



Daniela Faria Gomes

**Compósitos de PCL e vidro bioativo: estudo do
comportamento *in vitro***



Daniela Faria Gomes Compósitos de PCL e vidro bioativo: estudo do comportamento *in vitro*

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais e Dispositivos Biomédicos, realizada sob a orientação científica do Doutor José Martinho Marques de Oliveira, Professor Coordenador da Escola Superior Aveiro Norte da Universidade de Aveiro, e da Doutora Maria Helena Figueira Vaz Fernandes, Professora Associada, do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais.

o júri

presidente

Prof. Doutor José Maria da Fonte Ferreira

Professor associado com agregação da Universidade de Aveiro

Doutora Bárbara Joana Martins Leite Ferreira

Estagiária de pós-doutoramento da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor José Martinho Marques de Oliveira

Professor coordenador da Escola Superior Aveiro Norte da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Em primeiro lugar queria agradecer aos meus orientadores Professor José Martinho Marques de Oliveira e Professora Maria Helena Vaz Figueira Fernandes pelo apoio ao longo deste trabalho, pelo incentivo e pela confiança que depositaram em mim no decorrer deste projeto. Obrigada por todos os ensinamentos e por toda a disponibilidade demonstrada.

Aos colegas do *BioLab* pelo apoio incondicional, pelos conhecimentos que me transmitiram, pela amizade e pela ajuda em momentos difíceis. À Erika Davim pelo apoio incansável ao longo deste trabalho, pelo acolhimento e pela amizade demonstrada. À Nathalie Barroca pelo carinho, preocupação e amizade demonstrada durante a realização deste trabalho.

Um agradecimento a todos os meus colegas de mestrado, especialmente à Ana Filipa Correia e à Ângela Semitela por todos os momentos de descontração, pela força, pela amizade e pela constante disponibilidade.

À Filipa Pires pelos momentos únicos partilhados, pela amizade e pelo suporte.

A todos os técnicos do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica pela sua ajuda na elaboração deste projeto. Um agradecimento especial à Engenheira Marta Ferro e à Engenheira Ana Sofia Ribeiro.

Queria agradecer aos meus pais e ao meu irmão pelo apoio, compreensão e paciência demonstrados.

A toda a minha família e a todos os meus amigos que me acompanharam na realização deste trabalho.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a conclusão desta etapa e não são aqui referidas.

palavras-chave

Compósito, vidro bioativo, policaprolactona, bioatividade.

resumo

Na regeneração do tecido ósseo torna-se cada vez mais frequente o recurso a materiais capazes de interagir com o organismo, através de um conjunto de respostas específicas que conduzem à formação de novo tecido ósseo. Neste contexto, os compósitos de matriz polimérica com enchimento bioativo têm sido objeto de investigação recente pois combinam as vantagens destes dois tipos de materiais, para as aplicações pretendidas.

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver compósitos de vidro bioativo e policaprolactona (PCL) e estudo do seu comportamento em meio acelular (*in vitro*). Quando utilizados separadamente em aplicações biomédicas, estes materiais têm revelado características promissoras. No entanto, as propriedades de compósitos de matriz de PCL reforçado com vidro bioativo ainda não estão totalmente esclarecidas.

O vidro em estudo pertence ao sistema $3\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-MgO}$, identificado em estudos anteriores, como possuindo características bioativas. O PCL foi escolhido por ser um polímero sintético biocompatível, biodegradável e aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA).

Os compósitos foram preparados por duas técnicas distintas: extrusão e evaporação do solvente.

Estudaram-se algumas variáveis de processamento, nomeadamente: a fração de partículas vítreas, o tamanho de partículas do enchimento, fração de partículas vítreas e respetiva distribuição granulométrica.

O comportamento destes compósitos em meio fisiológico simulado indica um elevado potencial bioativo, manifestado através da formação de uma camada de fosfato de cálcio na sua superfície, o que torna estes compósitos promissores para aplicações em regeneração do tecido ósseo.

keywords

Composite, bioactive glass, polycaprolactone, bioactivity.

abstract

In bone regeneration it becomes more and more attractive the use of materials capable of interacting with the living tissues through adequate responses that lead to the formation of new bone. In this context, composites of polymeric matrix with bioactive filling composites have recently been investigated because they combine the advantages of these two types of materials for the envisaged application.

The main goal of this work was to produce composites of polycaprolactone (PCL) and a bioactive glass as filler and to evaluate their in vitro behavior in an acellular medium. When used separately in biomedical applications, these materials have revealed quite promising characteristics. However, the properties of composites based on polymeric matrix reinforced with glass are not yet entirely clarified.

The bioactive glass used in this project belongs to the $3\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-MgO}$, and system showed, in previous works, to exhibit a bioactive behavior in vitro. PCL was chosen because it is a synthetic biocompatible, biodegradable and Food and Drug Administration (FDA) approved polymer.

The composites were prepared by two techniques: extrusion and solvent casting.

Some variables of processing were studied, namely: the filler content, the particle size and particle size distribution.

The behavior of these composites in simulated physiologic environment indicates a high bioactive potential confirmed by the formation of a calcium phosphate layer, making these composites very promising for bone regeneration applications.

Índice

1 – Introdução	1
1.1 – Tecido Ósseo	5
1.1.1– Osso compacto e Osso esponjoso	6
1.1.2– Reparação óssea.....	7
1.2 – Biomateriais e Engenharia de Tecidos	8
1.2.1 – Biocerâmicos	10
1.2.2 – Polímeros Biodegradáveis	15
1.3 – Compósitos de polímeros biodegradáveis e cerâmicos bioativos	18
1.4 – Técnicas convencionais e técnicas avançadas para desenvolvimento de materiais.....	21
1.4.1 – Técnicas convencionais	21
1.4.2 – Técnicas avançadas	23
2 – Procedimento Experimental.....	25
2.1 – Materiais.....	29
2.1.1 – Preparação e caracterização do vidro (frita e placas)	29
2.1.2 – Caracterização do PCL	30
2.2 – Produção dos compósitos de PCL e vidro bioativo	31
2.3 – Testes de mineralização em SBF	34
2.4 – Técnicas para caracterização de materiais.....	35
2.4.1 – Difração de Raios-X (DRX)	35
2.4.2 – Análise da Distribuição Granulométrica.....	35
2.4.3 – Isotérmica de adsorção de Brunauer, Emmett e Tellerum (BET).....	35
2.4.4 – Análise Térmica Diferencial (ATD) e Termogravimétrica (TG)	35
2.4.5 – Análise Dilatométrica	36
2.4.6 – Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)	36
2.4.7 – Espectrometria de Emissão por Plasma Induzido Acoplado (ICP).....	36
2.4.8 – Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)	36

2.4.9 – Espectroscopia de Infravermelho com Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)	36
3 – Resultados e Discussão.....	37
3.1 – Caracterização do vidro (frita e placas)	39
3.2 – Caracterização da matriz de PCL	43
3.3 – Testes de mineralização em SBF	45
3.3.1 – Análise da superfície e das alterações iônicas das placas de V7	46
3.3.2 – Análise da superfície e das alterações iônicas dos compósitos obtidos por extrusão .	51
3.3.3 – Análise da superfície e das alterações iônicas dos compósitos obtidos por evaporação do solvente	57
4 – Conclusão e Trabalho Futuro.....	67
4.1 – Conclusão	69
4.2 – Trabalho Futuro.....	70
5 – Bibliografia.....	73
6 – Anexo.....	81
Anexo I – Extrusora	83

Índice de figuras

Figura 1 - Estrutura de um osso longo [13].	6
Figura 2 – Processo de reparação óssea [10].	7
Figura 3 – Influência da composição do vidro bioativo na ligação ao tecido ósseo. A – ligação entre o vidro bioativo e o tecido ósseo, B – vidros encapsulados por fibras, C – vidros reabsorvíveis nos tecidos e D – não ocorre ligação. (adaptado de [39]).	13
Figura 4 – Diagrama de fases ternário do sistema $3\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-MgO}$.	15
Figura 5 - Cadeia principal do PCL [60].	18
Figura 6 – Esquema resumo do procedimento experimental.	28
Figura 7 – Diagrama ternário do sistema $3\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-MgO}$.	29
Figura 8 – Mini-extrusora.	32
Figura 9 – Gráfico do perfil de temperatura utilizados na extrusão.	33
Figura 10 – Resultado de DRX para a composição V7 da frita.	39
Figura 11 – Evolução do tempo de moagem com o tamanho médio de partícula.	40
Figura 12 – Distribuição granulométrica dos pós da composição V7.	40
Figura 13 – Micrografias obtidas por SEM para os pós vidro.	41
Figura 14 – Caracterização das placas de vidro por DRX (a) e FTIR (b).	41
Figura 15 – Micrografia obtidas por SEM para as placas de vidro.	42
Figura 16 – Análise térmica diferencial e termogravimetria do V7.	42
Figura 17 – Análise dilatométrica de um compacto de V7.	43
Figura 18 – Termograma de DSC do PCL.	44
Figura 19 – Variação da cristalinidade do PCL com a taxa de aquecimento.	45
Figura 20 – Micrografias de SEM para amostras de V7 em placa para os diferentes tempos de imersão.	47
Figura 21 – Evolução da razão Ca/P nos precipitados sobre a superfície das placas de V7 após vários tempos de imersão em SBF.	47
Figura 22 – Variação da concentração elementar da solução de SBF nos íões Si e Mg (a) e em Ca e P (b).	48
Figura 23 – Variação dos valores do pH da solução de SBF, após vários dias de imersão.	49
Figura 24 – Espectro de FTIR-ATR do vidro após diferentes tempos de imersão.	50
Figura 25 – Micrografias de SEM de um compósito PCL/vidro bioativo extrudido.	51
Figura 26 – Micrografias de SEM para amostras de todas as composições obtidas por extrusão.	52

Figura 27 – Variação das concentrações iônicas de Si e Mg (a) e em Ca e P (b) na solução de SBF após imersão do PCL obtido por extrusão.	54
Figura 28 – Variação da concentração elementar da solução de SBF em Si e Mg (a) e em Ca e P (b) para o compósito PCL30G obtido por extrusão.	55
Figura 29 – Variação dos valores do pH da solução de SBF em função do tempo de imersão.....	56
Figura 30 – Espectro de FTIR-ATR do PCL para os diferentes tempos de imersão em SBF.....	57
Figura 31 – Micrografias de SEM de todas as composições para as amostras obtidas por evaporação do solvente.	58
Figura 32 – Evolução da razão Ca/P nos precipitados sobre os compósitos PCL30G após o tempo de imersão em SBF.	61
Figura 33 – Variação da concentração elementar da solução de SBF em Si e Mg (a) e em Ca e P (b) para o PCL.....	62
Figura 34 – Variação da concentração elementar da solução de SBF em Si e Mg (a) e em Ca e P (b) para o PCL30G.	63
Figura 35 – Variação dos valores do pH da solução de SBF, após vários dias de imersão.	64
Figura 36 – Espectro de FTIR-ATR do PCL com os diferentes tempos de imersão.....	65
Figura 37 – Ampliação e sobreposição do espectro de FTIR-ATR na gama dos 400-1500 cm ⁻¹ do PCL e do PCL30G.	66
Figura 38 – Representação esquemática do parafuso utilizado na extrusora.	83
Figura 39 - Mini-extrusora.....	84

Índice de tabelas

Tabela 1 – Consequências das interações Implante-Tecido [29].	10
Tabela 2 – Concentração iônica (mM) do SBF comparativamente ao plasma humano.	14
Tabela 3 – Exemplos de polímeros sintéticos e naturais utilizados em Engenharia de Tecidos (adaptado de [22]).	17
Tabela 4 – Fatores que diferenciam vários processos de prototipagem rápida (Adaptado de [26]).	23
Tabela 5 – Massa das amostras de PCL e respectiva taxa de aquecimento.	31
Tabela 6 – Percentagem de vidro bioativo utilizada na produção dos compósitos.	32
Tabela 7 – Perfis de temperaturas utilizados na extrusão dos compósitos.....	33
Tabela 8 – Ordem, fórmula química, marca e quantidade dos reagentes utilizados para preparação de 1 litro.	34
Tabela 9 – Resultados referentes às temperaturas de fusão e de transição vítrea do PCL obtidas por DSC.....	43
Tabela 10 – Evolução da cristalinidade do PCL com a taxa de aquecimento.....	44
Tabela 11 – Frequências de vibração [42,88–91].....	50
Tabela 12 – Frequências de vibração do PCL [93].....	57
Tabela 13 – Formação de precipitados de Ca-P nos compósitos para diferentes tempos de imersão.....	60

Lista de Abreviaturas e Símbolos

3DP	Impressão tridimensional
ATD	Análise térmica diferencial
FTIR-ATR	Espectroscopia de infravermelho com refletância total atenuada
BET	Isotérmica de adsorção de Brunauer, Emmett e Tellerum
Ca-P	Fosfato de cálcio
Ca/P	Razão cálcio e fósforo
DRX	Difração raios-X
DSC	Calorimetria diferencial de varrimento
EDS	Espectrometria de dispersão de energias de raios-X
Endo	Endotérmica
Exo	Exotérmica
FFF	<i>Fused Filament Fabrication</i>
HA	Hidroxiapatite
ICP	Espectrometria de Emissão por Plasma Induzido Acoplado
SEM	Microscopia eletrônica de varrimento
PCL	Policaprolactona
PCL10F	Policaprolactona e 10% de partículas finas
PCL10G	Policaprolactona e 10% de partículas grossas
PCL10GF	Policaprolactona e 10% de partículas finas e grossas
PCL30F	Policaprolactona e 30% de partículas finas
PCL30G	Policaprolactona e 30% de partículas grossas
PCL30GF	Policaprolactona e 30% de partículas finas e grossas
PLGA	Ácido poli(láctico-co-glicólico)
PLLA	Ácido poli-L-láctido
OCP	Fosfato octacálcico
SBF	Fluido corporal simulado (simulated body fluid)
SLS	Sinterização Seletiva por Laser
T _f	Temperatura de fusão
TG	Termogravimetria
T _g	Temperatura de transição vítrea
V7	Vidro bioativo do sistema 3CaO-P ₂ O ₅ -SiO ₂ -MgO

1 – Introdução

1 – Introdução

Os avanços da medicina proporcionaram um aumento da esperança média de vida para o qual contribuiu o desenvolvimento de novos materiais capazes de remodelar, restaurar e reforçar estruturas ósseas. O tecido ósseo tem a capacidade de promover a sua regeneração espontânea ao longo da sua vida. Contudo, em casos de ocorrência de fraturas ou de doenças, a perda óssea é superior à formação óssea estabelecendo-se um desequilíbrio, tornando-se o processo de reparação óssea insuficiente [1–3]. Nestas situações o procedimento padrão passa pela utilização de enxertos ósseos, que variam conforme a sua utilização e origem e aos quais estão associadas várias restrições como a limitação da quantidade de tecido a extrair e a possibilidade de uma resposta imunitária adversa. A Engenharia de Tecidos surge neste contexto e com o objetivo de ultrapassar as limitações associadas a estes métodos convencionais através do desenvolvimento de implantes para substituição óssea com propriedades semelhantes ao tecido nativo [1,4].

Embora se tenha alcançado grandes avanços nesta área, ainda não é possível o desenvolvimento de substitutos ósseos que apresentem propriedades ideais para a generalidade das aplicações clínicas.

O interesse em torno dos polímeros biodegradáveis para aplicação em Engenharia de Tecidos surge devido à capacidade de degradação quando em contacto com os tecidos vivos além da biocompatibilidade [5]. Tem havido um número crescente de trabalhos relacionados com o estudo do comportamento *in vitro* e *in vivo* de polímeros biodegradáveis de origem sintética, nomeadamente a policaprolactona (PCL). Apesar do PCL ser biocompatível, a sua aplicação torna-se limitada pela ausência de bioatividade [6]. Como alternativa, surgem as modificações estruturais e a combinação do polímero com partículas bioativas, de forma a obterem-se compósitos com propriedades melhoradas [7].

O uso de vidros bioativos para regeneração óssea tem revelado características vantajosas essencialmente a nível de bioatividade. A bioatividade é entendida como a capacidade de formar ligações químicas com o tecido ósseo através da formação de uma camada rica em cálcio e fósforo [3]. A capacidade de osteocondução e biocompatibilidade bem como a osteointegração com os tecidos hospedeiros suprimindo a possibilidade de rejeição do implante torna estes materiais adequados para aplicação em Engenharia de Tecidos [7–9].

A incorporação de partículas inorgânicas numa matriz polimérica tem contribuído para a obtenção de compósitos que combinam a flexibilidade dos polímeros com a resistência mecânica e a bioatividade da fase inorgânica. Tais características garantem uma maior estabilidade ao material quando em contacto com fluidos fisiológicos [7].

1 - Introdução

Este trabalho tem como objetivo a obtenção e caracterização de compósitos PCL/vidro bioativo, sendo que a composição vítrea eleita pertence ao sistema $\text{SiO}_2\text{-3CaO.P}_2\text{O}_5\text{-MgO}$. Um dos pontos de interesse deste trabalho será a obtenção de materiais para posterior aplicação em técnicas de fabrico rápido, nomeadamente em *Fused Filament Fabrication* (FFF). Dentro dos objetivos pretendidos será dada particular atenção ao estudo do compósito *in vitro*.

A presente dissertação está dividida em quatro partes. O primeiro capítulo, onde será apresentada uma revisão bibliográfica para enquadramento do trabalho, seguido de um segundo capítulo onde será descrito o protocolo experimental e algumas técnicas. O terceiro capítulo será dedicado aos resultados obtidos e sua discussão e, por fim, as conclusões retiradas deste mesmo trabalho. Apresentam-se ainda sugestões para trabalho futuro.

1 - Introdução

Neste capítulo é efetuada uma descrição das principais características do tecido ósseo e do sistema de recuperação óssea e analisam-se os requisitos que um biomaterial deve ter para ser implantado no corpo humano. Seguidamente é realizada uma descrição para os materiais designados para este projeto, PCL e vidro bioativo, e é apresentado um estado da arte para os compósitos de PCL/vidro bioativo.

1.1 – Tecido Ósseo

O sistema esquelético tem a capacidade de suportar cargas devido à rigidez e dureza do tecido ósseo e de proteger os diversos órgãos do corpo humano, possibilitando a execução de movimentos. Permite o armazenamento de minerais e é um local de produção de células sanguíneas. Consoante a forma, os ossos podem ser classificados em longos, curtos, achatados ou irregulares (também designados por alguns autores como ossos curtos) [10].

Os ossos curtos, achatados e irregulares apresentam, comparativamente com os ossos longos, uma estrutura simples constituída por uma camada de osso compacto que envolve a camada de osso esponjoso ou trabecular.

Os ossos longos são constituídos por três componentes que se distinguem pela composição: diáfise, epífises e placa epifisária (figura 1). A diáfise, também conhecida como corpo do osso devido à sua localização no centro do osso, é composta principalmente por osso compacto na sua maior parte constituído por matriz óssea, enquanto as epífises, que se situam nas extremidades dos ossos, são compostas essencialmente por osso esponjoso e pequenas cavidades com matriz óssea à sua volta, sendo a sua superfície coberta com uma camada de osso compacto. A placa epifisária apresenta cartilagem hialina e é onde ocorre o crescimento ósseo. Quando este cessa, a placa ossifica e passa a denominar-se por linha epifisária [10].

A parte externa do osso é revestida por uma membrana de tecido conjuntivo fibroso (periósteo), que está dividida em duas camadas. A camada fibrosa exterior é rica em colagénio e contém vasos sanguíneos e nervos, enquanto que, a camada fibrosa consiste em uma camada de células ósseas (osteoblastos, osteoclastos e células progenitoras osteocondrais).

As superfícies interiores de todas as cavidades do osso são revestidas por endósteo que é constituído por uma camada de células (osteoblastos, osteoclastos e células progenitoras osteocondrais) [10].

O tecido ósseo é constituído por células ósseas e por uma matriz óssea. A matriz óssea é constituída por 35% de material orgânico, principalmente proteoglicanos e colagénio, que confere flexibilidade ao osso, e 65% de material inorgânico, hidroxiapatite (HA) ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) [10–12].

1 - Introdução

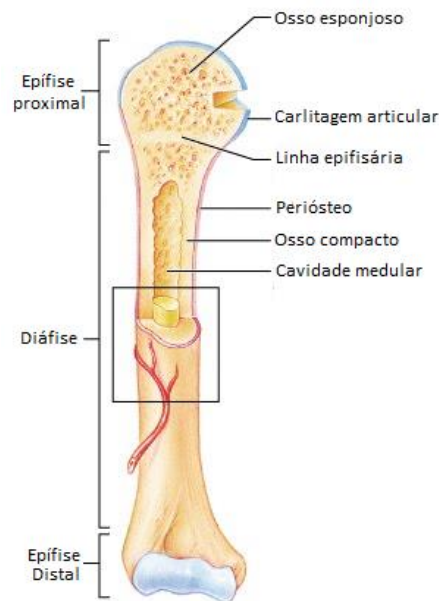


Figura 1 - Estrutura de um osso longo [13].

1.1.1- Osso compacto e Osso esponjoso

O osso esponjoso e o osso compacto são classificados conforme a quantidade de matriz óssea e quantidade de espaços ocupados por estruturas orgânicas [10].

O osso esponjoso é constituído por trabéculas e entre estas existem espaços que são preenchidos por medula óssea e vasos sanguíneos [10,14]. A medula óssea está dividida em duas categorias: medula vermelha e medula amarela. A medula vermelha consiste em tecido conjuntivo que se situa nos vazios do osso esponjoso ou do canal medular, a medula amarela é armazenada nos mesmos locais mas sob a forma de gordura. As trabéculas têm tamanhos que variam entre os 50-400 μm e são constituídas por várias lamelas, entre as quais se encontram os osteócitos. Os osteócitos estão associados uns aos outros através de canalículos e produzem elementos necessários para manter a matriz extracelular [10]. O módulo de *Young* deste tecido esponjoso situa-se entre 0.1-5 GPa, a resistência à compressão toma valores entre 2-12 MPa, a tenacidade à fratura situa-se entre 0.1-0.8 $\text{MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$ e a porosidade está entre os 50-90% [3,15,16].

O osso compacto apresenta uma estrutura sólida e densa e menos espaços que o osso esponjoso [10,14]. Os vasos sanguíneos penetram na própria substância óssea, e os osteócitos e as lamelas do osso compacto vão orientar-se predominantemente em torno desses vasos sanguíneos. Os vasos que correm paralelos ao eixo longo do osso encontram-se dentro dos canais de *Havers*, que são revestidos por endóstio e, contêm vasos sanguíneos, nervos e tecido

1 - Introdução

conjuntivo [10,16]. O módulo de *Young* do osso compacto situa-se entre 10-20 GPa, a resistência à compressão é 100-150 MPa, a tenacidade à fratura entre 2-12 MPa.m^{1/2} e a porosidade varia entre 5-10% [3,15,16].

1.1.2– Reparação óssea

Existem diversas patologias responsáveis pela ocorrência de fraturas ósseas. Anualmente, ocorrem cerca de 6.2 milhões de fraturas ósseas nos Estados Unidos da América, ocorrendo 10% de falhas no tratamento devido a cura inapropriada [3].

O tecido ósseo possui uma capacidade de se regenerar a si próprio ao longo da sua vida. Contudo, em situações em que a perda óssea é superior à formação óssea, como em casos de doença ou fratura, este processo torna-se insuficiente [17].

O processo de reparação óssea pode descrever-se em quatro passos, sumarizados na figura 2. Este processo tem início com a formação de um hematoma que atrai agentes celulares responsáveis pelo tecido fibroso dando origem ao calo mole. Posteriormente, os osteoblastos migram para a zona de fratura, onde irão produzir e mineralizar o tecido ósseo formando o calo duro. Finalmente restituem-se as características morfológicas, estruturais e funcionais do tecido ósseo, proporcionando ao tecido criado as propriedades mecânicas e biológicas equivalentes às do tecido nativo, produzindo-se a remodelação óssea [10].

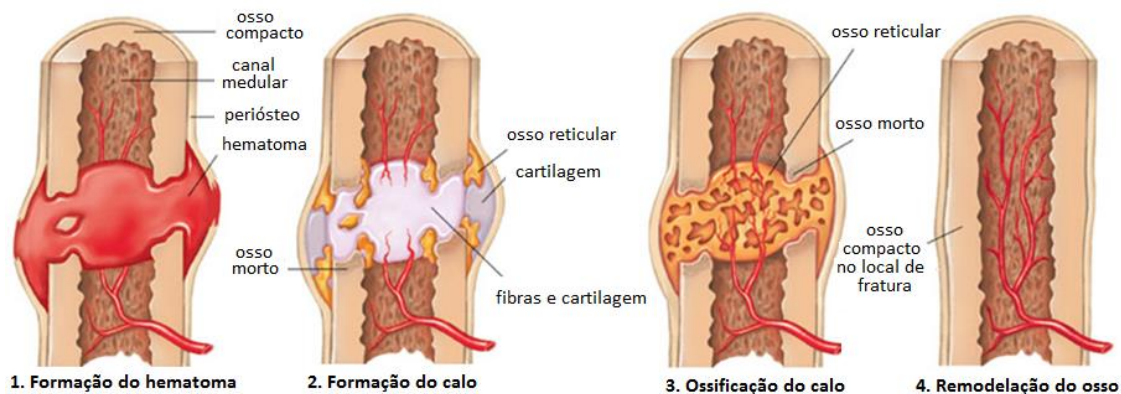


Figura 2 – Processo de reparação óssea [10].

Quando este processo de reparação é insuficiente, é necessário recorrer à aplicação de substitutos ósseos, genericamente chamados enxertos ósseos. Estes enxertos podem ser divididos em quatro tipos consoante a sua origem: autógenos, alógenos, xenógenos e enxertos derivados de materiais sintéticos [1,4,18–21]. Os enxertos autógenos isto é, derivados do próprio paciente, foram durante muito tempo a única opção viável para a recuperação de tecido ósseo. A

sua utilização é fortemente condicionada pela quantidade limitada de tecido a extrair de modo a evitar a morbidade [4,10,19–21]. De forma a ultrapassar as limitações provocadas pelos enxertos autógenos, surgiram os enxertos alógenos, provenientes de indivíduos da mesma espécie, e xenógenos, derivados de indivíduos de espécie diferente, mas ambos apresentam riscos nomeadamente os associados a uma resposta adversa por parte do sistema imunitário [19–21]. Uma alternativa que nos últimos anos tem ganho grande impacto na investigação e na clínica é a utilização de enxertos de materiais sintéticos, aloplásticos. Os materiais utilizados, em regra, apresentam composições semelhantes às do tecido ósseo, como os fosfatos de cálcio, e há a possibilidade de reproduzir arquiteturas específicas [19–21].

1.2 – Biomateriais e Engenharia de Tecidos

Os biomateriais para serem implantados no corpo humano necessitam de obedecer a uma série de requisitos de forma a evitar qualquer tipo de reação imunológica adversa, quando em contacto com os tecidos hospedeiros. É necessário que os materiais sejam biocompatíveis e, no caso dos implantes ósseos, promover a osteocondução dos tecidos hospedeiros evitando a encapsulação pelo tecido fibroso, proporcionando, uma ligação mais forte entre o tecido ósseo e o material [16,22,23]. Em determinadas situações pode ser importante o material ser biodegradável e reabsorvível para assegurar a reconstrução completa do tecido em questão. Nestes casos, a sua taxa de degradação deve ser equivalente à taxa de regeneração do tecido e os produtos resultantes da degradação devem ser não tóxicos e libertados via metabólica [24,25]. Como forma de promover o crescimento celular os materiais devem ser portadores de características de superfície apropriadas à adesão, proliferação, migração e diferenciação celulares [24]. Uma maior rugosidade promove a migração das células à superfície do material e uma maior área de superfície permite a ligação de um elevado número de células na superfície do material, necessária à substituição ou restauração da função do tecido ou do órgão [22,26].

A configuração geométrica, forma e tamanho de um material implantado, têm influência no desempenho mecânico do material. É importante que este forneça suporte para o crescimento de células e, por isso, possuir elevada porosidade, poros interconectados e tamanhos de poro que promovam o crescimento dos tecidos. No entanto, o grau de porosidade influencia outras propriedades no material como é o caso do desempenho mecânico. Assim, a porosidade deve ser controlada de forma a não comprometer a resistência mecânica adequada para cada tecido [3].

1 - Introdução

Os biomateriais podem ser divididos em três gerações: primeira geração (materiais bioinertes), segunda geração (materiais bioativos e materiais biodegradáveis) e terceira geração (combinação de materiais bioativos e materiais biodegradáveis) [27].

Na primeira geração de biomateriais, o principal requisito é a obtenção de materiais que combinem propriedades físicas com uma baixa resposta imunológica do tecido hospedeiro. Dentro dos materiais que se enquadram nesta geração podem destacar-se as ligas de titânio, o aço inoxidável e as ligas de cromo-cobalto (materiais metálicos), a alumina e a zircônia (materiais cerâmicos) e o polietileno, o poliuretano, o polimetacrilato de metilo e as resinas acrílicas (materiais poliméricos) [27].

A segunda geração aparece entre 1980 e 2000 e engloba os materiais com capacidade para interagir com o meio biológico de forma a melhorar a resposta biológica e a ligação tecido/superfície e também os materiais reabsorvíveis que sofrem degradação durante a regeneração do tecido. Exemplos de materiais desta geração são os vidros e os vidros cerâmicos bioativos e os fosfatos de cálcio, e também alguns polímeros biodegradáveis como é o caso do PCL, do quitosano, do ácido hialurônico, do ácido poliláctido e dos hidrogéis [27].

Na terceira e atual geração de biomateriais incluem-se materiais que são capazes de estimular uma resposta celular específica a nível molecular. Estes materiais combinam os conceitos de bioatividade e biodegradabilidade, tendo como função a regeneração do tecido. Estruturas porosas de fosfatos de cálcio, cimentos ósseos reabsorvíveis e superfícies metálicas revestidas com partículas cerâmicas bioativas são exemplos deste tipo de materiais [27]. Os materiais desta geração representam o advento da Engenharia de Tecidos e são desejavelmente processados na forma de estruturas porosas que devem ter uma existência temporária, funcionando como *templates* ou *scaffolds* para os tecidos regenerados.

A Engenharia de Tecidos surge como alternativa aos métodos tradicionais de substituição óssea referidos anteriormente (enxertos ósseos) de forma a evitar problemas que lhes estão associados. A regeneração de tecidos utilizando enxertos provenientes do corpo humano raramente repõe por completo a função do tecido nativo estando também associados uma série de riscos e complicações como a ocorrência de infeções e anormalidades metabólicas [24].

A primeira utilização do termo Engenharia de Tecidos remonta ao tempo de Sócrates, quando se realizou pela primeira vez a transferência de uma parte do corpo para outra [25]. Já em 1993, Langer e Vancanti [28] definiram Engenharia de Tecidos como sendo um “campo interdisciplinar de investigação que aplica princípios de engenharia e ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram, mantêm e melhoram a função do

1 - Introdução

tecido”. É uma ciência baseada na compreensão da formação e regeneração do tecido através da formação de novos tecidos funcionais em detrimento da utilização de implantes de reposição [23]. Desta forma, é possível afirmar que a Engenharia de Tecidos é uma área multidisciplinar que conjuga várias áreas: física, química, bioquímica, engenharia, ciências de materiais, biologia e medicina [22,23].

As estratégias usadas em Engenharia de Tecidos podem ser divididas em três categorias [22,23]:

- Extração de células diretamente do paciente e multiplicação das mesmas através de culturas *in vitro*, para posterior implantação no corpo humano de modo a proporcionar regeneração da área afetada;
- Colocação de fatores biológicos como fatores de crescimento em defeitos ósseos;
- Utilização de estruturas tridimensionais (*scaffold*) que estimulam o crescimento de um novo tecido ósseo.

1.2.1 – Biocerâmicos

Materiais da classe dos cerâmicos encontram-se nas várias gerações de biomateriais. O desenvolvimento e utilização de biocerâmicos para reparação e reconstrução do tecido ósseo teve um enorme avanço no desenvolvimento de materiais para aplicação médica nos últimos 30-40 anos. Os biocerâmicos utilizados para aplicação clínica podem ser policristalinos (alumina ou HA), vidros bioativos, vidros cerâmicos bioativos (Cerabone® A/W) e ainda, compósitos bioativos (polietileno/HA) [29].

Qualquer material quando implantado no tecido vivo provoca uma resposta por parte do tecido [29]. A resposta ocorre na interface tecido-implante e depende de vários fatores (representados na tabela 1).

Tabela 1 – Consequências das interações Implante-Tecido [29].

Reação Implante-Tecido	Consequência
Tóxico	Morte dos tecidos
Inerte	Formação de uma cápsula fibrosa em torno do implante
Bioativo	Tecido forma uma ligação interfacial com o implante
Degradação do implante	Tecido substitui o implante

1 - Introdução

O mecanismo de ligação dos tecidos ao implante está diretamente relacionado com a resposta do tecido na interface implante. Com base nos quatro tipos de resposta, sumarizados na tabela 1, os biocerâmicos foram classificados por Hench [29]:

i) biocerâmicos inertes – apresentam como principal característica a não reação com os tecidos hospedeiros. Promovem a formação de uma camada fibrosa não aderente na interface e a espessura da camada é influenciada pelo nível de reatividade do implante e pela estabilidade química do material. Exemplos: alumina, zircônia e titânia.

ii) biocerâmicos porosos – o crescimento do tecido ósseo faz-se através dos poros proporcionando uma elevada área interfacial entre o implante e os tecidos hospedeiros. A principal limitação é o elevado tamanho de poro requerido, que deve ser elevado para permitir o fornecimento de sangue de forma a possibilitar o crescimento do tecido. Exemplo: hidroxiapatite porosa.

iii) biocerâmicos bioativos – a ligação interfacial é conseguida através da ocorrência de reações químicas na superfície do material proporcionando a capacidade de formar uma interface semelhante à interface nativa. O conceito bioativo abrange uma vasta gama de materiais como é o caso dos vidros bioativos, dos vidros cerâmicos bioativos, da hidroxiapatite, dos compósitos bioativos e dos revestimentos bioativos, sendo as características da ligação diferentes para cada um deles.

iv) biocerâmicos reabsorvíveis – exibem como principal característica a degradação gradual com o tempo e posterior substituição pelo tecido nativo. A principal dificuldade é reunir no implante os requisitos mecânicos suficientes durante um curto período de tempo. As taxas de degradação e reabsorção variam conforme o local de reparação do tecido em questão. Exemplo: fosfatos de cálcio.

Nas últimas décadas a classe de biomateriais bioativos tem atraído grande interesse principalmente para aplicações dentárias e substituições ósseas. A capacidade de estabelecer ligações químicas entre o implante e o tecido vivo, evitando a formação de uma cápsula fibrosa, aumenta a viabilidade do implante [29].

Vidro Bioativo

O conceito de bioatividade criado por Hench está associado à descoberta do vidro bioativo 45S5, patenteado com a designação de Bioglass®. Este material desenvolvido em 1969 pelo Professor Larry Hench, apresenta a composição 45% SiO₂ - 6% P₂O₅ - 24,5% CaO - 24,5% Na₂O e é capaz de formar uma forte ligação com o tecido ósseo [3,30,31]. Este vidro bioativo já foi

1 - Introdução

utilizado em mais de 1 milhão de pacientes no tratamento de defeitos ósseos tendo evidenciado capacidade osteoindutiva [32]. A sua principal característica, que é a bioatividade, é atribuída à capacidade de promover o desenvolvimento de uma camada rica em Ca-P na superfície do vidro com composição e estrutura semelhantes às da parte inorgânica do tecido ósseo, permitindo uma forte ligação com os tecidos ósseos adjacentes e o crescimento de células [3,30,33,34].

A principal limitação do vidro é a fraca resistência mecânica que compromete o seu desempenho em zonas com grandes solicitações mecânicas [3,35]. Uma forma de melhorar a resistência mecânica deste tipo de materiais é através da obtenção de vidros cerâmicos. Estes materiais são obtidos através de um processo de cristalização controlada submetendo os vidros a tratamentos térmicos devidamente programados [36].

O primeiro vidro-cerâmico a ser comercializado para aplicações médicas foi o Ceravital® [37] (40-50% SiO₂ - 10-50% P₂O₅ - 30-35% CaO - 5-10% Na₂O - 0,5-3% K₂O - 2,5-5% MgO) que apresenta uma microestrutura constituída por duas fases (amorfa e apatite). A aplicação clínica destes vidros cerâmicos é hoje limitada.

Posteriormente, Kokubo *et al.* [38] desenvolveram o vidro-cerâmico Cerabone® A/W (34,0% SiO₂ - 16,2% P₂O₅ - 44,7% CaO - 4,6% MgO - 0,5% CaF₂) que apresenta melhorias significativas em relação aos anteriores ao nível de resistência mecânica, devido à formação de wollastonite durante o processo de cristalização, que precipita na matriz vítrea juntamente com a apatite.

Em 1985 surgiram os vidros-cerâmicos Bioverit® divididos em três tipos: Bioverit® I, Bioverit® II, Bioverit® III. Os Bioverit® I (30,5% SiO₂ - 11,4% P₂O₅ - 14,4% CaO - 14,8% MgO - 2,3% Na₂O - 5,8% K₂O - 15,9% Al₂O₃ - 4,9% F) e Bioverit® II (44,5% SiO₂ - 0,2% P₂O₅ - 0,2% CaO - 11,8% MgO - 4,4% Na₂O - 4,9% K₂O - 29,7% Al₂O₃ - 4,2% F) têm como principal característica o facto de serem maquináveis devido à presença de cristais do tipo mica na sua estrutura. Já os Bioverit® III (51,4% P₂O₅ - 16,0% CaO - 14,6% Na₂O - 9,0% Al₂O₃ - 1,8% F - 4,5% ZrO₂ - 2,7% TiO₂) e não são maquináveis [39].

Estes vidros cerâmicos juntamente com o vidro bioativo Bioglass® têm sido os mais amplamente estudados e utilizados em aplicações clínicas. No entanto, outros estudos têm sido realizados com vista à obtenção de novas composições de vidros e de vidros cerâmicos bioativos para utilização em regeneração óssea [40–42]. No grupo de investigação onde se insere o presente trabalho de Mestrado existem vários estudos sobre o sistema 3CaO-P₂O₅-SiO₂-MgO [41,43,44].

1 - Introdução

Os componentes base da maioria dos vidros bioativos são: SiO₂, Na₂O, CaO e P₂O₅. Hench *et al.* [29] desenvolveram uma série de vidros bioativos do sistema SiO₂-Na₂O-CaO, como sumarizado no diagrama ternário representado na figura 3.

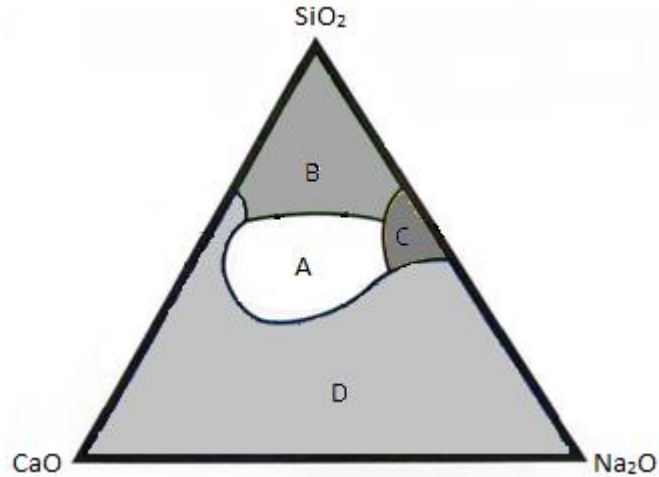
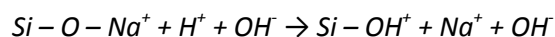


Figura 3 – Influência da composição do vidro bioativo na ligação ao tecido ósseo. A – ligação entre o vidro bioativo e o tecido ósseo, B – vidros encapsulados por fibras, C – vidros reabsorvíveis nos tecidos e D – não ocorre ligação. (adaptado de [39]).

A Figura 3 identifica a fronteira do comportamento na interface com os tecidos para as diferentes composições. Na região A ocorre ligação entre o vidro bioativo e o tecido ósseo. A parte superior do diagrama, região B, é referente aos vidros que são encapsulados por fibras não aderentes quando o material é implantado nos tecidos vivos, enquanto que, a região C está associada às composições que são reabsorvíveis no tecido. Na região D não ocorre ligação aos tecidos [39].

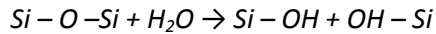
A formação da camada rica em Ca-P [45] considerada o principal requisito para a ocorrência de bioatividade, foi explicada por Hench [29,46,47] através de um mecanismo subdividido em cinco estágios, dos quais, os três primeiros estão associados ao processo de dissolução que acontece em qualquer vidro quando imerso numa solução aquosa:

Estágio 1: troca entre íons alcalinos do vidro (Na⁺ ou K⁺) e íons H⁺ ou H₃O⁺ da solução:

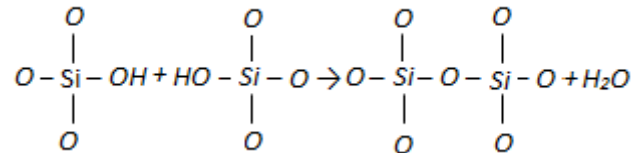


Estágio 2: quebra das ligações Si-O-Si e formação de grupos Si-OH (silanol) na interface vidro-solução devido à perda de sílica solúvel na forma de Si(OH)₄:

1 - Introdução



Estágio 3: Formação de uma camada rica em sílica gel à superfície do vidro devido à condensação e re-polimerização dos grupos silanol, desprovidos de íões alcalinos e alcalino-terrosos:



Estágio 4: Formação de um filme amorfo rico em Ca-P na superfície da camada de sílica devido à adsorção de íões Ca^{2+} e PO_4^{3-} da solução.

Estágio 5: Cristalização do filme amorfo com incorporação de aniões OH^- , CO_3^{2-} e F^- formando uma camada rica em Ca-P.

A confirmação da bioatividade de um vidro só pode ser realizada através de ensaios *in vivo*. Porém, de forma a fazer o primeiro escrutínio dos materiais potencialmente bioativos, a bioatividade deve ser primeiramente estudada *in vitro* em meio acelular [48,49]. Kokubo *et al.* [48] propuseram o recurso a uma solução, cuja composição e pH são semelhantes aos do plasma humano, *simulated body fluid* (SBF). Na tabela 2 é apresentada a concentração iónica do SBF em comparação ao plasma humano.

Tabela 2 – Concentração iónica (mM) do SBF comparativamente ao plasma humano.

Concentração iónica (mM)								
	Na^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Cl^-	HCO_3^-	HPO_4^{2-}	SO_4^{2-}
Plasma Humano	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5
SBF	142.0	5.0	1.5	2.5	148.8	4.2	1.0	0.5

O comportamento bioativo dos vidros e vidros cerâmicos é dependente da composição [41]. A presença de cálcio e fósforo foi considerada inicialmente indispensável para a formação de uma camada rica em Ca-P. No entanto, vidros do sistema $CaO-Si_2O_3$, sem P_2O_5 na sua composição

1 - Introdução

mostram a capacidade para formar uma ligação química com o tecido ósseo [50]. Em relação ao papel desempenhado pela sílica na formação da camada rica em Ca-P reposta-se na literatura [41,51] que esta tem um papel importante pois promove locais favoráveis para a precipitação de fosfatos de cálcio e posterior formação do tecido ósseo.

Um aspeto que ainda provoca alguma controvérsia é a influência do óxido de magnésio (MgO) na bioatividade dos vidros. É muitas vezes assumido que, no caso dos vidros bioativos, a sua adição provoca uma diminuição da bioatividade. Contudo, outros estudos demonstram que é possível desenvolver vidros com elevadas quantidades de MgO sem perda de bioatividade [43,52].

No presente trabalho foi utilizado para enchimento dos compósitos desenvolvidos um vidro do sistema $3\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-MgO}$ (figura 4) que em estudos anteriores mostram ser potencialmente bioativos. A região representada a cinzento representa composições que correspondem a materiais com estrutura amorfa.

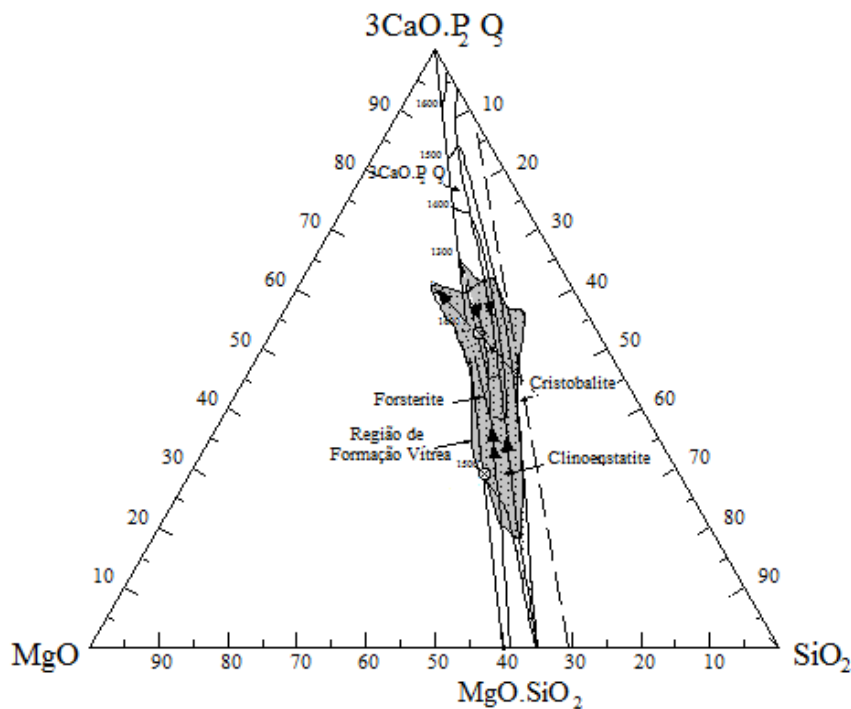


Figura 4 – Diagrama de fases ternário do sistema $3\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-MgO}$.

1.2.2 – Polímeros Biodegradáveis

O interesse em torno dos polímeros biodegradáveis surge devido à capacidade de degradação quando em contacto com os tecidos vivos, desde que garantida a sua biocompatibilidade [53,54]. Desejavelmente, o tempo de degradação deve ser adequado ao

1 - Introdução

processo de regeneração e não deve comprometer as propriedades mecânicas. Os produtos resultantes da degradação devem ser metabolizados de modo a serem eliminados [55].

Os polímeros biodegradáveis podem ser divididos em duas classes: polímeros de origem natural e polímeros de origem sintética.

Os polímeros de origem natural são provenientes de fontes animais ou vegetais, como é o caso do colagénio, da seda e da fibrina, da celulose, da quitina, da agarose, do alginato, do ácido hialurónico, entre outros [55,56]. As suas principais desvantagens residem na variação das taxas de degradação consoante o local de implantação e na reduzida resistência mecânica. Estes materiais possuem uma boa capacidade de interação com os tecidos hospedeiros, não produzem as reações imunológicas adversas e podem ser quimicamente modificados [22].

Os polímeros sintéticos usados em Engenharia de Tecidos podem dividir-se em várias classes: os poliésteres, as poliamidas, os polifosfazenos e os polianidridos [55,56]. Os mais utilizados são os poliésteres como é o caso do policaprolactona, do ácido poliglicólico e do ácido poliláctico. Em relação aos polímeros de origem natural têm a vantagem de ser facilmente processados em formas específicas e permitem controlar com relativa facilidade as propriedades mecânicas e a sua taxa de degradação [22].

A tabela 3 sumariza alguns dos polímeros sintéticos e naturais, referidos anteriormente, utilizados em Engenharia de Tecidos.

1 - Introdução

Tabela 3 – Exemplos de polímeros sintéticos e naturais utilizados em Engenharia de Tecidos (adaptado de [22]).

Material	Origem	Características
Colagénio	Natural	Baixa resposta imunológica Bom substrato para adesão celular
Quitosano	Natural	Promove osteocondução e vascularização do tecido
Ácido Hialurónico	Natural	Baixa resposta imunológica
Policaprolactona	Sintético	Poliéster alifático Degradação por hidrólise
Polihidroxiácidos	Sintético	Poliésteres alifáticos Degradação por hidrólise
Polipropileno fumaratos	Sintético	Poliésteres insaturados Degradados em ácido fumárico e propileno glicol

Policaprolactona

A policaprolactona (PCL) é um poliéster alifático semi-cristalino com uma baixa temperatura de fusão ($\sim 60^{\circ}\text{C}$), o que permite que seja processado a baixas temperaturas, e uma temperatura de transição vítrea de -60°C [55]. Possui uma reduzida taxa de degradação (superior a 2 anos), é não tóxico, apresenta propriedades elásticas e resistência mecânica elevadas e é biocompatível [7,57]. O PCL possui um módulo de elasticidade e uma resistência à tração de 400MPa e 16MPa, respetivamente [58].

Mereceu aprovação, na década de 70, pela FDA para utilização em aplicações biomédicas e tem sido recentemente muito estudado para aplicação em Engenharia de Tecidos [59]. As principais desvantagens estão relacionadas com a ausência de comportamento bioativo e com a sua natureza hidrofóbica [7,57]. A unidade de repetição do PCL está ilustrada na figura 5.

1 - Introdução

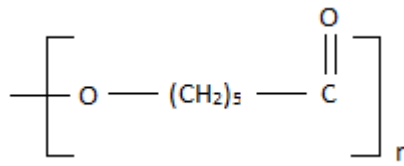
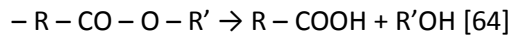


Figura 5 - Cadeia principal do PCL [60].

A sua degradação ocorre por hidrólise, é dependente do peso molecular e do grau de cristalinidade e pode ser acelerada através da combinação com outros materiais [7,61]. O processo de degradação e metabolização ocorre em 3 etapas [62,63]:

1º etapa: quebra da cadeia polimérica por hidrólise que ocorre nas ligações ésteres, sem auxílio de enzimas:



2º etapa: formação de cadeias curtas de oligómeros, o que provoca alteração do peso molecular do PCL.

3º etapa: fagocitose do PCL pelos macrófagos.

A eliminação dos produtos resultantes das várias fases de degradação ocorre por metabolização ou por excreção renal [63].

1.3 – Compósitos de polímeros biodegradáveis e cerâmicos bioativos

Um dos maiores desafios da Engenharia de Tecidos é a produção de materiais adequados para aplicação clínica. Um grupo de materiais que tem atraído grande interesse é o dos compósitos de polímeros biodegradáveis com um enchimento cerâmico bioativo como fase de reforço. A incorporação de partículas inorgânicas numa matriz polimérica permite uma melhoria das propriedades mecânicas e osteocondutivas dos compósitos [65].

O desenvolvimento de *scaffolds* de ácido poli-L-láctido (PLLA) com adição de diferentes quantidades de partículas vítreas (0%, 10%, 30% e 50%) mostrou a formação de precipitados ricos em Ca-P após 14 dias de imersão para as composições com enchimento bioativo. Os compósitos com fase inorgânica exibiram um melhor desempenho mecânico em relação ao PLLA puro [66].

O estudo da influência de partículas de um vidro bioativo numa matriz polimérica de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) revelou uma melhoria do desempenho mecânico do compósito em relação ao PLGA puro. [67]. Após imersão em SBF, os compósitos permitiram o desenvolvimento à sua superfície de uma camada rica em Ca-P.

O efeito de revestimentos PCL/nanopartículas de vidro bioativo e PCL/nanopartículas de HA em *scaffolds* de fosfatos de cálcio bifásicos foi analisado [68]. Estes *scaffolds* revelam fraca

1 - Introdução

bioatividade, sendo possível verificar uma melhoria significativa na presença de revestimentos através da formação de uma camada rica em Ca-P após 21 dias de imersão em SBF. A melhoria foi mais acentuada nos revestimentos em que a fase bioativa utilizada foi o vidro.

A formação da camada rica em Ca-P foi também observada por Lei *et al.* [69] em compósitos de PCL e fosfato de tricálcio após 17 dias de imersão em SBF.

Um estudo recente sobre a aplicação de *scaffolds* de PCL/fosfato de tricálcio em ensaios *in vivo* realizados em ovelhas mostrou regeneração óssea em pequenos defeitos realizados na tíbia dos animais [70].

O estudo em SBF de compósitos de vidro bioativo e copolímero poli(caprolactona-DL-láctido) permitiu verificar que, para todas as composições (40%, 60% e 70% de vidro bioativo) ocorreu formação de uma camada rica em Ca-P, sendo essa formação mais acentuada nos compósitos com maior quantidade de partículas de vidro [71].

Compósitos de vidro bioativo e PCL

O interesse em torno dos compósitos de PCL/vidro bioativo surge da necessidade da criação de novos materiais que combinem propriedades bioativas e biodegradáveis para aplicação em regeneração óssea.

O reforço de uma matriz de PCL com partículas de vidro bioativo provoca uma melhoria tanto a nível de propriedades mecânicas como a nível de osteocondutividade do compósito. As partículas bioativas também contribuem para o aumento da hidrofiliabilidade do compósito o que, por sua vez, pode afetar a taxa de hidrólise em meio fisiológico e, eventualmente, induzir uma melhoria na taxa de degradação *in vivo* [7].

O estudo da influência do tamanho de poro em compósitos de PCL/vidro bioativo mostrou a formação de uma camada rica em Ca-P. Poros maiores favoreceram a formação de depósitos ricos em Ca-P. Contudo, em termos de propriedades mecânicas os compósitos com poros de menor dimensão apresentaram melhor resistência à compressão [57,72].

Além do tamanho de poro há outras características que têm influência no desempenho do compósito. Fabbri *et al.* [73] desenvolveram compósitos de PCL/vidro bioativo de modo a averiguar o efeito do solvente e da percentagem de partículas vítreas a nível de microestrutura, de propriedades mecânicas e de bioatividade. Do ponto de vista microestrutural foram observadas diferenças consoante o solvente escolhido tanto a nível de tamanho de poro como a nível de distribuição do tamanho de poro. Para maiores percentagens de vidro (50% em relação a 25%) as superfícies eram mais rugosas. No que diz respeito ao desempenho mecânico foram

1 - Introdução

também verificadas diferenças entre os solventes utilizados e a quantidade de vidro. A ação das partículas vítreas como reforço provocou um aumento da rigidez dos compósitos. Nos ensaios de mineralização *in vitro* foi possível verificar o papel do vidro bioativo na formação da camada rica em Ca-P. Independentemente do solvente utilizado apenas as amostras com mais vidro formaram uma camada por toda a superfície após 4 semanas de imersão em SBF.

As propriedades bioativas bem como as propriedades mecânicas são também afetadas pelo tamanho de partícula. Tamjid *et al.* [7] utilizaram partículas de vidro à escala micrométrica, sub-micrométrica e nanométrica em combinação com o PCL. Após 28 dias de imersão em SBF foi possível verificar a formação de uma camada rica em Ca-P para todos os compósitos independentemente dos tamanhos de partícula. No entanto, quando foram utilizadas partículas nanométricas como fase bioativa verificou-se uma ligeira diminuição da razão Ca/P em relação aos outros tamanhos, atribuído possivelmente, ao fenómeno de aglomeração das nanopartículas. O desempenho mecânico foi substancialmente beneficiado com a introdução de partículas vítreas em relação ao PCL puro.

Lei *et al.* [74] através da técnica de sol-gel sintetizaram partículas de vidro bioativo com tamanho nanométrico para posterior combinação com PCL sob a forma de compósito. Após 7 dias de imersão em SBF foi possível observar a formação de precipitados ricos em Ca-P. A inserção das nanopartículas provocou uma melhoria do desempenho mecânico dos compósitos em relação ao PCL puro.

A adição de diversos óxidos tais como, o óxido de ferro (Fe_2O_3), tem sido estudada na durabilidade de fibras de compósitos de vidro bioativo/PCL. Khan *et al.* [75] propõem uma melhoria significativa a nível propriedades mecânicas dos compósitos em relação ao PCL puro, sendo os valores obtidos para os compósitos muito próximos do osso compacto.

Adicionalmente, Prabhakar e seus colaboradores [76] estudaram a influência da composição vítrea nestes referidos compósitos por alteração do componente cálcio de um determinado sistema vítreo. Verificaram alterações nos perfis de libertação iónica e nas propriedades de degradação dos compósitos.

Em termos de forma das partículas bioativas, alguns autores [77] sugerem que a forma esférica favorece a dispersão uniforme das partículas vítreas na matriz de PCL em relação à forma irregular. A nível de propriedades mecânicas, compósitos com 30% de vidro e partículas esféricas exibem melhores resultados do que compósitos com a mesma quantidade vítrea e partículas irregulares. Em relação ao comportamento bioativo, ambas apresentam formação de uma camada rica em Ca-P após 7 dias de imersão em SBF.

Um estudo recente sobre a resposta biológica de compósitos de vidro bioativo/PCL foi apresentado por Ródenas-Rochina *et al.* [78]. Estudos celulares permitem concluir que estes compósitos suportam o crescimento de células pertencentes a uma linha celular osteoblástica do osteossarcoma (MC3T3-E1), mantendo-se uma elevada viabilidade celular até aos 28 dias de cultura.

Em termos de aplicação para libertação controlada de fármacos, Kim *et al.* [79] relataram uma libertação mais acentuada nas estruturas de PCL com partículas vítreas bioativas em relação ao PCL puro. A viabilidade celular foi comprovada em células osteoblásticas (MG63).

Ensaio *in vivo* realizados em ratos exibem uma boa capacidade de ligação com o tecido ósseo e uma boa biocompatibilidade [80].

1.4 – Técnicas convencionais e técnicas avançadas para desenvolvimento de materiais

As técnicas utilizadas para produção de materiais para aplicação em Engenharia de Tecidos necessitam de obedecer a uma série de requisitos de forma a manter elevados níveis de precisão tanto a nível macroestrutural (resistência mecânica, densidade e porosidade) como a nível microestrutural (tamanho de poro, distribuição e interconectividade dos poros). É essencial que a técnica utilizada não modifique as propriedades dos materiais de forma adversa, como é o caso da biocompatibilidade, permita a obtenção de propriedades adequadas à aplicação final e deve ser precisa e consistente de modo a garantir a reprodutibilidade do processamento e das propriedades [26].

1.4.1 – Técnicas convencionais

Existem diversas metodologias propostas para a preparação de materiais para aplicação em regeneração óssea. Entre as diversas técnicas convencionais utilizadas são exemplos a separação de fases, a formação de espumas, a lixiviação por sal, a difusão de gases sob elevada pressão, a liofilização e a evaporação do solvente. Embora estas técnicas permitam obter vários materiais adequados para aplicação em implantologia, a limitação em termos de forma restringe a sua utilização. Além desta limitação, as técnicas convencionais possuem outras relacionadas com [26]:

- Intervenção manual: a elevada intervenção humana pode proporcionar resultados pouco reprodutíveis.
- Uso de solventes orgânicos: a não remoção completa do solvente dá origem a resíduos que podem ter efeitos nocivos nas células.

1 - Introdução

- Uso de porogénos: a dificuldade em obter uma dispersão uniforme do porogéneo pode dar lugar a estruturas não reprodutíveis.
- Baixas propriedades mecânicas: as formas porosas, por possuírem fracas propriedades mecânicas, têm a sua aplicação restringida em zonas do corpo humano não sujeitas a cargas.

Evaporação do Solvente

A evaporação do solvente tem sido largamente utilizada para a produção de materiais compósitos para aplicação em Engenharia de Tecidos. A técnica consiste na dissolução de um polímero num solvente orgânico e posterior adição de um fase de enchimento que se junta à mistura para conseguir determinadas características (reforço mecânico, carácter bioativo, entre outras). A mistura é depois vazada para um molde para evaporação do solvente [81].

A aplicação desta metodologia não requer equipamento específico, pode ser realizada à temperatura ambiente e aplicada a qualquer polímero, desde que o solvente escolhido seja adequado. As principais desvantagens estão relacionadas com a limitação das formas que se conseguem obter e à possível retenção do solvente no polímero. A evaporação do solvente pode ser um processo demorado [81].

Para a produção de estruturas porosas, este processo pode ser combinado com agentes indutores de porosidade (porogéneos). Neste caso, após a dissolução do polímero, além das partículas de enchimento, são adicionadas partículas inorgânicas que podem ser de cloreto de sódio, tartarato de sódio ou citrato de sódio ou partículas orgânicas tais como sacarose. Após vazamento da mistura e evaporação do solvente, as partículas são retiradas por dissolução. A porosidade é dependente da razão agente porogéneo/polímero e o tamanho de poro da dimensão dos cristais utilizados[22].

Extrusão

A extrusão é uma técnica em que um material fundido é forçado com um fluxo constante permitindo desta forma a obtenção de produtos de secção constante e elevada homogeneidade. O equipamento apresenta diferentes zonas controladas independentemente através de unidades de controlo equipadas com sensores de temperatura (termopares). A admissão do material é feita na zona de alimentação e o material é transportado através de um parafuso, que se encontra no interior do cilindro a uma rotação constante provocando a expulsão do material [82].

1.4.2 – Técnicas avançadas

A introdução de técnicas avançadas como técnicas de fabrico rápido deu início a uma nova era revolucionária no design do produto e na produção industrial. O conceito passa pela aquisição de imagens tridimensionais através de técnicas de imagens médicas, nomeadamente tomografia axial computadorizada (TAC) e ressonância magnética (MRI), posterior conversão das imagens em modelos virtuais através de um *software* CAD (*computer aided design*). De seguida, o modelo virtual é transportado através de um ficheiro para uma máquina de fabrico rápido que constrói o modelo físico pela adição sucessiva de camadas de material [26].

Geralmente estão associadas ao processo de prototipagem rápida para aplicação em Engenharia de Tecidos as seguintes tecnologias, entre outras: Sinterização Seletiva por Laser (SLS), *Fused Filament Fabrication* (FFF) e Impressão Tridimensional (3DP). A tabela 4 mostra as principais diferenças entre estas técnicas.

Tabela 4 – Fatores que diferenciam vários processos de prototipagem rápida (Adaptado de [26]).

Técnica	Vantagens	Limitações
SLS	Elevada porosidade Não utiliza solventes Elevadas propriedades mecânicas	Tamanho de poro limitado Elevadas temperaturas de processamento
FFF	Elevada porosidade Não utiliza solventes Elevadas propriedades mecânicas	Gama de materiais limitada Elevadas temperaturas de processamento
3DP	Elevada porosidade Vasta gama de materiais Processo simples	Utiliza ligantes Baixas propriedades mecânicas

2 – Procedimento Experimental

2 – Procedimento Experimental

Neste capítulo, será feita uma descrição detalhada das várias fases envolvidas na metodologia experimental e apresentar-se-á a seguir as principais técnicas de caracterização de materiais utilizados neste projeto.

Para a produção de compósitos de PCL e vidro bioativo foi necessário preparar e fundir a composição vítrea selecionada, preparar e caracterizar as partículas vítreas bem como caracterizar o PCL. Após esta fase de preparação e caracterização, os compósitos foram desenvolvidos através de duas técnicas distintas: extrusão e evaporação do solvente. Para todas as composições desenvolvidas, foram selecionadas amostras obtidas por ambas as técnicas, de forma a avaliar o potencial bioativo em SBF.

Na figura 6 está representado um esquema do procedimento experimental usado.

2 – Procedimento Experimental

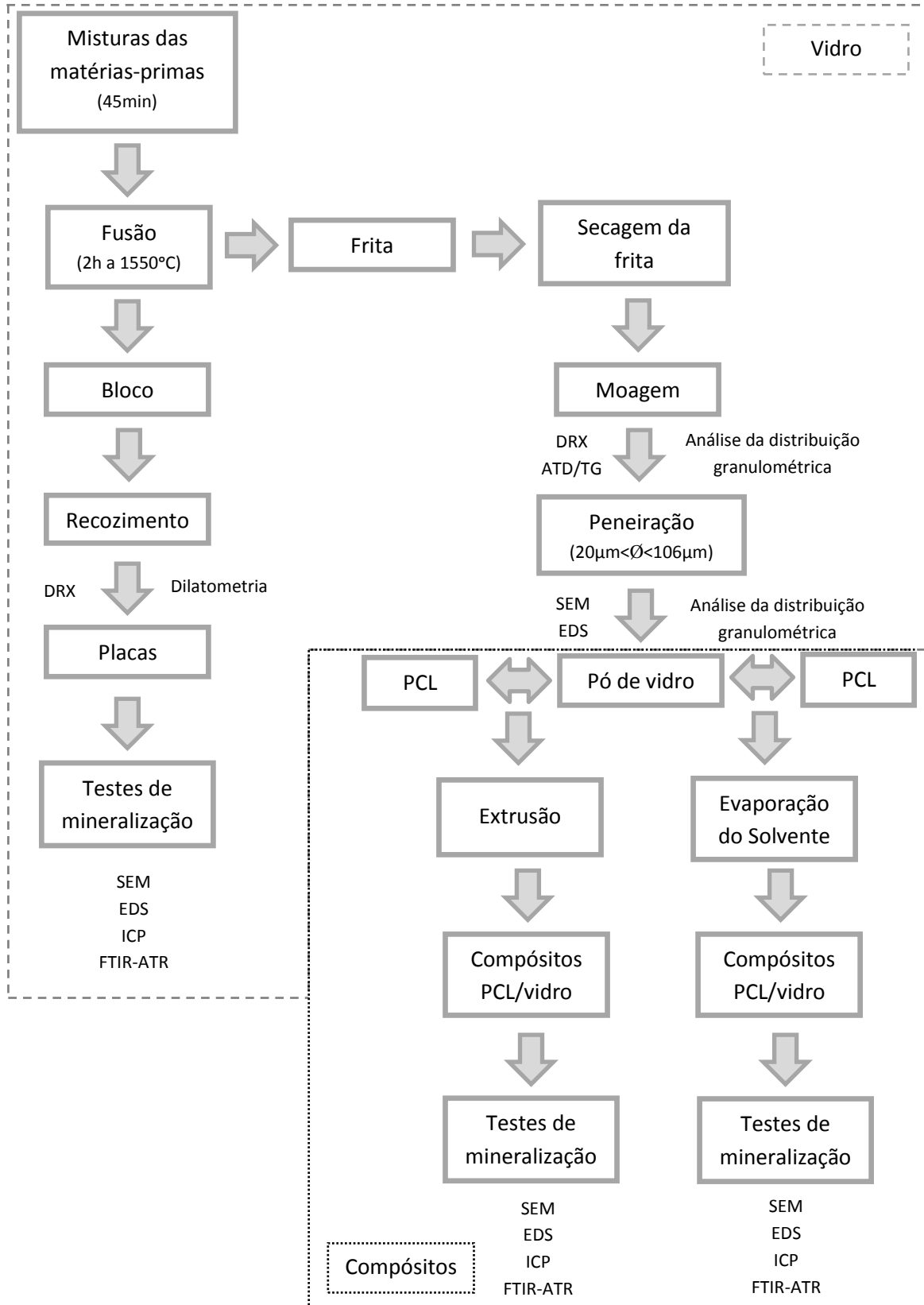


Figura 6 – Esquema resumo do procedimento experimental.

2.1 – Materiais

Os materiais usados neste projeto para a preparação dos compósitos foram o PCL e um vidro bioativo.

O PCL é de origem comercial da marca Sigma-Aldrich e apresenta um peso molecular médio de 45.000 g/mol.

A composição vítrea selecionada pertence ao sistema $3\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-MgO}$ e denomina-se V7, correspondente à composição molar 33.26%CaO-28.07%P₂O₅-23.03%SiO₂-15.64%MgO. A composição V7 no diagrama ternário está representada na figura 7.

As matérias-primas utilizadas para a preparação do vidro foram: fosfato de cálcio monobásico monohidratado da Sigma-Aldrich ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O}$), carbonato de cálcio da Fluka (CaCO_3), óxido de magnésio da Fluka (MgO) e sílica da Sigma-Aldrich (SiO_2).

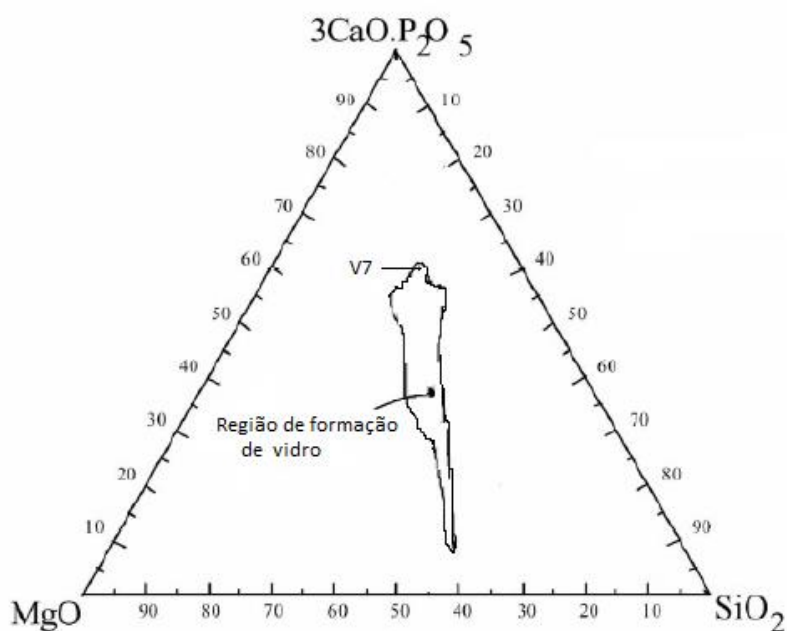


Figura 7 – Diagrama ternário do sistema $3\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-MgO}$.

2.1.1 – Preparação e caracterização do vidro (frita e placas)

Foi efetuada a mistura das matérias-primas, previamente pesadas de acordo com a composição do vidro, com álcool etílico comercial num moinho planetário durante ~45 minutos a 170 rpm. De seguida procedeu-se à secagem da mistura numa estufa a 50°C durante cerca de 48h-72h. Após esta etapa, a mistura foi colocada num cadinho de platina e foi fundida num forno elétrico (Termolab, controlador FP21 da Shimaden) a 1550°C durante 2 horas. O vazamento foi realizado para água de forma a permitir o seu rápido arrefecimento obtendo-se uma frita (~50g)

2 – Procedimento Experimental

que foi colocada a secar numa estufa a 50°C durante 24 horas. Por último, a frita foi analisada por difração de raios-X (DRX) de modo a confirmar a natureza amorfa do vidro. O processo de obtenção de placas de vidro foi semelhante ao descrito anteriormente com a exceção de, neste caso, o vazamento ter sido efetuado para um molde metálico de forma a obter um paralelepípedo.

Depois de efetuadas as fusões, a frita foi sujeita a um processo de moagem no moinho Retsch-RM 10 que permitiu a obtenção do pó de vidro. Foram utilizadas cargas de forma a obter cerca de 30g de vidro, e a moagem foi feita a seco.

De forma a avaliar a influência do tempo de moagem no tamanho de partícula fez-se um estudo prévio sujeitando as partículas de vidro a diferentes tempos de moagem (até 130 minutos). Após este passo, as partículas foram separadas em duas frações utilizando telas de 106 µm e de 20 µm. As frações foram designadas de grossos (G), $20\ \mu\text{m} < G < 106\ \mu\text{m}$, e finos (F), $F < 20\ \mu\text{m}$. Posteriormente foi analisada a distribuição granulométrica num equipamento Coulter Counter e a área superficial específica através da isotérmica de adsorção de Brunauer, Emmett e Tellerum (BET). A análise química dos elementos presentes no pó de vidro foi realizada por espectrometria de dispersão de energias de raios-X (EDS) e a caracterização morfológica através de microscopia eletrónica de varrimento (SEM).

Com base na análise térmica diferencial (ATD) efetuada o bloco de vidro foi submetido a um recozimento num forno Eurotherm 2116 da Termolab, com um programa de temperatura pré-estabelecido. Procedeu-se ao corte do vidro numa máquina de corte Struers Secotom – 10 com disco diamantado a velocidade de rotação de 2000 rpm. As amostras obtidas apresentavam dimensões de $10 \times 10 \times 2.5\ \text{mm}^3$. Seguiu-se o polimento numa polidora Struers RotoPol – 11 com velocidade máxima de 300 rpm. As amostras foram polidas com lixas de granulometria sucessivamente mais finas (P#180, P#320, P#500, P#800, P#1200) e o acabamento foi efetuado com panos de veludo molhados com pasta de diamante (15 µm, 6 µm e 3 µm).

2.1.2 – Caracterização do PCL

O PCL foi sujeito a uma análise térmica através da calorimetria diferencial de varrimento (DSC) de forma a determinar a cristalinidade da sua matriz. Foram utilizadas quatro amostras previamente pesadas e aquecidas a diferentes taxas de aquecimento, tal como indica a tabela 5.

2 – Procedimento Experimental

Tabela 5 – Massa das amostras de PCL e respetiva taxa de aquecimento.

Massa (g)	Taxa de aquecimento (°C.min ⁻¹)
0.0101	5
0.0094	10
0.0090	20
0.0087	40

Para determinação das transições térmicas do PCL, as amostras foram sujeitas a um arrefecimento até -80°C e os ensaios decorreram a diferentes taxas de aquecimento (tabela 5) até 120°C. As curvas térmicas obtidas foram utilizadas para calcular as entalpias ΔH que permitem determinar o grau de cristalinidade da matriz de PCL através da seguinte equação:

$$\chi = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_f \text{ (PCL 100\% cristalino)}} \quad (1)$$

onde:

- ΔH_f , entalpia de fusão da amostra (J/g),
- $\Delta H_f \text{ (PCL 100\% cristalino)}$, entalpia de fusão associada ao PCL 100% cristalino (139.5 J/g [83]).

2.2 – Produção dos compósitos de PCL e vidro bioativo

Para a produção dos compósitos de PCL/vidro bioativo foram utilizadas duas técnicas distintas: extrusão e evaporação do solvente.

Foram estabelecidas sete frações vítreas diferentes para processamento por ambas as técnicas como representado na tabela 6.

2 – Procedimento Experimental

Tabela 6 – Percentagem de vidro bioativo utilizada na produção dos compósitos.

Identificação	Formulação	Tamanho de partícula
PCL	0%	-
PCL10G	10% partículas grossas	$20\ \mu\text{m} < G < 106\ \mu\text{m}$
PCL30G	30% partículas grossas	$20\ \mu\text{m} < G < 106\ \mu\text{m}$
PCL10F	10% partículas finas	$F < 20\ \mu\text{m}$
PCL30F	30% partículas finas	$F < 20\ \mu\text{m}$
PCL5G5F	5% partículas grossas e 5% partículas finas	$20\ \mu\text{m} < G < 106\ \mu\text{m}$ $F < 20\ \mu\text{m}$
PCL15G15F	15% partículas grossas e 15% partículas finas	$20\ \mu\text{m} < G < 106\ \mu\text{m}$ $F < 20\ \mu\text{m}$

Processamento por extrusão

A extrusora usada no trabalho (figura 8) é constituída por um cilindro, aquecido por três resistências (zona 1, zona 2 e zona 3) que permitem adequar o perfil de temperaturas a cada material. A zona de saída é constituída por uma feira, onde se encontra uma quarta resistência que tem como objetivo evitar a solidificação do material no interior desta, mantendo a temperatura controlada até à sua expulsão.

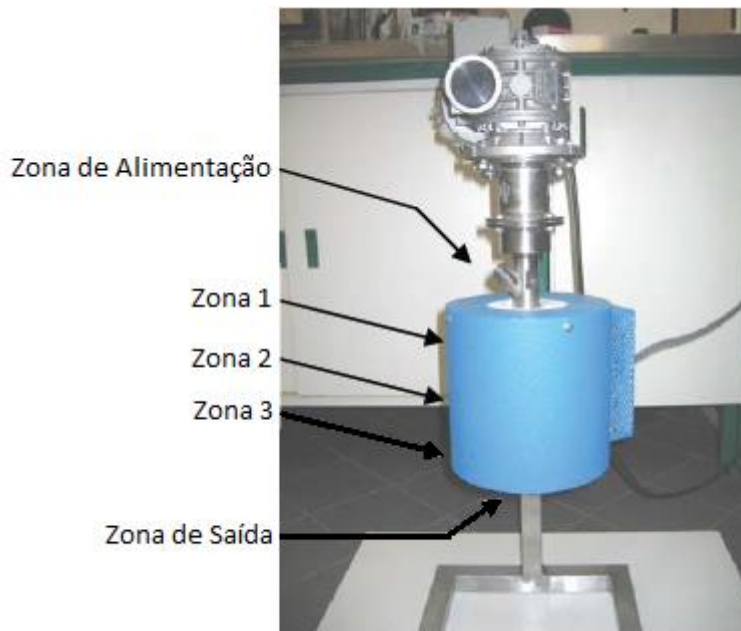


Figura 8 – Mini-extrusora.

2 – Procedimento Experimental

A mistura de PCL com vidro foi extrudada a uma velocidade de rotação do fuso de 25-30 rpm, tomando por base os perfis de temperatura indicados na tabela 7 e no gráfico da figura 9. A admissão da mistura à extrusora foi feita através de um funil inserido na zona de alimentação.

Tabela 7 – Perfis de temperaturas utilizados na extrusão dos compósitos.

Zona da extrusora	Temperatura (°C)
Zona 1	55
Zona 2	65
Zona 3	55
Zona de Saída	50

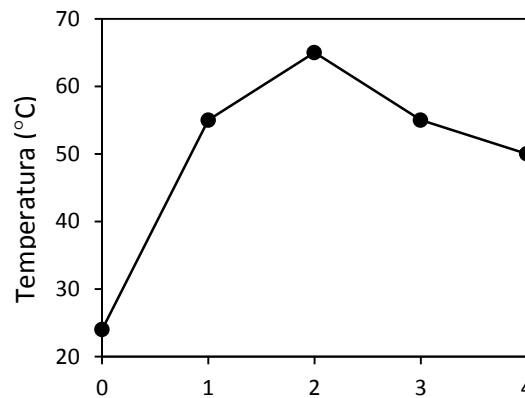


Figura 9 – Gráfico do perfil de temperatura utilizados na extrusão.

Após extrusão, os compósitos obtidos foram cortados em espécimes cilíndricas com cerca de 10 mm de altura e 2.5 mm de espessura, que foram sujeitos a uma prensagem a quente de modo a proporcionar a obtenção de superfícies planas. As placas obtidas foram cortadas de forma a conseguir amostras com 10x10x0.3 mm³. Todas as amostras foram sujeitas a um polimento (P#1200) e nos vários estudos foram utilizadas placas com e sem polimento de todas as composições.

Processamento por evaporação do solvente

Para produzir compósitos pela técnica evaporação do solvente o polímero foi previamente dissolvido em clorofórmio (Carlo Ebra) à temperatura ambiente sob agitação magnética durante cerca de 20 minutos. Utilizou-se 7% (m/v) de PCL em relação ao sistema PCL/clorofórmio. Seguidamente procedeu-se à adição das partículas de vidro bioativo nas

respetivas formulações (indicadas na tabela 6), mantendo-se o sistema sob agitação magnética à temperatura ambiente por mais 20 minutos. A solução foi sujeita a agitação em ultrassons durante 1 minuto e vazada em caixas de Petri com 7.5 cm de diâmetro. A evaporação do solvente deu-se a 37.5°C durante 12 horas. Os filmes compósitos obtidos foram cortados em placas com cerca de 10x10mm² com espessuras de 0.3 mm e 0.7 mm.

2.3 – Testes de mineralização em SBF

Com vista à realização de testes de mineralização as amostras foram imersas em SBF que foi preparado de acordo com o proposto por Kokubo [48] (tabela 8).

Os reagentes foram colocados pela ordem indicada na tabela 8 em 1 litro de água desionizada a 36,5 ± 0,5°C e sob agitação. Cada reagente foi adicionado lentamente e apenas quando o anterior se encontrava completamente dissolvido, de forma a evitar precipitações. O reagente 9 provoca um aumento do pH, sendo necessário ajustar o seu valor para valores próximos do pH do plasma humano (~7.4) através da adição de ácido clorídrico (HCl).

Tabela 8 – Ordem, fórmula química, marca e quantidade dos reagentes utilizados para preparação de 1 litro.

Ordem	Reagente	Marca	Quantidade (g)
1	NaCl	Panreac	7.996
2	NaHCO ₃	Riedel-de Haën (Sigma-Aldrich)	0.350
3	KCl	Riedel-de Haën (Sigma-Aldrich)	0.224
4	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	Calbiochem	0.228
5	MgCl ₂ ·6H ₂ O	Riedel-de Haën (Sigma-Aldrich)	0.305
6	HCl (1M)	Panreac	até 40ml
7	MgCl ₂ ·6H ₂ O	Fluka	0.548
8	CaCl ₂ ·6H ₂ O	Panreac	0.071
9	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃	Merck	6.057

O volume de SBF recomendado por Kokubo [48] para um ensaio de bioatividade deverá ser maior que o volume mínimo V_s , calculado pela equação (2), onde S_a é a área superficial aparente (mm²):

$$V_s = \frac{S_a}{10} \quad (2)$$

2 – Procedimento Experimental

Nestes ensaios foram utilizados 30ml de SBF em frascos plásticos previamente esterilizados (15min, radiação ultravioleta). As amostras foram imersas durante 1h, 3h, 5h, 8h, 1, 3, 7, 14 e 21 dias à temperatura de 37°C.

Para cada tempo de imersão foi medido o pH da solução de SBF com um medidor de pH Orion 420A.

O SBF residual foi guardado a -4°C para posterior análise por espectrometria de emissão por plasma induzido acoplado (ICP) de forma a averiguar a concentração iónica de algumas espécies em solução.

As amostras retiradas dos banhos de imersão depois dos tempos determinados foram observadas por SEM/EDS e analisadas por Espectroscopia de Infravermelho com Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR).

2.4 – Técnicas para caracterização de materiais

Para o desenvolvimento do processo experimental foi fundamental a utilização das técnicas de caracterização abaixo abordadas.

2.4.1 – Difração de Raios-X (DRX)

A análise cristalográfica dos materiais foi realizada através de difração de raios X (DRX) utilizando um difractómetro de raios-X Rigaku Geigerflex Dmax-C, equipado com monocromador curvo de grafite, que utiliza radiação $\text{CuK}\alpha$.

2.4.2 – Análise da Distribuição Granulométrica

A avaliação do tamanho e distribuição granulométrica dos pós de vidro foi feita no equipamento Coulter LS Particle Size Analyser 230.

2.4.3 – Isotérmica de adsorção de Brunauer, Emmett e Tellerum (BET)

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

2.4.4 – Análise Térmica Diferencial (ATD) e Termogravimétrica (TG)

As análises térmicas realizadas ao vidro tiveram como objetivo compreender o comportamento do material quando sujeito a um programa de aquecimento controlado. Foi

utilizado o equipamento Seteram Labsys ATD/TG-DSC e uma velocidade de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, no intervalo de 50°C a 1000°C .

2.4.5 – Análise Dilatométrica

A variação dimensional das placas vítreas, com a temperatura, foi caracterizada por dilatometria até 800°C , a uma taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Esta técnica consiste na medição das variações dimensionais da amostra com a temperatura. O equipamento utilizado foi um dilatômetro horizontal Bahr Thermo Analyse.

2.4.6 – Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM)

A observação da superfície das amostras foi efetuada através de um microscópio eletrônico de varrimento (SEM) da Hitachi modelo S4100 associado a um equipamento de espectrometria de dispersão de energias de raios-X (EDS) que permite efetuar a análise química dos elementos presentes na amostra.

2.4.7 – Espectrometria de Emissão por Plasma Induzido Acoplado (ICP)

Após imersão, o SBF foi analisado por ICP de forma a determinar as concentrações dos íons cálcio, fósforo, magnésio e silício num espectrômetro Jobin-Yvon JY70 Plus.

2.4.8 – Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)

Para determinação das transições térmicas do PCL recorreu-se à calorimetria diferencial de varrimento num espectrômetro Shimadzu DSC 60.

2.4.9 – Espectroscopia de Infravermelho com Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)

De forma a determinar os grupos funcionais presentes nas amostras, foi utilizada a espectroscopia de infravermelho com refletância total atenuada. As amostras foram colocadas numa célula de germânio sem qualquer tratamento prévio. Os espectros de FTIR foram obtidos num espectrômetro Bruker Tensor 27, num intervalo de 1400 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} .

3 – Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos na preparação e caracterização do vidro (frita e placas), na caracterização do PCL e preparação e caracterização dos compósitos de PCL/vidro bioativo.

3.1 – Caracterização do vidro (frita e placas)

Após a fusão da composição vítrea V7 anteriormente mencionada, procedeu-se à preparação de pós de vidro e sua caracterização.

A natureza amorfa da frita foi confirmada por DRX, conforme indicado na figura 10.

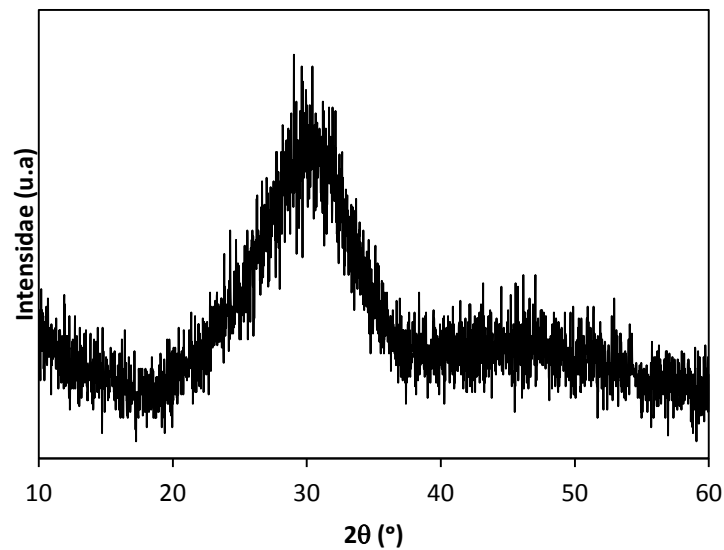


Figura 10 – Resultado de DRX para a composição V7 da frita.

Do modo a preparar pós com uma granulometria controlada foi realizado um estudo de moagem para determinar qual o efeito do tempo de moagem na distribuição do tamanho de partícula (figura 11). Esta composição apresenta uma forte tendência para aglomeração devido ao carácter higroscópico do V7, o que dificulta a obtenção de partículas de tamanho reduzido. Como esperado, a figura 11 mostra que o tamanho médio de partícula diminui com o tempo de moagem até aproximadamente 130 minutos. Para tempos de moagem superiores a 70 minutos a eficiência do processo de moagem é muito baixa e o tamanho médio de partícula tende a não se alterar. Por esta razão, as fritas usadas no trabalho foram sujeitas a um tempo de moagem de 105 minutos. Os tamanhos médios de partículas para cada tempo de moagem foram determinados num equipamento Coulter Counter.

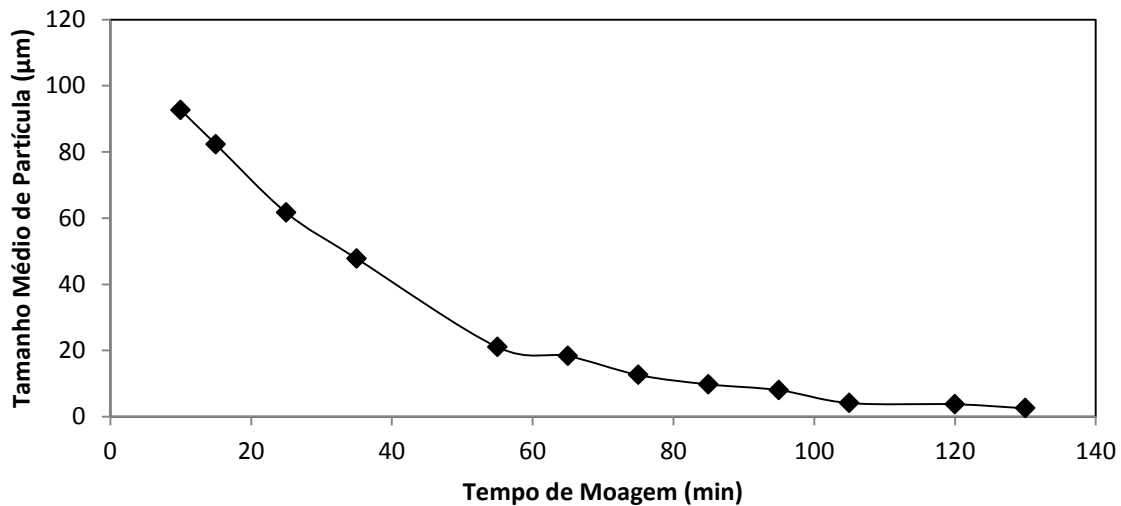


Figura 11 – Evolução do tempo de moagem com o tamanho médio de partícula.

Após este processo, os pós foram separados em duas frações consoante o tamanho médio e classificados entre grossos e finos. Frações com um tamanho médio de partícula de 61.66 μm ($20 \mu\text{m} < G < 106 \mu\text{m}$) e com uma área superficial específica de $3.00 \text{ m}^2/\text{g}$ foram designadas por “grossos (G)” e aquelas que apresentam um tamanho médio de partícula de $4.134 \mu\text{m}$ ($F < 20 \mu\text{m}$) e uma área superficial específica de $13.25 \text{ m}^2/\text{g}$ (figura 12) designadas por “finos (F)”.

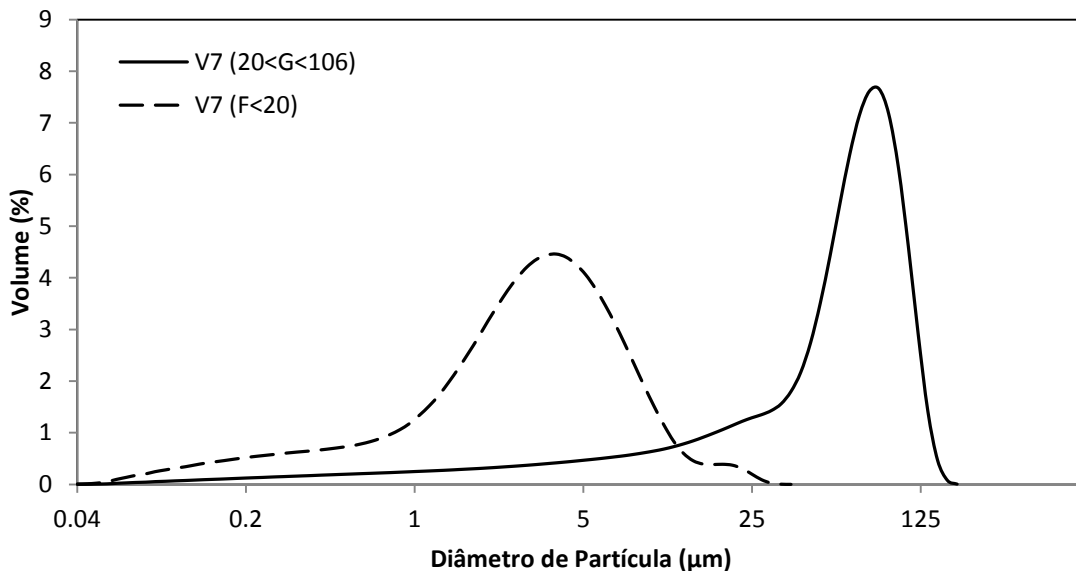


Figura 12 – Distribuição granulométrica dos pós da composição V7.

Após o processo de moagem, as partículas foram observadas em SEM sendo possível verificar as suas formas irregulares e alguma tendência para aglomerar nas partículas finas (figura 13). Através do EDS confirmou-se a constituição química das partículas de vidro: cálcio, fósforo,

silício e magnésio (Ca, P, Si e Mg). Confirmou-se também por análise quantitativa a inexistência da perda de fósforo durante a fusão do vidro, que por vezes ocorre em fundidos com P_2O_5 .

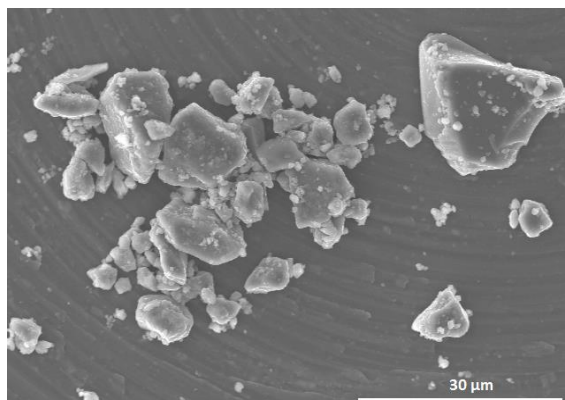


Figura 13 – Micrografias obtidas por SEM para os pós vidro.

Tendo sido produzidas placas de vidro e de forma a confirmar a natureza amorfa destas, procedeu-se à análise das placas por DRX (figura 14a). A existência de pequenas alterações na curva de DRX (quando comparada com a curva apresentada na figura 10), e de forma a esclarecer a possível ocorrência do fenómeno de cristalização insipiente, procedeu-se à realização do FTIR (figura 14b). Dada a largura das bandas do FTIR (largas) é possível assumir a não ocorrência de fenómenos de cristalização. A discussão e indicação das bandas será realizada na secção 3.3.1.

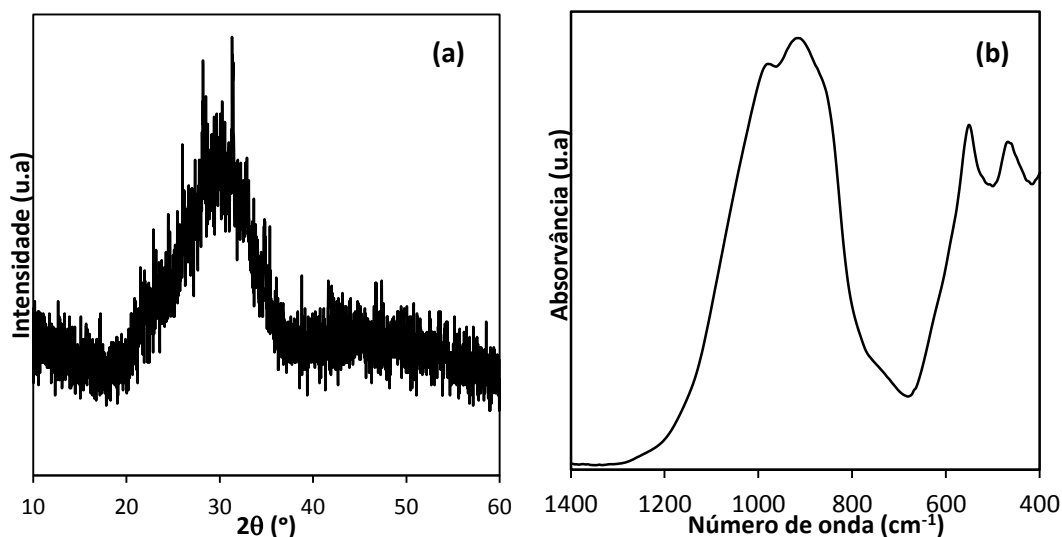


Figura 14 – Caracterização das placas de vidro por DRX (a) e FTIR (b).

A observação das placas de V7 em SEM (figura 15) evidencia na superfície do vidro separação de fases como resultado de uma imiscibilidade líquido-líquido, com fases dispersas de

estruturas convolutas de tipo “morular” ou “amora”. Em trabalhos realizados no sistema $3\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2-\text{MgO}$, Oliveira *et al.* [44], observaram a presença de mórulas amorfas e ricas em silício. Existem várias opiniões para o mecanismo de formação de mórulas, não estando o processo ainda completamente compreendido, mas é conhecido que este tipo de morfologia é apenas observado em sistemas ternários ou mais complexos.

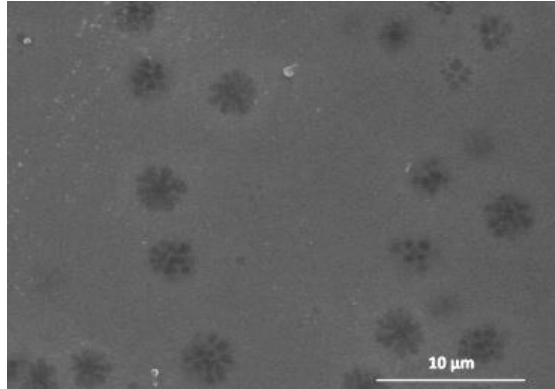


Figura 15 – Micrografia obtidas por SEM para as placas de vidro.

A figura 16 representa a curva de ATD do vidro V7 (sob a forma de pó) obtida a uma taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Os dois picos exotérmicos encontrados a $\sim 835^\circ\text{C}$ e $\sim 925^\circ\text{C}$ estão associados a fenômenos de cristalização. A baixa qualidade da linha de base não permite a identificação clara da temperatura de transição vítrea. A curva de termogravimetria (TG) mostra uma perda de massa até aproximadamente 600°C .

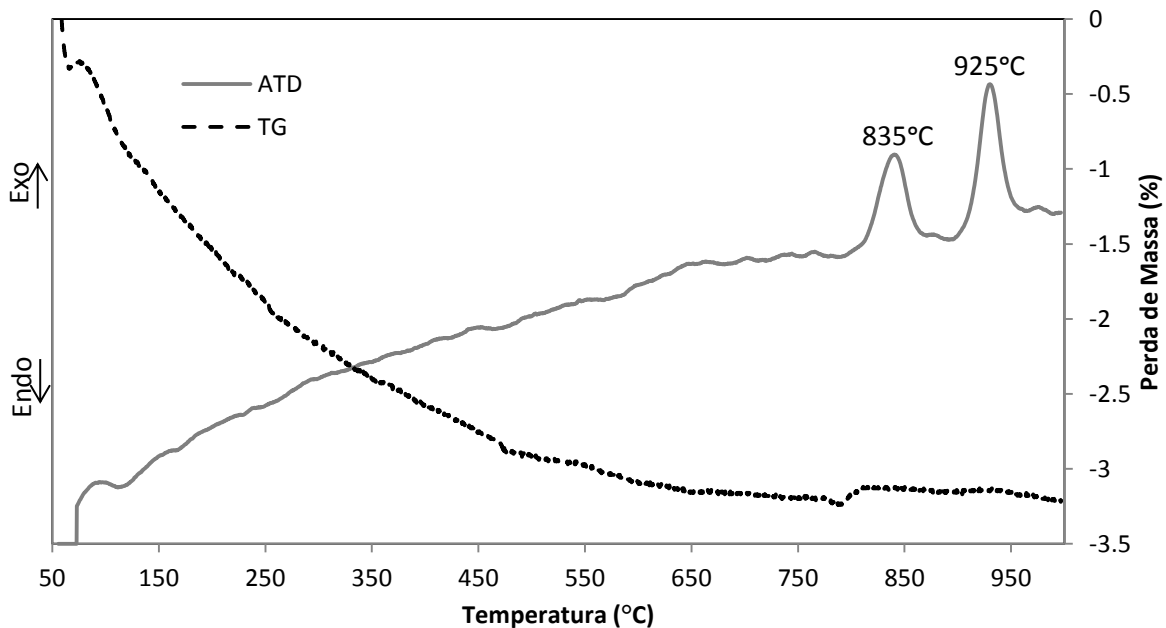


Figura 16 – Análise térmica diferencial e termogravimetria do V7.

A figura 17 representa a curva da análise dilatométrica de um compacto de vidro aquecido a uma temperatura de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Este ensaio foi interrompido aos 780°C altura em que o vidro tinha amolecido. A identificação da temperatura de transição vítrea não é clara, e à semelhança do que ocorreu no ensaio de ATD, a curva base é de reduzida qualidade. O pico registado a 748°C é referente à temperatura de amolecimento do vidro V7.

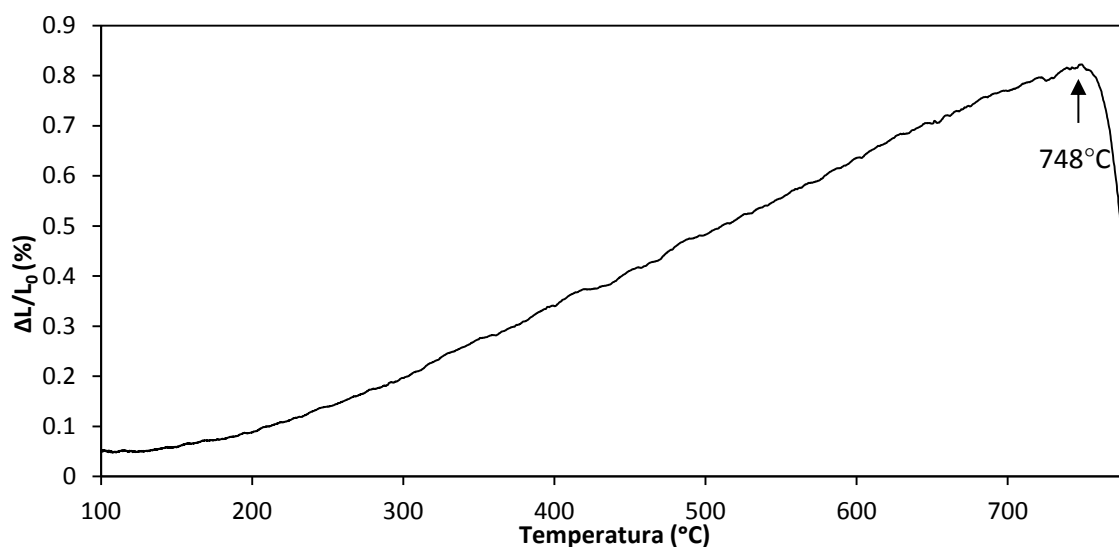


Figura 17 – Análise dilatométrica de um compacto de V7.

3.2 – Caracterização da matriz de PCL

A fim de se avaliar a cristalinidade do polímero realizou-se um DSC. A partir da figura 18 pode observar-se as transições térmicas do polímero a diferentes taxas de aquecimento.

As temperaturas de transição vítrea (T_g) foram determinadas pela interceção de duas tangentes à curva. Já as temperaturas de fusão (T_f) foram associadas à ocorrência de reações endotérmicas. Os resultados são apresentados na tabela 9.

Tabela 9 – Resultados referentes às temperaturas de fusão e de transição vítrea do PCL obtidas por DSC.

Taxa de aquecimento ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$)	T_g ($^{\circ}\text{C}$)	T_f ($^{\circ}\text{C}$)
5	-70	60
10	-70	63
20	-65	68
40	-58	76

3 – Resultados e Discussão

De acordo com esta informação, é possível apurar que tanto a T_g como a T_f aumentam com o aumento da taxa de aquecimento. Consideraram-se T_g 's e T_f 's obtidas no segundo varrimento, dado que, alguns autores indicam esta forma como sendo a mais exata, uma vez que, ao efetuar um segundo varrimento nas amostras, a história térmica do polímero é eliminada, diminuindo assim, o ruído [84].

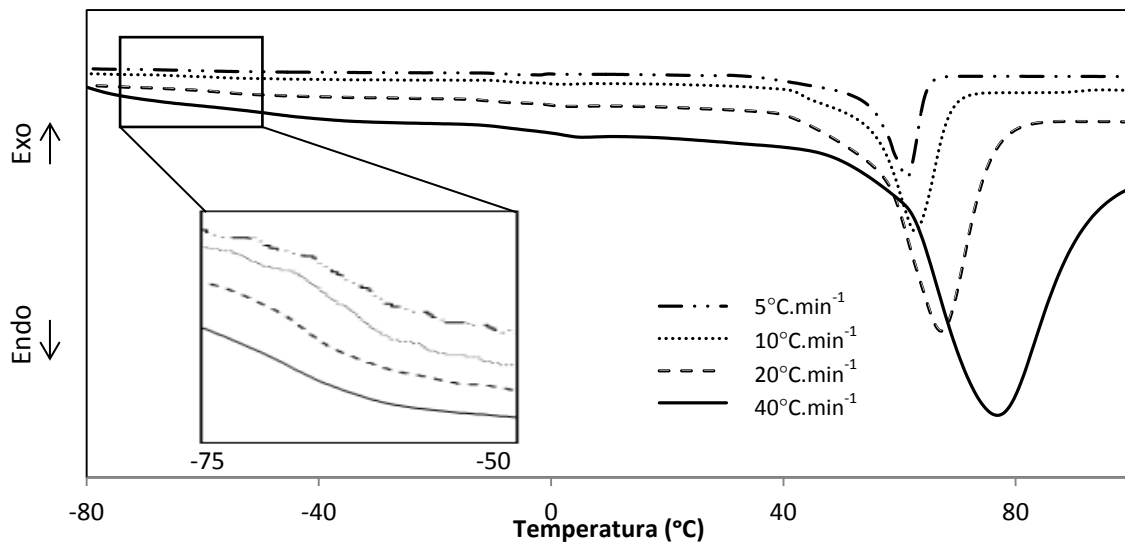


Figura 18 – Termograma de DSC do PCL.

O grau de cristalinidade da matriz de PCL foi calculado de acordo com a equação (1) e a sua variação com o tempo está ilustrada na figura 19. Os valores calculados para a cristalinidade estão registados na tabela 10.

Tabela 10 – Evolução da cristalinidade do PCL com a taxa de aquecimento.

Taxa de aquecimento ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$)	Cristalinidade (%)
5	57
10	50
20	51
40	43

Pode verificar-se que, à medida que a taxa de aquecimento aumenta, o grau de cristalinidade diminui, o que se deve a efeitos decorrentes do rearranjo das cadeias moleculares.

A linha a tracejado na figura 18 é uma guia visual e indica que a percentagem de cristalinidade tende a diminuir com o aumento da taxa de aquecimento. O aumento da cristalinidade da matriz polimérica está relacionado com a maior percentagem de cadeias

alinhadas na matriz. Ora, quanto mais elevada a taxa de aquecimento menor a capacidade das cadeias de arrumarem e estabelecerem ligações entre elas.

A diminuição da cristalinidade da matriz polimérica com o aumento da taxa de aquecimento foi igualmente observada por alguns autores [83,85,86].

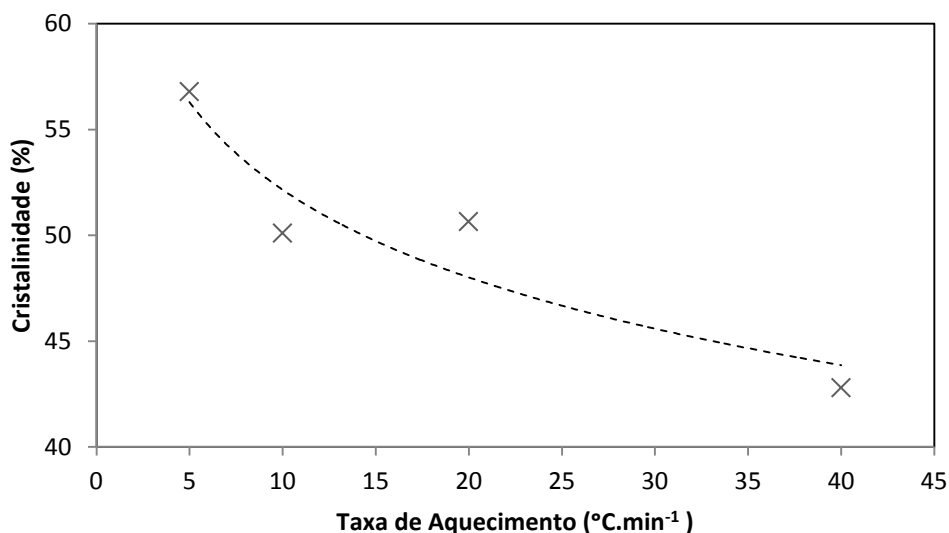


Figura 19 – Variação da cristalinidade do PCL com a taxa de aquecimento.

3.3 – Testes de mineralização em SBF

O potencial bioativo das placas de V7 e dos compósitos produzidos por extrusão e evaporação do solvente foi testado em SBF para os tempos de 0h, 1h, 1, 3, 7, 14 e 21 dias. No caso dos compósitos produzidos por evaporação do solvente foram ainda testados tempos de 3h, 5h e 8h. Tal como já foi referido, a bioatividade é definida como a capacidade de formar ligações químicas com o tecido ósseo aferida, em testes *in vitro* em meio acelular, através da formação de uma camada rica em Ca-P. Estes testes permitem verificar as alterações tanto a nível topográfico como a nível de composição química do fluido fisiológico de imersão.

Nesta secção serão apresentados em primeiro lugar os resultados referentes à observação por SEM da superfície do material após vários tempos de imersão, complementada com a análise química semi-quantitativa por EDS dos precipitados formados sobre o vidro e sobre os compósitos. Seguem-se os resultados da análise por ICP das variações das concentrações dos iões Ca, P, Mg e Si na solução de SBF em função do tempo de imersão. Por fim, apresentar-se-ão os resultados da caracterização por FTIR-ATR dos precipitados formados sobre o vidro e compósitos.

Para realização de ICP e do FTIR-ATR dos compósitos foram selecionadas duas composições: PCL e PCL30G.

3.3.1 – Análise da superfície e das alterações iônicas das placas de V7

A figura 20 mostra as micrografias obtidas por SEM para as placas de vidro após imersão em SBF.

Após a primeira hora de imersão é possível notar algumas alterações na superfície da amostra decorrentes na dissolução do vidro para a solução. O EDS revela uma pequena diminuição da razão Ca/P (1.5 para 1.29), indicando uma dissolução preferencial de cálcio em relação ao fósforo.

Com 1 dia de imersão é visível a formação de pequenos depósitos que se verificou serem constituídos por Ca-P. A análise química por EDS destas formações mostra um aumento da razão Ca/P para 1.33 que é o valor para o fosfato octacálcico (OCP), $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca/P}=1.33$. Este fosfato de cálcio que tem sido referido como fase precursora da HA na mineralização óssea [87].

Estes depósitos de Ca-P aumentam, e ao fim de 3 dias de imersão e a razão Ca/P situa-se nos 1.45.

Ao fim de 7 dias toda a superfície está coberta por uma camada de Ca-P, sendo a razão de 1.61. Observam-se algumas fissuras na camada.

Com 14 dias de imersão observa-se a existência de fissuras na camada de Ca-P. O valor da razão Ca/P situa-se em 1.63.

Após 21 dias é visível a formação de cristais de fosfato de cálcio, sendo a morfologia dos precipitados similar à da HA e a razão Ca/P de 1.65 aproximando-se da HA (1.67) [87].

3 – Resultados e Discussão

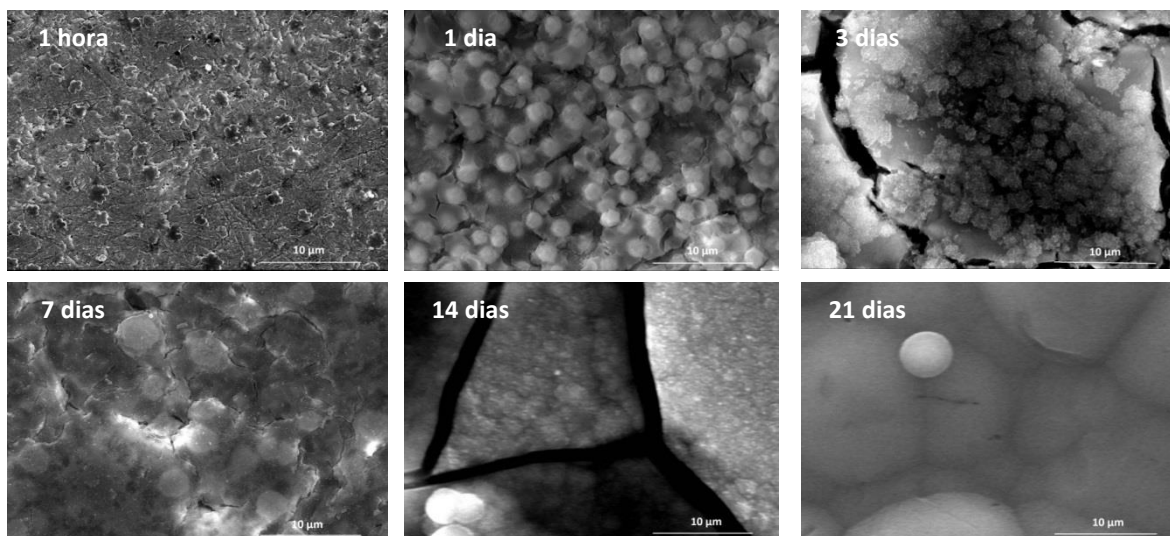


Figura 20 – Micrografias de SEM para amostras de V7 em placa para os diferentes tempos de imersão.

Na figura 21 apresentam-se os valores da razão Ca/P determinados por análise de EDS sobre a superfície das amostras imersas em SBF para os tempos 0, 1h, 1 (24h), 3 (72h), 7 (168h), 14 (336h) e 21 (504h) dias.

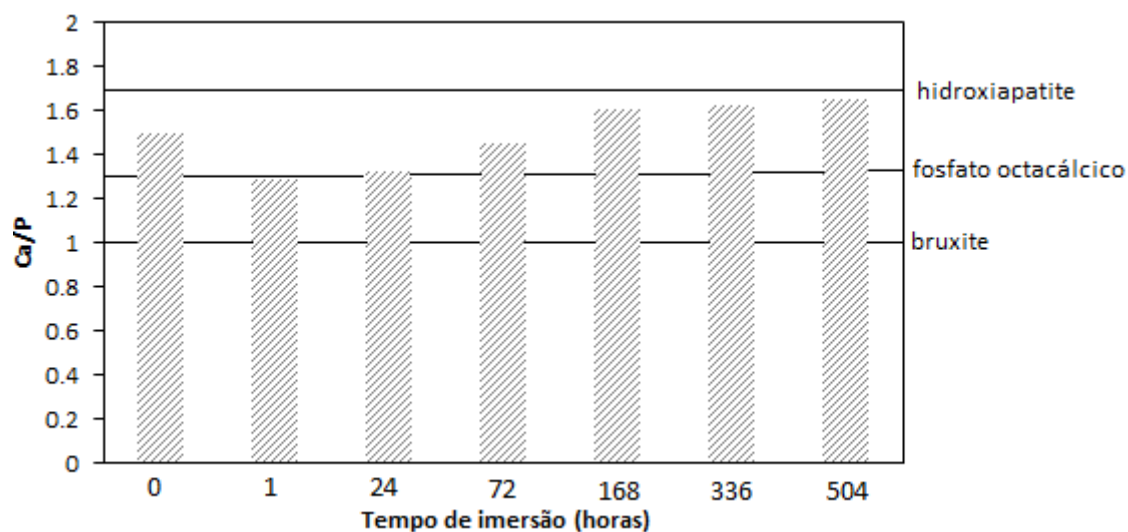
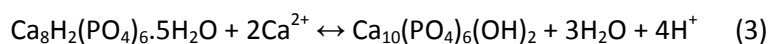


Figura 21 – Evolução da razão Ca/P nos precipitados sobre a superfície das placas de V7 após vários tempos de imersão em SBF.

É possível que com o aumento do tempo de imersão ocorra a transformação de OCP em HA devido ao consumo dos íons de Ca^{2+} da solução. Esta transformação pode ser traduzida pela seguinte reação [7]:



Na figura 22 estão representados os gráficos da variação da concentração na solução de SBF dos íons Si, Mg, Ca e P, determinada por ICP, para os vários tempos de imersão.

A imersão das placas de vidro em SBF dá origem à dissolução de todos os íons do vidro (Si^{4+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} e P^{5+}) para a solução. É possível observar que a dissolução contínua de íons silício a magnésio (figura 22a) apresenta a mesma tendência com o tempo de imersão. Por sua vez, a concentração dos íons cálcio e fósforo no SBF (figura 22b), atinge um máximo ao fim do primeiro dia de imersão indicando a dissolução do vidro, observando-se a partir desse período a diminuição da concentração destes íons em solução, presumivelmente por precipitação sob a forma de um fosfato de cálcio na superfície do vidro. Observa-se também que o consumo destes íons da solução segue a mesma tendência ao longo do tempo. Esta diminuição pode estar associada à formação de precipitados, tal como sugerido pelas micrografias obtidas por SEM (figura 20).

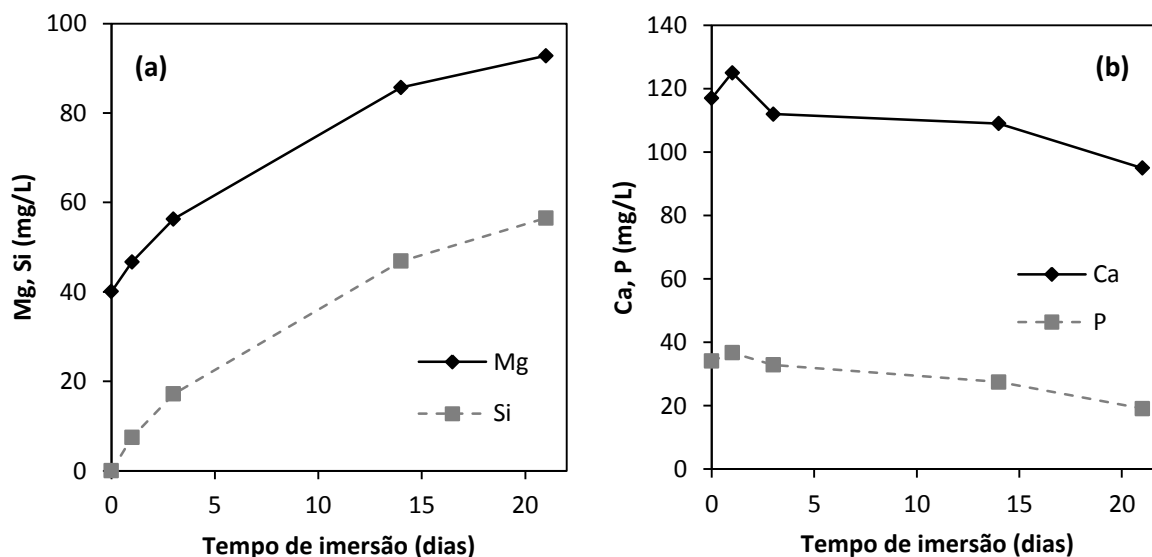


Figura 22 – Variação da concentração elementar da solução de SBF nos íons Si e Mg (a) e em Ca e P (b).

A figura 23 apresenta o gráfico da variação do pH com o tempo de imersão. Verificando-se um claro aumento até tempos de imersão de 7 dias e uma tendência para estabilizar entre 8.2-8.4 entre 7 e 21 dias. Esse aumento progressivo favorece a deposição da camada de HA na superfície das placas. É sabido que em sistemas fisiológicos a HA é o fosfato de cálcio mais estável a pH acima de 4.2, sendo a sua precipitação favorecida à medida que aumenta o pH do meio [87].

3 – Resultados e Discussão

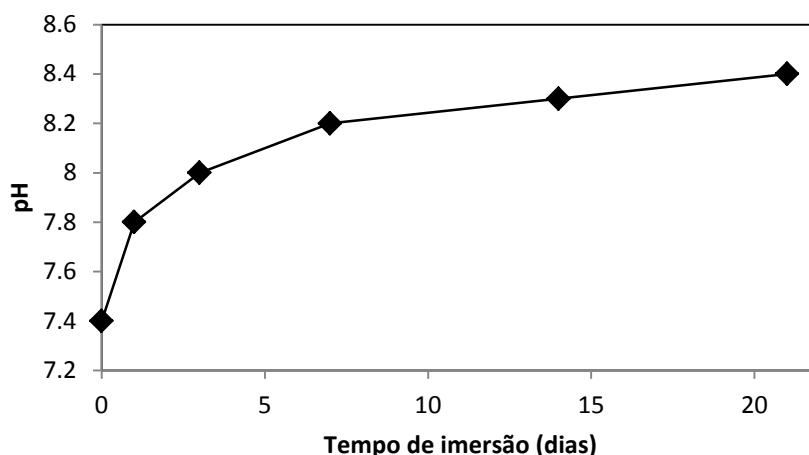


Figura 23 – Variação dos valores do pH da solução de SBF, após vários dias de imersão.

As alterações superficiais ocorridas sobre o vidro após imersão em SBF foram estudadas por FTIR-ATR (figura 24). Para efeitos de comparação foi também analisada uma amostra de vidro sem imersão.

As principais bandas observadas estão identificadas na tabela 11.

É possível verificar que com o decorrer do tempo as bandas se vão individualizando, tornando-se mais estreitas, o que indica a perda progressiva de amorficidade.

As bandas presentes entre 980 cm^{-1} e 1055 cm^{-1} são atribuídas às vibrações das ligações Si–O⁻, oxigénios não ligantes resultantes da presença de iões alcalinos e/ou alcalino-terrosos na rede vítrea [88,89].

As bandas existentes entre 800 cm^{-1} e 890 cm^{-1} são atribuídas à vibração C–O do grupo carbonato e são características da formação da camada de Ca-P [42,90]. No entanto, as bandas situadas entre 720 cm^{-1} e 840 cm^{-1} podem pertencer ao modo estiramento das ligações Si–O–Si de oxigénios ligantes entre tetraedros. Estas bandas são típicas da formação da camada de sílica gel [91].

As bandas reveladas a baixos números de onda (550 cm^{-1} a 560 cm^{-1}) são atribuídas às vibrações do modo de flexão da ligação P–O. A banda para o tempo de imersão de 21 dias a 602 cm^{-1} , correspondente ao início da cristalização deste fosfato [42,90].

As bandas correspondentes a menores números de onda (inferiores a 480 cm^{-1}) são atribuídas a vibrações correspondentes ao modo de flexão das ligações Si–O–Si [42].

3 – Resultados e Discussão

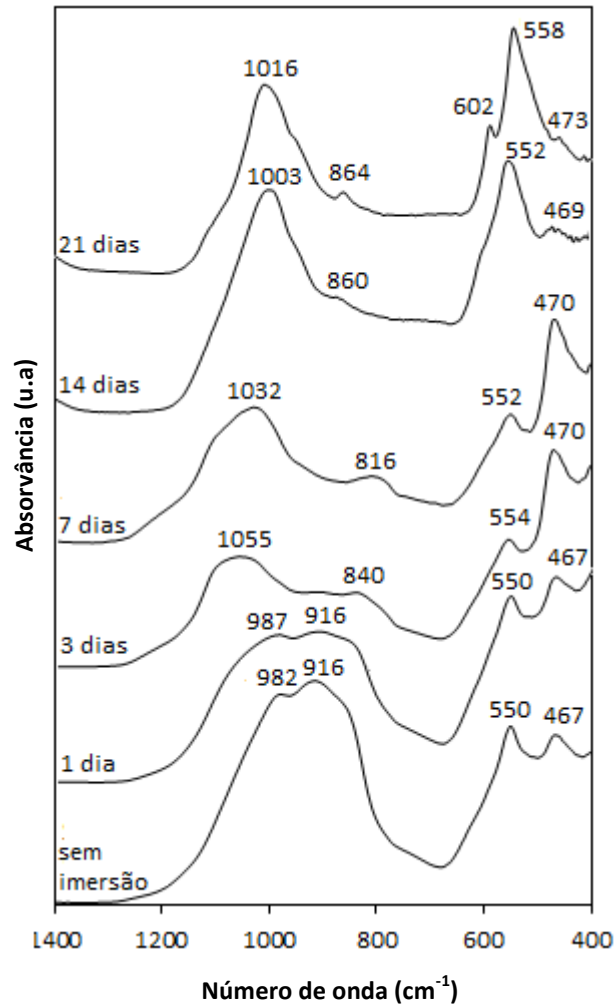


Figura 24 – Espectro de FTIR-ATR do vidro após diferentes tempos de imersão.

Tabela 11 – Frequências de vibração [42,88–91].

Bandas (cm ⁻¹)	Interpretação
1200 – 900	SiO ⁻
940 – 860	Estiramento Si–O–Si
890 – 800	Estiramento C–O
840 – 720	Estiramento simétrico Si–O–Si (tetraédrico)
560 – 550	Modo de flexão das ligações P–O (amorfo)
610 – 600	Modo de flexão das ligações P–O (cristalino)
540 – 415	Modo de flexão das ligações Si–O–Si

3 – Resultados e Discussão

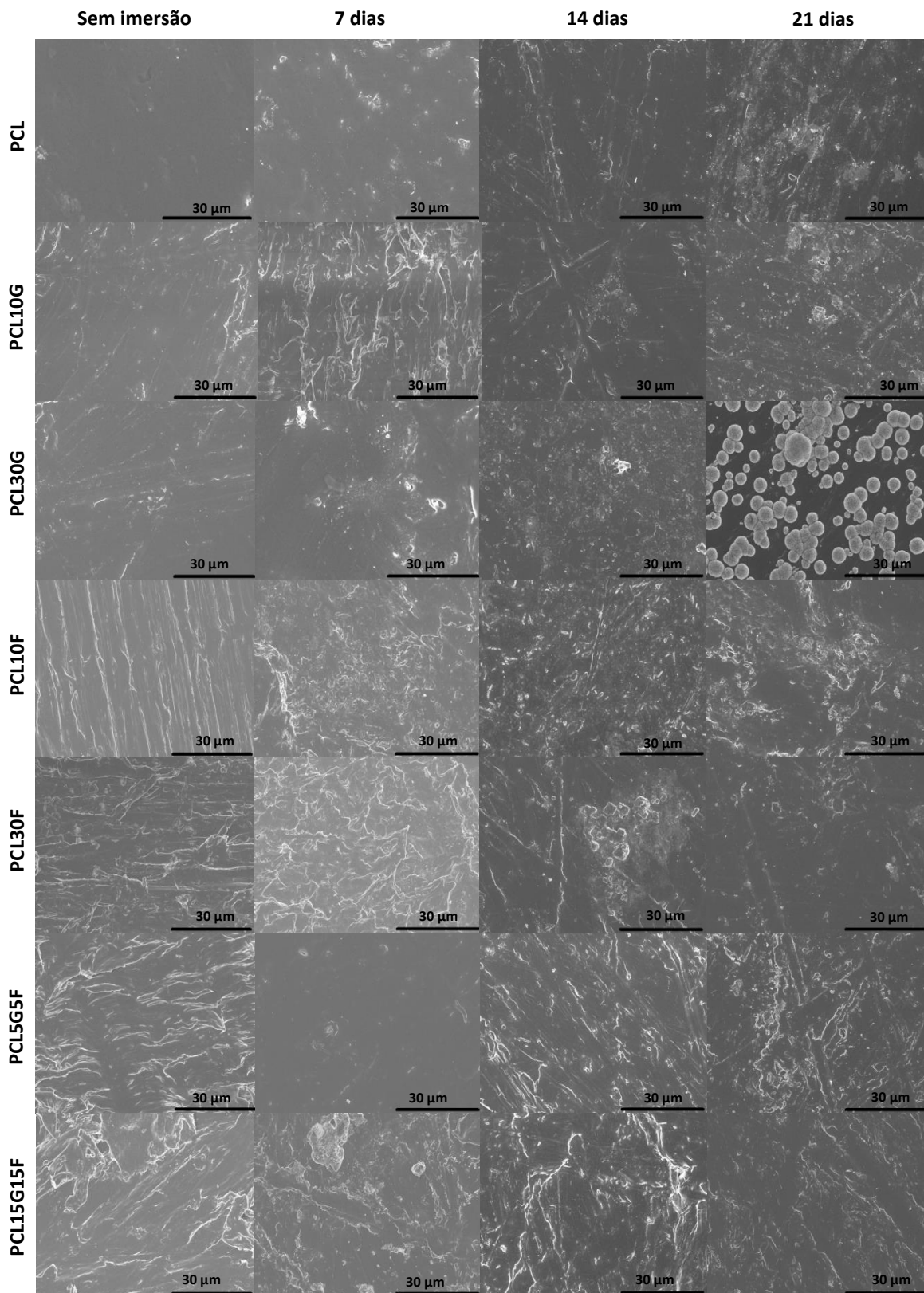


Figura 26 – Micrografias de SEM para amostras de todas as composições obtidas por extrusão.

As micrografias para os tempos de 1h, 1 dia e 3 dias não são apresentadas pois não trazem informação adicional relativamente à formação de precipitados na superfície dos compósitos.

As imagens referentes ao PCL mostram que com o aumento do tempo de imersão há formação de precipitados na superfície da amostra. A análise por EDS não evidencia a presença de cálcio e fósforo mas sim a presença de sódio e cloro. Uma explicação provável reside no facto de a lavagem das amostras em água destilada após imersão em SBF não ter sido suficiente para a remoção do sal proveniente da solução.

A não formação de depósitos ricos em Ca-P sobre o PCL evidencia a ausência de bioatividade deste polímero, conforme tem sido reportado na literatura [2,6,7]. Vários autores sugerem diferentes alternativas para contornar esta desvantagem, que vão desde a sua modificação superficial até à preparação de compósitos em que a fase dispersa seja bioativa.

Para a composição PCL30G não se verificam alterações na superfície dos compósitos até 14 dias de imersão. Para os tempos 0, 7 e 14 dias a análise de EDS indica valores reduzidos não só de cálcio e fósforo, mas também de silício e magnésio. Aos 21 dias é possível verificar a presença de depósitos ricos em Ca-P com uma razão Ca/P de 1.5.

Os resultados referentes às composições PCL10G, PCL30F, PCL10F, PCL15G15F e PCL5G5F por extrusão não evidenciam a formação de qualquer fase rica em Ca-P. O EDS confirma a presença dos constituintes químicos do vidro, embora em baixa quantidade.

A falta de atividade superficial poderá estar relacionada com a ausência de partículas de vidro expostas na superfície dos compósitos. A elevada espessura dos espécimes cilíndricos extrudidos ($\phi=2.5$ mm) proporciona condições para que ocorra o encapsulamento das partículas de vidro pela matriz de PCL, sendo os processos de prensagem a quente e de polimento insuficientes para colocar as partículas vítreas na superfície dos compósitos expondo-as ao meio envolvente.

Nas figuras 27 e 28 estão representados os gráficos da variação das concentrações iónicas de Si, Mg, Ca e P da solução de SBF, determinada por ICP após imersão das placas de PCL e de PCL30G, respetivamente, obtidos por extrusão.

Analisando a figura 27a verifica-se que as concentrações de silício e magnésio se mantêm aproximadamente constantes com o tempo de imersão. As concentrações de cálcio e fósforo ao final de 21 dias de imersão (figura 27b) não sofrem alterações significativas, indicando a ausência de atividade superficial do PCL.

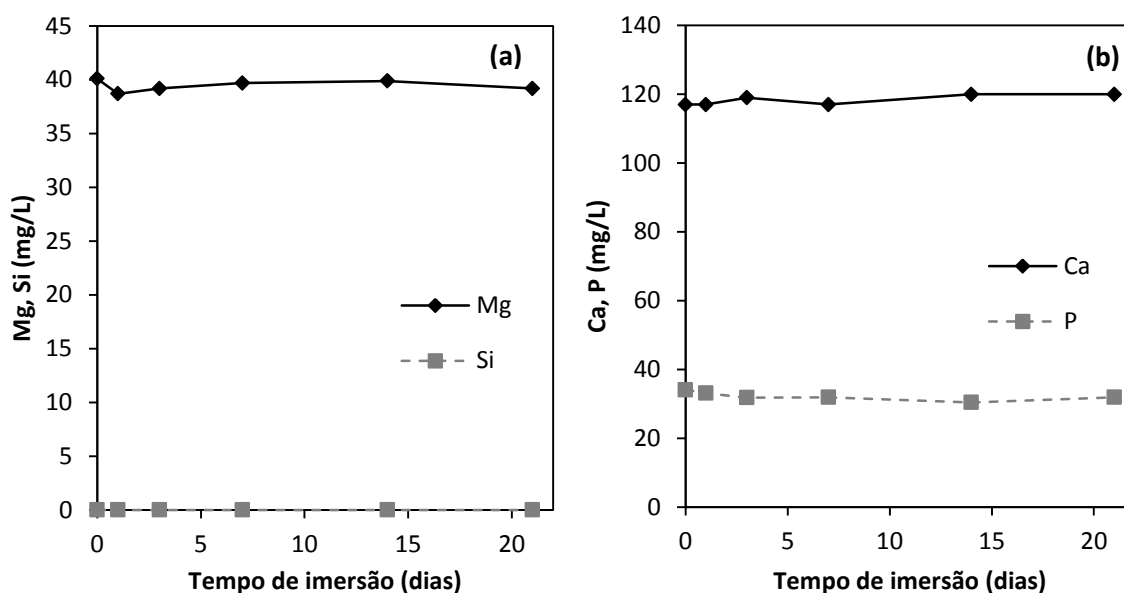


Figura 27 – Variação das concentrações iónicas de Si e Mg (a) e em Ca e P (b) na solução de SBF após imersão do PCL obtido por extrusão.

Para o compósito PCL30G, a figura 28a indica que as concentrações de silício e magnésio se mantêm aproximadamente constantes com o tempo de imersão. No que diz respeito às concentrações de cálcio e fósforo (figura 28b), não se apontam alterações significativas no decorrer do ensaio de bioatividade. A ligeira diminuição da concentração de fósforo entre os 14 e 21 dias poderá estar relacionada com a precipitação de pequenos depósitos de fosfato de cálcio na superfície do compósito, tal como é sugerido pelas imagens de SEM (figura 26). Estes resultados indicam a baixa atividade superficial do compósito, que pode ser atribuída à baixa quantidade de partículas vítreas nos compósitos ou pelo recobrimento por PCL das partículas vítreas existentes à superfície, o que dificulta o seu contacto e dissolução em SBF.

3 – Resultados e Discussão

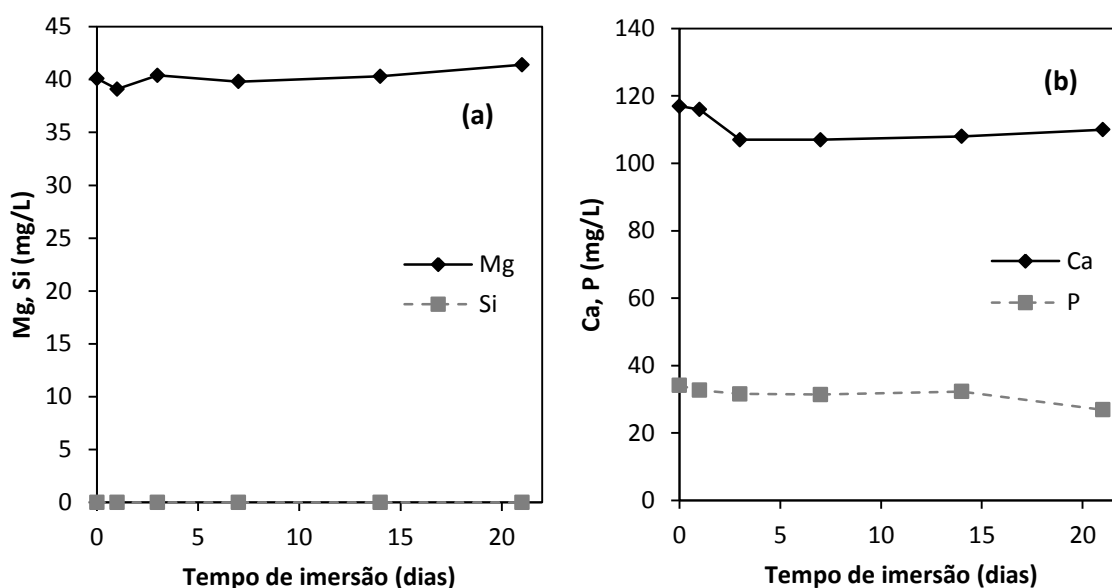


Figura 28 – Variação da concentração elementar da solução de SBF em Si e Mg (a) e em Ca e P (b) para o compósito PCL30G obtido por extrusão.

Na figura 29 estão representadas as curvas da variação de pH para o PCL e para o PCL30G. Ambas as curvas apresentam uma tendência para subir até valores próximos de 7.8 após o primeiro dia, seguido, de uma descida acentuada para ~7.4 ao sétimo dia de imersão. Entre os 7 e os 21 dias não se verificam alterações significativas em termos de valores de pH, que rondam os valores de 7.39 e 7.43.

Alguns autores têm reportado que a variação de valores de pH para o PCL imerso em SBF tem-se mantido constante ao longo do tempo de imersão [76,92]. No caso dos compósitos PCL/vidro bioativo, a liberação de íons de fósforo para a solução induz variações nos valores de pH [76].

Tal como foi verificado por ICP, a liberação do íon P nos compósitos PCL30G obtidos por extrusão não é significativa ao longo do tempo de imersão (figura 28b), quando comparado com os resultados de ICP para o íon fósforo dos compósitos obtidos por evaporação do solvente (secção 3.3.3 – figura 34b), não tendo por isso, influência nos valores de pH.

3 – Resultados e Discussão

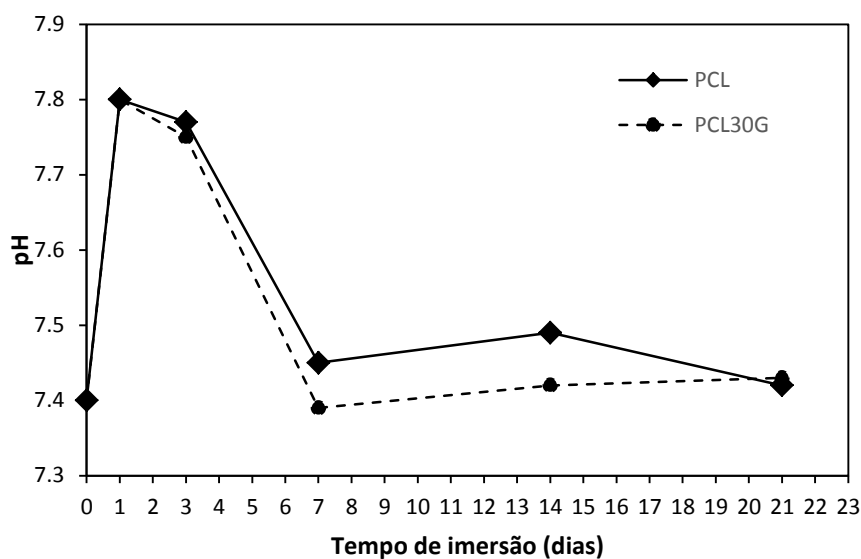


Figura 29 – Variação dos valores do pH da solução de SBF em função do tempo de imersão.

As camadas formadas sobre o PCL e sobre o PCL30G obtidos por extrusão foram analisadas por FTIR-ATR (figura 30). Para efeitos de comparação foi analisada também uma amostra de cada composição sem imersão. Não se verificaram alterações entre os espectros das duas composições optando-se por apresentar apenas o espectro referente ao PCL.

Através da análise dos espectros procurou-se identificar as principais ligações nas vibrações envolvidas. O espectro indica que não há alteração das bandas de vibração à medida que o tempo de imersão de SBF aumenta. Todas as bandas presentes foram associadas ao PCL.

As principais bandas representativas do espectro de PCL foram organizadas na tabela 12.

As bandas representadas a 2945 cm^{-1} e 2866 cm^{-1} são características do modo de estiramento assimétrico CH_2 e do modo estiramento simétrico CH_2 , respectivamente [93].

O espectro apresenta uma banda forte a 1720 cm^{-1} atribuída ao modo de estiramento das ligações carbonilo existentes no grupo amida (C=O) [93].

As bandas relevadas a 1165 cm^{-1} e 1294 cm^{-1} representam o modo de estiramento C-O e C-C da fase amorfa e o modo de estiramento C-O e C-C da fase cristalina [93].

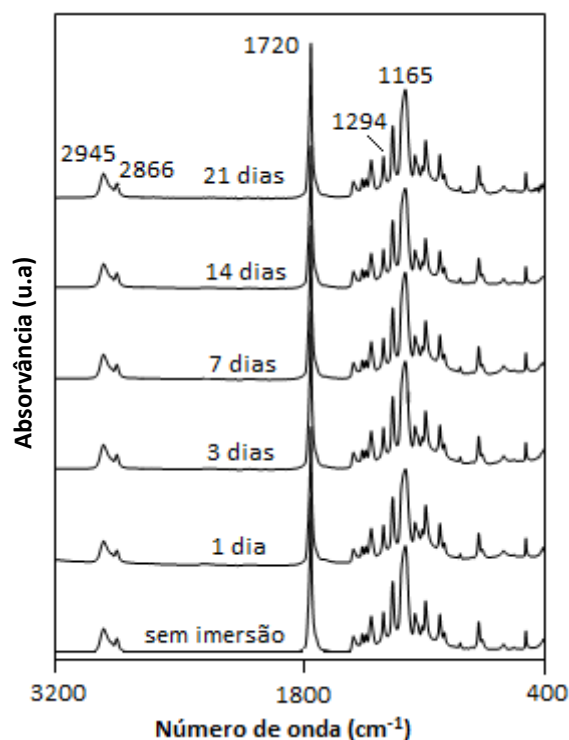


Figura 30 – Espectro de FTIR-ATR do PCL para os diferentes tempos de imersão em SBF.

Tabela 12 – Frequências de vibração do PCL [93].

Bandas (cm ⁻¹)	Interpretação
2949	Estiramento assimétrico CH ₂
2865	Estiramento simétrico CH ₂
1727	Estiramento C=O
1293	Estiramento C–O e C–C (fase cristalina)
1240	Estiramento assimétrico COC
1190	Estiramento OC–O
1170	Estiramento simétrico COC
1157	Estiramento C–O e C–C (fase amorfa)

3.3.3 – Análise da superfície e das alterações iônicas dos compósitos obtidos por evaporação do solvente

As amostras preparadas pelo método de evaporação do solvente foram sujeitas a testes de imersão em SBF por diferentes períodos de tempo (1h, 3h, 5h, 8h, 1, 3, 7, 14 e 21 dias). As micrografias apresentadas na figura 31 referem-se às superfícies das amostras com 10x10x0.3mm³ após imersão em SBF.

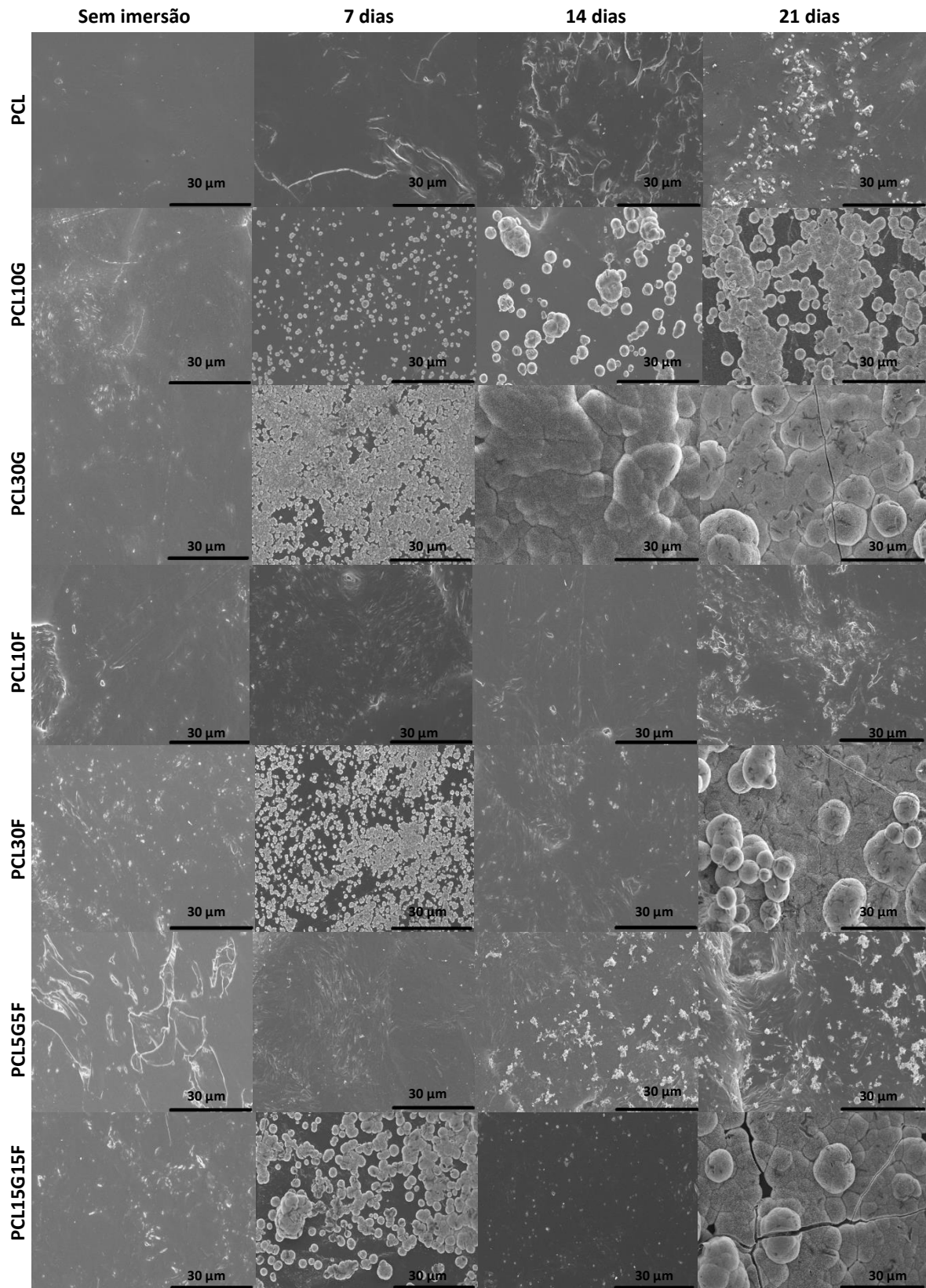


Figura 31 – Micrografias de SEM de todas as composições para as amostras obtidas por evaporação do solvente.

Tal como observado para as amostras de PCL obtidas por extrusão, verifica-se também a não formação de depósitos ricos em Ca-P evidenciando a ausência de bioatividade. Observa-se a formação de precipitados de sódio e de cloro (análise por EDS), com uma morfologia cúbica, para 21 dias de imersão.

Para a composição PCL10G, é possível notar que após 7 dias de imersão há formação de depósitos distribuídos de forma homogênea na superfície da amostra. A análise por EDS confirmou a presença Ca-P. Com o aumento do tempo de imersão, os precipitados começam a agregar (14 dias) e observa-se um aumento da superfície coberta (21 dias).

Relativamente ao compósito PCL30G observa-se a formação de depósitos ricos em Ca-P que aumentam com o tempo de imersão. Após 7 dias de imersão grande parte da superfície da amostra revela formações ricas em Ca-P. Entre 14 e 21 de imersão, toda a superfície apresenta uma camada rica em fosfatos de cálcio, registando-se, no caso dos 21 dias, o aparecimento de partículas esféricas resultantes da associação de precipitados de Ca-P. A análise química por EDS revela uma razão Ca/P de 1.5, 1.66 e 1.69, respetivamente para 7, 14 e 21 dias. Estes valores são próximos da razão Ca/P de 1.67 para a HA [87].

No que diz respeito à composição PCL10F, não se verificou sinais de atividade superficial. A baixa percentagem vítrea utilizada e o tamanho de partícula reduzido (~4 µm) podem ser justificações para a ausência desse comportamento. Possivelmente a matriz polimérica envolve as partículas de vidro impedindo-as de atingir a superfície. O EDS confirma a presença dos constituintes químicos do vidro.

As composições PCL30F e PCL15G15F apresentam comportamentos semelhantes, pelo que serão analisadas em conjunto. Estas amostras, após 7 dias de imersão em SBF apresentam uma superfície parcialmente preenchida por uma camada rica em Ca-P. Aos 21 dias toda a superfície das amostras está coberta com uma camada de fosfato de cálcio e há formação de partículas esféricas devido à associação de precipitados ricos em Ca-P, tal como foi verificado anteriormente para a composição PCL30G. A ausência de formações ricas em Ca-P após 14 dias é interpretada com base na fraca aderência da camada formada em relação às amostras. À medida que o tempo de imersão em SBF aumenta a camada formada torna-se mais espessa sendo mais provável o seu desprendimento da superfície. Por EDS verifica-se a presença de cálcio e fósforo para as amostras de 14 dias bem como os restantes constituintes do vidro bioativo (silício e magnésio).

No caso da composição PCL5G5F é visível a formação de pequenos depósitos de Ca-P. Estes depósitos aumentam com o tempo de imersão distribuindo-se na superfície dos compósitos

3 – Resultados e Discussão

de forma homogénea. O baixo teor de partículas vítreas da composição, conjugado com a mistura de partículas grossas e finas poderá ser uma justificação para a fraca atividade superficial. Tal como foi mencionado para a composição anterior, possivelmente a matriz polimérica envolve as partículas mais finas e ficando à superfície apenas uma pequena percentagem destas partículas.

Na tabela 13 são apresentados os resultados para a formação de precipitados de Ca-P nos compósitos, para os tempos de imersão em SBF de 1h, 3h, 5h, 8h, 1 e 3 dias.

Tabela 13 – Formação de precipitados de Ca-P nos compósitos para diferentes tempos de imersão.

Composições							
Tempo	PCL	PCL10G	PCL30G	PCL10F	PCL30F	PCL5G5F	PCL15G15F
1h	X	X	X	X	X	X	X
3h	X	X	X	X	X	X	X
5h	X	X	X	X	X	X	X
8h	X	X	X	X	X	X	X
1 dia	X	+	++	X	++	X	++
3 dias	X	+++	+++	X	+++	X	+++

X – não apresenta formação de precipitados de Ca-P na superfície

+ – formação de precipitados de Ca-P de tamanho reduzido em algumas zonas da superfície

++ – formação de precipitados de Ca-P em algumas zonas da superfície

+++ – superfície parcialmente coberta com precipitados de Ca-P

O gráfico da figura 32 representa a evolução da razão Ca/P nos precipitados sobre as amostras PCL30G imersas em SBF para os tempos 0, 1h, 1 (24h), 3 (72h), 7 (168h), 14 (336h) e 21 dias (504h).

3 – Resultados e Discussão

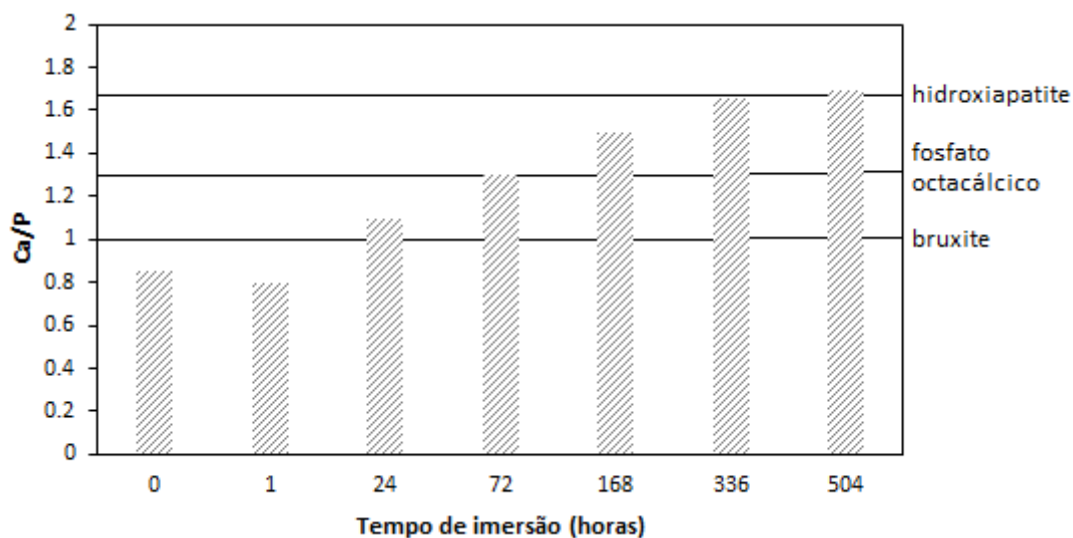
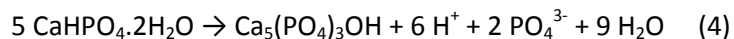


Figura 32 – Evolução da razão Ca/P nos precipitados sobre os compósitos PCL30G após o tempo de imersão em SBF.

À medida que o tempo de imersão aumenta é provável que a bruxite, considerada uma fase metastável da HA, tenda a dissolver e a reprecipitar na forma de um fosfato de cálcio mais estável, HA, em condições fisiológicas de pH e temperatura. A transformação da bruxite em HA decorre pela reação:



Os gráficos da variação das concentrações dos íons Si, Mg, Ca e P em solução de SBF para as composições PCL e PCL30G estão representados nas figuras 33 e 34, respetivamente.

Através da análise das figuras 33a e 33b é possível verificar que, à semelhança do que se sucedeu para o PCL obtido por extrusão, não se registam alterações significativas das concentrações iónicas com o tempo de imersão.

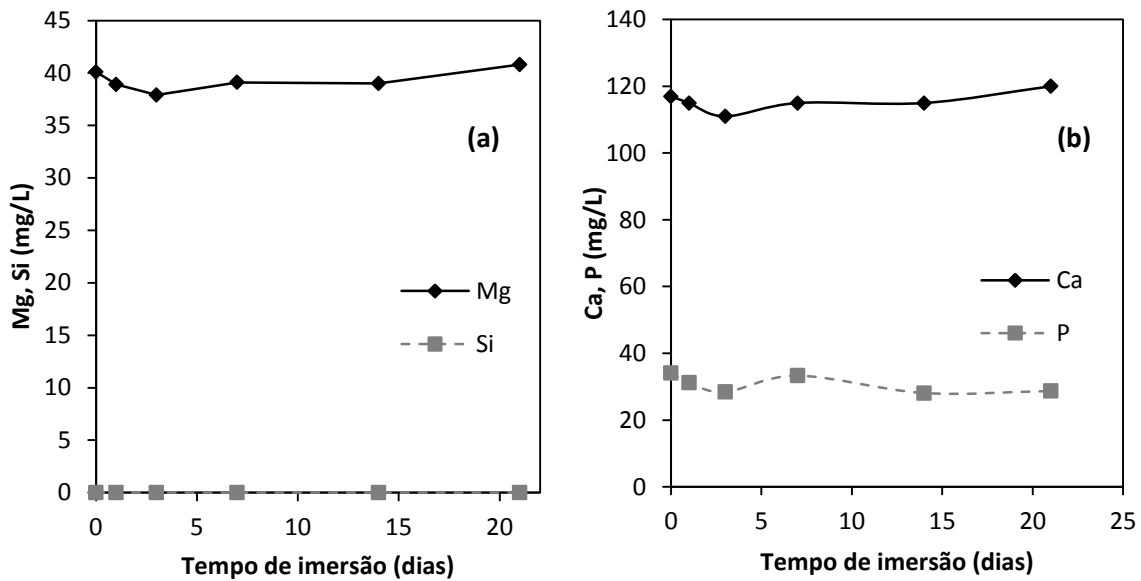


Figura 33 – Variação da concentração elementar da solução de SBF em Si e Mg (a) e em Ca e P (b) para o PCL.

Para os compósitos PCL30G é possível verificar a dissolução do vidro pelo aumento das concentrações de íons silício e magnésio (figura 34a) que atingem o máximo após 14 dias de imersão.

A concentração de fósforo no SBF (figura 34b) aumenta após 1 dia de imersão. Este aumento deve-se à dissolução do vidro. Seguidamente verifica-se uma diminuição ao longo do tempo sugerindo assim o seu consumo. O mesmo comportamento é observado para o cálcio (figura 34b). A libertação de Ca e P seguido do seu consumo sugerem a dissolução do vidro numa primeira fase e a posterior formação de precipitados de fosfato de cálcio originando ao crescimento de uma camada rica em Ca-P.

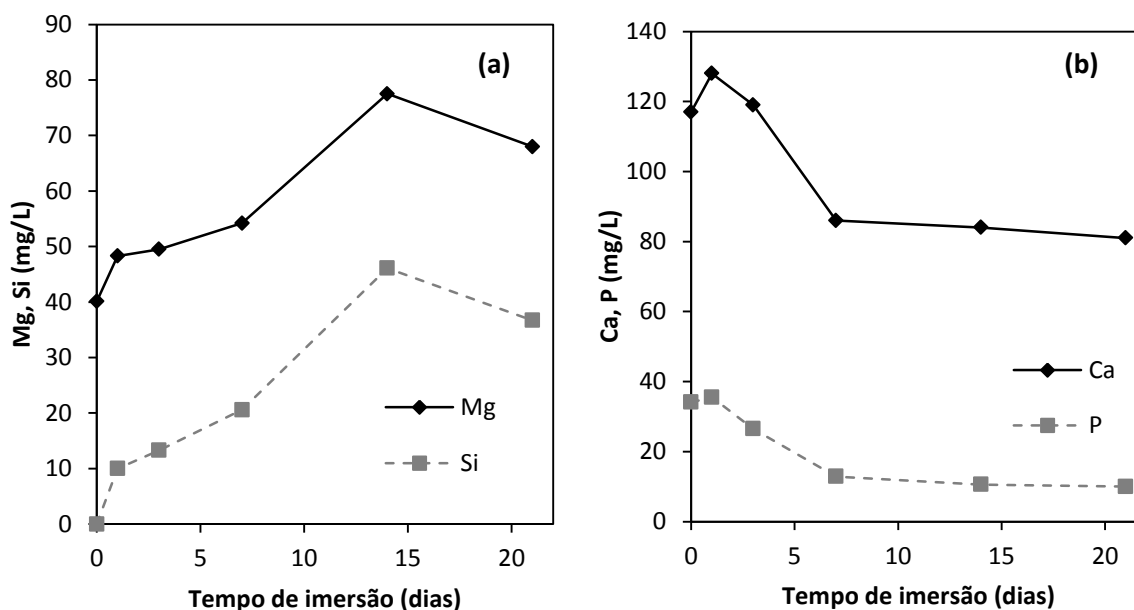


Figura 34 – Variação da concentração elementar da solução de SBF em Si e Mg (a) e em Ca e P (b) para o PCL30G.

A figura 35 representa as curvas da variação de pH para o PCL e para o PCL30G ao longo do tempo de imersão. Ambas as curvas apresentam um aumento de pH após 1 dia de imersão para um valor de 7.71 que diminui para tempos de imersão superiores. Aos 7 dias o pH apresenta valores de 7.4 para o PCL e de 7.28 para o compósito PCL30G. A partir do sétimo dia não se verificam alterações significativas em termos de valores de pH, situando-se estes entre 7.25 e 7.44.

Estes valores de pH favorecem termodinamicamente a deposição de HA na superfície dos compósitos, uma vez que, em sistemas fisiológicos, a HA é o fosfato de cálcio mais estável para valores de pH acima de 4.2, sendo a sua precipitação favorecida pelo aumento de pH do meio [87].

Relativamente aos valores de pH para tempos curtos (1 dia), verifica-se um aumento do pH o que se pode atribuir à existência de fenómenos de degradação da superfície do PCL. O mesmo fenómeno foi observado para as curvas de pH do PCL e dos compósitos PCL30G obtidos por extrusão (figura 29).

Tal como já foi referido os compósitos de PCL/vidro bioativo devem provocar variações nos valores de pH resultantes da libertação de iões de fósforo (presentes no vidro) para a solução de SBF [76].

Com o aumento do tempo de imersão para os compósitos PCL30G na solução de SBF, verifica-se uma diminuição da concentração de iões de fósforo (figura 34b). Aquando da formação

da camada rica em Ca-P na superfície dos compósitos, ocorre a formação de grupos OH^- que favorece a formação de bruxite e provoca queda do pH.

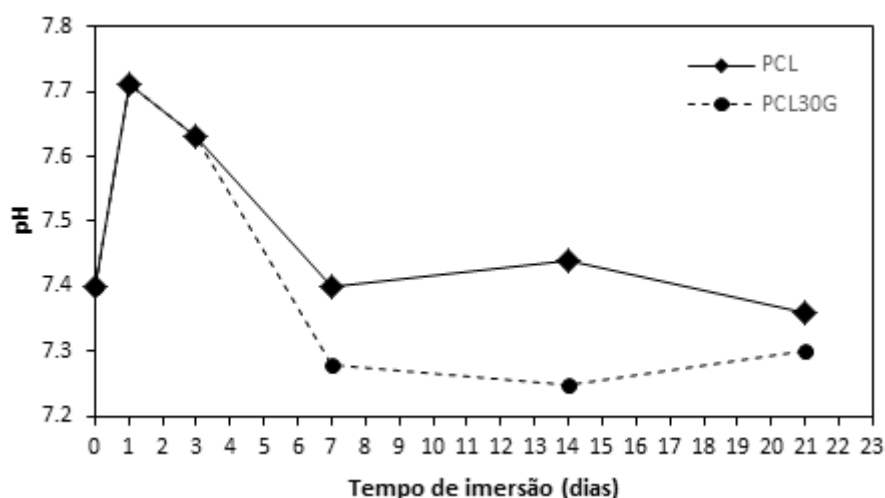


Figura 35 – Variação dos valores do pH da solução de SBF, após vários dias de imersão.

As camadas formadas sobre o PCL e sobre o PCL30G obtidos por evaporação do solvente foram analisadas por FTIR-ATR (figura 36). Para efeitos de comparação foi analisada também uma amostra de cada composição sem imersão. Não foram verificadas alterações no espectro de PCL em relação ao espectro obtido por extrusão (figura 30) indicando que o solvente utilizado não altera a estrutura do polímero. Neste documento apenas se apresenta o espectro referente à composição PCL30G.

Através da análise dos espectros procurou-se identificar as vibrações envolvidas, tais como os elementos químicos associados a estas vibrações. As principais bandas representativas do espectro de PCL e do espectro de vidro foram organizadas nas tabelas 11 e 12, apresentadas anteriormente.

O espectro indica que não há alteração da posição das bandas de vibração à medida que o tempo de imersão de SBF aumenta (figura 36), embora se verifiquem novas ligações comparativamente ao PCL puro (figura 37).

É possível verificar que as principais alterações entre os espectros de PCL30G e PCL ocorrem na gama dos $400\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ (figura 37). Entre $\sim 1500\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ nota-se uma diminuição da intensidade dos picos.

A 1043 cm^{-1} e a 961 cm^{-1} surgem duas bandas características do vidro associadas à vibração das ligações Si-O^- .

As bandas representadas a 934 cm^{-1} e 453 cm^{-1} correspondem ao modo de estiramento das ligações Si-O-Si e ao modo de flexão das ligações Si-O-Si , respetivamente.

3 – Resultados e Discussão

A 556 cm^{-1} é revelada uma banda pertence à vibração do modo de flexão das ligações P—O.

As bandas características do PCL foram observadas sem alterações significativas, nomeadamente a 1720 cm^{-1} e a 1165 cm^{-1} que correspondem ao modo de estiramento das ligações C=O do grupo amida e ao modo de estiramento C—O e C—C da fase amorfa, respetivamente.

Li *et al.* [72] mostraram a existência de bandas de vibração dos grupos fosfato e carbonato associadas à formação da camada rica em Ca-P em compósitos de PCL/vidro bioativo após 7 dias de imersão em solução de SBF. Seria de esperar neste trabalho, uma diminuição da intensidade das bandas características do PCL e o aparecimento de bandas associadas às ligações dos grupos fosfatos e dos grupos carbonato como resultado da formação de uma camada rica em Ca-P nas suas superfícies.

Neste projeto tal não foi observado. Uma vez que as micrografias obtidas em SEM apresentam a formação de uma camada rica em Ca-P (figura 31) evidenciando algumas fissuras, pressupõe-se uma baixa aderência da camada às amostras que provocou o seu desprendimento durante o manuseamento das mesmas aquando da realização do FTIR e em particular aquando da sua fixação no ATR.

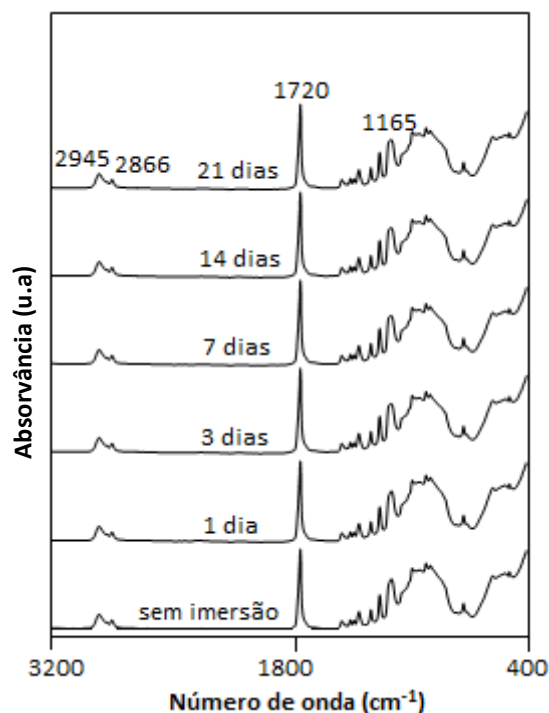


Figura 36 – Espectro de FTIR-ATR do PCL com os diferentes tempos de imersão.

3 – Resultados e Discussão

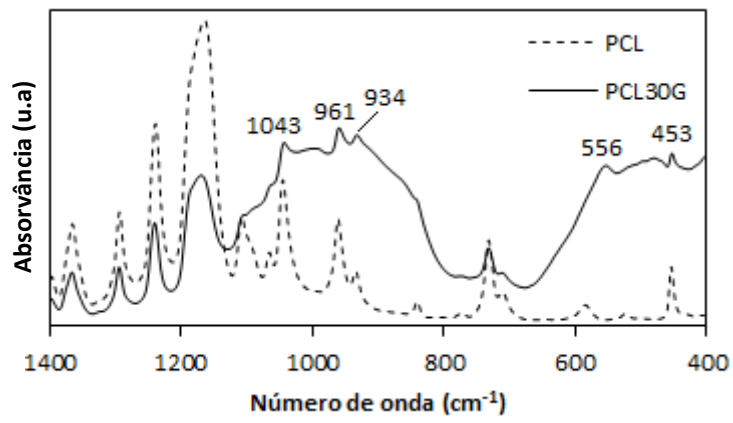


Figura 37 – Ampliação e sobreposição do espectro de FTIR-ATR na gama dos 400-1500 cm⁻¹ do PCL e do PCL30G.

4 – Conclusão e Trabalho Futuro

4.1 – Conclusão

Apresentam-se de seguida as principais conclusões do trabalho realizado e algumas perspetivas em relação a trabalhos futuros.

A caracterização do vidro V7 através de imersão em solução de SBF mostrou o potencial bioativo do material avaliado através da formação de uma camada rica em Ca-P.

O estudo do comportamento *in vitro* dos compósitos obtidos por extrusão revelou reduzida ou nula atividade superficial das amostras, atribuída a uma baixa homogeneização das formulações e ao efeito de encapsulação das partículas de vidro pelo PCL. Apenas a composição PCL30G para 21 dias de imersão em solução de SBF apresenta depósitos ricos em Ca-P.

No caso das amostras processadas por evaporação do solvente ocorreu formação de uma camada rica em Ca-P. O crescimento da camada é mais acentuado nas amostras que contêm 30% de partículas vítreas. As composições com tamanhos de partícula mais finos originaram menos atividade superficial, em relação às composições desenvolvidas com tamanhos de partícula mais grossos, atribuída ao fenómeno de encapsulação referido anteriormente.

Este comportamento *in vitro* foi tido como indicador de que os compósitos são potencialmente bioativos.

Para ambas as técnicas usadas no processamento as amostras de PCL puro não apresentam sinais de bioatividade.

Conclui-se que, quando comparado com PCL puro foi possível encontrar compósitos PCL/vidro bioativo com um elevado desempenho *in vitro*, tendo em consideração a bioatividade revelada através da formação da camada rica em Ca-P à superfície. Essa bioatividade permite sugerir que compósitos de PCL/vidro bioativo surgem como materiais promissores para aplicação em Engenharia de Tecidos, nomeadamente para a regeneração do tecido ósseo.

4.2 – Trabalho Futuro

Os compósitos produzidos neste trabalho apresentam potencialidades que justificam a continuidade de investigação em trabalho futuro.

Face à possibilidade de produzir amostras cilíndricas de compósitos com dispersão homogénea da fase de enchimento, seria recomendável otimizar o funcionamento da extrusora, começando pela sua revisão com melhoramentos térmico e eventual substituição de partes do equipamento.

Estudo do comportamento mecânico dos compósitos de PCL/vidro bioativo.

Tendo em conta que existe sempre algum grau de degradação dos materiais, é fundamental avaliar em que medida os produtos libertados podem apresentar toxicidade. Poderia levar-se a cabo um estudo de degradação, em que, os produtos de degradação fossem recolhidos e colocados em contacto com células de forma a avaliar a citotoxicidade.

Os ensaios de mineralização em solução de SBF permitiram determinar o potencial bioativo dos compósitos PCL/vidro bioativo desenvolvidos. Contudo, para uma eventual aplicação biomédica, é necessário prosseguir para ensaios de bioatividade em meio celular (*in vitro*) e, no caso destes ensaios se revelarem promissores, avançar para uma experimentação animal (*in vivo*).

O carácter bioativo destes compósitos torna-os ainda candidatos a aplicações como a libertação controlada de fármacos.

Estes compósitos apresentam ainda um elevado potencial para o desenvolvimento de novos materiais para uso em técnicas de fabricação aditiva, nomeadamente FFF.

5 – Bibliografia

5 – Bibliografia

- [1] McAuliffe JA. Bone graft substitutes. *Journal of Hand Therapy* 2003;16:180–7.
- [2] Cannillo V, Chiellini F, Fabbri P, Sola A. Production of Bioglass® 45S5 – Polycaprolactone composite scaffolds via salt-leaching. *Composite Structures* 2010;92:1823–32.
- [3] Fu Q, Saiz E, Rahaman MN, Tomsia AP. Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives. *Materials Science and Engineering: C* 2011;31:1245–56.
- [4] Cannillo V, Chiellini F, Fabbri P, Sola A. Fabrication of 45S5 bioactive glass-polycaprolactone composite scaffolds. *Composite Structures* 2010;92:1823–32.
- [5] Leja K, Lewandowicz G. Polymer biodegradation and biodegradable polymers: a review. *Pol J Environ Stud* 2010;19:255–66.
- [6] Woodruff MA, Huttmacher DW. The return of a forgotten polymer-Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science* 2010;35:1217–56.
- [7] Tamjid E, Bagheri R, Vossoughi M, Simchi A. Effect of particle size on the in vitro bioactivity, hydrophilicity and mechanical properties of bioactive glass-reinforced polycaprolactone composites. *Materials Science and Engineering: C* 2011;31:1526–33.
- [8] Oonishi H, Hench LL, Wilson J, Sugihara F, Tsuji E, Matsuura M, et al. Quantitative comparison of bone growth behavior in granules of Bioglass®, A-W glass-ceramic, and hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research* 2000;51:37–46.
- [9] Oonishi H, Kushitani S, Yasukawa E, Iwaki H, Hench LL, Wilson J, et al. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1997:316–25.
- [10] Seeley R, Stephens T, Tate P. *Anatomia e Fisiologia. Lusociência - Edições Técnicas e Científicas*; 1998.
- [11] Rho JY., Tsui TY., GM. P. Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation. *Biomaterials* 1997;18:1325–30.
- [12] Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005;26:5474–91.
- [13] Colbert B, Ankney J, Lee K. *Anatomy and Physiology for Nursing and Health Professionals* (2010).
- [14] Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical Engineering & Physics* 1998;20:92–102.

- [15] Gerhardt LC, Boccaccini AR. Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials* 2010;3:3867–910.
- [16] Hutmacher DW, Schantz JT, Lam CXF, Tan KC, Lim TC. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2007;1:245–60.
- [17] Tortora GJ. *Corpo humano : fundamentos de anatomia e fisiologia*. 4th ed. *Porto Alegre, Artes Médicas*; 2000.
- [18] Erdemli O, Captug O, Bilgili H, Orhan D, Tezcaner A, Keskin D. In vitro and in vivo evaluation of the effects of demineralized bone matrix or calcium sulfate addition to polycaprolactone-bioglass composites. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 2010;21:295–308.
- [19] Calori GM, Mazza E, Colombo M, Ripamonti C. The use of bone-graft substitutes in large bone defects: Any specific needs? *Injury* 2011;42, Supple:S56–S63.
- [20] Harwood PJ, Newman JB, Michael ALR. (ii) An update on fracture healing and non-union. *Orthopaedics and Trauma* 2010;24:9–23.
- [21] Schlickewei W, Schlickewei C. The Use of Bone Substitutes in the Treatment of Bone Defects – the Clinical View and History. *Macromolecular Symposia* 2007;253:10–23.
- [22] Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: State of the art and future trends. *Macromolecular Bioscience* 2004;4:743–65.
- [23] Kneser U, Schaefer DJ, Munder B, Klemm C, Andree C, Stark GB. Tissue engineering of bone. *Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies* 2002;11:107–16.
- [24] Hubbell J. Biomaterials in tissue engineering. *Nature Biotechnology* 1995;18:2–9.
- [25] Godbey WT, Atala A. In vitro systems for tissue engineering. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002;961:10–26.
- [26] Leong KF, Cheah CM, Chua CK. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials* 2003;24:2363–78.
- [27] Navarro M, Michiardi a, Castaño O, Planell J. Biomaterials in orthopaedics. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 2008;5:1137–58.
- [28] Langer R, Vacanti JP. Tissue Engineering. *Science* 1993;260:920–6.
- [29] Hench LL. Bioceramics - from concept to clinic. *Journal of the American Ceramic Society* 1991;74:1487–510.
- [30] Hench L. The story of Bioglass®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2006;17:967–78.

- [31] Jones JR, Ehrenfried LM, Hench LL. Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27:964–73.
- [32] Jones JR. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia* 2013;9:4457–86.
- [33] Best SM, Porter AE, Thian ES, Huang J. Bioceramics: Past, present and for the future. *Journal of the European Ceramic Society* 2008;28:1319–27.
- [34] Arcos D, Greenspan DC, Vallet-Regí M. A new quantitative method to evaluate the in vitro bioactivity of melt and sol-gel-derived silicate glasses. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2003;65A:344–51.
- [35] Kellomäki M, Niiranen H, Puumanen K, Ashammakhi N, Waris T, Törmälä P. Bioabsorbable scaffolds for guided bone regeneration and generation. *Biomaterials* 2000;21:2495–505.
- [36] Chen QZ, Boccaccini AR. Poly (D , L -lactic acid) coated 45S5 Bioglass[®] -based scaffolds : Processing and characterization. *J Biomed Mater Res A* 2006;27:445–57.
- [37] Bromer H, Deutscher K, Blencke B, Pfeil E, Strunz V. Properties of the Bioactive Implant Material Ceravital. *Science of Ceramics* 1977;9:219–25.
- [38] Kokubo T, Ito S, Shigematsu M, Sakka S, Yamamuro T. Mechanical properties of a new type of apatite-containing glass-ceramic for prosthetic application. *Journal of Materials Science* 1985;20:2001–4.
- [39] Hench LL, Wilson J. An Introduction to Bioceramics. 1st ed. *World Scientific Publishing, Singapore*; 1993.
- [40] Salinas J, Martin I, Vallet-Regí M. Bioactivity of three CaO-P₂O₅-SiO₂ sol-gel glasses. *Journal of Biomedical Materials Research* 2002;61:524–32.
- [41] Oliveira JM, Correia RN, Fernandes MH. Surface modifications of a glass and a glass-ceramic of the MgO-3CaO.P₂O₅-CaO.SiO₂ system in a simulated body fluid. *Biomaterials* 1995;16:849–54.
- [42] Peitl O, Hench L, Zanotto ED. Highly bioactive P₂O₅-Na₂O-CaO-SiO₂ glass-ceramics. *Journal of Non-Crystalline Solids* 2001;292:115–26.
- [43] Oliveira JM, Correia RN, Fernandes MH. Effect of SiO₂ on amorphous phase separation of CaO-P₂O₅-SiO₂-MgO glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids* 2000;273:59–63.
- [44] Oliveira JMM de. Desenvolvimento de vidros e de vidros cerâmicos sílico-fosfatados com elevado teor de alcalino- terrosos para aplicações biomédicas. Tese de Doutorado, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2000.
- [45] Hench LL. Bioceramics. *Journal of the American Ceramic Society* 1998;81:1705–28.

- [46] Kim CY, Clark AE, Hench LL. Early stages of calcium-phosphate layer formation in bioglasses . *Journal of Non-Crystalline Solids* 1989;113:195–202.
- [47] Obata A, Nakamura S, Moriyoshi Y, Yamashita K. Electrical polarization of bioactive glass and assessment of their in vitro apatite deposition. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2003;67A:413–20.
- [48] Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 2006;27:2907–15.
- [49] Bohner M, Lemaître J. Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? *Biomaterials* 2009;30:2175–9.
- [50] Izquierdo-Barba I, Salinas AJ, Vallet-Regí M. In vitro calcium phosphate layer formation on sol-gel glasses of the CaO-SiO₂ system. *Journal of Biomedical Materials Research* 1999;47:243–50.
- [51] Kokubo T, Kushitani H, Ohtsuki C, Sakka S, Yamamuro T. Chemical reaction of bioactive glass and glass-ceramics with a simulated body fluid. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1992;3:79–83.
- [52] Salinas J, Román J, Vallet-Regí M, Oliveira JM, Correia RN, Fernandes MH. In vitro bioactivity of glass and glass-ceramics of the 3CaO.P₂O₅-CaO.SiO₂-CaO.MgO.2SiO₂ system. *Biomaterials* 2000;21:251–7.
- [53] Bastioli C. Biodegradable materials—present situation and future perspectives. *Macromolecular Symposia* 1998;204:193–204.
- [54] Kolybaba M, Tabil L, Panigrahi S. Biodegradable polymers: past, present, and future. *An ASAE Meeting Presentation* 2003;0300:1–15.
- [55] Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* 2007;32:762–98.
- [56] Taylor P, Piskin E. Biodegradable polymers as biomaterials. *Journal of Biomaterials Science* 1994;9:37–41.
- [57] Yun H, Kim S, Park EK. Bioactive glass–poly (ε-caprolactone) composite scaffolds with 3 dimensionally hierarchical pore networks. *Materials Science and Engineering: C* 2011;31:198–205.
- [58] Shor L, Sun W, Güçeri S. Precision extruding deposition of composite polycaprolactone / hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2005:5–6.

- [59] Sravanthi R. Preparation and characterization of poly (ϵ -caprolactone)PCL scaffolds for tissue engineering applications. Departmente of Biotechnology and Medical Engineering 2009.
- [60] Gunatillake P, Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells & Materials* 2003;5:1–16; discussion 16.
- [61] Jiang G, Evans ME, Jones IA, Rudd CD, Scotchford CA, Walker GS. Preparation of poly(ϵ -caprolactone)/continuous bioglass fibre composite using monomer transfer moulding for bone implant. *Biomaterials* 2005;26:2281–8.
- [62] Salgado CL, Sanchez EMS, Mano JF, Moraes AM. Characterization of chitosan and polycaprolactone membranes designed for wound repair application. *Journal of Materials Science* 2012;47:659–67.
- [63] Wan Y, Xiao B, Dalai S, Cao X, Wu Q. Development of polycaprolactone/chitosan blend porous scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2009;20:719–24.
- [64] Tavares VACDB. Matrizes de Policaprolactona e Quitosano para aplicação em Engenharia de Tecidos. Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2011.
- [65] Niiranen H, Pyhältö T, Rokkanen P, Kellomäki M, Törmälä P. In vitro and in vivo behavior of self-reinforced bioabsorbable polymer and self-reinforced bioabsorbable polymer/bioactive glass composites. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2004;69A:699–708.
- [66] Barroca N, Daniel-da-Silva a L, Vilarinho PM, Fernandes MH V. Tailoring the morphology of high molecular weight PLLA scaffolds through bioglass addition. *Acta Biomaterialia* 2010;6:3611–20.
- [67] Lu H, El-Amin S, Scott K, Laurencin C. Three-dimensional, bioactive, biodegradable, polymer–bioactive glass composite scaffolds with improved mechanical properties support collagen synthesis and mineralization of human osteoblast-like cells in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research* 2003;61:465–74.
- [68] Roohani-Esfahani SI, Nouri-Khorasani S, Lu ZF, Appleyard RC, Zreiqat H. Effects of bioactive glass nanoparticles on the mechanical and biological behavior of composite coated scaffolds. *Acta Biomaterialia* 2011;7:1307–18.
- [69] Lei Y, Rai B, Ho KH, Teoh SH. In vitro degradation of novel bioactive polycaprolactone—20% tricalcium phosphate composite scaffolds for bone engineering. *Materials Science and Engineering: C* 2007;27:293–8.

- [70] Lohfeld S, Cahill S, Barron V, McHugh P, Dürselen L, Kreja L, et al. Fabrication, mechanical and in vivo performance of polycaprolactone/tricalcium phosphate composite scaffolds. *Acta Biomaterialia* 2012;8:3446–56.
- [71] Jaakkola T, Rich J, Tirri T, Närhi T, Jokinen M, Seppälä J, et al. In vitro Ca-P precipitation on biodegradable thermoplastic composite of poly(ϵ -caprolactone-co-dl-lactide) and bioactive glass (S53P4). *Biomaterials* 2004;25:575–81.
- [72] Li X, Shi J, Dong X, Zhang L, Zeng H. A mesoporous bioactive glass/polycaprolactone composite scaffold and its bioactivity behavior. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2008;84A:84–91.
- [73] Fabbri P, Cannillo V, Sola A, Dorigato A, Chiellini F. Highly porous polycaprolactone-45S5 Bioglass® scaffolds for bone tissue engineering. *Composites Science and Technology* 2010;70:1869–78.
- [74] Lei B, Shin KH, Noh DY, Jo IH, Koh YH, Kim HE, et al. Sol-gel derived nanoscale bioactive glass (NBG) particles reinforced poly(ϵ -caprolactone) composites for bone tissue engineering. *Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications* 2013;33:1102–8.
- [75] Khan R, Parsons J, Jones I, Walker GS, Rudd CD. Degradation and Interfacial Properties of Iron Phosphate Glass Fiber-Reinforced PCL-Based Composite for Synthetic Bone Replacement Materials. *Polymer-Plastics Technology and Engineering* 2010;49:1265–74.
- [76] Prabhakar RL, Brocchini S, Knowles JC. Effect of glass composition on the degradation properties and ion release characteristics of phosphate glass - polycaprolactone composites. *Biomaterials* 2005;26:2209–18.
- [77] Lei B, Shin KH, Noh DY, Koh YH, Choi WY, Kim HE. Bioactive glass microspheres as reinforcement for improving the mechanical properties and biological performance of poly(ϵ -caprolactone) polymer for bone tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials* 2012;100:967–75.
- [78] Ródenas-Rochina J, Ribelles JLG, Lebourg M. Comparative study of PCL-HAp and PCL-bioglass composite scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science Materials in Medicine* 2013;24:1293–308.
- [79] Kim HW, Lee EJ, Jun IK, Kim HE, Knowles JC. Degradation and drug release of phosphate glass/polycaprolactone biological composites for hard-tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2005;75B:34–41.

- [80] Jo JH, Lee EJ, Shin DS, Kim HE, Kim HW, Koh YH, et al. In vitro/in vivo biocompatibility and mechanical properties of bioactive glass nanofiber and poly(epsilon-caprolactone) composite materials. *Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials* 2009;91:213–20.
- [81] Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27:3413–31.
- [82] Singhal S, Lohar V K, Arora V. Hot melt extrusion technique. *WebmedCentral Pharmaceutical Sciences* 2011;1:1–20.
- [83] Wang Y, Rodriguez-Perez M, Reis RL, Mano JF. Thermal and Thermomechanical Behaviour of Polycaprolactone and Starch/Polycaprolactone Blends for Biomedical Applications. *Macromolecular Materials and Engineering* 2005;290:792–801.
- [84] Bernardo C, Van Hattum F, Carneiro O, Maia J. The Role of Rheology in the Processing of Vapour Grown Carbon Fibre/Thermoplastic Composites. *NATO ASI Series: Carbon Filaments and Nanotubes: Common Origins, Differing Applications*: Kluwer Academic Pub 2001:289–300.
- [85] Sarac A, Şakar D, Cankurtaran O, Karaman FY. The ratio of crystallinity and thermodynamical interactions of polycaprolactone with some aliphatic esters and aromatic solvents by inverse gas chromatography. *Polymer Bulletin* 2005;53:349–57.
- [86] Balsamo V, Calzadilla N. Thermal characterization of polycarbonate/polycaprolactone blends. *Journal of Polymer Science* 2001;39:771–85.
- [87] Eidelman N, Chow LC, Brown WE. Calcium phosphate saturation levels in ultrafiltered serum. *Calcified Tissue International* 1987;40:71–8.
- [88] Cerruti M, Greenspan D, Powers K. Effect of pH and ionic strength on the reactivity of Bioglass 45S5. *Biomaterials* 2005;26:1665–74.
- [89] G. Orcel J, And P, Hench LL. Structural changes o silica xerogels during low temperature dehydration. *Journal Non-Crystalline Solids* 1986;1:114–30.
- [90] Peitl Filho O, LaTorre GP, Hench LL. Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45S5. *Journal of Biomedical Materials Research* 1996;30:509–14.
- [91] ElBatal H., Azooz M., Khalil EM., Soltan Monem a, Hamdy Y. Characterization of some bioglass–ceramics. *Materials Chemistry and Physics* 2003;80:599–609.

5 – Bibliografia

- [92] Shah Mohammadi M, Ahmed I, Marelli B, Rudd C, Bureau MN, Nazhat SN. Modulation of polycaprolactone composite properties through incorporation of mixed phosphate glass formulations. *Acta Biomaterialia* 2010;6:3157–68.
- [93] Elzein T, Nasser-Eddine M, Delaite C, Bistac S, Dumas P. FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 2004;273:381–7.

6 – Anexo

Anexo I – Extrusora

O processo de extrusão consiste na operação de forçar o material a passar por uma fieira a taxas constantes, permitindo desta forma a obtenção de elevadas percentagens de carga e alta homogeneidade.

A extrusora utilizada neste trabalho foi criada a partir de um motor elétrico equipado com variação da velocidade de rotação acoplado.

O parafuso foi desenvolvido com uma relação de compressão de 1.57:

$$R = \frac{\phi_{intF}}{\phi_{intI}} = \frac{11}{7} = 1.57 \quad (\text{equação 5})$$

- R – razão de compressão,
- ϕ_{intF} – diâmetro interno do parafuso à saída,
- ϕ_{intI} – diâmetro interno do parafuso à entrada.

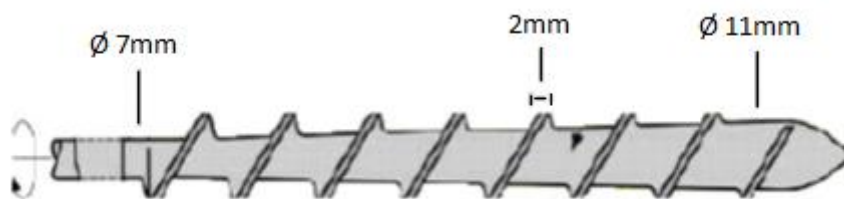


Figura 38 – Representação esquemática do parafuso utilizado na extrusora.

O transporte é feito por arraste criado pela ação de rotação do parafuso. O cilindro que constitui a extrusora é aquecido por três resistências (zona 1, zona 2 e zona 3) que permitem adequar o perfil de temperaturas escolhido a cada material. A zona de saída é constituída por uma fieira onde se encontra uma quarta resistência que tem como objetivo evitar a solidificação do material no interior da máquina, mantendo-o ligeiramente aquecido até à sua expulsão.

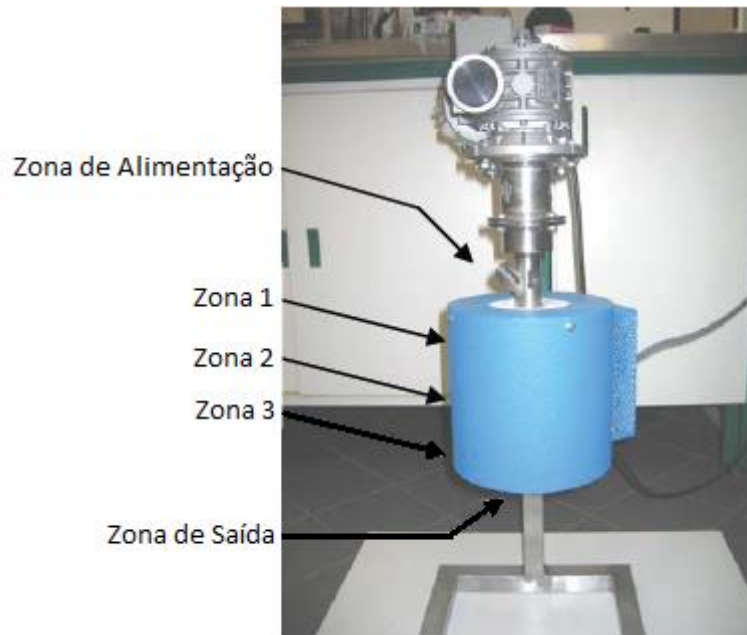


Figura 39 - Mini-extrusora.