

MARIANA ZAGHETE BERTOCHI

**“Scaffolds de polihidroxibutirato construídos por prototipagem rápida
funcionalizados com hidroxiapatita e peptídeo osteogênico”**

Araraquara

2013

MARIANA ZAGHETE BERTOCHI

**“Scaffolds de polihidroxibutirato construídos por prototipagem rápida
funcionalizados com hidroxiapatita e peptídeo osteogênico”**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Araraquara,
da Universidade Estadual Paulista para
obtenção do grau de
Farmacêutica-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Sidney José Lima Ribeiro

Co-orientadora: Dra. Sybele Specian Saska

Araraquara

2013

Dedicatória

A Deus, por estar sempre presente em minha vida, me orientar a fazer as escolhas certas e iluminar meus passos.

Dedico este trabalho também aos meus pais, meu irmão e minha cunhada pela confiança em minha capacidade e talento, pelo incentivo inesgotável e por não medirem esforços para me ajudar e apoiar. Esse trabalho não seria possível sem vocês ao meu lado.

Agradecimentos

Ao meu orientador, *Sidney José Lima Ribeiro*, pelo apoio à pesquisa e conselhos. Obrigada por sempre deixar as portas abertas e me incentivar a conhecer melhor o “mundo” da pesquisa.

A minha co-orientadora, *Sybele Specian Saska*, por todos os ensinamentos, incentivo e pela disponibilidade e paciência em sanar minhas dúvidas, e me ajudar.

Ao grupo de Materiais Fotônicos pelo convívio.

Ao Centro de Tecnologia de Informação Renato Archer, especialmente ao *Marcelo Fernandes de Oliveira*, *Izaque Alves Maia* e *Jorge Vicente Lopes da Silva*, pelo fornecimento dos *scaffolds*.

A todos os docentes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas que contribuíram para minha formação acadêmica.

Ao Instituto de Química por fornecer e disponibilizar toda a infra-estrutura, para o desenvolvimento do projeto.

A minha família, que mesmo sem conhecer “o meu mundo” na Universidade sempre confiou em meu potencial e talento.

Aos amigos de faculdade, agora amigos para vida inteira, com os quais compartilhei todas as alegrias, conquistas e dificuldades enfrentadas durante o desenvolvimento do projeto. Obrigada por me incentivarem e por fazerem essa jornada mais suave de se enfrentar.

As minhas grandes amigas de Araraquara, pela confiança em meu talento, por alegrarem os dias mais difíceis e pelo incentivo. Sem vocês tudo seria mais difícil.
Muito obrigada!

SUMÁRIO

1. Introdução	13
1.1. Scaffolds	13
1.2. Prototipagem rápida	15
1.3. Biomateriais	16
1.4. Compósitos	18
1.5. Polihidroxibutirato	19
1.6. Hidroxiapatita	21
1.7. OGP	25
1.8. Lipossomas	26
2. Objetivos	31
3. Materiais e Métodos	32
3.1 Confeção dos scaffolds de PHB	33
3.2. Preparação dos compósitos de polihidroxibutirato e apatita (PHB-CaP)	34
3.3 Preparo dos lipossomas contendo o OGP marcado com carboxifluoresceína (CF) ou triptofano (W)	35
3.4 Incorporação dos peptídeos OGP-CF	36
3.5 Caracterização dos compósitos	38
3.5.1 Microscopia eletrônica de varredura/espectroscopia de energia dispersiva (MEV/EDS)	39
3.5.2 Absorção atômica	39
3.5.3 Difractometria de Raios - X (DRX)	40
3.5.4 Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)	41
3.5.5 Análise termogravimétrica (TG)	41
3.5.6 Espalhamento de Luz	42
3.5.7 Dicroísmo Circular	43
3.6 Determinação da liberação do peptídeo nos compósitos	43
4. Resultados e Discussão	46

4.1 Caracterização dos compósitos	46
4.1.1 Microscopia eletrônica de varredura/espectroscopia de energia dispersiva (MEV/EDS)	46
4.1.2 Análise por Espectroscopia de energia dispersiva- Imagem espectral	49
4.1.3 Absorção atômica	54
4.1.4 Difratomia de Raio-x (DR-X)	58
4.1.5 Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)	61
4.1.6 Análise termogravimétrica (TG)	63
4.1.7 Espalhamento de luz (DLS)	65
4.1.8 Dicroísmo circular (CD)	68
4.2 Determinação da liberação do peptídeo nos compósitos	70
5. Conclusão	73
6. Perspectivas	74
7. Referência Bibliográfica	76

RESUMO

Com a evolução da engenharia tecidual novos materiais estão sendo estudados visando o tratamento de defeitos ósseos. O objetivo deste projeto foi preparar e caracterizar *scaffolds* a base de polihidroxibutirato (PHB), apatita e peptídeo osteogênico, *osteogenic growth peptide* (OGP), para aplicação em reparação óssea. Além disso, avaliar a liberação prolongada do peptídeo incorporado aos *scaffolds* na forma livre ou incorporado a lipossomas. Os *scaffolds* de PHB foram confeccionados por prototipagem rápida (PR) empregando a tecnologia *Selective Laser Sintering* (SLS). Posteriormente, a apatita foi incorporada *in situ* por meio de ciclos alternados de imersão em soluções de CaCl_2 e Na_2HPO_4 , respectivamente. Neste estudo foram selecionadas 2 marcações para o OGP, uma com 5,6-carboxifluoresceína (CF) e outra com triptofano (W), para análise de liberação prolongada. Os peptídeos foram incorporados ao sistema de liberação no momento de seu preparo. A caracterização por espalhamento de luz dos sistemas de liberação desenvolvidos mostrou que os peptídeos marcados com CF foram os melhores desenvolvidos. Portanto estes peptídeos foram adsorvidos nos *scaffolds* de PHB-CaP. Estudos *in vitro* foram realizados para avaliar o perfil de liberação do peptídeo OGP-CF do sistema de liberação controlada. A incorporação da apatita às matrizes de PHB foi confirmada por análises de microscopia eletrônica de varredura/espectroscopia de energia dispersiva (MEV/EDS), espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), absorção atômica, a difratometria de raios-X (DRX). Estas análises sugeriram que a principal fase precipitada foi β -TCP. O sistema de liberação lipossoma/OGP-CF foi caracterizado pelas análises de dicroísmo circular e espalhamento de luz, que confirmaram a presença do peptídeo nas amostras. Após a análise da liberação, observou-se que o sistema PHB-CaP/OGP-CF obteve bom

resultado, tendo sua liberação prolongada nas primeiras 10 h. Desta forma, os *scaffolds* de PHB-CaP com OGP poderão tornar-se materiais em potencial para engenharia tecidual óssea.

Palavras-chaves: *scaffolds*, lipossomas, hidroxiapatita, engenharia tecidual, prototipagem rápida, polihidroxibutirato, peptídeos osteogênicos, regeneração óssea.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática de lipossomas: multilamelar (a) e unilamelar (b).....	28
Figura 2 - Fluxograma da metodologia desenvolvida.....	32
Figura 3 - Modelo virtual 3D dos scaffolds de PHB seguindo as respectivas dimensões para aplicação em futuros estudo in vitro.....	33
Figura 4 - Processo de confecção dos scaffolds de PHB por SLS.....	34
Figura 5 - Sistema utilizado no estudo de liberação. Sistema completo (A), Aproximação do recipiente contendo as amostras e o tampão PBS para fluxo contínuo, assim como as mangueiras de silicone responsáveis pelo fluxo de entrada e saída do tampão (B), Aproximação do interior do espectrofotômetro onde está localizada a cubeta e detalhe para local de entrada e saída da cubeta, proporcionando o fluxo e leituras contínuas (C).....	44
Figura 6 - Imagens de MEV da superfície dos scaffolds de PHB produzidos por SLS. A: a imagem mostra os poros maiores (~700µm) produzidos durante o processo de confecção dos scaffolds; B: a imagem mostra a porosidade intrínseca do scaffold gerado pelo processo SLS.....	46
Figura 7 - Micrografia dos scaffolds de PHB funcionalizados com Ca-P: (A) amostras submetidas a 2 ciclos de imersão e (B) amostras submetidas a 3 ciclos de imersão. Ambas as amostras foram submetidas ao tratamento prévio de imersão em etanol 20%.....	47
Figura 8 - Micrografia dos scaffolds de PHB funcionalizados com Ca-P (A) amostras submetidas a 2 ciclos de imersão e (B) amostras submetidas a 3 ciclos de imersão; ambas amostras sem tratamento prévio de imersão em etanol 20%.....	49

Figura 9 - Mapeamento de energia dispersiva-imagem espectral das amostras de PHB modificadas com 2 ciclos de imersão sem tratamento prévio em etanol.	50
Figura 10 - Mapeamento de energia dispersiva-imagem espectral das amostras de PHB modificadas com 3 ciclos de imersão sem tratamento prévio de etanol.	51
Figura 11 - Mapeamento de energia dispersiva-imagem espectral das amostras de PHB modificadas com 2 ciclos de imersão. A amostra foi submetida ao tratamento prévio de imersão em etanol 20%.	52
Figura 12 - Mapeamento de energia dispersiva-imagem espectral das amostras de PHB modificadas com 3 ciclos de imersão. A amostra foi submetida ao tratamento prévio de imersão em etanol 20%.	53
Figura 13 - Curva de calibração de Ca e P.....	54
Figura 14 - Padrões de difração de Raios X obtidos para os scaffolds PHB puro (a), e funcionalizados com cálcio e fosfato; 2PHB-CaP (b), 2-Et-PHB-CaP (c), 3PHB-CaP (d) e 3-Et-PHB-CaP (e). As setas no gráfico indicam os picos referentes às fases de apatita.....	58
Figura 15 - Difratoograma de raios-X do PHB modificado com Ca-P da amostra com 3 ciclos imersões, comparado com o padrão de β -whitlockite (pdf.6-426), difratograma invertido.....	59
Figura 16 - Difratoogramas de raios-X do PHB modificado com Ca-P da amostra com 3 imersões, comparado com o padrão de β -fosfato tricálcio, β -TCP:Ca ₃ (PO ₄) ₂ (pdf. 11-177), difratograma invertido.	60
Figura 17 - Difratoogramas de raios X do PHB modificado com Ca-P das amostras com 3 imersões, comparado com o padrão de fosfato de cálcio (pdf.1-356), difratograma invertido.....	61

Figura 18 - Espectro vibracional na região do infravermelho obtido das amostras: (a) PHB, (b) 2PHB-CaP, (c) 2-Et-PHB-CaP, (d) 3PHB-CaP e (e) 3-Et-PHB-CaP. As setas indicam as bandas referentes aos íons PO_4^{3-} e CO_3^{2-} . Os círculos vermelhos destacam as bandas características do PHB puro.....	62
Figura 19 - Curvas termogravimétricas para as amostras antes e após 2 e 3 ciclos de funcionalização, com e sem pré tratamento em álcool a 20%.....	64
Figura 20 - Distribuição do tamanho do peptídeo livre em solução aquosa (A) e distribuição do tamanho do peptídeo OGP-CF incorporado nos lipossomas formados pelos fosfolipídios DPPC: POPG em solução aquosa (B), obtida pela análise de espalhamento de luz dinâmico.	66
Figura 21 - Distribuição do tamanho do peptídeo OGP-W livre em solução tampão PBS (A) e a distribuição do tamanho do peptídeo OFP-W incorporado nos lipossomas formados pelos fosfolipídios DPPC: POPG em solução tampão PBS (B) obtida pela análise de espalhamento de luz dinâmico.	66
Figura 22 - Espectro de dicroísmo circular da estrutura secundária randômica do peptídeo OGP diluído 10 vezes em metanol (partindo de uma concentração de 10^{-5}M).....	68
Figura 23 - Espectros de dicroísmo circular de estruturas secundárias do peptídeo OGP-CF, diluído 10 vezes em metanol (partindo-se de uma concentração de 10^{-5}M) e das estruturas secundárias dos lipossomas com o OGP-CF incorporado em sua estrutura.	69
Figura 24 - Perfil de liberação cumulativa do OGP-CF a partir das amostras de PHB-CaP; peptídeo adsorvido em solução de etanol absoluto.	71
Figura 25 - Perfil de liberação cumulativa do OGP-CF incorporado aos lipossomas a partir das amostras de PHB-CaP.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Razão Ca/P dos fosfatos de cálcio.	23
Tabela 2 - Classificação de lipossomos de acordo com os parâmetros estruturais ou métodos de preparação.....	29
Tabela 3 - Composição dos scaffolds confeccionados.	35
Tabela 4 - Soluções dos respectivos peptídeos e tipos de amostras nas quais foram incorporados.....	37
Tabela 5 - Figuras de mérito nas determinações.....	55
Tabela 6 - Concentrações de Ca e P presentes em cada compósito que foi obtido seguindo-se os protocolos descritos anteriormente, e a proporção Ca/P em cada amostra.	55
Tabela 7 - Temperatura inicial de decomposição (Tonset) dos compósitos desenvolvidos e da amostra controle e a porcentagem de resíduo inorgânico (Ca-P) de cada compósito.	64

1. Introdução

1.1. *Scaffolds*

O *scaffold* utilizado na engenharia tecidual é uma estrutura tridimensional (3D) composta de biomateriais que atua como um molde para regeneração tecidual, visando restaurar, manter e melhorar as funções dos tecidos, por isso é considerado elemento chave para o sucesso da regeneração tecidual. Esses *scaffolds* podem ser extraídos de substâncias naturais ou sintetizados por várias técnicas de processamento de polímeros (CHANTARAPANICH et al, 2006).

Na engenharia de tecido ósseo, o *scaffold* fornece um suporte estrutural para o tecido recém-formado, servindo como suporte para interações celulares e matriz intracelular óssea.

A composição e a arquitetura *dos scaffolds* desempenham papéis cruciais na capacidade de colonização das células. Em se tratando de sua composição, o material utilizado na fabricação do *scaffold* deve ser biocompatível, reabsorvível, com produtos de dissolução/degradação metabolizados pelo organismo, osteocondutor e preferencialmente osteoindutor. Quanto à arquitetura, um *scaffold* deve ser altamente poroso com uma rede de poros interconectados para crescimento celular/tecidual e transporte de nutrientes e resíduos metabólicos, além de possuir propriedades mecânicas adequadas (ABDELAAL, O.A.M.; DARWISH, S.M.H., 2013).

Scaffolds ideais não devem somente atender aos requisitos de composição e suporte estrutural, mas devem também fornecer sinais químicos, mecânicos e biológicos que são requeridos para a resposta ao estímulo do ambiente (ZHU et al, 2013).

A perda de um órgão ou tecido resultante de uma lesão ou de outro tipo de dano é um importante problema de saúde humana. O transplante de órgãos ou tecidos é uma terapia padrão para o tratamento desses pacientes, porém há uma grande limitação nesta terapia devido à escassez de doadores e pelo fato das próteses sintéticas e outros aparelhos médicos não serem capazes de substituir todas as funções de um órgão ou tecido danificado ou perdido.

Diante deste cenário, a produção de *scaffolds* para aplicação na engenharia tecidual tem desempenhado um papel crucial no desenvolvimento das terapias de transplantes e próteses de órgãos e tecidos (CHEN et al., 2002).

Diversas técnicas de fabricação de *scaffolds* vêm sendo desenvolvidas. Técnicas convencionais como evaporação de solventes, lixiviação de partículas e liofilização possuem pouca capacidade de controlar com precisão o tamanho, geometria, interconectividade e a distribuição dos poros ou não permitem a construção de canais internos dentro dos *scaffolds*. Técnicas avançadas têm sido recentemente desenvolvidas na engenharia tecidual como uma alternativa aos métodos convencionais de fabricação de *scaffolds*, dentre elas destacam-se: 1. eletroafiação, técnica de fabricação baseada na nanotecnologia, e 2. prototipagem rápida, uma classe de técnicas, na qual o *scaffold* 3D é fabricado camada por camada até a obtenção do modelo final (ZHU et al, 2013).

Os *scaffolds* devem ter a forma anatômica do órgão que se quer substituir, desta forma, a prototipagem rápida (PR) constitui no diferencial tecnológico, além de que a PR tem também demonstrado sua capacidade para incorporar células vivas e fatores de crescimento (YU et al, 2008) nos *scaffolds* durante o processo de fabricação do mesmo. Por isso o grande interesse em utilizar a técnica para construir *scaffolds* biomiméticos de tecidos ósseos (ZHU et al, 2013).

1.2. Prototipagem rápida

A prototipagem rápida é um método avançado e totalmente computadorizado para fabricação de estruturas 3D, que vem sendo bastante utilizado atualmente na engenharia tecidual. “*Additive fabrication*”, “*solid free form fabrication*”, “*3D printing*” e “*layer by layer fabrication*”, são denominações pelas quais esta técnica também é conhecida. Esse método possui como principal vantagem a possibilidade do preparo de estruturas complexas, de maneira rápida e com minuciosa riqueza de detalhes desde o formato anatômico desejado até a configuração dos poros da superfície do material (YANG et al, 2001 e YANG et al, 2002).

A PR constitui-se em uma técnica de confecção físico-química assistida por computador (*computer-assisted design- CAD*), partindo-se de um modelo 3D virtual que é, então, fatiado e transferido (“imprimido”) para os materiais na forma de pó, líquido ou lâmina, dependendo da tecnologia empregada, camada por camada até a obtenção do modelo final.

Dentre as técnicas de PR utilizadas na engenharia de materiais enquadram-se as técnicas de “*Sheet lamination*” ou folha de laminação, a técnica da ligação adesiva e a técnica de sinterização a laser seletivo (*Selective Laser Sintering - SLS*), entre outras (YANG et al, 2002).

A técnica de sinterização a laser seletivo (SLS) consiste do emprego de um laser de gás carbônico (CO₂) para sinterização seletiva do pó de polímero ou compósito que irá compor o *scaffold* 3D. Este processo visa formar as camadas sucessivas do material, fixando umas sobre as outras e à medida que, uma fatia física vai sendo construída ela vai sendo empilhada, alinhada e aderida simultaneamente à anterior até que a peça fique completa, criando o objeto tridimensional. Ao final do processo, a peça é liberada do suporte (VOLPATO, N.,

2008). A porosidade dos *scaffolds* fabricados via SLS pode ser controlada por meio do ajuste dos parâmetros do processo (LEONG, K. F. et al. 2003; WILLIAMS, J.M. et al., 2005) granulometria do material e projeto mecânico dos poros em três dimensões (LUCCHESI, 2010).

1.3. Biomateriais

Biomaterial é qualquer substância (ou combinações de substâncias), sintética ou natural, que não seja um fármaco, e que possa ser usada em qualquer período de tempo seja completa ou parcialmente, como parte de um sistema que possibilite tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo (AZEVEDO, et al, 2007).

Os biomateriais devem apresentar uma gama de propriedades químicas físicas e biológicas que permitam que eles desempenhem a função a qual são destinados, estimulando uma resposta adequada dos tecidos vivos. De maneira resumida, pode definir-se um biomaterial como um material que não influencia negativamente o seu ambiente biológico, ou seja, não deve causar reações tóxicas, alérgicas ou carcinogênicas e suas propriedades físicas não devem ser afetadas durante a sua utilização *in vivo*. Os biomateriais podem ser classificados de acordo com a resposta induzida ao meio biológico como inertes, biotoleráveis e bioativos (GASTALDI e APARECIDA, 2010).

Entretanto, um biomaterial ideal deve apresentar variedade de formas e tamanhos, com suficiente resistência para ser usado em locais onde há incidência de carga, e também ser biocompatível, reabsorvível ou não-reabsorvível, e quando reabsorvível, este material deve ser substituído pela neoformação tecidual, e quando

implantado em tecido ósseo deverá ser principalmente osteocondutor (permitir a invasão vascular e celular proveniente da área receptora do biomaterial).

Os autoenxertos, aloenxertos e/ou xenoenxertos apesar de serem biomateriais de escolha em muitos protocolos cirúrgicos, apresentam algumas desvantagens que limitam seu emprego em alguns protocolos cirúrgicos específicos. A restrição do uso dos autoenxertos e dos aloenxertos, no tratamento de lesões ósseas, ocorre devido à escassez de áreas doadoras bem como o potencial de morbidade das mesmas e devido ao potencial risco de transmissão de patógenos, respectivamente. Os aloenxertos e xenoenxertos ainda se restringem também pelo risco da ativação do sistema imunológico do hospedeiro gerando incompatibilidade biológica e conseqüentemente, a rejeição do implante (FARRINGTON et al., 1996).

Estas desvantagens estimulam a engenharia tecidual e a biotecnologia a desenvolverem novos materiais e métodos promissores para reparação dos tecidos, principalmente para tecido ósseo. Recentemente ocorreram grandes avanços no desenvolvimento de biomateriais tridimensionais para reconstrução de tecido ósseo.

Dentre estes biomateriais tridimensionais apresentam-se os vários materiais aloplásticos, tais como: biocerâmicas [β -fosfato de tricálcio (β -TCP), fosfato de cálcio bifásico (DCP) e hidroxiapatita (HA)], biovidros, polímeros [(celulose bacteriana, colágeno, ácido (poliláctico-co-glicólico), polietileno poroso de alta densidade)] e osso bovino poroso desmineralizado e liofilizado, além da associação entre esses biomateriais (HENCH, 1998; OZTURK et al., 2005; BURSTEIN et al., 2006; DUSKOVA et al., 2006; KLEIN; GLATZER, 2006; CZAJA, et al., 2007).

Apesar dos avanços conquistados no desenvolvimento de novos biomateriais para engenharia tecidual, ainda busca-se um compósito orgânico-inorgânico

preparado com polímeros e cerâmicos bioativos, com características e propriedades mecânicas similares ao autoenxerto ósseo (SASKA, 2011).

1.4. Compósitos

Materiais compósitos são definidos comumente como aqueles que possuem pelo menos dois constituintes, ou duas fases, com propriedades físico-químicas distintas entre si e que são separados por uma interface. A produção de compósitos permite combinar diferentes materiais para produzir um único dispositivo com propriedades superiores às dos componentes unitários e que permita que, separadamente os seus constituintes mantenham suas características, porém quando misturados formem um composto com propriedades próprias, inerentes à nova composição (ORÉFICE et al., 2006).

ALBEE, em 1930, iniciou um dos primeiros estudos sobre a utilização de materiais cerâmicos como biomateriais utilizando uma cerâmica de fosfato tricálcico para reparação de um defeito ósseo.

Compósitos associados às biocerâmicas vêm se destacando no âmbito acadêmico como materiais com potencial para aplicação em terapias da medicina regenerativa, pois além de serem reabsorvíveis são biocompatíveis, excelente osteocondutores, bioativos e possuem propriedades mecânicas satisfatórias. Estes são formados a partir da combinação de polímeros naturais como, colágeno, celulose e polihidroxibutirato; ou a partir da combinação de polímeros sintéticos como o poli (ácido láctico-co-ácido glicólico), poli (ácido láctico) e poli (ϵ -caprolactona) (ZHANG et al., 2004; CHEN, WU, 2005; WIEGAND et al., 2006; HONDA et al., 2007; SONG et al., 2007; YU et al., 2008; HUTCHENS et al., 2009; CARDOSO et al., 2010).

Os materiais empregados para a substituição de tecidos podem ser classificados de acordo com a sua natureza química. Os mesmos são classificados em metálicos, plásticos, compostos ou cerâmicos. Um recente desenvolvimento de biomateriais cerâmicos é a síntese biomimética de fosfato de cálcio na matriz polimérica para produzir compósitos que podem iniciar a osteogênese quando implantados em locais ósseos (HUTCHENS et al., 2006).

A similaridade química das biocerâmicas a base de fosfato de cálcio com os materiais normalmente encontrados no tecido ósseo foi a responsável pela grande aceitação dessas biocerâmicas em reparação tecidual. Entre as cerâmicas com melhor desempenho, estão os biovidros, a alumina, o beta-fosfato tricálcico (β -TCP) e a hidroxiapatita (HA) (COSTA et al., 2009).

1.5. Polihidroxibutirato

Para um material ser utilizado de maneira eficiente como restaurador tecidual, uma característica importante a ser considerada é sua capacidade de permitir a proliferação e migração celular além do suporte para o desenvolvimento de um novo tecido. Nos últimos anos diversos estudos têm apontado para os polihidroxicanoatos (*polyhydroxyalkanoates* - PHAs), e seus copolímeros como materiais com boas propriedades biomédicas. Algumas pesquisas vêm sendo desenvolvidas aplicando os PHAs em diferentes tipos de materiais como suturas cirúrgicas, dispositivos ortopédicos e materiais de reconstrução de tecidos e até mesmo de tendões. Essas aplicações visam produzir e processar esses materiais na tentativa de melhorar seu potencial restaurador (ASRAN et al., 2010; AHMED et al., 2010; CHEN, 2005).

Os PHAs são polímeros naturais sintetizados intracelularmente por vários tipos de microrganismos em condições de crescimento adversas e, constituem-se em potenciais *scaffolds* para a engenharia tecidual por serem materiais biocompatíveis e biodegradáveis (CHEN, 2005; RATHBONE, et al., 2010; ELSAYED, et al., 2009).

O polihidroxibutirato (PHB) – $C_4H_6O_2$ – é um dos polímeros termoplásticos mais comuns dentre os PHAs. Sintetizado a partir da bactéria *Ralstonia eutropha* apresenta características importantes para reparação tecidual, dentre as quais se destacam boa biocompatibilidade, uma superfície bastante favorável para a adesão, migração e proliferação celular e, por isso, nos últimos anos, o polihidroxibutirato (PHB) têm se destacado na produção de *scaffolds* para engenharia tecidual quando comparado a outros polímeros reabsorvíveis como o poli (ácido láctico) (PLA) e poli (ácido glicólico) (PGA) e seus copolímeros (ELSAIED et al., 2009; ANDERSON, 1990).

No entanto, o PHB apresenta algumas desvantagens como alto grau de cristalinidade, propriedade hidrofóbica e baixa resistência mecânica, principalmente quando materiais a base de PHB são produzidos via SLS, que limitam sua aplicação para dispositivos médicos (ASRAN et al., 2010; BARUD et al., 2011). Além disso, seu caráter hidrofóbico interfere na adesão celular podendo retardar os processos iniciais da neoformação óssea.

Desta forma, muitos métodos têm sido desenvolvidos para modificar a superfície e propriedades físico-químicas dos *scaffolds* a base de PHB para melhorar suas propriedades tanto mecânica quanto de biocompatibilidade, além do tempo de reabsorção. Dentre estes métodos se destaca a adição de fases inorgânicas, como hidroxapatita ou fosfatos de cálcio, (CHEN e WU, 2005; DUAN et

al., 2010) a estes polímeros, bem como também a incorporação de colágeno ou celulose bacteriana (CB) ao PHB (CHEN e WU, 2005; BARUD et al., 2011; ZHIJANG e GUANG 2011).

A hidroxiapatita (HA) e nanopartículas de biocerâmicas (Ca-P) são um dos materiais que vem sendo incorporado ao PHB a fim de melhorar suas propriedades de superfície, aumentar sua bioatividade e adesão celular (SHISHATSKAYA, et al., 2006; MEDVECKY, et al., 2011; LUKLINSKA e SCHLUCKWERDER, 2011; WNAG, et al., 2005; CARLO, et al., 2009).

Nanocompósitos produzidos por nanopartículas bioativas e polímeros biodegradáveis são uma estratégia promissora para a regeneração de tecido ósseo. DUAN et al. [2010], incorporaram nanopartículas de fosfato de cálcio (Ca-P) em *scaffolds* de PHBV (copolímero do PHB) produzidos por SLS, melhorando significativamente a proliferação celular e a atividade de fosfatase alcalina do mesmo.

1.6. Hidroxiapatita

A hidroxiapatita é o constituinte mineral natural encontrado no osso representando de 30 a 70% da massa dos ossos e dentes. O grande interesse na produção da hidroxiapatita sintética é devido sua biocompatibilidade e osteointegração, propriedades que a torna um promissor material substituto do osso humano em implantes e próteses (ANDERSON, A.J.; DAWES, E., 1990). Associada a estas propriedades, a sua alta capacidade de adsorver e/ou absorver moléculas fazem da hidroxiapatita um excelente suporte para ação prolongada de drogas (BARUD, et al., 2011). Além disso, a hidroxiapatita sintética não é carcinogênica e tampouco alergênica.

Os materiais à base de fosfato de cálcio passaram a ser utilizados principalmente como materiais para reposição e reparação óssea, no início da década de 1980. BONFIELD et al. [1981] incorporaram partículas cerâmicas bioativas em polímeros biocompatíveis. Atualmente vários pesquisadores vêm estudando os materiais a base de fosfato de cálcio principalmente para aplicações tecnológicas na área de saúde voltada ao uso clínico, com a intenção de substituir o autoenxerto ósseo em cirurgias ortopédicas. Além de possuir propriedade osteoindutiva (estimular a osteogênese) ou osteocondutiva, o substituto ósseo ideal deve ser biocompatível e ser gradualmente substituído por novo tecido ósseo.

As propriedades da hidroxiapatita apresentam características físico-químicas diferentes dependendo do processo de fabricação utilizado para sua obtenção. Vários métodos de síntese têm sido utilizados para preparação da hidroxiapatita, porém o método de precipitação por via úmida é o mais utilizado, pelo fato do produto produzido apresentar características similares as do tecido ósseo e dentário (COSTA et al., 2009).

Uma forma conveniente de classificar os fosfatos de cálcio é por meio da razão molar entre os átomos de cálcio e fósforo (razão Ca/P), a qual varia de 0,5 a 2,0, conforme mostra a Tabela 1.

Estes fosfatos de cálcio podem ser sintetizados por precipitação a partir de soluções contendo íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} . A solubilidade em água é uma das propriedades mais importantes dos fosfatos de cálcio explorada nas suas diversas aplicações e que permite que seu comportamento *in vivo* seja predito. De forma geral, quanto maior a razão Ca/P, menor será a solubilidade (FOOK, et al., 2010).

Tabela 1 - Razão Ca/P dos fosfatos de cálcio.

Fosfato de Cálcio	Fórmula Química	Ca/P
Fosfato Tetracálcico (TeCP)	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,0
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato de Cálcio Amorfo (ACP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,5
Fosfato tricálcico (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Fosfato Octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Monohidrogênio fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Monohidrogênio fosfato de cálcio (DCP)	CaHPO_4	1,0
Pirofosfato de cálcio (CPP)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,0
Pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Fosfato Heptacálcio (TDHP)	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0,7
Dihidrogênio fosfato tetracálcico (TDHP)	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0,67
Fosfato Monocálcico Monohidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,5
Metafosfato de cálcio (CMP)	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,5

(Fonte: AOKI, 1991)

Composições estáveis da hidroxiapatita podem ter a razão Ca/P estendida para aproximadamente 1,5. O fosfato de cálcio mais estável e o menos solúvel de todos é a hidroxiapatita, de fórmula estequiométrica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ com razão Ca/P igual a 1,67. A estrutura da hidroxiapatita permite substituições isomorficas de cátions e ânions com grande facilidade. O Ca^{2+} pode ser substituído por metais tais como o Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Co^{2+} e Fe^{2+} ; os grupos fosfatos por carbonatos e vanadatos e as hidroxilas por carbonatos, flúor e cloro (COSTA et al., 2009).

Devido às semelhanças química e estrutural com a fase mineral de ossos e dentes, a HA é o fosfato de cálcio mais pesquisado e utilizado como biomaterial (KAWACHI et al., 2000). Entretanto, vários outros fosfatos de cálcio vêm despertando amplo interesse biológico, pois também ocorrem em calcificações normais e patológicas e durante as diferentes etapas de desenvolvimento ósseo (LE GEROS, 1991). Um exemplo seria os grupos carbonatos, que não alteram a cristalinidade da hidroxiapatita, mas podem acelerar os processos de dissolução da estrutura, o que é verificado nas cáries dentárias e nos processos de reabsorção óssea.

O processo de cristalização do fosfato de cálcio presente no tecido ósseo se dá pela formação de produtos metaestáveis intermediários a fase da hidroxiapatita controlada cineticamente. A transformação do ACP a OCP é observada dentro de condições *in vitro*, e o OCP por sua vez se converte ao fosfato de cálcio que apresenta composição semelhante ao presente no tecido ósseo (FOOK, et al., 2010).

É de extrema importância o controle de parâmetros microestruturais da HA tais como cristalinidade e anisotropia para que se assegure seu adequado comportamento *in vivo*, já que devido às variações na sua estequiometria, estes parâmetros variam de acordo com a metodologia empregada na preparação da amostra.

A hidroxiapatita tem sido muito estudada por ser o principal constituinte da fase inorgânica do osso. Suas características químicas e estruturais possibilitam seu uso na área médica como material biocompatível em implantes e próteses (COSTA et al., 2009).

1.7. OGP

O OGP é um peptídeo de ocorrência natural cuja estrutura primária é idêntica à sequência C-terminal da histona H4 ($\text{NH}_3^+\text{-A-L-K-R-Q-G-R-T-L-Y-G-F-G-G-COO}^-$). (BAB, et al., 1992). O OGP está presente em ligação com proteínas, formando complexos, tal como a α 2-macroglobulina (α 2-M) do soro. *In vivo*, o OGP regula a expressão dos fatores de crescimento de transformação TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, fator de crescimento fibroblástico FGF-2 e fator de crescimento insulínico IGF-1 (BRAGER, et al., 2000).

O OGP age na diferenciação e/ou na proliferação tanto de células sanguíneas progenitoras quanto de células osteoprogenitoras, portanto, sua função e de seus derivados é de estimular a osteogênese e a hematopoiese (CHEN, et al., 2000; BAB e CHOREV, 2002; HUI, et al., 2007). O fato de estar presente fisiologicamente no soro humano e de ratos, mesmo em concentrações muito pequenas (BAB et al., 1992), indica sua importância biológica (GREENBERG et al., 1995). O OGP confere o aumento na densidade trabecular óssea, estimula a cicatrização óssea, permite que a atividade da fosfatase alcalina seja regulada, estimulando tanto a proliferação celular quanto a mineralização da matriz óssea (BAB e CHOREV, 2002).

CHEN et al., (2007) e VANELLA et al., (2010) demonstraram que tanto o OGP quanto o OGP [10-14] regulam diretamente a diferenciação de células mesenquimais de medula em osteoblastos favorecendo assim a neoformação óssea. GABET et al, (2004) comprovaram que o OGP e seus derivados quando empregados por via sistêmica estimulam a neoformação óssea em fraturas medulares de coelhos e ratos, reduzindo o tempo de maturidade medular e união cortical.

O peptídeo de crescimento osteogênico (OGP) é, portanto, uma alternativa para conferir além da propriedade de osteocondutividade aos *scaffolds*, a característica de osteoindução, desta forma, estes peptídeos apresentam um grande potencial para serem utilizados na medicina regenerativa, bem como, empregando-os na funcionalização de *scaffolds* constituídos de biomateriais com interesse na aplicação para engenharia tecidual óssea.

1.8. Lipossomas

Lipossomas são sistemas lipídicos dispersos constituídos por fosfolipídios, moléculas anfifílicas, que em meio aquoso se organizam espontaneamente em bicamadas formando vesículas esféricas. Essas bicamadas circundam uma cavidade aquosa interna e são envolvidas por um meio aquoso.

Pelo fato de serem constituídos por moléculas anfifílicas, os mesmos são capazes de encapsular substâncias hidrofílicas, lipofílicas e anfifílicas, por isso sua ampla aplicação em *drug delivery*, já que permitem a incorporação de moléculas, independente de sua solubilidade.

Há muitos anos os lipossomas têm sido estudados para a incorporação e liberação controlada de fármacos (*drug delivery*), devido a sua versatilidade, capacidade de proteção, composição, elasticidade e, principalmente, ao fato de permitirem a incorporação de moléculas, independente de sua solubilidade.

Na década de 60, BANGHAM et al.(1965) descreveram os lipossomas como modelos de membranas biológicas já que mimetizam as células em proteção, composição e funcionalidade (GIUBERTI, 2007).

A utilização dos lipossomas como sistemas de liberação de fármacos foi proposta na década de 70 por Gregory Gregoriadis (GREGORIADIS et al., 1971) e

desde então, a mesma finalidade tem sido estudada na aplicação de nanopartículas, emulsões, hormônios, peptídeos, dendrímeros e anticorpos.

O objetivo da utilização dos lipossomas como veículos de fármacos é o aumento do potencial terapêutico, permitindo a disponibilidade de somente uma fração do fármaco no seu local de ação e impedindo sua difusão para demais órgãos e tecidos que não sejam alvo da sua ação, a fim de que diminuam os efeitos indesejados no organismo, evitando a toxicidade sistêmica (GRANT & BANSSINATH, 2001).

As vantagens dos lipossomas em relação a outros sistemas de liberação de fármacos é o fato de serem degradáveis, não tóxicos e imunogênicos, características que atendem às condições fundamentais dos sistemas *drug delivery*, já que se tratam de estruturas a serem administradas *in vivo*.

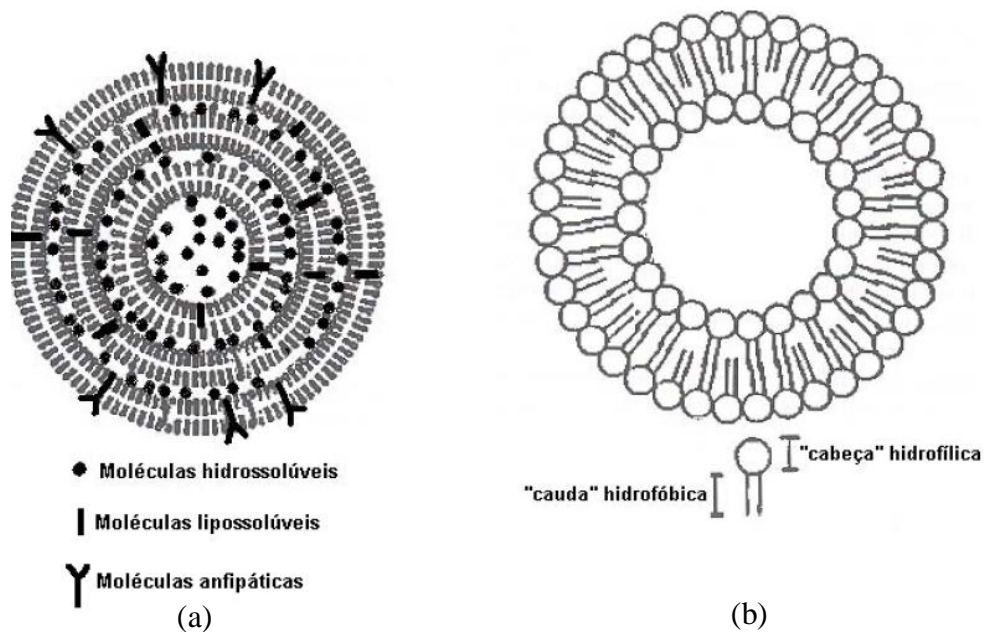
Os lipossomas apresentam diversas aplicações na área biomédica, dentre elas destacam-se o uso em testes diagnósticos, a desintoxicação através de agentes quelantes, na cosmetologia e aplicações como transportador de fármacos antitumorais, os quais são extremamente citotóxicos.

A preparação dos lipossomas se dá pela mistura de lipídeos naturais extraídos e purificados, ou a partir de lipídios sintéticos, disponíveis comercialmente. Uma grande variedade de lipídios e surfactantes pode ser utilizada para a preparação das vesículas, como por exemplo, DPPG (Dipalmitoil fosfatidil glicerol), DPPC (Dipalmitoil fosfadidil colina), POPG (Palmitoil oleil fosfatidil glicerol) e DPPE (Dipalmitoil fosfatidil etanolamina). Geralmente, utilizam-se fosfolipídios catiônicos ou aniônicos. A composição destas vesículas influencia as características físico-químicas dos lipossomas já que possuem um efeito significativo sobre o comportamento das mesmas e, conseqüentemente, na eficácia como transportador

de fármacos.

Os lipossomas são classificados em relação ao seu padrão estrutural (tamanho, número de lamelas, constituição lipídica e natureza de suas interações), estabilidade e modo de preparação (LICHTENBERG & BARENHOLZ, 1988). Quanto aos números de lamelas os lipossomas são classificados em vesículas multilamelares (MLV- *multilamellar vesicles*), aproximadamente concêntricas, com diâmetro variando entre 400 e 3500 nm (JULIANO, 1981); ou unilamelares (LUV- *large unilamellar vesicles*) de diâmetro inferior a 200 nm (Figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática de lipossomas: multilamelar (a) e unilamelar (b)



(Fonte: Araujo et al., 2003)

As demais classificações dos lipossomas levando em conta o padrão estrutura tamanho e quantidade de lamelas, bem como os métodos de preparação estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Classificação de lipossomas de acordo com os parâmetros estruturais ou métodos de preparação.

Parâmetros Estruturais	Método de Preparação
Vesículas Multilamelares (>1μm) - MLV	Evaporação de fase reversa
Vesículas Oligolamelares (0,1-1μm) - OLV	Extrusão
Vesículas Unilamelares (todos os tamanhos) - UV	Congelamento e Descongelação
Vesículas Unilamelares Pequenas (20-100nm) - SUV	Fusão ou Sonicação/ Extrusão
Vesículas Unilamelares Grandes (>100nm) – LUV	Desidratação - Reidratação, Agitação Mecânica (vortex)
Vesículas Unilamelares Gigantes (>1μm) - GUV	Extrusão

(Fonte: Adaptado de: LICHTENBER & BARENHOLS, 1988; GRANT, 2002; SANTOS & CASTANHO, 2002).

Neste trabalho, optou-se pela não definição do tamanho das partículas, podendo haver, portanto, partículas MLV, LUV e SUV.

A criação de novos métodos de preparação de lipossomas, que fossem eficientes, reprodutíveis e com a possibilidade para aplicação em escala laboratorial e industrial foi necessária devido à larga aceitação da utilização de lipossomas para os mais diversos fins.

A composição química, o número de camadas, a distribuição de tamanhos, o número de lamelas e o volume encapsulado influenciam consideravelmente na aplicação dos lipossomas, pois o tipo de lipossoma depende essencialmente do método utilizado na sua preparação.

De um modo geral, a preparação de vesículas lipídicas é realizada com a dissolução da fase lipídica em um solvente orgânico, seguida da sua evaporação para a formação de um fino filme lipídico. Posteriormente o lipídeo é hidratado com uma fase aquosa. Nesta etapa, ocorre a formação de vesículas multilamelares

grandes. Na maioria dos sistemas, um processamento secundário como extrusão ou sonicação é necessário se a finalidade é a obtenção de um produto final com tamanho de partícula menor e bem definido (WOODLE & PAPAHAADJOPOULOS, 1989).

As propriedades físico-químicas dos lipídeos que formam as bicamadas que constituem os lipossomas influenciam na cinética de liberação das substâncias que nelas estão incorporadas.

Cada fosfolipídio tem uma temperatura de transição da fase de gel para a fase de líquido-cristalina (T_m). A T_m é a temperatura na qual a estrutura de bicamadas muda de uma fase gel mais ordenada para uma fase menos ordenada de líquido-cristalina, permitindo o rompimento da estrutura de bicamadas e liberando o conteúdo que nela continha. Esta temperatura é designada temperatura de transição vítrea (GRANT & BANSSINATH, 2001).

Justificando a aplicação dos lipossomas no desenvolvimento de um sistema de liberação controlada de substâncias, uma mistura de fosfolipídios cujas temperaturas de transição vítrea diferem umas das outras é feita a fim de se obter lipossomas com uma temperatura intermediária de transição vítrea, que se assemelha a temperatura do meio no qual se deseja que a substância carregada seja liberada, no caso de fármacos ou peptídeos osteogênicos, a temperatura interna corpórea.

A necessidade de encontrar um biomaterial com propriedades físico-químicas e mecânicas capazes de mimetizar estruturas similares ao autoenxerto, aliada às propriedades dos lipossomas incentivou este trabalho. Com isso buscou-se funcionalizar estruturas 3D de PHB construídas com PR utilizando fosfato de cálcio e peptídeo osteogênico por meio de incorporação em lipossomas a fim de conferir ao

PHB melhores propriedades químicas e biológicas para aplicação em engenharia tecidual.

2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo desenvolver *scaffolds* a base de PHB produzidos por prototipagem rápida e posteriormente funcionalizados com apatita e peptídeo osteogênico (OGP), proporcionando a esses *scaffolds* características hidrofílicas, propriedades bioativas e osteoindutivas. Para tanto, os objetivos específicos foram:

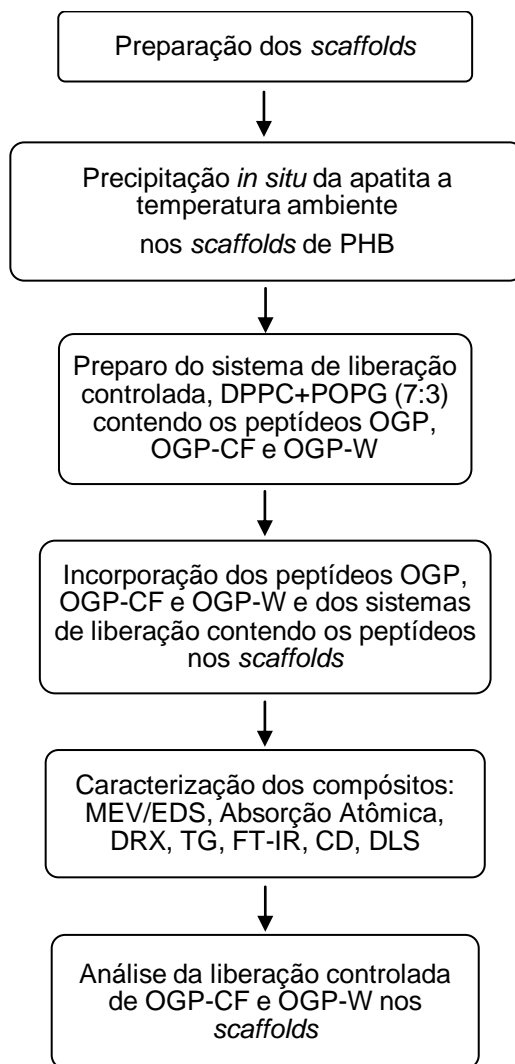
- Produção de *scaffolds* formados estruturalmente por polihidroxibutirato (PHB) sintetizados por Prototipagem Rápida (RP) empregando a tecnologia *Selective Laser Sintering* (SLS);
- Precipitação *in situ* de apatita a temperatura ambiente ao *scaffold* de PHB por meio de ciclos alternados de imersão em soluções de CaCl_2 e Na_2HPO_4 , respectivamente, na tentativa de proporcionar aos *scaffolds* características hidrofílicas, propriedades bioativas e osteoindutivas;
- Realizar caracterizações físico-químicas para melhor compreensão da interação dos cristais de apatita e dos peptídeos osteogênicos ao PHB;
- Incorporação de peptídeos osteogênicos em lipossomas preparados pela mistura dos fosfolipídios DPPC e POPG de modo que a temperatura de transição vítrea de 37 °C fosse alcançada permitindo a liberação dos peptídeos no meio fisiológico;

- Analisar a liberação controlada dos peptídeos OGP-5,6 carboxifluoresceína e OGP- triptofano por Espectroscopia de Fluorescência, após serem incorporados nas amostras.

3. Materiais e Métodos

Figura 2 apresenta o fluxograma do desenvolvimento do trabalho.

Figura 2 - Fluxograma da metodologia desenvolvida.

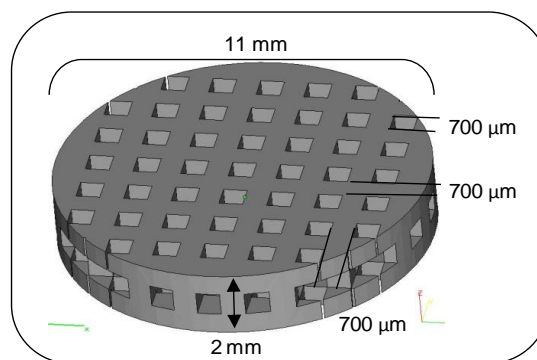


(Fonte: Autor)

3.1 Confeção dos *scaffolds* de PHB

Os *scaffolds* foram confeccionados empregando a tecnologia de impressão 3D disponível no Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer (CTI), utilizando como matéria-prima para confecção das peças 3D o polímero, poli-3-hidroxi-butirato (PHB) na forma de pó. Primeiramente foram gerados modelos geométricos virtuais com poros regulares e interconectados estabelecendo a melhor forma e tamanho. (Figura 3). Para desenvolver estes modelos geométricos virtuais foram empregado os programas *SolidWorks* CAD 3D (*Dassault Systèmes SolidWorks Corp.*, França). A partir destes modelos virtuais foram gerados os modelos físicos.

Figura 3 - Modelo virtual 3D dos *scaffolds* de PHB seguindo as respectivas dimensões para aplicação em futuros estudo *in vitro*.



Para tanto, na confecção dos biomodelos 3D de PHB foi utilizada a tecnologia *Selective Laser Sintering* (SLS) (Figura 4) empregando a máquina *SinterStation 2000* (DTM Corporation). O PHB utilizado na confecção desses *scaffolds* possui tamanho de partículas entre 10-100 µm (Biocycle[®], PHB Industrial S/A, Brasil). No processo de fabricação dos *scaffolds* foi utilizado laser de CO₂ na potência de 8 W com uma varredura do laser de 0,15 mm e temperatura do alimentador de matéria-

prima a 50 °C e do leito de construção a 100 °C. Os *scaffolds* foram produzidos nas seguintes dimensões: 11 mm de diâmetro, 2 mm de espessura e poros de 700 µm.

Figura 4 - Processo de confecção dos *scaffolds* de PHB por SLS.



3.2. Preparação dos compósitos de polihidroxibutirato e apatita (PHB-CaP)

A apatita foi incorporada aos *scaffolds* de PHB seguindo a metodologia de Hutchens et al. (2006). A apatita (CaP) foi precipitada no PHB pela realização de ciclos de incubação alternados, empregando para cada amostra solução de CaCl_2 0,1 M (pH 5,8) (Synth®) e posteriormente solução de Na_2HPO_4 0,1 M (pH 9,2) (Synth®). Todas as incubações foram realizadas por um período de 24 horas a temperatura ambiente sob agitação lenta (HUTCHENS et al.,2006).

Foram preparados dois grupos de amostras: em um grupo a incorporação de CaP se deu pela realização de 2 ciclos de incubação alternados enquanto em outro grupo a incorporação foi realizada submetendo os *scaffolds* a 3 ciclos de incubação. Ambos os grupos foram separados em dois diferentes subgrupos, sendo um deles submetido a tratamento prévio com álcool etílico absoluto 20%, que consistiu da imersão dos *scaffolds* em solução de etanol 20% por 24h a temperatura ambiente (sob agitação contínua) e no outro nenhum pré-tratamento foi realizado. Este pré-tratamento foi realizado na tentativa de diminuir a hidrofobicidade dos *scaffolds* de

PHB a fim de facilitar a incorporação de fases de apatita. As amostras obtidas estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição dos *scaffolds* confeccionados.

Amostras	2 ciclos	3 ciclos
Et-PHB-CaP	2-Et-PHB-CaP	3-Et-PHB-CaP
PHB-CaP	2PHB-CaP	3PHB-CaP

(Fonte: Autor). Et: pré tratamento com etanol 20%.

Para obtenção dos *scaffolds* de PHB-CaP as amostras foram secas em estufa a 37 °C. Depois de obtidos, os *scaffolds* de PHB- CaP foram caracterizados utilizando-se as técnicas de microscopia eletrônica de varredura/ espectroscopia de energia dispersiva (MEV/EDS), absorção atômica, difratometria de raios-X (DRX), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) a fim de se determinar quais amostras seriam utilizadas para posterior incorporação dos peptídeos.

3.3 Preparo dos lipossomos contendo o OGP marcado com carboxifluoresceína (CF) ou triptofano (W)

Os fosfolípidos empregados na preparação dos lipossomas foram o dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC) e o Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Glicerol (POPG), adquiridos da empresa Avanti®.

A mistura dos fosfolípidos DPPC: POPG foi preparada na proporção 7:3 que resultou em uma temperatura de transição próxima a temperatura corpórea, 37°C, o que possibilitaria a maleabilidade da estrutura do lipossoma e a liberação dos

peptídeos no local de interesse. As temperaturas de transição vítrea dos fosfolipídios DPPC e POPG são respectivamente, 42°C e -2°C.

Os peptídeos utilizados neste estudo, OGP- triptofano (W) e OGP-5,6 carboxifluoresceína (CF), foram sintetizados pela metodologia de síntese em fase sólida pela Empresa AminoTech (São Paulo – Brasil). A marcação fez-se necessária para quantificação do conteúdo liberado nos estudos de liberação dos mesmos. Assim, avaliando qual melhor sistema desenvolvido é apropriado para os estudos de liberação para estas amostras 3D. Somente o melhor sistema desenvolvido foi utilizado para incorporação dos peptídeos nos *scaffolds* PHB-CaP.

A incorporação dos peptídeos OGP-CF e OGP-W nos lipossomas foi realizada de acordo com o seguinte procedimento descrito por MORAES et al., 2010, onde cada peptídeo na concentração de 10^{-5} mol.L⁻¹ foi diluído em solução de DPPC:POPG (7:3) a 1 mmol.L⁻¹ em metanol/clorofórmio (1:9).

Após a diluição, a evaporação dos solventes foi feita em N₂ até a obtenção de um filme formado nas paredes do tubo de centrifugação. Posteriormente, o filme formado foi hidratado com solução tampão PBS 1x (pH 7,2) por 2 h a temperatura ambiente. As soluções obtidas referentes ao melhor sistema desenvolvido do respectivo peptídeo após hidratação foram utilizadas para incorporação dos peptídeos nos *scaffolds* PHB-CaP.

3.4 Incorporação dos peptídeos OGP-CF

Foram selecionadas as amostras ideais para a realização do teste de incorporação após analisados todos os resultados das caracterizações dos compósitos preparados, de modo que a incorporação fosse realizada apenas nos *scaffolds* com as características que se pretendia com a funcionalização. A Tabela 4

abaixo descreve as soluções preparadas e as amostras nas quais foram adsorvidos os peptídeos.

Tabela 4 - Soluções dos respectivos peptídeos e tipos de amostras nas quais foram incorporados.

Solução	Amostras	Quantidade de Amostras
OGP-CF	2-Et-PHB-CaP	3
DPPC+POPG/OGP-CF	2-Et-PHB- CaP	3

(Fonte: Autor).

A incorporação dos peptídeos foi feita pelo processo de adsorção. Por esse processo, tanto dos peptídeos livres quanto dos peptídeos incorporados em lipossomas, interagem aos compósitos PHB-CaP por interações iônicas. A liberação dos peptídeos nos sistemas lipossomais se dá pela maleabilidade da membrana de fosfolipídios do lipossoma que permite a passagem de moléculas, no caso dos peptídeos livres, a liberação ocorre em condições próximas às fisiológicas de temperatura e força iônica.

Para que fosse possível a análise de liberação dos peptídeos das amostras estabeleceu-se a concentração de 10^{-5} mol.L⁻¹ para o preparo das soluções peptídicas que foram utilizadas para adsorção direta nos *scaffolds* de PHB-CaP e também das soluções peptídicas incorporadas aos lipossomas. Pois, estudo realizado pelo grupo anteriormente verificou a falta de sensibilidade do equipamento, espectrômetro de fluorescência, para concentrações inferiores a 10^{-8} mol. L⁻¹ e ótima sensibilidade para concentrações entre 10^{-5} mol. L⁻¹ e 10^{-8} mol. L⁻¹ (SASKA et al, 2012). Esta faixa de concentração foi determinada de acordo com estudos prévios relatando a concentração ideal deste peptídeo para reparação óssea. De acordo

com BAB et al. (1992) e SPREAFICO et al. (2006), soluções peptídicas de concentrações maiores que 10^{-14} mol.L⁻¹ mostraram acentuada proliferação celular, sendo que a concentração de 10^{-9} mol.L⁻¹ promoveu uma melhor atividade da fosfatase alcalina, maior formação e mineralização de nódulos de osso neoformado.

As soluções de OGP-CF livre e do sistema lipossomal DPPC: POPG/OGP-CF foram selecionadas como sendo os sistemas melhores desenvolvidos, segundo as caracterizações realizadas previamente, portanto foram utilizadas para incorporação dos peptídeos nos *scaffolds* PHB-CaP.

Para o processo de incorporação, cada compósito PHB-CaP obtido (vide Tabela 4), foi imerso em 2 mL das respectivas soluções de OGP-CF livre e também incorporados em lipossomas, DPPC:POPG/OGP-CF, por 72 h a 10 °C. Todos os ensaios de incorporação foram feitos em triplicata.

Após esse período de 72 h, os *scaffolds* foram secos em estufa a 37 °C para posterior análise de liberação do peptídeo.

3.5 Caracterização dos compósitos

As técnicas de caracterizações físico-químicas foram empregadas na tentativa de elucidar a interação dos peptídeos OGP, OGP-CF e OGP-W com os lipossomas e identificar as fases de apatitas incorporadas nos compósitos 2PHB-HA, 2-Et-PHB-CaP, 3PHB-CaP e 3-Et-PHB-CaP. Para tanto, os *scaffolds* foram caracterizados utilizando-se as seguintes técnicas: microscopia eletrônica de varredura/espectroscopia de energia dispersiva- imagem espectral (MEV/EDS), absorção atômica, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), difratometria de raios-X (DRX), análise termogravimétrica (TG), dicroísmo circular (*circular dichroism* - CD) e espalhamento de luz (*dynamic light scattering* -

DLS).

3.5.1 Microscopia eletrônica de varredura/espectroscopia de energia dispersiva (MEV/EDS)

MEV acoplado a EDS para estudar aspectos morfológicos dos compósitos formados, assim como, a razão molar Ca/P nas amostras contendo apatita. Dado que auxiliou elucidar se a apatita incorporada aos sistemas é realmente deficiente em Ca e também qual tipo de apatita está sendo formado. Com os dados de EDS determinar a razão molar de Ca/P das amostras contendo apatita. Cada amostra foi colocada em suporte de cobre para a realização das microanálises semi-quantitativas com tensão de 5Kv. Posteriormente, as amostras foram recobertas com uma fina camada de carbono com espessura durante 2s e corrente de 40 A. As micrografias foram realizadas sob tensão de 2Kv. As micrografias e o EDS foram obtidas em microscópio eletrônico modelo FEG-MEV, JEOL – JEM 1200 realizadas no Laboratório de Microscopia Avançada (IQ-UNESP).

3.5.2 Absorção atômica

Para realizar essa análise cada amostra foi dissolvida em uma solução contendo proporcionalmente 1,5 mL de ácido nítrico (Synth[®]) e 0,3 mL peróxido de hidrogênio (Synth[®]), para que os *scaffolds* de PHB (controle) e PHB-CaP ficassem imersos. Os *scaffolds* foram pesados e suas respectivas massas anotadas, inicialmente. Em seguida foram imersos na solução e colocados em banho maria a 80°C de 5 a 10 minutos até dissolução completa das amostras.

Alíquotas dessas soluções obtidas foram utilizadas para determinar a concentração de Ca e P assim como a razão Ca/P dos *scaffolds* de PHB-CaP empregando a análise de espectrometria de absorção atômica com chama.

O equipamento utilizado foi o espectrômetro de absorção atômica em chama de alta resolução com fonte contínua ContrAA 300 (Analytik Jena, Jena, Alemanha) equipado com uma lâmpada de arco curto de xenônio operando no modo “hot-spot” modelo XBO 301 (GLE, Berlin, Alemanha) como fonte de radiação e queimador com caminho óptico de 100 mm, disponível no Departamento de Química Analítica do Instituto de Química de Araraquara-IQ/ UNESP.

3.5.3 Difratometria de Raios - X (DRX)

A formação e identificação das fases cristalinas, em função da variação da concentração do precursor e dos tempos de síntese foram acompanhadas mediante difratometria de raios X. Utilizou-se um difratômetro de raios X modelo Rigaku Rotaflex com ânodo rotatório, modelo rint 2000 com radiação $K\alpha$ de cobre, monocromatizada por cristal (UNESP - Instituto de Química - Araraquara). A varredura foi entre 4° a 70° e a velocidade usada foi de 3 segundos a cada $0,02^\circ$.

Os raios X são radiações eletromagnéticas que podem ser polarizadas, difratadas e refletidas. A condição para interferência construtiva da radiação X refletida pelos planos cristalinos de um cristal é dada pela relação $2d \sin \theta = n\lambda$, que é a lei fundamental da cristalografia de raios X, conhecida como lei de Bragg em que: n = número de ondas, d = distância interplanar, λ = comprimento de onda do feixe monocromático e θ = ângulo de difração. Ela estabelece que, para um dado comprimento de onda (λ), o raio refletido emergirá apenas nos ângulos (θ), para os quais a relação acima é satisfeita. Nestas condições a intensidade difratada

apresenta picos de máximo que são produzidos por um conjunto de planos separados por uma distância interplanar d_{hkl} .

A identificação das fases cristalinas do PHB, e das fases de apatita presentes nos compósitos foi realizada comparando-se os dados obtidos com as fichas cristalográficas padrões da base de dados ICDD – PDF-2 (*International Center for Diffraction Data – Powder Diffraction File-2*).

3.5.4 Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FT- IR)

Os espectros de FT-IR foram obtido usando um espectrômetro FT-IR 8.300 – Shimadzu. As respectivas amostras foram previamente pesadas, trituradas e diluídas em KBr na proporção 1:100 para a confecção das pastilhas. Os espectros foram realizados sob as seguintes condições: porcentagem de transmitância (%T) com acúmulo de 32 varreduras, com uma resolução de 4 cm^{-1} , na faixa de absorção de $4.000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$.

3.5.5 Análise termogravimétrica (TG)

Esta técnica possibilitou informações relevantes quanto ao comportamento térmico do PHB e os novos materiais obtidos relacionando com a cristalinidade/perda de massa. Com os dados da análise térmica quantificou-se a proporção de massa residual de compostos Ca-P incorporada nos sistemas.

As curvas de TG foram obtidas utilizando-se um equipamento TA- *Instruments* usando uma célula SDT. As amostras foram aquecidas em cadinho de alumina de 25°C a 600°C sob atmosfera de nitrogênio com fluxo contínuo de $70\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ com razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

3.5.6 Espalhamento de Luz

O espalhamento de luz dinâmico mede as variações dependentes da difusão de intensidade de espalhamento resultante de partículas submetidas a movimento browniano aleatório. Coeficiente de difusão e informações de tamanho de partícula podem ser obtidos a partir das análises destas flutuações (KASZUBA et al., 2008).

A técnica de espalhamento de luz dinâmica consiste de uma técnica não invasiva que permite a análise da distribuição e medida do tamanho de vesículas formadas neste processo de interação (FERREIRA et al., 2005).

Ao ser incidido um feixe de laser nas partículas, o feixe de luz é disperso. A intensidade da luz dispersa detectada em um determinado ângulo flutua a uma taxa que é dependente da velocidade de difusão das partículas que constituem os lipossomos, o que por sua vez é regulado pelo tamanho da partícula. Dado o tamanho das partículas pode ser gerada uma análise das variações na intensidade da luz dispersa. As medidas das flutuações de intensidade da luz dispersa são convertidas em impulso elétrico, que são alimentados a um dispositivo de correlação digital. O tamanho das partículas de informação é gerado a partir dos dados resultantes (KASZUBA et al., 2008).

O tamanho dos lipossomas e dos peptídeos osteogênicos, bem como a interação entre ele foi determinado empregando-se a técnica de espalhamento de luz, em um equipamento da Microtrac modelo NANOTRAC WAVE a temperatura de 25°C, com ângulo de medida de 180° e um laser Diodo (780 nm) (Grupo de Polímeros "Prof. Bernhard Gross" do IFSC/USP). Na análise obteve-se a média do diâmetro usando o índice de refração dos lipossomas de 1,42 (ARDHAMMA, et al., 2002). A distribuição das populações lipossomais foi caracterizada utilizando o

índice de polidispersibilidade, o qual é medido pela extensão da distribuição do tamanho das vesículas (FERREIRA et al., 2005).

3.5.7 Dicroísmo Circular

As análises de dicroísmo circular (*circular dichroism* - CD) forneceram informações que refletem tanto as características estruturais, quanto as mudanças conformacionais de interação dos peptídeos osteogênicos com os lipossomas.

O dicroísmo circular é uma técnica que pode ser utilizada para elucidar informações a respeito das estruturas secundárias de proteínas e peptídeos, pois permite estimar quantidades de hélice- α , folha- β e estruturas desordenadas (aleatórias ou randômicas), adotadas pelas moléculas. Desta forma, a partir dos espectros de dicroísmo circular dos peptídeos foi possível determinar a estrutura secundária destes, portanto, a análise de dicroísmo circular é uma importante sonda de estrutura secundária para estudos de enovelamento de proteínas e peptídeos.

Os espectros de dicroísmo circular foram realizados no em um Espectropolarímetro Jasco (J 815) (UNESP - Instituto de Química – Araraquara) e foram coletados na região de comprimento de onda de 190 a 250 nm, a 25 °C com largura de banda de 1nm, tempo de resposta de 0,5s e velocidade de varredura de 100nm/min. Os espectros finais foram obtidos a partir de 8 acumulações, utilizando-se cubetas de quartzo de caminho óptico de 1,0 mm.

3.6 Determinação da liberação do peptídeo nos compósitos

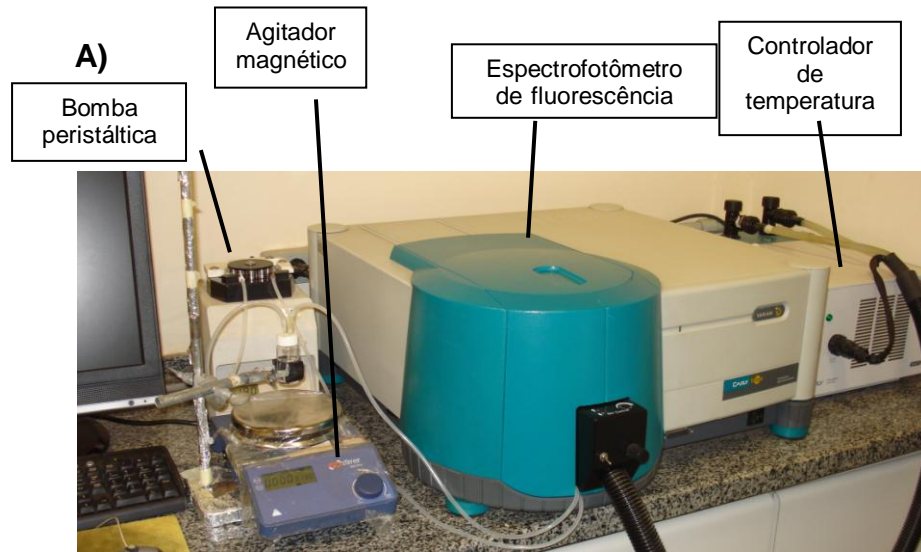
Considerando os resultados da análise de espalhamento de luz dinâmico, observou-se que apesar do peptídeo OGP-W ter obtido uma distribuição monomodal de partícula, o seu tamanho não o tornou ideal para utilização em sistemas de

liberação controlada. Portanto a liberação do peptídeo nos compósitos foi determinando somente para o peptídeo OGP-CF.

Cada *scaffold* de PHB-CaP contendo os peptídeos OGP-CF e sua respectiva solução incorporada nos lipossomas foi imerso em 30 mL de solução PBS (*phosphate buffer solution*, pH 7,2), um volume capaz de preencher todo circuito do equipamento. As amostras foram mantidas sob agitação a uma temperatura de 37°C durante o período de análise.

Os comprimentos de onda de excitação e de emissão utilizados na determinação da liberação do OGP-CF foram de 492 e 520 nm, respectivamente. As medidas foram realizadas em triplicata. As aquisições dos dados da concentração de peptídeo liberado foram realizadas em um sistema fechado acoplado a um espectrofotômetro de fluorescência VARIAN CARY ECLIPSE (Analysis Package software) por meio de mangueiras de silicone ajustadas a um cubeta de fluxo de 450 µL (Hellma QS 10 x 4 mm), sendo todo fluxo da solução mantido por uma bomba peristáltica. O sistema utilizado está compreendido na Figura 5.

Figura 5 - Sistema utilizado no estudo de liberação. Sistema completo (A), Aproximação do recipiente contendo as amostras e o tampão PBS para fluxo contínuo, assim como as mangueiras de silicone responsáveis pelo fluxo de entrada e saída do tampão (B), Aproximação do interior do espectrofotômetro onde está localizada a cubeta e detalhe para local de entrada e saída da cubeta, proporcionando o fluxo e leituras contínuas (C).



B)



C)



O tempo de aquisição dos dados foi de 24 h, monitorado da seguinte maneira: a primeira medida em tempo inicial ($T = 0$ min), posteriormente seguido de medidas a cada 1 min durante 60 min, depois a cada 5 min durante a segunda hora e a cada 15 min durante 300 min. Após 5 h de aquisição, as medidas foram realizadas a cada 30 min até completar 8 h e a cada 1 h até completar as 24 h de análise.

4. Resultados e Discussão

4.1 Caracterização dos compósitos

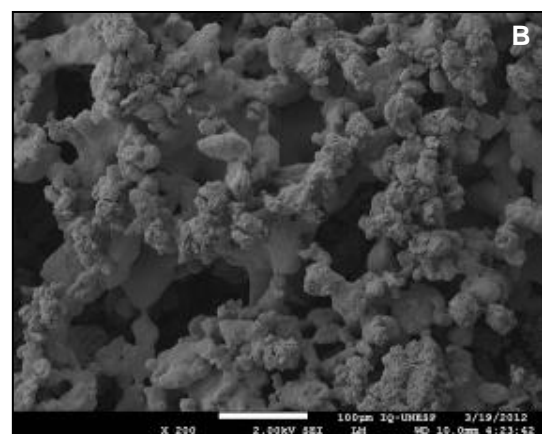
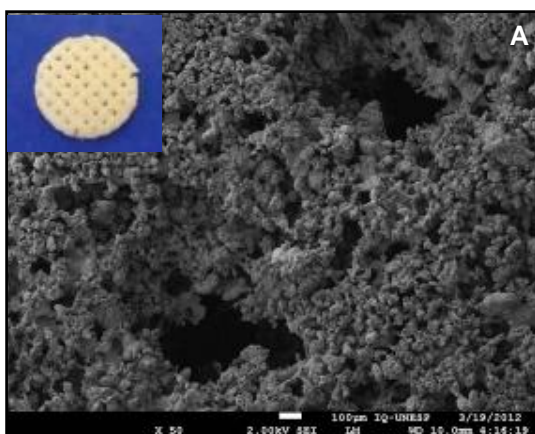
4.1.1 Microscopia eletrônica de varredura/espectroscopia de energia dispersiva (MEV/EDS)

Scaffold de PHB

As tecnologias de manufatura aditiva que processam pó, SLS e *Three-dimensional Printing* (3DP), possuem uma vantagem intrínseca em relação às demais tecnologias de manufatura aditiva para aplicação em *scaffolds* que é a porosidade (Figura 6). Na Figura 6, observam-se tanto os poros extrínsecos quanto os intrínsecos dos *scaffolds* de PHB, com porosidade de superfície uniforme.

Figura 6 - Imagens de MEV da superfície dos *scaffolds* de PHB produzidos por SLS.

A: a imagem mostra os poros maiores (~700 μ m) produzidos durante o processo de confecção dos *scaffolds*; B: a imagem mostra a porosidade intrínseca do *scaffold* gerado pelo processo SLS.



Compósito polihidroxibutirato – fosfato de cálcio (Ca-P)

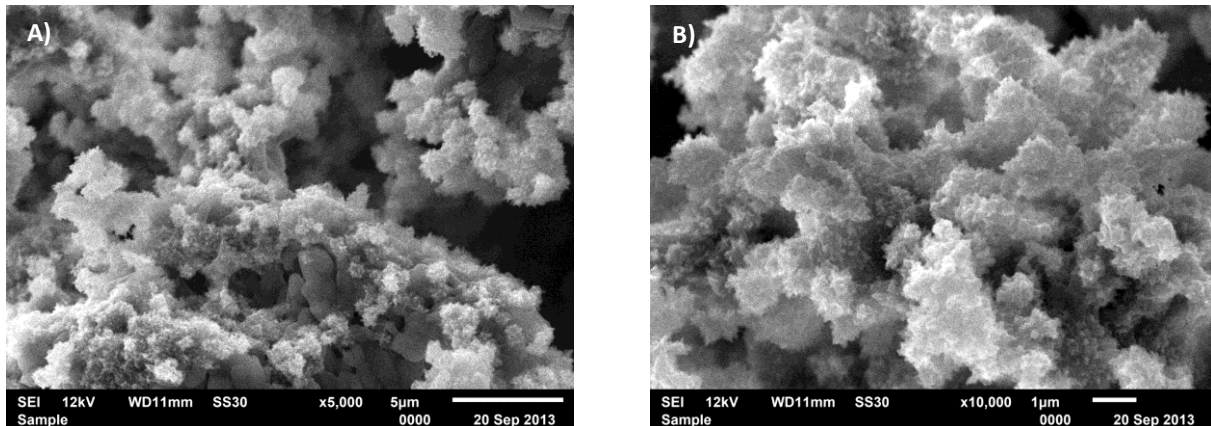
As Figuras 7 e 8 ilustram a superfície dos *scaffolds* modificada pela imersão em soluções de cloreto de cálcio e de fosfato básico de sódio. Conforme descrito anteriormente as amostras foram divididas em 2 grupos, a Figura 7 ilustra os cristais formados na superfície do PHB pré tratado em solução de etanol 20%. O grupo sem o pré-tratamento em etanol está representado na Figura 8.

As micrografias de MEV da superfície destas amostras secas revelaram cristais de apatita recobrando a superfície dos *scaffolds* de PHB com preservação da estrutura porosa intrínseca do *scaffold*. Observa-se que o grupo tratado em etanol, Figura 7, aparentemente tem maior quantidade de material inorgânico depositado na superfície, sendo que as amostras que foram submetidas a 3 ciclos, Figura 7-b, tem maior concentração, conseqüentemente apresentaram maior concentração de cristais precipitados na superfície.

As Figura 7 e 8 indicam a precipitação de típicos cristais de apatita na superfície dos *scaffolds* de PHB em forma de esferas contendo cristalitos de morfologia globular e em bastonetes (“*rods*”) com superfície irregular, formada por pequenos fios ou placas, assemelhando-se a “agulhas” (romboédrica) característicos de fosfato octacálcico (OCP) (HUTCHENS et al., 2006; HONDA et al., 2007) ou fosfato tricálcico (TCP) (KANAZAWA, 1989). Estes aspectos morfológicos indicam que as moléculas de apatita estão fornecendo sítios de nucleação secundária para formação de apatita adicional, formando assim partículas interconectadas. (HUTCHENS et al., 2006).

Figura 7 - Micrografia dos *scaffolds* de PHB funcionalizados com Ca-P: (A) amostras submetidas a 2 ciclos de imersão e (B) amostras submetidas a 3 ciclos de imersão.

Ambas as amostras foram submetidas ao tratamento prévio de imersão em etanol 20%.

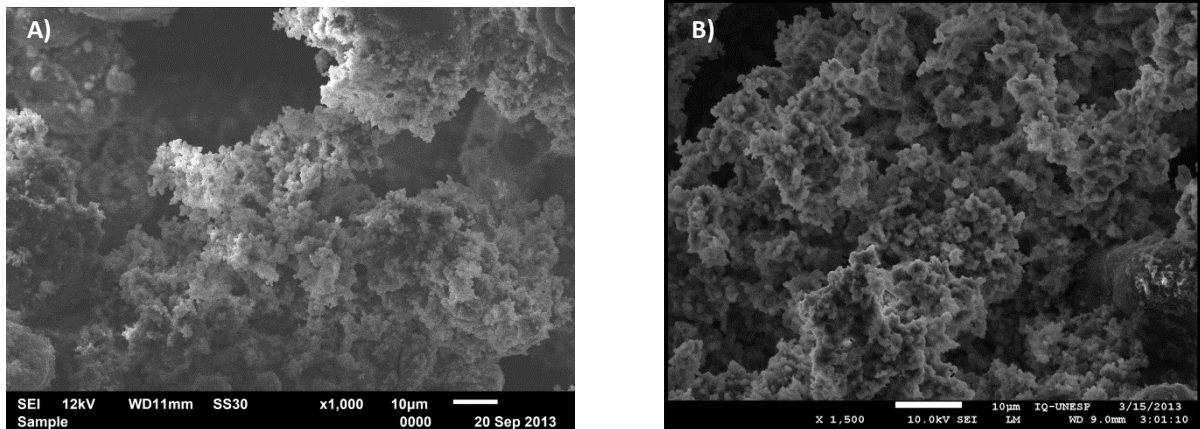


Observa-se que a morfologia dos cristais formados é similar independentemente do tratamento prévio realizado no *scaffold* de PHB, Figuras 7 e 8. Porém, apesar da semelhança morfológica, observa-se que os cristais formados sobre a superfície dos *scaffolds* submetidos ao tratamento prévio com solução alcoólica 20% apresentam-se melhor definidos, podendo ser observadas nitidamente as pontas dos mesmos em forma de “agulha”, Figura 7.

Analisando as micrografias, pode-se concluir que o grupo sem tratamento em solução alcoólica 20%, independente do número de ciclos teve os cristais incorporados a sua superfície em menor quantidade, Figuras 8 a e b.

Nas amostras que receberam 3 ciclos de imersão aparentemente há uma maior presença de precipitado de cristais de apatita que se apresentam com aspecto mais denso, diminuindo a porosidade nas regiões de maior concentração. Portanto pode não ser a melhor condição de incorporação pelo fato de obstruírem os poros do *scaffold*, indispensáveis para um processo de reparação óssea.

Figura 8 - Micrografia dos *scaffolds* de PHB funcionalizados com Ca-P (A) amostras submetidas a 2 ciclos de imersão e (B) amostras submetidas a 3 ciclos de imersão; ambas amostras sem tratamento prévio de imersão em etanol 20%.



A formação dos compostos de fosfato de cálcio acontece com diversas estequiometrias, sendo que dificilmente se forma uma única espécie via precipitação *in situ* ou mesmo algumas espécies se formam apenas em altas temperaturas. No caso, à temperatura ambiente, se tem a formação de algumas espécies mais comuns, dentre elas o fosfato de octacálcico (OCP), o β -fosfato tricálcico (β -TCP) e o β - pirofosfato de cálcio (PPC) (GOMES, et al., 2012.), além de carbonato-apatita.

Considerando que o PHB é um composto orgânico hidrofóbico as possibilidades de interação dos íons cálcio e fósforo com a superfície do polímero se tornam restritas (MEDVECKÝ, L. et al, 2010]. Provavelmente por esse motivo as amostras tratadas previamente em álcool favorecem a precipitação dos cristais de apatita.

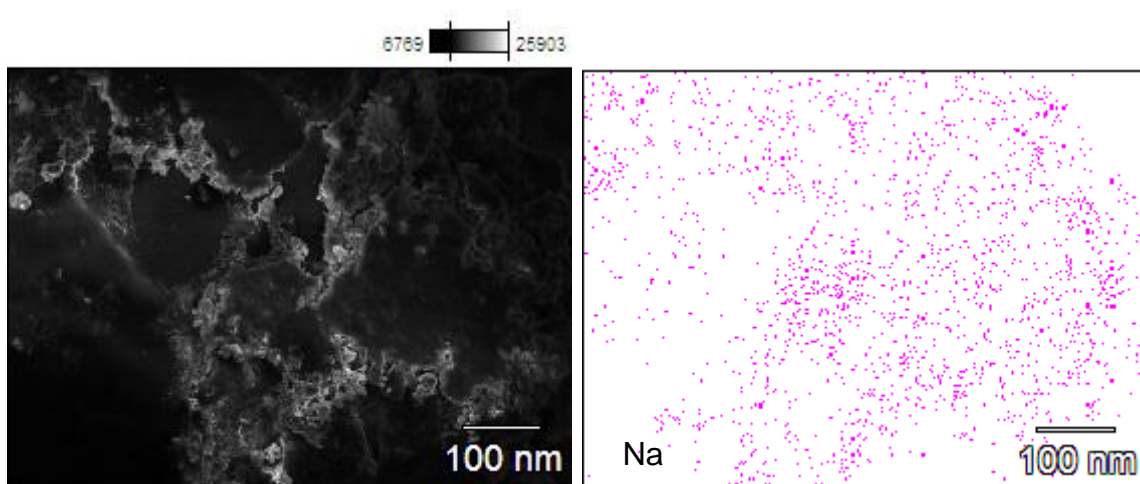
4.1.2 Análise por Espectroscopia de energia dispersiva- Imagem espectral

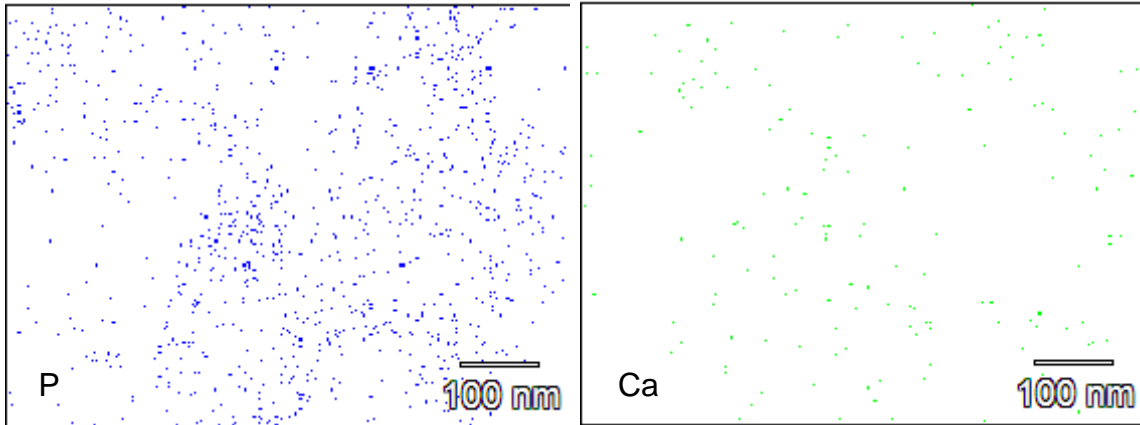
Considerando a característica hidrofóbica da superfície do *scaffold* de PHB e consequentemente a dificuldade de interação com íons inorgânicos, foi feita uma

análise por EDS, espectroscopia de energia dispersiva- e imagem espectral das amostras, Figuras 9-12.

O mapa de distribuição dos íons (Figura 9-12, b-d) indica que a superfície do polímero foi modificada (recoberta) de maneira mais homogênea por fósforo e por sódio, indicando a presença de cálcio apenas nas regiões nas quais foi possível observar os cristais brancos na forma de esferas com superfície irregular. Portanto, a interação do PHB com o fósforo é muito mais efetiva, provavelmente pela própria natureza formadora de polímero dos íons fosfato. Outros polímeros como celulose bacteriana, ricos em hidroxilas, apresentam característica hidrofílica e, portanto, interagem mais efetivamente com íons cálcio e fosfato. (SASKA et al., 2010)

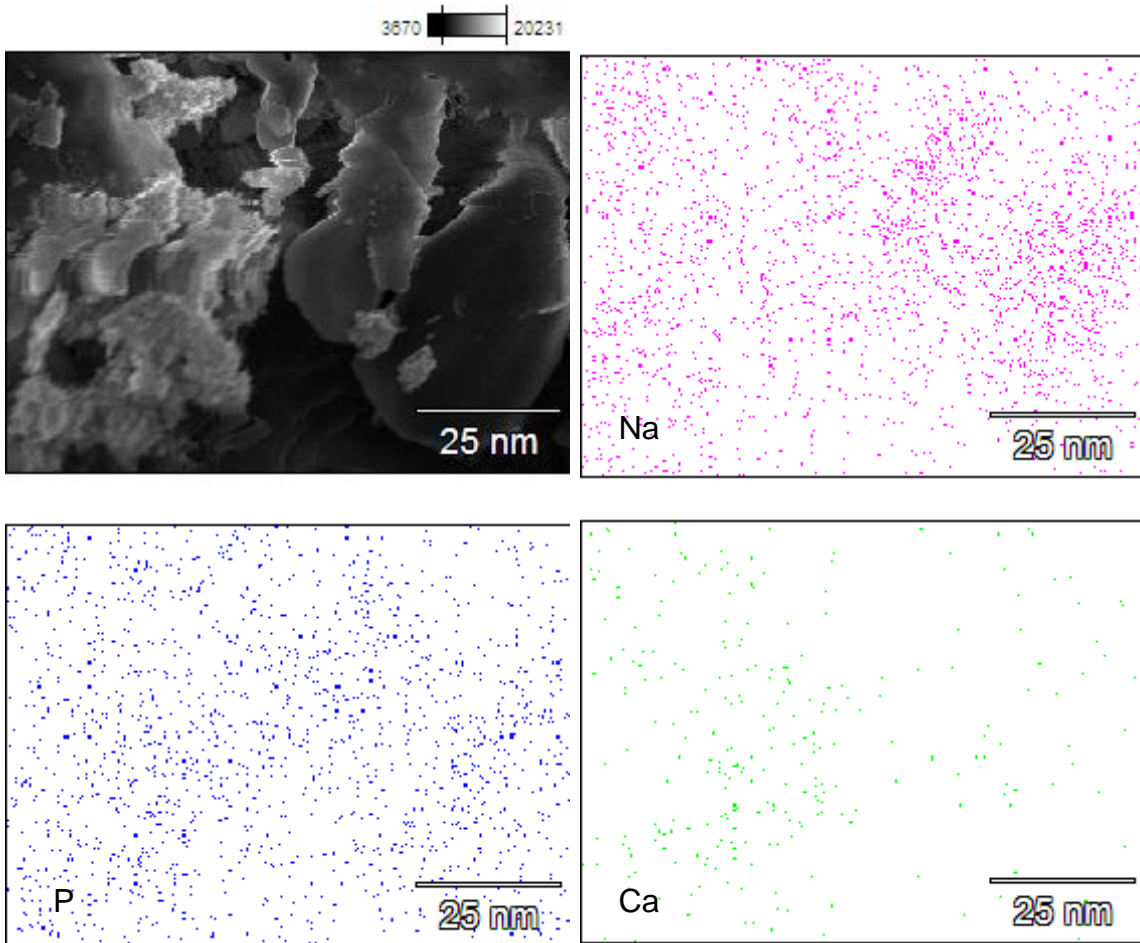
Figura 9 - Mapeamento de energia dispersiva-imagem espectral das amostras de PHB modificadas com 2 ciclos de imersão sem tratamento prévio em etanol.





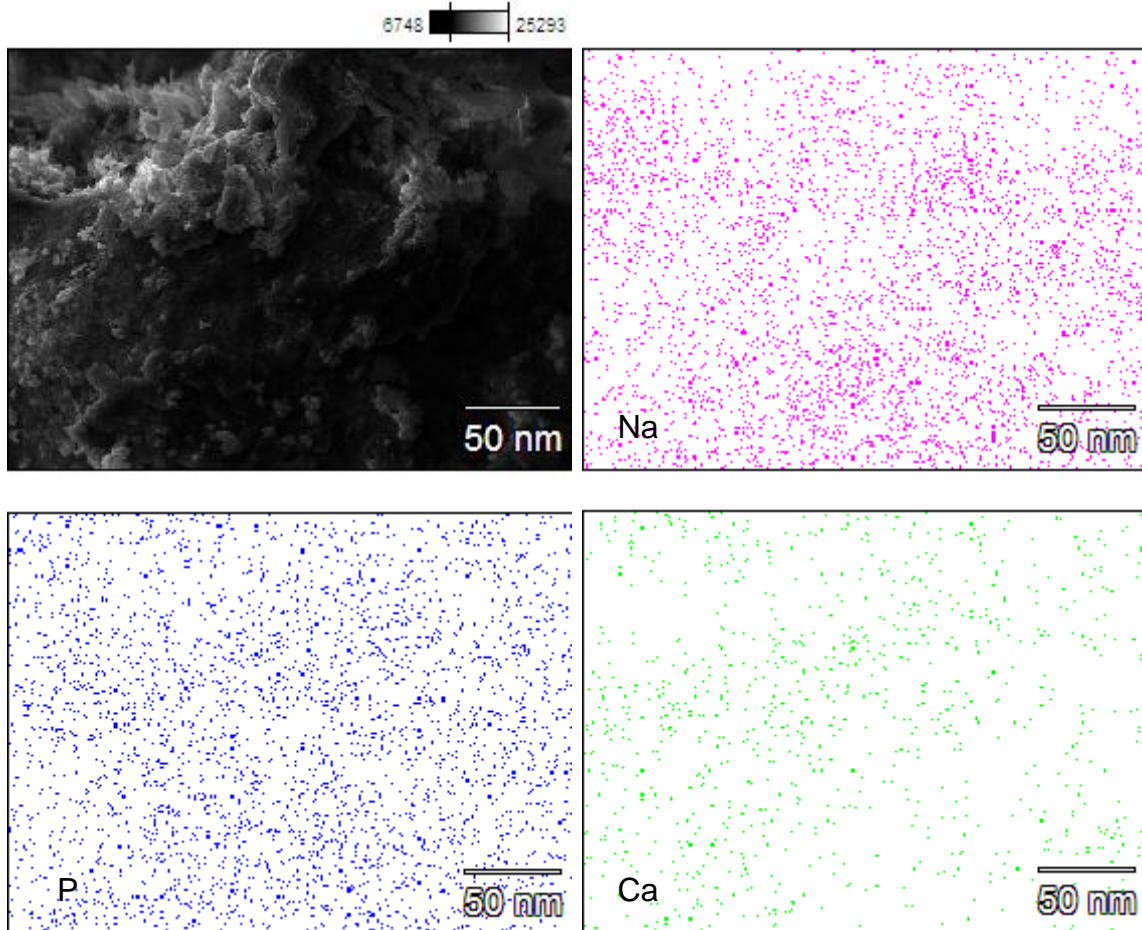
Data Type: Counts Mag: 1600 Acc. Voltage: 10.0 kV

Figura 10- Mapeamento de energia dispersiva-imagem espectral das amostras de PHB modificadas com 3 ciclos de imersão sem tratamento prévio de etanol.



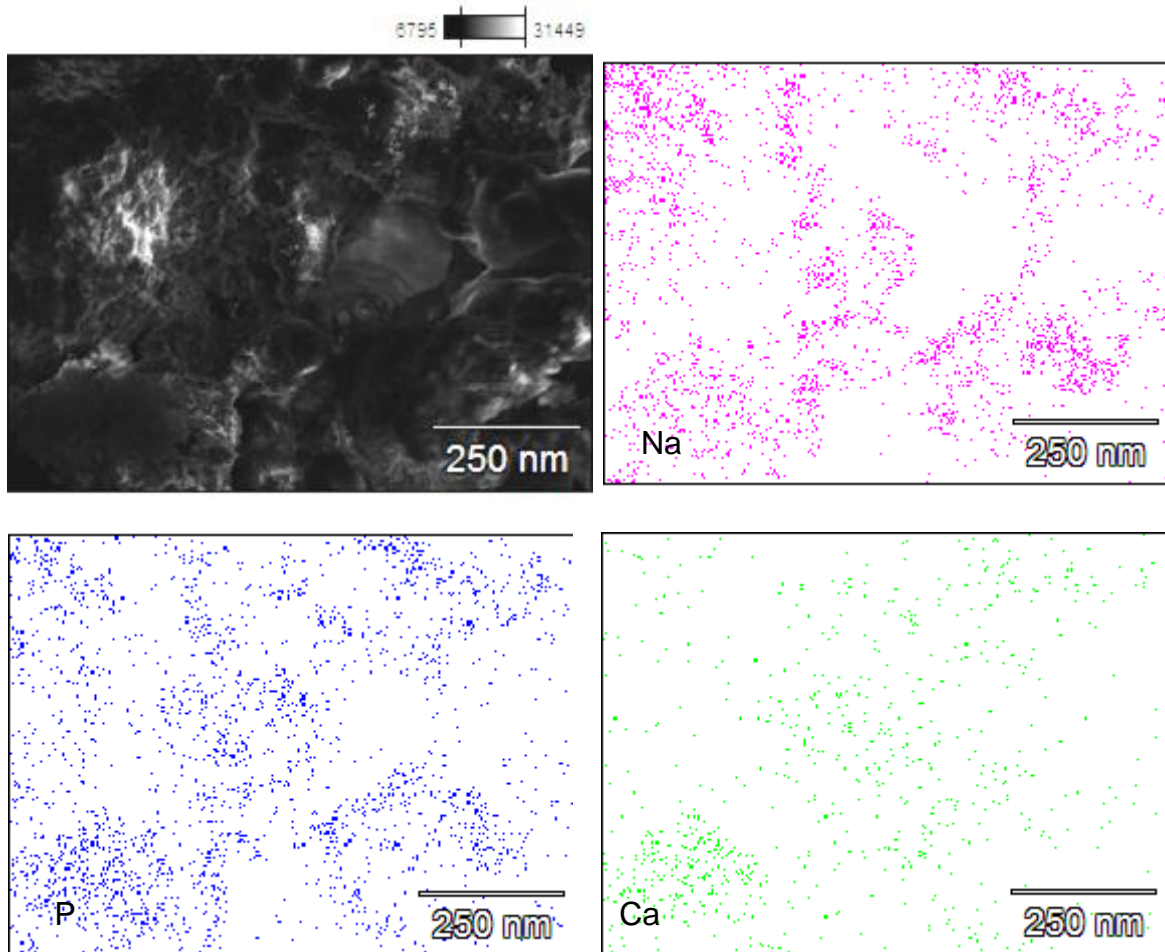
Data Type: Counts Mag: 12000 Acc. Voltage: 10.0 kV

Figura 11- Mapeamento de energia dispersiva-imagem espectral das amostras de PHB modificadas com 2 ciclos de imersão. A amostra foi submetida ao tratamento prévio de imersão em etanol 20%.



Data Type: Counts Mag: 4000 Acc. Voltage: 10.0 kV

Figura 12 - Mapeamento de energia dispersiva-imagem espectral das amostras de PHB modificadas com 3 ciclos de imersão. A amostra foi submetida ao tratamento prévio de imersão em etanol 20%.



Data Type: Counts Mag: 4000 Acc. Voltage: 10.0 kV

O comportamento observado nas micrografias e corroborado pelo mapa de imagem espectral é de que não há distribuição homogênea dos íons cálcio e fósforo, indicando que dados de EDS não são suficientes para se determinar a razão Ca/P depositada nas amostras.

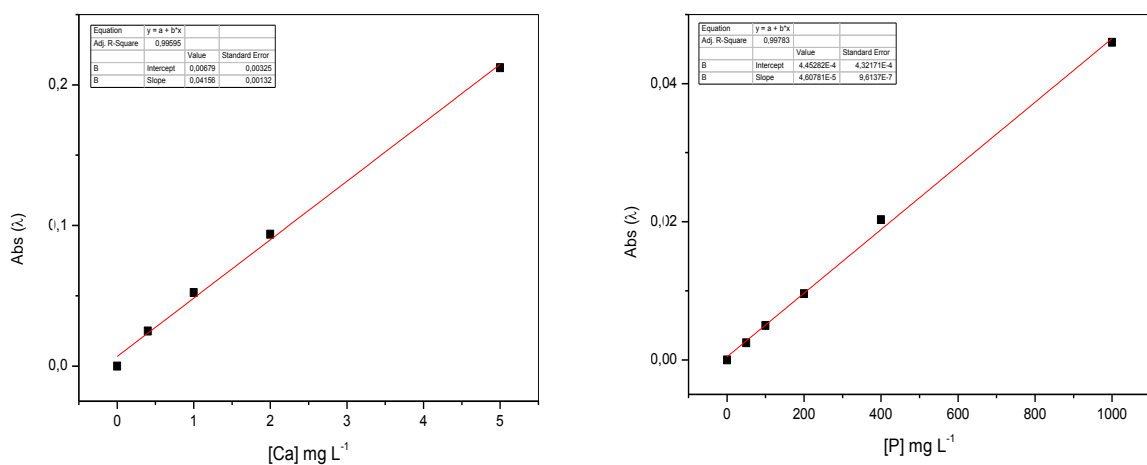
4.1.3 Absorção atômica

Para a determinação da proporção Ca/P nos *scaffolds* de PHB-CaP modificados, primeiramente foi necessário dissolver os *scaffolds* funcionalizados, para posterior análise das concentrações de Ca e P nas amostras. Esta análise foi realizada para todas as amostras em triplicata.

Para a análise de absorção atômica foram feitas duas curvas de calibração (Figuras 13) com diferentes concentrações de padrão de Ca (0 a 5mg. L⁻¹) e P (0 a 1000mg. L⁻¹) previamente acidificados com ácido nítrico 1%. Todas as medidas foram feitas em seis replicatas ($n= 6$) com taxa de aspiração fixada em 5,0 mL min⁻¹. O preparo das amostras foi realizado da seguinte maneira:

- **Para quantificação de Ca:** Em 200 µL de amostra foram adicionados 5 mL de Lantânio (La) e a mesma foi diluída para um volume final de 25 mL.
- **Para quantificação de P:** Em 3,5 mL de amostra foram adicionados 5 mL de titânio (Ti) e a mesma foi diluída para um volume final de 10 mL.

Figura 13 - Curva de calibração de Ca e P.



A Tabela 5 descreve as figuras de mérito das determinações.

Tabela 5 - Figuras de mérito nas determinações.

Curva Padrão	λ (nm)	Intervalo Linear (mg/L)	Limite de Detecção	Limite de Quantificação
			LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Ca	422,673	0,4-5	0,004	0,012
P	247,620	50-1000	3,6	10,9

(Fonte: Autor)

Determinou-se as concentrações de Ca e P (mg.L^{-1}) nos respectivos compósitos, obtidos após funcionalização pela imersão nas soluções de cálcio e fosfato, Tabela 6.

Tabela 6 - Concentrações de Ca e P presentes em cada compósito que foi obtido seguindo-se os protocolos descritos anteriormente, e a proporção Ca/P em cada amostra.

Amostra	[Ca] mg L^{-1}	[P] mg L^{-1}	[Ca/P] mg L^{-1}
2PHB-CaP	40,3	58,3	0,69
3PHB-CaP	20,9	66,1	0,31
2-Et- PHB-CaP	114,5	115,6	0,99
3-Et-PHB-CaP	201,7	99,1	2,03

(Fonte: Autor)

Segundo os resultados dos valores de Ca e P determinados nas amostras, demonstrados na Tabela 6, pôde confirmar que o pré-tratamento dos *scaffolds* em solução alcoólica 20% promoveu melhor interação dos íons cálcio e fósforo com a superfície do PHB (amostras 2-Et-PHB-CaP e 3-Et-PHB-CaP). Este fato pode ser atribuído à diminuição do caráter hidrofóbico da superfície do PHB proporcionada durante o tratamento prévio.

Analisando separadamente os grupos de amostras, observou-se que o grupo sem pré-tratamento apresentou concentração de fósforo semelhante tanto quando submetidos a 2 ou a 3 ciclos de imersões. No entanto, a concentração de cálcio diminuiu 50% quando realizado 3 imersões, indicando que a solução de fosfato aquosa removeu cálcio precipitado formando um complexo solúvel, reduzindo assim a concentração de composto Ca-P depositados na superfície do *scaffold*.

Considerando os resultados demonstrados, Tabela 6, observou-se que o grupo pré-tratado em solução alcoólica a 20% adsorveu 2 vezes mais fósforo do que o grupo que não foi submetido ao pré-tratamento, porém, assim como observado para o grupo que não teve tratamento prévio, a concentração de fósforo das amostras submetidas a 2 ciclos de imersão foi semelhante a das amostras submetidas a 3 ciclos.

A respeito da determinação da concentração de cálcio nas amostras, a concentração do grupo de amostras submetidas a 3 imersões foi de aproximadamente o dobro. Desta forma, a razão Ca/P determinada para o grupo de amostras submetidas a 2 ciclos de imersão foi de aproximadamente 1, enquanto para o grupo de amostras submetidas a 3 imersões, a razão Ca/P determinada passou para 2, indicando que o composto Ca-P formado é estável no meio de imersão.

Corroborando os resultados obtidos para o mapeamento, Figuras 9 a 12, onde se constatou que o fósforo está distribuído homogênea na superfície do PHB, diferentemente do cálcio que está localizado em determinadas regiões, os resultados da Tabela 5 indicam também uma concentração de fósforo pouco variável em função do número de imersões. Nos dois grupos de amostras (com ou sem pré-tratamento) se observa que a superfície do PHB foi totalmente modificada com

fósforo no primeiro ciclo de imersão. Os íons cálcio, portanto reagem com o fósforo formando espécies solúveis ou espécies não solúveis, o que resultou nas diferentes razões Ca/P. Porém, essa razão não pode ser atribuída aos compostos formados pois os resultados do mapeamento-imagem espectral e a concentração pouco variável, Tabela 5, comprovam que há muito fósforo sem interagir com cálcio. Portanto, segundo os resultados da Tabela 6, dentre as amostras sintetizadas, a amostra 2-Et-PHB-CaP apresenta a razão molar Ca/P mais viável para possíveis aplicações em reparação óssea.

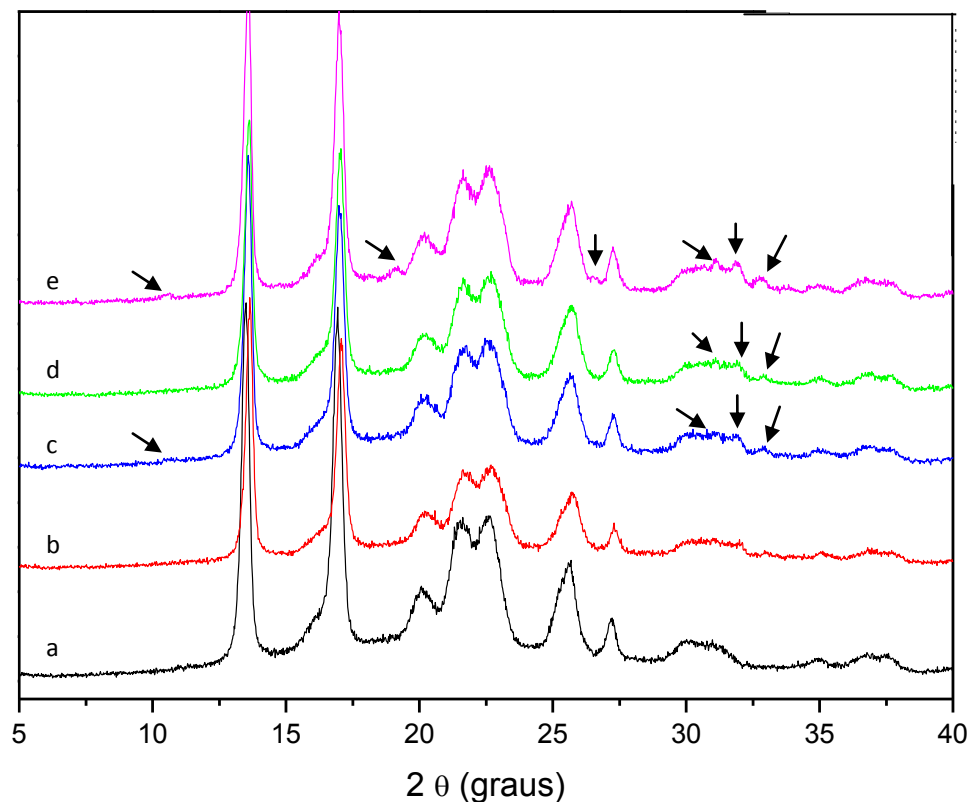
Se o valor mensurado para esta amostra representasse fielmente a relação Ca/P dos compostos formados se poderia indicar a formação de brushita (fosfato dicálcico dihidratado - DCPD), ou monetita (fosfato dicálcico anidro - DCP), cujas fases são precursoras para nucleação de outras fases de apatita, como fosfato octacálcico e fosfato de cálcio amorfo, por exemplo, em meio fisiológico. No entanto, temos fortes indícios de que isso não ocorreu. Analisando os DRX e os IV podemos inferir a provável formação de fosfato tricálcico (β -TCP: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e polifosfato de cálcio, $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$. Pode ter ocorrido também a formação de fosfato de cálcio amorfo (ACP) visto que os picos de difração se alargam em relação aos do PHB puro. Outro composto possível de estar presente é o $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$.

Desta forma, espera-se que estes *scaffolds*, PHB-CaP ao serem aplicados para reparação óssea, a fase de apatita presente nos *scaffolds* dissolva mais rapidamente que a HA, disponibilizando íons cálcio e fósforo na interface implante/osso favorecendo a formação de hidroxiapatita, permitindo uma neoformação óssea em menor tempo (LEGEROS 1991).

4.1.4 Difractometria de Raio-x (DR-X)

Os resultados da difratometria de raios X indicam a cristalinidade do PHB puro, Figura 13 a, sendo os picos de maior intensidade localizados entre 13° e 17° (2θ). A região de 2θ compreendida entre 20° a 40° apresenta picos de média intensidade. Nesta região situam-se os picos principais da maioria dos compostos a base de fosfato de cálcio, portanto, quando se faz funcionalização dos *scaffolds* a identificação dos possíveis compostos de fosfato de cálcio formados oferece grande dificuldades.

Figura 14 - Padrões de difração de Raios X obtidos para os *scaffolds* PHB puro (a), e funcionalizados com cálcio e fosfato; 2PHB-CaP (b), 2-Et-PHB-CaP (c), 3PHB-CaP (d) e 3-Et-PHB-CaP (e). As setas no gráfico indicam os picos referentes às fases de apatita.



Comparando-se os difratogramas dos compostos de PHB funcionalizados (Figura 13b-13e) com o difratograma do PHB puro (Figura 13a), observam-se modificações como o alargamento dos picos indicando que podem ter sido formados compostos amorfos de fosfato de cálcio. Também é possível localizar 3 regiões, indicadas pelas setas, na Figura 13, espectro c, d e e, onde aparecem picos do composto formado ($2\theta=11^\circ$; $30,0^\circ$, 31° e $32,5^\circ$). No espectro da amostra 3-Et-PHB-CaP (Figura 13e) aparecem também os picos 19° e 26° .

Utilizando o programa *Search and Match* foi investigado quais seriam os possíveis compostos formados no processo de funcionalização, onde foi identificada possível fase orgânica formada: β TCP, $(Ca_3(PO_4)_2)$. Também podem ter sido formados compostos contendo sódio - fósforo, $Na_4P_2O_7$, como observado nos dados de imagem espectral. A amostra utilizada nesta investigação foi a que apresentou maior quantidade de deposição de fosfato de cálcio, 3-Et-PHB-CaP, vide Tabela 6. Os padrões do *Search and Match* que mais se apresentaram possíveis, considerando sobreposição de picos e possíveis deslocamentos estão representados nas Figuras 15-17.

Figura 15 - Difratograma de raios-X do PHB modificado com Ca-P da amostra com 3 ciclos imersões, comparado com o padrão de β -whitlockite (pdf.6-426), difratograma invertido.

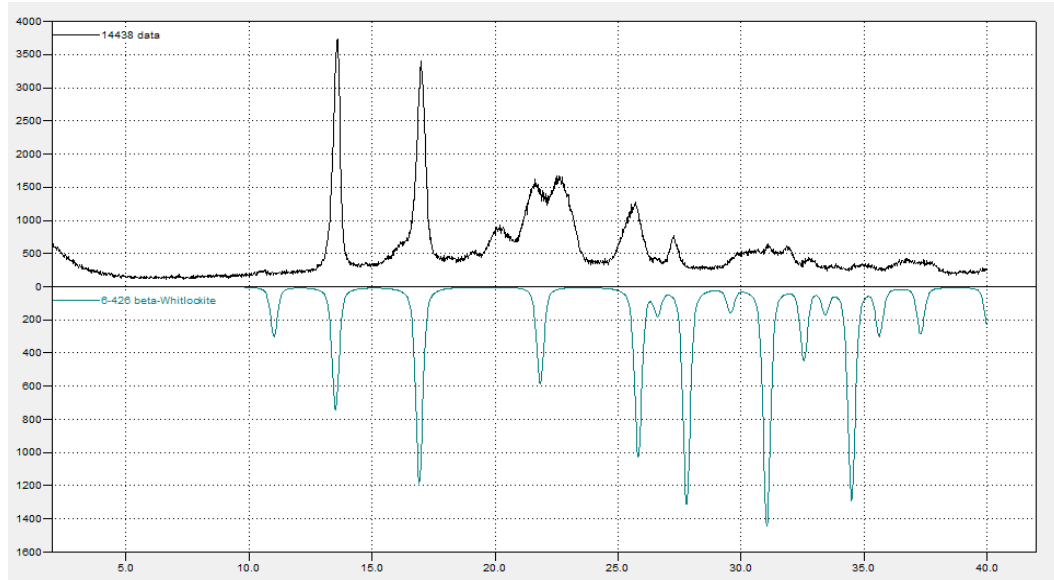


Figura 16 - Difratomogramas de raios-X do PHB modificado com Ca-P da amostra com 3 imersões, comparado com o padrão de β -fosfato tricálcio, β -TCP: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (pdf. 11-177), difratograma invertido.

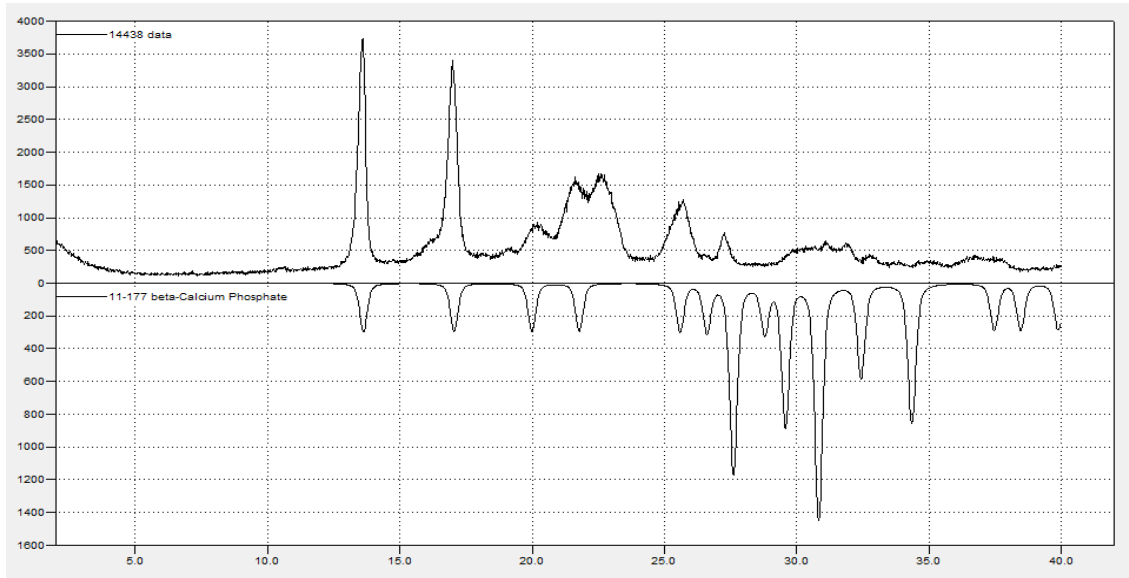
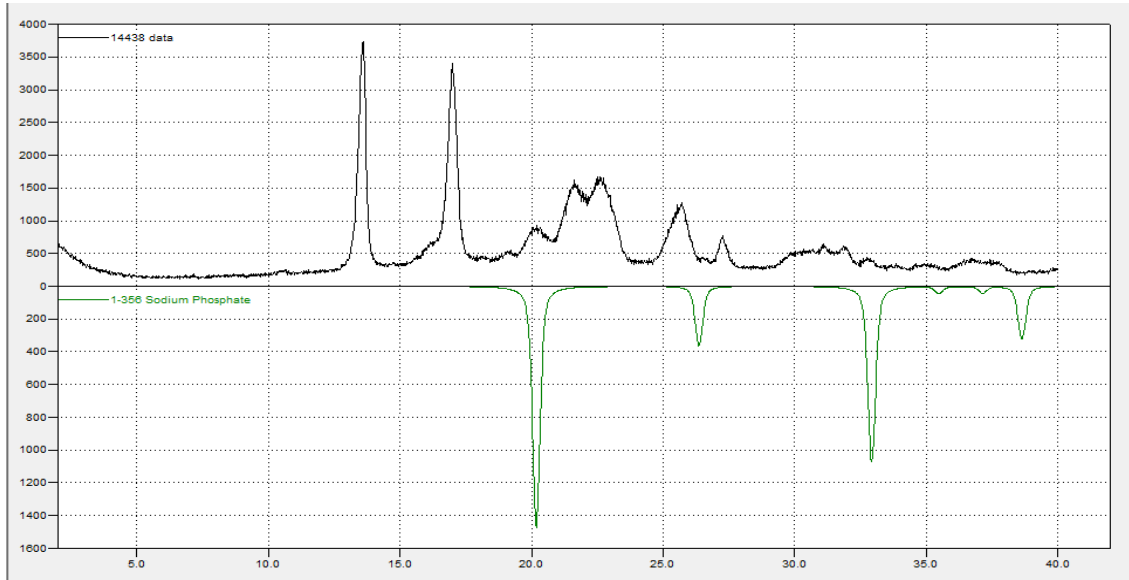


Figura 17 - Difratomogramas de raios X do PHB modificado com Ca-P das amostras com 3 imersões, comparado com o padrão de fosfato de cálcio (pdf.1-356), difratograma invertido.



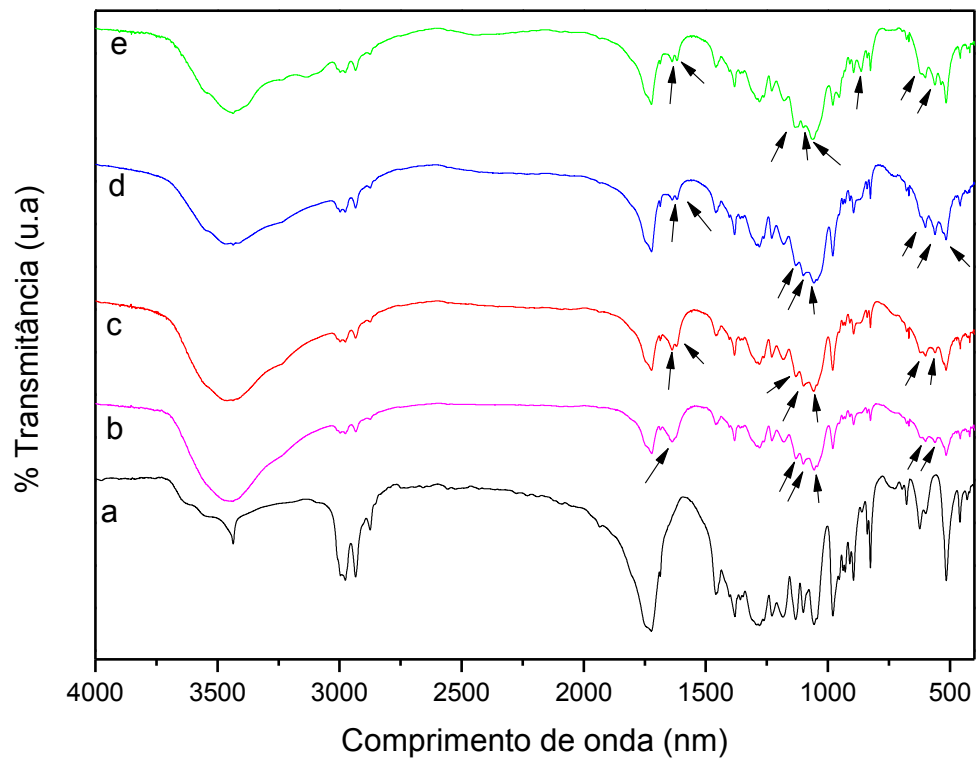
4.1.5 Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FT- IR)

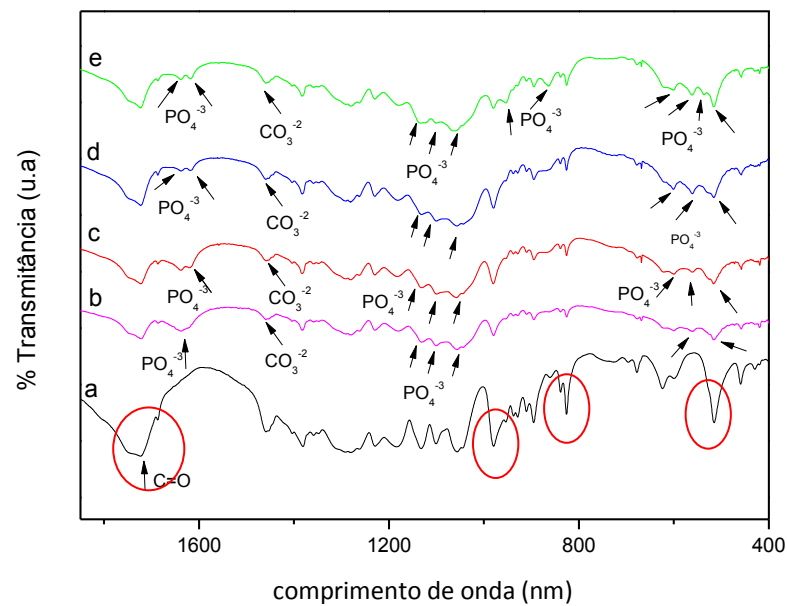
Na análise por FT-IR, foram observadas na amostra controle de PHB puro bandas referentes ao grupamento éster (C=O) em 1726 cm^{-1} e bandas entre 1000 e 1300 cm^{-1} referente a ligação C-O (círculos vermelhos no espectro, destacando as bandas). Em todas as amostras funcionalizadas com apatita foram observadas bandas em 1140 , 1098 , 1020 , 984 cm^{-1} correspondentes ao estiramento dos íons (PO_4^{3-}) (HONG et al., 2006; HUTCHENS et al., 2006; CROMME et al., 2007; WAN et al., 2007). As bandas com intensidade localizada ao redor de 1430 cm^{-1} correspondem ao estiramento dos íons CO_3^{2-} (HUTCHENS et al., 2006).

Nos espectros referentes às amostras 3PHB-CaP e 3-Et-PHB-CaP (Figura 18c e 18d) foram observadas bandas em 515 e 570 cm^{-1} também correspondentes ao estiramento dos íons (PO_4^{3-}) (HONG et al., 2006; HUTCHENS et al., 2006;

CROMME et al., 2007; WAN et al., 2007). A amostra 3-Et-PHB-CaP ainda apresentou em seu espectro outra banda referente ao estiramento dos íons (PO_4^{3-}), a banda em 960 cm^{-1} , Figura 18e.

Figura 18 - Espectro vibracional na região do infravermelho obtido das amostras: (a) PHB, (b) 2PHB-CaP, (c) 2-Et-PHB-CaP, (d) 3PHB-CaP e (e) 3-Et-PHB-CaP. As setas indicam as bandas referentes aos íons PO_4^{3-} e CO_3^{2-} . Os círculos vermelhos destacam as bandas características do PHB puro





4.1.6 Análise termogravimétrica (TG)

As curvas de TG para as amostras funcionalizadas com Ca-P indicam que a temperatura de início da decomposição do PHB é alterada pela presença destes íons deslocando-se para valores menores ($\pm 230^\circ\text{C}$) em relação ao PHB puro ($279,5^\circ\text{C}$), Tabela 8. Os valores *Tonset* observados para os compósitos diminuíram aproximadamente 50°C , quando comparados aos valores para a amostra de PHB controle.

A Figura 19 ilustra as curvas de TG para todas as amostras e nos permite observar que o comportamento de degradação dos *scaffolds* de PHB modificados não se altera com ou sem pré-tratamento em solução alcoólica 20% e também é independente em relação ao número de ciclos de imersão. Este comportamento pode estar associado com a redução da cristalinidade do PHB pela incorporação da fase inorgânica. De acordo com GAO et al., 2010, a redução da cristalinidade leva a diminuição nos valores *Tonset*, corroborando aos dados do DRX observados para amostras.

Figura 19 - Curvas termogravimétricas para as amostras antes e após 2 e 3 ciclos de funcionalização, com e sem pré tratamento em álcool a 20%.

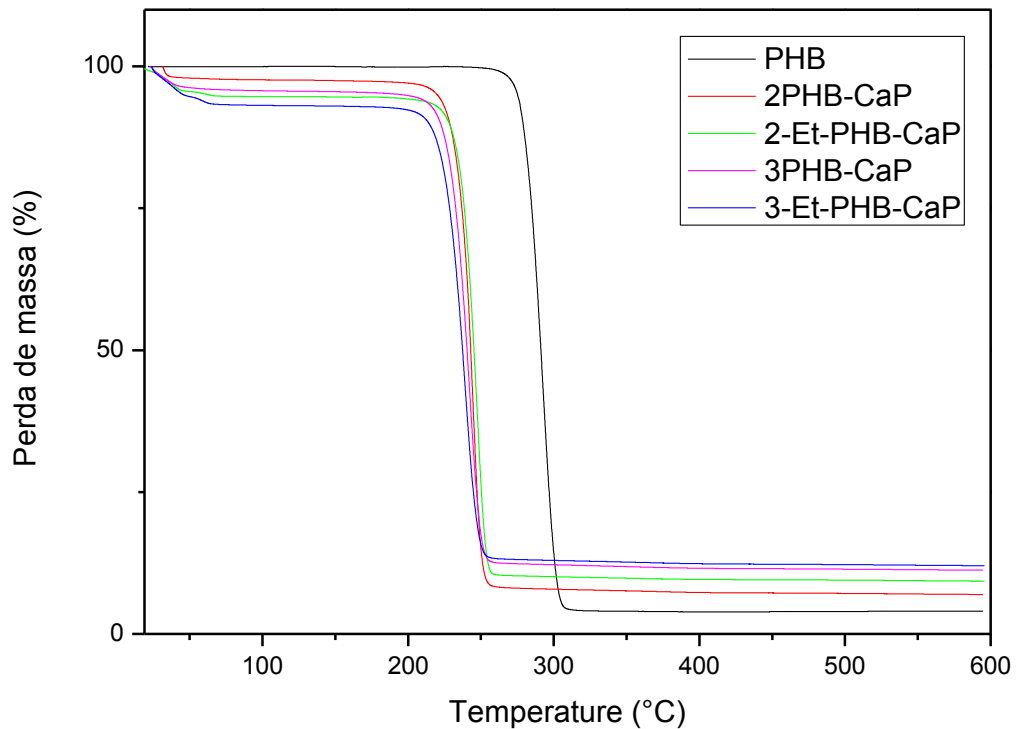


Tabela 7 - Temperatura inicial de decomposição (T_{onset}) dos compósitos desenvolvidos e da amostra controle e a porcentagem de resíduo inorgânico (Ca-P) de cada compósito.

Amostras	T_{onset} (°C)	Massa inicial (mg)	Massa final (mg)	Resíduo %	Massa Ca-P (mg)
PHB	279,5	5,20	0,208	4,0	-----
2PHB-CaP	229,3	5,50	0,380	7,0	0,172
2-Et-PHB-CaP	235,7	5,40	0,513	9,5	0,305
3PHB-CaP	228,4	4,60	0,360	8,0	0,152
3-Et-PHB-CaP	223,9	5,60	0,672	12,0	0,464

(Fonte: Autor.)

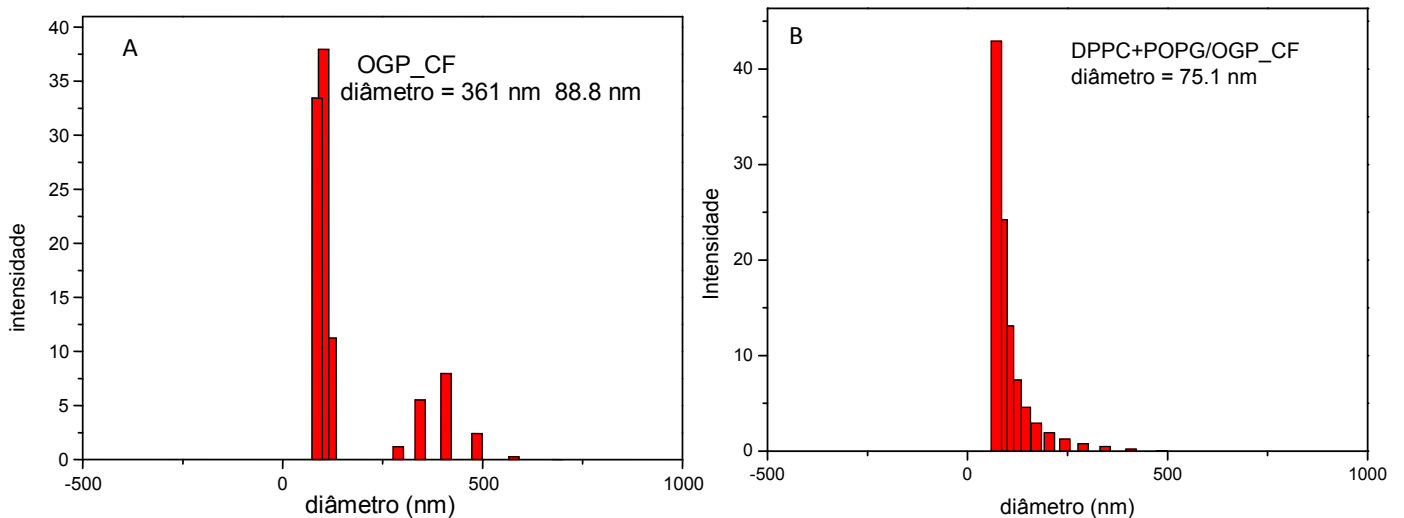
A Figura 19 permite observar que a perda de massa total ocorre em torno de 270°C devido à decomposição total do polímero. A porcentagem de resíduo a 600°C foi maior para as amostras pré-tratadas em solução alcoólica 20%. A amostra submetida a 3 ciclos de funcionalização, 3-Et-PHB-CaP, apresentou maior quantidade de resíduo depositado, aproximadamente 0,464 mg (12%). Enquanto que para as amostras sem pré-tratamento a maior massa de resíduo depositado foi na amostra com 2 ciclos de imersão (2PHB-CaP), conforme verificado nas análises de absorção atômica (Tabela 6). Portanto, esta análise confirma que a massa de resíduo inorgânico Ca-P incorporado ao PHB aumentou conforme aumentaram os ciclos de funcionalização/imersão dos *scaffolds* (para os compostos pré-tratados). Além disso, observou-se que a amostra 3PHB-CaP apresentou uma menor porcentagem residual em relação à amostra 2PHB-CaP, resultado que corrobora aos valores mensurados na análise de absorção atômica, onde a amostra com 3 ciclos de imersão revelou uma menor concentração de composto Ca-P depositada na superfície do *scaffold*.

Estes valores são mensurados quando descontando a porcentagem residual do PHB puro (4%). A porcentagem de Ca-P incorporada em cada compósito está descrita na Tabela 7.

4.1.7 Espalhamento de Luz (DLS)

A distribuição de tamanho dos peptídeos osteogênicos OGP-CF e OGP-W livres e incorporados nos lipossomas formados pelos fosfolipídios DPPC e POPG foi determinada pela técnica espalhamento de luz, a fim de se avaliar o tamanho dos agregados peptídeos osteogênicos bem como a influência dos mesmos em consequência da incorporação nos lipossomas.

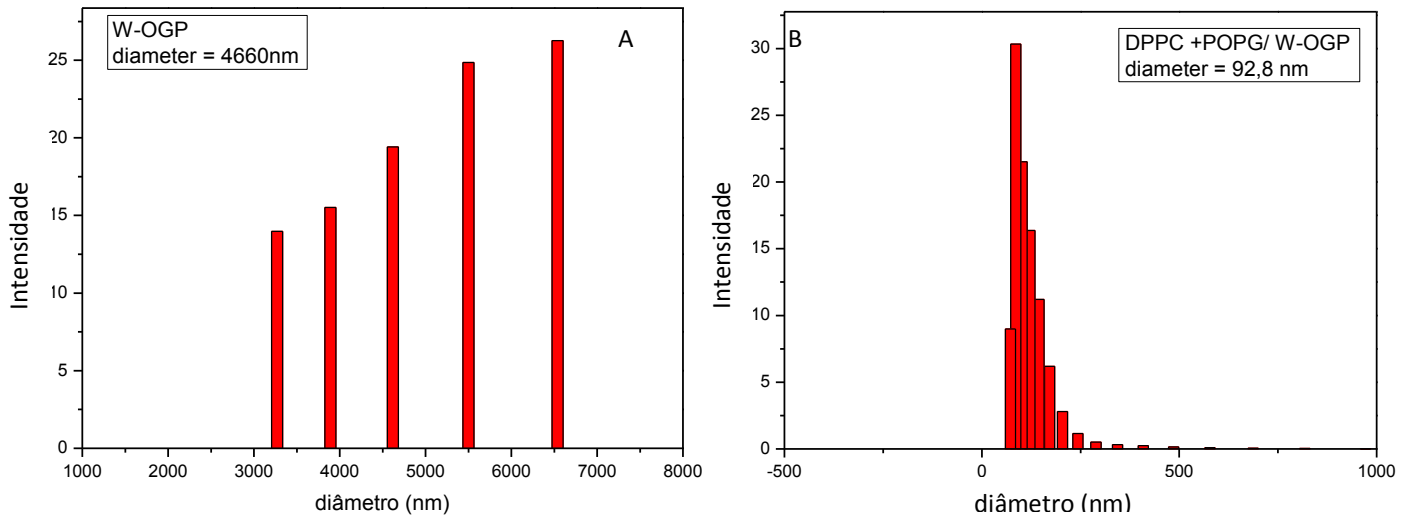
Figura 20 - Distribuição do tamanho do peptídeo livre em solução aquosa (A) e distribuição do tamanho do peptídeo OGP-CF incorporado nos lipossomas formados pelos fosfolipídios DPPC: POPG em solução aquosa (B), obtida pela análise de espalhamento de luz dinâmico.



Analisando a distribuição do tamanho do peptídeo OGP-CF, Figura 20-A, verificou-se que o peptídeo livre apresenta 2 agregados com tamanhos médios de 361nm e 89 nm. Isso se deve a hidrofobicidade do peptídeo e da carboxifluoresceína e por estarem em meio aquoso tendem a agregação. Ao analisar as medidas de DLS do peptídeo incorporado nos lipossomas, Figura 20-B, observou-se que o agregado de partículas em 361 nm não ocorreu e verificou-se que o tamanho do diâmetro dos lipossomas fica em torno de 75 nm, portanto, o sistema favoreceu uma distribuição monomodal das partículas, indicando a eficiência da incorporação e dispersão do peptídeo em meio aquoso quando na presença dos fosfolipídios.

Figura 21 - Distribuição do tamanho do peptídeo OGP-W livre em solução tampão PBS (A) e a distribuição do tamanho do peptídeo OFP-W incorporado nos

lipossomas formados pelos fosfolipídios DPPC: POPG em solução tampão PBS (B) obtida pela análise de espalhamento de luz dinâmico.



A Figura 21-A ilustra a distribuição do tamanho da estrutura linear do peptídeo OGP-W livre variando entre tamanhos de 3 μm a 6,5 μm , com uma média de 4,7 μm . Isso pode ser explicado devido à estrutura randômica e a hidrofobicidade do peptídeo OGP, que tende a agregar em meio tamponado aquoso. Ao analisar as medidas de DLS do peptídeo OGP-W incorporado nos lipossomas formados pelos fosfolipídios DPPC: POPG, Figura 21-B, observou-se que o agregado de partículas em 4,7 μm não ocorreu e que tamanho dos lipossomas ficou em torno de 93 nm.

O tamanho do lipossoma formado neste caso relaciona-se com a estrutura primária do peptídeo, pois o triptofano nesta sequência sintetizada está desprotegido, portanto possui carga 2 em pH neutro. Isto pode ter favorecido a formação de lipossomas maiores, quando comparado ao obtido com a incorporação do OGP-CF, já que este não possui cargas. Essa questão poderia ser resolvida se acetilando o resíduo de aminoácido N-terminal, no caso, o triptofano.

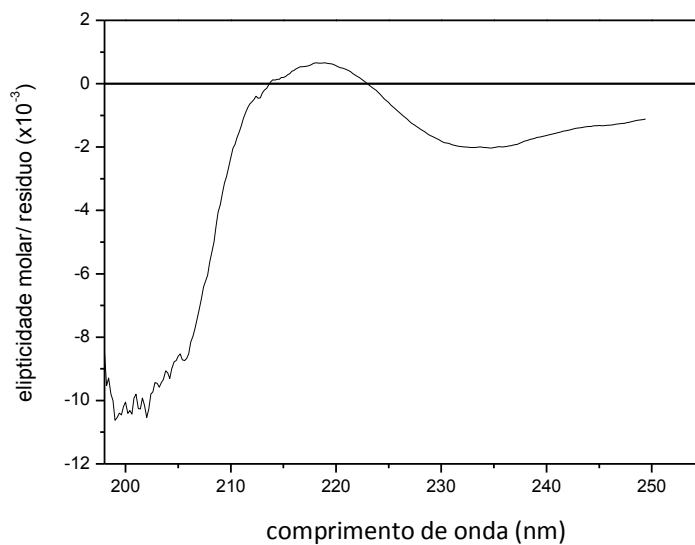
Em consequência da formação de agregados, do tamanho dos peptídeos OGP-W ser muito maior que o tamanho dos poros intrínsecos dos *scaffolds de PHB*,

nos quais seriam incorporados, constatou-se a necessidade de um estudo mais aprofundado em busca de metodologias que permitissem a diminuição do tamanho dos poros, antes de dar continuidade às demais etapas do trabalho. Portanto, optou-se pela escolha do uso do peptídeo marcado com carboxifluoresceína na continuidade do trabalho.

4.1.8 Dicroísmo circular (CD)

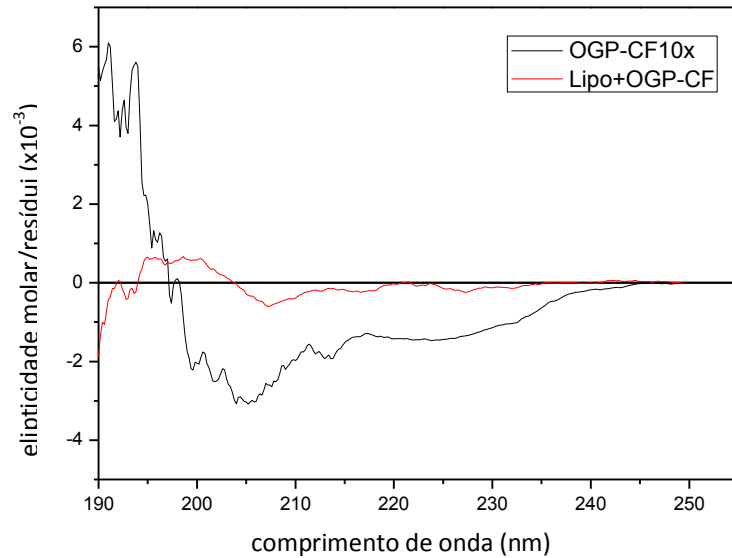
O peptídeo OGP possui uma conformação estrutural randômica, Figura 22, e os dados de dicroísmo circular revelam que o peptídeo OGP-5,6 carboxifluoresceína (CF) tem a tendência de se estruturar em hélice- α , pois são observados dois mínimos em 215 nm e 205 nm, com magnitudes aproximadas, além de uma banda positiva em 190 nm (ROGER & NORDEN, 1997).

Figura 22 - Espectro de dicroísmo circular da estrutura secundária randômica do peptídeo OGP diluído 10 vezes em metanol (partindo de uma concentração de 10^{-5} M).



Observando-se o espectro de dicroísmo circular dos peptídeos incorporados nos lipossomas, Figura 23, também se verifica que há uma tendência de estruturação em hélice- α , sendo observados dois mínimos de baixa intensidade em 209 nm e 217 nm. Em ambos os espectros observa-se um sinal baixo e com pouca resolução, isso se deve a baixa concentração do peptídeo, uma vez que ele teve que ser diluído 10 vezes (partindo de uma concentração de 10^{-5} M) devido o espalhamento de luz provocado pela carboxifluoresceína (CF). Mesmo com a baixa resolução notam-se dois mínimos e um máximo característico de α -hélice (ROGER & NORDEN, 1997). Em muitos casos, peptídeos tem sua estrutura secundária induzida por solventes orgânicos, como visto para o metanol, porém em meio aquoso assume uma conformação aleatória. (SOUZA, 2011). Quando o OGP-CF foi incorporado em lipossomas (meio aquoso) teve sua estrutura secundária preservada, característica essencial para a bioatividade do peptídeo.

Figura 23 - Espectros de dicroísmo circular de estruturas secundárias do peptídeo OGP-CF, diluído 10 vezes em metanol (partindo-se de uma concentração de 10^{-5} M) e das estruturas secundárias dos lipossomas com o OGP-CF incorporado em sua estrutura.



4.2 Determinação da liberação do peptídeo nos compósitos

A liberação do peptídeo OGP-CF dos respectivos compósitos, foi avaliada por espectroscopia de fluorescência, sendo inicialmente traçado o espectro de fluorescência do peptídeo livre, a fim de determinar o comprimento de onda máximo de emissão, sendo fixado o monocromador de excitação a 492 nm (obtido por espectrofotometria UV-Vis). Fixando os comprimentos de onda de excitação a 492 nm e de emissão a 520 nm, foi obtida uma curva padrão de fluorescência do OGP-CF, a 37 °C para auxiliar na quantificação do peptídeo liberado dos respectivos compósitos. A liberação *in vitro* dos peptídeos OGP-CF e compósito PHB-CaP foi, portanto, monitorada por espectroscopia de fluorescência ($\lambda_{exc} = 492$ nm e $\lambda_{em} = 520$ nm) a 37°C por um período de 24 h em circuito fechado com fluxo contínuo em solução PBS (pH 7,2).

As Figuras 24 e 25 mostram os perfis acumulativos das quantidades liberadas de peptídeo OGP-CF em função do tempo para os dois sistemas distintos, peptídeo livre ou incorporado ao lipossoma, respectivamente.

Figura 24 - Perfil de liberação cumulativa do OGP-CF a partir das amostras de PHB-CaP; peptídeo adsorvido em solução de etanol absoluto.

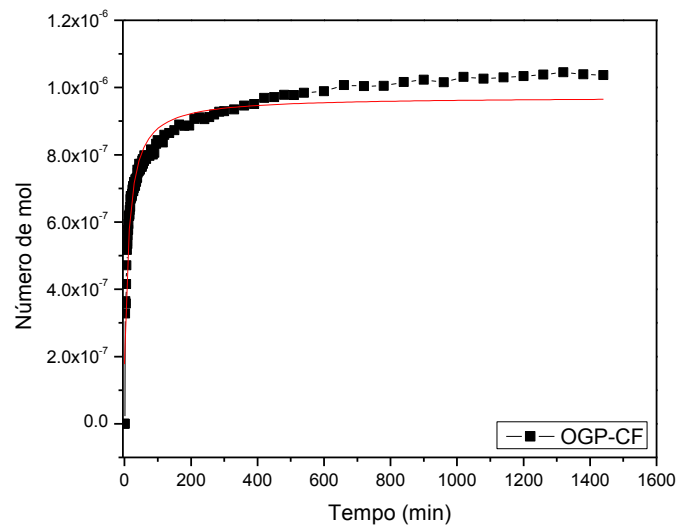
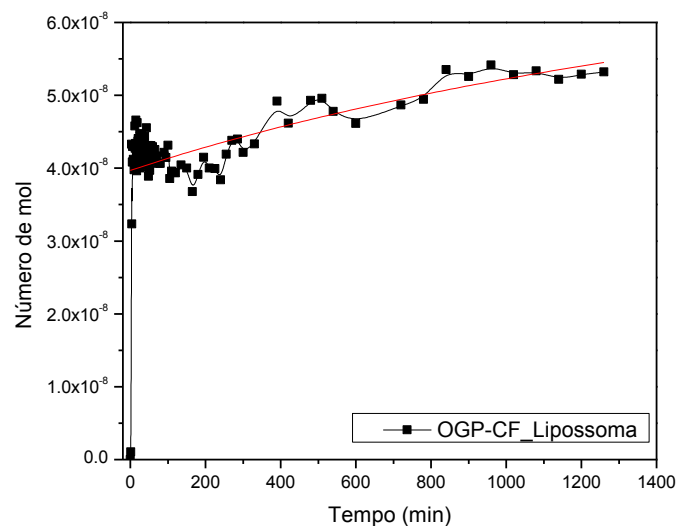


Figura 25 - Perfil de liberação cumulativa do OGP-CF incorporado aos lipossomas a partir das amostras de PHB-CaP.



Na Figura 24, pôde-se observar que a quantidade de peptídeo liberado é considerável em relação ao valor teórico incorporado ($10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$), apresentando um perfil de liberação ideal. Nota-se uma liberação acelerada do peptídeo na primeira hora (1 h), a partir desse período, observa-se uma liberação mais lenta do

peptídeo até aproximadamente 2 h, com uma liberação máxima em 10 h seguida de uma liberação constante atingindo um platô dentro de 24 h. Esse comportamento é típico de um sistema de liberação controlada, podendo a liberação inicial mais acelerada ser explicada pelo fato de uma fração do OGP-CF estar interagindo com a superfície dos *scaffolds* PHB-CaP por interações mais fracas ou então pela ligeira solubilidade do peptídeo, que faz com que as moléculas mais externas sejam rapidamente liberadas. Esse comportamento inicial é seguido por uma liberação lenta, a qual corresponde às moléculas do peptídeo que interagem mais fortemente à estrutura ou estão incorporadas no interior dos poros da estrutura 3D, mostrando que esse tipo de estrutura também pode ter caráter reservatório, proporcionando um efeito prolongado à liberação.

Na Figura 25, no entanto, foi observado o fenômeno conhecido como *burst release* ou liberação repentina, fenômeno este que ocorre devido aos lipossomas com OGP-CF estarem interagindo na superfície dos *scaffolds* em maior concentração resultando em um valor superestimado nos primeiros instantes dos ensaios de liberação (SOUSA; SOUZA; SOUZA, 2008). Esse perfil de liberação rápida no período inicial seguida por uma liberação mais lenta pode ser útil quando a liberação de altas doses da molécula carregada se faz necessária. Desta forma, neste sistema, observou-se que apesar deste efeito “*burst*” e de não apresentar um perfil ideal de liberação a quantidade de peptídeo liberado nos primeiros minutos até 1 h, também pode ser considerado bom, pois está próximo aos valores considerados ideais (10^{-9} mol.L⁻¹) para promover proliferação das células osteoblásticas e favorecer a atividade da fosfatase alcalina e conseqüentemente uma maior neoformação e mineralização de tecido ósseo (BAB et al. 1992; SPREAFICO et al. 2006). Além disso, nota-se que após esta liberação repentina há um ligeiro aumento

na liberação seguido de uma liberação constante atingindo um platô dentro de 24 h, mantendo uma concentração na casa de 10^{-8} mol.L⁻¹.

Apesar de não apresentar um perfil ideal de liberação, pôde-se ressaltar que o sistema de lipossoma preparado contendo POPG e DPPC na proporção de 3:7 pode ter obtido a temperatura de transição vítrea (T_g) próxima à temperatura corpórea, aproximadamente 36,5 °C. Pois, com este sistema observou-se a liberação do peptídeo OGP-CF, embora a quantidade liberada tenha sido aquém do valor esperado. Porém, estudos futuros de calorimetria diferencial exploratória revelarão o valor exato da T_g do sistema obtido, desta forma poderá aferir se a baixa taxa de liberação do peptídeo está relacionada a este fator. Outro fator é o tempo de liberação que em estudos futuros poderá ser ampliado para verificar se realmente houve incorporação dos lipossomas no interior dos poros *dos scaffolds*, e que não foi somente superficial, pois os lipossomas aprisionados no interior do *scaffolds* possam requerer um período maior para ocorrer o rompimento das partículas.

Contudo, os dados mensurados na liberação prolongada para os dois sistemas, peptídeo livre ou peptídeo em lipossoma, mostraram que a incorporação do peptídeo OGP-CF em solução de etanol absoluto proporcionou uma melhor solubilidade da molécula e conseqüentemente favoreceu uma incorporação mais eficaz para estes *scaffolds* do que em relação à incorporação do sistema peptídeo-lipossoma em solução tampão PBS.

5. Conclusão

Baseada na metodologia proposta conclui-se que:

- O pré-tratamento do *scaffold* de PHB em solução alcoólica 20% promoveu melhor funcionalização da superfície com compostos Ca-P.

- Os resultados das análises absorção atômica e de energia dispersiva-imagem espectral indicam que os íons fosfato interagem mais efetivamente com a superfície do PHB quando comparados com os íons cálcio.
- As técnicas de análise de absorção atômica e de energia dispersiva-imagem espectral não são ideais para elucidar qual estrutura a razão Ca/P dos compostos formados.
- Os dados de DRX e FTIR sugerem que a fase precipitada nos *scaffolds* foi β -TCP.
- Os dados de DLS sugeriram que o peptídeo OGP-W não apresentou tamanho ideal para incorporação nos *scaffolds* de PHB.
- O sistema de liberação lipossoma/OGP-CF apresentou-se eficaz na liberação prolongada do peptídeo osteogênico para este modelo de estudo.

Desta forma, tem-se que lipossoma/OGP-CF pode ser um sistema promissor para liberação controlada do OGP em *scaffolds* de PHB produzidos por SLS. Além disso, os *scaffolds* de PHB-CaP com OGP poderão tornar-se materiais em potencial para engenharia tecidual óssea.

6. Perspectivas

Como proposta para estudos futuros, pode-se citar:

- Modificação da técnica de funcionalização dos *scaffolds* de PHB. Por exemplo:
 - Inversão da ordem de imersão dos *scaffolds* nas soluções utilizadas para tal;

- Imersão dos *scaffolds* em uma única solução contendo ambos os íons de interesse;
- Funcionalizar a superfície do PHB com outro composto químico que não o etanol;
- Diminuição do tamanho das partículas de OGP-CF e OGP-W aplicando técnica de extrusão, afim de que o tamanho do lipossoma possa ser ideal para sistema de liberação de fármaco.

7. Referência Bibliográfica

ABDELAAL, O.A.M.; DARWISH, S.M.H. Review of Rapid Prototyping Techniques for Tissue Engineering Scaffolds Fabrication. **Characterization and development of biosystems and biomaterials advanced structured materials**, vol. 29, p.33-54, 2013.

ALBEE, F. H. The bone-graft operation for tuberculosis of the spine. **Bone Grafting**, vol. 94, No. 19, 1930.

ANDERSON, A.J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiological Reviews**, vol. 54: 450-72, 1990.

AOKI, H. **Science and medical applications of hydroxyapatite**. Tokyo: JAAS, 1991.

ASRAN, A.; RAZGHANDI, K.; AGGARWAL, N.; MICHLER, G.H.; GROTH, T. Nanofibers from blends of polyvinyl alcohol and polyhydroxy butyrate as potential scaffold material for tissue engineering of skin. **Biomacromolecules**, vol. 11: 3413-21, 2010.

AZEVEDO, V.V.C; CHAVES, S.A.; BEZERRA, D.C.; FOOK, M.V.L.; COSTA, A.C.F. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, vol.2.3, p.27-34, ISSN 1809-8797, 2007.

BAB, I.; GAZIT, D.; CHOREV, M.; MUHLRAD, A. SHTEYE, A. GREENBERG, Z., et al. Histone H4 - related osteogenic growth peptide (OGP) – A novel circulating stimulator of osteoblastic activity. **Embo Journal**, vol. 11: 1867-73, 1992.

BAB, I.; CHOREV, M. Osteogenic growth peptide: From concept to drug design. **Biopolymers**, vol. 66: 33-48, 2002.

BARUD, H.S.; SOUZA, J. L.; SANTOS, D.B.; CRESPI, M.S.; MESSADDEQ, Y. Bacterial cellulose/poly(3-hydroxybutyrate) composite membranes. **Carbohydrate Polymers**, vol. 83: 1279-84, 2011.

BRAGER, M.A.; PATTERSON, M.J.; CONNOLLY, J.F; NEVO, Z. Osteogenic growth peptide normally stimulated by blood loss and marrow ablation has local and systemic effects on fracture healing in rats. **Journal of Orthopaedic Research**, vol. 18: 133-9, 2000.

BONFIELD, W.; GRYNPASS, M.D.; TULLY, A.E., BOWMAN, J., ABRAM, J. Hydroxyapatite reinforced polyethylene - a mechanically compatible implant material for bone replacement. **Biomaterials**, vol.2 (3), p.185-186, 1981.

BURSTEIN, F. D. et al. Hydroxyapatite cement in craniofacial reconstruction: experience in 150 patients. **Plastic and Reconstructive Surgery**, vol.118, No. 2, p. 484-489, 2006.

CARDOSO, G. B. C. et al. Scaffolds of poly(ϵ -caprolactone) with whiskers of

hydroxyapatite. **Journal of Materials Science**, vol. 45, No.18, p. 4990-4993, 2010.

CARLOS, E.C; BATISTA BOIGES, A.P.; DEL CARLO, R.J.; MARTINEZ, M. M.; OLIVEIRA, P.M.; MORATO, G.O, et al. Comparison of In Vivo Properties of Hydroxyapatite-Polyhydroxybutyrate Composites Assessed for Bone Substitution. **Journal of Craniofacial Surgery**, vol. 20: 853-9, 2009.

CHANTARAPANICH, N.; PUTTAWIBUL, P.; SUCHARITPWATSKUL, S.; JEAMWATTANACHAI, P.; INGLAM, S.; SITTHISERIPRATIP, K. Scaffold Library for Tissue Engineering: A Geometric Evaluation. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**, vol.12, ID 407805, 2006.

CHEN, G. Q.; WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. **Biomaterials**, vol. 26, No. 33, p. 6565-6578, 2005.

CHEN, G.; USHIDA, T. TATEISHI, T. Scaffold design for tissue engineering. **Macromol. Biosci**, vol. 2, No.2, 2002.

CHEN, Y.C.; BAB, I.; MANSUR, N.; MUHLRAD, A.; SHTERYR, A.; NAMDAR-ARRAR, M., et al. Structure-bioactivity of C-terminal pentapeptide of osteogenic growth peptide [OGP(10-14)]. **Journal of Peptide Research**, vol. 56:147-56, 2000.

CHEN, Z. X. et al. Osteogenic growth peptide C-terminal pentapeptide [OGP (10 14)] acts on rat bone marrow mesenchymal stem cells to promote differentiation to

osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. **Regulatory Peptides**, vol. 142, No.1-2, p. 16-23, 2007.

COSTA, A. C. F. M. et al. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos** /ISSN 1809-8797, vol.4.3, p. 29-38, 2009.

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

DUSKOVA, M. et al. Guided tissue regeneration, barrier membranes and reconstruction of the cleft maxillary alveolus. **The Journal of Craniofacial Surgery**, vol.17, No. 6, p. 1153-1160, 2006.

EL-SAYED, A.; Abdel Hafez A, Hemmat, ABDENALHADY, M.; KHODAIR, T. Poduction of Polyhydroxybutyrate (PHB) Using Batch and Two-stage Batch CultureStrategies. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, vol. 3:617-27, 2009.

FARRINGTON, M.; MATTHEWS, I.; FOREMAN, J.; CAFFREY, E. Bone graft contamination from a water de-ionizer during processing in a bone bank. **J. Hosp. Infect.**, vol.32, p. 61-64, 1996.

FOOK, A.C.B.M.; APARECIDA, A.H.; FOOK, M.V.L. Desenvolvimento de Estruturas Porosas de Polietileno de Ultra Alto Peso Molecular (PEUAPM) Recobertas com Apatitas para Substituição e Regeneração Óssea. **Revista Matéria**, vol. 15, p.392-399, 2010.

GABET, Y.; MULLER, R.; REGEV, E.; SELA, J.; SHTEYER, A.; SALISBURY, K., et al. Osteogenic growth peptide modulates fracture callus structural and mechanical properties. **Bone**, vol. 35: 65-73, 2004.

GAO, C. et al. Dynamic interaction between the growing Ca-P minerals and bacterial cellulose nanofibers during early biomineralization process. **Cellulose**, v. 17, n. 2, p. 365-373, 2010.

GASTALDI, A.C.; APARECIDA, A.H., 2010. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, vol.33, No 6, p. 1352-1358, 2010.

GIUBERTI, C.S. Estudo da estabilidade e produção piloto de lipossomas pH-sensíveis furtivos de cisplatina. 2007. 81f. Dissertação (Mestre em Ciência Farmacêuticas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG.

GRANT & BANSSINATH, 200 GRANT, G., BANSINATH, M. Liposomal delivery systems for local anesthetics. **Reg. Anesth. Pain. Med**, vol. 26, 61-63, 2001.

GREENBERG, Z. et al. Structural and functional-characterization of osteogenic growth peptide from human serum - identity with rat and mouse homologs. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, vol. 80, No. 8, p. 2330-2335, 1995.

GREGORIADIS, G. & RYMAN, B. E. Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases. **The Biochemical Journal**, vol. 124, No.5, 58p, 1971.

HENCH, L. L. Bioceramics: from concept to clinic. **Journal of the American Ceramic Society**, vol. 74, No 7, p. 1487-1510, 1991.

HONDA, Y. et al. Formation of bone-like apatite enhanced by hydrolysis of octacalcium phosphate crystals deposited in collagen matrix. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, vol. 80, No. 2, p. 281-289, 2007.

HUI Z, YU L, XIAOLI, Y.; XIANG, H.; FAN, Z.; NINGBO, H., et al. C-terminal pentapeptide of osteogenic growth peptide regulates hematopoiesis in early stage. **Journal of Cellular Biochemistry**, vol. 101:1423-9, 2007.

HUTCHENS, S. A. et al. Biomimetic synthesis of calcium-deficient hydroxyapatite in a natural hydrogel. **Biomaterials**, No. 27, p. 4661- 4670, 2006.

HUTCHENS, S. A. et al. A resorbable calcium-deficient hydroxyapatite hydrogel composite for osseous regeneration. **Cellulose**, vol. 16, No. 5, p. 887-898, 2009.

LE GEROS, R.Z; In Calcium phosphates in oral byology and medicine. **Meyers**. São Francisco, 1991.

LEONG, K. F.et al. Solid freeform fabrication old tree-dimensional scaffolds for engineering replacement tissue and organs. **Biomaterials**, vol. 24, p.2363-2378, 2003.

LUCCHESI, C., 2010. Comportamento de células osteoblásticas sobre materiais poliméricos. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia: Campinas, SP: [s.n], 2010.

LUKLINSKA, Z.B.; SCHLUCKWERDER, H. In vivo response to HA-polyhydroxybutyrate/polyhydroxyvalerate composite. **Journal of Microscopy-Oxford**, vol. 211:121-9, 2003.

KAWACHI, E.Y., BERTRAN, C. A., DOS REIS, R.R., ALVES, O.L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, 23(4), 2000.

KLEIN, M.; GLATZER, C. Individual CAD/CAM fabricated glass-bioceramic implants in reconstructive surgery of the bony orbital floor. **Plastic and Reconstructive Surgery**, vol.117, No. 2, p. 565-570, 2006.

MEDVECKY, L.; STULAJTEROVA, R.; KUTSEV, S.V. Microstructure and properties of polyhydroxybutyrate-calcium phosphate cement composites. **Chemical Papers**, vol. 65:667-75, 2011.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. Biomateriais: fundamentos aplicações. Rio de Janeiro: **Cultura Médica**, 2006.

PETRI, L.; FERREIRA, M.;MORAES, M.L. Toward preserving the structure of the antigenic peptide p17-1 from the HIV-1 p17 protein in nanostructured films. *J Nanosci Nanotechnol.* 2011 Aug; vol. 11(8):6705-9.

ROGER, A.; NORDEN, B. Circular dichroism and linear dichroism. Oxford, Oxford University Press, 1997. 150p.

SASKA, S. et al. Characterization and in vitro evaluation of bacterial cellulose membranes functionalized with osteogenic growth peptide for bone tissue engineering. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, vol. 23, No.9, p. 2253-2266, 2012.

SASKA, S. Materiais compósitos orgânico-inorgânicos a base de celulose bacteriana com peptídeos regulatórios de fatores de crescimento, OGP e OGP [10-14], para regeneração óssea, 2011.257f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, São Paulo. 2011.

SHISHATSKAYA, E.; hishatskaya EI, Khlusov IA, Volova TG. A hybrid PHB-hydroxyapatite composite for biomedical application: production, in vitro and in vivo investigation. **Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition**, vol 17:481-98, 2006.

SONG, J. H.; KIM, H. E.; KIM, H. W. Collagen-apatite nanocomposite membranes for guided bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, vol. 83, No.1, p. 248-257, 2007.

SOUSA, A.; SOUZA, K. C.; SOUSA, E. M. B. Mesoporous silica/apatite nanocomposite: special synthesis route to control local drug delivery. **Acta Biomaterialia**, v. 4, p. 671-679, 2008.

VANELLA, L. et al. HO-1 expression increases mesenchymal stem cell-derived osteoblasts but decreases adipocyte lineage. **Bone**, vol. 46, No.1, p. 236-243, 2010.

VOLPATO, N. Prototipagem rápida: Tecnologias e Aplicações, Blucher, 1 ed., ISBN 85-212-0388-8, São Paulo, p.244, 2007.

WANG, Y.M.; WU, Q.; CHEN J.C.; CHEN G.Q. Evaluation of three-dimensional scaffolds made of blends of hydroxyapatite and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for bone reconstruction. **Biomaterials**, vol. 26:899-904, 2005.

WIEGAND, C. et al. Protease and ROS activities influenced by a composite of bacterial cellulose and collagen type I *in vitro*. **Cellulose**, vol. 13, No.6, p. 689-696, 2006.

WILLIAMS, J.M. et al. Bone tissue engineering using Polycaprolactone scaffolds fabricates via selective laser sintering. **Biomaterials**, vol.26, p.4817-4827, 2005

YANG, S.F., LEONG, K.F.; DU, Z.H; CHUA, C.K. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part 1. Traditional factors. **Tissue Engineering**, vol. 7, p. 679-689, 2001.

YANG, S.F., LEONG, K.F.; DU, Z.H; CHUA, C.K. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques. **Tissue Engineering**, vol. 8, p. 1-11, 2002.

YU, H. et al. Effect of porosity and pore size on microstructures and mechanical properties of poly-epsilon-caprolactone- hydroxyapatite composites. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, vol.86B, No. 2, p.541- 547, 2008.

ZHANG, L. J. et al. Hydroxyapatite/collagen composite materials formation in simulated body fluid environment. **Materials Letters**, vol. 58, No. 5, p. 719-722, 2004.

ZHIJIANG, C.; GUANG, Y. Optical nanocomposites prepared by incorporating bacterial cellulose nanofibrils into poly(3-hydroxybutyrate). **Mater. Lett.**, vol. 65, p. 182–184, 2011.

ZHU, N.; CHEN, X. Biofabrication of Tissue Scaffolds. **Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications**. Prof. Rosário Pignatello (Ed.), ISBN 978-953-51-1051-4, InTech, DOI:10.5772/54125, 2013. Disponível: <http://intechopen.com/books/advances-in-biomaterials-science-and-biomedical-applications/biofabrication-of-tissue-scaffolds>>. Acesso em: 12 out. 2013.