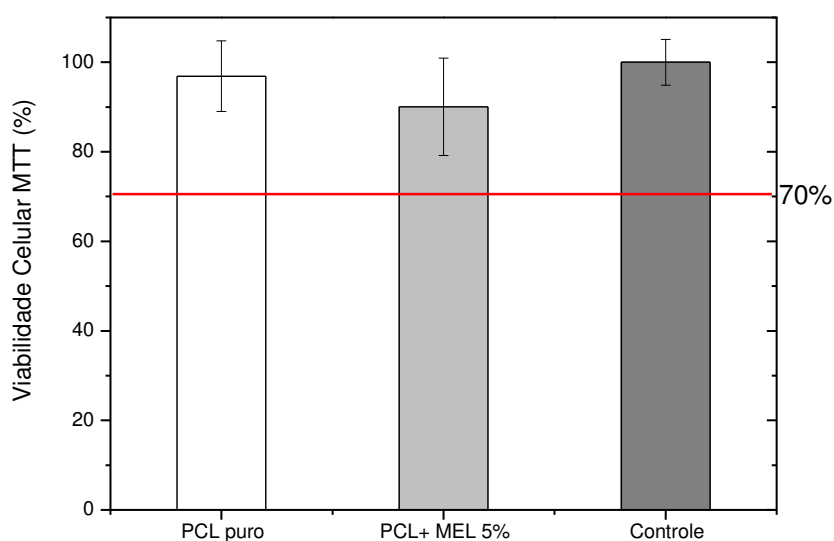


Figura 25 - Viabilidade celular dos scaffolds de PCL puro e PCL/Mel 5%

A viabilidade celular das estruturas de PCL e PCL/Mel 5% foi avaliada utilizando o método da redução do MTT. A partir dos resultados obtidos, é possível verificar que tanto as estruturas de PCL puro quanto as de PCL/Mel 5% apresentaram viabilidade celular acima de 90%, caracterizando-os como não citotóxicos, de acordo com a norma em que foi baseado o ensaio (ISO 10993-5), onde um material é considerado não citotóxico quando apresenta valores de viabilidade acima de 70% quando em

contato com as células. Com isso, essas estruturas apresentam viabilidade celular para ser utilizada como biomaterial.

4.8 Adesão Celular

Os ensaios de adesão celular foram realizados a fim de verificar a capacidade das estruturas em promover a adesão e possível proliferação celular no período inicial de 7 dias, com o objetivo de obter respostas que pudessem comprovar a eficácia do material escolhido na engenharia de tecidos. Porém, com base nas micrografias obtidas por MEV (Figura 26), pode-se verificar que não foi possível observar qualquer sinal de prolongamento celular, que são características evidentes do seu desenvolvimento.

As imagens por MEV apresentam apenas regiões de interconectividade entre os filamentos da estrutura, região que seria favorável para a adesão, considerando a superfície pouco porosa dos filamentos da estrutura. Tais respostas podem estar relacionadas ao fato de as amostras não terem ficado totalmente recobertas por células, devido ao seu diâmetro muito menor que o diâmetro do poço. Dessa forma, as amostras entraram em contato com o meio de cultura apenas em uma superfície e, em alguns casos, flutuando no meio, desfavorecendo assim a adesão celular.

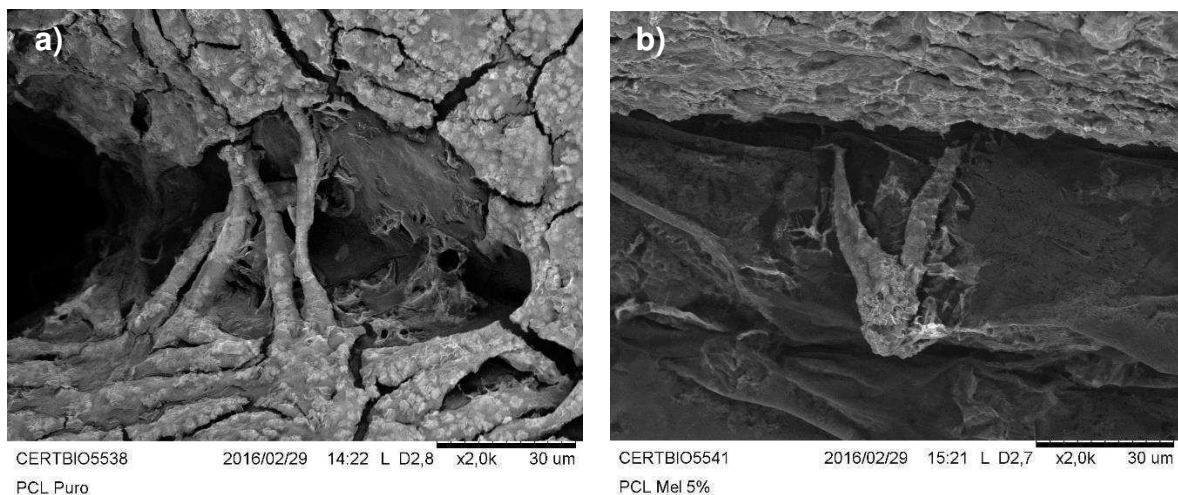


Figura 26: Micrografias por MEV das estruturas de PCL puro (a) e PCL/Mel 5% (b) com aumento de 2000x.

5 CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo principal produzir estruturas tridimensionais porosas de PCL e PCL/Mel a partir do sistema Bioextruder. Assim, pode-se concluir que as estruturas tridimensionais de PCL e PCL/Mel foram produzidas com êxito a partir do sistema Bioextruder, mostrando ser um método de fabricação reprodutível. A presença do mel na matriz polimérica não provocou alterações significativas no comportamento térmico ou químico, quando comparadas às estruturas de PCL puro.

Devido ao aspecto superficial que as estruturas PCL/Mel 5% apresentaram, esta composição foi definida como padrão para as demais análises, por ter mostrado uma superfície mais homogênea e regular, com pouca ou nenhuma migração do mel para a superfície das estruturas. Os resultados obtidos a partir do ensaio mecânico de compressão mostraram curvas tensão-deformação com um comportamento típico para estruturas porosas sob deformação constante e com resultados que indicam uma possível aplicação para regeneração óssea.

Assim, os materiais produzidos apresentaram-se aptos a serem aplicados como biomateriais, de acordo com a ISO 10993-5, pois apresentou viabilidade celular acima do valor de 70% estabelecido pela norma.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante do exposto neste trabalho e sempre em busca da melhoria dos resultados obtidos, para melhor aplicar as estruturas, sugere-se as seguintes ideias:

- Estudo mais aprofundado das propriedades químicas e térmicas, tanto do PCL quanto do mel;
- Utilizar um mel de grau médico;
- Definir uma aplicação mais específica quanto ao local que a estrutura poderia ser aplicada;
- Variar os parâmetros de processamento para obtenção de estruturas, a fim de se avaliar a influência desses parâmetros na morfologia e nas propriedades mecânicas das estruturas;
- Realizar ensaios de degradação *in vitro* e outros ensaios biológicos para verificar a eficácia dos materiais escolhidos para serem utilizados na engenharia de tecidos.

REFERÊNCIAS

ANJOS, O.; CAMPOS, M. G.; RUIZ, P. C.; ANTUNES, P.; Application of FTIR-ATR spectroscopy to the quantification of sugar in honey. **Food chemistry**, v. 169, p. 218-223, 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS. Registro Brasileiro de Transplantes. São Paulo: Lado a Lado – Serviços de Comunicação Ltda, 2015.

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.

CAMARGO, R. C. R.; PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R.; WOLFF, L. F. Mel: Características e Propriedades. Embrapa Meio-Norte, Teresina- Brasil. 2006.

CHEN, F. M.; LIU, X. Advanced biomaterials of human origin for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, 2015.

CHEUNG, H. Y.; LAU, K. T.; LU, T. P.; HUI, D. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. **Composites Part B: Engineering**, v. 38, n. 3, p. 291-300, 2007.

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

COOPER, R. Medizinischer Honig in der Wundbehandlung: antibakterielle MS Krankenhhyg Interdiszip. n.2, v.2. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2831240/> Acesso em: Fevereiro 2014.

CORDELLA, C.; ANTINELLI, J. F.; AURIERES, C.; FAUCON, J. P.; CABROL-BASS, D.; SBIRRAZZUOLI, N. Use of differential scanning calorimetry (DSC) as a new technique for detection of adulteration in honeys. 1. Study of adulteration effect on honey thermal behavior. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 1, p. 203-208, 2002.

CORDELLA, C.; FAUCON, J. P.; CABROL-BASS, D.; SBIRRAZZUOLI, N. Application of DSC as a tool for honey floral species characterization and adulteration detection. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 71, n. 1, p. 279-290, 2003.

CORDEN, T. J.; JONES, I. A.; RUDD, C. D.; CHRISTIAN, P.; DOWNES, S.; McDOUGALL, K. E. Physical and biocompatibility properties of poly- ϵ -caprolactone produced using in situ polymerisation: a novel manufacturing technique for long-fibre composite materials. **Biomaterials**, v. 21, n. 7, p. 713-724, 2000.

COUQUET, Y.; DESMOULIÈRE, A.; RIGAL, M. L. Les propriétés antibactériennes et cicatrisantes du miel. **Actualités pharmaceutiques**, n. 531, p. 22-25. 2013.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

DOMINGOS, M.; DINUCCI, D.; COMETA, S.; ALDERIGHI, M.; BÁRTOLO, P. J.; CHIELLINI, F. Polycaprolactone scaffolds fabricated via bioextrusion for tissue engineering applications. **International journal of biomaterials**, 2009.

DOMINGOS, M. **Caracterização Mecânica e Biológica de Scaffolds produzidos por BioCell Printing**. Tese (Doutorado) em Caracterização de Processos de Fabricação, Universidade de Girona. Girona, Espanha 2012.

ELOMAA, L.; TEIXEIRA, S.; HAKALA, R.; KORHONEN, H.; GRIJPMA, D. W.; SEPPÄLÄ, J. V. Preparation of poly (ϵ -caprolactone)-based tissue engineering scaffolds by stereolithography. **Acta biomaterialia**, v. 7, n. 11, p. 3850-3856, 2011.

ELZEIN, T.; EDDINE, M. N.; 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.

ELZUBAIR, A.; ELIAS, C. N.; SUAREZ, J. C. M.; LOPES, H. P.; VIEIRA, M. V. B. The physical characterization of a thermoplastic polymer for endodontic obturation. **Journal of dentistry**, v. 34, n. 10, p. 784-789, 2006.

ESCRICHE, I.; KADAR, M.; BORRÁS, M. J.; DOMENECH, E. Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment. **Food Chemistry**, v. 142, p. 135-143. 2014.

FIDELES, T. B.; **Desenvolvimento de scaffolds de quitosana para aplicação na Engenharia de Tecidos**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia. Campina Grande, 2014.

GETHIN, G. T.; COWMAN, S.; CONROY, Ronan M. The impact of Manuka honey dressings on the surface pH of chronic wounds. **International Wound Journal**, v. 5, n. 2, p. 185-194, 2008.

GIANNITELLI, S. M.; ACCOTO, D.; TROMBETTA, M.; RAINER, A. Current trends in the design of scaffolds for computer-aided tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 2, p. 580–594. 2014.

GRIFFITH, L. G. Polymeric Biomaterials. **Acta materialia**, v. 48, p. 263-277. 2000.
ANJOS, O. et al. Application of ftir-atr spectroscopy to the quantification of sugar in honey. **Food Chemistry**, v. 169, p. 218–223, 2014.

GUMBINER, B. M. Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 345–357, 1996.

HABIB, H. M. ; MEQBALI, FATIMA, T. AL ; KAMAL, H.; USAMA, D. S.; WISSAM, H. I. Physicochemical and biochemical properties of honeys from arid regions. **Food Chemistry**, v. 153, p.35–43, 2014.

HAYASHI, T. Biodegradable polymers for biomedical uses. **Progress in Polymer Science**. Vol 19, 663–702, 1994.

HOLLISTER, S. J. Porous scaffold design for tissue engineering. **Nature materials**, v. 4, n. 7, p. 518–24, 2005.

HOU, Q.; GRIJPMAN, D. W.; FEIJEN, J. Porous polymeric structures for tissue engineering prepared by a coagulation, compression moulding and salt leaching technique. **Biomaterials**, v. 24, n. 11, p. 1937-1947, 2003.

HUTMACHER, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials**, v. 21, p. 2529-2543. 2000.

HUTMACHER, D. W.; SCHANTZ, T.; ZEIN, I.; NG, K. W.; TEOH, S. H.; TAN, K. C. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 55, n. 2, p. 203-216, 2001.

HUTMACHER, D. W.; SITTINGER, M.; RISBUD, M. V. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. **TRENDS in Biotechnology**, v. 22, n. 7, p. 354-362, 2004.

JACOBY, M. Custom-made biomaterials. **Science & Technology**, v. 79, n. 6, p. 30-35, 2001.

LABET, M.; THIELEMANS, W. Synthesis of polycaprolactone: a review. **Chemical Society Reviews**, vol. 38, p. 3484-3504, 2009.

LAKSHMI, S. N.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, vol. 32, p. 762-798. 2007.

LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. P. (Ed.). **Principles of tissue engineering**. Academic press, 2011.

LILI, Z. **Síntese e Caracterização do copolímero tribloco anfífilo biodegradável Poli(L, L-Lactídeo-Stat- ϵ -Caprolactona)-Bloco-Poli (Óxido de Etileno)-Bloco-Poli (L, L-Lactídeo-Stat- ϵ -Caprolactona)**. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

LIU, C; XIA, Z.; CZERNUSZKA, J. T. Design and Development of Three Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 85, n. 7, p. 1051-1064, 2007.

MA, P. X. Scaffolds for tissue fabrication. **Materials Today**, v. 7, n. 5, p. 30-40, 2004.

MALEKI, H.; GHAREHAGHAJI, A. A.; DIJKSTRA, P. J. A novel honey-based nanofibrous scaffold for wound dressing application. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 127, n. 5, p. 4086-4092, 2013.

MALHEIRO, V. N.; CARIDADE, S. G.; ALVES, N. M.; MANO, J. F. New poly (ϵ -caprolactone)/chitosan blend fibers for tissue engineering applications. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 2, p. 418-428, 2010.

MANO, J. F.; KONIAROVA, D.; REIS, R. L. Thermal properties of thermoplastic starch/synthetic polymer blends with potential biomedical applicability. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 14, n. 2, p. 127-135, 2003.

MELCHELS, F. P. W.; DOMINGOS, M. A. N.; KLEIN, T. J.; MALDA, J.; BARTOLO, P. J.; HUTMACHER, D. W. Additive manufacturing of tissues and organs. **Progress in Polymer Science**, v. 37, p. 1079-1104. 2012.

MINUTH, W. W.; SITTINGER, M.; KLOTH, S. Tissue engineering: generation of differentiated artificial tissues for biomedical applications. **Cell and tissue research**, v. 291, n. 1, p. 1-11, 1997.

MOTA, C. M. D. **Sistema de Bioextrusão para a Engenharia de Tecidos**. 2008. 124f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica). Departamento de Engenharia Mecânica, Instituto Politécnico de Leiria. Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.

NAIR, L. S.; LAURENCIN C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**. V. 32, p. 762-798. 2007.

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

OH, S. H.; PARK, I. K.; KIM, J. M.; LEE, J. H. In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. **Biomaterials**, v. 28, n. 9, p. 1664-1671, 2007.

PATRICIO, T.; DOMINGOS, M.; GLORIA, A.; BARTOLO, P. Characterisation of PCL and PCL/PLA *scaffolds* for tissue engineering. **Procedia CIRP**, v. 5, p. 110-114. 2013.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, Á. S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

ROKKANEN, P. U.; BÖSTMAN, O.; HIRVENSALO, E.; MÄKELÄ, E. A.; PARTIO, E. K.; PÄTIÄLÄ, H.; VAINIONPÄÄ, S.; VIHTONEN, K.; TÖRMÄLÄ, P. Bioabsorbable fixation in orthopaedic surgery and traumatology. **Biomaterials**, v. 21, n. 24, p. 2607-2613, 2000.

SAMPAIO, G. Y. H. **Desenvolvimento de arcabouços biodegradáveis para regeneração de tecidos cartilagosos**. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, Campina Grande, 2012.

SENEDESE, A. L. C. **Estruturação tridimensional de scaffolds de policaprolactona via manufatura aditiva**. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas, 2011.

- SIVAKESAVA, S.; IRUDAYARAJ, J. Detection of inverted beet sugar adulteration of honey by FTIR spectroscopy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. January, p. 683–690, 2001a.
- SIVAKESAVA, S.; IRUDAYARAJ, J. A rapid spectroscopic technique for determining honey adulteration with corn syrup. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 6, p. 787–792, 2001b.
- SOUSA, I.; MENDES, A.; BÁRTOLO, P. J. PCL scaffolds with collagen bioactivator for applications in tissue engineering. **Procedia Engineering**, v. 59, p. 279–284, 2013.
- SOUZA, A. K. R.; LIMA, D. M. V.; OLIVEIRA, S. L. A. Técnica FTIR e suas aplicações em amostras orgânicas. **Anais do Encontro de Iniciação Científica – ENIC**, n. 6, 2015.
- TABATA, Y. Significance of release technology in tissue engineering. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 23/24, p. 1639-1646, 2005.
- TEWARI, J.; IRUDAYARAJ, J. Quantification of saccharides in multiple floral honeys using fourier transform infrared microattenuated total reflectance spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3237–3243, 2004.
- VELÁZQUEZ, T. G.; REVILLA, G. O.; LOA, M. Z.; ESPINOZA, Y. R. Application of FTIR-HATR spectroscopy and multivariate analysis to the quantification of adulterants in Mexican honeys. **Food Research International**, v. 42, n. 3, p. 313-318, 2009.
- WILLIAMS, D. Benefit and risk in tissue engineering. **Materials Today**, v. 7, n. 5, p. 24–29, 2004.
- WILLIAMS, J. M.; ADEWUNMI, A.; SCHEK, R. M.; FLANAGAN, C. L.; KREBSBACH, P. H.; FEINBERG, 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.
- WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer – Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, p. 1217-1256, 2010.
- WU, C. S. A comparison of the structure, thermal properties, and biodegradability of polycaprolactone/chitosan and acrylic acid grafted polycaprolactone/chitosan. **Polymer**, v. 46, n. 1, p. 147-155, 2005.
- YOSHIMOTO, H.; SHIN, Y. M. TERAJ, H.; VACANTI, J. P. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, n. 12, p. 2077-2082, 2003.

ZEIN, I.; HUTMACHER, D. W.; TAN, K. C.; TEOH, S. H. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 23, n. 4, p. 1169–1185, 2002.