



# CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO  
Escola Superior de Biotecnologia

FABRICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SCAFFOLDS COMPÓSITOS DE  
POLÍMERO-HIDROXIAPATITE E POLÍMERO-VIDRO PARA  
ENGENHARIA DE TECIDOS

por

Dulce Sofia Cardoso Tavares

Janeiro, 2014





CATÓLICA  
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO  
Escola Superior de Biotecnologia

FABRICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SCAFFOLDS COMPÓSITOS DE  
POLÍMERO-HIDROXIAPATITE E POLÍMERO-VIDRO PARA ENGENHARIA DE  
TECIDOS

Fabrication and characterization of polymer-hydroxyapatite and polymer-glass  
composite *scaffolds* for tissue engineering

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica  
Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

por

Dulce Sofia Cardoso Tavares

Local: [Universidade de Aveiro]

Orientação: [Prof. Dra. Maria Helena Figueira Vaz Fernandes]

Janeiro, 2014



## Resumo

A engenharia de tecidos tem adoptado diferentes estratégias de melhoria, tendo como objectivo a procura de soluções que permitam mimetizar cada vez melhor as condições *ex-vivo*, de regeneração de tecidos. Uma das mais recentes estratégias consiste no desenvolvimento de estruturas porosas tridimensionais, que servem como suportes temporários para a colocação de células, permitindo a sua adesão, proliferação e produção de matriz extracelular, que conduzirá à formação de novo tecido.

Neste trabalho foram preparados dois tipos de *scaffolds* compósitos com possíveis aplicações em engenharia de tecidos. Num dos *scaffolds* foi utilizado ácido poli (L-láctico) (PLLA) como matriz e hidroxiapatite (HAp) como enchimento inorgânico e noutro, ácido poli (L-láctico) como matriz e um vidro bioactivo (T14P43) como enchimento inorgânico. A escolha do PLLA deve-se ao facto de ser um polímero sintético biodegradável, biocompatível e piezoelectrico, sendo esta última característica, também identificada no tecido ósseo. A escolha das fases de enchimento, hidroxiapatite ou vidro bioactivo, deve-se ao facto da hidroxiapatite ser um material com capacidade de osteocondução e elevada biocompatibilidade e, no caso do vidro, este possui características bioactivas, adequadas para aplicações em contacto com o tecido ósseo.

O processo utilizado para a fabricação dos *scaffolds* baseou-se na separação de fases termicamente induzida (TIPS) de soluções de 5,5 ou 6,5% (m/m) PLLA/dioxano/água com hidroxiapatite e PLLA/dioxano/água com vidro bioactivo, variando os seguintes parâmetros: teor de hidroxiapatite (0%, 30% e 50% (m/m)) e vidro bioactivo (0% e 30% (m/m)), temperatura de mistura (75 e 80°C), tempo de mistura (15 e 90 minutos) e tempo de separação de fases (10 e 60 minutos).

A morfologia dos *scaffolds* foi avaliada por microscopia electrónica de varrimento (SEM), o potencial bioactivo dos compósitos foi testado com a imersão em fluido fisiológico sintético (SBF: simulated body fluid), por períodos de tempo variados até 24 dias e as propriedades mecânicas foram determinadas através de ensaios de compressão.

Obtiveram-se *scaffolds* com morfologias diferentes conforme o conteúdo de hidroxiapatite, verificando-se uma diminuição do tamanho de poros com a adição de hidroxiapatite. Os *scaffolds* preparados com vidro apresentaram um tamanho de poros maior que os de hidroxiapatite e nenhuns exibiram propriedades bioactivas quando imersos em SBF.

Este comportamento, juntamente com as propriedades mecânicas encontradas sugerem que as estruturas porosas desenvolvidas serão indicadas para aplicações em engenharia de tecidos, em situações preferencialmente ex-vivo, como suportes temporários de células.

## Abstract

Tissue engineering has adopted different strategies, with the aim of finding solutions that allow the improvement of the ex-vivo conditions that mimic the regeneration of tissues. One of the most recent strategies consist in the development of three dimensional porous structures that serve as temporary supports for the seeding of cells, allowing their adhesion, proliferation and extracellular matrix production, leading to the formation of new tissue.

In this work two types of composite scaffolds with potential applications in tissue engineering were prepared the scaffolds. In one of poly (L-lactic acid) (PLLA) was used as matrix and hydroxyapatite (HAp) as inorganic filler and in another poly (L-lactic acid) served as matrix and a bioactive glass (T14P43) as inorganic filler. PLLA was chosen because it is a biodegradable synthetic polymer, biocompatible and piezoelectric, a feature also identified in bone tissue. The choice of the filling phases, a bioactive glass or hydroxyapatite, was due to the fact that hydroxyapatite exhibit osteoconductive capacity and has a high biocompatibility and the bioactive glass has bioactive characteristics appropriate for application in contact with bone tissue.

The process used to manufacture the *scaffold* was based on a thermally induced phase separation technique (TIPS) of solutions of 5,5 or 6,5 % (w/w) PLLA/dioxane/water with hydroxyapatite and PLLA/dioxane/water with bioactive glass, varying the following parameters: content of hydroxyapatite (0%, 30% and 50% (m/m)) and bioactive glass (0% and 30% (m/m)), temperature of mixture (75 and 80°C), time of mixing (15 and 90 minutes) and time for phase separation (10 and 60 minutes).

The morphology of the scaffolds was evaluated by scanning electron microscopy (SEM), the bioactive potential of the composites was tested by immersion in synthetic fluid (SBF: simulated body fluid), for periods to 24 days and the mechanical properties were determined by compression testing.

Scaffolds with different morphology in were obtained depending on the hydroxyapatite, content with pore size decreasing with the addition of hydroxyapatite. Scaffolds prepared with glass as filler presented pore sizes higher than those containing hydroxyapatite.

No bioactive behavior was found in both types of scaffolds when immersed in SBF. This fact, together with the measured mechanical properties suggest that the porous structures developed in this work may have applications in tissue engineering strategies preferably ex-vivo, namely as temporary support for cells.





## **Agradecimentos**

Queria agradecer a várias pessoas que me ajudaram durante este trabalho.

À minha orientadora, Maria Helena Fernandes, pelo apoio prestado e por ter confiado em mim. Ao professor João Paulo Ferreira, por ter incentivado na decisão deste estágio.

Às minhas colegas de laboratório, em particular a Nathalie e a Erika pela força e sábios conselhos e pela constante disponibilidade tanto no trabalho laboratorial como para a discussão deste trabalho.

À engenheira Marta Ferro pela ajuda com a microscopia electrónica de varrimento.

Ao professor José Esteves, da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FE-UP), pelos ensaios mecânicos.

E sobretudo aos meus pais e à minha irmã por me terem apoiado durante todo este percurso, nos bons e nos maus momentos.



## Índice

Resumo	V
Abstrat	VII
Agradecimentos	IX
Índice	XI
Índice de figuras	XIII
Índice de tabelas	XV
1. Introdução	1
1.1. Osso	1
1.1.1. Composição e organização do osso	1
1.1.2. Remodelação e crescimento do osso	3
1.2. Materiais usados para regeneração óssea	4
1.2.1. Materiais cerâmicos: A hidroxiapatite e os vidros bioactivos	4
1.2.2. Materiais poliméricos: O ácido poli-L-láctico (PLLA)	5
1.2.3. Materiais compósitos	6
1.3. Engenharia de tecido ósseo	7
1.3.1. Conceito e estratégia	7
1.3.2. Requisitos para os materiais utilizados em engenharia de tecido ósseo	8
1.4. Técnicas de preparação de estruturas porosas para engenharia de tecidos	9
1.4.1. Evaporação do solvente	9
1.4.2. Electrofiação ou Electrospinning	9
1.4.3. Prototipagem rápida	10
1.4.4. Separação termicamente induzida de fases (TIPS) combinada com liofilização	10
2. Objectivos	13
3. Materiais e métodos	14
3.1. Materiais dos scaffolds	14
3.1.1. PLLA	14
3.1.2. Hidroxiapatite	14
3.1.3. Vidro bioactivo	15
3.2. Preparação dos <i>scaffolds</i> : metodologia	15
3.2.1. Preparação das soluções de PLLA/dioxano/água e das suspensões de	16

PLLA/dioxano/água/HAp e PLLA/dioxano/água/vidro bioactivo	
3.2.2. Separação de fases líquido-líquido termicamente induzida	18
3.2.3. Congelação e liofilização	19
3.3. Caracterização morfológica dos <i>scaffolds</i>	21
3.4. Caracterização do potencial bioactivo	22
3.5. Avaliação das propriedades mecânicas	24
4. Resultados e discussão	25
4.1. Caracterização do polímero	25
4.2. Caracterização das partículas de hidroxiapatite	25
4.3. Caracterização das partículas de vidro bioactivo	27
4.4. Caracterização morfológica dos <i>scaffolds</i>	28
4.5. Potencial bioactivo dos <i>scaffolds</i>	38
4.6. Propriedades mecânicas	42
5. Conclusões gerais	45
6. Trabalho futuro	46
7. Bibliografia	47

## Índice de figuras

Figura 1.1.1.1. Estrutura do osso longo.	2
Figura 1.1.1.2. Composição do osso.	3
Figura 1.1.2.1. Processo de remodelação e crescimento ósseo.	3
Figura 1.2.1.1. Estrutura molecular da hidroxiapatite.	5
Figura 1.2.2.1. Unidade de repetição do ácido poli-L-láctico (PLLA).	6
Figura 1.3.1.1. Estratégia da engenharia de tecidos.	8
Figura 1.4.4.1. Diagrama de fases binário temperatura-composição da solução polimérica.	11
Figura 3.2.1. Esquema do procedimento experimental.	16
Figura 4.1.1. Curva de DSC das partículas de PLLA.	25
Figura 4.2.1. Espectro de difração de raios-X das partículas de hidroxiapatite.	26
Figura 4.2.2. Micrografia por SEM das partículas de hidroxiapatite.	26
Figura 4.2.3. Distribuição granulométrica das partículas de hidroxiapatite.	27
Figura 4.3.1. Espectro de difração de raios-X das partículas de vidro bioactivo.	27
Figura 4.3.2. Micrografia por SEM das partículas de vidro bioactivo.	28
Figura 4.3.3. Distribuição granulométrica das partículas de vidro bioactivo.	28
Figura 4.4.1. Micrografias dos <i>scaffolds</i> obtidos a partir de P2, sob agitação magnética (à temperatura de 80°C), com diferentes teores de hidroxiapatite (0, 30 e 50%), diferentes tempos de mistura (15 e 90 minutos) e um tempo separação de fases de 60 minutos, ampliação: 300x. As figuras inseridas correspondem a uma ampliação de 1.00Kx.	30
Figura 4.4.2. Micrografias dos <i>scaffolds</i> obtidos a partir de P2, sob agitação magnética (à temperatura de 75°C), com diferentes teores de hidroxiapatite (0, 30 e 50%), diferentes tempos de mistura (15 e 90 minutos) e um tempo de separação de fases de 60 minutos, ampliação:300x. As figuras inseridas correspondem a uma ampliação de 1.00Kx.	31
Figura 4.4.3. Micrografias dos <i>scaffolds</i> obtidos a partir de P1, sob agitação magnética (à temperatura de 80°C), com diferentes teores de hidroxiapatite (0, 30 e 50%), diferentes tempos de mistura (15 e 90 minutos) e um tempo de separação de fases de 10 minutos, ampliação: 300x. As figuras inseridas correspondem a uma ampliação de 1.00Kx.	32
Figura 4.4.4. Micrografias dos <i>scaffolds</i> obtidos a partir de P2 com 30% de	34

hidroxiapatite, tempo de mistura de 90 minutos e tempo de separação de fases de 60 minutos, sem e com ultrassons, ampliação: 300x e 1.00Kx.	
Figura 4.4.5. Micrografias dos <i>scaffolds</i> obtidos a partir de P2 com 30% de hidroxiapatite ou vidro bioactivo, tempo de mistura de 90 minutos e tempo de separação de fases de 60 minutos, ampliação: 300x e 1.00Kx.	34
Figura 4.4.6. Formação iao-dipolo.	36
Figura 4.5.1. Micrografias do <i>scaffold</i> de PLLA/HAp e dos <i>scaffolds</i> PLLA/T14P43 com um teor de 30%, após imersão em SBF por 1, 3, 7, 14 e 21 dias.	39
Figura 4.5.2. Difractograma de difracção de raios-X no <i>scaffold</i> P2-90-30HA-US (a) e P2-90-30T14P43-US (b) após imersão em SBF para 1, 3, 7, 14 e 21 dias.	40
Figura 4.5.3. Evolução da concentração iónica em P (a) e Ca (b) no SBF durante o ensaio de bioactividade.	41
Figura 4.6.1. Curva tensão-deformação de um <i>scaffold</i> compósito preparado a partir de P2 com um tempo de separação de fases de 90 minutos e 30% de hidroxiapatite.	43
Figura 4.6.2. Curva tensão-deformação de um <i>scaffold</i> compósito preparado a partir de P2 com um tempo de separação de fases de 90 minutos e 30% de vidro bioactivo.	43

## Índice de tabelas

Tabela 3.2.3.1. Denominação dos <i>scaffolds</i> preparados à base de polímero e hidroxiapatite com indicação dos tempos de mistura.	20
Tabela 3.2.3.2. Denominação dos <i>scaffolds</i> preparados à base de polímero e vidro bioactivo.	20
Tabela 3.4.1. Concentração iónica no plasma humano e no SBF.	22
Tabela 3.4.2. Ordem, quantidade, fornecedor e pureza dos reagentes usados para a preparação de 1L de SBF.	23
Tabela 4.4.1. Condições de preparação dos <i>scaffolds</i> com as microestruturas representadas nas figuras 4.4.1., 4.4.2. e 4.4.3..	29
Tabela 4.4.2. Tamanho médio de poros dos <i>scaffolds</i> obtidos a partir de P1 e P2 para as condições experimentais indicadas.	33
Tabela 4.4.3. Tamanho médio de poros dos <i>scaffolds</i> de PLLA/HAp e PLLA/T14P43 obtidos a partir de P2 para as condições indicadas.	35
Tabela 4.4.4. Porosidade dos <i>scaffolds</i> com PLLA/HAp e PLLA/T14P43.	37
Tabela 4.6.1. Módulo de elasticidade e tensão de cedência dos <i>scaffolds</i> P2-90-3HA-US e P2-90-30T14P43-US.	44





## 1. Introdução

As limitações associadas à utilização clínica de auto-enxertos e aloenxertos têm levado ao desenvolvimento de esforços no sentido de incentivar a utilização de biomateriais e o recurso à engenharia de tecidos e à medicina regenerativa. (Healy *et al.*, 2007)

Em engenharia de tecidos tem sido utilizada uma estratégia que consiste no desenvolvimento de estruturas tridimensionais (*scaffolds* – 3D), semelhantes a matrizes extracelulares sintéticas que permitem às células proliferarem e segregarem na própria matriz extracelular, acabando por ocupar o espaço deixado pelo *scaffold*, que se degrada gradualmente. (Barroca *et al.*, 2009)

Dada a importância que os *scaffolds* representam na regeneração do tecido ósseo, far-se-á seguidamente particular referência ao osso, sua constituição, organização e formação. Serão também referidos alguns exemplos de materiais, desde os cerâmicos, os poliméricos, os compósitos e os respectivos contributos para a regeneração óssea.

### 1.1. Osso

O osso é um tecido vivo que possui uma estrutura complexa. Executa um papel fundamental no sistema músculo-esquelético e as suas funções são múltiplas, desde, protecção (protecção dos órgãos, tecidos, etc.), mecânica (suporte para músculos e articulação), movimento (permite a locomoção), hematopoiese (formação de sangue) e metabólica (reservatório mineral para homeostase de iões Ca e PO<sub>4</sub>).

Para que o osso possa efectuar todas estas funções necessita de ter características e propriedades específicas, tais como leveza, resistência, rigidez e flexibilidade. (Seeman, 2002)

A diferença entre o tecido ósseo e o osso está no facto do tecido ósseo ser mais complexo no sentido em que é formado por células e matriz mineralizada.

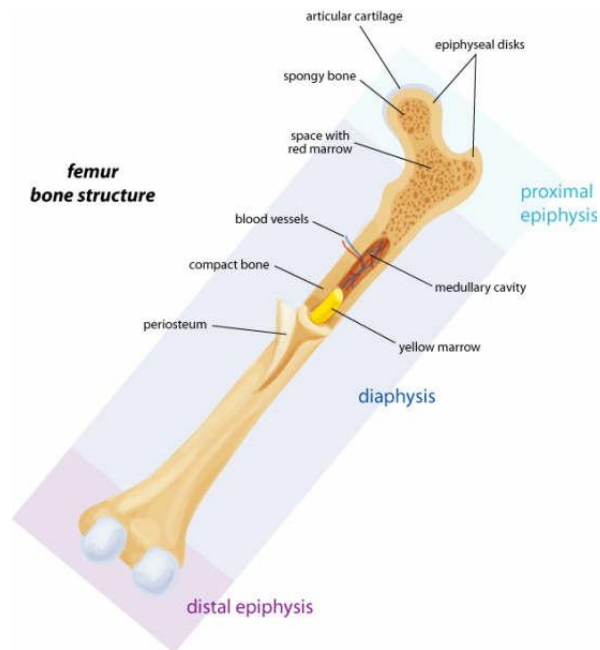
É um dos tecidos mais dinâmicos e metabolicamente activos, permanecendo toda a vida activo. (Nordin *et al.*, 2001)

#### 1.1.1. Composição e organização do osso

O osso é um tecido conjuntivo composto por duas fases: a mineral e a orgânica (figura 1.1.1.1.). A fase mineral ou porção inorgânica do osso é composta principalmente por cálcio e fosfato, sob a forma de pequenos cristais com composição próxima da hidroxiapatite sintética, Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>. A fase mineral representa cerca de 60 a 70% do peso seco do osso, a fase orgânica é de aproximadamente 35% e a água por sua vez representa 5-8%. (Nordin *et al.*, 2001)

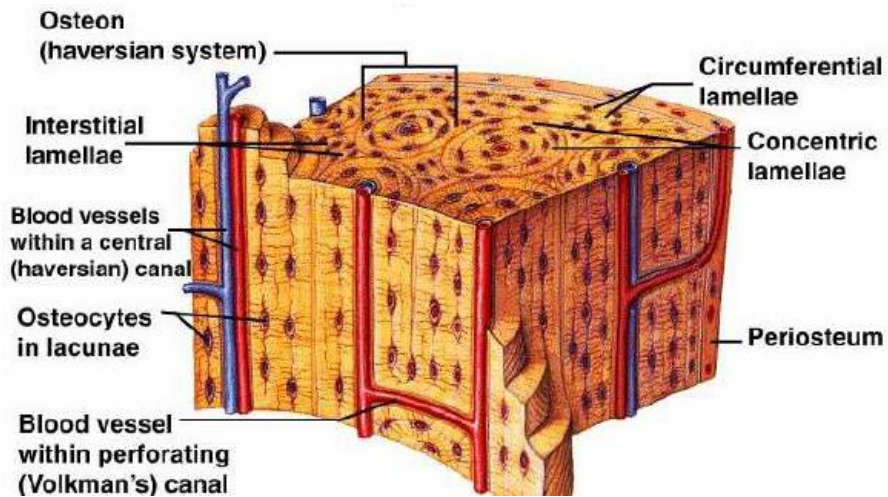
A fase orgânica é composta por nanofibras de colagénio do tipo I (90%), por proteínas não colagénicas (10%) e pelas células ósseas.

Uma característica particular do osso é o seu alto teor de materiais inorgânicos na matriz orgânica. Este componente inorgânico faz com que o tecido seja duro e rígido, enquanto, a componente orgânica dá ao osso a sua flexibilidade e resistência. (Nordin *et al.*, 2001)



**Figura 1.1.1.1.** Estrutura do osso longo. (Ribeiro, 2013)

Sob o ponto de vista macroscópico, podem encontrar-se dois tipos de osso: o osso compacto ou cortical e o osso esponjoso ou trabecular. O osso compacto localiza-se na parte externa, ou seja, em baixo do periósteo, possui uma elevada dureza e densidade e a sua espessura depende da exigência mecânica. Organiza-se em forma de finas lâminas concêntricas que fazem parte dos denominados sistemas de Havers (figura 1.1.1.2.).



**Figura 1.1.1.2.** Composição do osso compacto. (Ratner *et al.*, 2004)

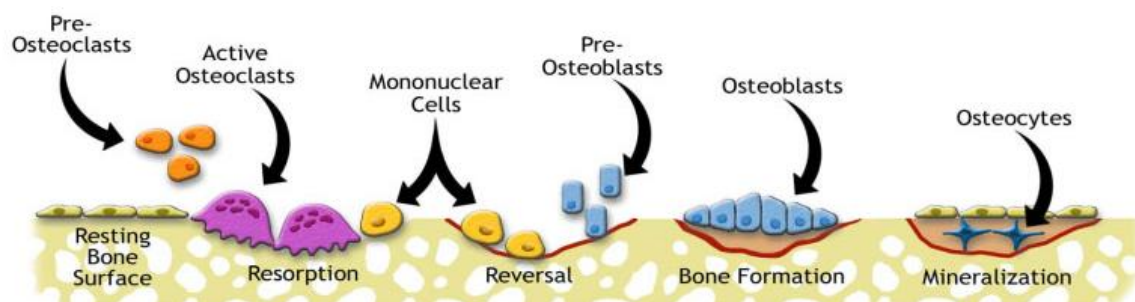
O osso esponjoso é constituído por trabéculas, com a forma de grade, na qual se encontram a medula óssea e vasos sanguíneos. Geralmente localiza-se na parte interna da diáfise. (Seeman, 2002)

### 1.1.2. Remodelação e crescimento do osso

O tecido ósseo é dinâmico, ou seja, está em constante remodelação, com o osso novo a substituir o osso velho. (Hill *et al.*, 1999)

A remodelação óssea é um processo cíclico e contínuo que ocorre a nível das unidades microscópicas de remodelação e resulta das actividades associadas de reabsorção óssea pelos osteoclastos e de formação óssea pelos osteoblastos. Este processo é produzido em três etapas. A primeira etapa consiste na produção de matriz orgânica, na segunda etapa ocorre a mineralização da matriz com formação de osso e por fim, na terceira etapa, há remodelação óssea com reabsorção seguida da formação de novo osso. (Compston *et al.*, 1999)

Na figura 1.1.2.1. está esquematizado o processo de remodelação e crescimento ósseo. Existem alguns métodos de apoio à remodelação óssea, entre eles a estimulação elétrica.



**Figura 1.1.2.1.** Processo de remodelação e crescimento ósseo. (<http://www.ns.umich.edu/Releases/>)

## 1.2. Materiais usados para regeneração óssea

Existem materiais nas várias classes de cerâmicos, vidros, polímeros ou compósitos que podem ser usados como substitutos de osso. Em menor variedade, mas nas mesmas classes podem encontrar-se materiais com aplicações em situação de regeneração. (Jordan *et al.*, 2001)

### 1.2.1. Materiais cerâmicos: A hidroxiapatite e os vidros bioactivos

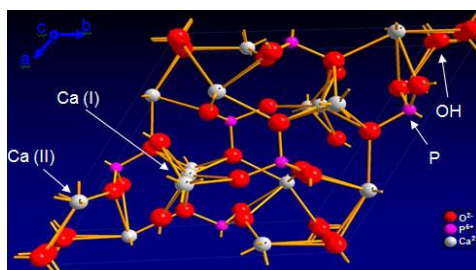
Os materiais cerâmicos são usados em aplicações biomédicas e servem sobretudo para substituir tecidos duros, tais como ossos e dentes ou para revestimentos de implantes metálicos. Possuem geralmente uma densidade moderada, uma elevada biocompatibilidade e uma boa resistência à compressão. No entanto, este tipo de material apresenta alguns inconvenientes, tais como, a baixa tenacidade à fractura, dificuldade de processamento e ainda degradação das propriedades mecânicas em meio fisiológico. (Ratner *et al.*, 2004)

Entre os vários materiais cerâmicos utilizados em implantologia óssea podem citar-se, a alumina, a zircônia, a hidroxiapatite (HAp), o óxido de titânio, o fosfato tricálcico, a fibra de carbono, o nitreto de titânio, os vidros bioactivos, etc. (Ratner *et al.*, 2004)

A hidroxiapatite (HAp) possui uma composição e uma estrutura semelhantes à da parte inorgânica do osso (Zhang *et al.*, 1998), o que permite criar condições que fomentem a regeneração óssea. A hidroxiapatite é formada por fosfato de cálcio cristalino ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), representando cerca de 99% do cálcio corporal e 80% do fósforo total. Na figura 1.2.1.1. representa-se a estrutura molecular da hidroxiapatite.

A hidroxiapatite pode ser usada como monolítico, em pó ou como revestimento. Normalmente é utilizada em revestimentos de implantes dentários e ortopédicos, componentes para reconstrução facial, substitutos ósseos e cimentos ósseos. Ao revestir uma prótese metálica, por exemplo, com hidroxiapatite espera-se que quando em contacto com tecidos vivos, haja interacção entre estes e o implante, conduzindo à formação de um novo tecido ósseo em torno do implante, isto é a osseointegração. (Tian *et al.*, 2008)

Uma das propriedades principais da hidroxiapatite é ser biactiva, conseguindo interagir com as estruturas ósseas e incentivar o crescimento do osso.



**Figura 1.2.1.1.** Estrutura molecular da hidroxiapatite. (Rivera-Muñoz, 2011)

Os vidros bioativos representam um subconjunto de materiais bioativos inorgânicos que têm a capacidade de formar *in vivo*, ligações fortes com o osso devido à precipitação à superfície do vidro de uma camada de fosfato de cálcio com composição e estrutura idênticas à da fase inorgânica do osso. Após estas interações, a libertação de iões do vidro, como Si, Ca e P dá origem a respostas intracelulares e extracelulares favoráveis à formação óssea. (Chen *et al.*, 2008)

Na literatura são reportadas várias composições vítreas com a capacidade de induzir a precipitação de fosfato de cálcio à sua superfície. Estas composições encontram-se fundamentalmente em sistemas à base de sílica ou de fosfatos, com adição de diversos óxidos, como B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>O, CaO, MgO, TiO<sub>2</sub>, entre outros. (Silva *et al.*, 2008)

### 1.2.2. Materiais poliméricos: O ácido poli-L-láctico (PLLA)

Os polímeros são macromoléculas constituídas por várias unidades estruturais mais pequenas, denominadas por monómeros ou unidades de repetição, covalentemente ligadas. As suas propriedades tendem a ser mais complexas que as dos seus precursores de cadeia curta. (Temenoff *et al.*, 2007)

Os materiais poliméricos são amplamente usados em dispositivos biomédicos, para ortopedia, substitutos de tecidos moles ou duros e implantes cardiovasculares e constituem a maior classe de biomateriais. Podem ter origem de fontes naturais ou obter-se a partir de processos de síntese orgânica.

Os polímeros naturais ou biopolímeros são compostos orgânicos de alto peso molecular encontrados na natureza. Existe uma ampla gama de polímeros naturais, que inclui materiais de origem vegetal, tais como celulose, alginato, resina, etc, e materiais de origem animal, tais como quitina (quitosano), glicosaminoglicanos (GAGs), colagénio/gelatina, etc, e ainda outros materiais naturais, tal como ácido desoxiribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA). (Temenoff *et al.*, 2007)

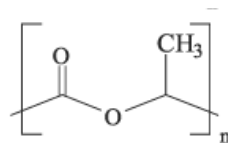
Quanto aos polímeros sintéticos podem citar-se como exemplos: a borracha de silicone (SR), polietileno (PE), polipropileno (PP), poli (tereftalato de etileno) (PET), politetrafluoroetileno (PTFE), e poli (metacrilato de metilo) (PMMA), poli (cloreto de vinilo) (PVC), ácido poli (lático-co-glicólico) (PLGA), ácido poli-L-lático (PLLA), entre outros. (Ratner *et al.*, 2004)

Existem algumas limitações dos polímeros naturais em relação aos sintéticos, relacionadas com o facto de provirem de fontes de composições variáveis, o que conduz a processamento menos versátil, imunogenicidade, baixa estabilidade mecânica, térmica e química, susceptibilidade a biodegradabilidade microbiana e enzimática e dificuldade em produzir-se em grandes quantidades. (Ratner *et al.*, 2004)

Um dos polímeros com bastante interesse é o ácido poli-L-lático (PLLA) pois é um polímero semicristalino, biodegradável e bioabsorvível, aprovado pela Food and Drug Administration EUA (FDA), para uso clínico e muito utilizado na área biomédica. (Rezwan *et al.*, 2006) Designadamente em suturas, parafusos para fixação de fracturas, pins, etc. Mais recentemente o PLLA é também utilizado em engenharia de tecidos e sistemas de libertação de fármacos. (Lee *et al.*, 2005)

Este polímero é ainda o mais utilizado para materiais compósitos, pois possui propriedades físicas e mecânicas ajustáveis. (Cruz, 2010)

O PLLA tem uma unidade de repetição como representada na figura 1.2.2.1..



**Figura 1.2.2.1.** Unidade de repetição do ácido poli-L-lático (PLLA).

Sendo o PLLA biodegradável, refere-se como alguns dos factores que influenciam a sua taxa de degradação, a cristalinidade, o peso molecular, o valor de pH do meio e a temperatura. A cristalinidade desempenha um papel relevante na degradação do PLLA que ocorre a nível da ligação éster, particularmente nas regiões amorfas do polímero. (Lee *et al.*, 2005)

### 1.2.3. Materiais compósitos

Os compósitos são materiais cuja composição contém dois ou mais tipos de materiais diferentes das classes convencionais (metais, cerâmicos e polímeros). Normalmente são

utilizados quando a aplicação exige uma combinação de propriedades que não podem ser obtidas se os materiais forem usados isoladamente. (Ratner *et al.*, 2004)

Os biocerâmicos e vidros apresentam melhor resistência mecânica, que os polímeros e desempenham ainda um papel crucial no fornecimento de estabilidade mecânica. Porém, devido à sua fragilidade são propícios a falhas catastróficas. (Chen *et al.*, 2008)

Pode concluir-se que, do ponto de vista biológico e da ciência dos materiais, faz sentido combinar polímeros e biocerâmicos para produzir compósitos para engenharia de tecido ósseo, pois o osso é o resultado da combinação de um polímero e de uma apatite biológica. (Chen *et al.*, 2008)

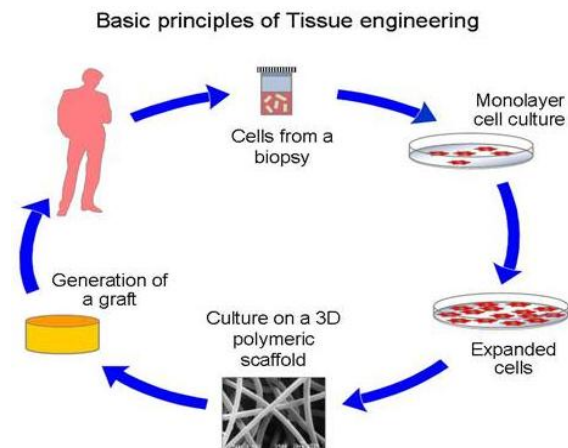
### **1.3. Engenharia de tecido ósseo**

#### **1.3.1. Conceito e estratégia**

A engenharia de tecidos é um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida para desenvolver substitutos biológicos que servem para restaurar, manter ou melhorar a função de um tecido. Esta requer a combinação, de uma forma integrada, de conhecimentos de várias áreas, tais como, a física, a química, a engenharia, as ciências dos materiais, a biologia e a medicina. (Salgado *et al.*, 2004)

A engenharia de tecidos tem como objectivo desenvolver suportes biológicos capazes de restaurar ou melhorar a função dos tecidos (figura 1.3.1.1.). Estes suportes, que são matrizes porosas tridimensionais ou *scaffolds* devem ser semeados com células que, com factores de crescimento adequados permitirão a adesão, proliferação e crescimento das células para a formação de novo tecido. (Martínez-Pérez *et al.*, 2011) Este processo de reconstituição do tecido deverá ocorrer simultaneamente com a degradação do suporte tridimensional.

No caso particular do tecido ósseo a regeneração está associada ao processo de osteocondução, osteoindução e osteogénese. Quando ocorre pelo processo de osteocondução, o *scaffold* proporciona uma estrutura física de suporte para infiltração de células osteoprogenitoras (crescimento de novo tecido ósseo) e endoteliais (vascularização). No processo de osteoindução, há uma libertação de citosinas (factores de crescimento) que são capazes de estimular a diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos. No processo de osteogénese, o *scaffold* osteocondutor é implantado com células viáveis capazes de formar osso. (Ratner *et al.*, 2004)



**Figura 1.3.1.1.** Estratégia da engenharia de tecidos. (Guerra, 2012)

### 1.3.2. Requisitos para os materiais utilizados em engenharia de tecido ósseo

Os materiais utilizados para a produção de *scaffolds* para engenharia de tecidos devem cumprir um conjunto de requisitos, entre os quais: ser biocompatíveis, porosos, biodegradáveis, bioreabsorvíveis e com propriedades mecânicas que permitam a edificação do novo tecido sem danificação da estrutura.

A estrutura de um *scaffold* deve possuir poros abertos e interligados, tendo uma grande área de superfície, para proporcionar a adesão e crescimento, de um grande número de células facilitando a neovascularização do tecido em causa.

A porosidade e a interconectividade são características primordiais para a difusão de nutrientes e para a remoção de resíduos metabólicos resultantes da actividade das células. No entanto, a porosidade influencia outras propriedades dos *scaffolds*, tais como a estabilidade mecânica, entre outras. (Salgado *et al.*, 2004)

O *scaffold* deve ter uma taxa de degradação sincronizada com a taxa de crescimento do novo tecido, de modo a que, quando o local da lesão estiver todo regenerado, o *scaffold* também esteja totalmente degradado. As propriedades mecânicas são naturalmente influenciadas pela degradação. (Thomson *et al.*, 1995 e Iakada, 1994)

O *scaffold* deve possuir uma resistência mecânica adequada, *in vitro*, para resistir a pressões hidrostáticas, assim como, *in vivo*, pois o osso está sob tensão contínua. (Salgado *et al.*, 2004)



## 1.4. Técnicas de preparação de estruturas porosas para engenharia de tecidos

Na selecção da técnica de processamento do *scaffold*, deve procurar-se garantir que todas as características do *scaffold* são cumpridas. Portanto, a técnica escolhida deverá atender aos seguintes critérios:

- o processamento não pode afectar as propriedades dos materiais, mais precisamente a biocompatibilidade;

- a técnica deve ser o mais precisa possível, para que permita uma boa obtenção de propriedades, sobretudo a porosidade, o tamanho, a distribuição dos poros e a interconectividade;

- a reprodutibilidade do processamento e das propriedades deve ser garantida.

Foram desenvolvidas várias técnicas de processamento com o objectivo de produzir *scaffolds* com propriedades adequadas para a engenharia de tecido ósseo, entre as mais utilizadas podem referir-se: a técnica baseada na evaporação do solvente, a electrofiliação ou electrospinning, a prototipagem rápida, e a técnica de separação de fases termicamente induzida (TIPS) combinada com a liofilização. (Salgado *et al.*, 2004)

### 1.4.1. Evaporação do solvente

A técnica evaporação do solvente é a mais utilizada para a preparação de *scaffolds* para engenharia de tecido ósseo. (Mikos *et al.*, 1994) O polímero é dissolvido através de um solvente adequado podendo adicionar-se à solução partículas inorgânicas (por exemplo: cloreto de sódio, tartarato de sódio e citrato de sódio) ou partículas orgânicas (por exemplo: sacarose). Depois a mistura é vazada para um molde, com a forma desejada, ocorrendo posteriormente a remoção do solvente, quer por evaporação ou liofilização, obtendo-se a estrutura porosa pretendida.

A partir desta técnica podem obter-se *scaffolds* com uma porosidade superior a 90%, dependendo do tipo de polímero e do tamanho dos cristais utilizados. (Salgado *et al.*, 2004)

As principais desvantagens são a limitação nas formas (planas e tubos), a possibilidade de retenção de solvente tóxico no interior do polímero e a desnaturação das proteínas e outras moléculas incorporadas no polímero, pela utilização de solventes. (Chen *et al.*, 2008)

### 1.4.2. Electrofiliação ou electrospinning

O electrospinning é um método simples e vantajoso, no qual é criado um jacto de uma solução polímera electricamente carregada, que depois de seco ou solidificado forma uma fibra. (Doshi *et al.*, 1995)

O electrospinning produz estruturas porosas com elevada porosidade e elevada área superficial, imitando a estrutura de uma matriz extracelular, o que torna esta técnica muito promissora para engenharia de tecidos. Os principais desafios associados são o controlo da uniformidade do diâmetro das fibras e da sua orientação e a necessidade de aumentar a taxa de produção. (Agarwal *et al.*, 2008)

### **1.4.3. Prototipagem rápida**

A prototipagem rápida é uma técnica que se usa o desenho assistido por computador (CAD) ou outros dados digitais produzidos por equipamentos de imagiologia médica, como por exemplo a ressonância magnética, para construir estruturas tridimensionais complexas. Numa das técnicas de prototipagem mais comuns os *scaffolds* são fabricados por deposição camada por camada, de materiais em forma de pó. (Ratner *et al.*, 2004)

Uma das principais vantagens desta técnica é a possibilidade de introduzir proteínas e células e produzir estruturas porosas à medida do tecido hospedeiro. (Aoki, 1994)

Como desvantagens apontam-se o facto do tamanho dos poros dos *scaffolds* fabricados ser dependente do tamanho do pó do material e a necessidade de usar solventes orgânicos. (Salgado *et al.*, 2004)

### **1.4.4. Separação de fases termicamente induzida (TIPS) combinada com a liofilização**

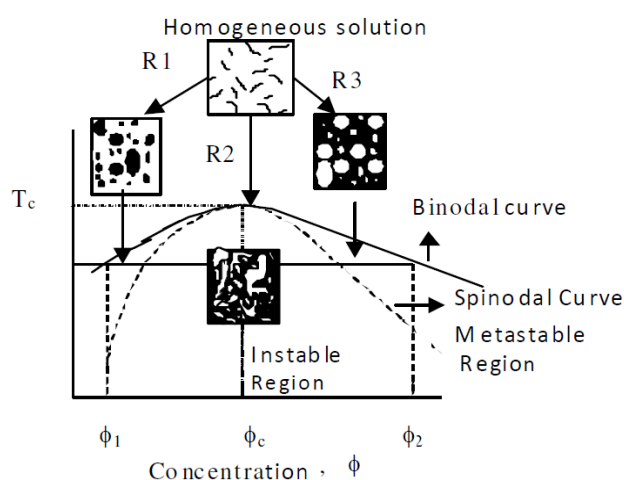
Este processo consiste na separação em duas fases de uma solução polimérica, tendo uma fase rica em polímero e outra pobre em polímero. A separação ocorre devido à adição de um solvente à solução polimérica, devendo o polímero ser imiscível no solvente. Posteriormente, o solvente é extraído e independentemente do sistema ou condições de separação de fases usados, podem obter-se diferentes morfologias. (Martínez-Pérez *et al.*, 2011)

Os *scaffolds* produzidos a partir desta técnica são altamente porosos (acima de 95%), com uma morfologia tubular e uma extensa interconectividade dos poros. (Chen *et al.*, 2008 e Rezwana *et al.*, 2006)

Existem dois tipos de separação de fases: a separação de fases sólido-líquido e a separação de fases líquido-líquido. O mecanismo de separação de fases sólido-líquido pode ser alcançado através da diminuição da temperatura da separação de fases para induzir a cristalização de solventes a partir de uma solução de polímero. Esta técnica é frequentemente usada para fabricar suportes de vários tipos de polímeros e materiais compósitos poliméricos. A partir desta técnica podem obter-se dois tipos de estruturas as anisotrópicas ou as

isotrópicas. (Chen *et al.*, 2008) Nas estruturas anisotrópicas são formados canais tubulares abertos com pequenas divisões ou poros, esta estrutura é obtida usando temperaturas de separação de fases muito baixas, ou seja,  $-196^{\circ}\text{C}$ , por exemplo, onde foi utilizado o mesmo polímero (PLLA). (Zhang *et al.*, 1999) Em contrapartida as estruturas isotrópicas apresentam geralmente poros ovais a esféricos e são obtidas com temperaturas menos baixas, como por exemplo  $0^{\circ}\text{C}$ , e previsivelmente taxas de arrefecimento menores ou concentrações baixas de polímero. (Tu *et al.*, 2003)

No mecanismo de separação de fases líquido-líquido, a morfologia das estruturas porosas dos *scaffolds*, que é conseguida após a remoção do solvente, depende do estado termodinâmico do sistema aquando da separação. O processo está assim sujeito à temperatura seleccionada. (Martinez-Pérez *et al.*, 2011)



**Figura 1.4.4.1.** Diagrama de fases binário temperatura-composição da solução polimérica. (Martínez-Pérez *et al.*, 2011)

Como indicado na figura 1.4.4.1., as temperaturas que se encontram entre as curvas binodal e spinodal, o sistema é metaestável. Quando as temperaturas estão abaixo da curva spinodal, o sistema é instável, separando-se naturalmente em duas fases, decomposição spinodal. (Van de Witte *et al.*, 1996)

Após a iniciação da separação de fases pelo mecanismo binodal ou spinodal, o sistema continua a evoluir por coalescência das gotas, na decomposição binodal, ou pelos domínios, na decomposição spinodal, o que faz com que a energia interfacial entre as fases rica e pobre em polímero diminua. Portanto, a estrutura final na decomposição binodal leva ao aumento do tamanho dos poros, enquanto que na decomposição spinodal, a estrutura porosa é aberta em conjunto com um aumento de tamanho de poros. (Martínez-Pérez *et al.*, 2011)

A técnica de separação de fases líquido-líquido pelo mecanismo de decomposição spinodal, tem sido amplamente utilizada para a preparação de estruturas porosas para engenharia de tecidos, uma vez que é possível obter estruturas com elevada porosidade (aproximadamente 97%), dependendo da concentração de polímero.

Para se obter uma estrutura final com as características adequadas, podem ser manipulados diferentes parâmetros: a razão solvente/não solvente, a natureza destes, a temperatura, o tempo de separação de fases e a concentração de polímero.

A grande desvantagem, desta técnica reside no facto de um aumento do tamanho dos poros levar a uma diminuição da interconectividade. (Van de Witte *et al.*, 1996)

O processo TIPS é combinado com a liofilização, que consiste na remoção de água (ou de outro solvente), que está presente no material congelado, convertendo o gelo directamente em vapor sem que haja formação de água líquida. A evaporação do solvente pode originar inconvenientes, como a limitação nas formas, possibilidade de retenção de solvente tóxico no interior do polímero e desnaturação das proteínas e outras moléculas incorporadas no polímero pela utilização de solventes. (Monteiro, 2008)

## 2. Objectivos

O objectivo deste trabalho consiste em preparar estruturas tridimensionais, *scaffolds*, que tenham morfologia e microestrutura adequada à sua aplicação em engenharia de tecidos. Adicionalmente espera-se que essas estruturas exibam comportamento bioactivo e sejam capazes de induzir osteoindução e promover a regeneração.

Foram produzidos dois tipos de *scaffolds* compósitos, sendo PLLA a matriz e a hidroxiapatite ou vidro bioactivo o enchimento inorgânico. As proporções de hidroxiapatite ou vidro bioactivo foram 0%, 30% e 50% (m/m), e para a produção das misturas usou-se a técnica de separação de fases termicamente induzida (TIPS) de soluções de 5,5% para o PLLA de maior peso molecular e 6,5% para o PLLA de menor peso molecular (m/m), relativamente à massa total das suspensões PLLA/dioxano/água com hidroxiapatite ou PLLA/dioxano/água com vidro.

Os *scaffolds* foram caracterizados sob o ponto de vista microestrutural, do potencial bioactivo em fluido fisiológico sintético e das suas propriedades mecânicas.

### **3. Materiais e métodos**

São aqui apresentados os diferentes materiais utilizados na produção das estruturas compósitas porosas tridimensionais, nas quais o PLLA funcionou como matriz polimérica e a hidroxiapatite ou vidro bioactivo como enchimento. A técnica de preparação utilizada foi a separação de fases termicamente induzida (TIPS).

#### **3.1. Materiais dos scaffolds**

##### **3.1.1. PLLA**

Foram utilizados dois tipos de PLLA adquiridos no fornecedor Purac BioChem Netherland, um com peso molecular de  $63\,624\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  (P1) e outro com  $190\,707\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  (P2).

O comportamento térmico do PLLA com menor peso molecular foi estudado através de ensaios de calorimetria diferencial de varrimento (DSC) no equipamento Shimadzu DSC-50. O aquecimento operou-se a uma taxa de  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  desde a temperatura ambiente até  $190^{\circ}\text{C}$ , sob fluxo constante de azoto.

##### **3.1.2. Hidroxiapatite**

A hidroxiapatite utilizada neste trabalho foi adquirida no fornecedor Plama Biotall Limited, com uma granulometria de  $1,585\ \mu\text{m}$ .

As partículas de hidroxiapatite foram caracterizadas por várias técnicas de análise e de observação.

Para a observação das características morfológicas foi utilizado um microscópio electrónico de varrimento (Hitachi S-4100, Japan), com uma voltagem de aceleração de electrões de  $25\text{kV}$ .

Para a determinação do tamanho médio das partículas usou-se um equipamento Coulter LS Particle Size Analyzer 230.

A natureza das fases cristalinas foi avaliada por DRX com um difractómetro Rigaku Geigerflex Dmax-C com radiação  $\text{CuK}\alpha$ .

A área superficial específica das partículas de hidroxiapatite foi determinada por adsorção física de gás azoto pelo método BET (isotérmica de Brunauer-Emmett-Teller) num equipamento Micromerites-Gemini 2370 V5.

### 3.1.3. Vidro bioactivo

O vidro bioactivo utilizado possui a composição molar:  $\text{TiO}_2$  (14%),  $\text{P}_2\text{O}_5$  (43%) e  $\text{CaO}$  (43%) e foi denominado por T14P43. Foi obtido por fusão (durante cerca de 1h 30min a  $1500^\circ\text{C}$ ) e arrefecimento brusco em água, produzindo-se uma frita que foi posteriormente moída e passada numa tela com malha de  $20\ \mu\text{m}$ .

Esta composição vítrea em particular foi escolhida porque trabalhos anteriores mostraram o seu carácter bioactivo em meio fisiológico sintético acelular. (Silva *et al.*, 2008)

O pó foi submetido a análise de distribuição granulométrica, recorrendo-se ao equipamento Coulter LS Particle Size Analyser 230.

Para a avaliação morfológica e análise química dos elementos, foi utilizado um microscópio electrónico de varrimento (Hitachi, S-4100, Japan).

Para a avaliação do carácter amorfo do vidro T14P43 foi utilizado um difractómetro Rigaku Geigerflex Dmax-C, com radiação  $\text{CuK}\alpha$ .

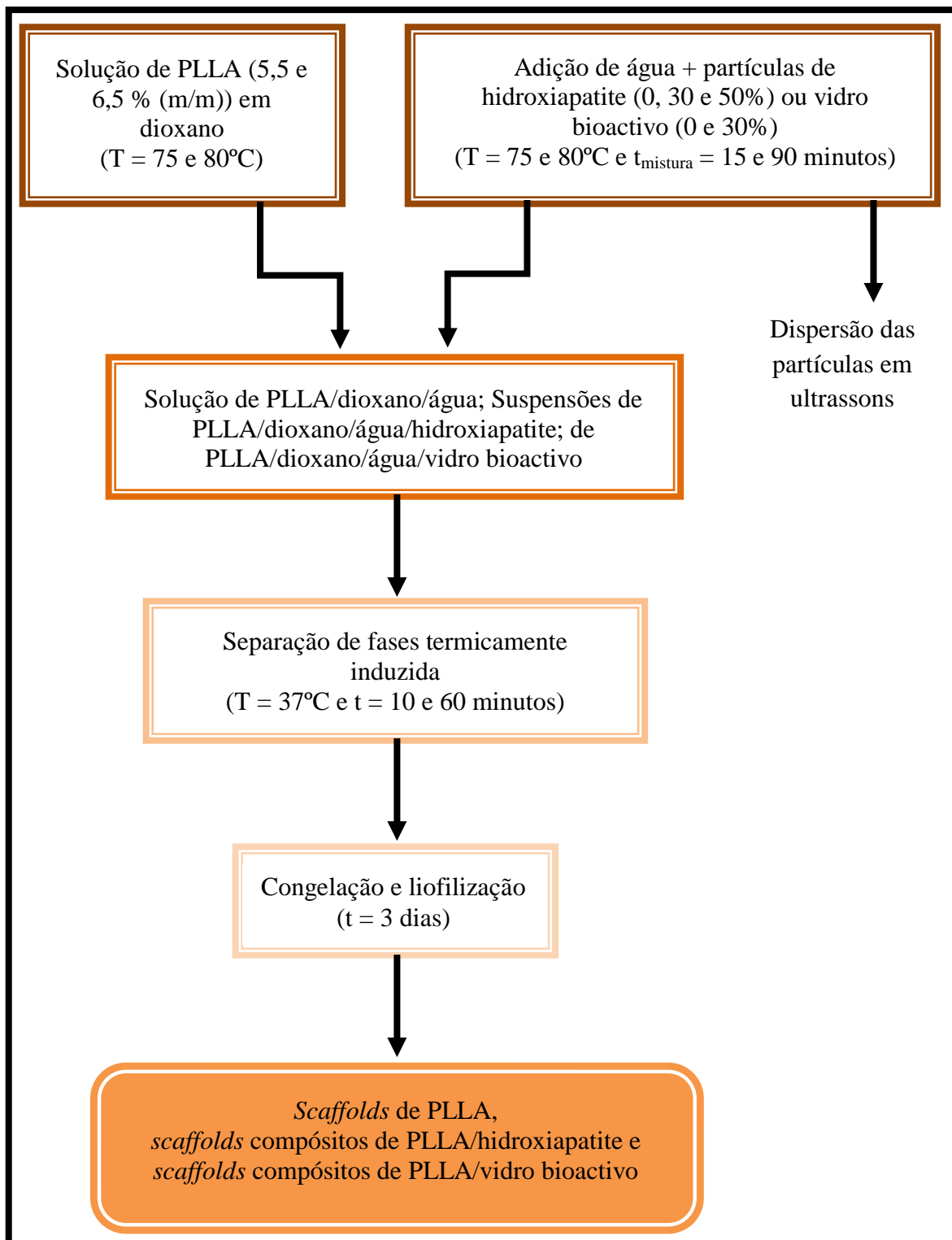
Procedeu-se ainda à determinação da área superficial dos pós de vidro por adsorção física de gás azoto pelo método BET (isotérmica de Brunauer-Emmett-Teller) no equipamento Micromerites – Gemini 2370 V5.

## 3.2. Preparação dos *scaffolds*: metodologia

Neste trabalho foram preparados *scaffolds* de PLLA, *scaffolds* compósitos de PLLA/hidroxiapatite e *scaffolds* compósitos de PLLA/vidro bioactivo pelo processo de separação de fases líquido-líquido termicamente induzida (TIPS).

Foram utilizados dois tipos de PLLA com diferentes pesos moleculares (P1 e P2). Os compósitos foram preparados com PLLA de peso molecular  $63\ 624\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  (P1) e  $190\ 707\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  (P2) e diferentes teores de partículas de hidroxiapatite: 0, 30 e 50% (m/m) e de vidro bioactivo: 0 e 30% (m/m), calculados em relação à fase polimérica. Os tempos de separação de fases no processo TIPS foram 10 minutos, para o PLLA de menor peso molecular, P1 e 60 minutos, para o PLLA de maior peso molecular, P2.

O procedimento experimental utilizado para a preparação e caracterização dos diferentes *scaffolds* está ilustrado no esquema da figura 3.2.1..



**Figura 3.2.1.** Esquema do procedimento experimental.

### **3.2.1. Preparação das soluções de PLLA/dioxano/água e das suspensões PLLA/dioxano/água/hidroxiapatite e PLLA/dioxano/água/vidro bioactivo**

Foram usados dois lotes diferentes de PLLA da Purac BioChem Netherland, caracterizados por viscosidades inerentes distintas sendo medidas em clorofórmio à



temperatura de 25°C e para uma concentração em polímero de 0,1g.dl<sup>-1</sup>. O primeiro lote (Purasorb ® PL18), foi denominado por P1 e o segundo lote (Purasorb ® PL39), denominado por P2, com viscosidades inerentes de 1,75 dl.g<sup>-1</sup> e 3,9 dl.g<sup>-1</sup>, respectivamente, tal como indicado pelo fornecedor.

O peso molecular de um polímero pode ser relacionado com a viscosidade intrínseca de uma solução deste polímero de concentração conhecida num determinado solvente pela equação de Mark Houwink, equação 3.2.1. (Cruz, 2010):

$$[\eta] = k * M_w^\alpha \quad \text{Equação 3.2.1.}$$

onde,

- $[\eta]$  é a viscosidade intrínseca (dl.g<sup>-1</sup>);
- $M_w$  é o peso molecular (g.mol<sup>-1</sup>);
- $k$  e  $\alpha$  são factores dependentes do sistema polímero-solvente.

A equação permite determinar o peso molecular do polímero em estudo (PLLA) a partir da viscosidade intrínseca ou vice-versa. (Cruz, 2010)

$$[\eta] = 5,45 * 10^{-4} * M_w^{0,73} \quad \text{donde} \quad M_w = 10^{\frac{\log[\eta] - \log(5,45 * 10^{-4})}{0,73}}$$

A viscosidade intrínseca, definida como sendo a viscosidade inerente quando a concentração de polímero tende para zero, calcula-se pelas equações 3.2.2. e 3.2.3.,

$$[\eta_{\text{iner}}] = \frac{\ln \eta_r}{c} \quad \text{Equação 3.2.2.}$$

$$[\eta] = \left[ \frac{\ln \eta_r}{c} \right]_{c=0} = [\eta_{\text{iner}}]_{c=0} \quad \text{Equação 3.2.3.}$$

onde,

- $[\eta_{\text{iner}}]$  é a viscosidade inerente;
- $\eta_r$  é a viscosidade relativa;
- $C$  é a concentração de polímero.

Como a viscosidade inerente tem tendência a diminuir com o aumento da concentração de polímero, a viscosidade intrínseca é sempre igual ou superior à viscosidade inerente, o que leva a que:

$$M_w \geq 10^{\frac{\log[\eta_{\text{iner}}] - \log(5,45 * 10^{-4})}{0,73}} \quad \text{Equação 3.2.4.}$$

Assim sendo, obteve-se para os pesos moleculares dos dois lotes de PLLA os valores de  $M_{w(P1)} \geq 63\,624 \text{ g.mol}^{-1}$  e  $M_{w(P2)} \geq 190\,707 \text{ g.mol}^{-1}$  respectivamente.

Para a preparação das soluções de PLLA/dioxano/água e das suspensões PLLA/dioxano/água/hidroxiapatite e PLLA/dioxano/água/vidro bioactivo, o polímero foi dissolvido em dioxano (Panreac Química SA), utilizando 0,65 g de P1 ou 0,55 g de P2 com 100 g da mistura dioxano/água onde a razão dioxano/água foi igual a 87/13, a 75 e 80°C sob agitação magnética durante aproximadamente 2 horas. Seguidamente adicionou-se água ultrapura (Milli-Q®) e posteriormente as partículas de hidroxiapatite ou vidro bioactivo no caso dos *scaffolds* compósitos, mantendo sempre a temperatura de 75 e 80°C, sob agitação magnética por mais 15 e 90 minutos. A água só era adicionada quando estivesse completa a dissolução do polímero porque a água é um não-solvente para o PLLA e é miscível com o dioxano.

Depois de acionadas as fases de enchimento (hidroxiapatite ou vidro bioactivo) foram ensaiados dois tempos de mistura – 15 e 90 minutos, com o objectivo de avaliar a influência do tempo de contacto líquido-sólido na dissolução da fase de enchimento na morfologia dos poros nos *scaffolds* finais.

Nalguns casos, em que se verificou aglomeração de partículas de hidroxiapatite ou de vidro bioactivo, recorreu-se a agitação das suspensões por ultrassons antes de passar para a agitação magnética.

As soluções eram transparentes e as suspensões, contendo hidroxiapatite ou vidro bioactivo possuíam cor branca.

Na dissolução do P2 (peso molecular de 190 707 g.mol<sup>-1</sup>) usou-se 5,5% (m/m) de PLLA e na dissolução de P1 (peso molecular de 63 624 g.mol<sup>-1</sup>) usou-se 6,5 % (m/m) de PLLA em relação ao sistema de PLLA/dioxano, tendo por base as indicações da literatura de que ocorria sedimentação da fase rica de polímero para concentrações de PLLA inferiores a 4,5%. (Lee *et al.*, 2005)

Foi utilizada uma razão mássica de dioxano/água de 87/13 pelo facto de esta originar melhores resultados, a nível da estrutura porosa. O teor de água influencia a solubilidade do polímero, verificando-se que esta diminui com o aumento do teor de água originando a sedimentação da fase rica em polímero. (Nam *et al.*, 1999)

### **3.2.2. Separação de fases líquido-líquido termicamente induzida**

Para se iniciar o processo de separação de fases líquido-líquido escolheu-se uma temperatura que fosse inferior ao “ponto de nuvem”. O “ponto de nuvem” define-se como sendo a temperatura que indica a passagem da situação em que a solução é homogénea para a situação em que as fases se separam, isto é, quando a solução fica turva.

Nas duas soluções produzidas (P1/dioxano/água e P2/dioxano/água) mediu-se a temperatura do “ponto de nuvem”, a partir da turbidimetria visual. O procedimento usado foi o seguinte: num banho onde era obtida a solução PLLA/dioxano/água a 75 e 80°C como indicado anteriormente, foi-se arrefecendo lentamente a solução, deixando que a temperatura estabilizasse durante 5 minutos antes de passar à nova temperatura. No final, obteve-se para temperaturas do “ponto de nuvem” os valores de 39 e 41°C, para a solução com P1 e com P2, respectivamente. No entanto, não foi possível determinar a temperatura do “ponto de nuvem” das suspensões, uma vez que a coloração branca, devido à presença de hidroxiapatite ou vidro bioactivo, não permitia a visualização de turvação.

A morfologia da estrutura porosa depende do estado termodinâmico da solução aquando da separação de fases e é muito importante ter em atenção a temperatura à qual o processo vai decorrer. A literatura refere que as temperaturas usadas na separação de fases são muito abaixo da temperatura do “ponto de nuvem” medido, para garantir que a separação de fases líquido-líquido acontece por decomposição spinodal. Porém se a temperatura escolhida for muito inferior à temperatura do “ponto de nuvem”, a separação de fases pode ser demasiado rápida comprometendo a formação adequada de poros. (Lee *et al.*, 2005)

Face a estas considerações e sendo as temperaturas do “ponto de nuvem” para o P1 e P2, respectivamente, 39 e 41°C, tomou-se para a temperatura para a separação de fases o valor de 37°C, isto é, 2 e 4°C abaixo dos “pontos de nuvem”.

Foram escolhidos dois tempos de separação de fases, 10 minutos para as soluções baseadas no polímero de menor peso molecular, P1, e 60 minutos para as soluções baseadas no de maior peso molecular, P2. A escolha destes tempos baseou-se na experiencia reportada por outros autores (Barroca *et al.*, 2009), designadamente no facto destes tempos conduzirem a estruturas com características morfológicas mais favoráveis para o objectivo pretendido.

### **3.2.3. Congelação e liofilização**

Depois do processo de separação de fases, as soluções foram congeladas a -17°C e posteriormente liofilizadas com a finalidade de ser removida toda a água assim como todo o solvente, dando origem a estruturas porosas. O processo de liofilização decorreu no equipamento de modelo Lyph Lock 4.5 Labconco, a uma temperatura de -50°C, e sob uma pressão de  $15 \times 10^{-3}$  mbar, durante 3 dias.

No final deste processo, obtiveram-se os *scaffolds* de PLLA, os *scaffolds* de PLLA/HAp e os *scaffolds* de PLLA/T14P43, a partir da separação de fases líquido-líquido termicamente induzida a 37°C, com PLLA de diferentes pesos moleculares, e com diferentes

teores de hidroxiapatite ou vidro bioactivo (30 e 50%), a vários tempos de separação de fases (10 e 60 minutos).

Nas tabelas 3.2.3.1. e 3.2.3.2. são apresentadas as denominações dos diversos *scaffolds* preparados.

**Tabela 3.2.3.1.** Denominação dos *scaffolds* preparados à base de polímero e hidroxiapatite com indicação dos tempos de mistura.

Polímero	HAp (%)	0	30	50
	t (min)			
P1 (SF=10 min)	15	P1-15-0HA	P1-15-30HA	P1-15-50HA
	90	-	P1-90-30HA	-
P2 (SF=60 min)	15	P2-15-0HA	P2-15-30HA	P2-15-50HA
	90	-	P2-90-30HA	-
P2 (Ultrassom) (SF=60 min)	15	P2-15-0HA-US	P2-15-30HA-US	P2-15-50HA-US
	90	-	P2-90-30HA-US	-

SF – Tempo de separação de fases

t(min) – Tempo de mistura

**Tabela 3.2.3.2.** Denominação dos *scaffolds* preparados à base de polímero e vidro bioactivo.

Polímero	T14P43 (%)	30
	t (min)	
P2 (Ultrassom) (SF=10 min)	90	P2-90-30T13P43-US

SF – Tempo de separação de fases

t(min) – Tempo de mistura

### 3.3. Caracterização morfológica dos *scaffolds*

Para a caracterização morfológica dos *scaffolds* de PLLA e dos *scaffolds* compósitos de PLLA/HAp e PLLA/T14P43 recorreu-se à microscopia electrónica de varrimento (SEM), o que possibilitou determinar o tamanho médio dos poros e, ainda, a presença ou não de interconectividade entre os poros.

Os *scaffolds* foram cortados em pequenos cubos de aproximadamente 150 mm<sup>3</sup> e, posteriormente colados sobre um suporte com fita-cola de carbono. Seguidamente, fez-se uma deposição de uma camada condutora de Au-Pd por sputtering sobre todas as amostras, para serem posteriormente examinadas no microscópio electrónico de varrimento.

Para a medição da porosidade,  $\varepsilon$ , foi utilizada a seguinte fórmula: (Wei *et al.*, 2004)

$$\varepsilon = \frac{D_s - D_m}{D_s} \quad \text{Equação 3.3.1.}$$

onde,

- $D_m$  densidades da matriz;
- $D_s$  densidade da amostra é calculado pela fórmula seguinte:

$$D_s = \frac{1}{(1-X_h)/D_p + X_h/D_h} \quad \text{Equação 3.3.2.}$$

onde,

- $X_h$  é a percentagem de hidroxiapatite ou vidro bioactivo no compósito;
- $D_h$  é a densidade do pó de hidroxiapatite com um valor de 3,16 g/mL e/ou densidade do pó de vidro T14P43 com um valor de 2,62 g/mL;
- $D_p$  é a densidade do polímero, calculada a partir de:

$$D_p = \frac{1}{(1-X_c)/D_a + X_c/D_c} \quad \text{Equação 3.3.3.}$$

onde,

- $D_a$  é a densidade de PLLA amorfo, com o valor de 1,248 g/mL; (Wei *et al.*, 2004)
- $D_c$  é a densidade de PLLA 100% cristalino, com o valor de 1,290 g/mL; (Wei *et al.*, 2004)
- $X_c$  é o grau de cristalinidade do PLLA calculada por:

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0} \quad \text{Equação 3.3.3.}$$

com,

- $\Delta H_m$  entalpia de fusão;
- $\Delta H_m^0$  entalpia de fusão do PLLA 100% cristalino, com o valor de 203,4 J/g.

No caso presente usou-se o valor de  $\Delta H_m$  obtido por outros autores do grupo com o valor de 76,47 J/g. (Barroca, 2008)

### 3.4. Caracterização do potencial bioactivo

A avaliação do potencial bioactivo dos *scaffolds* foi feita através de ensaios *in vitro* em meio fisiológico sintético acelular ou SBF (Simulated Body Fluid) no qual as amostras foram mergulhadas e mantidas por tempos variados (1, 3, 7, 14 e 21 dias), analisando-se, após esses tempos, a superfície das amostras e a variação das concentrações iónicas do fluido. A formação de uma camada de fosfato de cálcio sobre as amostras após imersão é indicativa de que os materiais são potencialmente bioactivos, isto é, apresentam a capacidade de poder promover a ligação ao tecido quando testados *in vivo*.

O SBF possui composição e concentrações iónicas idênticas às do plasma humano (tabela 3.4.1.) e foi preparado de acordo com o procedimento descrito na literatura. (Kokubo *et al.*, 2006)

**Tabela 3.4.1.** Concentração iónica no plasma humano e no SBF.

		Concentração iónica (mM)							
		Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
Plasma humano		14,2	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5
SBF		14,2	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5

Na tabela 3.4.2. estão indicados: os reagentes usados, o fornecedor, o grau de pureza e a quantidade usada para a preparação de 1 L de SBF, bem como a ordem de introdução na solução.

**Tabela 3.4.2.** Ordem, quantidade, fornecedor e pureza dos reagentes usados para a preparação de 1L de SBF.

Ordem	Reagente	Quantidade (g) ou (mL)	Fornecedor	Pureza (%)
1	NaCl	7,996	Panreac	99,5
2	NaHCO <sub>3</sub>	0,350	Riedel-de Haën	99,7
3	KCl	0,224	Riedel-de Haën	99,5
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	0,228	Calbiochem	100
5	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,305	Riedel-de Haën	99
6	HCl (1M)	39	Panreac	99
7	CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,548	Fluka	99
8	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,071	Panreac	99
9	CNH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub>	6,057	Merck	99,8
10	HCl (1M)	0-5	Panreac	99

Para a preparação da solução de SBF foram usados 700 mL de água ultrapura (Milli Q®) a uma temperatura de  $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$  sob agitação, acrescentando os reagentes do 1 a 8. Cada reagente foi adicionado lentamente e só era adicionado o reagente seguinte quando o anterior estivesse bem dissolvido, para evitar possíveis precipitações. Durante toda a mistura a solução deve permanecer transparente e à temperatura de  $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ .

Os reagentes 9 e 10 servem para regular o pH. Assim, o reagente 9 (tris-hidroxi-metil-aminometano) foi adicionado gradualmente para que não houvesse uma mudança brusca no pH, o que originaria a precipitação do fosfato de cálcio. Depois de adicionado este reagente esperou-se que o pH estabilizasse e só depois se adicionou o ácido clorídrico, também lentamente, para que o pH atingisse o valor de 7,4. Enquanto o pH era ajustado, adicionou-se água ultrapura até completar 1000 mL.

Após a preparação da solução de SBF, preparam-se as amostras, cortando pedaços de *scaffolds* compósitos de PLLA/HAp e de PLLA/T14P43 com dimensões  $10 \times 6 \times 1 \text{ mm}^3$ .

Os volumes de SBF necessários para os ensaios de biactividade obtiveram-se a partir da relação,  $V_s = S_a / 10$ , onde  $V_s$  é o volume calculado de SBF em mL, e  $S_a$  a área superficial aparente em  $\text{mm}^2$ . (Kokubo *et al.*, 2006)

Uma vez que cada amostra apresenta uma área superficial média de  $152 \text{ mm}^2$ , as amostras foram mergulhadas em 15 mL de SBF em copos de polietileno. Finalmente, os

copos foram colocados na estufa a 37°C, durante diferentes tempos de imersão, nomeadamente 1, 3, 7, 14 e 21 dias.

Após o tempo de imersão das amostras, estas foram retiradas e lavadas delicadamente com água ultrapura (Milli Q®), secas na estufa a 37°C e posteriormente colocadas no exsiccador, para subseqüentemente serem caracterizadas.

O SBF residual de cada tempo de imersão foi colocado no frigorífico para posteriormente ser analisado por espectroscopia de emissão por plasma induzido (ICP) num espectrómetro Jobin-Yvon JY70 Plus, para se avaliar a evolução da concentração iónica de algumas espécies em solução, tais como, cálcio e fósforo.

Cada amostra foi observada em microscopia electrónica de varrimento (SEM) e caracterizada por difracção de raios-X. Por SEM podem analisar-se as modificações superficiais das amostras, designadamente a formação de precipitados e por DRX é possível determinar a natureza e composição das fases cristalinas presentes.

### **3.5. Avaliação das propriedades mecânicas**

Para se caracterizar os *scaffolds* a nível das suas propriedades mecânicas, as amostras foram submetidos a ensaios de compressão para a determinação do módulo de elasticidade e da tensão de cedência. Foram seleccionados para o estudo amostras dos *scaffolds* que apresentaram melhores características sob o ponto de vista da porosidade (tamanho médio de poros e interconectividade). Quer para os *scaffolds* contendo hidroxiapatite, quer para os que continham vidro bioactivo, foram preparados 5 discos com um diâmetro de 24 mm e uma altura de  $12 \pm 1$  mm.

Estes *scaffolds* foram testados a uma velocidade de 0,1 mm/s até uma deformação de 60-70% num equipamento TIRA GmbH modelo TIRAtest 2705, do Departamento de Engenharia Mecânica da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FE-UP).

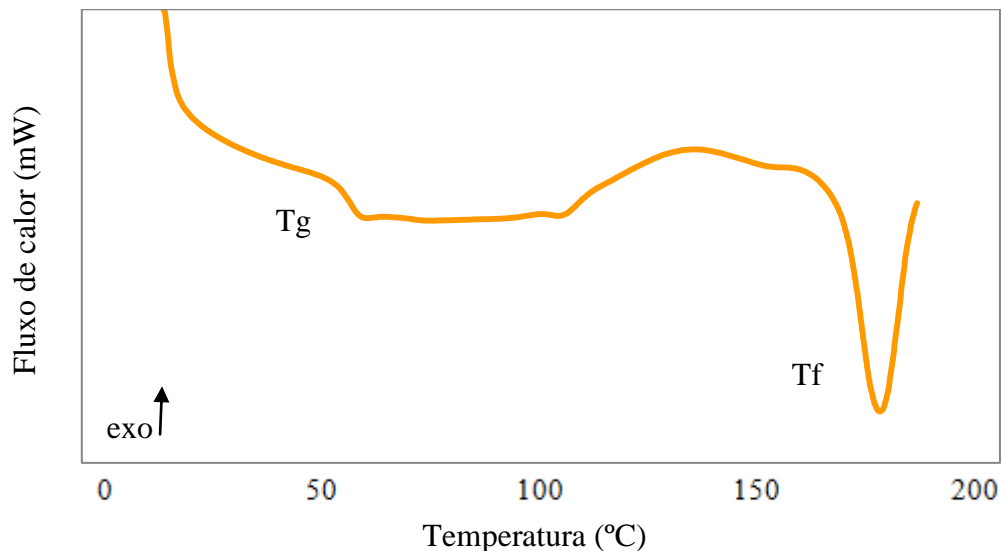
Todos os resultados desta caracterização serão apresentados no capítulo seguinte.



## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Caracterização do polímero

A fim de avaliar o comportamento térmico do PLLA, foi realizado um ensaio de calorimetria diferencial de varrimento (DSC), tendo-se obtido a curva representada na figura 4.1.1..

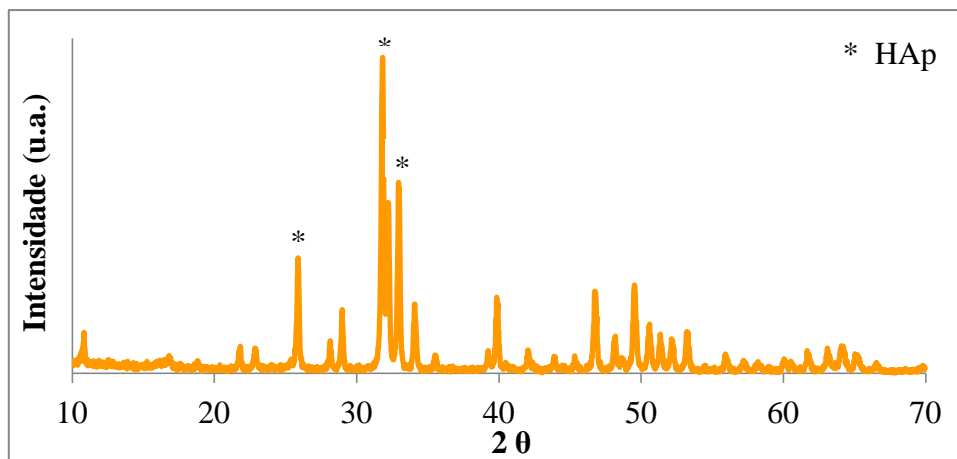


**Figura 4.1.1.** Curva de DSC das partículas de PLLA.

Como pontos relevantes, observa-se a temperatura de transição vítrea (Tg) do PLLA a 65°C e um pico endotérmico acima de 180°C (Tf), que corresponde à fusão da parte cristalina do PLLA. Estes resultados conferem com o que é referido na literatura (Mano *et al.*, 2004)

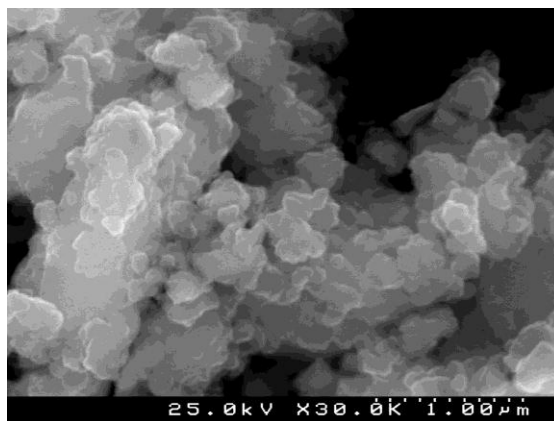
### 4.2. Caracterização das partículas de hidroxiapatite

As partículas de hidroxiapatite utilizadas neste estudo foram submetidas a uma análise por difracção de raios-X (DRX) tendo-se confirmado a presença maioritária de hidroxiapatite, com o pico de maior intensidade em  $2\theta = 31,9^\circ$ .



**Figura 4.2.1.** Espectro de difração de raios-X das partículas de hidroxiapatite.

Para a caracterização morfologia das partículas de hidroxiapatite, estas foram observadas por microscopia electrónica de varrimento, sendo o resultado apresentado na figura 4.2.2..

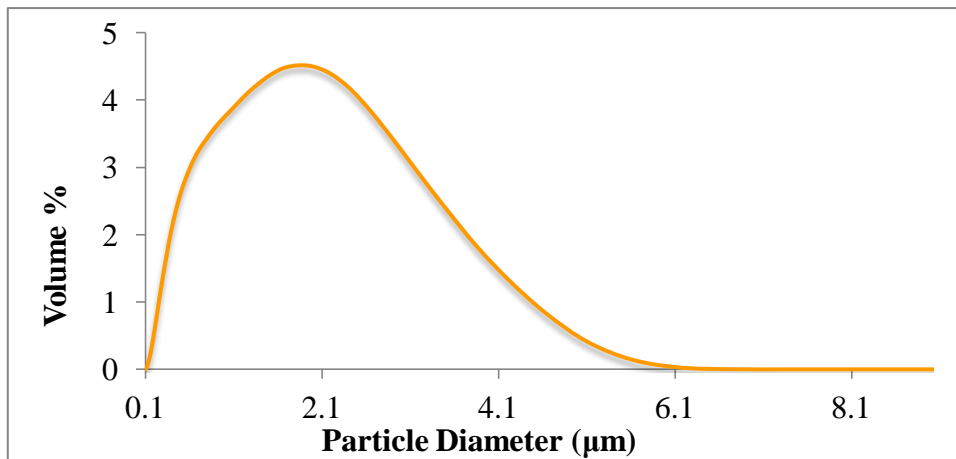


**Figura 4.2.2.** Micrografia por SEM das partículas de hidroxiapatite.

A figura mostra que as partículas de hidroxiapatite são submicrométricas, com aspecto irregular e com tendência para se apresentarem sob a forma de aglomerados.

A área superficial específica das partículas de hidroxiapatite, determinada por BET é de 7,1657 m<sup>2</sup>/g.

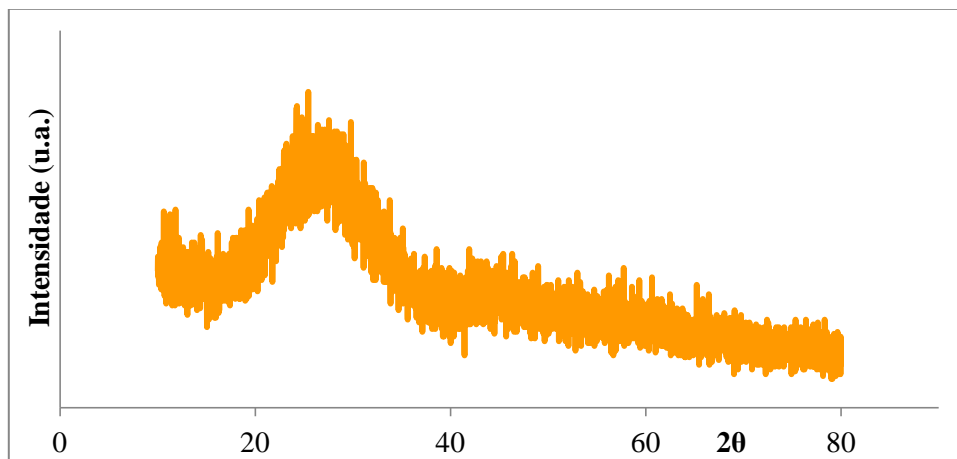
O tamanho médio das partículas foi calculado com base numa análise por Coulter, tendo-se obtido um valor de 1,585 µm (figura 4.2.3.). A figura mostra ainda que as partículas possuem diversos tamanhos distribuídos maioritariamente no intervalo de 0,2µm a 5µm.



**Figura 4.2.3.** Distribuição granulométrica das partículas de hidroxiapatite.

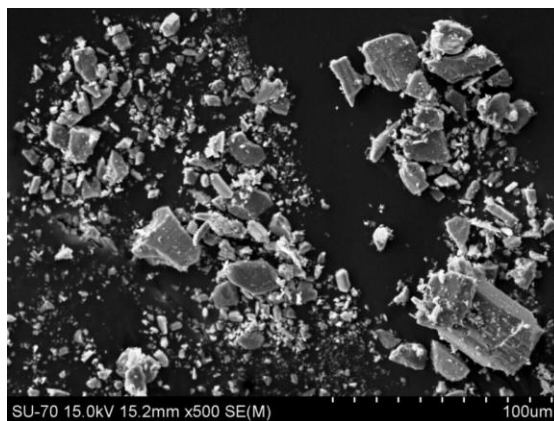
### 4.3. Caracterização das partículas de vidro bioativo

A figura 4.3.1. representa o espectro de DRX realizado às partículas de vidro bioativo e revela o carácter essencialmente amorfo do material.



**Figura 4.3.1.** Espectro de difracção de raios-X das partículas de vidro bioativo.

A morfologia das partículas de vidro bioativo obtida por microscopia electrónica de varrimento, é apresentada na figura 4.3.2..

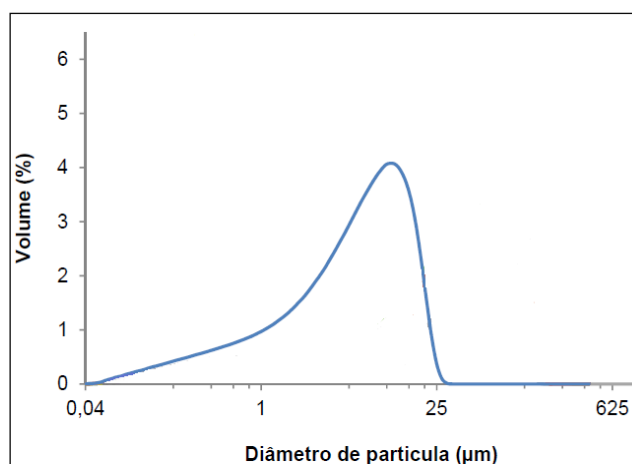


**Figura 4.3.2.** Micrografia por SEM das partículas de vidro bioactivo.

A micrografia mostra que as partículas de vidro bioactivo possuem uma morfologia irregular com superfícies planas e tamanhos muito variados.

A área superficial específica das partículas de vidro bioactivo, obtida por BET é de  $10,5505 \text{ m}^2/\text{g}$ .

O tamanho médio de partículas obtido num equipamento Coulter foi de  $18,5\mu\text{m}$ . Observa-se ainda, pela distribuição granulométrica das partículas (figura 4.3.3.), que os tamanhos de partículas se distribuem maioritariamente no intervalo de  $1\mu\text{m}$  a  $23\mu\text{m}$ .



**Figura 4.3.3.** Distribuição granulométrica das partículas de vidro bioactivo.

#### **4.4. Caracterização morfológica dos *scaffolds***

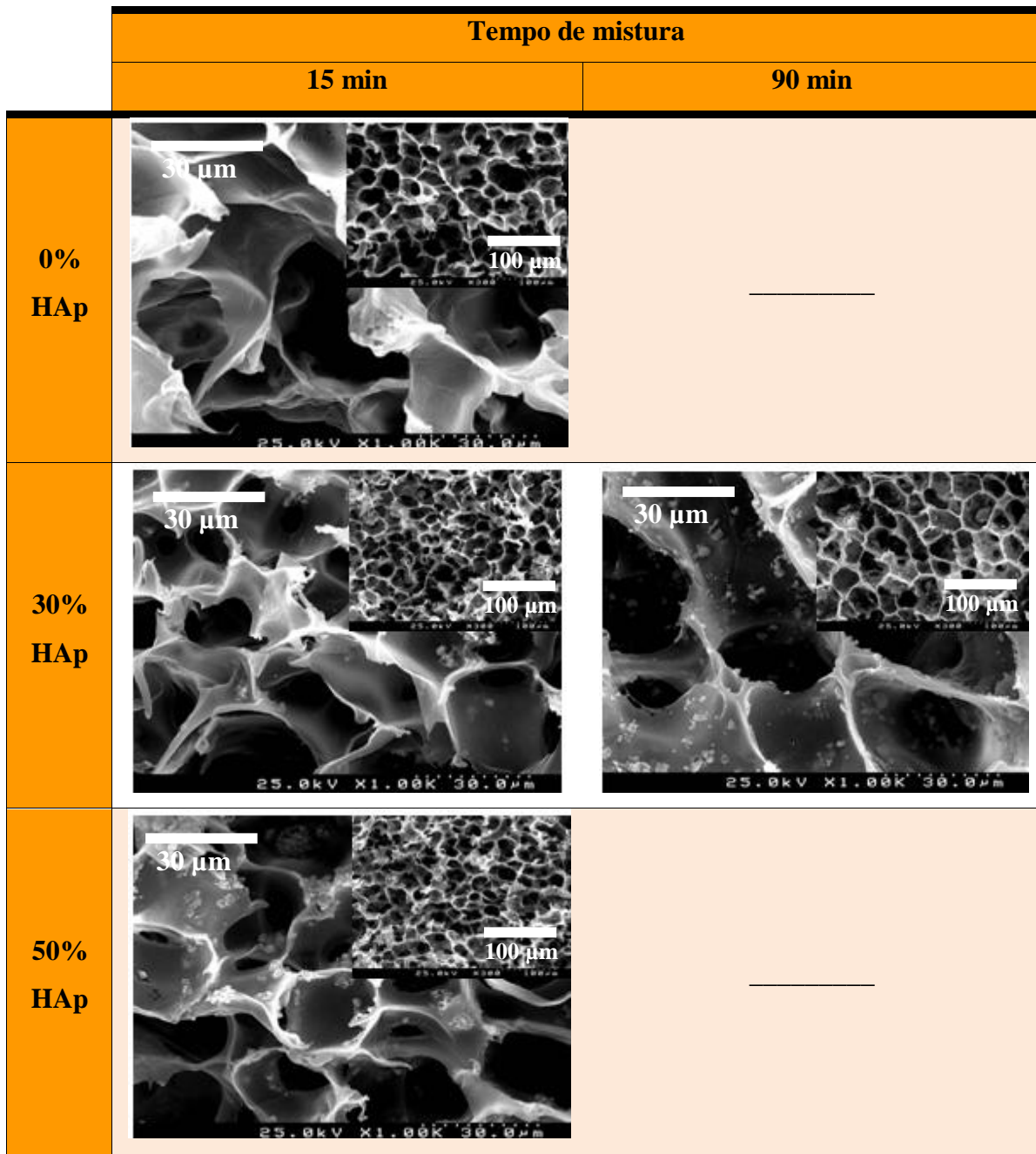
As micrografias dos *scaffolds* de PLLA/HAp preparados por TIPS para as condições na tabela 4.4.1. encontram-se nas figuras 4.4.1., 4.4.2. e 4.4.3..

**Tabela 4.4.1.** Condições de preparação dos *scaffolds* de PLLA/HAp com as microestruturas representadas nas figuras 4.4.1., 4.4.2. e 4.4.3..

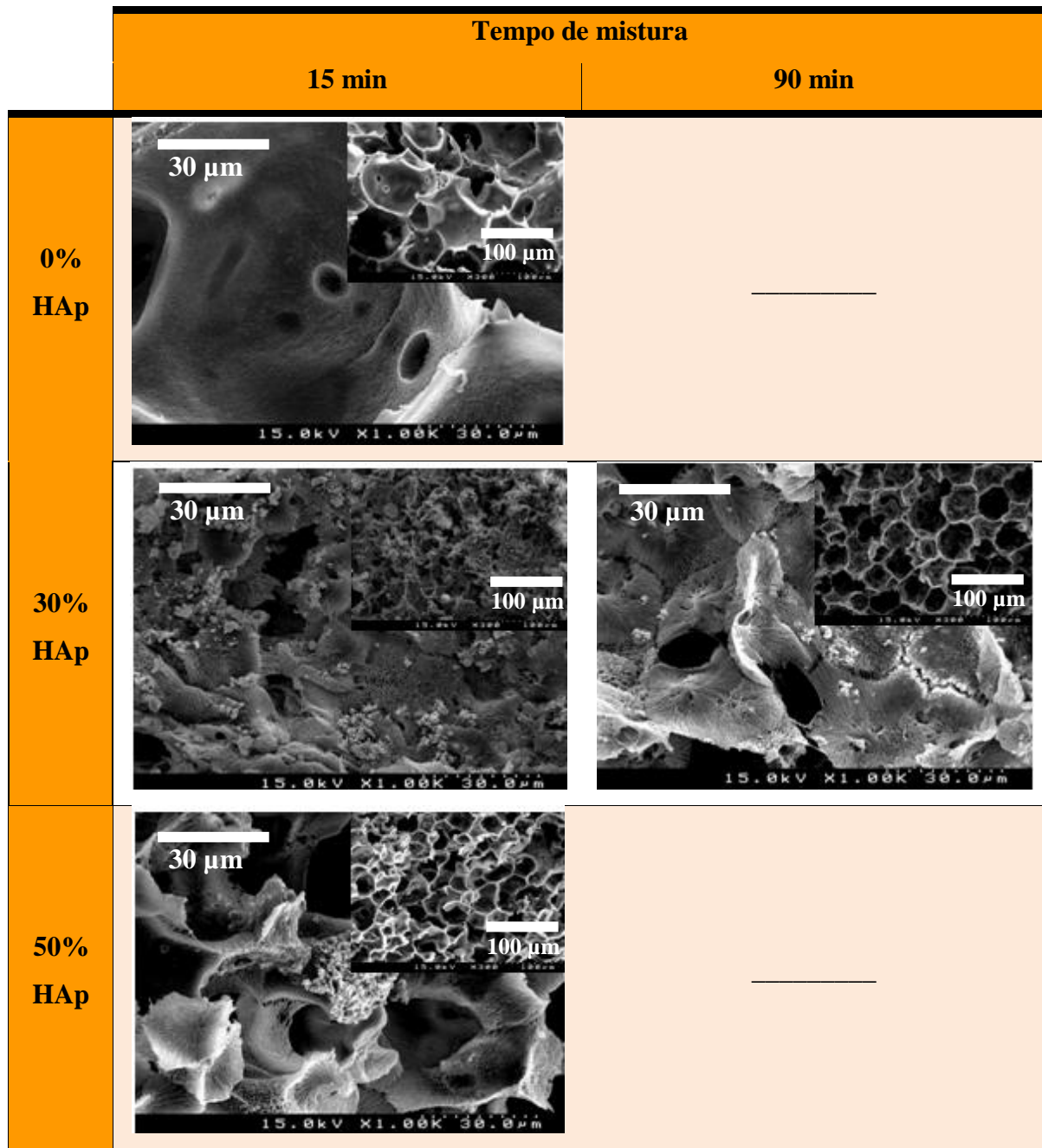
		Polímero	HAp (%)			
			t (min)	0	30	50
Temperatura de mistura	80°C	P1 (SF=10 min)	15	Figura 4.4.3.		
			90			
		P2 (SF=60 min)	15	Figura 4.4.1.		
			90			
	75°C	P2 (SF=60 min)	15	Figura 4.4.2.		
			90			

SF – Tempo de separação de fases

t(min) – Tempo de mistura

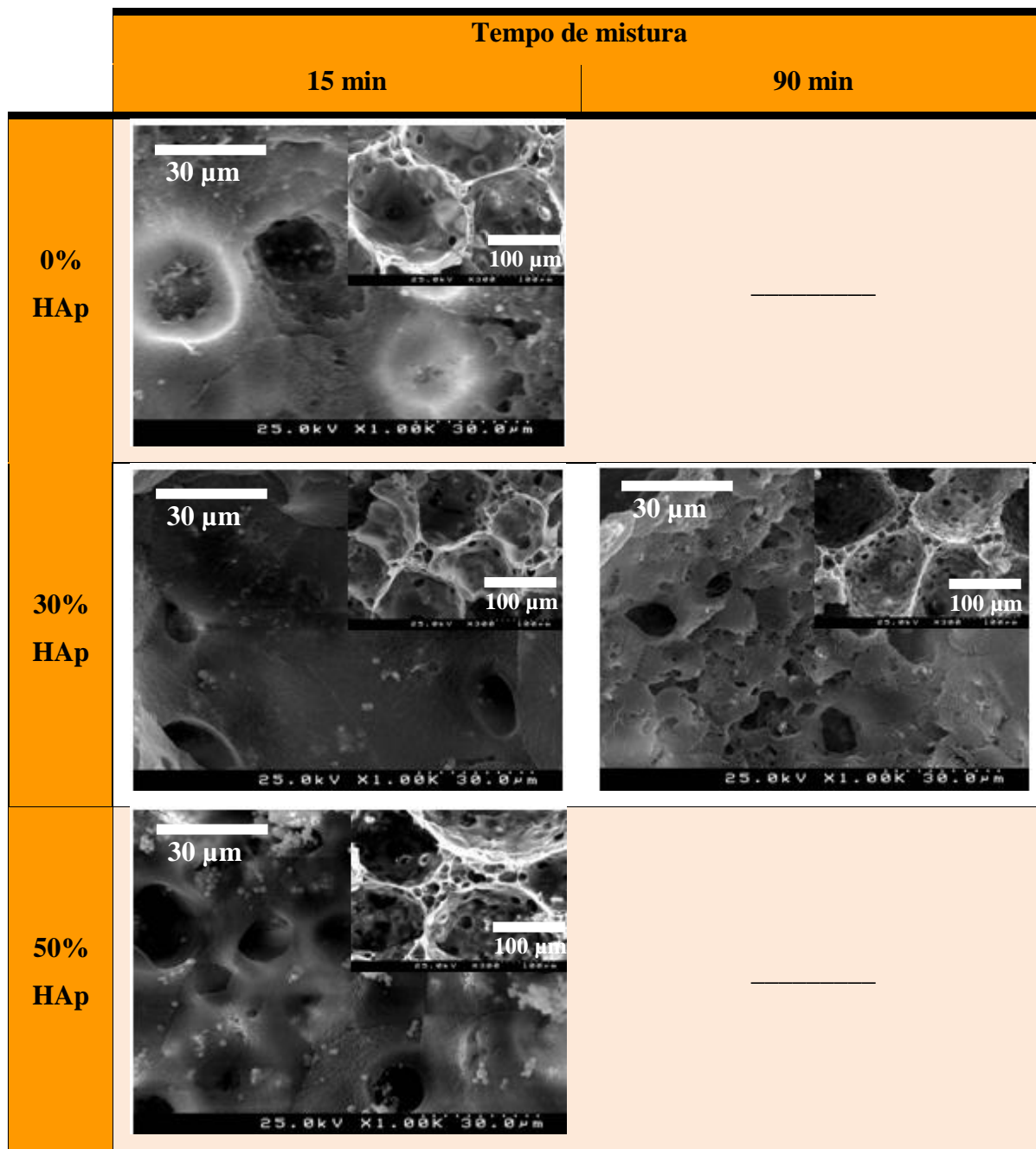


**Figura 4.4.1.** Micrografias dos *scaffolds* obtidos a partir de P2, sob agitação magnética (à temperatura de 80°C), com diferentes teores de hidroxiapatite (0, 30 e 50%), diferentes tempos de mistura (15 e 90 minutos) e um tempo separação de fases de 60 minutos, ampliação: 300x. As figuras inseridas correspondem a uma ampliação de 1.00Kx.



**Figura 4.4.2.** Micrografias dos *scaffolds* obtidos a partir de P2, sob agitação magnética (à temperatura de 75°C), com diferentes teores de hidroxiapatite (0, 30 e 50%), diferentes tempos de mistura (15 e 90 minutos) e um tempo de separação de fases de 60 minutos, ampliação:300x. As figuras inseridas correspondem a uma ampliação de 1.00Kx.





**Figura 4.4.3.** Micrografias dos *scaffolds* obtidos a partir de P1, sob agitação magnética (à temperatura de 80°C), com diferentes teores de hidroxiapatite (0, 30 e 50%), diferentes tempos de mistura (15 e 90 minutos) e um tempo de separação de fases de 10 minutos, ampliação: 300x. As figuras inseridas correspondem a uma ampliação de 1.00Kx.

Na tabela 4.4.2. são apresentados os valores do tamanho médio de poros dos *scaffolds*, calculados a partir da observação das micrografias (média de 10 poros por micrografia).



**Tabela 4.4.2.** Tamanho médio de poros dos *scaffolds* obtidos a partir de P1 e P2 para as condições experimentais indicadas.

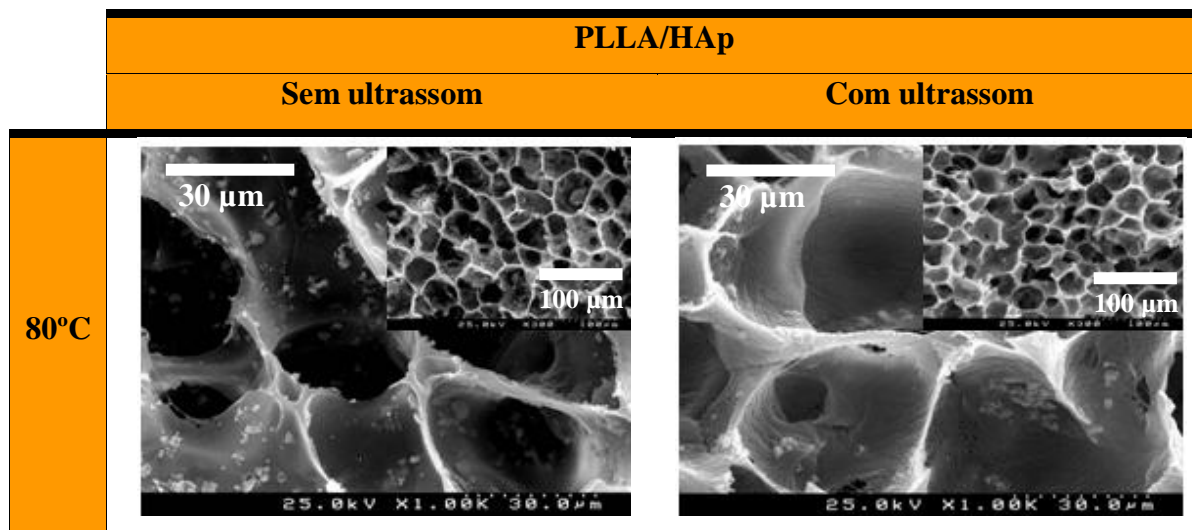
		Polímero	HAp (%)	0	30	50
			t (min)			
Temperatura de mistura	80°C	P1 (SF=10 min)	15	138 ± 68,3µm	111,2 ± 26,3 µm	138,3 ± 37,2 µm
			90	-	133,2 ± 17,1 µm	-
		P2 (SF=60 min)	15	39,1 ± 7 µm	37,3 ± 6 µm	36,4 ± 6,3 µm
			90	-	47,6 ± 10,3 µm	-
	75°C	P2 (SF=60 min)	15	84,8 ± 22,5 µm	39 ± 10,5 µm	49,2 ± 8,1 µm
			90	-	56,3 ± 7 µm	-

SF – Tempo de separação de fases

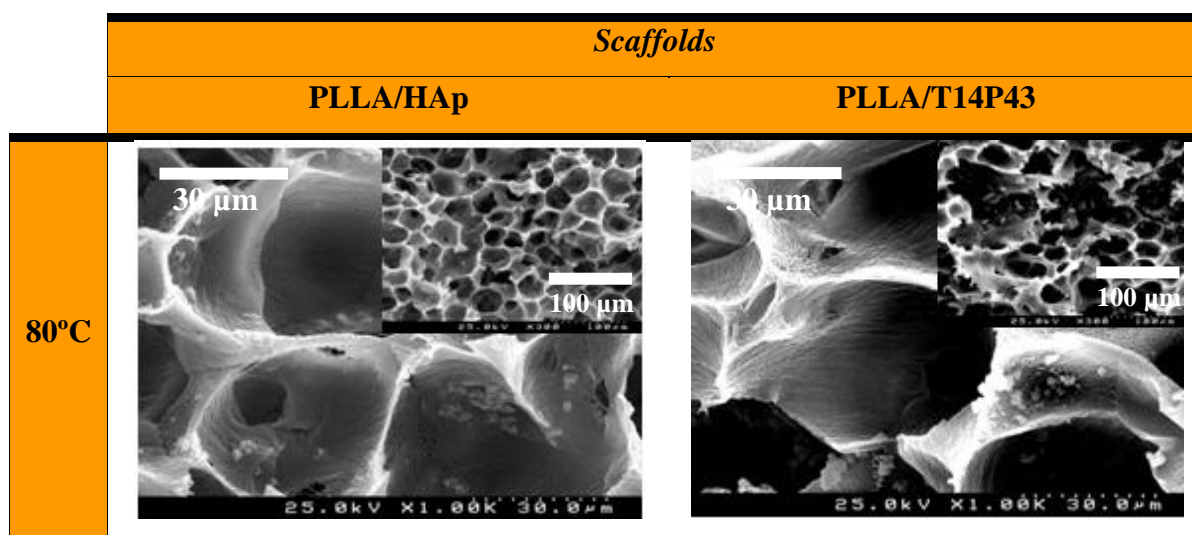
t(min) – Tempo de mistura

Uma vez que os *scaffolds* compósitos observados nas figuras 4.4.1, 4.4.2. e 4.4.3., apresentavam alguns aglomerados de partículas de hidroxiapatite, decidiu-se recorrer à agitação por ultrassons para homogeneizar as suspensões de PLLA/dioxano/água/hidroxiapatite. Foi colocada a água e o enchimento inorgânico em ultrassons e só depois se passou para a agitação magnética. Para efeitos de comparação foram também preparados *scaffolds* compósitos contendo vidro bioactivo, utilizando o mesmo método de ultrassons para misturar a suspensão de PLLA/dioxano/água/vidro bioactivo.

Na figura 4.4.4. estão representados os *scaffolds* de PLLA/HAp preparados sem agitação em ultrassons e com ultrassons, para comparação a nível da dispersão do enchimento inorgânico. As micrografias dos *scaffolds* produzidos nas mesmas condições de agitação (com ultrassons) e com diferentes fases de enchimento são apresentadas na figura 4.4.5..



**Figura 4.4.4.** Micrografias dos *scaffolds* obtidos a partir de P2 com 30% de hidroxiapatite, tempo de mistura de 90 minutos e tempo de separação de fases de 60 minutos, sem e com ultrassons, ampliação: 300x e 1.00Kx.



**Figura 4.4.5.** Micrografias dos *scaffolds* obtidos a partir de P2 com 30% de hidroxiapatite ou vidro bioactivo, tempo de mistura de 90 minutos e tempo de separação de fases de 60 minutos, ampliação: 300x e 1.00Kx.

Para comparar o efeito do enchimento nos *scaffolds* são apresentados na tabela 4.4.3. os valores do tamanho médio de poros das amostras de PLLA/HAp e PLLA/T14P43 para as mesmas condições de preparação.

**Tabela 4.4.3.** Tamanho médio de poros dos *scaffolds* de PLLA/HAp e PLLA/T14P43 obtidos a partir de P2 para as condições indicadas.

	Compósito	Tempo de mistura (min)	Tempo de Separação de Fases (min)	Diâmetro médio poros
80°C	P2 /30% HAp	90	60	42,2 ± 5,9µm
	P2 / 30% Vidro			54 ± 8,7µm

Nesta discussão dos resultados obtidos vão ser analisados diferentes parâmetros tendo em conta o seu efeito no tamanho de poros. Os parâmetros são os seguintes: o peso molecular do PLLA (P1 e P2), o tipo de enchimento inorgânico (hidroxiapatite ou vidro bioactivo), a percentagem de enchimento inorgânico (0, 30 e 50%), a temperatura de mistura (75 e 80°C), o tempo de mistura (15 e 90 minutos) e o tempo de separação de fases (10 e 60 minutos).

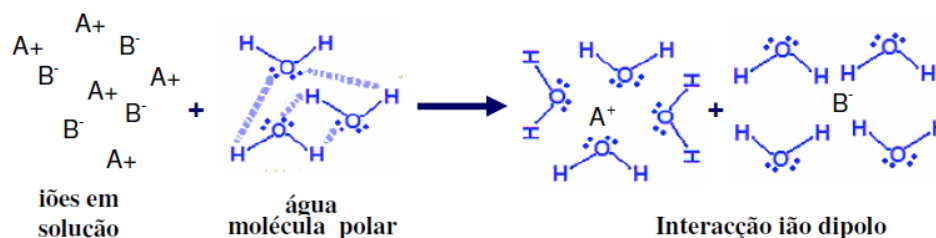
Com base nas micrografias dos diversos *scaffolds* verifica-se que, tanto os *scaffolds* compostos por P1 como os compostos por P2 possuem uma estrutura homogénea, na qual os poros apresentam uma forma oval ou circular.

Quanto ao tamanho de poros (tabela 4.4.2. e 4.4.3.), observa-se que os *scaffolds* preparados com P1 (PLLA de menor peso molecular) têm um tamanho de poros maior que os preparados com P2 (PLLA de maior peso molecular). No caso dos *scaffolds* preparados com P1, o tamanho de poros varia entre 111 e 138 µm enquanto que os preparados com P2 têm um tamanho de poros entre 36 e 84 µm.

A morfologia das estruturas porosas é diferente nos *scaffolds* preparados a partir de P1 ou de P2. Os *scaffolds* preparados com P1 têm poros maiores com pouca interconectividade, existindo nas paredes dos poros largos, poros mais pequenos. Em contrapartida os *scaffolds* preparados com P2 apresentam uma maior interconectividade, sugerindo que o mecanismo de separação de fases possa ser mais lento com P2 do que com P1, decomposição spinodal. O peso molecular do PLLA afecta a cinética da separação de fases, tal como verificado nos estudos de Atkinson *et al.* onde os resultados relatam que o tamanho médio de poros em membranas preparadas por separação de fases diminuiu com o aumento do peso molecular mesmo para condições idênticas de arrefecimento. (Atkinson *et al.*, 2000)

Relativamente à influência do tipo de enchimento inorgânico (hidroxiapatite ou vidro bioactivo) no tamanho dos poros, verifica-se que os poros são maiores nos *scaffolds* com vidro (54 µm) e menor nos *scaffolds* com hidroxiapatite (42 µm). Este resultado pode estar relacionado com a maior solubilidade do vidro bioactivo relativamente à hidroxiapatite. A

lixiviação de iões de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{2-}$  e  $\text{Ti}^{4+}$  provenientes do vidro são libertados para a solução formando interações ião-dipolo com os dipolos da água, como esquematicamente representado na figura 4.4.6.. As interações vão induzir o aumento da tensão superficial da água bem como o aumento da tensão interfacial entre as fases rica e pobre em polímero acelerando assim a separação das fases. (Barroca, 2008)



**Figura 4.4.6.** Formação ião-dipolo. (Barroca, 2008)

A percentagem de enchimento inorgânico (0, 30 e 50%) é um parâmetro que também influencia o tamanho dos poros. Verifica-se que a adição crescente de hidroxiapatite leva à diminuição do tamanho dos poros, ou seja, os *scaffolds* de PLLA sem enchimento apresentam poros com diâmetros superiores aos dos *scaffolds* compósitos (tabela 4.4.2.). Esta observação também é relatada na literatura para *scaffolds* de matriz polimérica com enchimentos inorgânicos. Verifica-se que, independentemente da técnica usada, o reforço inorgânico diminui ligeiramente o tamanho de poros pois ocupa parte do espaço dos poros. Wei *et al* observaram este efeito em *scaffolds* compósitos de PLLA com nanopartículas de hidroxiapatite. (Wei *et al.*, 2004)

No caso da temperatura de mistura (75 e 80°C) foi observado que, com a diminuição de 5°C da temperatura do banho, o tamanho de poros aumentou genericamente para as várias percentagens de enchimento, sendo mais notório no caso da ausência de fase inorgânica.

A influência dos tempos de mistura (15 e 90 minutos) é bastante importante porque com o aumento do tempo de mistura, espera-se aumentar a dissolução do enchimento inorgânico, aumentando assim o tamanho de poros. De facto, verifica-se que tanto para P1, como para P2 os compósitos com 30% de hidroxiapatite, o aumento do tamanho de poros foi de respectivamente 19,8 e 27,6%.

Relativamente ao tempo de separação de fases (10 e 60 minutos), este também controla o tamanho de poros porque é nesta altura que se separa a fase rica e a pobre em polímero. (Barroca *et al.*, 2009) No estudo presente não é possível fazer a comparação entre os dois polímeros, uma vez que para o P1 foi usado um tempo de separação de fases de 10 minutos e para o P2 60 minutos.

Foram seleccionados, para determinação da porosidade (%) de acordo com a equação 3.3.1., as amostras dos *scaffolds* preparados a partir de P2, com agitação magnética por ultrassons, com as designações P2-15-0HA-US, P2-90-30HA-US, P2-15-50HA-US, e P2-90-30T14P43-US. Esta selecção restrita baseou-se no facto destes *scaffolds* apresentarem um tamanho de poros (> 100 µm) adequado para aplicações em engenharia de tecido ósseo e uma maior interconectividade do que os outros tipos de *scaffolds* preparados. Os resultados são apresentados na tabela 4.4.4..

**Tabela 4.4.4.** Porosidade dos *scaffolds* com PLLA/HAp e PLLA/T14P43.

<i>Scaffolds</i>	HAp ou T14P43 (% em peso)	t (min)	Porosidade (%)
<b>PLLA</b> (SF = 60 min)	0	15	93,0
<b>PLLA/HAp</b> (SF = 60 min)	30	90	74,8
	50	15	91,5
<b>PLLA/T14P43</b> (SF = 60 min)	30	90	58,8

Analisando os valores da tabela verifica-se que a porosidade varia entre 58,8 e 93% com os maiores valores referentes ao enchimento de hidroxiapatite. No entanto, pela literatura os valores de porosidade de *scaffolds* preparados por separação de fases líquido-líquido com 30 e 50% de hidroxiapatite, na qual a porosidade é de aproximadamente 92,5% para os *scaffolds* com 30% de hidroxiapatite e entre 89,9% para os *scaffolds* com 50% de hidroxiapatite. (Zhang *et al.*, 1998)

Dado o pequeno número de amostras, não foi possível avaliar se os valores de porosidade para os diferentes *scaffolds* com hidroxiapatite ou vidro bioactivo são ou não significativamente diferentes.

Observando os valores de porosidade nos *scaffolds* de PLLA/HAp, verifica-se que os mesmos aumentam com o teor de hidroxiapatite. Este resultado pode atribuir-se ao facto de as partículas estarem a ocupar o espaço dos poros, sendo tanto maior quanto maior a percentagem de enchimento.

A porosidade dos *scaffolds* com 30% de hidroxiapatite é maior que a dos *scaffolds* com 30% de vidro bioactivo, porque as partículas de hidroxiapatite tem um tamanho médio de 1,585  $\mu\text{m}$  e as de vidro bioactivo de 18,5  $\mu\text{m}$ , o que poderá ser responsável por uma maior ocupação dos poros no caso da presença do vidro.

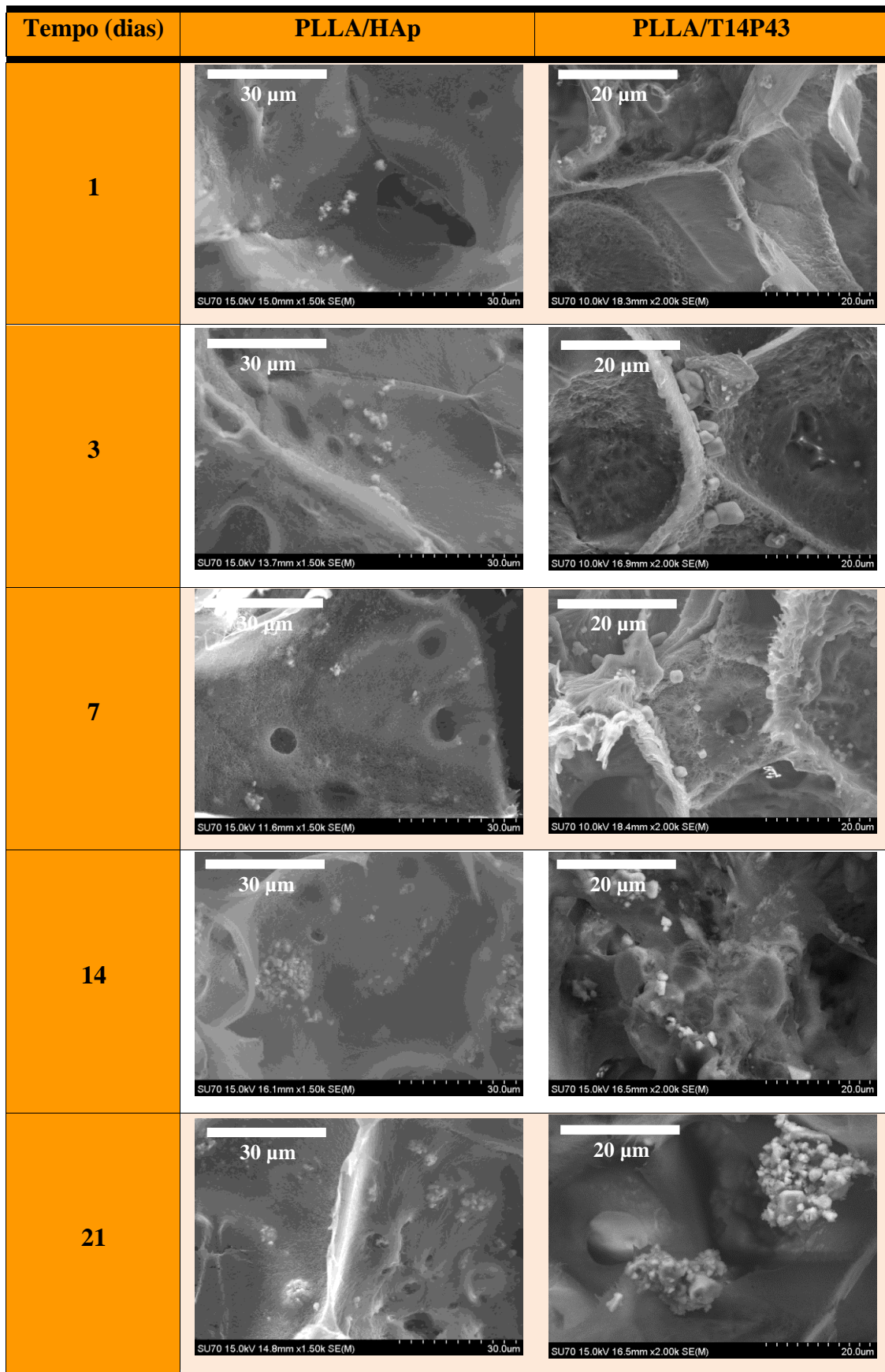
#### **4.5. Potencial bioactivo dos *scaffolds***

O potencial bioactivo *in vitro* dos *scaffolds* de PLLA/HAp e PLLA/T14P43, com o teor de 30%, foi testado por imersão no SBF de Kokubo. Os *scaffolds* seleccionados são constituídos por polímero de maior peso molecular (P2), uma vez que apresentavam maior interconectividade de poros, tendo assim maior interesse para serem usados na engenharia de tecidos.

A figura 4.5.1. mostra as micrografias dos *scaffolds* P2-90-30HA-US e P2-90-30T14P43-US, após a imersão em SBF durante 1, 3, 7, 14 e 21 dias.

Observa-se que, quer a nível macroscópico quer a nível microscópico, os *scaffolds* mantiveram a estrutura que tinham antes da imersão em SBF. Verifica-se ainda que os tempos de imersão usados não permitiram uma degradação significativa a nível macro e microscópico do PLLA. Esta degradação é habitualmente um processo muito lento, que depende de inúmeros factores como o peso molecular, e a cristalinidade, entre outros e não foi observada até 21 dias.

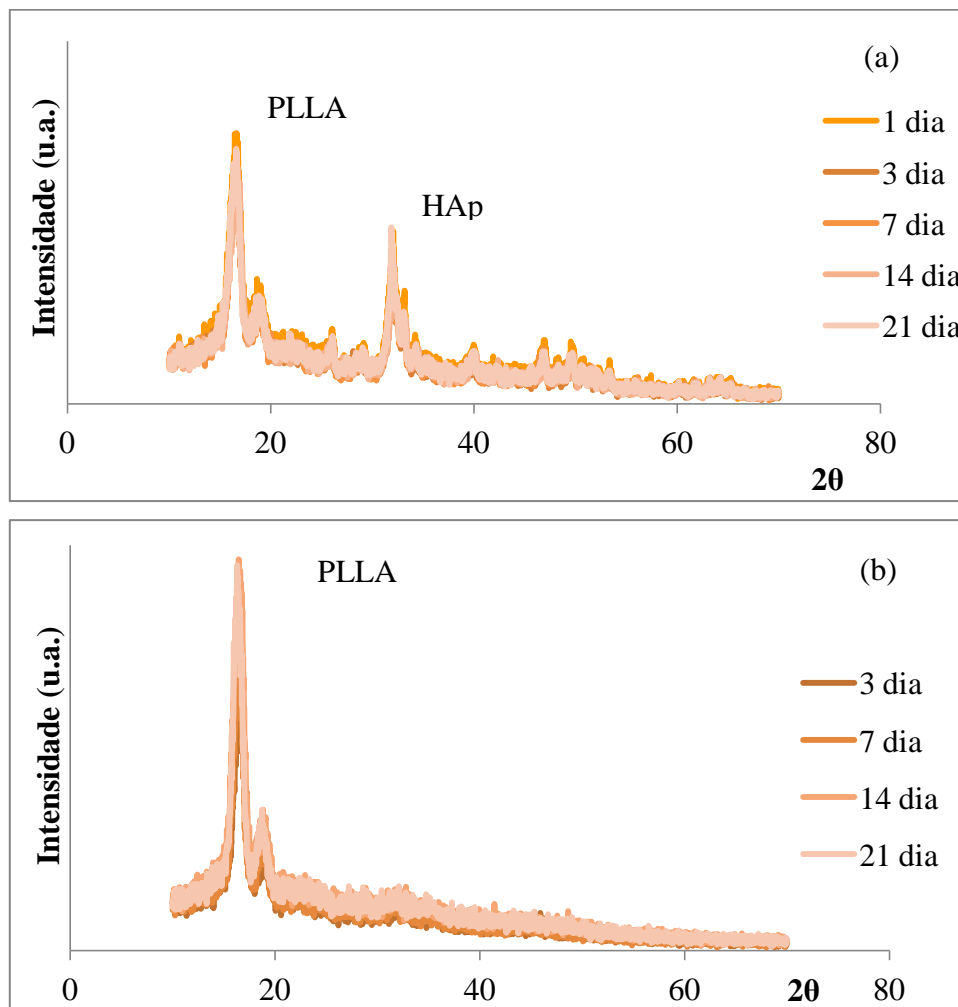




**Figura 4.5.1.** Micrografias do *scaffold* de PLLA/HAp e dos *scaffolds* PLLA/T14P43 com um teor de 30%, após imersão em SBF por 1, 3, 7, 14 e 21 dias.

A partir das micrografias apresentadas na figura 4.5.1., verifica-se que não existe formação de uma camada superficial nos poros dos compósitos, cuja morfologia possa indicar o desenvolvimento de uma fase apatítica. Observa-se apenas a formação de pequenos cristais cúbicos de NaCl, identificados em EDS e Raios-X, ao fim de alguns dias de imersão em SBF e que podem ter origem casual, por lavagem deficiente, por exemplo.

A figura 4.5.2. mostra os difractogramas de raios-X relativos aos *scaffolds* compósitos com 30% de hidroxiapatite e 30% de vidro bioactivo após a imersão por diferentes períodos de tempo em SBF.

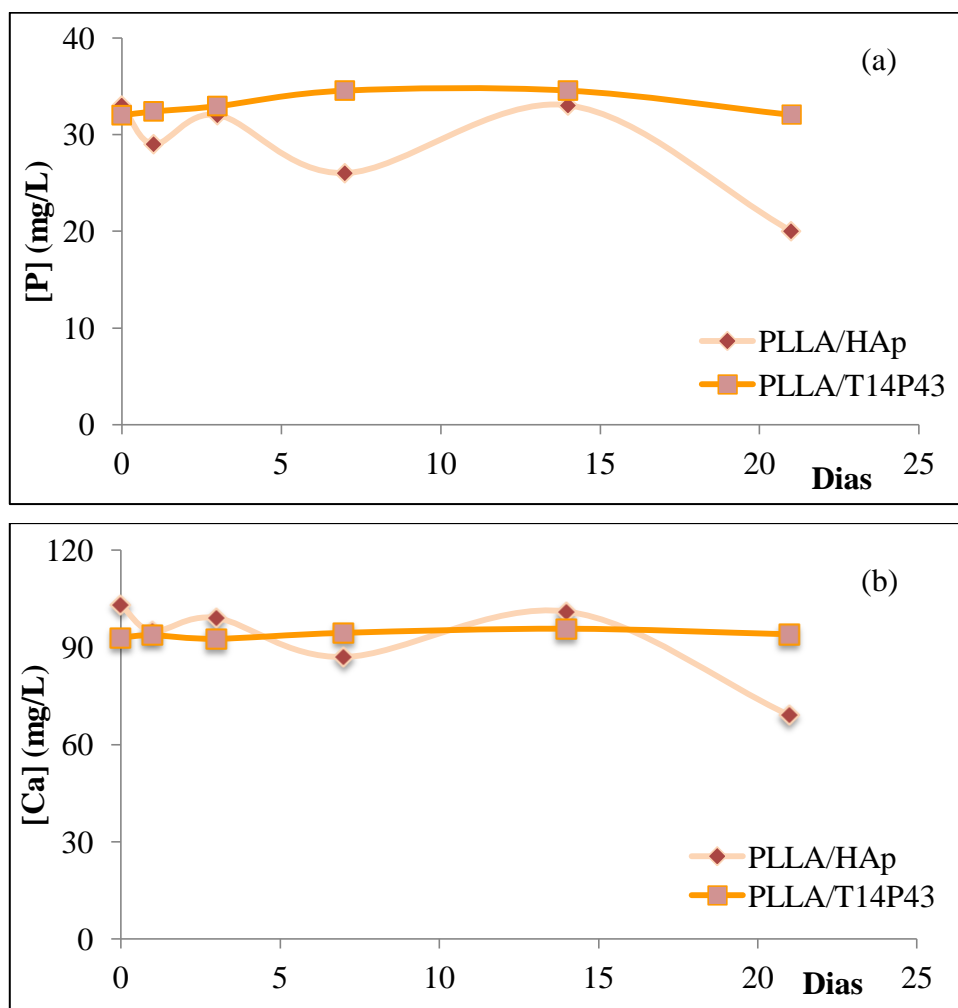


**Figura 4.5.2.** Difractograma de difracção de raios-X no *scaffold* P2-90-30HA-US (a) e P2-90-30T14P43-US (b) após imersão em SBF para 1, 3, 7, 14 e 21 dias.

Estes difractogramas confirmam as observações feitas nas microscopias pois não há alterações dos picos à medida que o tempo de imersão em SBF aumenta.



A figura 4.5.3. apresenta a evolução da concentração em iões Ca e P no SBF durante o ensaio de bioactividade. Estão ilustradas as concentrações iónicas no SBF residual depois da imersão dos *scaffolds* por períodos de tempo de 1, 4, 7, 14 e 21 dias.



**Figura 4.5.3.** Evolução da concentração iónica em P (a) e Ca (b) no SBF durante o ensaio de bioactividade.

Para os dois compósitos as concentrações iónicas de P e Ca em SBF mantêm-se genericamente constantes, com alguma oscilação nos valores referentes aos compósitos PLLA/HAp.

Apenas para o maior tempo de 21 dias, se observa um ligeiro consumo de Ca e P da solução no caso da imersão dos compósitos de PLLA/HAp, o que surge a formação de um composto de fosfato de cálcio, nem sempre detectado por DRX. O recurso a EDS para avaliação da relação Ca/P na superfície dos poros não se revelou eficaz, uma vez que o vidro possui já na sua composição os elementos Ca e P.

O PLLA é um material não bioactivo. A incorporação de uma fase bioactiva (a hidroxiapatite ou o vidro bioactivo) no compósito está usualmente associada à criação de alguma reactividade superficial no compósito.

Um estudo feito com um vidro bioactivo com composição à base de sílica num compósito de matriz de PLLA, indica que existe bioactividade aquando de um teor de vidro de 30%, após 1 dia de imersão. (Barroca *et al.*, 2009)

Em *scaffolds*, desenvolvidos pelo método de prototipagem rápida, com o mesmo vidro utilizado neste trabalho, foi encontrada bioactividade ao fim de 14 e 21 dias. (Pires, 2011)

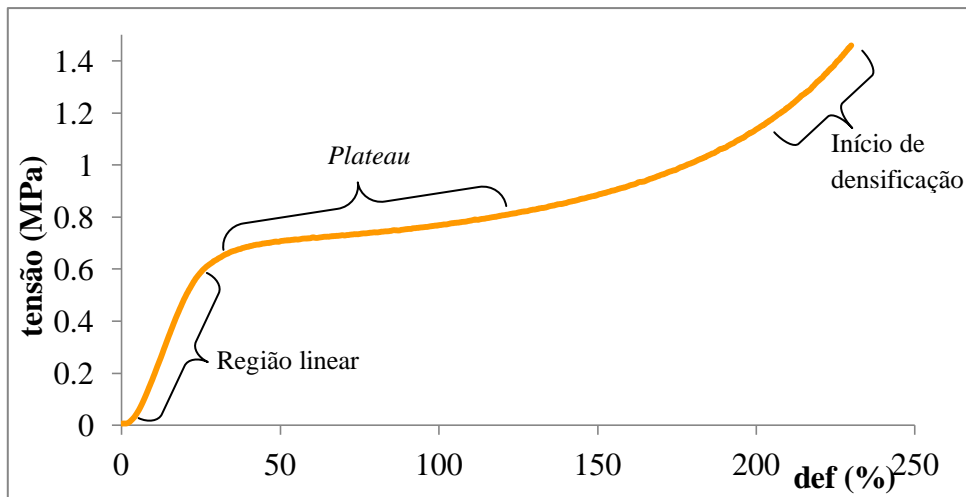
A não observação de bioactividade *in vitro* no vidro associada à precipitação de fosfato de cálcio, não significa ausência da mesma nos compósitos estudados. A avaliar pelo resultado de ICP após 21 dias de imersão, em que se detectou, para os compósitos de PLLA/HAp, consumo de Ca e P, é provável que o tempo de 21 dias seja ainda muito curto, sendo necessário usar tempos mais longos para poder quantificar a precipitação de algum fosfato de cálcio.

#### **4.6. Propriedades mecânicas**

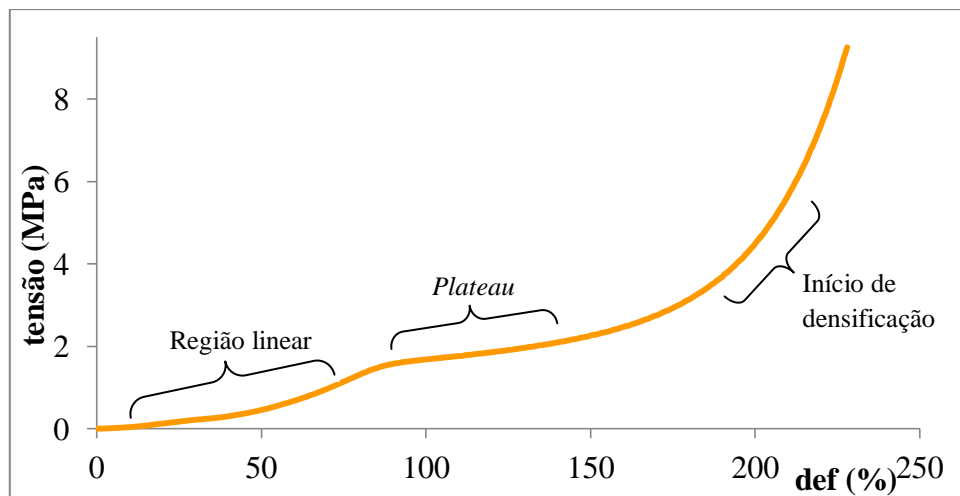
Para determinar o efeito da hidroxiapatite e do vidro bioactivo nas propriedades mecânicas, foram testados *scaffolds* preparados a partir de P2 com um tempo de separação de fases de 90 minutos e teor de hidroxiapatite ou vidro bioactivo de 30%, P2-90-30HA-US e P2-90-30T14P43-US.

O comportamento mecânico dos dois *scaffolds* nos ensaios de compressão pode ser analisado nas figuras 4.6.1 e 4.6.2., que representam as respectivas curvas de tensão-deformação.

Verifica-se que à medida que a deformação aumenta, as amostras manifestam um comportamento elástico seguido de um longo *plateau* e da densificação final.



**Figura 4.6.1.** Curva tensão-deformação de um *scaffold* compósito preparado a partir de P2 com um tempo de separação de fases de 90 minutos e 30% de hidroxiapatite.



**Figura 4.6.2.** Curva tensão-deformação de um *scaffold* compósito preparado a partir de P2 com um tempo de separação de fases de 90 minutos e 30% de vidro bioativo.

Para calcular o módulo elástico ( $E$ ) foi utilizada a região linear da curva, segundo a lei de Hooke, e a tensão de cedência ( $\sigma$ ) foi determinada a partir do ponto em que a tangente à região linear se cruza com a tangente do *plateau*.

A tabela 4.6.1 mostra os valores médios do módulo de elasticidade e da tensão de cedência dos *scaffolds* P2-90-30HA-US e P2-30-30T14P43-US.

**Tabela 4.6.1.** Módulo de elasticidade e tensão de cedência dos *scaffolds* P2-90-3HA-US e P2-90-30T14P43-US.

	<b>E (médio) (MPa)</b>	<b><math>\sigma</math> (médio) (MPa)</b>
<b>P2-90-30HA</b>	2,57 $\pm$ 0,08	0,72 $\pm$ 0,06
<b>P2-90-30T14P43</b>	1,51 $\pm$ 0,47	0,35 $\pm$ 0,06

Quer os valores do módulo elástico quer o da tensão de cedência são inferiores aos medidos no osso trabecular, que são respectivamente na gama de 20 e 500 MPa para o módulo elástico e entre 4 e 12 MPa para a tensão de cedência. (Yang *et al.*, 2001)

Analisando as curvas de tensão-deformação, verifica-se que a amostra P2-90-30HA-US apresenta um maior *plateau* comparativamente com a amostra P2-90-30T14P43-US, o que indica que a hidroxiapatite confere uma maior resistência à deformação relativamente ao vidro bioactivo.

Os compósitos P2-90-30T14P43 apresentaram por um módulo elástico e uma tensão de cedência inferiores (tabela 4.6.1.) aos dos compósitos P2-90-30HA.

Zhang *et al.* mediram o módulo de elasticidade e a tensão de cedência de *scaffolds* compósitos de PLLA/HAp, obtidos pelo método TIPS e obtiveram um módulo de elasticidade à compressão de aproximadamente 11 MPa e uma tensão de cedência de aproximadamente 0,98 MPa. (Zhang *et al.*, 1998)

Noutro estudo, Barroca *et al.* prepararam *scaffolds* de PLLA/vidro pelo mesmo método de TIPS, utilizando um polímero com o mesmo peso molecular e um tempo de separação de fases de 120 minutos, obtiveram valores de módulo de elasticidade de aproximadamente 10,88 MPa e de tensão de cedência de 0,753 MPa para a mesma percentagem de enchimento.

Os valores do módulo e da tensão de cedência reportados na literatura são, em ambos os casos, superiores aos encontrados no presente trabalho. Detalhes, não disponíveis, sobre a morfologia e tamanho médio de poros, sobre a percentagem da porosidade e sobre o equipamento utilizado seriam fundamentais para uma discussão mais aprofundada.

## 5. Conclusões gerais

Durante este trabalho foram preparados *scaffolds* de PLLA e *scaffolds* compósitos de PLLA/HAp e PLLA/T14P43 por separação de fases termicamente induzida de soluções de 5,5 ou 6,5% PLLA/dioxano/água/hidroxiapatite e PLLA/dioxano/água/vidro bioactivo, seguida de congelação e liofilização. Usaram-se PLLA com dois pesos moleculares diferentes, P1 ( $M_w \geq 63624 \text{ g.mol}^{-1}$ ) e P2 ( $M_w \geq 190707 \text{ g.mol}^{-1}$ ), e teores de hidroxiapatite ou vidro bioactivo entre 10 a 50% (m/m).

Os *scaffolds* obtidos possuem diferentes morfologias. Os que foram produzidos a partir de P1 apresentaram poros largos e pouco interconectados, com um tamanho de poros entre 111 e 138  $\mu\text{m}$ , enquanto que os preparados com P2 têm um tamanho de poros entre 36 e 84  $\mu\text{m}$ , sendo os poros mais interconectados.

A presença crescente de hidroxiapatite nos *scaffolds* não induziu aumento do tamanho de poros. No caso dos *scaffolds* com vidro bioactivo foi possível observar que existe um ligeiro aumento do tamanho de poros em relação aos *scaffolds* com hidroxiapatite, associado ao facto de a hidroxiapatite ser um cerâmico menos hidrossolúvel que o vidro.

Quanto ao potencial bioactivo dos *scaffolds* compósitos, verificou-se que não há formação de uma camada apatítica nos dois tipos de *scaffolds*, até 21 dias de imersão em SBF. A realização de ensaios para tempos mais longos poderá clarificar os resultados.

Sobre as propriedades mecânicas, a presença da hidroxiapatite ou vidro bioactivo mostrou ter uma influência diferenciadora entre as duas fases de reforço. Os baixos valores do módulo e da tensão de cedência, comparativamente com os valores apontados para o osso trabecular sugerem que os materiais compósitos desenvolvidos podem ter aplicações em estratégias ex-vivo de engenharia de tecidos.

## 6. Trabalho futuro

Nos *scaffolds* de PLLA, PLLA/HAp e PLLA/T14P43 preparados neste trabalho, existem características e condições que podem ser optimizadas e outras que necessitam deser investigadas.

Uma das condições a investigar, é por exemplo, o tempo de separação de fases, que é revelante para a morfologia e tamanho de poros.

A avaliação do efeito do peso molecular e cristalinidade da matriz polimérica na degradação do compósito também se revelou ser importante, sobretudo porque a bioactividade *in vitro* é um processo directamente relacionado com a extensão da degradação do compósito.

Apesar dos dois tipos de compósitos (com 30% de fase de enchimento) não serem dotados de bioactividade, para os tempos testados (até 21 dias) poder-se-ia proceder a ensaios celulares pois a proporção de hidroxiapatite ou vidro bioactivo no *scaffold* parece indicada para garantir condições de não citotoxicidade.

## 7. Bibliografia

Aoki, H. 1994. Science and medical applications of hydroxyapatite. Japanese Association of Apatite Science, Tokyo, St Louis, pp. 214.

Agarwal, S., Wendorff, J. H., Greiner, A. 2008. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer* **49**: 5603–5621.

Atkinson, P. M., Lloyd, D. R. 2000. Anisotropic flat sheet membrane formation via TIPS: atmospheric convection and polymer molecular weight effects. *Journal of Membrane Science* **175**: 225-238.

Barroca, N. B. 2008. Scaffolds à base de polímeros piezoelétricos para regeneração óssea [dissertação]. Editora: Universidade de Aveiro, 142 pp. Disponível: Universidade de Aveiro.

Barroca, N., Daniel-da-Silva, A. L., Vilarinho, P. M., Fernandes, M. H. V. 2009. Tailoring the morphology of high molecular weight PLLA scaffolds through bioglass addition. *Journal of Materials Science* **6**: 3611–3620.

Chen, Q., Roether, J. A., Boccaccini, A. R. 2008. Tissue Engineering Scaffolds from Bioactive Glass and Composite Materials. *Topics in Tissue Engineering* **4**: 1-27.

Cruz, F. 2010. Fabrication of HA/PLLA composites scaffolds for bone tissue engineering using additive manufacturing technologies. *Materials Science* 227-236.

Compston, J. E., Rosen, C. J. 1999. Pathophysiology. In Osteoporosis. 2ª Edição, Oxford Health Press.

Doshi, J., Reneker, D. H. 1995. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of Electrostatics* **35**: 151-160.

Guerra, P. 2012. “Engenharia de tecidos.” Disponível: <http://engbiotec.wordpress.com/2012/09/20/> [data de consulta: 9/10/2012].

Healy, K. E., Guldberg, R. E. 2007. Bone tissue engineering. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **4**: 328-330.

Hill, P. A., B. D. S., F. D. S., Orth., M., B. SC, M. SC. 1999. Remodelação Óssea. *Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial* **4**: 56-62.

Iakada, Y. 1994. Surface Modification of Polymers for Medical Applications. *Biomaterials* **15**:725-36.

Jordan, T. L., Ounaies, Z. 2001. Piezoelectric ceramics characterization. *National Aeronautics and Space Administration* **28**: 1-25.

Kokubo, T., Takadama, H. 2006. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?. *Biomaterials* **27**: 2907–2915.

Lee, I-C., Cheng,L.-P., Young, T.-H. 2005. Role of phase diagram of membrane formation system in controlling the crystallinity and degradation rate of PLLA membranes. *Wiley InterScience* **76**: 842-850.

Mano, J. F., Wang, Y., Viana, J. C., Denchev, Z., Oliveira, M. J. 2004. Cold crystallization of PLLA studied by simultaneous SAXS and WAXS. *Macromolecular Materials and Engeneering*. **289**: 910-915.

Martínez-Pérez, C. A., Olivas-Armendariz, I.,Castro-Carmona, J. S., García-Casillas, P. E. 2011. Scaffolds for Tissue Engineering Via Thermally Induced Phase Separation. 275-294 pp. In: *Advances in Regenerative Medicine* (Sabine Wislet-Gendebien), InTech Europe, México.

Mikos, A. G, Thorsen, A. J., Czerwonka, L. A., Bao, Y., Langer, R., Winslow, D. N., Vacanti, J. P. 1994. *Polymer*. **35**: 1068.

Monteiro, N. S. 2008. Caracterização de matrizes de quitosano para a regeneração de tecidos produzidas pela técnica de TIPS [dissertação]. Editora: Faculdade de Ciências e Tecnologia, 104 pp. Disponível: Universidade Nova de Lisboa.



Rivera-Muñoz, E. M. 2011. Hydroxyapatite-based materials: synthesis and characterization. *Biomedical Engineering – Frontiers and Challenge* 75-98.

Nam, Y. S., Park, T. G. 1999. Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation. *Journal of Biomedical Materials Research* **47**.

Nordin, M., Frankel, V. H. 2001. Basic Biomechanics of the Musculoskeletal System, 3ª Edição. USA, pp.469.

Pires, L. S. O. 2011. Biocerâmicos e biovidro para prototipagem 3D: propriedades e formulações. [dissertação]. Editora: Universidade de Aveiro, 120 pp. Disponível: Universidade de Aveiro.

Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Frederick, J., Schoen, M. D., Lemons, J. E. 2004. Biomaterials Science, 2ª Edição. San Diego, California, USA, London, UK, pp. 879.

Remodelação óssea. 2005. Disponível: <http://www.ns.umich.edu/new/> [data de consulta: 9/10/2012].

Rezwana, K., Chena, Q. Z., Blakera, J. J., Boccaccini, A. R. 2006. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **27**: 3413–3431.

Ribeiro, P. V. C. 2013. “Fisiopatologia do osso”. Disponível: <http://pt.scribd.com/doc/> [data de consulta: 9/10/2012].

Salgado, A. J., Coutinho, O. P., Reis, R. L. 2004. Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. *Macromolecular Bioscience* **4**: 743–765.

Seeman E. 2002. Pathogenesis of bone fragility in women and men. *Lancet* **359**: 1841-50.  
Sistema esquelético. Disponível: <http://www.professoronline.ac.mz/biologia/esqueleto.htm>  
[data de consulta: 9/10/2012].

- Silva, A. M. B., Correia, R. N., Oliveira, J. M., Fernandes, M. H. V. 2008. Effect of TiO<sub>2</sub> and SiO<sub>2</sub> on surface reactivity of calcium phosphate glasses in SBF. *Materials Science Forum* **587-588**: 138-142.
- Temenoff, J. S., Mikos, A. G. 2007. *Biomaterials: The Intersection of Biology and Materials Science*. 1ª Edição. Prentice Hall, pp. 471.
- Thomson, R. C., Yaszemski, M. J., Powers, J. M., Mikos, A. G. 1995. Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone. *Journal Biomater Sci Polym* **7**:23.
- Tian, T., Jiang, D., Zhang, J., Lin, Q. 2008. Fabrication of bioactive composite by developing PLLA onto the framework of sintered HA scaffold. *Materials Science and Engineering* **28**: 51-56.
- Tu, C., Cai, Q., Yang, J., Wan, Y., Bei, J. 2003. The fabrication and characterization of poly(lactic acid) scaffolds for tissue engineering by improved solid-liquid phase separation. *Polymers for Advanced Technologies* **14**: 565-573.
- Van de Witte, P., Dijkstra, P. J., Van den Berg, J. W. A., Feijen, J. 1996. Phase separation processes in polymer solutions in relation to membrane formation. *Journal of Membrane Science* **117**: 1-31.
- Wei, G., Ma, P. X. 2004. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **25**: 4749-4757.
- Yang, S., Leong, K.-F., Du, Z., Chua, C.-K. 2001. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional Factors. *Tissue Engineering* **7**: 679-689.
- Zhang, R., Ma, P. X. 1999. Porous poly(L-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process. *Journal of Biomedical Materials Research* **45**: 285-293.
- Zhang, R., Ma, P. X. 1998. Poly(a-hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology. *Journal Biomed Mater* **4**: 446-455.