



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Livia Maria Christovam

**COMPÓSITOS À BASE DE POLÍMEROS COM FASES INORGÂNICAS
BIOATIVAS PARA A ENGENHARIA TECIDUAL**

Araraquara

2015

Livia Maria Christovam

**COMPÓSITOS À BASE DE POLÍMEROS COM FASES INORGÂNICAS
BIOATIVAS PARA A ENGENHARIA TECIDUAL**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da
Universidade Estadual Paulista (Campus de Araraquara)
para obtenção do Título de Mestra em Química

Orientador: Prof. Dr. Sidney José Lima Ribeiro

Co-orientador: Prof.Dr. Luiz Henrique Catalani

Araraquara

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

C556c Christovam, Livia Maria
Compósitos à base de polímeros com fases inorgânicas
bioativas para engenharia tecidual: / Livia Maria
Christovam. – Araraquara : [s.n], 2015
111 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Sidney José Lima Ribeiro
Coorientador: Luiz Henrique Catalani

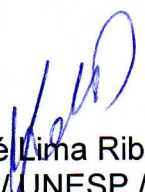
1. Materiais biomédicos. 2. Compósitos poliméricos.
3. Biocompatibilidade. 4. Engenharia tecidual. 5. Apatita.
I. Título.

LIVIA MARIA CHRISTOVAM

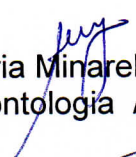
Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestra em
Química.

Araraquara, 13 de abril de 2015.

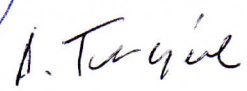
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Sidney José Lima Ribeiro (Orientador)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara.



Profª. Drª. Ana Maria Minarelli Gaspar
Faculdade de Odontologia / UNESP / Araraquara.



Profª. Drª. Agnieszka Tercjak Sliwinska
Universidad Del País Vasco / San Sebastian - Espanha.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Livia Maria Christovam

Nacionalidade: Brasileira

Data de Nascimento: 26/01/1989 **Naturalidade:** Américo Brasiliense - SP

Email: liviaamc@yahoo.com.br

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Logradouro: Rua Professor Francisco Degni, nº55 **CEP:** 14801-970

UNESP - Instituto de Química de Araraquara

Departamento de Química Geral e Inorgânica – Grupo de Materiais Fotônicos

Araraquara - São Paulo - Brasil

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2013 – 2015

Mestrado em Química

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP – Araraquara/SP.

Título: Compósitos à base de Polímeros com Fases Inorgânicas Bioativas para a Engenharia Tecidual

Orientador: Prof. Dr. Sidney José Lima Ribeiro

Co-orientador: Prof.Dr. Luiz Henrique Catalani

2008 – 2012

Graduação em Bacharel em Química Tecnológica.

Universidade Estadual Paulista – UNESP – Araraquara- SP

Trabalho de Conclusão: Estágio Supervisionado na empresa DuPont Performance Coatings, Guarulhos – SP.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Martins.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- Introdução ao Empreendedorismo (60 horas) – UNESP Araraquara;
- Físico – Química de Superfícies (60 horas) – UNESP Araraquara;
- Biomateriais (20 horas) – UNESP Araraquara;
- Química e Tecnologia de Bebidas: Processo de Produção e Qualidade (20 horas) – UNESP Araraquara;
- Criminalística (40 horas) – UNESP Araraquara;
- White Belt – Seis Sigma (16 horas) – DuPont do Brasil;
- Sistema de Qualidade 5S (4 horas) - DuPont do Brasil;
- Comunicação com Impacto (4 horas) - DuPont do Brasil;
- Respeito às Pessoas (4 horas) - DuPont do Brasil;
- Básico e Avançado de Tintas (32 horas) - DuPont do Brasil;
- Básico de Resinas (10 horas) - DuPont do Brasil.

ATIVIDADES ACADÊMICAS RELEVANTES

1. Participação em Atividades Acadêmicas

- Participação da 4ª Semana da Escrita Científica do IFSC.
- Participação no Workshop: “ENTREPRENEURSHIP FOR GRADUATE IN CHEMISTRY: A GLANCE FOR BRAZILIAN COMPETITIVENESS INNOVATION & DEVELOPMENT” – Instituto de Química – UNESP – Araraquara

PRODUÇÕES

Artigos completos publicados em periódicos

RIBEIRO, S. J. L.; SILVA, ROBSON ROSA ; DOMINGUEZ, CHRISTIAN T ; DOS SANTOS, MOLIRIA V ; BARBOSA-SILVA, RENATO ; CAVICCHIOLI, MAURICIO ; CHRISTOVAM, LIVIA MARIA ; DE MELO, LUCIANA S.A. ; GOMES, ANDERSON S. L. ; DE ARAÚJO, CID B. Silk fibroin biopolymer films as efficient hosts for DFB laser operation. **J. Mater. Chem. C**, 2013,1, 7181-7190.

Trabalhos Publicados Em Anais De Congressos

RIBEIRO, S. J. L.; SILVA, R. R, VORPAGEL, A. J.; SANTOS, M. V.; SANTOS, D. B.; CAVICCHIOLI, M.; CHRISTOVAM, L. M. Multifunctional organic-inorganic hybrids based on biocellulose, fibroin membranes and vegetable oils. In: XIV International Sol-Gel Conference, 2011, Hangzhou, China.

CHRISTOVAM, L.M., CAVICCHIOLI, M., RIBEIRO, S.J. Preparação E Caracterização De Filmes Transparentes Biocompatíveis A Partir Da Fibroína Extraída Da Seda (Bombyx Mori). XXIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2011, Araraquara – SP.

CHRISTOVAM, L.M., CAVICCHIOLI, M., RIBEIRO, S.J. Preparação E Caracterização De Filmes E Compósitos Biocompatíveis A Partir De Fibroína Extraída Da Seda (Bombyx Mori). 34 a. Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis-SC.

SILVA, R. R.; DOMINGUES, C. T.; SANTOS, M. V. DOS, MELO, L. S. A.; BARBOSA-SILVA, R.; CAVICCHIOLI, M.; CHRISTOVAM, L. M.; RIBEIRO, S. J. L.; ARAUJO, C. B. DE, GOMES, A. S. L. Efficient Distributed Feedback Dye Laser In Silk Fibroin Films. In: CONGRESS OF LASER AND ELETRICO-OPTICS, 2012, SanJose-Estados Unidos. Laser Science for Photonic Applications, 2012.

CAVICCHIOLI, M.; CHRISTOVAM, L. M.; SILVA, R. R, RIBEIRO, S. J. L, Luminescent films and porous scaffolds prepared with the biopolymer fibroin extracted from silk. POLYCHAR WORLD FORUM ON ADVANCED MATERIALS, 20, 2012 Dubrovnik-Croatia.

CHRISTOVAM, L. M.; Saska,S. ; NIGOGHOSSIAN K. ; GUTIERREZ J. ; TERCJAK, A. ; Ribeiro, S.J.L. . Infrared to visible up-conversion in Yb:Er phosphate-vanadate containing poly-ε-caprolactone fibers.. In: XIII ENCONTRO SBPMA T, 2014, João Pessoa. Abstracts, 2014. v. 13. p. 137.

Atividade científica e de Extensão

2012 – DuPont do Brasil S/A – DuPont Performance Coatings

Cargo: Estagiária.

Departamento: Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Tintas Industriais.

Desenvolvimento de Projeto baseado na Metodologia Seis Sigma: Análise da performance de produtos do portfólio.

2011 – Bolsista FAPESP Iniciação Científica

Cargo: Iniciação Científica.

Departamento: Departamento de Química Geral e Inorgânica – Instituto de Química – UNESP Araraquara.

Projeto: “Filmes finos híbridos luminescentes no sistema fibroína-siloxanos-lantanídeos” – área de biomateriais.

2008- 2011 – Bolsista do Grupo PET

Cargo: Membro do Grupo.

Grupo de extensão universitária que abrange a tríade: ensino, pesquisa e extensão.

2008 - 2009 – Membro da Química Júnior – Projetos e

Cargo: Gerente de Eventos.

Empresa Júnior do Instituto de Química – UNESP Araraquara

Participação em encontros e congressos e organização de eventos:

1. Participação e Apresentação de Trabalho Científico na “34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química”- 2011;
2. Participação nas XXXVIII, XXXIX e XXXX Semana da Química – IQ/Araraquara – UNESP - 2008, 2009 e 2010;
3. Participação do “I, II e III Encontro dos Grupos PET Química do Estado de São Paulo” – 2009, 2010 e 2011.

4. Comissão Organizadora do XXXVIII e XXXX Semana da Química – IQ/Araraquara-UNESP 2008 e 2010;
5. Organização da oficina do software Origin para a comunidade acadêmica;
6. Comissão organizadora do “III Encontro dos Grupos PET Química do Estado de São Paulo”;
7. Membro da Comissão Organizadora do Trabalho Voluntário 2011 – colaboração dos grupos de extensão do Instituto de Química- UNESP – Araraquara.

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Luis e Maria
e à minha irmã Elisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente à Deus por ter me concedido saúde e motivação para desempenhar o trabalho aqui realizado por esses dois anos;

Aos meus pais que sempre lutaram para que eu chegasse até aqui e que se privaram de suas vidas para garantir os meus estudos;

Ao meu orientador Prof. Dr. Sidney José Lima Ribeiro pela oportunidade, pela orientação e pela enorme contribuição para minha evolução profissional e crescimento pessoal;

Ao meu corientador Prof. Dr. Luiz Henrique Catalani que sempre me recebeu de braços abertos e disponibilizou todo seu laboratório para parte dos experimentos;

À Sybele pela amizade, pela ajuda e pelos conhecimentos concedidos a mim por todo meu mestrado;

À CAPES pela bolsa concedida, que financiou todo meu trabalho;

À Profa. Dra. Agnieszka Tercjak e Dra. Junkal Gutierrez pela grande ajuda no trabalho e pela disponibilidade sempre em ajudar;

Novamente à Profa. Dra. Agnieszka Tercjak e à Profa. Dra. Ana Maria Minarelli Gaspar pela participação na banca avaliadora da minha defesa de mestrado e pelas críticas que são de grande valia;

À minha irmã e minha melhor amiga, Elisa, por estar ao meu lado sempre e que amo tanto;

Ao Felipe pelo tanto que me apoiou desde o começo, não só nesse trabalho, mas como por todos os desafios enfrentados em 2014. Obrigada pelo carinho, pela paciência e por me fazer sorrir nos momentos mais difíceis;

Às meninas da Farmácia-Bioquímica UNESP Araraquara, Rep Paracetamal e agregadas: Marina, Rachel, Amanda, Andreza, Gaga, Emiliana, Carol, Ricardo, Marcus e Jefferson que foram meus amigos de verdade e que abraçaram com todo carinho;

À minha amiga do coração e de muitos anos, Nathiana que não há como descrever o tamanho da minha amizade por você e a sua ajuda na minha vida;

A todos meus professores, desde a pré-escola, que me transmitiram todos seus conhecimentos e permitiu a minha formação profissional;

Aos colegas do Grupo de Materiais Fotônicos, pela amizade e colaboração, e um agradecimento em especial à Karina Nigoghossian, pela amizade e pelo trabalho em conjunto;

À Professora Dra. Alessandra de Almeida Lucas e ao Dr. Cesar Beatrice pela ajuda nos ensaios mecânicos e nos resultados obtidos;

Ao Prof. Dr. Édison Precoraro pela ajuda na avaliação do meu trabalho na qualificação e as super dicas;

Aos meus colegas de trabalho da USP São Paulo: Alliny, Fernando, Diego, Isabela, Ricardo que me aguentaram por algumas semanas e me fizeram rir demais. Um agradecimento em especial à Alliny que me ensinou e me ajudou demais nos resultados de proliferação celular;

Ao CTI Campinas pela disponibilidade para impressão dos scaffolds;

Ao Rafael, pela amizade e por conviver comigo no laboratório e com frequência ouvir meus desabafos profissionais;

A todos meus amigos que compartilharam momentos da minha vida até então, principalmente os da minha turma de graduação que ainda continuaram no IQ e que me acompanharam durante o período de mestrado;

Ao GFQM – IQ pelas medidas de Difração de Raios X;

À todos os funcionários do Instituto de Química da UNESP Araraquara que sem a ajuda de vocês, nenhum trabalho se conclui.

RESUMO

Estruturas tridimensionais (3D), scaffolds, têm sido largamente estudadas na área de reconstrução de defeitos ósseos, já que esses materiais têm proporcionado resultados promissores na área de engenharia tecidual. A fim de tornar o biomaterial mais compatível com o tecido a ser formado e garantir resistência mecânica adequada, tem-se adicionado compostos que proporcionam ao material essas propriedades. O objetivo do trabalho é o estudo de materiais promissores para aplicação na engenharia tecidual utilizando o polímero policaprolactona (PCL) com a adição de fibroína, apatita com lantânio e com nanopartículas luminescentes ou vidro bioativo. Esses materiais foram analisados quanto às suas propriedades necessárias à utilização na área de regeneração do tecido ósseo. Para a caracterização dos materiais obtidos foram empregadas as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise dinâmico-mecânica (DMA), análise mecânica por torção, reologia, Perfilometria, Medida de ângulo de Contato propriedades ópticas da amostra luminescente, teste in vitro MTT de proliferação celular e radiografia das amostras. Em consequente, desenvolveu-se estruturas 3D através do método de manufatura aditiva (impressão 3D). Encontrou-se composições que apresentaram resistência mecânica maior que a policaprolactona e crescimento celular favorável para aplicação na área biomédica. A amostra com nanopartículas luminescentes apresentou propriedade óptica pelo processo de *Upconversion*. Os materiais estudados são promissores para matéria-prima de scaffolds para aplicação na regeneração de tecido ósseo.

Palavras Chave: policaprolactona, scaffold, compósitos

ABSTRACT

Three-dimensional structures (3-D) scaffolds have been widely studied area in the reconstruction of bone defects because these materials have provided promising results in tissue engineering. In order to render the biomaterial more compatible with the tissue to be formed and to ensure adequate mechanical strength, has been added to the material compounds providing these properties. The objective is the study of promising materials for use in tissue engineering using polycaprolactone polymer (PCL) with the addition of fibroin, apatite and lanthanum with luminescent nanoparticles or bioactive glass. These materials were analyzed for their properties required for use in the regeneration area of bone tissue. For the characterization of materials were used the scanning electron microscopy techniques (SEM), infrared spectroscopy with Fourier transform (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA), differential scanning calorimetry (DSC), dynamic mechanical analysis (DMA) , mechanical analysis twist, rheology, profilometry, contact angle measure optical properties of luminescent sample, test in vitro MTT cell proliferation and radiographic images. In consequence, we developed 3D structures through additive manufacturing method (3D printing). It was found that compositions showed strength greater than polycaprolactone and favorable cell growth for application in the biomedical field. The sample with luminescent nanoparticles presented optical property by the upconversion process. The materials studied are promising for raw material scaffolds for application in bone tissue regeneration.

Keywords: polycaprolactone, scaffold, composites

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Scaffold de policaprolactona e nano hidroxiapatita construído por impressão 3D.....	24
Figura 2. Monômero da policaprolactona.....	25
Figura 3. Publicações que contém PCL para área de biomateriais e engenharia tecidual até o ano de 2010.....	26
Figura 4. Estrutura secundária da fibroína. Conformação de folhas β antiparalelas.....	28
Figura 5. Janela biológica encontrada na pele.....	34
Figura 6. Diagrama de níveis de energia para os pares de íons lantanídeos Yb^{3+} - Er^{3+}	35
Figura 7. Esquema da técnica de prototipagem rápida para a produção de scaffolds 3D.....	37
Figura 8. Fluxograma para síntese do vidro bioativo.....	41
Figura 9. Mini-extrusora dupla rosca (Thermo Scientific).....	45
Figura 10. Extrusão dos compósitos na forma de filamentos padronizados.....	45
Figura 11. Exemplo de modelo virtual 3D para <i>scaffolds</i>	52
Figura 12. Processo de confecção dos <i>scaffolds</i> de PCL por extrusão (Fab@CTI).....	52
Figura 13. Filamento obtido a partir do processo de extrusão.....	53
Figura 14. Espectro de Infravermelho do PCL.....	54
Figura 15. Difratoograma de Raios X do PCL.....	54
Figura 16. Espectro Infravermelho fibroína em pó.....	55
Figura 17. Difratoograma de Raios-X da fibroína da seda.....	56
Figura 18. Espectro de infravermelho da La_{20}OAP	57
Figura 19. Padrões de difração de DRX para a amostra La_{20}OAP com respectivos picos de difração assinalados correspondentes aos planos (211), (112) e (300), respectivamente.....	57
Figura 20. Espectro Infravermelho da PCL/AL.....	58
Figura 21. Difratoograma de Raios X da apatita luminescente comparado com o difratograma das nanopartículas feitas por NIGOGHOSSIAN, K. em seu trabalho de mestrado.....	59

Figura 22. Difratoograma de DRX da apatita luminescente juntamente com os padrões.....	60
Figura 23. Espectro Infravermelho vidro bioativo.....	61
Figura 24. Difratoograma de Raios-X do vidro bioativo.....	62
Figura 25. Espectro de infravermelho do PCL e todos os compósitos.....	63
Figura 26. Curvas de DSC do PCL e todos os compósitos extrudados.....	64
Figura 27. Curvas de DSC do PCL e todos os compósitos após dois aquecimentos.....	67
Figura 28. Curvas termogravimétricas para o PCL e os compósitos.....	68
Figura 29. Microscopia Eletrônica de Varredura para o PCL.....	70
Figura 30. Microscopia Eletrônica de Varredura para a secção transversal do filamento extrudado de PCL/F.....	70
Figura 31. Microscopia Eletrônica de Varredura para a secção transversal do filamento extrudado de PCL/A.....	70
Figura 32. Microscopia Eletrônica de Varredura para a secção transversal do filamento extrudado de PCL/A/F.....	71
Figura 33. Microscopia Eletrônica de Varredura para a secção transversal do filamento extrudado de PCL/B.....	71
Figura 34. Microscopia Eletrônica de Varredura para a secção transversal do filamento extrudado de PCL/B/F.....	71
Figura 35. Microscopia Eletrônica de Varredura para a secção transversal do filamento extrudado de PCL/A/B.....	72
Figura 36. Microscopia Eletrônica de Varredura para a secção transversal do filamento extrudado de PCL/A/B/F.....	72
Figura 37. Microscopia Eletrônica de Varredura para a secção transversal do filamento extrudado de PCL/AL.....	72
Figura 38. Microscopias Eletrônicas de Varredura da secção transversal dos filamentos de PCL/A, PCL/A/F, PCL/B, PCL/B/F, PCL/A/B e PCL/A/B/F com um aumento de 2000 vezes.....	74
Figura 39. Valores de ângulo de contato e respectivos erros padrões.....	75
Figura 40. Medida de ângulo de contato em filmes de policaprolactona e dos 8 compósitos.....	76
Figura 41. Topografia da superfície das amostras PCL (à esquerda) e PCL/F (à direita).....	77

Figura 42. Topografia da superfície das amostras PCL/A (à esquerda) e PCL/A/F (à direita).....	77
Figura 43. Topografia da superfície das amostras PCL/B (à esquerda) e PCL/B/F (à direita).....	78
Figura 44. Topografia da superfície das amostras PCL/A/B (à esquerda) e PCL/A/B/F (à direita).....	78
Figura 45. Topografia da superfície da amostra PCL/AL.....	78
Figura 46. Curva de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para o polímero PCL e as amostras em uma temperatura de 100°C.....	79
Figura 47. Curva de log da viscosidade em função do log da taxa de cisalhamento para o polímero PCL e as amostras em uma temperatura de 100°C.....	80
Figura 48. Curva de viscosidade de módulo de armazenamento por frequência em solitação mecânica em torção.....	82
Figura 49. Curva de viscosidade de módulo de armazenamento pela temperatura em solitação mecânica em torção.....	84
Figura 50. Curva de módulo de armazenamento em função da frequência em solitação mecânica em flexão.....	86
Figura 51. Imagens do scaffold da amostra PCL/A/B impresso em impressora 3D.....	88
Figura 52. Espectros de Emissão com excitação em 980 nm para nanopartículas $\text{YVO}_4\text{:Yb}^{3+}\text{:Er}^{3+}$ (NP), apatita dopada com $\text{YVO}_4\text{:Yb:Er}$ e scaffold (PCL/AL).....	89
Figura 53. a) Espectros de emissão da apatita com nanopartículas de $\text{YVO}_4\text{:Yb}^{3+}\text{:Er}^{3+}$ em função da potência do laser à excitação em 980 nm; b) Dependência da emissão das bandas pela potência de bombeamento.....	90
Figura 54. a) Espectros de emissão do scaffold luminescente em função da potência do laser à excitação em 980 nm; b) Dependência da emissão das bandas pela potência de bombeamento.....	90
Figura 55. a) Espectros de emissão do scaffold luminescente em função da potência do laser à excitação em 980 nm; b) Dependência da emissão das bandas pela potência de bombeamento.....	91

Figura 56. Imagens do microscópio de luminescência do compósito PCL/YVO ₄ :Yb ³⁺ :Er ³⁺	92
Figura 57. Valores de densidade óptica à 570 nm relativos à cada amostra para 2 e 7 dias de proliferação celular, segundo os procedimentos do teste de MTT	93
Figura 58. Valores de densidade óptica à 570 nm relativos à às amostras 1 e 7 para amostras com estruturas físicas na forma de filme e de scaffold e a comparação da proliferação celular para o tempo de 2 dias de cultura.....	95
Figura 59. Fotos radiográficas das amostras PCL:La ₂₀ OAP, PCL:La ₂₀ OAP:BV e PCL: La ₂₀ OAP:BV:FB.....	96
Figura 60. Foto radiográfica da PCL/YVO ₄ :Yb ³⁺ :Er ³⁺ - Ap.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Planejamento dos experimentos.....	44
Tabela 2. Dados de T_{onset} , T_m , ΔH_f e % cristalinidade para a policaprolactona e os compósitos para as amostras extrudadas.....	45
Tabela 3. Dados de T_{onset} , T_m , ΔH_f e % cristalinidade para a policaprolactona e os compósitos para amostras em pó, após dois aquecimentos.....	67
Tabela 4. Dados de T_{onset} da policaprolactona e cada compósito.....	68
Tabela 5. Medidas de ângulo de contato das amostras.....	75
Tabela 6. Valores de módulos de armazenamento para a policaprolactona e as amostras.....	82
Tabela 7. Valores de dos módulos de armazenamento nas temperaturas inicial e final e a porcentagem de queda da resistência mecânica durante o ensaio para a policaprolactona e as amostras.....	85
Tabela 8. Valores de módulos de armazenamento para a policaprolactona e as amostras.....	86
Tabela 9. Valores de n para nanopartículas de $YVO_4:Yb^{3+}:Er^{3+}$, apatita e scaffold luminescente.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS

- MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura
- DSC: Calorimetria Exploratória Diferencial
- FT-IR: Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
- TGA: Análise Termogravimétrica
- DRX: Difractometria de Raios X
- CTI: Centro de Tecnologia da Informação – Renato Archer – Campinas-SP
- MTT: Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]
- PCL: Policaprolactona
- VB: Vidro Bioativo
- FB: Fibroína
- TEOS: Tetraortosilicato
- TEP: trietilfosfato
- PEG: polietilenoglicol

SUMÁRIO

1. Introdução.....	21
1.1 Scaffolds e Biomateriais.....	22
1.2 Polímeros.....	24
1.2.1 Policaprolactona (PCL).....	24
1.3 Compósitos.....	27
1.4 Fibroína.....	28
1.5 Fases inorgânicas.....	29
1.5.1 Vidros Bioativos.....	29
1.5.2 Apatita.....	30
1.5.3 Apatita com Lantânio.....	32
1.6 Materiais Luminescentes e Aplicações Biológicas.....	32
1.7 Luminescência e a Conversão Ascendente de Energia.....	34
1.8 Manufatura aditiva ou impressão 3D.....	36
2. Objetivos.....	39
3. Materiais e Métodos.....	40
3.1 Materiais.....	40
3.2 Obtenção da Fibroína.....	40
3.3 Síntese do Biovidro pelo método Sol-Gel.....	41
3.4 Apatitas com terras raras.....	42
3.4.1 Síntese de Oxiapatita dopada com Lantânio (La_{20}OAP).....	42
3.4.2 Síntese da Apatita dopada com $\text{YVO}_4: \text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$	42
3.5 Planejamento dos Experimentos.....	43
3.6 Extrusão dos compósitos.....	44
3.7 Caracterizações dos materiais.....	45
3.7.1 Difratomia de Raios-X (DRX).....	46
3.7.2 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	46
3.7.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	46
3.7.4 Ângulo de Contato.....	47
3.7.5 Perfilometria.....	47
3.7.6 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	48
3.7.7 Fluorescência.....	48
3.7.8 Ensaio de Reologia.....	48
3.7.9 Análise mecânica por torção.....	49
3.7.10 Análise Dinâmica Mecânica (DMA).....	49
3.7.11 Análise Termogravimétrica (TGA).....	50
3.7.12 Proliferação Celular – Teste MTT.....	50
3.7.13 Radiografia.....	51
3.7.14 Análise Estatística.....	51
3.8 Confeção dos scaffolds.....	51

4. Resultados e Discussões.....	53
4.1 Características Físicas dos Materiais.....	53
4.2 Caracterização dos Componentes – Espectroscopia de Infravermelho e DRX.....	53
4.2.1 Policaprolactona (PCL).....	53
4.2.2 Fibroína.....	55
4.2.3 Oxiapatita com Lantânio (La ₂₀ OAP).....	56
4.2.4 Apatita com YVO ₄ :Yb ³⁺ :Er ³⁺	58
4.2.5 Vidro Bioativo.....	61
4.3 Caracterização dos Compósitos.....	63
4.3.1 Espectroscopia Infravermelho.....	63
4.3.2 Caracterização Térmica -Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	64
4.3.3 Caracterização Térmica -Termogravimetria (TGA).....	67
4.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	69
4.3.5 Medida do Ângulo de Contato.....	74
4.3.6 Perfilometria.....	77
4.4 Análise Mecânica.....	79
4.4.1 Caracterização Reológica - Propriedades no regime permanente de cisalhamento.....	79
4.4.2 Propriedades Mecânicas por Torção.....	81
4.4.3 Análise Dinâmico Mecânica (DMA).....	85
4.5 Confeção dos scaffolds 3D.....	87
4.6 Propriedades Ópticas – Amostra PCL/AL.....	88
4.7 Análise in vitro - Proliferação Celular.....	92
4.8 Radiografia dos materiais com La ₂₀ OAP e YVO ₄ :Yb ³⁺ :Er ³⁺ - Ap.....	96
5. Conclusões.....	98
6. Perspectivas.....	100
7. Referências	101

1. Introdução

Com o aumento da expectativa de vida da população, o mercado de implantes ortopédicos tem crescido de maneira elevada devido à alta demanda. Nos EUA, 600 mil próteses são utilizadas por ano com um custo estimado de mais de 3 bilhões de dólares. Graças às excelentes propriedades mecânicas, os metais são as escolhas mais comuns para a reconstrução óssea total ou implantes. Porém, materiais metálicos podem causar desgastes durante seu tempo de uso e também possui limitações quanto à compatibilidade com tecidos biológicos¹.

Enxertos autólogos ainda são amplamente utilizados devido à ausência de imunogenicidade, além de serem condutores e indutores celulares, cujas propriedades biológicas são primordiais para regeneração tecidual. Porém possui alguns aspectos contrastantes, dentre os quais o requerimento de mais uma etapa cirúrgica, limitação da quantidade de tecido a ser utilizado, morbidade da área doadora e aumento do risco de infecções². Além disso, cada área anatômica diferente apresenta necessidades específicas em relação a forma, função e alguns pacientes, como os oncológicos, leva a necessidade de uma enxertia vascularizada, levando a uma maior morbidade à área doadora². Há a opção de se utilizar aloenxertos, porém há a possibilidade de rejeição do enxerto pelo sistema imunológico do hospedeiro e risco de infecções².

Assim, a engenharia de tecido é a área que pesquisa novas soluções que visa reduzir as complicações causadas por métodos obsoletos para implantes e reconstrução de tecidos e, assim, promover um maior conforto e bem-estar ao paciente. Refere-se a um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e ciências para desenvolver substitutos biológicos que restauram, mantêm ou melhoram a função de um tecido³.

O grande desafio da engenharia tecidual é o desenvolvimento de materiais que quando em contato com células, tecidos, órgãos, fluidos fisiológicos e macromoléculas biológicas possam mimetizar a estrutura a ser regenerada a quão mais análogo as suas propriedades biológicas e mecânicas. Na engenharia de tecidos, matrizes (scaffolds) são desenvolvidas para o suporte de células, promoção de sua proliferação e diferenciação para

formação de novos tecidos⁴, e representa uma área que tem atraído significativa atenção no campo de regeneração óssea.

1.1 Scaffolds e Biomateriais

Como definição, um biomaterial consiste em qualquer substância ou combinação de substâncias de origem natural ou sintética, que não sejam drogas, aplicados na área biomédica com interação com sistemas biológicos, que tratam, aumentam ou substituem tecidos, órgãos ou funções do corpo^{5; 6}.

Há duas alternativas para tratamento de pacientes com defeitos ósseos: o transplante e o implante⁷. Biomateriais de origem natural podem ser classificados como:

- a) Autólogos: o material é retirado do próprio paciente e transplantado de um local para outro, o que era melhor aceitação imunitária.
- b) Alogênico: material retirado de outras fontes humanas, por meio de um doador humano vivo, ou retirado de cadáveres. Portanto, deve-se ter uma preocupação quanto ao risco de contaminação para o organismo receptor.
- c) Xenogênico: material retirado a partir de seres de outras espécies, de organismo vivo ou não-vivo⁷.

Uma outra linha para a substituição de tecidos, foi o desenvolvimento de implantes feitos pelo homem com a interface com organismos vivos e tecidos hospedeiros, como implantes aplicados como biomateriais⁷. Esses por sua vez, podem ser classificados de acordo com a resposta do corpo hospedeiro diante sua implantação no corpo vivo:

- a) Bioinertes ou biotoleráveis: materiais biocompatíveis que não induzem nenhuma ligação interfacial entre os implantes e o osso;
- b) Bioativos: grupo de materiais biocompatíveis que podem se juntar diretamente com os tecidos do corpo e formar vínculos químicos e biológicos durante os primeiros estágios após a implantação;
- c) Bioreabsorvíveis: tipo de materiais biocompatíveis que são gradualmente reabsorvíveis e finalmente desaparecer e o local preenchido pelo novo tecido⁸.

Um requerimento importante para o conceito de biomaterial é a habilidade de um material de gerar uma resposta apropriada de seu hospedeiro para uma aplicação específica⁸. A palavra biocompatibilidade é extensivamente utilizada na ciência dos biomateriais, porém ainda existe uma grande incerteza sobre o conceito e mecanismos envolvidos, que conjuntamente, consistem nessa propriedade. Segundo Williams (2008), de forma abrangente, a biocompatibilidade refere-se a capacidade de um biomaterial executar sua função desejada com relação à terapia médica, sem quaisquer efeitos locais ou sistêmicos indesejáveis, gerando o benefício mais apropriado para a situação específica, e otimizando o desempenho clinicamente relevante daquela terapia⁹.

Portanto, biomateriais são materiais empregados em contato com tecido, sangue e fluidos biológicos para aplicação protética, de diagnóstico e terapêutica sem afetar adversamente o organismo vivo e seus componentes¹⁰. Esses materiais podem ser implantados em diversas formas: scaffolds, géis, esponjas ou membranas¹¹.

Scaffolds são estruturas tridimensionais utilizadas como suporte para o crescimento e proliferação celular¹². Estudos mostram que essas estruturas promovem condições mais familiares com o ambiente do tecido em questão, possibilitando a atividade biológica de células em seu interior¹³. No entanto, esses materiais necessitam de propriedades específicas, de acordo com cada tipo de tecido a ser tratado pelo biomaterial. Para aplicações ósseas, um scaffold ideal necessita ser biocompatível com fluidos e tecidos humanos, osteoindutivo, osteocondutor e propriedades mecânicas adequadas com o osso nativo. Essas propriedades garantem a adesão de células, estabilidade mecânica e orientação estrutural do novo tecido pelo scaffold¹². A Figura 1 contém um exemplo de scaffold para a reconstrução de tecido ósseo.

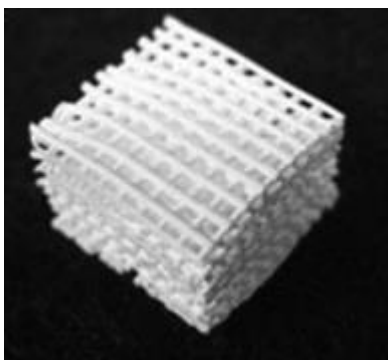


Figura 1. Scaffold de policaprolactona e nano hidroxiapatita construído por impressão 3D.

A neoformação tecidual no interior dessas estruturas é diretamente influenciada pela sua taxa de porosidade e tamanho dos poros. No caso de neoformação tecidual óssea os scaffolds devem possuir poros acima de 300 μm para que haja uma boa vascularização e neoformação óssea, evitando-se condições de hipóxia e indução de formação osteocondral antes da osteogênese¹⁴. O sucesso de um implante é relativo à sua interação com os tecidos que estão à sua volta, de modo que os materiais escolhidos para a sua construção devem promover um crescimento celular adequado.

1.2 Polímeros

1.2.1 Policaprolactona (PCL)

A definição da estrutura e a seleção do material é uma etapa significativa na construção de scaffolds. Esse material deve ser, geralmente, não tóxico, biocompatível, promotor de crescimento celular e de neoformação tecidual, mas também com propriedades físicas e mecânicas adequadas de acordo com tecido a ser reparado ou regenerado. Além disso, o material pode ser também biodegradável e bioreabsorvível para a reconstrução tecidual sem causar inflamações crônicas⁴.

Assim, diversos polímeros biodegradáveis estão sendo estudados para aplicação na área biomédica. Dentre essa classe de polímeros, a

policaprolactona (PCL)¹⁵, um poliéster alifático, semicristalino, com taxa de degradação lenta e diversas vantagens para aplicação biomédica¹¹. A estrutura química do monômero do polímero está demonstrada na Figura 2.

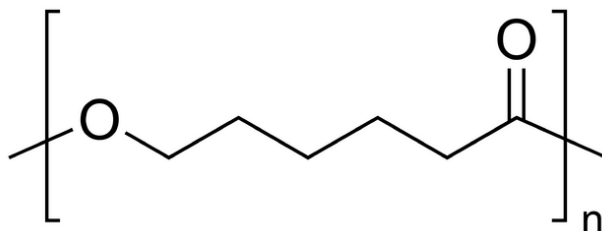


Figura 2. Monômero da policaprolactona¹⁶.

Nas décadas de 70 e 80, o PCL e seus copolímeros foram amplamente empregados para dispositivos de liberação controlada de fármacos, entretanto, devido a sua degradação lenta, outros polímeros bioabsorvíveis foram ganhando espaço nesse tipo de aplicação. Além disso, a indústria médica possuía o interesse em substituir os implantes metálicos por materiais biodegradáveis. Pelo fato do PCL não apresentar resistência mecânica adequada para a aplicação em locais de alta carga, esse polímero foi esquecido¹⁷.

Sua ressurgência se deu nas décadas de 90 e 2000 com o aparecimento da área de engenharia tecidual. Por possuir propriedades reológicas e viscoelásticas superiores a outros polímeros reabsorvíveis, e por isso, ser facilmente processado e apto a construir scaffolds de formas variadas, o PCL voltou a atuar na área biomédica. A cronologia de sua utilização na pesquisa da área médica encontra-se na Figura 3¹⁷.

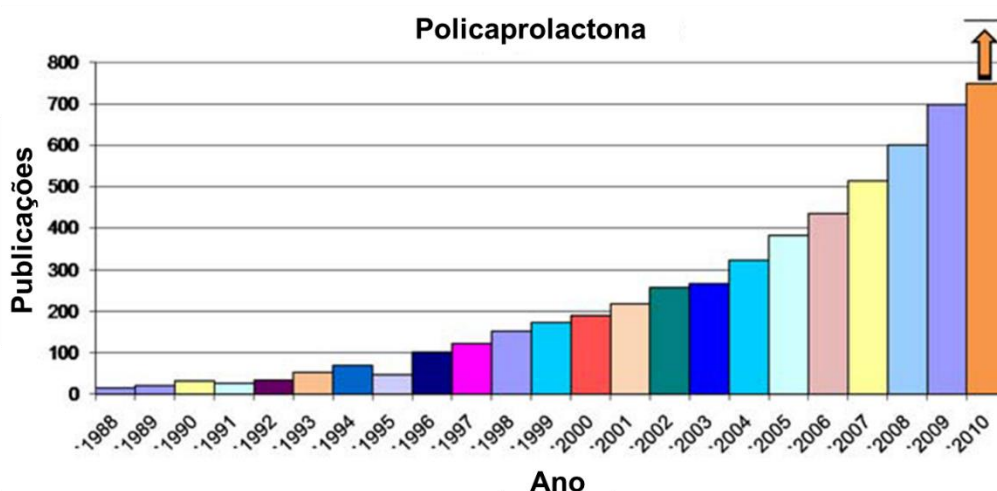


Figura 3. Publicações que contém PCL para área de biomateriais e engenharia tecidual até o ano de 2010¹⁷.

A policaprolactona apresenta diversas propriedades não encontradas em outros poliésteres alifáticos. Uma delas é a baixa temperatura de transição vítrea, -62°C , e seu ponto de fusão entre 57°C e 64°C . Além disso, o PCL possui alta estabilidade térmica; enquanto alguns poliésteres apresentam uma temperatura de decomposição entre 235°C e 255°C , a policaprolactona apresenta decompõe-se em 350°C ¹¹.

PCL é comumente utilizado na engenharia tecidual se comparado com outros polímeros também empregados nessa área¹⁸. Possui um fácil processamento e compatibilidade para blendas poliméricas¹⁷. Seu monômero pode ser copolimerizado com diversos outros monômeros, como por exemplo óxido de etileno, cloropreno, tetrahidrofurano, estireno, etc¹¹.

Estas características o fazem ser um polímero amplamente empregado na construção de scaffolds 3D para aplicações diversas, tais como scaffolds para regeneração óssea. DONOGHUE et al. (2013) descreveram o sucesso da utilização do PCL como suporte tridimensional para o crescimento de células e reparação do sistema nervoso central¹⁹. YEONG et al. (2010) também descreveram a utilização da policaprolactona como suporte de crescimento celular de células cardíacas, e o sucesso de crescimento celular de scaffolds com o polímero por processo de manufatura aditiva e SLS (*Selective Laser*

Sintering)²⁰. Dispositivos de liberação de fármacos estudados por CHEN et al. demonstraram crescimento celular em scaffolds de policaprolactona, tricálcio fosfato e quitosana e a cinética de liberação de Doxorubicina. Os autores demonstraram que o fármaco foi 95% liberado em um período de 4 meses. Os resultados demonstram que esses scaffolds são promissores para aplicação em cirurgia reconstrutiva após a ressecção de tumor ósseo²¹.

1.3 Compósitos

O termo “compósito” é empregado a sólidos que possuam dois ou mais materiais constituintes ou fases em uma escala maior que a atômica. Os compósitos apresentam propriedades significativamente modificadas se em comparação ao material homogêneo, como por exemplo diferenças no módulo elástico de um polímero e seu compósito. Materiais naturais e biológicos são normalmente compósitos, como por exemplo os ossos, madeira, cartilagem e pele²².

Apresentam diversas vantagens em relação ao material puro, principalmente por oferecerem ao cientista o poder de controlar suas propriedades, e assim, aplicados em campos variados da pesquisa²². Muitos são os trabalhos na literatura que utilizam compósitos com PCL para aplicação na área biomédica e reconstrução de tecido ósseo. HEO et al. descrevem um compósito de PCL e nano-hidroxiapatita como promissor para aplicação em regeneração de tecido ósseo.²³ LEI et al. (2013) encontrou um grande ganho de resistência mecânica ao adicionar um vidro bioativo produzido por meio sol-gel na policaprolactona. Além dessa propriedade, para a proporção de 30% carga/polímero, houve um aumento da bioatividade e a resposta celular quando comparados os resultados com o PCL puro²⁴. LEE, JANG e KIM (2014) estudaram um compósito de policaprolactona e fibroína como suporte para o crescimento de tecido em lesão no tímpano, e encontraram resultados positivos quanto à resposta celular e bioatividade²⁵. Zhang et al. (2014) incorporaram nanopartículas magnéticas em scaffold mesoporoso de policaprolactona e biovidro afim de desenvolver um material para liberação de fármacos anti câncer e hipertermia²⁶. É possível observar que muitos trabalhos utilizam

materiais compósitos para melhorar as propriedades dos polímeros base e aumentar os resultados positivos na aplicação biomédica.

1.4 Fibroína

Um dos componentes estudados como compósitos com a policaprolactona é a fibroína da seda. A seda é amplamente conhecida na indústria têxtil por seu brilho e propriedades mecânicas. Sedas são proteínas fibrosas sintetizadas por células epiteliais de glândulas do bicho-da-seda. As fibras de fibroína possuem aproximadamente 10-25 μm e consistem em duas cadeias proteicas: uma cadeia leve (26 kDa) e a pesada (390 kDa) ligadas por uma simples ligação de dissulfeto. Essas cadeias são revestidas por uma proteína hidrofílica, uma espécie de “cola”, chamada sericina. A fibroína da seda é purificada pelo aquecimento dos casulos em uma solução alcalina. A cadeia primária da fibroína consiste praticamente em glicina (43%), alanina (30%) e serina (12%)²⁷. A Figura 4 representa a organização da proteína em folhas β .

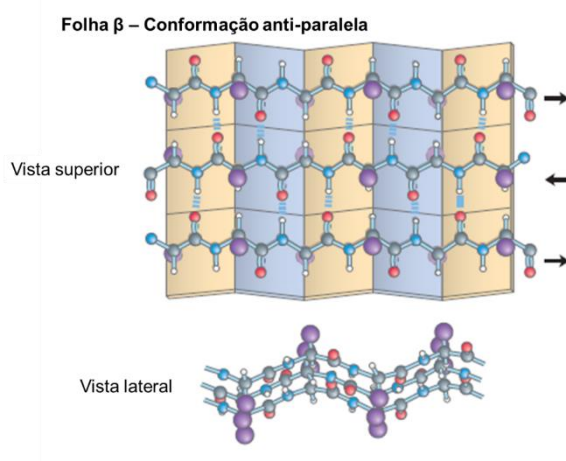


Figura 4. Estrutura secundária da fibroína. Conformação de folhas β antiparalelas²⁸.

A fibroína possui características mecânicas interessantes e capacidade de ser modificada quimicamente para a utilização em uma gama de tipos de biomateriais²⁷. Além disso, é considerada apta para aplicações biomédicas, pois apresenta grande permeabilidade ao vapor de água e ao oxigênio,

compatibilidade com sangue e promove a proliferação de fibroblastos²⁹. A proteína pode ser utilizada na forma de fibras, filmes, esponjas e hidrogéis.

MAKAYA et al. (2009) estudaram a construção de scaffolds de fibroína com morfologia e porosidade suficientes para servir de suporte para o crescimento de cartilagens, onde se encontrou que um material de fibroína construído a partir da técnica de *salt leaching* utilizando sacarose e hexafluoroisopropanol apresentou melhores resultados de proliferação desse tecido³⁰. PARK et al. (2010) propuseram um trabalho que desenvolveu scaffold com controle de poros por *electrospinning* com estudos *in vitro* e *in vivo* para aplicação na regeneração óssea³¹. Os autores concluíram que scaffolds de fibroína construídos com a técnica de *electrospinning* apresentaram maior resposta de proliferação celular e fosfatase alcalina de osteoblastos que scaffolds do polímero PLA (poliácido láctico) demonstrando a boa compatibilidade da fibroína. Além da utilização dessa proteína sozinha, a adição de compostos inorgânicos, como a hidroxiapatita pode melhorar as propriedades biológicas dos materiais tornando-os mais similares ao tecido ósseo^{32; 33}. Recentemente, vários estudos têm sido feitos empregando a fibroína e hidroxiapatita no desenvolvimento de biomateriais para a regeneração óssea. A finalidade é a utilização da proteína como um polímero biocompatível, e da fase inorgânica para favorecer melhores propriedades biológicas para o material^{32; 33; 34}.

1.5 Fases inorgânicas

1.5.1 Vidros Bioativos

Assim como já mencionado anteriormente, a síntese de compósitos orgânicos/inorgânicos tem sido amplamente estudada como materiais promissores na aplicação na área de regeneração óssea. Muitos polímeros que têm sido explorados apresentam resistência mecânica insuficiente para a aplicação em tecido ósseo, e também, baixa bioatividade e osteocondutividade. Para aprimorar essas propriedades, fases inorgânicas são incorporadas a

esses polímeros a fim de se aumentar a resistência mecânica e o comportamento biológico do material³⁵.

Vidros bioativos são fases inorgânicas interessantes para a aplicação na regeneração óssea, devido a sua bioatividade e osteocondutividade o que garante uma alta biocompatibilidade e boa resposta na formação de tecido ósseo. Além disso, aumentam as propriedades mecânicas dos polímeros utilizados na construção de biomateriais, viabilizando a utilização na regeneração óssea³⁵.

Os vidros bioativos são formados principalmente por SiO_2 e P_2O_5 , que são formadores de rede, e por CaO e outros óxidos metálicos. Os íons Ca^{2+} , assim como Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} e Ag^+ , são modificadores de rede ou fazem a dupla função. A bioatividade do vidro depende de seus componentes estruturais³⁶.

Biopolímeros estão sendo estudados para a formação de compósitos com a incorporação dos vidros bioativos. Dentre os mais populares, encontram-se os poliésteres alifáticos como, por exemplo, poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA) e respectivos copolímeros e a policaprolactona(PCL). Atualmente, pesquisas têm utilizado a combinação PCL/vidros bioativos para a fabricação de scaffolds para crescimento celular através da técnica de eletrofiação³⁷ e técnicas de “solvente casting”²⁴, as quais demonstram resultados promissores para a utilização dessa mistura de fase orgânica e inorgânica e aplicação em scaffolds para regeneração de tecido ósseo.

1.5.2 Apatita

Muitos métodos têm sido desenvolvidos para modificar a superfície e propriedades físico-químicas de materiais para scaffolds, como melhorar características mecânicas e a biocompatibilidade do material com o tecido em questão. Desse modo, compostos inorgânicos têm sido inseridos às matrizes poliméricas constituintes do material para conferir estas propriedades a estes materiais³⁸.

Porém esses componentes inorgânicos devem possuir algumas características essenciais para otimizar sua utilização no material. Primeiramente, o tamanho das partículas deve ser menor que as distâncias intercadeias dentro do polímero, de modo a não gerar pontos de concentração de tensões do componente, assim como, devem ser compatíveis com a cadeia polimérica. Para a utilização dessas matrizes na área médica e principalmente em tecidos ósseos, esses componentes inorgânicos devem apresentar biocompatibilidade, serem bioativos, não estimular resposta imunológica no organismo do hospedeiro e propriedades mecânicas adequadas para suportarem a carga do tecido específico¹².

As apatitas são uma família de componentes cuja fórmula geral corresponde à $M_{10}(XO_4)_6Y_2$, onde M representa um cátion divalente, XO_4 um ânion e Y um ânion monovalente. O componente mais importante dessa classe de materiais é a hidroxiapatita, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ³⁹.

A hidroxiapatita (HA) é o componente inorgânico primário das matrizes ósseas. Esse material não se apresenta de forma pura e estequiométrica, (razão molar Ca/P = 1,67), pois contém traços de íons como Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Na^+ , K^+ , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{3+} , na substituição do íon Ca^{2+} . Assim como o PO_4^{3-} pode ser substituído por íons CO_3^{2-} , SiO_4^{4-} , P_2O_7 e o OH por F^- e Cl^- . Desse modo, a incorporação de alguns íons torna-se interessante para a similaridade com a estrutura biológica⁴⁰.

Desta forma, HA quando sintetizadas apresentam propriedades biológicas como biocompatibilidade e osteocondução. Devido à sua excelente bioatividade, ela tem sido usada na confecção de materiais para a reconstrução óssea⁴¹. A combinação de PCL e HA garante materiais promissores com propriedades mecânicas, bioatividade, biodegradabilidade e biocompatibilidade com o tecido ósseo²³.

Recentemente vários estudos têm sido feitos na construção de scaffolds de policaprolactona e hidroxiapatita, porém o maior desafio encontrado foi em relação à resistência mecânica desses materiais, que dificulta a aplicação para reconstrução de tecidos em defeitos ósseos^{23; 38; 41}. Logo, é necessário o planejamento de novas estratégias para aprimorar a resistência mecânica desses materiais.

1.5.3 Apatita com Lantânio

O lantânio é um dos elementos mais explorados na área médica, devido ao fato de possuir baixa toxicidade e efeitos benéficos como antibacteriano e regulação da imunidade celular⁴², além disso, o carbonato de lantânio $[La_2(CO_3)_3]$ é utilizado para tratamento de hiperfosfatemia, agindo na regulação sérica do fósforo em pacientes renais crônicos em hemodiálise^{43; 44; 45}. Portanto, a preocupação se dá com relação à dose ingerida, administrada ou mesmo correlacionado com tempo de exposição ao longo da vida, pois elevados níveis podem promover efeitos adversos ao organismo tanto em curto quanto a longo prazo. Como exemplo de efeito adverso, GUO et al. (2009) observaram que dependendo da concentração de La utilizada pode promover a formação de células semelhantes à osteoclastos⁴⁰.

Uma tendência no desenvolvimento de compósitos poliméricos, para aplicações médicas e odontológicas, compreende em torná-los radiopacos para facilitar a visualização dos mesmos em diagnósticos por imagens^{46; 47; 48; 49; 50}. Biocerâmicas contendo La têm sido sintetizadas para aplicação médicas^{40; 51; 52; 53}, as quais não apresentaram citotoxicidade⁴⁰ e também favorecem a adesão de osteoblastos⁵¹. Além disso, o lantânio proporciona radiopacidade a biocerâmica permitindo sua nítida visualização em radiografias médicas-odontológicas e até mesmo acompanhar sua degradabilidade concomitante a neoformação tecidual⁵².

1.6 Materiais Luminescentes e Aplicações Biológicas

Imageamento por luminescência é uma grande ferramenta para o estudo de analitos e de estruturas subcelulares em tempo real. Para isso, vários detectores luminescentes têm sido explorados e estudados para aplicação na área biomédica. Dentre esses materiais, compostos inorgânicos dopados com íons lantanídeos são uma classe importante nessa área, pois devido à configuração $4f^n$ desses íons, seus materiais possuem boas propriedades ópticas. A propriedade óptica permite o desenvolvimento de

ensaios *in vitro* e *in vivo* ultrasensíveis, com bandas de emissão finas e alta estabilidade química⁵⁴.

O grupo “lantanídeos” corresponde aos 15 elementos da tabela periódica entre o lantânio (Z=57) e lutécio (Z=71). O termo terras raras inclui também o ítrio e o escândio que possuem propriedades químicas semelhantes⁵⁵.

Várias técnicas foram desenvolvidas para diagnóstico e tratamento de doenças, desde o desenvolvimento de métodos ultra-sensíveis, mais eficientes e menos invasivos. Nanobiofotônica contribuiu para esse progresso, com o desenvolvimento de novas modalidades de bioimagem e terapias ativadas monitorados pela luz^{56; 57}.

Os materiais luminescentes mais comuns são os corantes orgânicos fluorescentes e os pontos quânticos (*quantum dots*). Avanços ainda estão sendo alcançados na aplicação desses materiais em diagnóstico e imageamento, entretanto com algumas limitações. Fluoróforos orgânicos possuem bandas de emissão muito largas, não sendo ideais para experimentos complexos que lidam com grandes valores de largura de banda. Além disso, moléculas orgânicas fluorescentes podem sofrer degradação por foto-excitação. Os pontos quânticos possuem bandas de emissão que são influenciadas pela dispersibilidade de seu tamanho, além da preocupação da toxicidade dos “*quantum dots*” convencionais semicondutores, devido ao teor de metais pesados. Contudo, a maior desvantagem dos materiais mencionados é que para serem excitados necessitam de fonte ultravioleta que podem levar à autofluorescência, e um dano potencial do material biológico, além da degradação de marcadores moleculares luminescentes⁵⁸.

Para que os materiais biológicos sejam aplicados em tecidos, suas propriedades ópticas devem ser levadas em consideração. Os principais grupos cromóforos são a hemoglobina e melanina que apresentam bandas de absorção abaixo de 600 nm. A água possui absorção próxima a 1150 nm. Devido a essas condições, tem-se a chamada “janela biológica” que cobre comprimentos de onda do vermelho ao infravermelho próximo onde há a maior penetração de luz na pele, por exemplo, como está demonstrado na Figura 5⁵⁹.

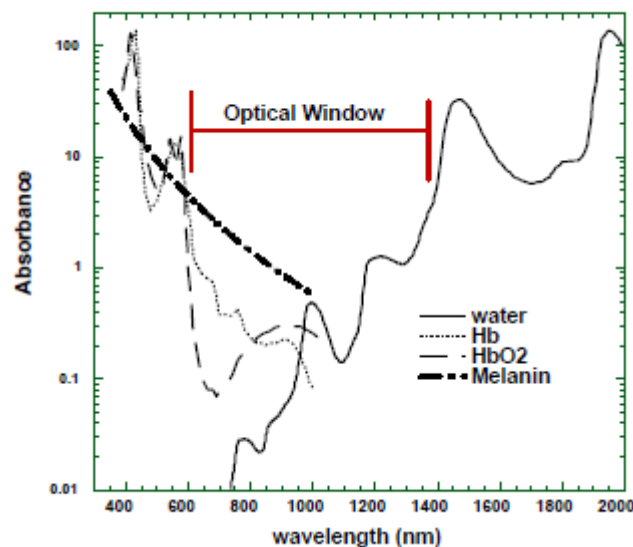


Figura 5. Janela biológica encontrada na pele⁵⁹.

1.7 Luminescência e a Conversão Ascendente de Energia

Uma oportunidade de aplicar materiais luminescentes na área biomédica é utilizar aqueles que podem ser excitados dentro na faixa de comprimentos de onda da janela biológica. Nanopartículas (NPs) dopadas com terras raras possuem a característica de emitir fótons de alta energia com excitação no infravermelho próximo, resultante de um processo de Conversão Ascendente de Energia (*Upconversion*), em que a absorção de dois ou mais fótons leva à emissão de um único fóton com comprimento de onda menor, ou seja, maior energia⁶⁰.

O processo de *upconversion* se deve ao trabalho de dois grandes pesquisadores. Nicolaas Bloembergen iniciou os estudos na área em 1959 e em seguida na década de 60, os materiais para o processo de conversão ascendente de energia foi extensivamente estudado por François Auzel que propôs que o processo ocorria por transferência de energia entre íons no estado excitado. Desde sua descoberta, a conversão ascendente vem sendo um grande interesse de pesquisadores, devido à aplicação em diversas áreas⁵⁸.

Em contraste com o tradicional processo de luminescência, o qual segue a Lei de Stokes, o processo de *upconversion* representa geralmente a

absorção de dois ou mais fótons de baixa energia e, em seguida, a emissão de um único fóton de energia maior. Para atingir esse processo, o material deve possuir baixa energia entre estados de excitação intermediários e um longo tempo de vida no estado excitado. Lantanídeos são fortes candidatos a ativadores do processo de *upconversion*, já que possuem abundantes níveis de energia e longos tempos de vida, devido sua configuração f-f. Er^{3+} , Ho^{3+} e Tm^{3+} possuem níveis de energia escalonados e são os mais populares ativadores e eficientes nesse processo, entretanto apresentam baixos perfis de absorção. Os íons Yb^{3+} possuem apenas um nível de energia simples e uma alta absorção em 980 nm, o que os fazem serem utilizados como sensibilizadores, absorvendo os fótons de excitação e transferindo a energia para os ativadores. Normalmente esses íons são adicionados a matrizes para se construir os materiais com propriedades ópticas. Essas matrizes devem possuir baixa energia de fônon, alta estabilidade química e transparência nos comprimentos de onda de excitação e emissão dos íons luminescentes⁶¹. Abaixo, segue o esquema de *upconversion* para o par de íons Er^{3+} como ativadores e Yb^{3+} como sensibilizadores, o qual foi utilizado nesse trabalho de mestrado.

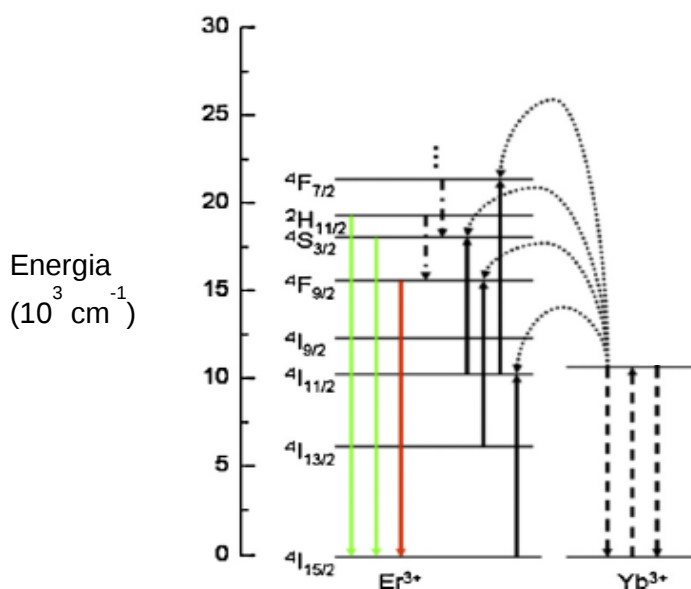


Figura 6. Diagrama de níveis de energia para os pares de íons lantanídeos Yb^{3+} - Er^{3+} ⁶¹.

As propriedades ópticas ligadas às nanopartículas possuem vantagens como bandas de emissão finas, longo tempo de vida, fotoestabilidade e baixa toxicidade que vem atraindo a utilização desses materiais na área biomédica⁶⁰. As nanopartículas de *upconversion* são uma perspectiva para técnicas não invasivas de diagnóstico, pois estas podem ser utilizadas para guiar tratamentos e monitorar as respostas terapêuticas em tempo real^{62; 63; 64; 65; 66}. Além disso, podem ser combinadas à fármacos quimioterápicos e, assim, serem úteis para o tratamento do câncer⁶⁷. Há vários trabalhos que demonstram bons resultados da utilização das nanopartículas *upconversion* na sensibilização de moléculas fotoativas empregadas na terapia fotodinâmica^{68; 69; 70}.

1.8 Manufatura aditiva ou impressão 3D

As técnicas convencionais para a fabricação de scaffolds 3D como *salt leaching*, *gas foaming*, *fiber bonding*, *solvent casting*, *melting molding* e *phase separation* possuem limitações por não possuírem o controle de poros para a migração e difusão de células e por não produzirem estruturas interconectadas para o crescimento celular⁷¹.

Com avanços na ciência computacional e sua integração na produção de biomateriais e engenharia de tecido, houve o desenvolvimento de novas técnicas de produção de materiais 3D, sendo uma delas a manufatura aditiva (impressão 3D)⁷². Essa técnica consiste na construção de scaffolds 3D conectada a um computador, o que permite a construção de materiais com precisão e controle da forma, tamanho de poros, porosidade⁷¹, e até mesmo algumas necessidades de estrutura específica para pacientes.

Um exemplo de manufatura aditiva é a tecnologia por meio de extrusão de filamento, onde o material na forma de filamento padronizado é aquecido e fundido no bocal de extrusão, e de acordo com o modelo virtual pré-estabelecido no software de computador, o modelo físico é confeccionado. A temperatura do fluxo é controlada pela cabeça de extrusão, enquanto que a arquitetura no eixo z se dá pelo movimento da plataforma em relação ao orifício

de saída do material⁴. As camadas são depositadas até a completa construção do modelo físico.

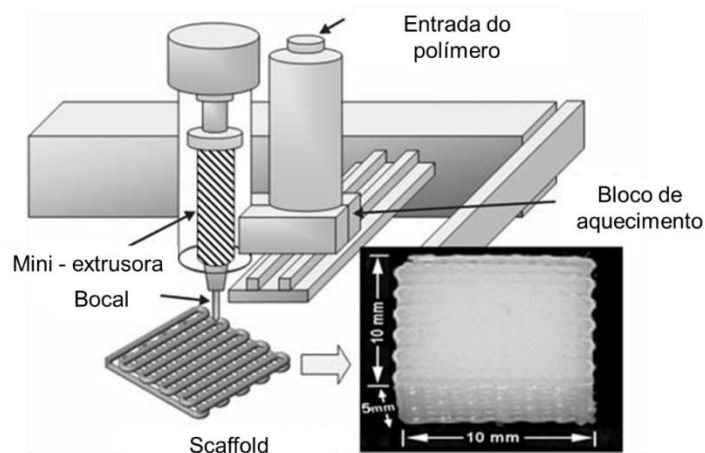


Figura 7. Esquema da técnica de prototipagem rápida para a produção de scaffolds 3D⁷¹.

Um projeto do Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer (CTI) – Campinas denominado ProMed (Tecnologias Tridimensionais na Medicina) sugere que por meio da manufatura aditiva e exames de ressonância magnética ou tomografia computadorizada de pacientes com danos na base óssea, é possível desenvolver suportes anatômicos para reconstruir fidedignamente a área atingida⁷³. Como a impressora é acoplada a um software, é possível desenhar o material exatamente nas mesmas dimensões da fratura sofrida pelo paciente, de forma que na cirurgia este se encaixe de forma perfeita, garantindo alta eficiência na reconstrução anatômica do local atingido.

A impressão 3D confere uma liberdade de desenhos para suas estruturas permitindo sua aplicação em diversos materiais para a reconstrução de tecidos e órgãos, por meio da confecção de scaffolds. WANG et al. (2007) estudaram o processo de impressão 3D para o desenvolvimento de fígados bioartificiais humanos para a reparação de danos e disfunções causados nesse órgão⁷². WANG et al. (2014) descreveram em um review a utilização de scaffolds impressos para aplicação na área de imageamento em biofotônica⁷⁴. Essa técnica é capaz de criar scaffolds para a reconstrução óssea com diversos polímeros e compósitos, como é o caso do estudo de KALITA et al.

(2003) que desenvolveram estruturas 3D de polipropileno e tricálcio fosfato (TCP) por prototipagem rápida⁷⁵.

2. Objetivos

De acordo com a revisão bibliográfica descrita nos itens anteriores, o trabalho objetiva desenvolver e caracterizar compósitos a base do polímero policaprolactona (PCL) juntamente com a fibroína e fases inorgânicas como apatita com lantânio (La_{20}OAP) ou apatita com nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ ($\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ - Ap), além de vidro bioativo para manufatura aditiva com potencial de aplicação em engenharia tecidual.

Os objetivos específicos incluem:

1. Síntese das apatitas com lantânio e apatitas com $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ e extração da fibroína;
2. Síntese dos compósitos seguindo um planejamento por meio da extrusão;
3. Caracterizações físico-químicas e mecânicas dos compósitos para melhor entendimento da interação entre as fases nas respectivas amostras;
4. Confeção dos scaffolds por manufatura aditiva.

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Os materiais utilizados neste trabalho foram: PCL 37.000 (CAPA® 6505, Solvay), membrana para diálise (Sigma-Aldrich, D9652) e demais reagentes foram comprados da Sigma Aldrich em grau analítico e estocados de forma adequada para cada um.

3.2 Obtenção da Fibroína

A fibroína (FB) foi extraída a partir de casulos do bicho-da-seda comprados comercialmente. Para a sua extração, os casulos foram cortados em pedaços menores, na forma de filetes. Os pedaços foram colocados em uma solução de Na_2CO_3 $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ (5 g de casulos: 2 L de solução de Na_2CO_3) a 100°C por 30 min para remoção da sericina das fibras de fibroína.

Após esse tempo, a fibroína foi retirada com auxílio de uma espátula e lavada em 1 L água ultrapura por três vezes por 20 min cada lavagem. A proteína foi colocada em uma folha de alumínio limpa e mantida por algumas horas em estufa a 37°C para secagem⁷⁶.

Para a solubilização das fibras, a cada 10 g de fibroína seca foram adicionados 100 mL de solução ternária de $\text{CaCl}_2:\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ em proporção molar de 1:2:8. A suspensão obtida foi mantida em aquecimento em banho-maria a aproximadamente 80°C até a completa solubilização⁷⁷.

A fibroína solubilizada foi dialisada contra água ultrapura a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) com trocas de água após 1 h, 4 h, depois a cada 12 h, totalizando 48 h, sendo 15 mL de fibroína para 1 L de água.

A solução resultante foi então centrifugada a 20.000 rpm por 30 min, para remoção de impurezas⁷⁶. E em seguida, foi congelada em nitrogênio líquido e liofilizada por 48 h. Um material esponjoso foi obtido, e então colocado em um moinho de facas para obter a proteína em forma de pó.

3.3 Síntese do Biovidro pelo método Sol-Gel

O vidro bioativo (VB) foi sintetizado empregando método sol-gel segundo metodologia previa proposta por Lei et al³⁵. Para tanto, adicionou-se tetraortosilicato (TEOS) (37,5%, v/m), trietilfosfato (TEP) (3,8%, v/m), nitrato de cálcio tetrahidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (23.65%, m/m), polietilenoglicol (PEG) 6000 (6% m/m), água (20,7%, v/m) e ácido clorídrico (HCl) 0,1 M (9% v/m) em um recipiente e deixou-se em agitação magnética à temperatura ambiente por 2 h.

Em seguida, adicionou-se 15 mL de hidróxido de amônio (NH_4OH) 0,1 mol L^{-1} para promover o processo de formação do gel. O gel obtido foi lavado em etanol e separado do sobrenadante por centrifugação a 8.000 rpm. Posteriormente, o gel foi mantido a -20°C por 24 h, e após esse período realizou-se o tratamento térmico a 600°C por 2 h³⁵. A figura 8 mostra o fluxograma do processo.

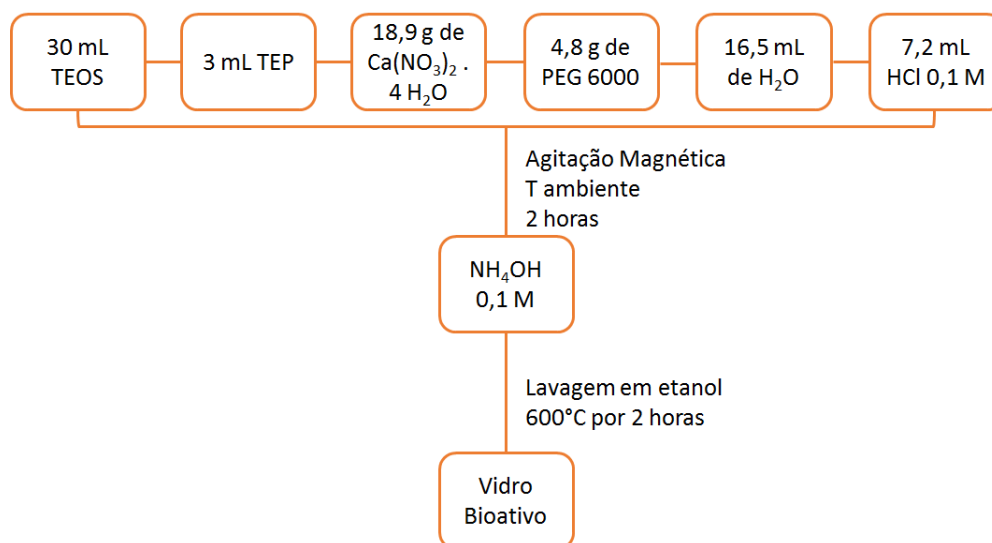


Figura 8. Fluxograma para síntese do vidro bioativo.

Obteve-se então o vidro bioativo com 60% SiO_2 , 36% CaO e 4% P_2O_5 .

3.4 Apatitas com terras raras

Foram sintetizados dois tipos de apatita para a incorporação no polímero: uma apatita com íons lantânio, La_{20}OAP , e a outra apatita com nanopartículas luminescentes, $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ ($\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}\text{-Ap}$).

3.4.1 Síntese de Oxiapatita dopada com Lantânio (La_{20}OAP)

A apatita dopada com 20% de La^{3+} foi sintetizada de acordo com metodologia prévia GUO et al. (2009)⁴⁰. A apatita foi sintetizada a partir de uma mistura estequiométrica composta de CaCO_3 (51,4%, m/m), La_2O_3 (14,4%, m/m) e $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$ (34,2%, m/m), por meio de reação estado sólido a alta temperatura. Primeiramente, a homogeneização dos reagentes foi feita em almofariz. Depois deste procedimento, etanol absoluto foi adicionado ao pó na proporção 1:2 (v/m). As etapas e parâmetros de sinterização foram: tratamento térmico a 950 °C por 2h, seguido de outro tratamento térmico a 1.100° a 48h, com taxa de aquecimento de 5 °C min⁻¹. Em seguida, foi realizada uma moagem da amostra em um Ultra-Turrax® Tube Drive (IKA) para desagregar as partículas para nova etapa de tratamento térmico a 1.300 °C por 72 h. Após este último tratamento térmico foi realizado a moagem em um moinho esferas metálicas para diminuição do tamanho das partículas.

3.4.2 Síntese da Apatita dopada com $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$

A apatita foi dopada em 5% com NPs de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$, cujas NPs foram sintetizadas de acordo com metodologia previamente estabelecida por Nigoghossian et al.^{78; 79; 80}.

Inicialmente foi preparado vanadato de sódio (Na_3VO_4) pela reação no estado sólido entre óxido de sódio (Na_2O) e metavanadato de sódio (NaVO_3) na proporção 1:2 e misturados em um almofariz. A mistura foi colocada em um cadinho de platina e levada a um forno a 600 °C por 24 horas em atmosfera de

nitrogênio, a uma taxa de aquecimento de $15\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. A reação de óxido de ítrio e ácido nítrico na proporção de 1:6 e sob aquecimento e agitação gerou nitrato de ítrio. Após a dissolução do pó, evaporou-se o ácido até atingir o pH 5,0. O preparo dos cloretos de itérbio, érbio procedeu-se de maneira similar, porém com o uso de ácido clorídrico. Para a determinação das concentrações finais das soluções, adicionou-se 50 μL de nitrato ou cloreto de lantanídeo a 5 mL de tampão acetato pH 6,0 e titulou-se com ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) a $0,01\text{ mol.L}^{-1}$, na presença do indicador alaranjado de xilenol.⁷⁸

Foram misturadas sob agitação as soluções a 1 mol L^{-1} de $\text{Y}(\text{NO}_3)_3$ (7,9 mL), YbCl_3 (2,0 mL) e ErCl_3 (0,1 mL) a fim de se obter a relação molar Y:Yb:Er = 77,5:20:2,5. Adicionou-se uma solução aquosa de citrato de sódio a 2 mol.L^{-1} (5 mL) que levou à formação de um precipitado branco de citrato de lantanídeo, o qual foi mantido sob agitação por 1 hora. O precipitado foi completamente dissolvido pela adição da solução aquosa de Na_3VO_4 recém-preparada a $0,3\text{ mol L}^{-1}$ com pH entre 12,5 e 13,0 (30 mL). A solução transparente obtida foi mantida sob agitação e aquecimento a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 45 minutos. Em seguida, a amostra foi dialisada contra água Milli-Q em membrana para diálise (Sigma-Aldrich, D9652) até a medida da condutividade da água ser igual a $0,000\text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$, o que foi atingido com 72 horas de diálise com trocas de água a cada 6 horas. A secagem das nanopartículas foi feita por liofilização. O pó obtido foi tratado termicamente a $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos.⁷⁸

Em seguida, a apatita foi sintetizada de acordo com a metodologia descrita acima para $\text{La}_{20}\text{OAP}^{42}$. A partir de uma mistura estequiométrica composta de CaCO_3 (50%, m/m), $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$ (45%, m/m) e NPs de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ (5% m/m), a mistura foi sinterizada empregando os mesmos parâmetros de tratamento térmico e moagem. Desta forma, ao final do processo foi obtida a apatita com as NPs $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ ($\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}\text{-Ap}$).

3.5 Planejamento dos Experimentos

A construção das amostras foi planejada como demonstrado na Tabela 1. Obteve-se oito materiais diferentes com a mistura dos seus componentes de forma variada. Admitiu-se a máxima razão massa/massa de 10%, 20% e 20%

para a fibroína, La₂₀OAP e vidro bioativo, respectivamente. Além disso, fixou-se uma relação máxima de 80:20 para polímero:carga em todas as amostras. Além dessas amostras, a PCL/AL cuja composição foi de 12,5% (m/m) de YVO₄:Yb³⁺:Er³⁺-Ap em relação ao polímero PCL. Assim, foi possível observar a influência de cada componente no polímero base. Os nomes das amostras foram construídos com base em suas composições, sendo a letra A correspondente à apatita, B vidro bioativo, F fibroína e AL à apatita luminescente com as nanopartículas de YVO₄:Yb³⁺:Er³⁺.

Tabela 1. Planejamento dos experimentos.

Amostra	FB (g)	La ₂₀ OAP (g)	VB (g)	Apatita com YVO ₄ :Yb ³⁺ :Er ³⁺	PCL (g)
PCL	0	0	0	0	0,8
PCL/F	0,1	0	0	0	0,8
PCL/A	0	0,2	0	0	0,8
PCL/A/F	0,05	0,15	0	0	0,8
PCL/B	0	0	0,2	0	0,8
PCL/B/F	0,05	0	0,15	0	0,8
PCL/A/B	0	0,1	0,1	0	0,8
PCL/A/B/F	0,04	0,08	0,08	0	0,8
PCL/AL	0	0	0	0,125	0,875

3.6 Extrusão dos compósitos

As respectivas amostras relacionadas na Tabela 1 e a amostra PCL/AL foram sintetizadas pelo método de extrusão empregando uma mini-extrusora dupla rosca (Thermo Scientific HAAKE) (Figura 9) em colaboração com a Escuela Politécnica de San Sebastián, Universidad del Pais Basco, Espanha.

Primeiramente, os reagentes de cada amostra foram homogeneizados na forma de pó e as respectivas misturas foram extrudadas a 100 °C empregando uma velocidade de extrusão de 50 rpm. Para garantir uma melhor homogeneização das partículas com o polímero, uma segunda extrusão da amostra foi realizada a partir da granulação do material previamente extrudado.

Desta forma, após a segunda extrusão, compósitos mais homogêneos foram obtidos na forma de filamento padronizados com 1,7 - 1,9 mm de diâmetro (Figura 10).

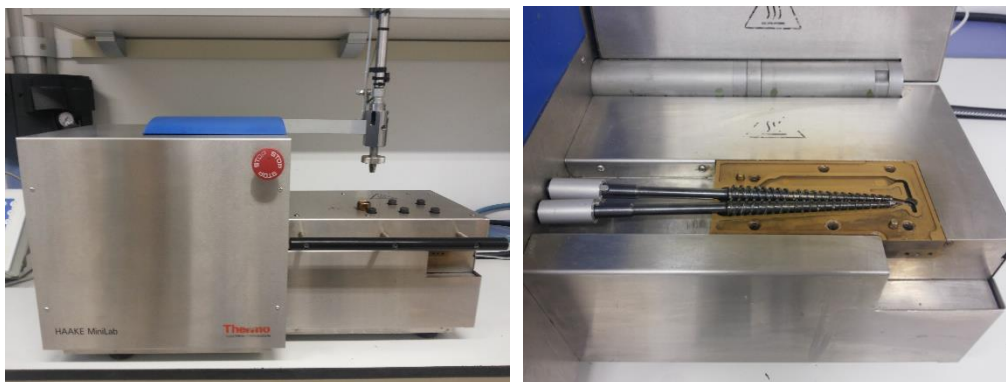


Figura 9. Mini-extrusora dupla rosca (Thermo Scientific).



Figura 10. Extrusão dos compósitos na forma de filamentos padronizados.

3.7 Caracterizações dos materiais

Os materiais empregados como precursores para síntese dos compósitos foram caracterizados por FT-IR e DRX para as fases inorgânicas e fibroína. Os compósitos foram caracterizados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), Análise Termogravimétrica (TGA), medidas de ângulo de contato, perfilometria, reologia, análise mecânica por torção, Análise Dinâmica Mecânica (DMA) e espectroscopia de fluorescência para o compósito PCL/AL. Foi realizado

também um teste in vitro por MTT (Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]) de proliferação celular. A maioria dos ensaios foram realizados no Instituto de Química da UNESP de Araraquara, com algumas exceções as quais são mencionadas durante a descrição do procedimento.

3.7.1 Difratometria de Raios-X (DRX)

A determinação da estrutura cristalina a partir de padrões de raios-X foi realizada empregando um difratômetro Rigaku Rint 2000 (Anôdo Rotatório), com filtro de níquel e radiação de Cu ($K\alpha$), com varredura angular entre 10° a 50° (2θ) com passo de $0,02^\circ$ e $5^\circ \cdot \text{min}^{-1}$. As amostras foram fixadas sobre um suporte de vidro. A identificação das fases cristalinas foi realizada comparando-se os dados resultantes com as fichas cristalográficas padrões da base de dados ICDD - PDF-2 (International Centre for Diffraction Data – Power Diffraction File-2).

3.7.2 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros de FT-IR foram coletados em um equipamento Thermo Scientific Nicolet IS5, módulo de iD1 transmissão, resultado em % de Reflectância (ATR) para os compósitos e polímero e em % de Transmitância para os componentes que se encontraram em pó. Foi utilizada uma resolução de 2 cm^{-1} , com acúmulo de 20 varreduras, na faixa de varredura de 4000 a 500 cm^{-1} .

3.7.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC das amostras foram obtidas utilizando-se um DSC modelo Q100 TA Instruments. As medidas foram realizadas em recipientes de alumínio, sob as seguintes condições: atmosfera de nitrogênio com fluxo contínuo de 70 mL min^{-1} e razão de aquecimento de $10^\circ \text{C min}^{-1}$. O aquecimento foi feito da temperatura inicial de

25 °C para a temperatura final de 100 °C e um segundo aquecimento de 0 °C para 100 °C. Como referência utilizou-se recipientes de alumínio vazios.

3.7.4 Ângulo de Contato

Como o objetivo do trabalho é o desenvolvimento de materiais que possam ser aplicados no organismo humano para a reparação de defeitos ósseos, é necessária a análise da viabilidade do crescimento de células pelo corpo do material. O estudo do ângulo de contato, nos permite conhecer o aspecto hidrofílico/hidrofóbico dos compósitos, característica essa que pode influenciar os resultados dos testes biológicos. Desse modo, o ensaio foi realizado dispensando uma gota de água na superfície de cada amostra na forma de filme e, o ângulo entre a superfície e a gota medido em triplicata. A mensuração de ângulo de contato foi realizada utilizando um equipamento Dataphysics Contact Angle System (KSV Instruments LTD, Finland), operado em ar à temperatura ambiente e munido de câmera CCD (*Charge Coupled Device*). Empregou-se o método de gota séssil para determinar a molhabilidade dos filmes, ou seja, o caráter hidrofílico ou hidrofóbico dos mesmos. A gota séssil foi dispensada com o auxílio de uma seringa, com agulha de 0,5 mm de diâmetro e volume controlado de aproximadamente 10 µL de água deionizada por gota. O ângulo de contato estático foi medido imediatamente após a dispensação da gota ($t=0s$), em diferentes pontos da superfície das amostras. As imagens das gotas sésseis foram analisadas utilizando o *software* Drop-Shape Analysis SCA20. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.7.5 Perfilometria

As imagens topográficas dos materiais foram obtidas utilizando um perfilômetro Taylor Hobson Precision – Form Talysurf Series 2, modelo SV – C525, com número de pontos igual a 100 e comprimento de dados de 5 mm. A

superfície foi avaliada por meio do TalyMap Expert versão 3.1.8 que possibilita a medição da rugosidade superficial.

3.7.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

As micrografias das amostras foram realizadas para a análise morfológica de superfície dos filamentos. As amostras foram recobertas por uma camada de ouro de espessura de 6 nm (20 s, tensão de 3 Kv e corrente de 15 mA). As micrografias foram obtidas em um microscópio eletrônico da marca FEI, modelo Magellan 400L, com detector da marca EDAX modelo Apolo X (*Laboratório de Caracterização Estrutural da Universidade Federal de São Carlos, SP*).

3.7.7 Fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência das nanopartículas e dos compósitos foram obtidos no fluorímetro Horiba Jobin Yvon (Spex Fluorolog-3), medidos à temperatura ambiente e os espectros foram corrigidos pela resposta instrumental. Como fonte de excitação das amostras, foi ligado externamente um laser de diodo em fibra operando em 980 nm. A potência máxima do laser aplicada foi de 900 mW.

3.7.8 Ensaio de Reologia

As análises reológicas em regime permanente de cisalhamento visam avaliar possíveis interações entre os componentes das amostras, além de simular o processamento do material, como por exemplo diante a condição de preparo dos filamentos. Os ensaios foram feitos na temperatura de extrusão (100°C). A avaliação do comportamento reológico do polímero foi realizada em um reômetro de tensão controlada ARG2 – TA Instruments com geometria de placas paralelas com diâmetro de 25 mm e distância entre as placas de 1 mm à

uma temperatura de 180 °C. O ensaio foi realizado no laboratório do Núcleo de Reologia e Processamento de Polímeros, Departamento de Engenharia de Materiais – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

3.7.9 Análise mecânica por torção

A análise mecânica por torção foi realizada em um reômetro de deformação controlada ARES da Rheometric Scientific, em modo torção. Para tal, corpos de prova retangulares com dimensões 40 x 12 x 3 mm foram produzidos em uma prensa a quente. Obteve-se o módulo de armazenamento ou elástico (G') e o módulo de perda ou plástico (G'') dos corpos de prova em função da frequência que variou de 0,1 a 10 Hz, à temperatura de 37°C; e em função da temperatura que variou de 30 a 42°C, taxa de aquecimento de 2°C min⁻¹ em uma frequência de 1 Hz. A amplitude de deformação foi de 0,2%. O ensaio foi realizado no laboratório do Núcleo de Reologia e Processamento de Polímeros, Departamento de Engenharia de Materiais – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

3.7.10 Análise Dinâmico Mecânica (DMA)

Os ensaios foram realizados em um DMA Q 800 da TA Instruments a fim de se obter os módulos de armazenamento e perda em modo flexão. Os corpos de prova também apresentavam a geometria retangular com dimensões 40 x 12 x 3 mm. Os ensaios foram feitos em modo de flexão em um ponto (single cantilever) à temperatura de 37°C e variação de frequência de 0,1 a 10 Hz. Um outro teste foi realizado fixando a frequência em 1 Hz e variando a temperatura de 37 a 42°C. O ensaio foi realizado no laboratório do Núcleo de Reologia e Processamento de Polímeros, Departamento de Engenharia de Materiais – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

3.7.11 Análise Termogravimétrica (TGA)

As curvas de TGA 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 mL min⁻¹ com razão de aquecimento de 10°C min⁻¹.

3.7.12 Proliferação Celular – Teste MTT

Nos estudos de resistência mecânica, vários materiais apresentaram bom desempenho em relação à policaprolactona, sendo assim, promissores para a utilização em scaffolds para regeneração óssea. Para que os materiais estudados sejam capazes de serem inseridos no organismo humano, deve-se analisar seu comportamento diante o crescimento celular. Para isso, ensaios de proliferação foram realizados no período de 2 e 7 dias para cada compósito. Fibroblastos humanos foram incubados em frascos de cultura celular de 75 cm² contendo meio de cultura (DMEM suplementado com soro fetal bovino 10%, penicilina-estreptomicina 0,5% e anfotericina 1%) sob condições normais de cultura (37 °C, atmosfera de CO₂ a 5% e controle de umidade) antes de serem semeados sobre as amostras. Para os experimentos *in vitro*, as células foram tripsinizadas e dispersadas em meio de cultura. Então, essa suspensão de células foi utilizada para semear 10⁴ células (em 500 µL de meio de cultura) sobre as amostras em placas de cultura celular de 24 poços, as quais foram incubadas por 2 e 7 dias. O meio de cultura foi renovado a cada 2 dias. Para avaliar a proliferação celular, as amostras foram transferidas para placas de cultura novas e incubadas com 500 µL de uma solução de MTT 1 mg mL⁻¹ em meio de cultura. Após 3 horas, o meio de cultura foi removido e os cristais de formazan foram dissolvidos em 1 mL de DMSO. A absorbância foi medida a 570 nm (Espectrofotômetro Tecan Infinity 200Pro, Software Tecan i-control). Esse ensaio foi realizado no laboratório de Biomateriais Poliméricos – Instituto de Química – USP São Paulo, sob supervisão do Professor Dr. Luiz Henrique Catalani.

3.7.13 Radiografia

Os exames radiográficos foram realizados utilizando o sistema digital DenOptix QST (Gendex Dental Systems, Des Plaines, IL) com placa de fósforo no tamanho 2 (31 x 41 mm) e utilizando aparelho de raios X Gendex 765DC com 7 mA; 65 kV e 0,04 s, pertencente ao Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP. A distância do cilindro localizador à placa de fósforo foi padronizada em 30 cm. Desta forma, os scaffolds foram posicionados de forma com que ficassem perpendicular a placa de fósforo. As placas de fósforo foram escaneadas numa resolução de 300 dpi, utilizando software VinxWin Pro e salvas no formato TIFF. As imagens radiográficas foram obtidas na Faculdade de Odontologia – UNESP – Araraquara.

3.7.14 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico BioEstat 5.0. O teste de ANOVA foi realizado para avaliar os valores mensurados na proliferação celular e ângulos de contato e o pós-teste empregado foi para comparações múltiplas foi Teste de Tukey. O nível de significância estatística estabelecido foi de 5%.

3.8 Confeção dos scaffolds

As amostras 3D foram confeccionadas empregando a tecnologia de impressão 3D disponíveis no Centro de Tecnologia da Informação – Renato Archer, Campinas - SP para extrusão de filamento utilizando como matéria-prima para confecção das peças 3D as amostras listadas na Tabela 1, na forma de filamento de aproximadamente 1,8 mm de diâmetro. Primeiramente foram gerados modelos geométricos virtuais com poros regulares e interconectados estabelecendo a melhor forma, tamanho e espessura tanto para futuros estudos *in vitro* e *in vivo* (Figura 11). Para os modelos geométricos

virtuais foi empregado o programa SolidWorks CAD 3D (Dassault Systèmes SolidWorks Corp., França). A partir destes modelos virtuais foram geradas as estruturas físicas.

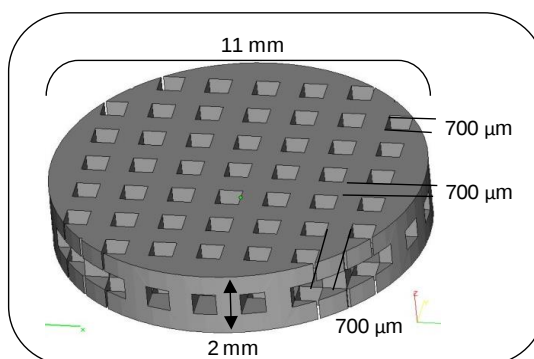


Figura 11. Exemplo de modelo virtual 3D para *scaffolds*.

Para a confecção dos biomodelos 3D foi utilizada a tecnologia de extrusão de filamento empregando o equipamento Fab@CTI (CTI, Campinas, Brasil) (Figura 12), uma plataforma experimental do projeto *open source* baseado no equipamento Fab@Home, a qual possui um cabeçote de extrusão intercambiável para entrada de material em forma de filamentos, e nesse caso utilizadas as amostras na forma de pó por meio da Plastometer MI-3 DSM, permitindo o uso de vários tipos de materiais poliméricos^{81; 82}. Os biomodelos físicos das respectivas amostras foram confeccionados na dimensão 20 x 20 x 2 mm com poros de 500 µm. A temperatura utilizada no processo de fabricação dos *scaffolds* foi 100 °C e espessura dos filamentos após extrusão foi de 0,4 mm.

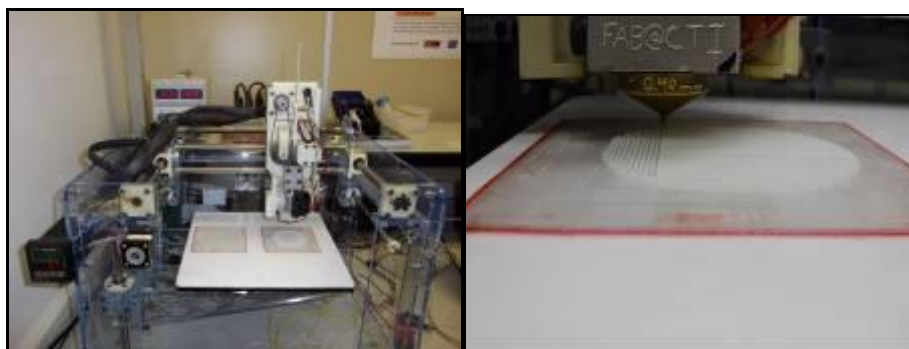


Figura 12. Processo de confecção dos *scaffolds* de PCL por extrusão (Fab@CTI).

4. Resultados e Discussões

4.1 Características Físicas dos Materiais

Seguindo a composição de cada amostra de acordo com a Tabela 1, as amostras foram extrudadas na forma de filamento, os quais apresentaram coloração branca. A figura 13 traz um exemplo de um material na forma de filamento.



Figura 13. Filamento obtido a partir do processo de extrusão.

4.2 Caracterização dos Componentes – Espectroscopia de Infravermelho e DRX

4.2.1 Policaprolactona (PCL)

A Figura 14 mostra o espectro infravermelho do polímero indicando duas bandas situadas em 1723 cm^{-1} , 1108 cm^{-1} típicas da ligação C=O, C-O, respectivamente²⁴. A banda em 2944 e 2864 cm^{-1} correspondem ao alongamento, e as bandas em 1365 , 1396 e 1472 cm^{-1} se relacionam às vibrações de flexão do grupamento CH_2 . A banda em 1295 cm^{-1} relacionada à vibração de alongamento de C-O e C-C, em 1241 cm^{-1} , 1189 cm^{-1} e 1046 cm^{-1} correspondentes ao grupamento C-O-C⁸³. Todas as bandas encontradas são características do polímero policaprolactona.

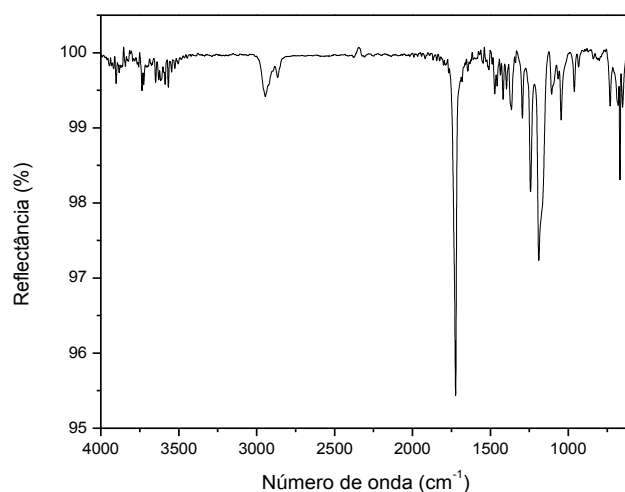


Figura 14. Espectro de Infravermelho do PCL.

O Difratoograma de Raios X da policaprolactona utilizada como base para construção dos materiais apresenta picos em 21° e 23° relativos ao PCL, de acordo com a caracterização feita por LEI et al. (2013) em seu trabalho que avaliou o comportamento de scaffolds de policaprolactona com vidro bioativo para a reconstrução de tecido ósseo²⁴.

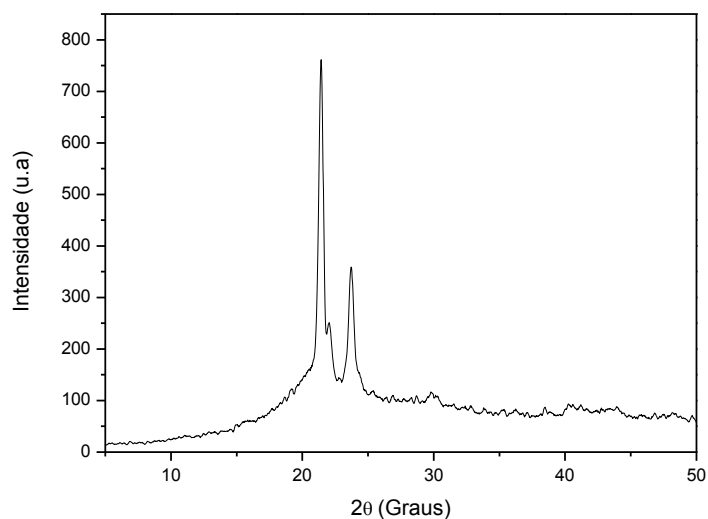


Figura 15. Difratoograma de Raios X da policaprolactona.

4.2.2 Fibroína

A figura 16 mostra o espectro de infravermelho para a proteína da seda em pó, com as condições de preparo descritas anteriormente.

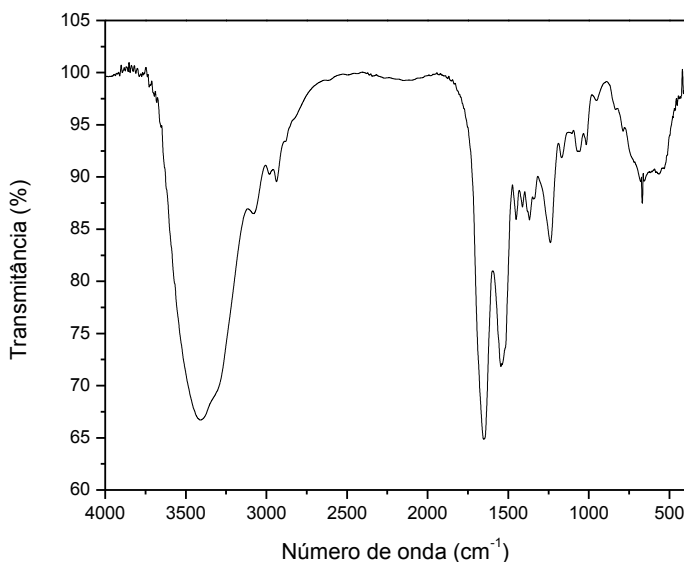


Figura 16. Espectro Infravermelho fibroína em pó.

A fibroína da seda pode ser classificada quanto à sua estrutura pelas bandas de amida I, amida II e amida III que de acordo com a região onde ocorrem é possível estudar a conformação que a proteína se encontra. O espectro de infravermelho da proteína apresenta bandas em 1656 cm^{-1} (amida I), 1547 cm^{-1} (amida II) e 1235 cm^{-1} (amida III) relativas à conformação random coil^{84; 85;86}, a qual se descreve por uma estrutura sem uma organização definida⁸⁷. As bandas na região de 645 e 551 cm^{-1} também descrevem a organização random coil. Essa informação é confirmada pela curva de DRX, encontrado na figura 17.

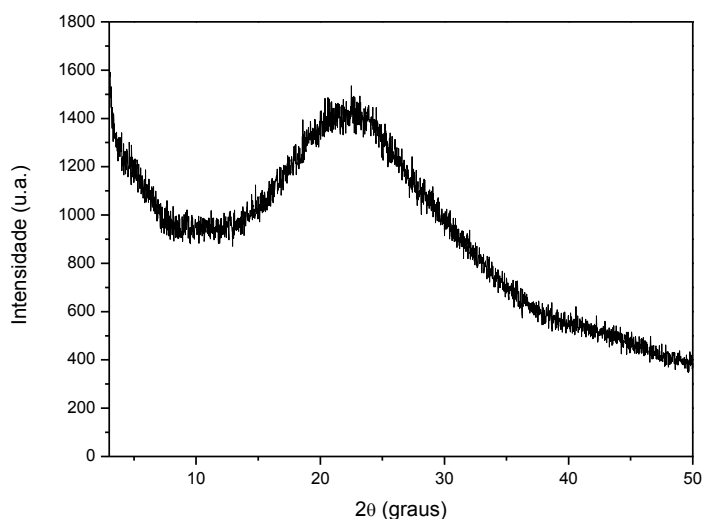


Figura 17. Difratoograma de Raios-X da fibroína da seda.

A figura mostra a difração de Raios X para a fibroína na seda na forma de pó entre valores de 2θ de 10° e 50° . O amplo pico de difração encontrado em aproximadamente 22° corresponde ao típico padrão de espalhamento da fibroína amorfa.⁸⁸

4.2.3 Oxiapatita com Lantânio (La_{20}OAP)

O espectro para La_{20}OAP revelou bandas típicas para apatitas (Figura 18). A banda em 1030 cm^{-1} e as bandas 570 cm^{-1} e 599 cm^{-1} correspondem aos grupos PO_4^{3-} da apatita. A banda em 3644 cm^{-1} corresponde a grupamentos OH, e a em 512 cm^{-1} relacionada à La-O, o que demonstra a ocupação dos sítios dos íons cálcio pelos de lantânio⁸⁹. Já a banda em 1414 cm^{-1} pode estar relacionada à presença de carbonato na estrutura⁹⁰.

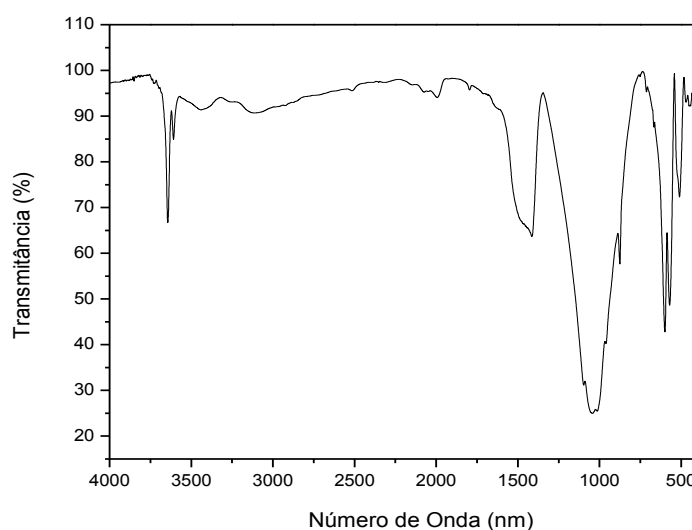


Figura 18. Espectro de infravermelho da La₂₀OAP.

A Figura 19 mostra os padrões de difração de raios-X (DRX) da apatita dopada com La em 20% (La₂₀OAP). Os picos da difração observados neste difratograma em 31,7°, 32,1° e 32,8° (2θ) correspondentes aos planos (211), (112) e (300) são atribuídos à oxiapatita contendo La (Ca₈La₂(PO₄)₆O₂) (ficha cristalográfica: ICDD – PDF-2: 33-0287).

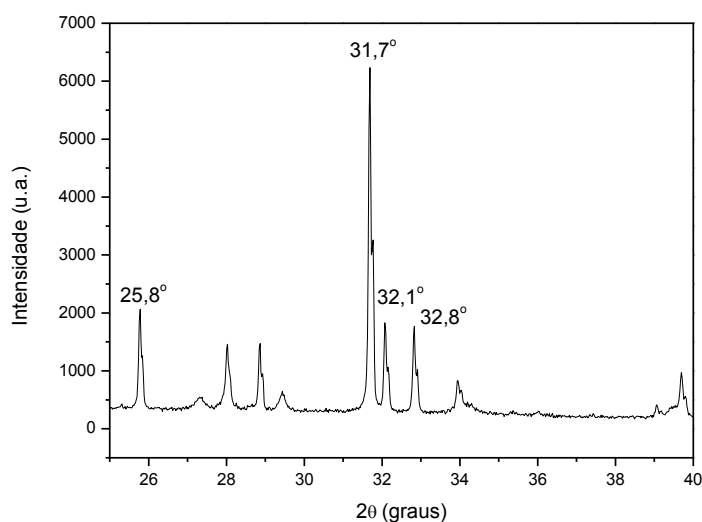


Figura 19. Padrões de difração de DRX para a amostra La₂₀OAP com respectivos picos de difração assinalados correspondentes aos planos (211), (112) e (300), respectivamente.

4.2.4 Apatita com $\text{YVO}_4\text{:Yb}^{3+}\text{:Er}^{3+}$

Os espectros de infravermelho para as nanopartículas e para $\text{YVO}_4\text{:Yb}^{3+}\text{:Er}^{3+}$ - Ap, estão representados na figura 20.

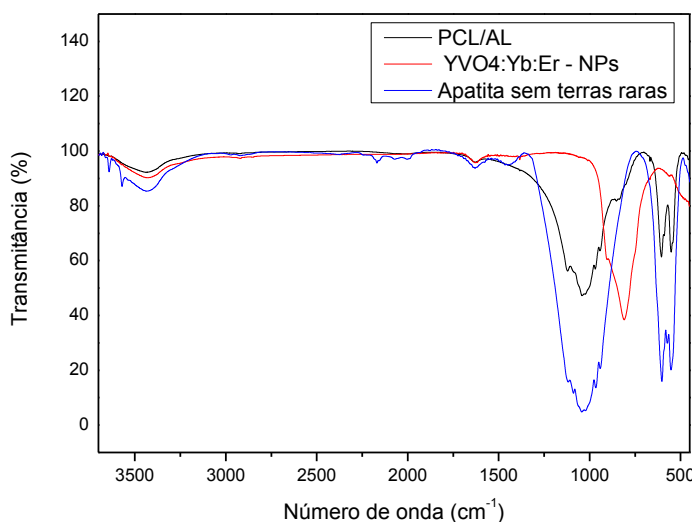


Figura 20. Espectro Infravermelho da PCL/AL.

As bandas localizadas em 3435 cm^{-1} e 1629 cm^{-1} que estão presente nos espectros são relativas à água adsorvida nos materiais. A apatita apresentou bandas em 1129 , 1031 , 849 , 607 e 546 cm^{-1} características dos grupos PO_4^{3-} . As bandas relativas ao cálcio apresentam-se em regiões inferiores a 400 cm^{-1} , as quais não detectáveis no equipamento utilizado^{91; 92}. Já as bandas em 812 cm^{-1} e o ombro em 904 cm^{-1} referem-se ao grupo VO_4^{3-} nas nanopartículas. Elas aparecem no espectro da apatita nos ombros em 941 , 968 , 852 e 842 cm^{-1} ⁹³.

A análise de DRX foi realizada para apatita luminescente, entretanto essa estrutura ainda não é conhecida na literatura. Em comparação ao difratograma das nanopartículas feito anteriormente no trabalho de mestrado de NIGOGHOSSIAN, K., observa-se que não é possível encontrar a mesma estrutura. A Figura 21 mostra o difratograma da apatita em comparação com o DRX das nanopartículas.

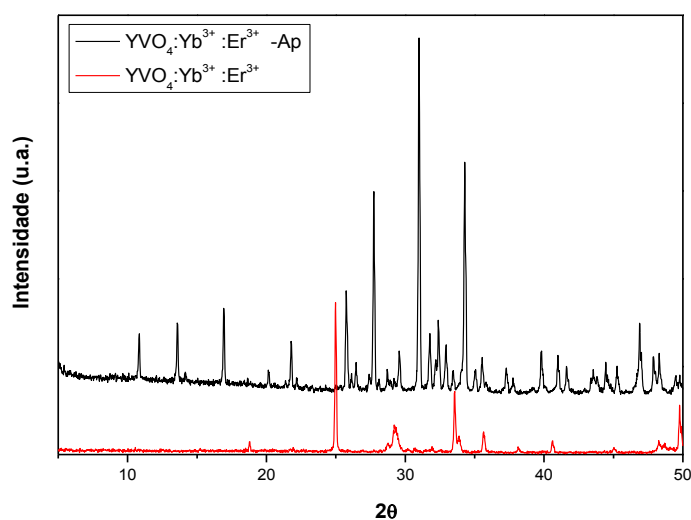


Figura 21. Difratoograma de Raios X da apatita luminescente comparado com o difratoograma das nanopartículas feitas por NIGOGHOSSIAN, K. em seu trabalho de mestrado.

O difratoograma da apatita luminescente apresentou picos relacionados às fases romboédrica do composto $\text{Ca}_9\text{Y}(\text{PO}_4)_7$ (PDF No. 46-402) e a hexagonal hidroxil-apatita $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (PDF No. 9-432). Os difratogramas de cada padrão comprados com o difratoograma da amostra estão indicados na Figura 22.

O difratoograma demonstra que se tem uma mistura de fase para a apatita luminescente, sendo a hidroxilapatita e o composto $\text{Ca}_9\text{Y}(\text{PO}_4)_7$, onde se indica que houve a substituição de um cálcio por um átomo de ítrio no fosfato de cálcio. A apatita possui a capacidade de acomodar diversas substituições: aniônica, catiônica ou ambas. A flexibilidade da estrutura da apatita aceita a inserção de variados grupos, permitindo a construção de materiais com propriedades distintas. Na hidroxilapatita por exemplo, os grupos Ca^{2+} , PO_4^{3-} e OH^- podem ser substituídos por La^{3+} , SiO_4^{4-} e O^{2-} ³⁹.

Os picos encontrados no difratoograma da apatita correspondem aos picos de fosfato de cálcio, porém deslocados para a esquerda. Esse comportamento está de acordo com a lei de Bragg, pois se o cálcio for substituído pelo ítrio, cujo tamanho é superior ao primeiro átomo, a distância entre planos é aumentada e assim, os picos são deslocados para valores de 2θ menores.

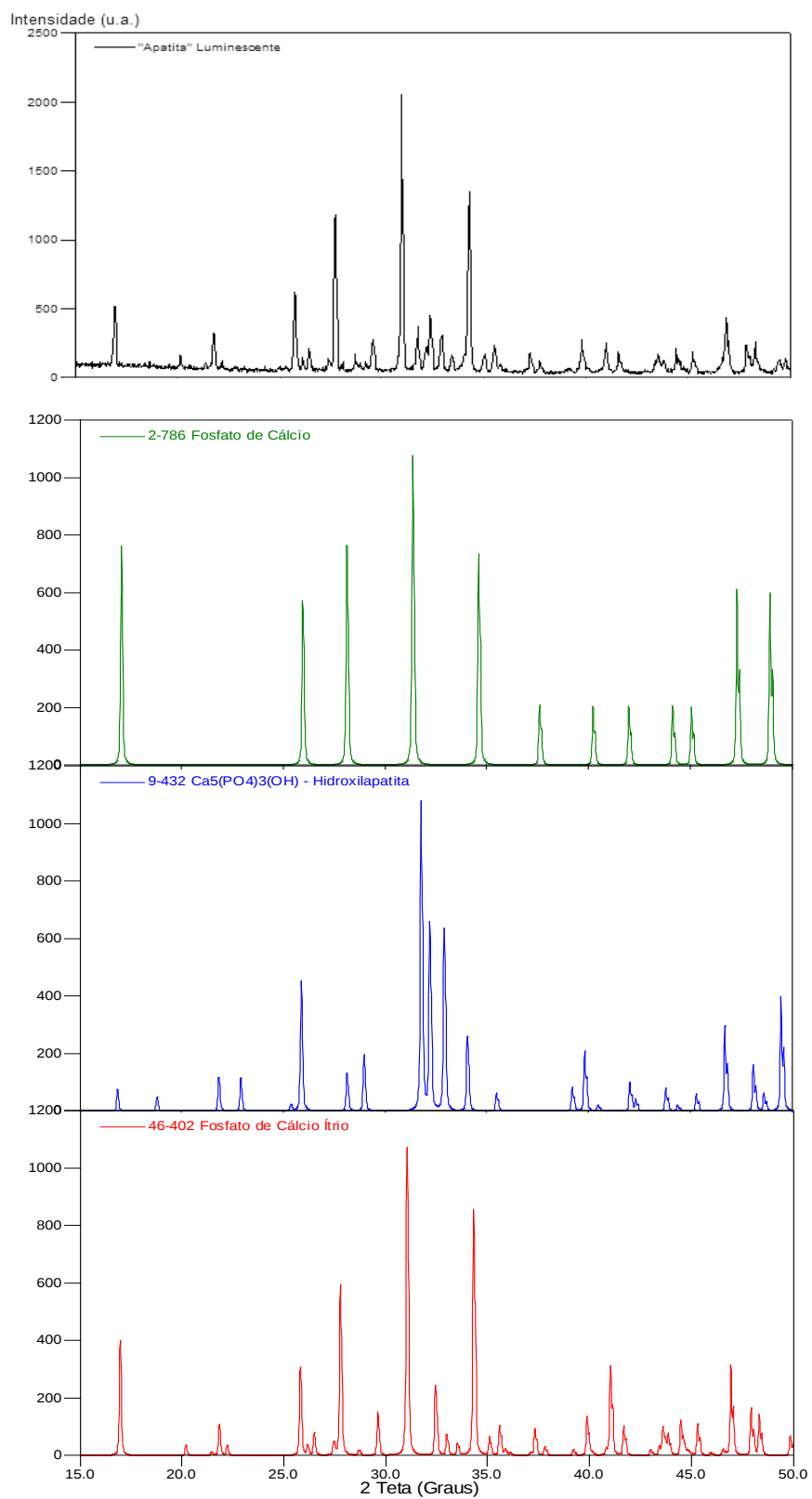


Figura 22. Difratoograma de DRX da apatita luminescente juntamente com os padrões.

4.2.5 Vidro Bioativo

No espectro de infravermelho do vidro bioativo (Figura 23), observam-se bandas na região de 1200 e 1090 cm^{-1} correspondentes aos modos vibracionais ópticos longitudinais e transversais das ligações Si-O que estão demonstradas pelo ombro em 1216 cm^{-1} e a banda de grande intensidade em 1074 cm^{-1} . Essa última pode estar sobrepondo as bandas em 1100 e 1040 cm^{-1} que são relacionadas às vibrações de alongamentos também da ligação Si-O. As bandas em 791 e 804 cm^{-1} também correspondem às vibrações deste grupamento⁹⁴. Já a banda em 494 cm^{-1} corresponde à vibração simétrica dos grupos Si-O-Si⁹⁵ e a banda localizada em 3452 cm^{-1} relacionada às vibrações de hidroxila, o que pode indicar a presença de grupos silanóis. Bandas relativas à composição Ca_2SiO_4 encontram-se nas regiões entre 620 e 580 cm^{-1} , porém essas podem estar sobrepostas à banda de grande intensidade dos grupos Si-O-Si⁹⁴.

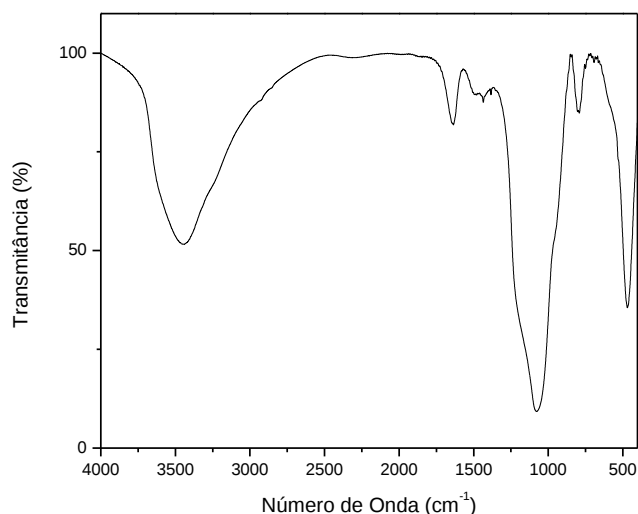


Figura 23. Espectro Infravermelho vidro bioativo.

A fim de se verificar se o material obtido, realmente apresentava organização amorfa, característica de todo componente vítreo, realizou-se um Difratoograma de Raios-X, como mostra a Figura 24. Observa-se então, pela ausência de picos bem definidos e um halo pico próximo a 22° , que o material apresenta organização amorfa, portanto, é coerente com o resultado esperado. Exceto por um único pico localizado em 32° que, segundo a literatura, pode

corresponder à formação Ca_2SiO_4 ⁹⁶ que pode apresentar nos vidros bioativos sintetizados por via sol-gel.

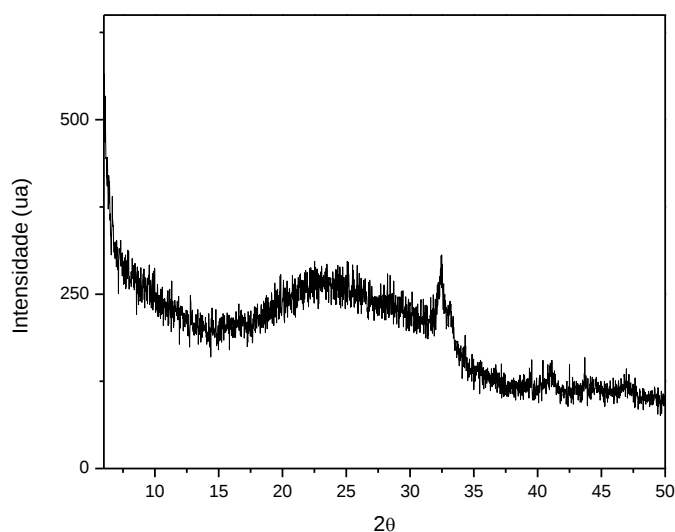


Figura 24. Difratoograma de Raios-X do vidro bioativo.

Pelo pico largo relacionado à formação do Ca_2SiO_4 , pode calcular o tamanho dos cristais pela equação de Scherrer⁹⁷.

$$D = \frac{G \cdot \lambda}{B \cos \theta}$$

onde D é o tamanho do cristal na direção vertical dos parâmetros hkl, B é a largura à meia altura do pico de difração, θ é o ângulo de Bragg correspondente ao pico de difração, λ é o comprimento de onda da fonte de radiação, neste caso Cu K = 1,5418 Å e G é a constante de Bragg, que varia entre 0,62 e 2,08 e é dependente do método para estimular o tamanho do cristal, a forma do cristal e a distribuição do tamanho. Para simplificar, é comum utilizar o valor de 0,94 para esta constante, correspondente a cristais esféricos de simetria cúbica⁹⁷.

Admitindo os valores de $G=0,94$, $\lambda= 1,5418$ Å, a largura à meia altura calculada para o pico (B) = 0,25°, e $2\theta= 32,47^\circ$, encontra-se que os cristais possuem diâmetro médio igual a 6,04 nm.

4.3 Caracterização dos Compósitos

4.3.1 Espectroscopia Infravermelho

A Figura 25 mostra as curvas de Infravermelho para os compósitos comparados com o PCL.

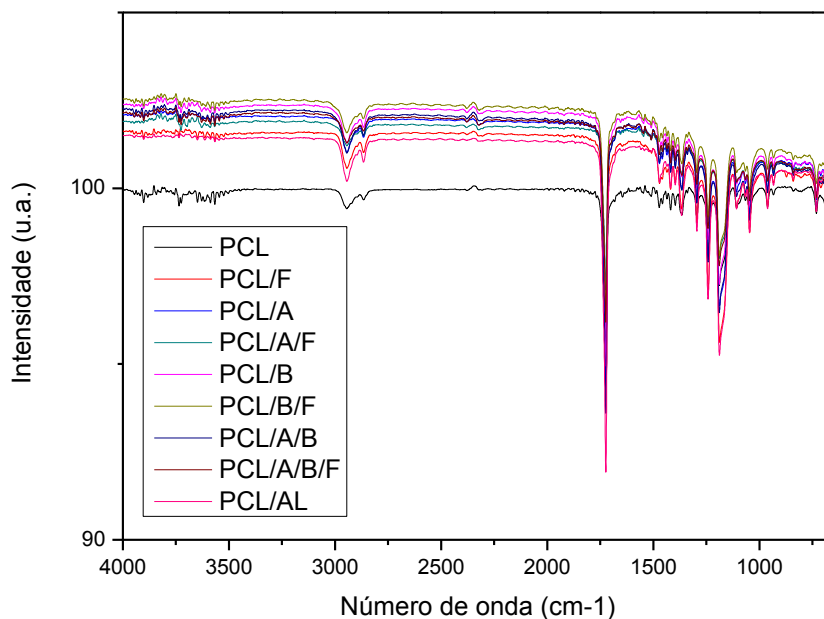


Figura 25.Espectro de infravermelho do PCL e todos os compósitos.

As amostras apresentaram as mesmas bandas características do PCL, e não foi possível a identificação da fibroína, apatita com lantânio e terras-raras e biovidro. Elzubair et al. também não detectou bandas de biovidro em sua amostra de Resilon™ cuja composição é biovidro e policaprolactona⁹⁸. Essa informação sugere o PCL encontra-se por toda superfície do filamento, englobando as partículas das cargas inorgânicas e fibroína, devido ao processo de extrusão.

4.3.2 Caracterização Térmica -Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A Figura 26 mostra as curvas de DSC para o aquecimento dos compósitos e da policaprolactona. Os valores da temperatura de fusão, temperatura *onset*, calor de fusão e grau de cristalinidade estão representados na Tabela 2 para todas as amostras. Os ensaios foram feitos até a temperatura de 100°C a qual representa a temperatura de trabalho tanto para o processo de extrusão quanto para o processo de impressão.

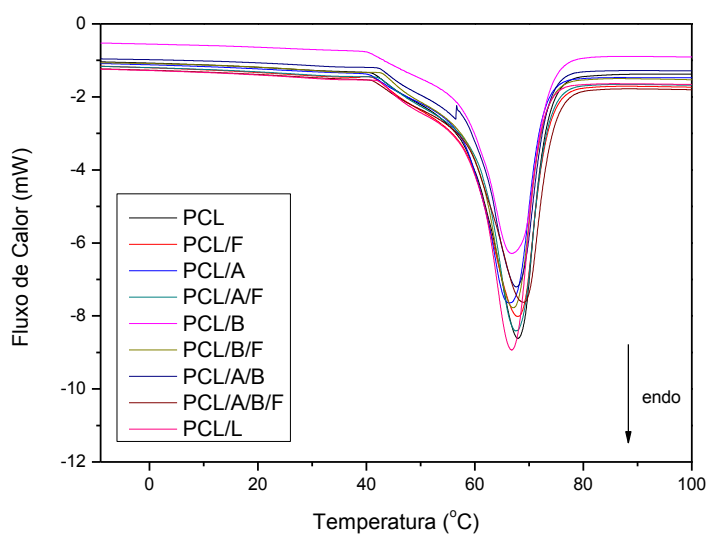


Figura 26.Curvas de DSC do PCL e todos os compósitos extrudados.

As amostras apresentaram apenas um evento endotérmico relativo ao ponto de fusão do polímero PCL em torno de 60°C. As fases inorgânicas e a fibroína não alteraram significativamente as propriedades térmicas do polímero, sendo dentre todos os ensaios, a maior variação de ponto de fusão remete-se à um valor de 2,43°C. Esses resultados sugerem que não há degradação da policaprolactona durante os processos de extrusão e de impressão dos scaffolds, já que os dados coletados estão de acordo com a literatura⁹⁹.

É notado também que todas as amostras apresentaram um amolecimento em torno de 40°C. Como a temperatura do corpo humano encontra-se em torno de 37°C e podendo variar até 3 graus acima desse ponto, há uma mudança de viscosidade do scaffold a ser implantado em uma área de reconstrução óssea e assim a perda de parte da resistência mecânica próximo

a essa temperatura. Por outro lado, o amolecimento pode promover uma maior difusão das fases inseridas no polímero para o organismo, aumentando assim, a biodisponibilidade das cargas.

Tabela 2. Dados de T_{onset} , T_m , ΔH_f e % cristalinidade para a policaprolactona e os compósitos para as amostras extrudadas.

Propriedades Térmicas	PCL	PCL/F	PCL/A	PCL/A/F	PCL/B	PCL/B/F	PCL/A/B	PCL/A/B/F	PCL/AL
Temperatura onset, °C (T_{onset})	57,6	56,5	57,9	59,8	58,1	58,4	59,0	57,4	58,9
Temperatura de fusão, °C (T_m)	67,9	67,9	66,5	67,5	66,9	67,2	67,6	69,0	66,8
Entalpia de fusão, J/g (ΔH_f)	59,7	57,0	51,9	55,0	48,4	51,9	50,3	54,6	56,2
Grau de Cristalinidade, % (χ)	44,2	42,1	38,3	40,7	35,8	38,4	37,2	40,3	41,5

Os valores encontrados estão de acordo com a literatura com grau de cristalinidade do PCL de 44,1% e um calor de fusão de $59,1 \text{ J g}^{-1}$ para um aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ ⁹⁹. Os compósitos apresentaram valores levemente menores dessas duas grandezas, porém não é possível compará-las entre si, pois a história térmica do polímero deve ser considerada.

A história térmica de um material corresponde aos processos de aquecimento e resfriamento que as amostras foram submetidas antes da realização da medida de DSC. Esses processos provocam mudanças nas cadeias poliméricas e modificam o comportamento da curva. Diferentes modos de resfriamento podem levar a diferentes porcentagens de cristalização¹⁰⁰.

Como o resfriamento desses materiais não seguiu um padrão para todas as amostras, já que se deu de forma natural, à temperatura ambiente, não é possível compará-los entre si. Para isso, a fim de se comparar propriedades como o grau de cristalinidade e calor de fusão, uma análise de DSC foi realizada, agora na amostra em pó, e todos os dados coletados a partir do segundo aquecimento, garantindo assim, o mesmo regime de resfriamento para todas elas. As curvas encontram-se na Figura 27.

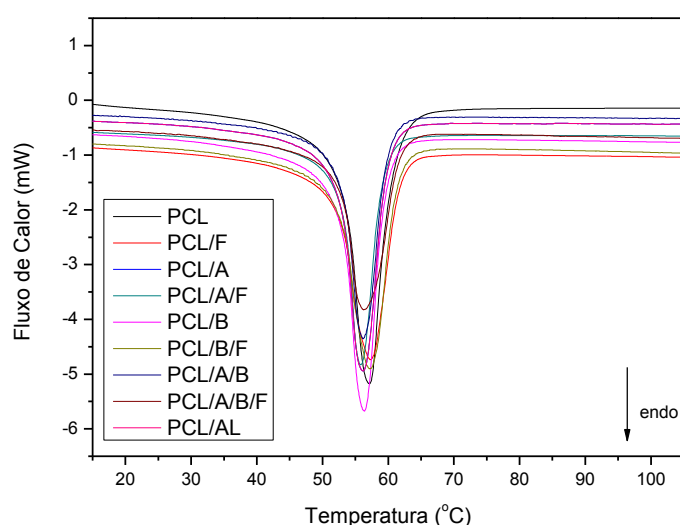


Figura 27.Curvas de DSC do PCL e todos os compósitos após dois aquecimentos.

Os valores de temperatura *onset*, temperatura de fusão, calor de fusão e grau de cristalinidade são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Dados de T_{onset} , T_m , ΔH_f e % cristalinidade para a policaprolactona e os compósitos para amostras em pó, após dois aquecimentos.

Propriedades Térmicas	PCL	PCL/F	PCL/A	PCL/A/F	PCL/B	PCL/B/F	PCL/A/B	PCL/A/B/F	PCL/AL
Temperatura onset, °C (T_{onset})	52,97	52,14	52,86	52,78	52,71	52,32	52,70	52,43	52,57
Temperatura de fusão, °C (T_m)	57,17	57,26	55,89	56,57	56,39	57,35	56,19	56,36	56,13
Entalpia de fusão, J/g (ΔH_f)	35,00	35,78	30,76	31,04	32,60	32,96	31,71	29,68	34,43
Grau de Cristalinidade, % (χ)	25,87	26,44	22,74	22,94	24,10	24,36	23,44	21,94	25,45

Inicialmente, se observa que o amolecimento havia sido detectado na medida anterior, não é visto para essas condições. Apesar do aumento da fluidez do material aumentar a biodisponibilidade das cargas bioativas para o organismo hospedeiro do implante, isso pode acarretar uma perda da resistência mecânica. Caso, em alguma situação, esse amolecimento não seja

desejável, como por exemplo um implante apenas com o polímero, onde não haja componentes bioativos inseridos, um resfriamento controlado, poderia suprimir o evento e apenas apresentar o ponto de fusão em aproximadamente 60°C.

Pelos valores da tabela, observa-se uma diminuição nos valores de temperatura *onset*, temperatura de fusão, calor de fusão e grau de cristalinidade para todas as amostras comparado com os valores encontrados na literatura. Se um polímero fundido é rapidamente resfriado, é possível que não haja tempo para que a cristalização ocorra, formando assim, núcleos cristalinos com crescimento desprezível. Um resfriamento rápido pode acarretar em uma diminuição significativa na cristalinidade do polímero¹⁰¹. Logo, o resfriamento natural, à temperatura ambiente, realizado nas amostras da primeira medida de DSC pode ter garantido um maior tempo para o rearranjo das cadeias poliméricas, e assim, um maior grau de cristalinidade.

Ao comparar as amostras entre si, observa-se que todas apresentaram valores de temperatura *onset*, temperatura de fusão, calor de fusão e grau de cristalinidade muito próximos. Apesar dessa informação, amostras que contém apatita com lantânio apresentaram uma maior interferência nos valores de cristalinidade e calor de fusão, se comparadas com os valores dessas grandezas do PCL puro. Tal fato pode ser atribuído às interações polímero-carga que podem provocar o decréscimo da cristalinidade do PCL, ou até mesmo o tamanho das partículas pode impedir a ordem do polímero^{102; 103}.

4.3.3 Caracterização Térmica -Termogravimetria (TGA)

A estabilidade térmica de polímeros bioabsorvíveis é um fator importante a ser estudado no processo de fabricação de scaffolds 3D, já que o processo de manufatura aditiva necessita de altas temperaturas para o processamento do material. Além disso, durante a fabricação do scaffolds, a degradação térmica pode gerar moléculas menores, que podem interferir na citotoxicidade e biocompatibilidade do material¹⁰⁴. A Figura 28 apresenta curvas de termogravimetria para todas as amostras, cujos valores encontram-se na Tabela 4.

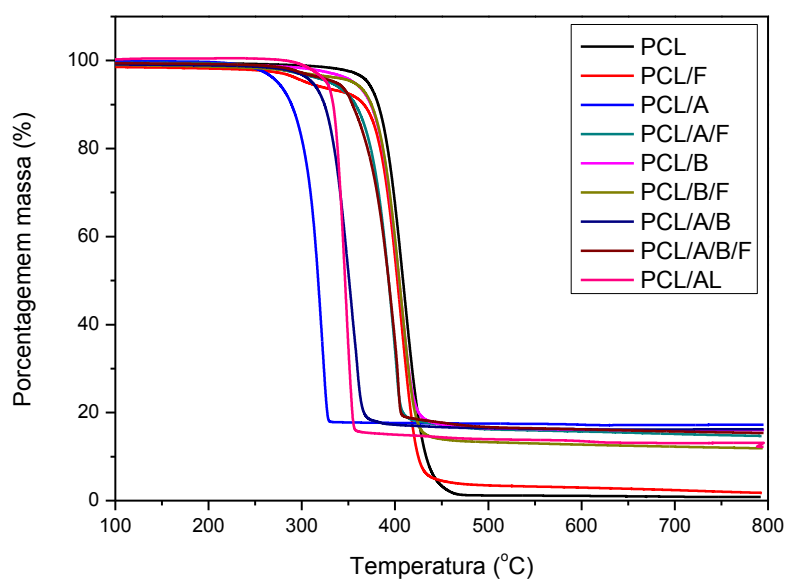


Figura 28. Curvas termogravimétricas para o PCL e os compósitos.

Tabela 4. Dados de T_{onset} da policaprolactona e cada compósito.

Amostra	Tonset (°C)
PCL	385,9
PCL/F	383,7
PCL/A	302,6
PCL/A/F	374,8
PCL/B	380,6
PCL/B/F	382,6
PCL/A/B	329,7
PCL/A/B/F	381,9
PCL/AL	334,8

A amostra de PCL puro (PCL) apresentou apenas um estágio de degradação com início em 386°C e fim em 462°C³⁷. Igualmente, todos os compósitos apresentaram apenas um evento relativo à decomposição do polímero, entretanto, se observa uma diminuição da temperatura onset para amostras que contém apatita com lantânio e com íons terras raras. A amostra PCL/A que contém a maior concentração de apatita (20%) apresentou a maior

diminuição da temperatura em relação ao PCL puro. Isso também se notou para as amostras PCL/A/F, PCL/A/B, PCL/A/B/F e PCL/AL que também possuem a apatita em sua composição. Trabalhos na literatura expõem essa diminuição da temperatura de decomposição do polímero em compósitos com apatita¹⁰⁵, o que indica que a apatita diminui a estabilidade térmica do PCL. Para o vidro bioativo e a fibroína, as amostras PCL/F e PCL/B que apresentam esses componentes separadamente, não foi notada mudança significativa da temperatura de decomposição, evidenciando que não há interseção desses materiais na estabilidade térmica do polímero.

A PCL/F apresenta uma perda de massa antes do evento de decomposição do polímero com início em 267°C e fim em 351°C. Essa queda de massa pode estar relacionada à decomposição da fibroína, como se encontra na literatura¹⁰⁶. Não se observa nenhuma perda de massa e, assim, nenhuma decomposição dos materiais até 100°C, temperatura do processo de extrusão ou de impressão 3D a partir da matéria-prima em pó.

4.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

A distribuição dos componentes na base PCL pode ser observada pelas imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura como nas Figuras 29 a 37. Podem também observar as imagens obtidas a partir do detector de BSE, o qual fornece o contraste químico de acordo com o número atômico dos constituintes de cada amostra. Uma cor mais clara é atribuída aos componentes de maior número atômico, dessa forma, é possível distinguir a apatita com lantânio, o biovidro e apatita com terras raras da base polimérica nas figuras. As micrografias foram realizadas na secção transversal do filamento de cada compósito.

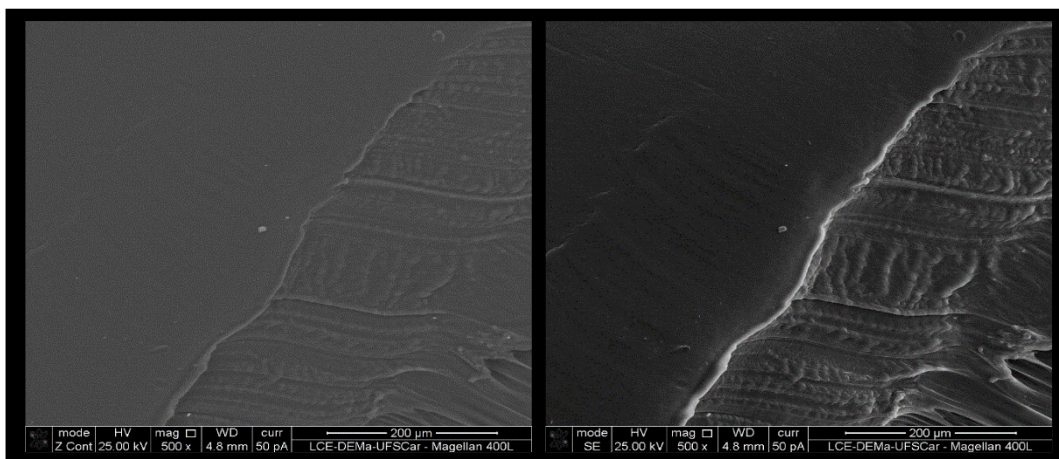


Figura 29. Microscopia Eletrônica de Varredura para a secção transversal do filamento extrudado de policaprolactona.

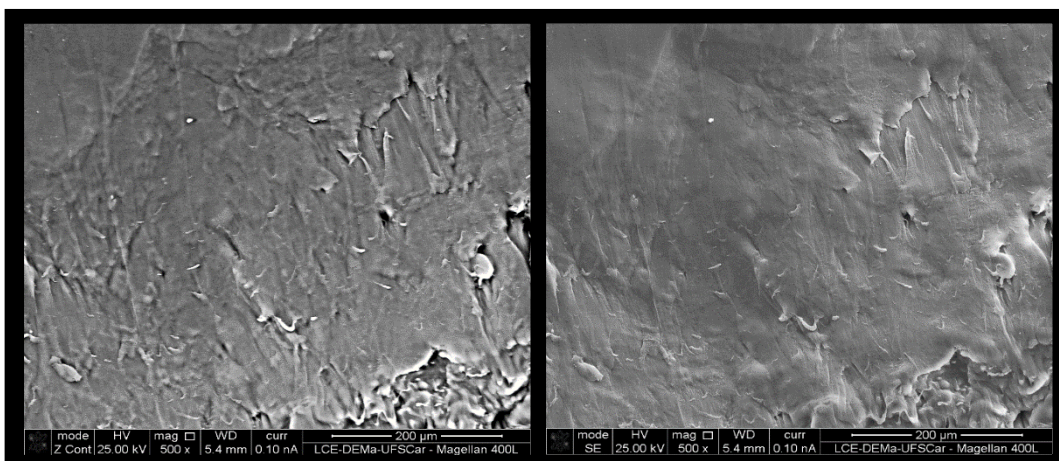


Figura 30. Microscopia Eletrônica de Varredura para a secção transversal do filamento extrudado de PCL/F.

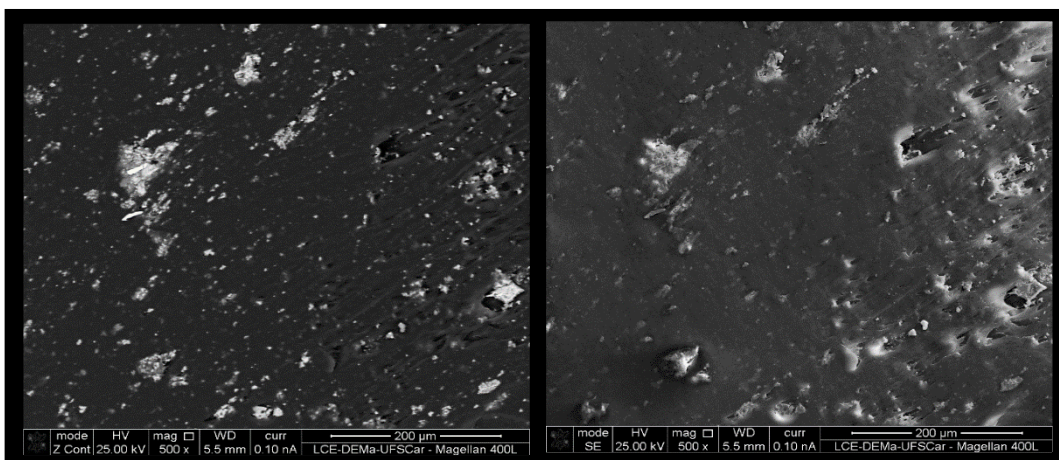


Figura 31. Microscopia Eletrônica de Varredura para a secção transversal do filamento extrudado de PCL/A.

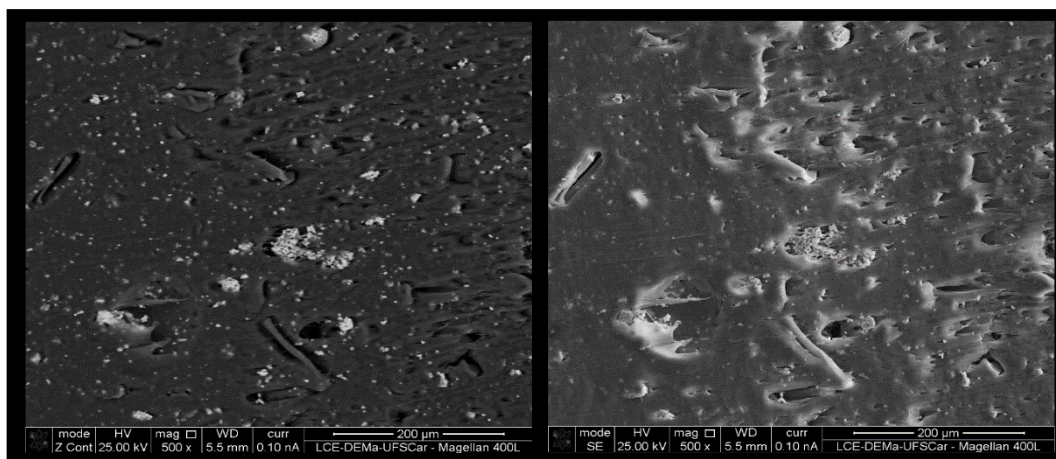


Figura 32. Microscopia Eletrônica de Varredura para a secção transversal do filamento extrudado de PCL/A/F.

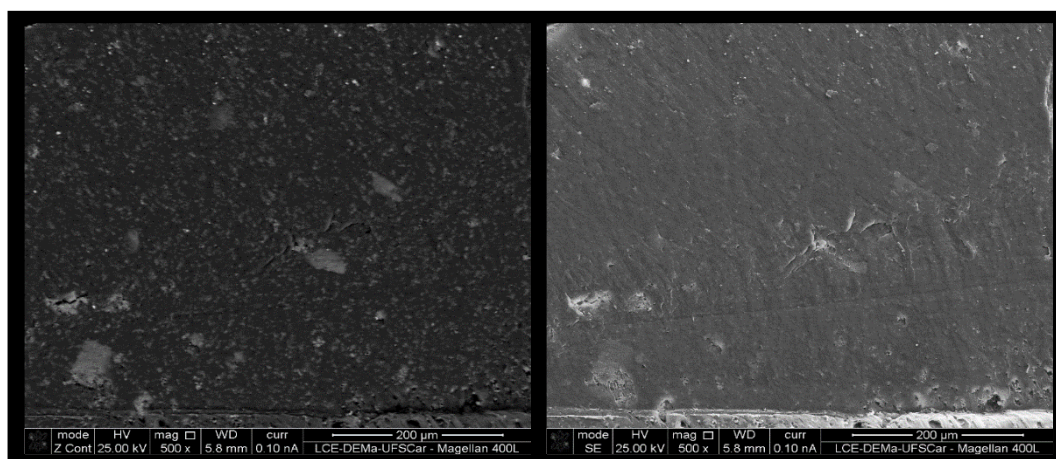


Figura 33. Microscopia Eletrônica de Varredura para a secção transversal do filamento extrudado de PCL/B.

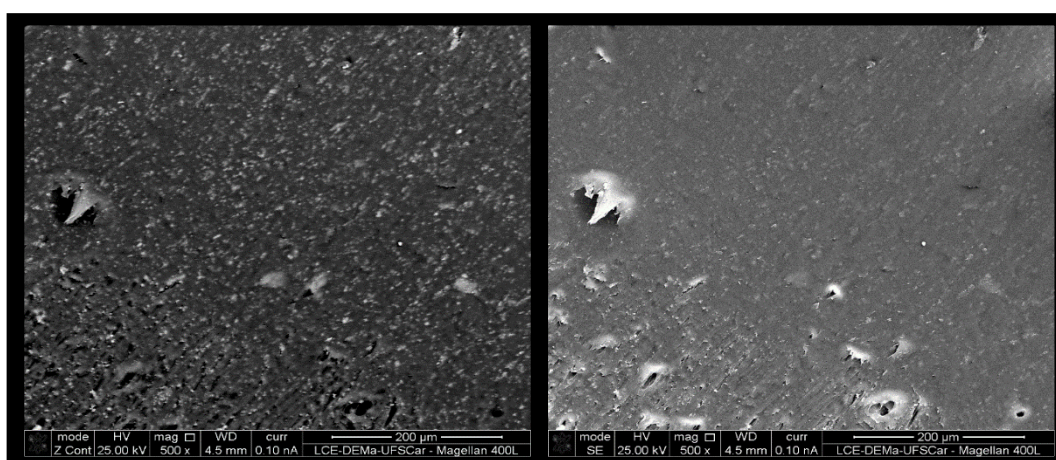


Figura 34. Microscopia Eletrônica de Varredura para a secção transversal do filamento extrudado de PCL/B/F.

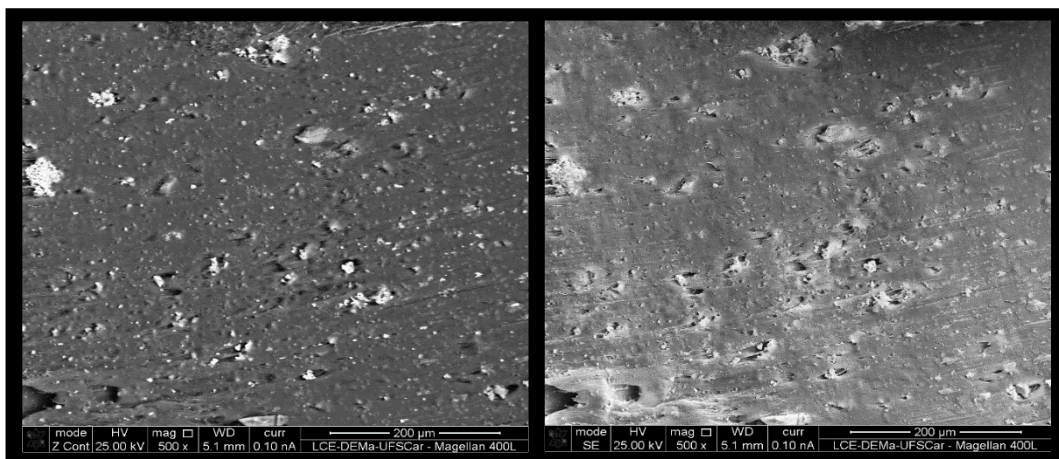


Figura 35. Microscopia Eletrônica de Varredura para a secção transversal do filamento extrudado de PCL/A/B.

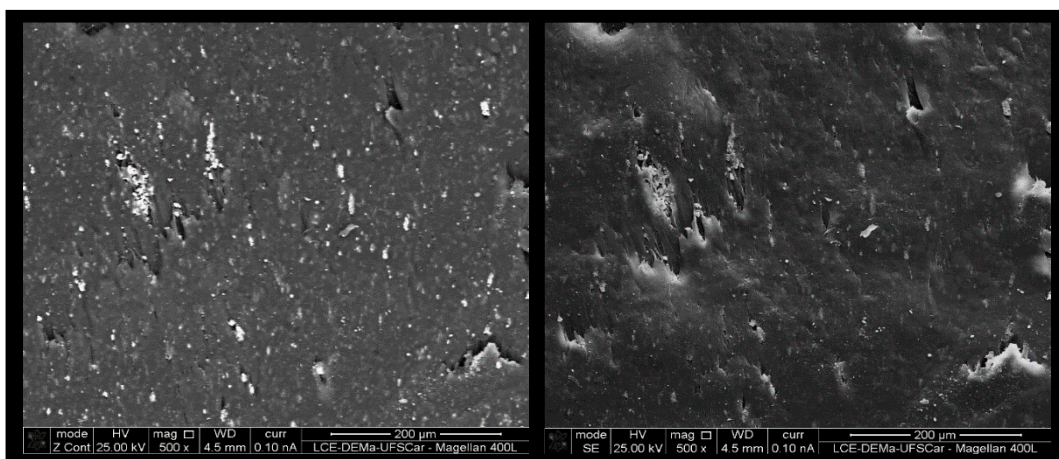


Figura 36. Microscopia Eletrônica de Varredura para a secção transversal do filamento extrudado de PCL/A/B/F.

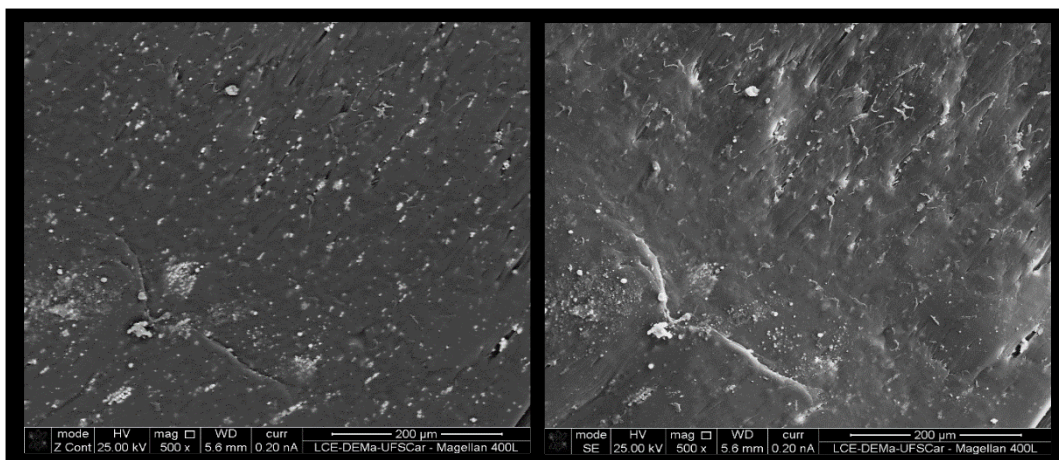


Figura 37. Microscopia Eletrônica de Varredura para a secção transversal do filamento extrudado de PCL/AL.

Pelas imagens de microscopia feitas é possível observar que o processo de extrusão garante uma boa distribuição das partículas do corpo do polímero. Todas as amostras que continham biovidro e apatitas mostraram pontos mais claros correspondentes aos átomos de silício, cálcio, fósforo e terras raras presentes nas matrizes inorgânicas. Esses átomos se destacam em meio ao polímero, PCL, que por sua vez é constituído apenas de carbono e oxigênio. Os pontos mais claros são mais superficiais, enquanto os com menor nitidez são mais profundos e assim, envolvidos pelo polímero. A fase da fibroína, por ser uma proteína, não ficou destacada nas imagens de contraste químico, já que é constituída de átomos com número atômico parecido aos da base polimérica.

Em aumentos maiores, é possível identificar que nas amostras com apatita e vidro bioativo, com a adição da proteína da seda, os aglomerados dessa fase são mais desagregados e dispersos. Isso indica que a fibroína pode aumentar a compatibilidade das fases inorgânicas com o polímero policaprolactona. As partículas são mais bem divididas mesmo dentro dos aglomerados após a adição da fibroína. Esse efeito pode ser visto e comparado na figura 38.

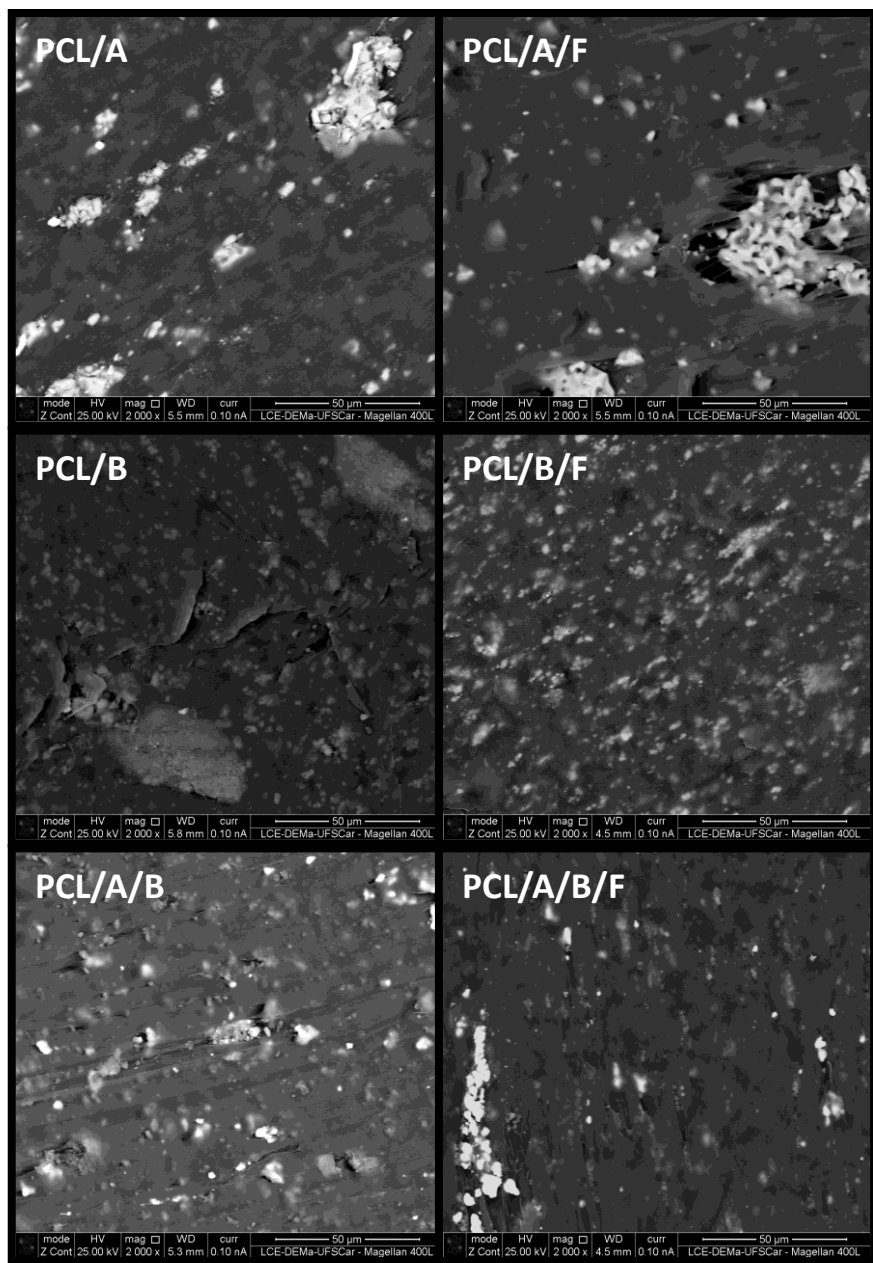


Figura 38. Microscopias Eletrônicas de Varredura da secção transversal dos filamentos de PCL/A, PCL/A/F, PCL/B, PCL/B/F, PCL/A/B e PCL/A/B/F com um aumento de 2000 vezes.

4.3.5 Medida do Ângulo de Contato

A média dos valores encontrados foi considerada como mostra a Tabela 5. A medida foi realizada na superfície de um filme de cada amostra, já que na forma de filamentos, por serem muito finos, não seria possível desprender a gota de água.

Tabela 5. Medidas de ângulo de contato das amostras.

Amostra	Composição	Ângulo de Contato
PCL	PCL	84°
PCL/F	PCL + FIB	92°
PCL/A	PCL+La ₂₀ OAP	102°
PCL/A/F	PCL + FIB+La ₂₀ OAP	96°
PCL/B	PCL +VB	96°
PCL/B/F	PCL +FIB+VB	99°
PCL/A/B	PCL+La ₂₀ OAP+VB	90°
PCL/A/B/F	PCL+FIB+La ₂₀ OAP+VB	92°

Diversos autores determinam que ângulos acima de 90° demonstram um material hidrofóbico enquanto que para valores menores materiais com maior hidrofilicidade. Admitindo esse conceito, pode-se notar que todas as amostras apresentaram um caráter hidrofóbico. A Figura 39 demonstra os valores de ângulo de contato e seus respectivos erros para as amostras.

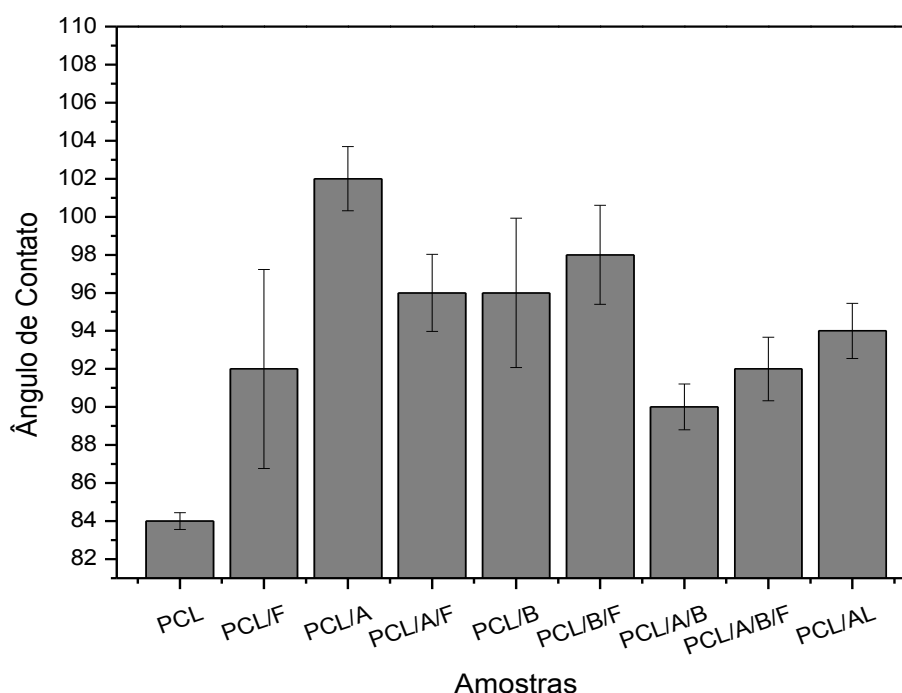


Figura 39. Valores de ângulo de contato e respectivos erros padrões.

Por meio da avaliação estatística, com teste de Tukey, todas as amostras, exceto PCL/A e PCL/B/F, possuem ângulo de contato iguais ao

polímero base PCL, portanto, apresentam hidrofobicidade semelhante ao polímero base, o que indica que as cargas não interferiram na composição da superfície do material. A amostra 3, cuja composição é PCL:La₂₀OAP ($p < 0,01$) e amostra PCL/B/F ($p < 0,05$) apresentaram diferenças nos valores de ângulo de contato em relação à policaprolactona. Esses dois compósitos apresentam biovidro e apatita com lantânio, e essas cargas por possuírem caráter polar, a parte mais hidrofílica do PCL pode interagir com as cargas polares, restando na superfície a parte mais hidrofóbica do polímero, garantindo assim valores levemente maiores para ângulo de contato que a policaprolactona.

A não interferência da maioria das amostras na composição da superfície dos materiais leva a concluir que com o processo de extrusão, as partículas são circundadas pelo polímero, e assim, na superfície só se tem a policaprolactona. As imagens da gota de água em contato com a superfície de cada amostra encontram-se na Figura 40.



Figura 40. Medida de ângulo de contato em filmes de policaprolactona e dos 8 compósitos.

4.3.6 Perfilometria

O caráter hidrofóbico dos compósitos pode se originar da composição química ou até mesmo da topografia da superfície. É possível encontrar na literatura a descrição de materiais altamente repelentes à água, os quais possuem em sua superfície protuberâncias em escala micrométrica e até estruturas nanométricas que garantem um caráter superhidrofóbico ao material. Esse comportamento é chamado de Efeito Lótus, já que a flor de lótus apresenta essa topografia de superfície e a repelência à água^{107; 108; 109}.

Assim, foi realizada uma perfilometria para se obter um mapa de superfície das amostras utilizadas na medição do ângulo de contato. Desse modo, é possível determinar se o caráter hidrofóbico dos materiais se deve à composição química, ou possuem uma topografia que garante essa propriedade à eles. Os mapas de superfície encontram-se nas Figuras 41 a 45.

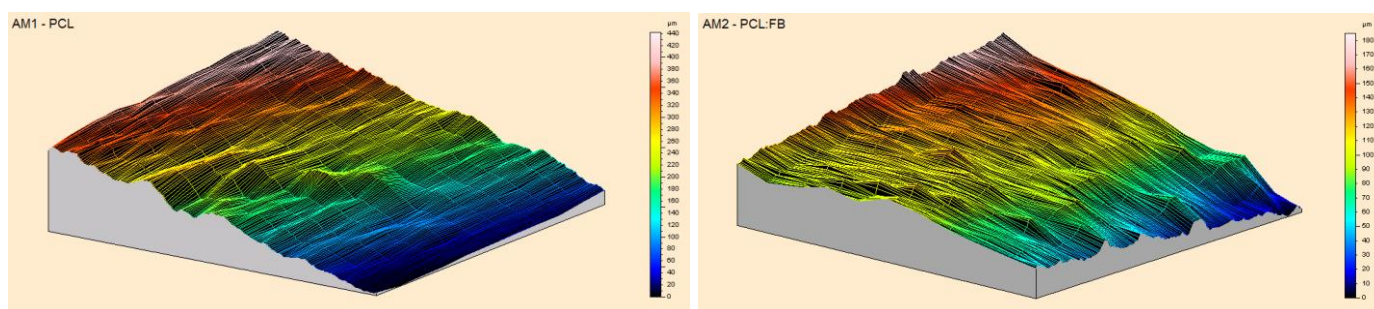


Figura 41. Topografia da superfície das amostras PCL (à esquerda) e PCL/F (à direita).

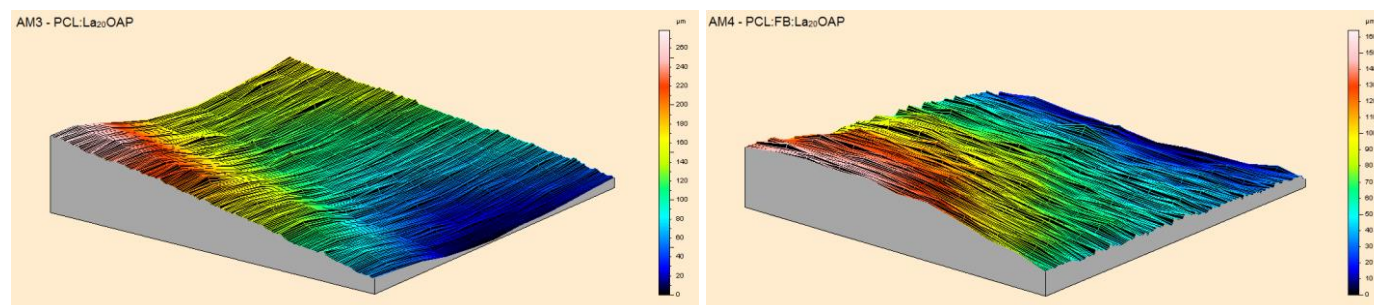


Figura 42. Topografia da superfície das amostras PCL/A (à esquerda) e PCL/A/F (à direita).

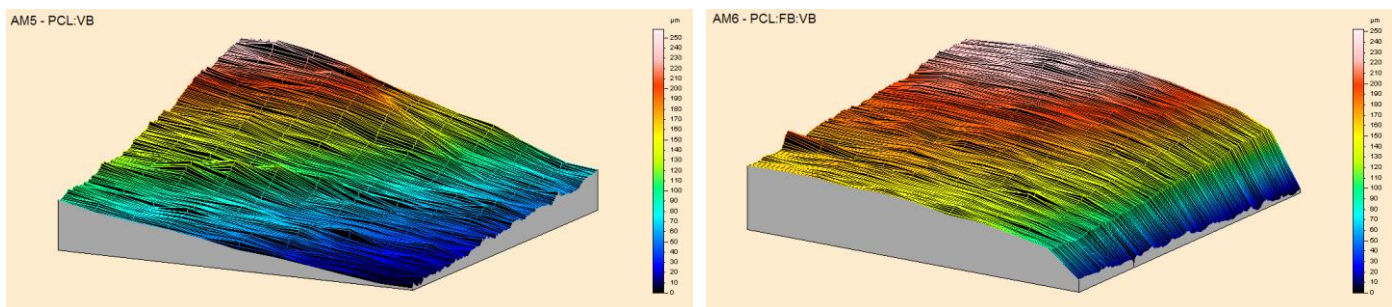


Figura 43. Topografia da superfície das amostras PCL/B (à esquerda) e PCL/B/F (à direita).

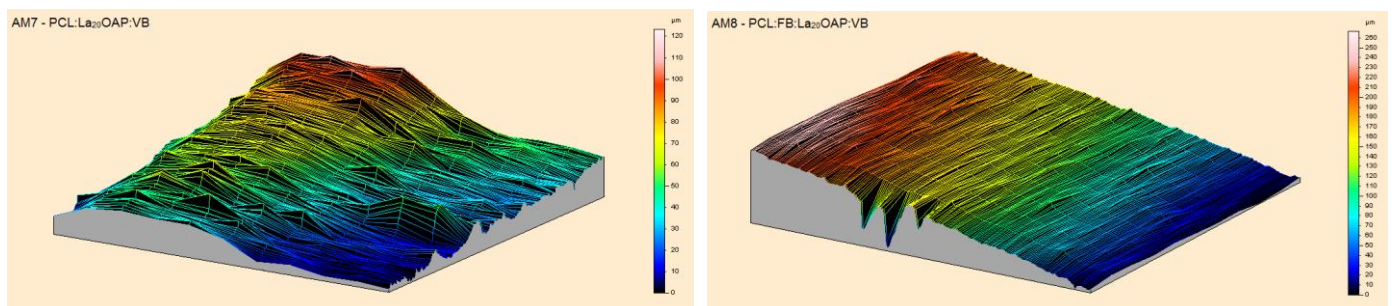


Figura 44. Topografia da superfície das amostras PCL/A/B (à esquerda) e PCL/A/B/F (à direita).

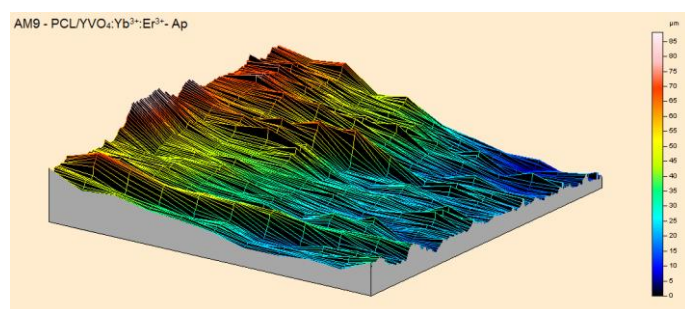


Figura 45. Topografia da superfície da amostra PCL/AL.

Pelos mapas de superfície, nota-se que as amostras apresentam baixa rugosidade, algumas mais acentuadas como no caso das amostras PCL, PCL/F, PCL/A/B e PCL/AL, porém não demonstram estruturas organizadas que

impeçam o contato do material com a água. Desse modo, pode-se atribuir o caráter hidrofóbico à composição química da superfície dos materiais.

4.4 Análise Mecânica

4.4.1 Caracterização Reológica - Propriedades no regime permanente de cisalhamento

A Figura 46 mostra os resultados de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para o polímero PCL e as amostras com diferentes proporções de vidro bioativo, apatitas e fibroína.

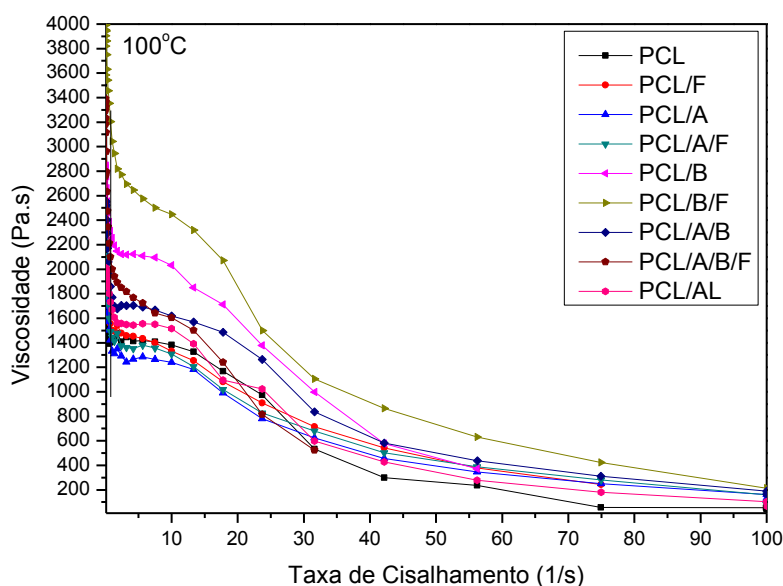


Figura 46. Curva de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para o polímero PCL e as amostras em uma temperatura de 100°C.

A curva de reologia acima descreve o comportamento do polímero e dos compósitos à uma temperatura de 100°C e taxa de cisalhamento de 0,1 a 100 Hz. As informações sobre o processo podem ser retiradas a partir da curva. Nota-se que em baixas taxas de cisalhamento, os comportamentos reológicos dos compósitos diferem-se notoriamente uns dos outros, inclusive em comparação com o PCL, o que indica a diferença de interações entre cargas-polímero na fase líquida. Nessas condições, as amostras PCL/B e PCL/B/F

apresentam interações mais fortes, e o consequente aumento da viscosidade desses materiais. Com o aumento das taxas, amostras e polímero tendem ao mesmo comportamento de viscosidade. Em um processo de extrusão, por exemplo, as amostras com maior viscosidade, como no caso a PCL/B/F, necessitariam de uma maior energia de rosca ou uma maior pressão para processar o material. A maioria das impressoras 3D para a confecção de scaffolds são alimentadas por filamentos do material a ser impresso, os quais são confeccionados pelo processo de extrusão. Já foram realizados trabalhos no grupo de pesquisa em que filamentos foram extrudados em mini extrusora à rotação de 50 rpm, ou 0,83 Hz e assim a baixas taxas de cisalhamento. Pelo gráfico, para essa frequência, as viscosidades dos materiais são bem distintas, o que indica que cada compósito necessitará de parâmetros específicos durante o processo.

Abaixo, para melhor avaliação do comportamento do polímero e compósitos, a Figura 47 representa um gráfico de log de viscosidade em função de log da taxa de cisalhamento.

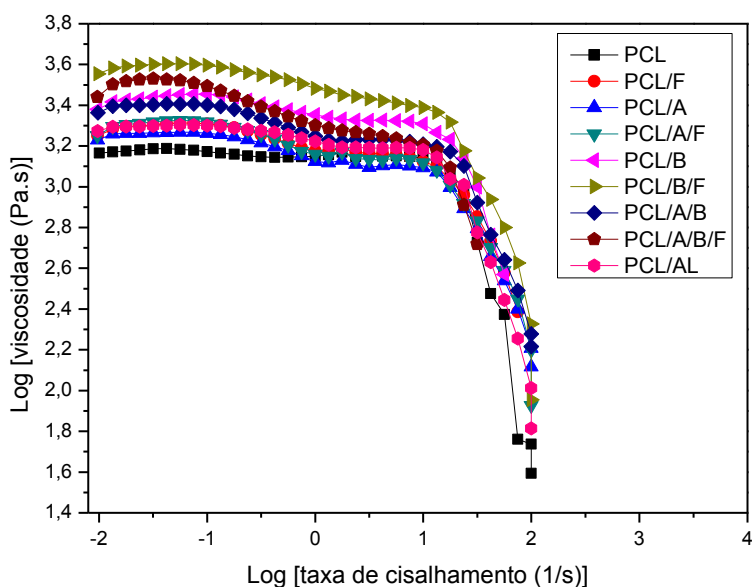


Figura 47. Curva de log da viscosidade em função do log da taxa de cisalhamento para o polímero PCL e as amostras em uma temperatura de 100°C.

Os materiais apresentam um Platô Newtoniano com valores distintos, indicando interações distintas entre a cadeia polimérica e os componentes inorgânicos e/ou fibroína, de acordo com a composição de cada amostra. A amostra PCL/B/F apresentou um maior valor, correspondente a de maior viscosidade. Em uma frequência de aproximadamente 13 Hz, o comportamento dos materiais passa de fluido newtoniano para pseudoplástico. Tal informação se relaciona ao fato de que com o aumento da taxa de cisalhamento as moléculas do polímero se orientam e algumas interações rompem-se diminuindo assim, a viscosidade.¹¹⁰

4.4.2 Propriedades Mecânicas por Torção

As propriedades reológicas em regime dinâmico fornecem informações sobre a resposta de um material a uma dada deformação ou uma dada tensão, dependendo do tipo de solicitação e equipamento que são dispostos. No regime oscilatório ou dinâmico, é possível determinar as propriedades viscoelásticas como módulo de armazenamento ou elástico (G') e de perda ou viscoso (G'')¹¹¹. Propriedades mecânicas, como resistência à tensão, elongação e módulo de elasticidade podem servir como base para a comparação do desempenho mecânico de diferentes polímeros, assim como avaliação dos efeitos da inserção de reforços, cargas e aditivos em um polímero base, como é o caso nesse estudo¹¹². Assim, abaixo encontram-se as respostas das análises dos materiais em deformação do tipo torção, à temperatura de 37°C. A Figura 48 representa o módulo de armazenamento em função da frequência de oscilação.

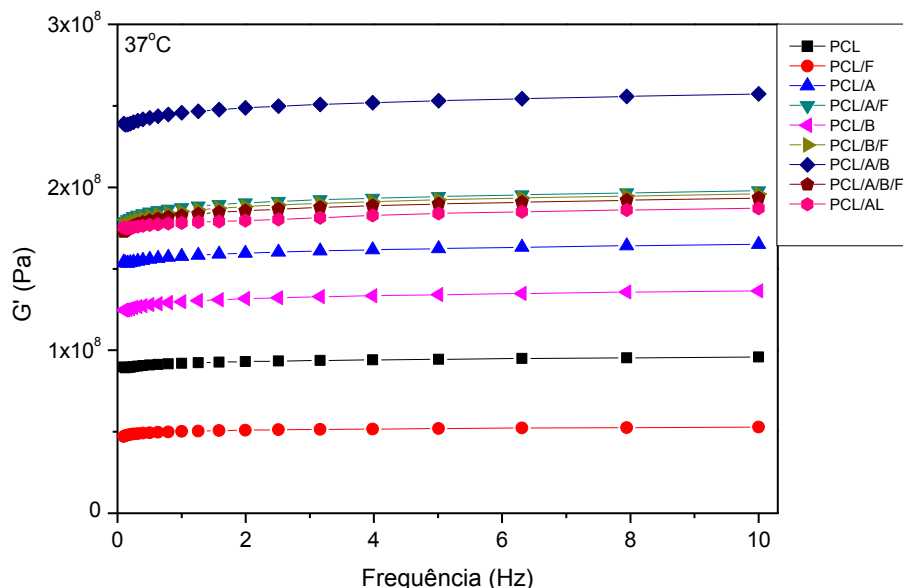


Figura 48. Curva de viscosidade de módulo de armazenamento por frequência em solicitação mecânica em torção.

A resistência mecânica dos compósitos será avaliada em comparação com os respectivos módulos de armazenamento ou elasticidade que apresentaram na solicitação da deformação do tipo torção¹¹³. Além disso, serão comparados na frequência de 1 Hz, valor esse correspondente à frequência fisiológica, a qual os tecidos ósseos são solicitados em condições normais. Os módulos elásticos ou de armazenamento dos compósitos e do polímero à essa frequência estão na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de módulos de armazenamento para a policaprolactona e as amostras.

Compósito G' (MPa)	
PCL	91,7
PCL/F	50,6
PCL/A	157,7
PCL/A/F	188,1
PCL/B	130,2
PCL/B/F	185,2
PCL/A/B	246,3
PCL/A/B/F	182,3
PCL/AL	178,7

Na literatura para solicitação do material em tração e compressão o polímero PCL apresenta módulos maiores, tais como 400 e 300 MPa respectivamente^{114; 115}. Com a solicitação em torção, o PCL apresentou módulo elástico no valor de 91,7 MPa, enquanto que todas as amostras, exceto a PCL/F, apresentaram módulos superiores.

A amostra PCL/A/B que contém biovidro e apatita com lantânio apresentou um módulo de elasticidade de 246 MPa, quase três vezes maior que a policaprolactona, sendo a amostra com maior resistência mecânica nesse caso. Nota-se que os compósitos 3 e 5 que contém apatita com lantânio e biovidro separadamente, não obtiveram tanto sucesso na análise, o que pode indicar que quando juntos, possuem uma forte interação também entre as cargas inorgânicas.

As interações PCL+FIB+La₂₀OAP, PCL+FIB+VB e PCL+FIB+La₂₀OAP+VB apresentaram comportamentos semelhantes, já que os valores de módulo de elasticidade de cada um são próximos.

A amostra PCL/F, por sua vez, não atingiu um módulo maior que o polímero base, comprovando que não foi possível a utilização da fibroína como um material de reforço nesse caso. As proporções dos materiais aqui estudados, foram calculadas a partir da porcentagem em massa de amostra, e a proteína apresenta uma densidade muito baixa. Em alguns sistemas, há uma fração volumétrica crítica que a partir desse valor o módulo tende a cair. Por necessitar de muito volume de proteína para atingir a massa descrita na amostra, uma aglomeração da fibroína pode ter diminuído a resistência mecânica do material^{116; 117}. Nas amostras em que a proteína foi adicionada em menor proporção em massa, porém na presença de apatita ou vidro bioativo, observa-se que o valor do módulo elástico foi maior que para amostras com essas fases inorgânicas separadas, apenas com o polímero. Portanto, uma massa menor da proteína, e o consequente volume menor, pode sim contribuir para o reforço da resistência mecânica dos materiais.

Os resultados da análise de torção demonstram o excelente desempenho da amostra PCL/AL, a qual apresentou resistência mecânica superior ao polímero base, com módulo de elasticidade de aproximadamente 2 vezes maior que o PCL. Além de ser luminescente e radiopaca, a apatita com nanopartículas de itérbio e érbio demonstrou boas interações com a

policaprolactona, sugerindo um material promissor para a utilização em materiais biomédicos.

Como o corpo humano, em certas situações, possui variações de temperatura, e como visto no DSC, os materiais estudados apresentam um amolecimento próximo à 40°C, é necessária a análise da resistência mecânica dos materiais nessas condições. Assim, o ensaio de torção foi realizado com uma frequência fixa de 1 Hz e variando a temperatura de 30 a 42°C. A Figura 49 demonstra o módulo G' das amostras em função da temperatura.

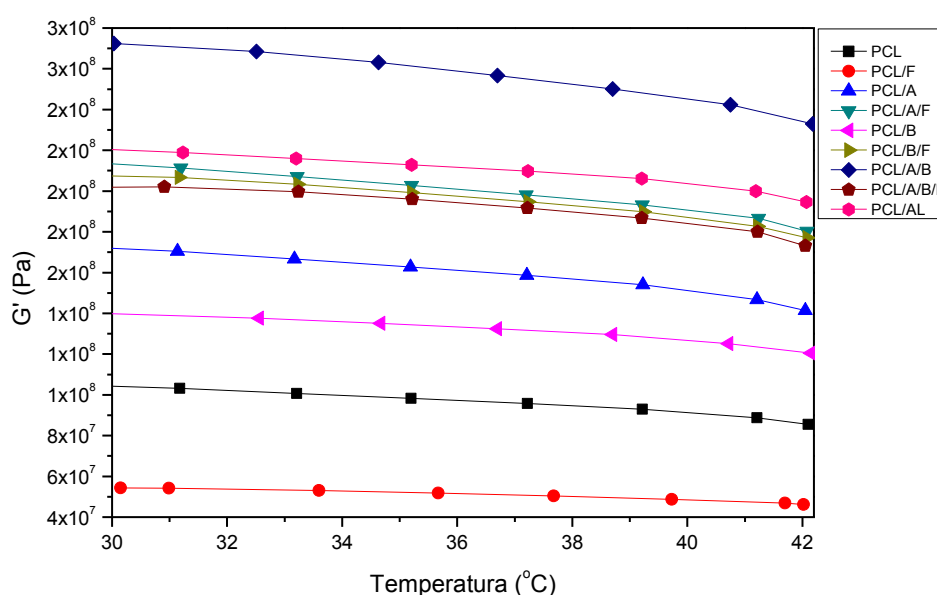


Figura 49. Curva de viscosidade de módulo de armazenamento pela temperatura em solitação mecânica em torção.

É notado pelo comportamento das curvas que os compósitos apresentaram perda de resistência mecânica com o aumento da temperatura do sistema, confirmando assim, o amolecimento visto nas análises de DSC. A Tabela 7 contém os valores do módulo de armazenamento para a temperatura de 30°C (temperatura inicial do ensaio), 42°C (temperatura final) e o total da queda de resistência mecânica em porcentagem.

Tabela 7. Valores de dos módulos de armazenamento nas temperaturas inicial e final e a porcentagem de queda da resistência mecânica durante o ensaio.

Amostra	G' 30°C	G' 42°C	 ΔG' 30 - 42°C 	% Queda 30 - 42°C
PCL	104,1	86,8	17,3	16,62
PCL/F	53,9	46,6	7,3	13,54
PCL/A	171,6	142,4	29,2	17,02
PCL/A/F	213,6	181,7	31,9	14,93
PCL/B	139,7	121,4	18,3	13,10
PCL/B/F	207,2	178	29,2	14,09
PCL/A/B	272,1	234,6	37,5	13,78
PCL/A/B/F	201,8	173,5	28,3	14,02
PCL/AL	220	195,4	24,6	11,18

Os compósitos apresentaram um amolecimento com queda de até 17% do valor inicial do módulo de elasticidade. Para a construção de estruturas 3D a partir dos materiais aqui estudados, deve-se levar em consideração as mudanças de resistência mecânica que ocorrem no intervalo de temperatura do corpo humano. Como já discutido na análise de DSC, essa queda da resistência mecânica pode contribuir para uma maior disponibilidade dos componentes inorgânicos e da fibroína para o sistema fisiológico, e o consequente aumento da bioatividade dessas espécies.

4.4.3 Análise Dinâmico Mecânica (DMA)

O complexo músculo esquelético do nosso organismo é submetido a diversas exigências mecânicas durante a vida. Os ossos podem sofrer vários tipos de carga, dentre elas a flexão¹¹⁸. Desse modo, as amostras foram ensaiadas também por análise dinâmico-mecânica em flexão, nas mesmas condições da torção. A Figura 50 representa os módulos de armazenamento (E') pela frequência de solicitação em flexão, para uma temperatura de 37°C.

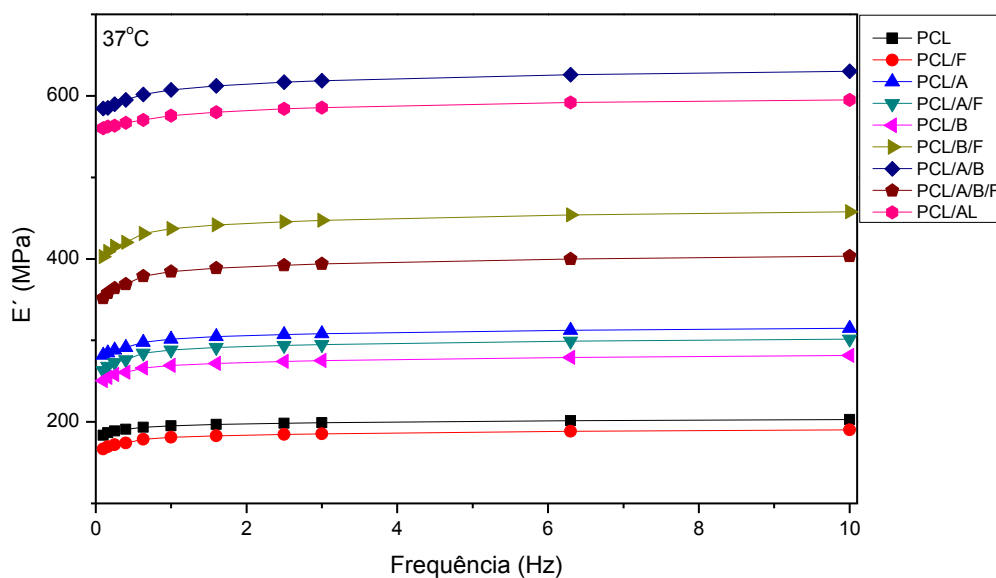


Figura 50. Curva de módulo de armazenamento em função da frequência em solicitação mecânica em flexão.

Para fins de comparação, como já mencionado anteriormente, os valores dos módulos para os compósitos e polímero à 1 Hz, encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8. Valores de módulos de armazenamento para a policaprolactona e as amostras.

Compósito	E' (MPa)
PCL	195,7
PCL/F	182
PCL/A	300,6
PCL/A/F	289,2
PCL/B	268,7
PCL/B/F	437,6
PCL/A/B	608,7
PCL/A/B/F	382,8
PCL/AL	576,8

Todos os compósitos apresentaram módulos de elasticidade maiores que o polímero base, atingindo o objetivo do trabalho. A policaprolactona

obteve um módulo de armazenamento de 196 MPa, coerentes com resultados encontrados na literatura para corpos de prova sólidos e compactos ^{115; 119}. Como já visto no ensaio de torção, a amostra PCL/F não demonstrou um bom desempenho mecânico no teste de flexão. Isso se deve à grande quantidade de volume de proteína, o qual dificultou o papel de reforço da mesma. A amostra PCL/A/B, com apatita e vidro bioativo, como já visto no ensaio de torção, apresentou excelente resistência mecânica com um valor de E' três vezes maior que o PCL. A inserção da apatita com lantânio e o vidro bioativo na policaprolactona garante uma maior resistência mecânica do material, como se observa em diversos trabalhos na literatura^{115; 120}. Como visto no ensaio acima, quando as duas fases são adicionadas juntas ao polímero, o ganho de resistência mecânica é ainda maior, o dobro das fases separadas, garantindo um material promissor para suporte com maiores cargas mecânicas.

Um grande destaque foi a amostra PCL/AL, que também demonstrou ótimo desempenho no teste de flexão. Esta apresentou um valor de módulo próximo de 3 vezes maior que o polímero, muito próximo ao da amostra PCL/A/B, evidenciando um material muito promissor para a utilização em regeneração óssea de locais com maiores cargas mecânicas, além de possuir a propriedade luminescente e radiopacidade.

4.5 Confecção dos scaffolds 3D

A amostra que apresentou maior resistência mecânica, PCL/A/B, foi impressa em uma impressora 3D para obtenção dos scaffolds, além do PCL que representa o grupo controle para próximos testes. O processamento foi realizado à 100°C e um scaffold impresso de cada vez. A estrutura impressa encontra-se na Figura 51.

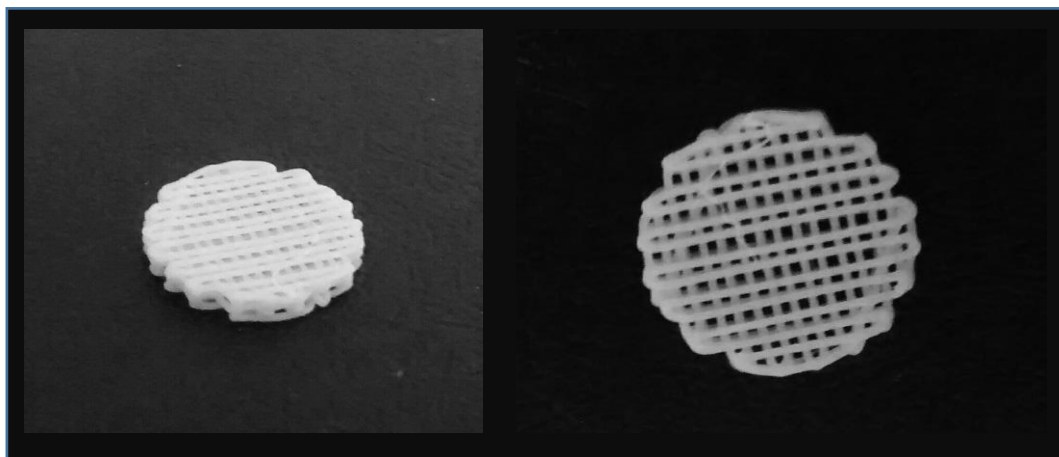


Figura 51. Imagens do scaffold da amostra PCL/A/B impresso em impressora 3D.

É possível a impressão por prototipagem rápida tanto do polímero policaprolactona como do composto com adição de apatita com lantânio e vidro bioativo.

4.6 Propriedades Ópticas – Amostra PCL/AL

A amostra PCL/AL apresenta também propriedades ópticas relacionadas aos íons lantanídeos presentes em sua composição. A avaliação dessas propriedades encontra-se na Figura 52 com os espectros de emissão (conversão ascendente) das nanopartículas $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$, da apatita $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ -Ap e do scaffold a base de PCL/ $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ -Ap obtidos sob excitação no infravermelho (980nm) com potência do laser de 800 mW, medidos à temperatura ambiente e os espectros corrigidos pela resposta instrumental.

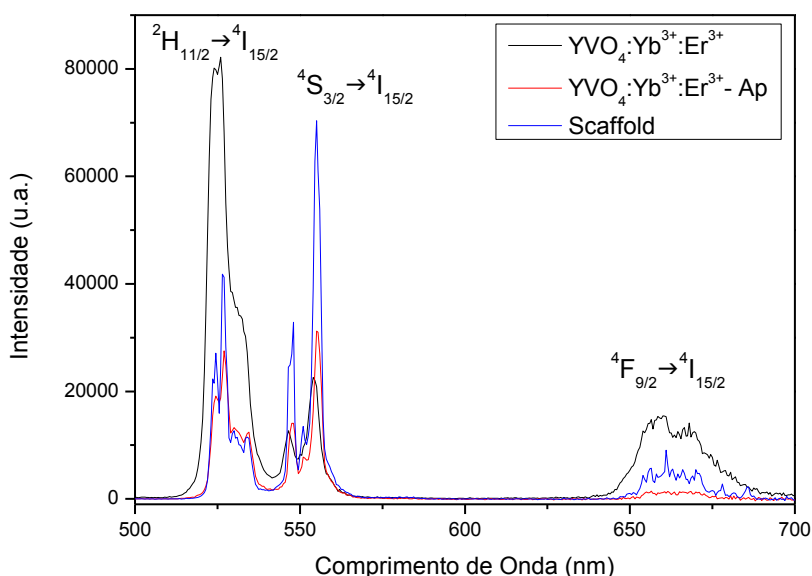


Figura 52. Espectros de Emissão com excitação em 980 nm para nanopartículas $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ (NP), apatita com $\text{YVO}_4:\text{Yb}:\text{Er}$ e scaffold (PCL/AL).

O espectro de emissão das nanopartículas, apatita e scaffold possuem picos em 525 nm, 550 nm e 660 nm, que correspondem às transições do íon Er^{3+} : $^2\text{H}_{11/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$, $^4\text{S}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ e $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$, respectivamente¹²¹. As emissões são observadas a olho nu quando as amostras são excitadas em 980 nm. Observa-se que o compósito PCL/ $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ -Ap apresentou também as emissões relativas dos íons terras raras assim como encontradas no espectro da apatita luminescente e nanopartículas, demonstrando que não houve interferência do polímero no processo de emissão das partículas.

As intensidades não podem ser comparadas entre as espécies, já que as emissões relativas a cada transição dependem de outros fatores. A evolução da luminescência do scaffold foi avaliada em função da potência do laser (Figura 54). No processo de conversão ascendente de energia (*upconversion*), a intensidade de emissão (I_{em}) é proporcional à intensidade de bombeamento (I_{ex}) de acordo com a fórmula:¹²²

$$I_{\text{em}} \propto (I_{\text{ex}})^n$$

onde “n” é o número de fótons no infravermelho absorvidos para a geração de um fóton emitido no visível, o qual pode ser obtido para inclinação da curva $\log(I_{\text{em}})$ vs $\log(I_{\text{ex}})$. O valor de “n” deve ser necessariamente um número inteiro, porém efeitos térmicos podem decrescer a inclinação para valores menores, já que a densidade de excitação é alta o suficiente para elevar a temperatura na

área irradiada, induzindo o efeito térmico, e o decrescimento do efeito de *upconversion*¹²². As curvas (I_{em}) vs $\log(I_{ex})$ para as nanopartículas, apatita e o compósito das transições no verde encontram-se nas Figuras 53 a 55 e os respectivos valores de n na tabela 9.

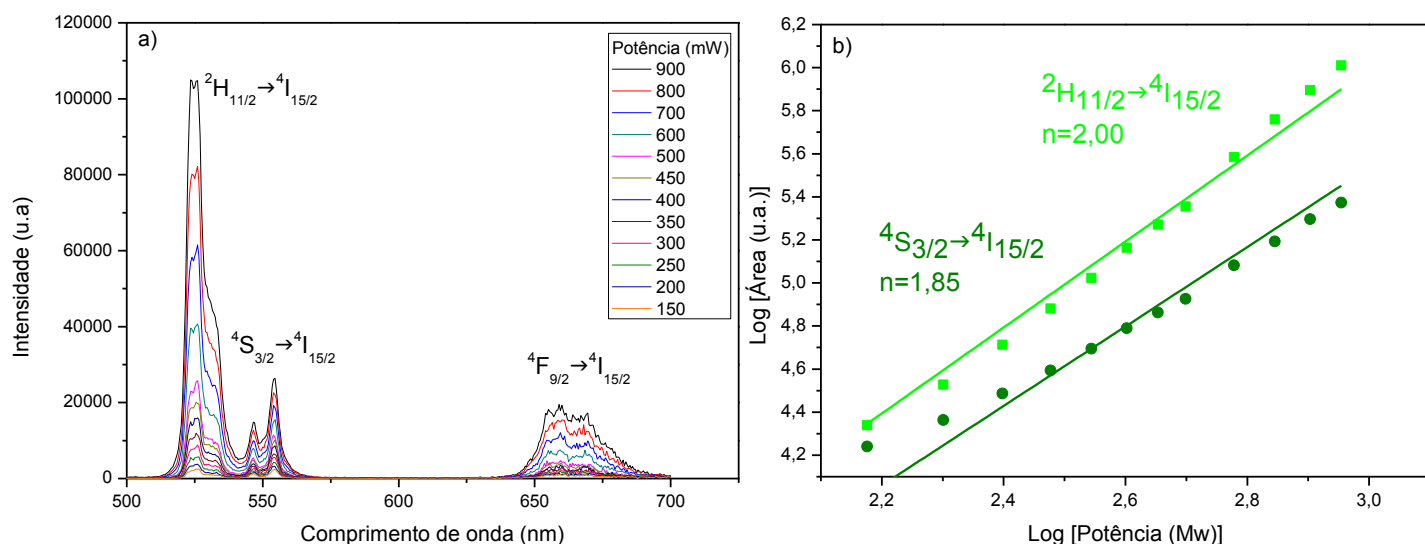


Figura 53. a) Espectros de emissão das nanopartículas de YVO4:Yb3+:Er3+ em função da potência do laser à excitação em 980 nm; b) Dependência da emissão das bandas pela potência de bombeamento.

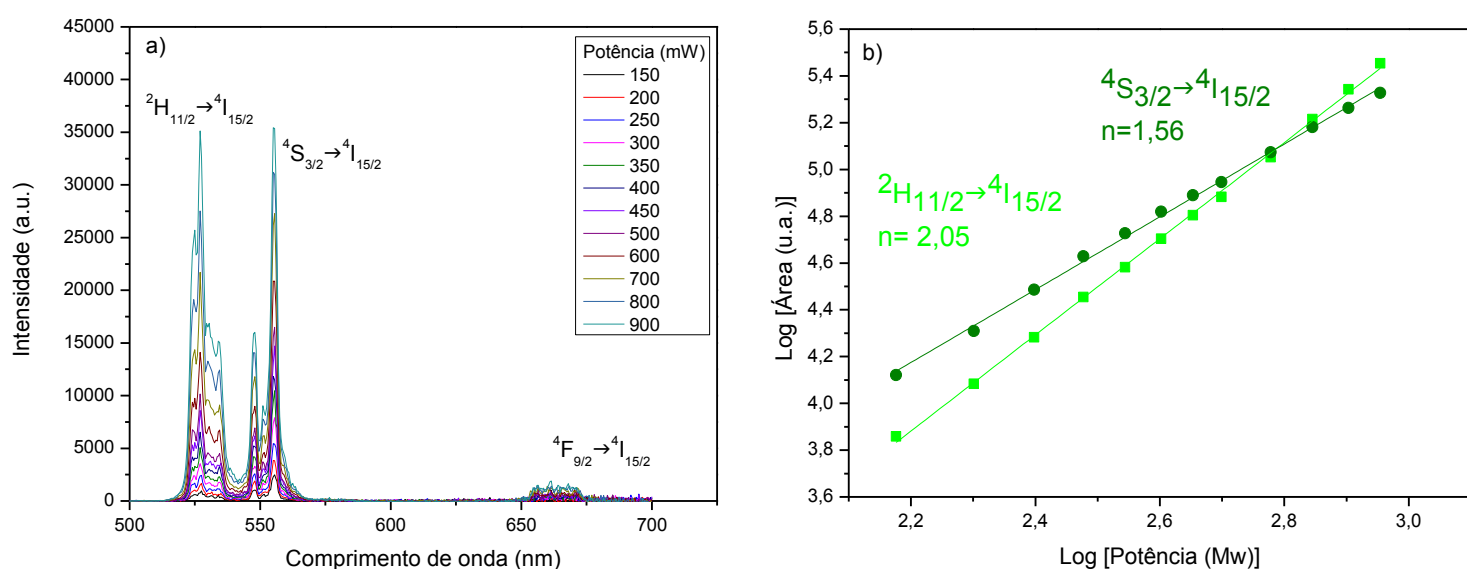


Figura 54. a) Espectros de emissão da apatita com nanopartículas de YVO4:Yb3+:Er3+ em função da potência do laser à excitação em 980 nm; b) Dependência da emissão das bandas pela potência de bombeamento.

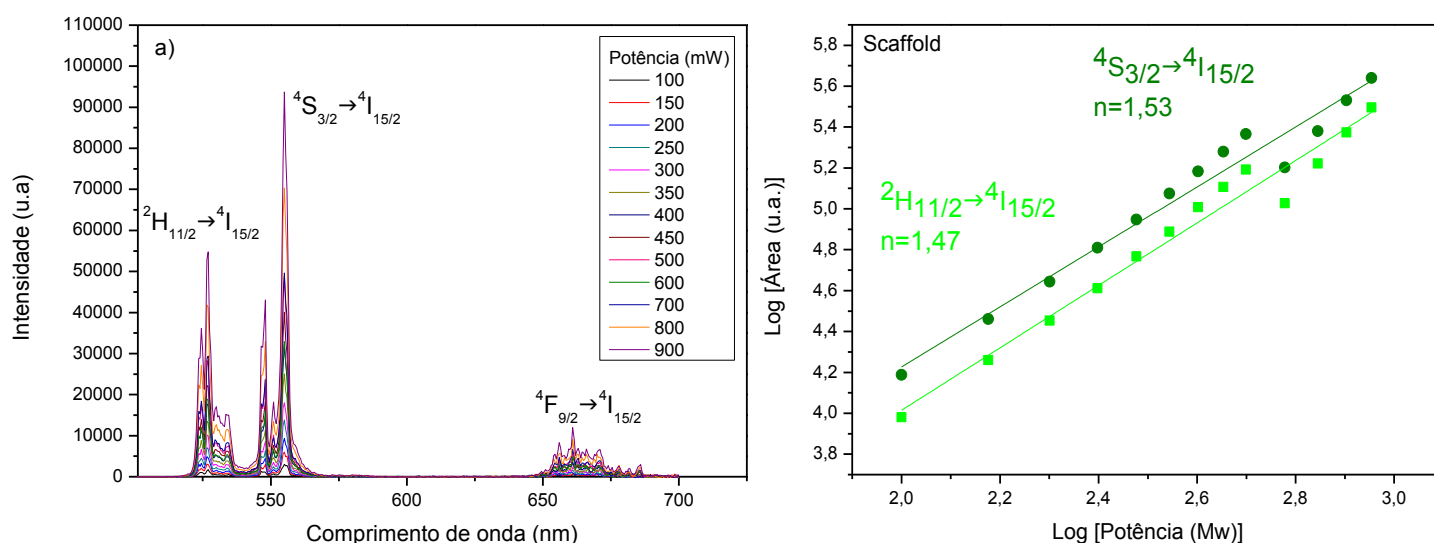


Figura 55. a) Espectros de emissão do scaffold luminescente em função da potência do laser à excitação em 980 nm; b) Dependência da emissão das bandas pela potência de bombeamento.

Tabela 9. Valores de n para nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$, apatita e scaffold luminescente.

Região de emissão (nm)	Nanopartículas	Apatita	Scaffold
525	2	2,05	1,47
550	1,95	1,56	1,53

No sistema contendo $\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$, as emissões em 525 nm ($^2\text{H}_{11/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$) e 550 nm ($^4\text{S}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$) apresentaram valores de n que indicam que dois fótons de excitação são absorvidos nestas transições na região do verde para as nanopartículas, apatita e scaffold luminescentes¹²¹. Tais dados comprovam a existência do processo de *upconversion* no sistema de compósito 9, evidenciando a possibilidade desse material ser excitado à baixa energia, com emissão de fótons de energia maiores.

Nota-se que os valores de “ n ” para as nanopartículas são superiores se comparados com a apatita e o scaffold, o que pode indicar que a matriz da

apatita e o polímero podem ter elevado o efeito térmico, decrescendo assim a inclinação na curva, ou seja, o valor de “n”. Apesar desse fato, todas as amostras apresentaram a propriedade de luminescência a olho nu quando excitadas a um laser de 980 nm.

O compósito PCL/ $\text{YVO}_4\text{:Yb}^{3+}\text{:Er}^{3+}$ -Ap foi observado em um microscópio de luminescência EVOS FL Microscope - AMG, para analisar a distribuição da fase inorgânica no material. Um scaffold confeccionado com este compósito foi excitado a 470 nm com emissão em 525 nm. A Figura 56 demonstra a emissão do verde por toda a estrutura do scaffold, demonstrando que o processo de extrusão apresenta alta eficiência na mistura e dispersão dos componentes pelo polímero, gerando assim, materiais com alta homogeneidade em sua composição.

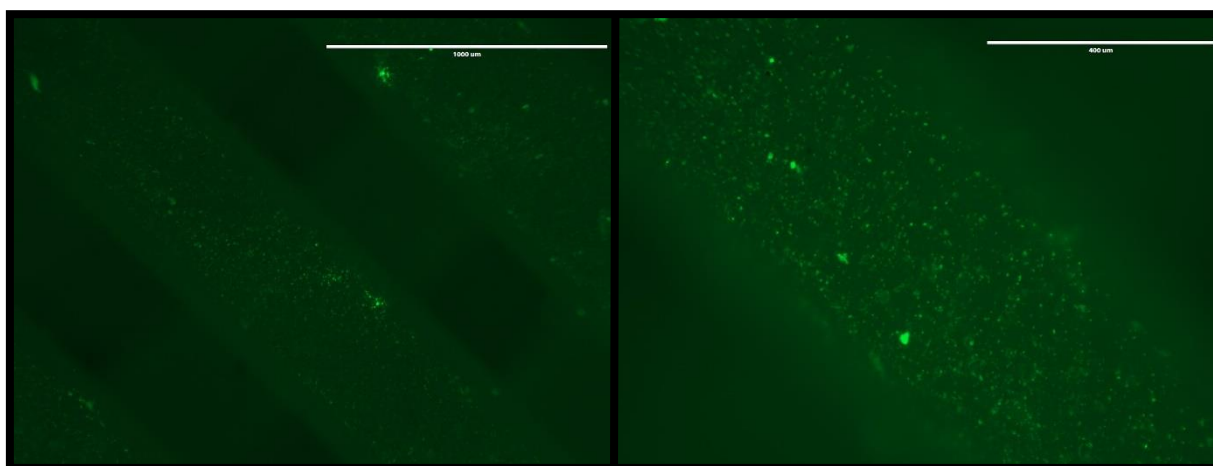


Figura 56. Imagens do Microscópio de Luminescência do compósito PCL/ $\text{YVO}_4\text{:Yb}^{3+}\text{:Er}^{3+}$ - Ap.

4.7 Análise in vitro - Proliferação Celular

As respostas obtidas e seus respectivos erros padrões encontram-se na Figura 57.

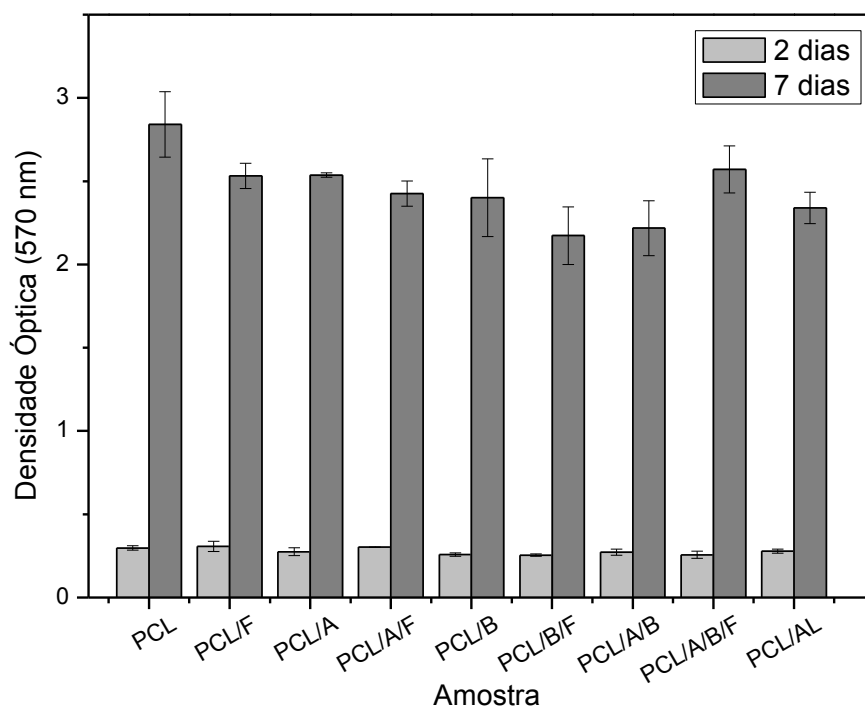


Figura 57. Valores de densidade óptica à 570 nm relativos à cada amostra para 2 e 7 dias de proliferação celular, segundo os procedimentos do teste de MTT.

Os resultados do ensaio de proliferação celular de todas as amostras avaliadas em fibroblastos humanos demonstraram que em dois dias de incubação todas as amostras apresentaram proliferação celular idênticas entre si pela avaliação estatística ANOVA (Análise de Variância) com valor de $p > 0,05$ ($p = 0,52$). Apesar de estatisticamente demonstrarem respostas iguais, é possível observar que há uma tendência de um maior desempenho dos compósitos 7 e 8, e um menor crescimento para a PCL/B/F. O restante demonstrou proliferação semelhante ao polímero base (PCL).

Após 7 dias de ensaio, todas as amostras apresentaram um perfil de crescimento celular maior que o período anterior. As respostas foram semelhantes estatisticamente para teste ANOVA apresentando $p > 0,05$ ($p = 0,1171$). Assim, como discutido para o período anterior, a tendência observada pelas curvas de proliferação indica que os compósitos 2,3,4,5,8 e 9 apresentaram crescimento semelhantes entre si, porém a uma taxa menor que

a policaprolactona. Em comparação com as demais, as amostras PCL/B/F e PCL/A/B apresentaram menor taxa de proliferação celular. Entretanto, como a amostra PCL/A/B no período de dois dias demonstrou bons resultados, duas possibilidades podem estar relacionadas ao menor crescimento celular: o sinergismo entre apatita com lantânio e vidro bioativo não favoreceu o crescimento de células, já que amostras que contenham essas fases sozinhas com o polímero, desempenharam um melhor resultado no ensaio; ou, a amostra já passou da fase de proliferação para a diferenciação celular no período de 7 dias, o que indica um resultado positivo para esse compósito. A diferença de desempenho das amostras na proliferação celular, poderão ser melhor explorados em testes mais específicos como linhagem osteoblástica ou células mesenquimais para avaliar a atividade de fosfatase alcalina e a expressão gênica de algumas proteínas ósseas (PCR-real time).

A avaliação de citotoxicidade previamente realizada no grupo de pesquisa demonstrou um alto teor tóxico das nanopartículas de $\text{YVO}_4\text{:Yb}^{3+}\text{:Er}^{3+}$. Entretanto, de acordo com os resultados aqui obtidos, a amostra PCL/AL, cuja composição encontra-se as nanopartículas, apresentou proliferação celular semelhantes às demais amostras. Tal informação remete ao fato de que a inserção das $\text{YVO}_4\text{:Yb}^{3+}\text{:Er}^{3+}$ NPS na apatita e no polímero PCL inibiu a ação tóxica dos grupos vanadato, o que é de grande valia para os estudos iniciados anteriormente. Desse modo, esse compósito, além de apresentar a propriedade luminescente, apresenta uma ótima resistência mecânica e proliferação celular promissora.

De acordo com os resultados de ângulo de contato, todas as amostras apresentaram-se hidrofóbicas, assim como a policaprolactona. Como para o crescimento e proliferação celular é necessário que um filme aquoso se forme entre a amostra e a membrana celular, os substratos devem possuir caráter mais hidrofílico. Logo, uma sugestão para melhorar o desempenho dos compósitos nesse ensaio, seria imergir as amostras em uma solução de fibroína ou de TEOS para aumentar a hidrofiliabilidade da superfície e assim, garantir o crescimento de um maior número de células, usufruindo da boa resistência mecânica que as composições apresentaram.

A fim de verificar se a estrutura influencia no crescimento celular, um ensaio de proliferação foi realizado em uma amostra de PCL e PCL/A/B na forma de scaffolds. A resposta obtida encontra-se na Figura 58.

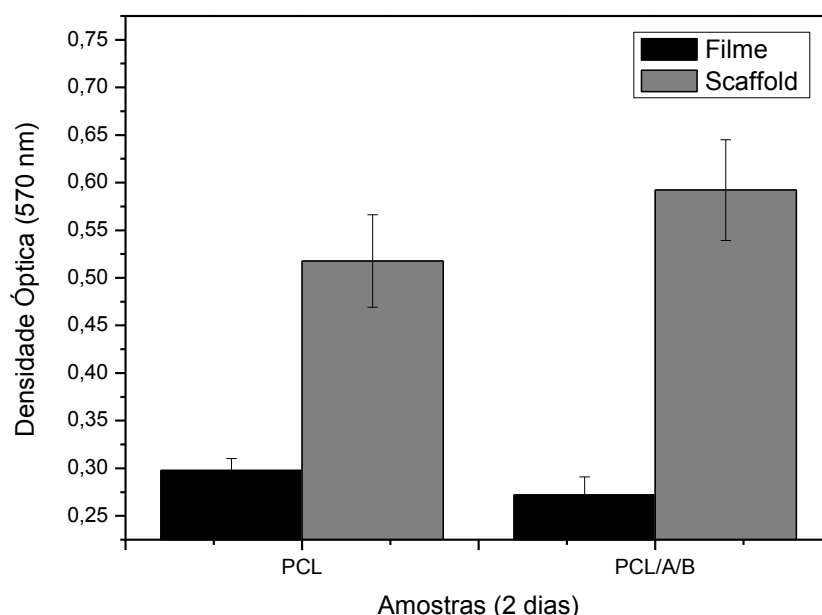


Figura 58. Valores de densidade óptica à 570 nm relativos às amostras PCL e PCL/A/B para amostras com estruturas físicas na forma de filme e de scaffold e a comparação da proliferação celular para o tempo de 2 dias de cultura.

Por meio da análise estatística pelo método de Tukey, a comparação entre a densidade óptica do filme e do scaffold apresentou diferenças: para a PCL, ou PCL puro, o valor de p encontrado foi 0,0130 ($p < 0,05$) e para a PCL/A/B, $p = 0,0060$ ($p < 0,01$). Essa diferença demonstra que houve maior crescimento celular nas amostras na forma scaffolds para o período de 2 dias, o que confirma que a estrutura influencia no resultado de proliferação, sendo que estruturas porosas nesse caso, são mais viáveis para a aplicação de regeneração tecidual que filmes finos. Desse modo, testes futuros mais específicos serão aplicados em amostras porosas com estruturas 3D (scaffolds).

Os ensaios de proliferação celular foram feitos utilizando fibroblastos humanos devido à disponibilidade do material. Posteriormente, os mesmos

testes serão realizados com uma linhagem de osteoblastos para melhor caracterizar os materiais.

4.8 Radiografia dos materiais com La_{20}OAP e $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ - Ap

Para desenvolver materiais que contenham uma fase inorgânica bioativa foi proposto desenvolver uma apatita com uma intensidade de radiopacidade superior a dos ossos compactos. Uma tendência no desenvolvimento de compósitos poliméricos, para aplicações médicas e odontológicas, tem sido torná-los radiopacos para facilitar a visualização dos mesmos em diagnósticos por imagens.

As imagens radiográficas correspondem ao exame de radiografia feito em pacientes, porém como uma simulação apenas com o material. Ao lado do compósito é colocado uma escala de radiopacidade que indica que quanto mais clara o material na imagem, mais radiopaco é.

Assim, foram obtidas as imagens radiográficas das amostras contendo apatita dopada com terras raras, as quais comprovaram que os compósitos obtidos possuem a propriedade de radiopacidade, possíveis de serem visualizados por exames de diagnósticos com raios-X e tomografia computadorizada (Figura 59). Desta forma, o profissional pode acompanhar a evolução da reparação tecidual concomitante à reabsorção do compósito, já que os polímeros são radiolúcidos aos diagnósticos por imagens.



Figura 59. Fotos radiográficas das amostras $\text{PCL}:\text{La}_{20}\text{OAP}$, $\text{PCL}:\text{La}_{20}\text{OAP}:\text{BV}$ e $\text{PCL}:\text{La}_{20}\text{OAP}:\text{BV}:\text{FB}$.

A figura 60 mostra as radiografias dos compósitos contendo La_{20}OAP , as quais confirmam que a radiopacidade do material é diretamente relacionada à concentração de apatita dopada com lantânio. Observa-se que quanto maior a concentração de La_{20}OAP nos scaffolds, maior a radiopacidade do material, a qual é induzida por íons La^{3+} . A Figura 61 mostra que a apatita $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}-\text{Ap}$ na porcentagem de 12,5 % (m/m) também promove radiopacidade ao compósito.



Figura 60. Foto radiográfica da $\text{PCL}/\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}-\text{Ap}$.

5. Conclusões

Esse trabalho visou o estudo de materiais promissores para aplicação na engenharia tecidual, que pelo contexto e a alta demanda, na área de regeneração óssea. Foi possível a avaliação da inserção de fibroína, apatita com íons lantânio, apatita com nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ e suas combinações na policaprolactona. Essa pesquisa explorou os compósitos de forma multidisciplinar ao explorar técnicas de materiais, fotônica e técnicas biológicas.

Os compósitos foram preparados a partir da extrusão, a qual garantiu uma boa distribuição de todos os componentes por todo corpo do polímero, de modo que foram obtidos materiais com alta homogeneidade em sua composição. A inserção das fases inorgânicas e da proteína não alteraram significativamente as características térmicas do polímero.

Todas as amostras, inclusive o PCL, em filamento apresentaram um amolecimento próximo à 40°C, que apesar de causar uma diminuição da resistência mecânica, pode aumentar a disponibilidade das cargas para o organismo que irá receber o implante.

A inserção de 10% em massa de fibroína no PCL não apresentou boa resistência mecânica, pois devido à baixa densidade da proteína, o grande volume necessário prejudicou a interação polímero-carga. Para as demais composições, foi possível atingir uma resistência mecânica maior que o PCL. O sinergismo entre as fases inseridas no polímero apresentou um ganho de resistência mecânica, sendo que o grande destaque foi entre vidro bioativo e apatita com lantânio que demonstrou módulo elástico quase três vezes maior que a policaprolactona.

Apesar de apresentarem o mesmo caráter hidrofóbico que a policaprolactona, os compósitos apresentaram crescimento celular promissor, porém semelhantes ao polímero base. Caso seja necessário um aumento de hidrofiliidade dos materiais, é possível a modificação da superfície com compostos mais hidrofílicos de modo a aumentar a resposta biológica. Cabe salientar, que um estudo de estrutura também foi realizado, o que indicou que a organização do material em *scaffold* favorece a proliferação celular no mesmo.

Nanopartículas luminescentes foram empregadas para a síntese de uma “apatita” e em seguida, a inserção dessa “apatita” na policaprolactona para a construção de filamentos e *scaffolds*. Os materiais apresentaram propriedades ópticas por meio do processo de *Upconversion*, o qual é possível excitar o composto com comprimentos de onda no infravermelho e emitir em região de maior energia. Além dessa característica, a amostra luminescente apresentou excelente resistência mecânica quando comparada ao polímero base. Portanto, desenvolveu-se um material multifuncional para a aplicação biomédica.

As amostras com apatita apresentaram-se radiopacas, o que no caso de serem implantadas em organismo vivo, é possível o acompanhamento do implante por exames de diagnóstico por imagem, como radiografia e tomografia.

Assim, os materiais estudados nesse trabalho apresentaram características que os fazem materiais promissores para aplicação na área de reconstrução de tecido ósseo.

6. Perspectivas

Esse trabalho será complementado pelo aprofundamento da avaliação biológica dos materiais por meios de ensaios de linhagem osteoblástica ou células mesenquimais para avaliar a atividade de fosfatase alcalina e a expressão gênica de algumas proteínas ósseas (PCR-real time). Caso seja necessário um aumento da hidrofiliabilidade das superfícies dos materiais, um filme fino de fibroína ou TEOS será depositado sobre os compósitos e novos testes biológicos serão realizados. A estrutura da “apatita” luminescente também será explorada a fim de se definir mais detalhes para esse material, que não há na literatura.

REFERÊNCIAS

- 1 CHRISTENSON, E. M. et al. Nanobiomaterial applications in orthopedics. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 25, n. 1, p. 11-22, 2007.
- 2 MOURIÑO, V.; BOCCACCINI, A. R. Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, n. 43, p. 209-227, 2010.
- 3 ZHOU, H.; LEE, J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 7, p. 2769-2781, 2011.
- 4 MANO, J. F. et al. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 4, n. 17, p. 999-1030, 2007.
- 5 OLIVEIRA, L. S. de A. F. et al. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futura. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, p. 37-44, 2010.
- 6 VON RECUM, A. F.; LABERGE, M. Educational goals for biomaterials science and engineering: perspective view. **Journal of Applied Biomaterials**, v. 6, p. 137-144, 1995.
- 7 HENCH, L. L. The challenge of orthopaedic materials. **Current Orthopaedics**, v. 14, n. 1, p. 7-15, 2000.
- 8 BASU, B.; NATH, S. Fundamentals of biomaterials and biocompatibility. In: BASU, B. K., KATTI, D. S.; KUMAR, A. (Ed.). **Advanced biomaterials: fundamentals, processing and applications**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2009. Chap. 1, p. 3-18.
- 9 WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, n. 20, p. 2941-2953, 2008.
- 10 PARK, J. B. ; BRONZINO, J. D. (Ed.). **Biomaterials: principles and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2002. 250 p.
- 11 LANZA, R. P.; LANGER, R.; VACANTI, J. (Ed.). **Principles of tissue engineering**. 2nd ed. San Diego: Academic, 2000. 995 p.
- 12 CARDOSO, G. B. C. et al. Scaffolds of poly (ϵ -caprolactone) with whiskers of hydroxyapatite. **Journal of Materials Science**, v. 45, n. 18, p. 4990-4993, 2010.
- 13 LI, Y. S. et al. Cells and materials for liver tissue engineering. **Cell Transplantation**, v. 22, n. 4, p. 685-700, 2013.

- 14 KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v. 26, n. 27, p. 5474-5491, 2005.
- 15 VERSACE, D.-L. et al. Natural biopolymer surface of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)-photoinduced modification with triarylsulfonium salts. **Green Chemistry**, v. 14, n. 3, p. 788-798, 2012.
- 16 SIGMA-ALDRICH. **Polycaprolactone**. 2015. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/704105?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 12 ago. 2014.
- 17 WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer-polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 10, p. 1217-1256, 2010.
- 18 MEI, N. et al. Biocompatibility of Poly(epsilon-caprolactone) scaffold modified by chitosan-the fibroblasts proliferation in vitro. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 19, n. 4, p. 323-339, 2005.
- 19 DONOGHUE, P. S. et al. The development of a ϵ -polycaprolactone scaffold for central nervous system repair. **Tissue Engineering Part A**, v. 19, n. 3/4, p. 497-507, 2013.
- 20 YEONG, W. Y. et al. Porous polycaprolactone scaffold for cardiac tissue engineering fabricated by selective laser sintering. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 6, p. 2028-2034, 2010.
- 21 CHEN, M. et al. Fabrication and characterization of a rapid prototyped tissue engineering scaffold with embedded multicomponent matrix for controlled drug release. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 4285-4297, 2012.
- 22 LAKES, R. S. Composite biomaterials. In: PARK, J. B.; BRONZINO, J. D. (Ed.). **Biomaterials: principles and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2000. Chap. 4, p. 79-93.
- 23 HEO, S. J. et al. Fabrication and characterization of novel nano- and micro-HA/PCL composite scaffolds using a modified rapid prototyping process. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 89A, n. 1, p. 108-116, 2009.
- 24 LEI, B. et al. Sol-gel derived nanoscale bioactive glass (NBG) particles reinforced poly(ϵ -caprolactone) composites for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 3, p. 1102-1108, 2013.
- 25 LEE, H.; JANG, C. H.; KIM, G. H. A polycaprolactone/silk-fibroin nanofibrous composite combined with human umbilical cord serum for subacute tympanic membrane perforation; an in vitro and in vivo study. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 18, p. 2703-2713, 2014.

- 26 ZHANG, J. et al. 3D-printed magnetic Fe₃O₄/MBG/PCL composite scaffolds with multifunctionality of bone regeneration, local anticancer drug delivery and hyperthermia. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 43, p. 7583-7595, 2014.
- 27 VEPARI, C.; KAPLAN, D. L. Silk as a biomaterial. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8/9, p. 991-1007, 2007.
- 28 NELSON, D. L.; COX, M. M. Aminoácidos, peptídeos e proteínas. In: _____. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. Cap. 3, p. 71-112.
- 29 SILVA, S. S. et al. The use of ionic liquids in the processing of chitosan/silk hydrogels for biomedical applications. **Green Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 1463-1470, 2012.
- 30 MAKAYA, K. et al. Comparative study of silk fibroin porous scaffolds derived from salt/water and sucrose/hexafluoroisopropanol in cartilage formation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 108, n. 1, p. 68-75, 2009.
- 31 PARK, S. Y. et al. Electrospun silk fibroin scaffolds with macropores for bone regeneration: an in vitro and in vivo study. **Tissue Engineering Part A**, v. 16, n. 4, p. 1271-1279, 2010.
- 32 MING, J.; ZUO, B. A novel electrospun silk fibroin/hydroxyapatite hybrid nanofibers. **Materials Chemistry and Physics**, v. 137, n. 1, p. 421-427, 2012.
- 33 CAO, H. et al. Fabrication of an alternative regenerated silk fibroin nanofiber and carbonated hydroxyapatite multilayered composite via layer-by-layer. **Journal of Materials Science**, v. 48, n. 1, p. 150-155, 2013.
- 34 ANDIAPPAN, M. et al. Electrospun eri silk fibroin scaffold coated with hydroxyapatite for bone tissue engineering applications. **Progress in Biomaterials**, v. 2, n. 6, 2013. Disponível em:
<http://download.springer.com/static/pdf/92/art%253A10.1186%252F2194-0517-2-0517-2-6.pdf?auth66=1427121558_b19fd16b0bd64b5bc466804f14906aab&ext=.pdf>.
Acesso em: 23 mar. 2015.
- 35 LEI, B. et al. Bioactive glass microspheres as reinforcement for improving the mechanical properties and biological performance of poly (ε-caprolactone) polymer for bone tissue regeneration. **Society of Biomaterials**, v. 100B, n. 4, p. 967-975, 2012.
- 36 JI, L. et al. Progress of three-dimensional macroporous bioactive glass for bone regeneration. **Frontiers of Chemical Science and Engineering**, v. 6, n. 4, p. 470-483, 2012.

- 37 ALLO, B. A.; RIZKALLA, A. S.; MEQUANINT, K. Synthesis and electrospinning of ϵ -polycaprolactone-bioactive glass hybrid biomaterials via a sol-gel process. **American Chemical Society**, v. 26, n. 13, p. 18340-18348, 2010.
- 38 PARK, S. A.; LEE, S. H.; KIM, W. D. Fabrication of porous polycaprolactone/hydroxyapatite (PCL/HA) blend scaffolds using a 3D plotting system for bone tissue engineering. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 4, p. 505-513, 2011.
- 39 GMATI, N. et al. Mechanochemical synthesis and ionic conductivity of lanthanum phosphosilicate oxyapatites. **Comptes Rendus Chimie**, v. 17, n. 9, p. 920-926, 2014.
- 40 GUO, D. G. et al. Characterization, physicochemical properties and biocompatibility of La-incorporated apatites. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 9, p. 3512-3523, 2009.
- 41 AKKOUCH, A.; ZHANG, Z.; ROUABHIA, M. A novel collagen/hydroxyapatite/poly(lactide-co- ϵ -caprolactone) biodegradable and bioactive 3D porous scaffold for bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 96, n. 4, p. 693-704, 2011.
- 42 GUO, F. et al. Lanthanum chloride inhibiting expression of inducible nitric oxide synthase in RAW264.7 macrophages induced by lipopolysaccharide. **Journal of Rare Earths**, v. 25, n. 3, p. 359-363, 2007.
- 43 HUTCHISON, A. J. et al. Long-term efficacy and safety profile of lanthanum carbonate: results for up to 6 years of treatment. **Nephron Clinical Practice**, v. 110, n. 1, p. 15-23, 2008.
- 44 HUTCHISON, A. J. et al. Lanthanum carbonate versus placebo for management of hyperphosphatemia in patients undergoing peritoneal dialysis: a subgroup analysis of a phase 2 randomized controlled study of dialysis patients. **BMC Nephrology**, v. 14, n. 40, 2013. doi:10.1186/1471-2369-14-40.
- 45 SHIGEMATSU, T. Multicenter prospective randomized, double-blind comparative study between lanthanum carbonate and calcium carbonate as phosphate binders in Japanese hemodialysis patients with hyperphosphatemia. **Clinical Nephrology**, v. 70, n. 5, p. 404-410, 2008.
- 46 SHASTEEN, C. et al. Biodegradable internal fixation plates enabled with X-ray visibility by a radiopaque layer of β -tricalcium phosphate and poly (lactic-co-glycolic acid). **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 101, n. 2, p. 320-329, 2013.
- 47 HE, J. et al. Incorporation of an antibacterial and radiopaque monomer in to dental resin system. **Dental Materials**, v. 28, n. 8, p. 110-117, 2012.

- 48 KIRAN, S. et al. Polyurethane thermoplastic elastomers with inherent radiopacity for biomedical applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 100, n. 12, p. 3472-3479, 2012.
- 49 NORDBACK, I. et al. A novel radiopaque biodegradable stent for pancreatobiliary applications--the first human phase I trial in the pancreas. **Pancreatology**, v. 12, n. 3, p. 264-271, 2012.
- 50 SANG, L. et al. Biodegradable radiopaque iodinated poly(ester urethane)s containing poly(ϵ -caprolactone) blocks: synthesis, characterization, and biocompatibility. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 102, n. 4, p. 1121-1130, 2014.
- 51 ERGUN, C.; LIU, H.; WEBSTER, T. J. Osteoblast adhesion on novel machinable calcium phosphate/lanthanum phosphate composites for orthopedic applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 89, n. 3, p. 727-733, 2009.
- 52 MEDRI, V.; MAZZOCCHI, M.; BELLOSI, A. Doped calcium-aluminium-phosphate cements for biomedical applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, n. 2, p. 229-236, 2011.
- 53 SERRET, A.; CABAÑAS, M. V.; VALLET-REGÍ, M. Stabilization of calcium oxyapatites with lanthanum (III) -created anionic vacancies. **Chemistry of Materials**, v. 12, p. 3836-3841, 2000.
- 54 WANG, S.; WANG, L. Lanthanide-doped nanomaterials for luminescence detection and imaging. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 62, p. 123-134, 2014.
- 55 SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. **Inorganic chemistry**. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press, 1999. 763 p.
- 56 DOANE, T. L.; BURDA, C. The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2885-2911, 2012.
- 57 PRASAD, P. N. Fundamentals of nanobiophotonics. In: DUBOWSKI, J. J.; TANEV, S. (Ed.). **Photon-based nanoscience and nanobiotechnology**. Dordrecht: Springer, 2006. p. 55-65. (Serie II: mathematics, physics and chemistry, v. 239).
- 58 DaCOSTA, M. V. et al. Lanthanide upconversion nanoparticles and applications in bioassays and bioimaging: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 832, p. 1-33, 2014.
- 59 HAMBLIN, M. R.; DEMIDOVA, T. N. Mechanisms of low level light therapy. In: HAMBLIN, M. R.; WAYNANT, R. W.; ANDERS, J. (Ed.). **Mechanisms for low-light therapy**. Bellingham: SPIE, 2006. p. 614001/1-614001/12. (Proceedings of SPIE, v. 6140).

- 60 CHENG, L.; WANG, C.; LIU, Z. Upconversion nanoparticles and their composite nanostructures for biomedical imaging and cancer therapy. **Nanoscale**, v. 5, p. 23-37, 2013.
- 61 LIU, Q.; FENG, W.; LI, F. Y. Water-soluble lanthanide upconversion nanophosphors: synthesis and bioimaging applications in vivo. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 273, p. 100-110, 2014.
- 62 WANG, M. et al. Upconversion nanoparticles: synthesis, surface modification and biological applications. **Nanomedicine**, v. 7, n. 6, p. 710-729, 2011.
- 63 FUKUMORI, Y.; ICHIKAWA, H. Nanoparticles for cancer therapy and diagnosis. **Advanced Powder Technology**, v. 17, n. 1, p. 1-28, 2006.
- 64 MINELLI, C.; LOWE, S. B.; STEVENS, M. M. Engineering nanocomposite materials for cancer therapy. **Small**, v. 6, n. 21, p. 2336-2357, 2010.
- 65 CELLI, J. P. et al. Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization. **Chemical Reviews**, v. 110, p. 2795-2838, 2010.
- 66 KIM, J.; PIAO, Y.; HYEON, T. Multifunctional nanostructured materials for multimodal imaging, and simultaneous imaging and therapy. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 372-390, 2009.
- 67 WANG, C.; CHENG, L.; LIU, Z. Drug delivery with upconversion nanoparticles for multi-functional targeted cancer cell imaging and therapy. **Biomaterials**, v. 32, p. 1110-1120, 2011.
- 68 GUO, H. et al. Singlet oxygen-induced apoptosis of cancer cells using upconversion fluorescent nanoparticles as a carrier of photosensitizer. **Nanomedicine**, v. 6, p. 486-495, 2010.
- 69 BECHET, D. et al. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 612-621, 2008.
- 70 ZHANG, P. et al. Versatile photosensitizers for photodynamic therapy at infrared excitation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, p. 4526-4527, 2007.
- 71 PARK, S. et al. 3D polycaprolactone scaffolds with controlled pore structure using a rapid prototyping system. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 1, p. 229-234, 2009.
- 72 WANG, X.; YAN, Y.; ZHANG, R. Rapid prototyping as a tool for manufacturing bioartificial livers. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 505-513, 2007.

- 73 CENTRO DE TECNOLOGIA DA INFORMAÇÃO RENATO ARCHER. **ProMed-DT3D**. Disponível em: <<http://www.cti.gov.br/component/content/article?id=746>>. Acesso em: 14 fev. 2015.
- 74 WANG, J. et al. Three-dimensional printing of tissue phantoms for biophotonic imaging. **Optics Letters**, v. 39, n. 10, p. 3010-3013, 2014.
- 75 KALITA, S. J. et al. Development of controlled porosity polymer-ceramic composite scaffolds via fused deposition modeling. **Materials Science & Engineering C: Biomimetic and Supramolecular Systems**, v. 23, n. 5, p. 611-620, 2003.
- 76 ROCKWOOD, D. N. et al. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. **Nature Protocols**, v. 6, n. 10, p. 1612-1631, 2011.
- 77 NOGUEIRA, G. M. **Hidrogéis e filmes de fibroína de seda para fabricação ou recobrimento de biomateriais**. 2009. 137 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- 78 NIGOGHOSSIAN, K. et al. Infrared to visible up-conversion in biocellulose-yttrium vanadate nanoparticles composite membranes. Demonstration of chloroaluminum phthalocyanine light emission under upconverted light excitation. **Colloid and Interface Science Communications**, v. 2, p. 6-10, 2014.
- 79 BARKER, M. G.; HOOPER, A. J. Preparation and X-ray powder diffraction patterns of the sodium vanadates NaVO_3 , $\text{Na}_4\text{V}_2\text{O}_7$, and Na_3VO_4 . **Journal of the Chemical Society: Dalton Transactions**, n. 15, p. 1513-1517, 1973.
- 80 GIAUME, D. et al. Emission properties and applications of nanostructured luminescent oxide nanoparticles. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 33, p. 99-106, 2005.
- 81 MALONE, E.; LIPSON, H. Fab@Home: the personal desktop fabricator kit. **Rapid Prototyping Journal**, v. 13, p. 245-255, 2007.
- 82 SENEDESE, A. L. C. et al. Additive manufacturing to build polycaprolactone scaffolds. In: BRAZILIAN CONFERENCE ON MANUFACTURING ENGINEERING, 6., 2011, Caxias do Sul. [Rio de Janeiro]: [ABCM], 2011.
- 83 CANBOLAT, M. F.; CELEBIOGLU, A.; UYAR, T. Drug delivery system based on cyclodextrin-naproxen inclusion complex incorporated in electrospun polycaprolactone nanofibers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 115, p. 15-21, 2013.
- 84 LING, S. et al. Synchrotron FTIR microspectroscopy of single natural silk fibers. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 9, p. 3344-3349, 2011.

- 85 LU, Q. et al. Degradation mechanism and control of silk fibroin. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 4, p. 1080-1086, 2011.
- 86 ZHU, H. et al. Fabrication and characterization of silk fibroin/bioactive glass composite films. **Materials Science & Engineering C: Materials for Biological Applications**, v. 32, n. 4, p. 822-829, 2012.
- 87 CAO, Y.; WANG, B. Biodegradation of silk biomaterials. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 4, p. 1514-1524, 2009.
- 88 SHEIKH, F. A. et al. A novel approach to fabricate silk nanofibers containing hydroxyapatite nanoparticles using a three-way stopcock connector. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, 2013. doi: 10.1186/1556-276X-8-303.
- 89 SERRET, A.; CABANAS, M. V.; VALLET-REGI, M. Stabilization of calcium oxyapatites with lanthanum(III)-created anionic vacancies. **Chemistry of Materials**, v. 12, n. 12, p. 3836-3841, 2000.
- 90 FOWLER, B. Infrared studies of apatites. I. Vibrational assignments for calcium, strontium, and barium hydroxyapatites utilizing isotopic substitution. **Inorganic Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 194-207, 1974.
- 91 SILVA, V. V.; LAMEIRAS, F. S. Synthesis and characterization of composite powders of partially stabilized zirconia and hydroxyapatite. **Materials Characterization**, v. 45, n. 1, p. 51-59, 2000.
- 92 RAJABZADEH, G. et al. Enhancing glass ionomer cement features by using the HA/YSZ nanocomposite: a feed forward neural network modelling. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 29, p. 317-327, 2014.
- 93 CIMINO, N. et al. XPS and IR studies of transparent InVO_4 films upon Li charge-discharge reactions. **Solid State Ionics**, v. 165, n. 1/4, p. 89-96, 2003.
- 94 WU, C. T.; CHANG, J. Mesoporous bioactive glasses: structure characteristics, drug/growth factor delivery and bone regeneration application. **Interface Focus**, v. 2, n. 3, p. 292-306, 2012.
- 95 OLIVEIRA, A. A. R. de et al. Development of biodegradable polyurethane and bioactive glass nanoparticles scaffolds for bone tissue engineering applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 100B, n. 5, p. 1387-1396, 2012.
- 96 MAEDA, H.; NAKANO, Y.; KASUGA, T. Preparation of CaO-SiO_2 glass-ceramic spheres by electrospraying combined with sol-gel method. **Journal of Nanomaterials**, v. 2013, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/463048>>. Acesso em: 23 mar. 2015.

- 97 SCHERRER, P. Bestimmung der Größe und der inneren Struktur von Kolloidteilchen mittels Röntgenstrahlen. **Nachrichten von der Gesellschaft der Wissenschaften zu Göttingen**, v. 26, p. 98-100, 1918.
- 98 ELZUBAIR, A. et al. The physical characterization of a thermoplastic polymer for endodontic obturation. **Journal of Dentistry**, v. 34, n. 10, p. 784-789, 2006.
- 99 COCK, F. et al. Thermal, rheological and microstructural characterisation of commercial biodegradable polyesters. **Polymer Testing**, v. 32, n. 4, p. 716-723, 2013.
- 100 BANNACH, G. et al. Efeitos da história térmica nas propriedades do polímero PET: um experimento para ensino de análise térmica. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1825-1829, 2011.
- 101 CANEVAROLO JÚNIOR, S. V. **Ciência dos polímeros**: um texto básico para tecnólogos e engenheiros. 2. ed. São Paulo: Artliber, 2006. 277 p.
- 102 MAHESHWARI, S. U.; SAMUEL, V. K.; NAGIAH, N. Fabrication and evaluation of (PVA/HAp/PCL) bilayer composites as potential scaffolds for bone tissue regeneration application. **Ceramics International**, v. 40, n. 6, p. 8469-8477, 2014.
- 103 SHOKROLLAHI, P. et al. Effect of interface on mechanical properties and biodegradation of PCL HAp supramolecular nano-composites. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, n. 1, p. 23-35, 2014.
- 104 BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. de R. Effect of Salt Leaching on PCL and PLGA(50/50) resorbable Scaffolds. **Materials Research**, v. 11, n. 1, p. 75-80, 2008.
- 105 CHEN, J.-P.; CHANG, Y.-S. Preparation and characterization of composite nanofibers of polycaprolactone and nanohydroxyapatite for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, n. 1, p. 169-175, 2011.
- 106 HE, J. X. et al. Preparation and characterization of biomimetic tussah silk fibroin/chitosan composite nanofibers. **Iranian Polymer Journal**, v. 22, n. 7, p. 537-547, 2013.
- 107 DARMANIN, T.; GUITTARD, F. Recent advances in the potential applications of bioinspired superhydrophobic materials. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 2, n. 39, p. 16319-16359, 2014.
- 108 CHENG, Y. T. et al. Microscopic observations of condensation of water on lotus leaves. **Applied Physics Letters**, v. 87, n. 19, p. 194112/1-194112/3, 2005.

- 109 ENSIKAT, H. J. et al. Superhydrophobicity in perfection: the outstanding properties of the lotus leaf. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 2, p. 152-161, 2011.
- 110 BRETAS, R. E. S.; DÁVILA, M. A. **Reologia de polímeros fundidos**. São Carlos: EdUFSCar, 2005.
- 111 BRETAS, R. E. S.; SCURACCHIO, C. H. L. A. Reometria de placas paralelas e cone-placa. In: CANEVAROLO JÚNIOR, S. V. (Ed.). **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2003. p. 385-404.
- 112 CANTO, L. B.; PESSAN, L. A. Resistência à tração, flexão e compressão. In: CANEVAROLO JÚNIOR, S. V. (Ed.). **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2003. p. 341-360.
- 113 PASSADOR, F. R.; PESSAN, L. A.; RODOLFO JÚNIOR, A. PVC/NBR blends by reactive processing II: physical-mechanical and morphological characterization. **Polimeros: Ciencia e Tecnologia**, v. 18, n. 2, p. 87-91, 2008.
- 114 SHOR, L. et al. Fabrication of three-dimensional polycaprolactone/hydroxyapatite tissue scaffolds and osteoblast-scaffold interactions in vitro. **Biomaterials**, v. 28, n. 35, p. 5291-5297, 2007.
- 115 ESHRAGHI, S.; DAS, S. Micromechanical finite-element modeling and experimental characterization of the compressive mechanical properties of polycaprolactone-hydroxyapatite composite scaffolds prepared by selective laser sintering for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 8, p. 3138-3143, 2012.
- 116 WANG, L. et al. Mechanical properties and microstructure of polyetheretherketone-hydroxyapatite nanocomposite materials. **Materials Letters**, v. 64, n. 20, p. 2201-2204, 2010.
- 117 KURTZ, S. M.; DEVINE, J. N. PEEK biomaterials in trauma, orthopedic, and spinal implants. **Biomaterials**, v. 28, n. 32, p. 4845-4869, 2007.
- 118 VAL, F. F. de A. et al. Effects of high-impact exercise training on bone mechanical proprieties - an experimental study in female wistar rats. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 19, n. 4, p. 252-255, 2013.
- 119 CAMPOS, A. de et al. Effect of fiber treatments on properties of thermoplastic starch/polycaprolactone/sisal biocomposites. **Polimeros: Ciência e Tecnologia**, v. 21, n. 3, p. 217-222, 2011.
- 120 TAMJID, E. et al. Effect of particle size on the in vitro bioactivity, hydrophilicity and mechanical properties of bioactive glass-reinforced polycaprolactone composites. **Materials Science & Engineering C: Materials for Biological Applications**, v. 31, n. 7, p. 1526-1533, 2011.

121 MIALON, G. et al. High up-conversion efficiency of $\text{YVO}_4\text{:Yb,Er}$ nanoparticles in water down to the single-particle level. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 51, p. 22449-22454, 2010.

122 BAI, X. et al. Size-dependent upconversion luminescence in $\text{Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$ -codoped nanocrystalline yttria: saturation and thermal effects. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 36, p. 13611-13617, 2007.