



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS
DOUTORADO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS**

GEANE CONCEIÇÃO CARVALHO

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE
ARCABOUÇOS 3D DE ALGINATO, FIBROÍNA E HIDROXIAPATITA PARA
REGENERAÇÃO TECIDUAL ÓSSEA.**

Orientador: Professor Dr. Luís Eduardo Almeida

Co-orientadora: Professora Dra. Débora dos Santos Tavares

SETEMBRO DE 2018

SÃO CRISTÓVÃO, SE.

GEANE CONCEIÇÃO CARVALHO

PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE ARCABOUÇOS
3D DE ALGINATO, FIBROÍNA E HIDROXIAPATITA PARA REGENERAÇÃO
TECIDUAL ÓSSEA.

Tese apresentada ao programa de Pós
Graduação em Ciência e Engenharia de
Materiais pela Universidade Federal de
Sergipe como requisito para a obtenção
do Grau de doutor em Ciência e
Engenharia dos Materiais.

Linha de pesquisa: Polímeros,
Blendas e seus Compósitos

Orientador: Prof. Dr. Luís Eduardo Almeida

São Cristóvão - SE

2018

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

C331p Carvalho, Geane Conceição
Preparação, caracterização e avaliação biológica de arca-bouços 3D de alginato, fibroína e hidroxiapatita para regeneração tecidual óssea / Geane Conceição Carvalho ; orientador Luís Eduardo Almeida. - São Cristóvão, 2018.
94 f. : il.

Tese (doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) –
Universidade Federal de Sergipe, 2018.

1. Ciência dos materiais. 2. Ossos - Regeneração. 3. Materiais biomédicos. 4. Hidroxiapatita. 5. Compostos de sódio. 6. Proteínas. I. Almeida, Luís Eduardo orient. II. Título.

CDU 66.017:616.71

“Preparação, caracterização e avaliação biológica de arcabouços 3D de alginato, fibroína e hidroxiapatita para regeneração tecidual óssea”

Geane Conceição Carvalho

Tese submetida ao corpo docente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS da Universidade Federal de Sergipe como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS.

Aprovada por:



Prof. Dr. Luís Eduardo Almeida



Profa. Dra. Rossana Mara da Silva Moreira Thiré



Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo



Profa. Dra. Cristiane Xavier Resende



Prof. Dr. Euler Araújo dos Santos

SÃO CRISTÓVÃO, SE – BRASIL.

Setembro/2018

DEDICATÓRIA

*... À minha mãe (in memoriam), com todo meu amor e gratidão,
espero ter sido merecedora de todo esforço feito por mim,
principalmente no que se refere a minha formação.*

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, toda minha gratidão, pois não foi fácil chegar até aqui, foi um longo e árduo caminho percorrido, na certeza que em alguns momentos, me carregou em seus braços. À minha **Mãe** (*in memoriam*), amor incondicional eterno, que nunca mediou esforços para me proporcionar educação, sempre me mostrando o quanto era importante estudar, mesmo não tendo ela a mesma oportunidade no passado. O que sou hoje devo exclusivamente a sua dedicação a mim, que falta a senhora me faz! Ao meu Esposo **Antônio César**, por sua compreensão e apoio imensurável, por suportar todo meu estresse e por ser tão presente, principalmente quando precisei estar ausente. Aos meus filhos, **Deivid Lucas, Maria Vitória, Millena Beatriz e César Júnior**, pela paciência e por todo carinho, vocês são os principais estímulos, em persistir nos meus objetivos e não adianta perguntar quando irei parar de estudar (vocês sabem a resposta, rsrs), é justamente essa a lição que deixo para vocês, busquem o conhecimento sempre, todo dia, a cada momento, em qualquer circunstância. Amo vocês! Aos **meus irmãos e sobrinhos**, pessoas especiais que diretamente me incentivaram e desde sempre acreditaram em mim. Ao professor Dr. **Luis Eduardo Almeida**, meu orientador e amigo, meu referencial enquanto professor, meus sinceros agradecimentos por ter confiado em mim, obrigada por todo apoio e contribuição de forma direta na minha formação e evolução intelectual, lembro bem de suas palavras quando nos conhecemos “nada é por acaso”. À minha co-orientadora e amiga, professora Dra. **Débora dos Santos Tavares**, pelo apoio, por compartilhar comigo seus conhecimentos, estando sempre ao meu lado durante a fase de avaliação biológica, você certamente tornou meu trabalho mais completo. Ao professor Dr. **Euler Araújo dos Santos**, por toda atenção nas diversas vezes que o procurei pedindo orientação, suas sugestões foram extremamente valiosas. À minha amiga de infância professora Msc. **Lígia Patrícia Alcântara Costa**, minha total admiração, obrigada por todo incentivo e carinho. À amiga professora Dra. **Jamilly Ribeiro Lopes**, meus sinceros agradecimentos pela amizade, carinho e por toda ajuda durante a primeira fase desse estudo. Ao professor Dr. **Paulo Autran Leite Lima**, pela troca de experiências e parceria de sempre. A todos os amigos do laboratório de biomateriais, em especial a **Erisfagna e Cristiano** por toda ajuda, pela amizade e companheirismo. Por fim, a Universidade Federal de Sergipe (UFS), a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), a Universidade Federal de Sorocaba por todo apoio laboratorial e a CAPES pelo financiamento essencial no desenvolvimento dessa pesquisa.

Resumo da Tese apresentada ao P²CEM/UFS como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutora em Ciência e Engenharia de Materiais (D.Sc.).

PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE ARCABOUÇOS 3D DE ALGINATO, FIBROÍNA E HIDROXIAPATITA PARA REGENERAÇÃO TECIDUAL ÓSSEA.

Geane Conceição Carvalho

Setembro/2018

Orientador: Luis Eduardo Almeida

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais

Pesquisas recentes na bioengenharia permitem a produção de arcabouços tridimensionais biodegradáveis, para atuarem como suporte temporário na regeneração tecidual óssea. Nessa perspectiva, foi produzido, caracterizado e avaliado o comportamento *in vitro* de arcabouços 3D porosos, à base de alginato de sódio (AS), fibroína da seda (FS) e hidroxiapatita (HA), em diferentes proporções: grupo I: AS (100 % da composição), grupo II: AS/FS/HA (25:25:50 % da composição), grupo III: AS/FS/HA (50:25:25 % da composição), grupo IV: AS/FS/HA (35:35:30 % composição), com o propósito de avaliar a influência da composição frente às células das linhagens MC3T3-E1 e MG-63. Análises físico-químicas foram realizadas através de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier e difração de raios X, a fim de investigar a interação física dos materiais no compósito. Além disso, o comportamento de degradação térmica dos arcabouços foi estudado, por análise termogravimétrica e calorimetria exploratória diferencial, que forneceu compreensão dos possíveis eventos térmicos ocorridos. Alterações morfológicas e análises de microestrutura foram observadas em ensaio de bioatividade e por microtomografia computadorizada respectivamente. Por fim, concluímos, que independente da composição, todos os arcabouços produzidos possuem uma composição topográfica e de microestrutura capazes de promover adesão, proliferação e diferenciação osteogênica, de forma mais eficaz, como verificado por ensaios biológicos. Entretanto os arcabouços foram considerados biocompatíveis sendo, portanto, viáveis para utilização como suportes na regeneração do tecido ósseo.

Abstract of the Thesis presented to P²CEM / UFS as partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Materials Science and Engineering (D.Sc.).

PREPARATION, CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL EVALUATION OF 3D SCAFFOLDS OF ALGINATE, FIBROIN AND HYDROXYAPATITE FOR BONE TISSUE REGENERATION.

Geane Conceição Carvalho

September/2018

Advisor: Luis Eduardo Almeida

Department: Materials Science and Engineering

Recent researches in bioengineering allow the production of three-dimensional biodegradable scaffolds to act as temporary support in bone tissue regeneration. In this perspective, the in vitro behavior of porous 3D scaffolds based on sodium alginate (SA), silk fibroin (SF) and hydroxyapatite (HA) at different proportions was evaluated as follows: group I: SA (100 wt.%), group II: SA/SF/HA (25:25:50 wt.%), group III: SA/SF/HA (50:25:25 wt.%), group IV: SA/SF/HA (35:35:30 wt.%), face to MC3T3-E1 and MG-63 cells, for a possible application in bone tissue engineering. Physical-chemical analyzes were performed using Fourier transform infrared spectroscopy and X ray diffraction, in order to demonstrate the physical interaction of the materials in the composite. In addition, the thermal degradation behavior of the scaffolds was assessed by thermogravimetric analysis and differential scanning calorimetry which provided an understanding of possible thermal events. Morphological changes and microstructure analyzes were observed in a bioactivity assay and by computerized microtomography, respectively. Finally, we conclude that regardless of composition, all the scaffolds produced have a topography and microstructure composition capable of promoting osteogenic adhesion, proliferation and differentiation, more effectively, as verified by biological assays. However, the frameworks were considered biocompatible and therefore feasible for use as supports in the regeneration of bone tissue.

ÍNDICE

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO.....	16
CAPÍTULO II. OBJETIVOS.....	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
CAPÍTULO III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
3.1 OSSO.....	22
3.1.1 Composição química e formação do tecido ósseo.....	22
3.2 ENXERTOS.....	26
3.3 BIOMATERIAIS.....	27
3.3.1 Hidroxiapatita (HA).....	30
3.3.2 Alginato de Sódio(AS).....	33
3.3.3 Fibroína de seda (FS).....	34
CAPÍTULO IV. REVISÃO DE LITERATURA.....	37
4.1 ARCABOUÇOS 3D À BASE DOS MATERIAIS SELECIONADOS (AS, FS, HA).....	38
4.2 POROSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DE PORO.....	39
4.3 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA.....	40
CAPÍTULO V. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
5.1 MATERIAIS.....	44
5.2 MÉTODOS.....	44
5.2.1 Produção dos arcabouços.....	45
5.2.2 Dimensões e peso médio das amostras.....	46
5.2.3 Caracterização físico-química.....	46

5.2.3.1	<i>Difração de Raios X (DRX)</i>	46
5.2.3.2	<i>Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier usando refletância total atenuada (FTIR- ATR)</i>	46
5.2.3.3	<i>Análise Termogravimétrica (TG)</i>	46
5.2.3.4	<i>Análise Térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i>	47
5.2.4	Caracterização morfológica e topográfica.....	47
5.2.4.1	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	47
5.2.4.2	<i>Microtomografia computadorizada (μCT)</i>	47
5.2.5	Ensaio in vitro com os arcabouços.....	48
5.2.5.1	<i>Ensaio de degradação</i>	48
5.2.5.2	<i>Estudo de bioatividade in vitro</i>	49
5.2.6	Avaliação biológica.....	49
5.2.6.1	<i>Processo de esterilização</i>	49
5.2.6.2	<i>Cultura celular</i>	50
5.2.6.3	<i>Ensaio de citotoxicidade</i>	50
5.2.6.4	<i>Análise de proliferação celular</i>	51
5.2.6.5	<i>Análise da diferenciação celular</i>	52
5.2.7	Análise estatística.....	52
CAPÍTULO VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO		53
6.1	DIMENSÕES E MASSA MÉDIA DAS AMOSTRAS.....	54
6.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	54
6.2.1	<i>Difração de Raios X (DRX)</i>	54
6.2.2	<i>Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier usando refletância total atenuada (FTIR- ATR)</i>	57
6.2.3	<i>Análise Termogravimétrica (TG)</i>	59
6.2.4	<i>Análise Térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i>	61
6.3	MORFOLOGIA e TOPOGRAFIA.....	62
6.3.1	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	62

6.3.2 Microtomografia Computadorizada (μ CT).....	64
6.4 ENSAIOS IN VITRO COM OS ARCABOUÇOS.....	69
6.4.1 Ensaio de degradação.....	69
6.4.2 Ensaio de bioatividade.....	70
6.5 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA.....	74
6.5.1 Ensaio de citotoxicidade.....	74
6.5.2 Análise de proliferação celular.....	75
6.5.3 Análise da diferenciação osteoblástica.....	79
CAPÍTULO VII. CONCLUSÃO.....	83
CAPÍTULO VIII. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	85
CAPÍTULO IX. REFERÊNCIAS.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de células ósseas. Adaptado de (TORMENA 2009).....	22
Figura 2. Representação esquemática da evolução dos biomateriais nos últimos anos (adaptado de Allo et al., 2012).....	28
Figura 3. Imagem dos Arcabouços tridimensionais de Alginato de Sódio, Fibroína da Seda e Hidroxiapatita produzidos nesse estudo.....	29
Figura 4. Estrutura da célula unitária da HAp, mostrando os átomos formadores do mineral: cálcio (Ca), hidrogênio (H), fósforo (P) e os grupos hidroxila (OH ⁻). Fonte: Adaptado de (Muñoz, 2011).....	32
Figura 5. Estrutura dos monômeros do ácido algínico (a) e a representação estrutural de um fragmento da cadeia polimérica do ácido algínico (b), onde o blocos M formado pelo ácido β-D-manurônico e o bloco G formado pelo ácido α-L gulurônico (Adaptado de Draget et al. 2011).....	34
Figura 6 Microscopia da fibra de fibroína da seda Adaptado de (Kato, 2012).....	36
Figura 7. Esquema ilustrativo da estrutura secundária da fibroína de seda: (a) α-hélice e (b) Estrutura da folha β e principais aminoácidos em sua composição (Adaptada de GARRETT; GRISHAM, 2009).....	36
Figura 8. Resumo das etapas realizadas.....	44
Figura 9. Difratoogramas de DRX em a) os pós puros da Fibroína da Seda (FS), do Alginato de Sódio (AS), e da Hidroxiapatita (HA) puros e b) da Hidroxiapatita pura e dos grupos I, II, III e IV. Os asteriscos marcam os principais picos identificados.....	56
Figura 10. Espectros de transmitância no infravermelho (FTIR-ATR) a) os pós puros da Fibroína da Seda (FS), do Alginato de Sódio (AS), e da Hidroxiapatita (HÁ) e b) dos grupos de arcabouços produzidos e reticulados.....	59

Figura 11. Análise termogravimétrica das amostras de arcabouços de alginato de sódio, fibroína da seda e hidroxiapatita até a temperatura de 1000°C com uma razão de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de nitrogênio: (a) curvas de perda de massa dos arcabouços, (b) derivadas das curvas.....	61
Figura 12. Termograma de DSC dos grupos de arcabouços produzidos e reticulados analisados em uma faixa de temperatura de 0 a 250°C e razão de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de nitrogênio.....	62
Figura 13. Micrografias dos grupos: a) Grupo I; b) Grupo II; c) Grupo III; d) Grupo IV.....	64
Figura 14. Quantitativo em micrometro do tamanho de poro dos grupos de arcabouços produzidos e reticulados.....	64
Figura 15. Imagens tomográficas tridimensionais reconstruídas dos arcabouços utilizando a renderização direta do volume.....	67
Figura 16. Imagens tomográficas tridimensionais coronal, sargital e transaxial reconstruídas dos arcabouços porosos.....	67
Figura 17. Imagens tomográficas tridimensionais reconstruídas dos arcabouços usando o método matemático Algoritmo Double-Time Cubes.....	68
Figura 18. Variação da perda de massa dos arcabouços em função do tempo de imersão na solução de PBS.....	70
Figura 19. Micrografias da área de superfície dos arcabouços imersos em SBF após 14 dias. (a) grupo controle; (b) grupo II; (c) grupo III; (d) grupo IV.....	72
Figura 20. Difractogramas dos compósitos após 1, 7 e 14 dias em SBF: (a) Grupo I; (b) Grupo II; (c) Grupo III; (d) Grupo IV.....	73
Figura 21. Ensaio de citotoxicidade dos grupos com células fibroblásticas de rato (L929), através do método colorimétrico – MTT. Apresentando comparativo entre os controles positivo e negativo. (* estatisticamente diferente).....	74

Figura 22. Curva padrão da linhagem MC3T3-E1 demonstrando o número de células em função da absorvância.....	76
Figura 23. Curva padrão da linhagem MG-63 demonstrando o número de células em função da absorvância.....	76
Figura 24. Ensaio de proliferação celular dos grupos I, II, III e IV, com células pré-osteoblásticas de rato (MC3T3-E1) através do método colorimétrico – MTT durante 7, 14 e 21 dias (*, **estatisticamente diferente).....	78
Figura 25. Ensaio de proliferação celular dos grupos I, II, III e IV, com células osteoblásticas de osteosarcoma humano (MG-63) através do método colorimétrico – MTT durante 7, 14 e 21 dias. (GI estatisticamente diferente entre os tempos 7 e 14 dias; GI em 7 dias estatisticamente diferente de GII e GIV; p<0,05).....	79
Figura 26. Curva padrão em nmols p-nitrofenil-fosfato em função da absorvância para determinação da atividade enzimáticas das células.....	80
Figura 27. Ensaio do ALP mostrando a atividade fosfatase alcalina das células pré-osteoblásticas de rato (MC3T3-E1) nos grupos I, II, III e IV, durante 7, 14 e 21 dias (*, estatisticamente diferente).....	81
Figura 28. Ensaio do ALP mostrando a fosfatase alcalina das células MG-63 dos grupos I, II, III e IV durante 7, 14 e 21 dias de cultura. GI estatisticamente diferente de GII e GIV em todos os tempos; GIII estatisticamente diferente de GIV em todos os tempos; GIII estatisticamente diferente de GI (14 dias); GIII estatisticamente diferente de GII (21 dias); GII estatisticamente diferente entre os tempos de 7e 14 dias.	82

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Composição química do osso.....	24
Tabela 2. Parâmetros estrutural e biológico, dos arcabouços 3D.....	30
Tabela 3. Composição mineral do osso e da hidroxiapatita. Adaptado de (MOREIRA, 2000).....	31
Tabela 4. Composição em massa dos arcabouços tridimensionais.....	45
Tabela 5. Reagentes utilizados na preparação de 1 litro de SBF. Adaptado de (KOKUBO et al. 2006).....	49
Tabela 6. Média e desvio-padrão das dimensões e da massa em (mg) dos grupos I, II, III e IV.....	54
Tabela 7. Parâmetros morfométricos dos arcabouços à base de alginato, fibroína e hidroxiapatita.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

μct.....	Microtomografia computadorizada
ABNT.....	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ALG.....	Alginato de sódio
ALP.....	Atividade de fosfatase alcalina
ATCC.....	<i>American Type Culture Collection</i>
DO.....	Densidade óptica
DMEM.....	<i>Dulbecco modified Eagle medium</i>
DMSO.....	Dimetilsulfóxido
DRX.....	Difração de raios X
DSC.....	Calorimetria Exploratória Diferencial
EDTA.....	Etilenodiaminotetracético
FS.....	Fibroína da seda
FTIR-ATR.....	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada
GLA.....	Ácido γ-carboxiglutâmico
HA.....	Hidroxiapatita
HCl.....	Ácido clorídrico
ISO.....	<i>International Organization for Standardization</i>
JCPDS.....	<i>Joint Committee on Powder Diffraction Standards</i>
LIN.....	Laboratório de Instrumentação Nuclear
MEV.....	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT.....	3-(4-5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NE.....	Número de células

nHAP.....Nanohidroxiapatita
PBS.....Solução salina tamponada
PMMA..... Poli(metilmetaacrilato)
PNP.....P-nitrofenol
SD.....*Standard deviation (desvio padrão)*
SBF.....*Simulated body fluid (fluido corporal simulado)*
SFBSoro fetal bovino
TG.....Análise Termogravimétrica
TRITON X-1004-(1,1,3,3-Tetrametilbutil)fenil-poliethileno glicol.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Existe uma necessidade clínica de biomateriais sintéticos, que podem reparar de forma viável defeitos ósseos, pois até o ano de 2020 serão realizadas anualmente em torno de 6,6 milhões de cirurgias ósseas sendo que a maioria com o objetivo de reparar defeitos ósseos de “tamanho crítico” que resultam de fratura traumática, devido ao elevado índice de acidentes automobilísticos, osteossarcoma ou malformação congênita e doenças degenerativas como a osteoporose (MCNAMARA *et al.*, 2014).

As perdas ósseas fizeram com que houvesse interesse na busca por estratégias, a fim de repor o osso que foi perdido. Recentemente, a bioengenharia tecidual, que é uma ciência emergente e envolve diversas áreas do conhecimento a exemplo da biologia molecular e engenharia de materiais (TEIMOURI *et al.*, 2015) desempenha um papel fundamental e surgiu como uma alternativa promissora na regeneração óssea, uma vez que introduziu novas estratégias, como a produção de arcabouços tridimensionais porosos, principalmente por envolver a expansão celular nesses arcabouços, o qual irá servir como suporte temporário até a formação do novo tecido (JIN *et al.*, 2012).

O tecido ósseo tem a capacidade de regeneração, produzindo novo tecido, com a mesma organização estrutural original, porém essa regeneração é limitada com o tamanho da lesão, assim defeitos ósseos extensos, não se regeneram espontaneamente (MCNAMARA *et al.*, 2014). O preenchimento de defeitos com osso autógeno e/ou alógeno é uma opção de tratamento regenerativo, porém, são crescentes as preocupações sobre as complicações com autoenxerto, aloenxerto e suas limitações (LOSANO *et al.*, 2018).

Esses tratamentos cirúrgicos são restritos, devido à quantidade limitada de tecido, ausência de biocompatibilidade, rejeição imunitária e risco de transmissão de doenças (SOWJANYA *et al.*, 2013).

Já é reconhecido à forte influência da matriz extracelular nas respostas biológicas de células que são estruturas complexas e para proliferarem e se diferenciarem requer ancoragem nessa matriz e com isso restabelecer não somente a estrutura, mas a função do tecido lesado (CHATZINIKOLAIDOU *et al.*, 2017). Um dos principais desafios na produção desses arcabouços para engenharia tecidual é mimetizar a matriz extracelular óssea (PATI *et al.*, 2015).

Sendo o arcabouço um dos componentes essenciais para regeneração óssea, tanto para o cultivo de células como também por possibilitar adesão, proliferação e migração celular (SHIM *et al.*, 2017), alguns critérios são significativos para o sucesso do seu desempenho como substitutos biológicos, como ser biocompatível, a fim de permitir a atividade celular normal, sem provocar qualquer efeito tóxico local ou

sistêmico; ser biorreabsorvível cujos produtos da dissolução sejam metabolizados pelo organismo; possuir uma microestrutura porosa com tamanho de poros adequados e interligados, que permita uma difusão eficaz de oxigênio e nutrientes essenciais à sobrevivência celular (KIM *et al.*, 2015).

A composição e arquitetura do arcabouço também desempenham papéis cruciais na capacidade de colonização das células e, para isso, deve possuir uma topografia de superfície, com uma composição química que favoreça a proliferação celular. Deve ainda ser biodegradável, pois a degradação desempenha papel importante na engenharia tecidual óssea, visto que, os biomateriais devem degradar a uma taxa controlada, para suportar a formação do novo tecido e, portanto, se faz necessário a compreensão e manipulação controlada das taxas de degradação do biomaterial utilizado (MELKE *et al.*, 2015). Deve possuir ainda uma resistência mecânica adequada, para assegurar o crescimento celular, ser osteocondutor e, de preferência, osteoindutor (YU *et al.*, 2017).

Estudos recentes mostram que arcabouços com estrutura 3D têm promovido à fixação de células e formação do novo tecido (SHIM *et al.*, 2017). Isto se deve ao fato do modelo tridimensional poder fornecer às células um microambiente mais natural permitindo o desenvolvimento de suas funções fisiológicas *in vitro*, uma vez que reflete ambientes biofísicos e bioquímicos nativos. Embora a simplicidade dos sistemas de cultura em 2D possam elucidar fenômenos celulares individuais, esses sistemas podem reduzir a importância biológica e a complexidade da arquitetura do tecido dinâmico, que afetam o comportamento fisiológico de células *in vivo* (YAMAMOTO *et al.*, 2014).

Esses critérios são significativos para o seu papel como substitutos biológicos, isso porque o arcabouço deve imitar a matriz extracelular, pois eles irão atuar como substrato para a adesão e proliferação de células, sendo introduzido no local defeituoso ou de perda de osso. (SAMANDARI *et al.*, 2016).

A escolha do material mais apropriado para a produção de um arcabouço capaz de cumprir todos esses requisitos é um passo crítico a ser estudado e continua sendo objeto de pesquisas para a bioengenharia tecidual óssea (YU *et al.*, 2017).

Foi produzido nesse estudo, biocompósitos à base de hidroxiapatita, alginato de sódio e fibroína da seda e estudada a influência da percentagem destes constituintes no compósito, com relação à porosidade e à adesão, proliferação e diferenciação de duas linhagens de células (SARTUQUI *et al.*, 2016).

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Avaliar a influência da proporção de alginato de sódio, fibroína da seda e hidroxiapatita, em arcabouços 3D frente às células cultivadas *in vitro* visando à aplicação dos arcabouços, na engenharia tecidual óssea.

2.2 ESPECÍFICOS

- Produzir arcabouços 3D à base de alginato de sódio, fibroína da seda e hidroxiapatita com diferentes composições.
- Caracterizar físicoquimicamente os arcabouços produzidos através de DRX, FTIR, TG, DSC, μ CT e MEV.
- Investigar a degradação e a bioatividade dos arcabouços.
- Determinar a topografia e microestrutura dos compósitos.
- Avaliar a influência da composição dos arcabouços, frente à adesão, proliferação e diferenciação *in vitro* de células pré-osteoblásticas de rato MC3T3-E1 e de osteosarcoma humano MG-63.

CAPÍTULO III
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 OSSO

3.1.1 Composição química e formação do tecido ósseo

O osso é um tecido conjuntivo, dinâmico e vascularizado, no qual a matriz extracelular é mineralizada, conferindo-lhe rigidez e mantendo algum grau de elasticidade. A estrutura da matriz óssea é composta por componentes inorgânicos principalmente cristais de hidroxiapatita e componentes orgânicos, incluindo colágeno tipo I, glicoproteínas, proteoglicanos e sialoproteínas. Por ser um tecido multifuncional, o osso é responsável por uma variedade de estímulos, dentre eles, os biológicos, bioquímicos e biomecânicos (CHEN *et al.*, 2014).

O processo como o osso é formado é chamado de ossificação ou osteogênese. A Figura 1 esquematiza os tipos principais de células que irá formar o tecido ósseo que são: os osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, todas derivadas da mesma linhagem de células osteoprogenitoras (CARREIRA *et al.*, 2014).

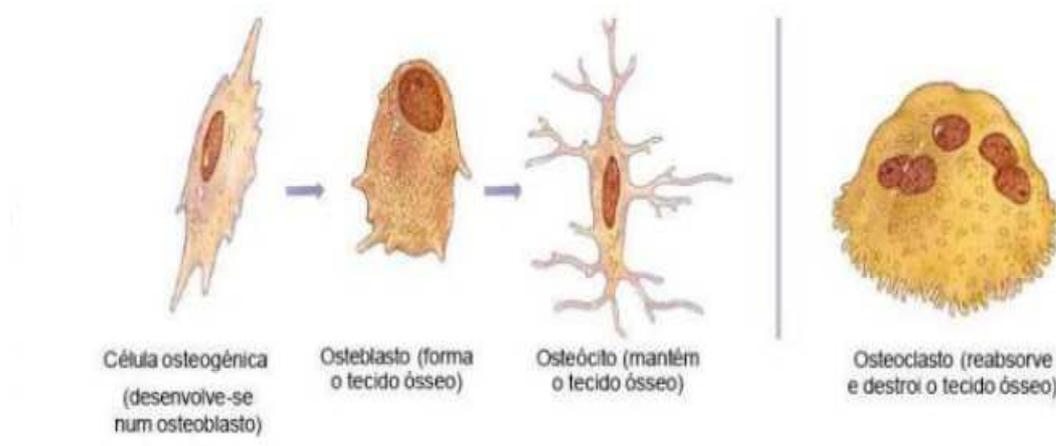


Figura 1. Tipos de células ósseas. Adaptado de (TORMENA 2009).

Os osteoblastos são as células responsáveis pela formação da matriz, que será posteriormente mineralizada. Cerca de 70% da matriz óssea são mineralizadas logo após a sua síntese e o restante sofre mineralização gradualmente (WU *et al.*, 2014).

À medida que a matriz óssea é sintetizada, os osteoblastos ficam envolvidos por ela e passam a ser chamados osteócitos. Os osteoblastos têm como função manter a viabilidade do tecido ósseo. Entre as substâncias que produz, podemos citar a fosfatase alcalina, a proteína GLA¹, grandes quantidades de colágeno do tipo I e uma variedade de outras proteínas da matriz extracelular (GU et al., 2017).

Os osteócitos são os osteoblastos encontrados aprisionados no interior da matriz óssea. Eles ocupam as lacunas, das quais partem canalículos preenchidos por projeções citoplasmáticas, mantendo a troca de pequenas moléculas e íons entre eles. Apesar das características ultraestruturais dos osteócitos, eles são essenciais para a manutenção da matriz óssea (HANKENSON *et al.*, 2015).

Os osteoclastos são células gigantes, multinucleadas, derivadas dos macrófagos e responsáveis pela remoção do osso, processo denominado osteoclasia. Essas células possuem os mecanismos necessários para dissolução dos materiais ósseos e para a digestão da matriz orgânica (WU et al., 2014).

Microscopicamente existem dois tipos de osso: osso primário (imaturo ou osteóide) é o primeiro a se formar durante o desenvolvimento fetal e durante a reparação óssea é rico em osteócitos e em feixes de colágeno não modelado, que mais tarde, são substituídos como osso secundário (maduro ou lamelar), com uma matriz mais calcificada sendo, portanto, mais forte que o osso primário (ZIMMERMAN et al., 2015).

Macroscopicamente o osso divide-se em cortical e esponjoso. De maneira geral, aproximadamente 80% do esqueleto consiste em osso cortical, formando a camada externa de todos os ossos longos, dando proteção e suporte, resistindo às forças produzidas pelo peso e movimento. O tecido ósseo cortical está organizado em unidades chamadas de ósteons, ou sistemas de "Havers" (WU et al., 2014). A Tabela 1 mostra a composição química do osso.

¹ Proteínas dependentes da vitamina K onde o resíduo do ácido glutâmico (GLU) da proteína foi carboxilado formando o ácido γ -carboxiglutâmico (GLA).

Tabela 1: Composição química do osso.

Fase	% em massa	Fase Organica	% em massa
Inorgânica			
Hidroxiapatita	60	Colágeno	20
Carbonato	4	Água	9
Citrato	0.9	Proteínas não colágenas	3
Sódio	0.7		
Magnésio	0.5		
Outros		Outros:	
: Cl ⁻ , F ⁻ , Sr ⁺ , Pb ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ²⁺		Polissacarídeos, lipídios, Osteoblastos, osteoclastos e osteócitos.	

Fonte: Adaptado de (WU et al., 2014).

Ao contrário do cortical, o tecido ósseo esponjoso ou trabecular consiste em cerca de 20% do esqueleto, apresentando uma matriz mais porosa, organizada em trabéculas, preenchida por medula óssea vermelha, na qual há produção ativa de células sanguíneas, a partir de células mesenquimais, possuindo, assim, metabolismo mais intenso que o osso cortical (HANKENSON *et al.*, 2015).

A diferenciação entre o tecido ósseo cortical e o esponjoso dá-se em virtude da disposição dos elementos constituintes. A substância óssea cortical é mais densa, pois nela, as lamínulas do tecido ósseo encontram-se fortemente unidas às outras, sem que exista espaço livre interposto. Já a substância esponjosa tem o arranjo das lamínulas ósseas, com espaço e lacunas que se comunicam umas com as outras. Isso ocorre devido à forma e tamanho irregular (CHEN *et al.*, 2014).

O tecido ósseo é o mais complexo de todos os materiais produzidos no corpo humano, altamente organizado, com o potencial de reconstruir sua estrutura original através dos processos de renovação e remodelação, de forma constante por toda a vida. Por causa de suas propriedades únicas, o osso atrai o interesse de diferentes tipos de pesquisadores que, utilizando diferentes técnicas, tentam chegar ao conhecimento completo de sua estrutura e diversidade de funções (CHEN *et al.*, 2014).

A formação do osso ocorre de três maneiras distintas: osteogênese, osteocondução e osteoindução. A osteogênese é a formação do osso pela transferência ou colocação de osteoblastos viáveis, que atuam sintetizando o osso em novos sítios.

Na osteocondução, inicialmente é formado um material como uma malha, onde vão crescer vasos e osteoblastos, que migram de regiões de osteotomia² ou fratura óssea. A osteocondução geralmente é ativada em fraturas ósseas (HANKENSON *et al.*, 2015). Já na osteoindução, células não esqueléticas desmineralizadas são diferenciadas em células mineralizadas e estruturadas através de estímulos indutivos (hormônios). O osso imaturo, por exemplo, é um material osteoindutivo e, desde que haja estímulo, ocorre a mineralização (CARREIRA *et al.*, 2014).

O osso pode assumir diferentes morfologias e funções, de acordo com sua localização no esqueleto humano, além das específicas solicitações mecânicas exigidas por cada parte do corpo (HANKENSON *et al.*, 2015).

O esqueleto corresponde ao conjunto de ossos e cartilagens, que se interligam para formar o arcabouço do corpo animal para desempenhar diversas funções. Dentre essas, citam-se: proteção (para órgãos como os pulmões), sustentação e conformação do corpo, local de armazenamento de cálcio e fósforo, deslocamento do corpo e produção de certas células sanguíneas (HANKENSON *et al.*, 2015).

O esqueleto possui duas divisões, uma axial e outra apendicular. O esqueleto axial consiste na porção mediana e é composto pelos ossos da cabeça pescoço e tronco (tórax e abdome), enquanto o esqueleto apendicular corresponde aos membros, superiores e inferiores. Os dois tipos de esqueletos são unidos por estruturas chamadas cinturas (escapular e pélvica) e juntos, constituem o conjunto completo composto por 206 ossos (CHEN *et al.*, 2014).

² osteotomia é o seccionamento cirúrgico de um osso.

3.2 ENXERTOS

Procedimentos cirúrgicos para reparos de perda de tecido, devido a algum trauma ou extração de tecido doente, envolvem implantes de enxertos autólogos e alogênicos que podem ser doados de um sítio do mesmo paciente (autoenxerto), de outro ser humano (homoenxerto) ou de outras espécies (xenoenxertos), porém estes tratamentos cirúrgicos são restritos devido à quantidade limitada de tecido, ausência de biocompatibilidade, rejeição imunitária e risco de transmissão de doenças. Com isso, há uma necessidade clínica de biomateriais sintéticos, que podem reparar de forma viável grande defeitos ósseos (LOSANO et al., 2018).

Vários estudos têm sido realizados, na busca de um método eficaz, buscando-se preencher as falhas ósseas, quando existe perda muito grande de tecido ósseo ou dificuldade em sua regeneração. Assim, diversos materiais são utilizados como enxertos ósseos com o intuito de estimular a osteogênese (enxertos e implantes osteogênicos e osteoindutores) ou mesmo direcionar de forma mais rápida e apropriada à cicatrização do osso (enxertos e implantes osteocondutores) (CARREIRA et al., 2014).

A finalidade no tratamento de uma fratura é obter rápida união óssea, preservando a função normal das articulações e tecidos moles próximos. A procura por substitutos que apresente as mesmas propriedades que o osso autógeno e com o objetivo de reduzir os procedimentos cirúrgicos, fez com que as pesquisas desenvolvessem materiais sintéticos. Vários materiais foram desenvolvidos, entre eles: enxertos homogêneos, xenógenos, membranas biológicas, vidros bioativos e derivados da hidroxiapatita (TURNBULL et al., 2018).

O material de enxerto ideal deve obedecer aos seguintes requisitos: fornecimento ilimitado sem comprometer a área doadora; promover a osteogênese; não apresentar resposta imunológica do hospedeiro; revascularizar rapidamente; estimular a osteoindução; promover a osteocondução; ser substituído completamente por osso em quantidade e qualidade semelhante ao do hospedeiro (TURNBULL et al., 2018).

Neste sentido, a engenharia tecidual tem desempenhado um papel fundamental, uma vez que introduziu novas estratégias com base no desenvolvimento de sistemas compostos que integram células, fatores de crescimento e arcabouços tridimensionais porosos, objetivando mimetizar a matriz extracelular óssea e com isso restabelecer não somente a estrutura, mas a função do tecido lesado (CHATZINIKOLAIDOU et al., 2017).

3.3 BIOMATERIAIS

Por definição, biomaterial é qualquer substância ou combinação de substâncias, naturais ou não, que não sejam drogas ou fármacos, utilizados em aplicações biomédicas e que interagem com sistemas biológicos, que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo (BABU & OGLE, 2015).

Existe uma gama de materiais que podem ser utilizados como biomateriais, sendo que cada um deles pode apresentar propriedades que irão classificá-los de diferentes maneiras, dependendo das funções que deverão desempenhar no local de inclusão (SOWJANYA *et al.*, 2013).

Dois fatores são de extrema importância para o sucesso de um biomaterial: A biocompatibilidade, que é a habilidade de um material ter um desempenho satisfatório, com resposta adequada do tecido hospedeiro, para uma dada aplicação e a biofuncionalidade, que é a capacidade do material desempenhar apropriadamente a função para o qual foi projetado, pelo tempo necessário, que pode ser longo nos casos de implantes permanentes, ou curto no caso de implantes temporários (TURNBULL *et al.*, 2018).

A evolução dos biomateriais (ver Figura 2) tem contemplado diferentes fases que têm contribuído para o desenvolvimento dos materiais, procurando reproduzir as condições nativas do tecido onde vai ser implantado.

Cada biomaterial possui uma classificação, de acordo com seu comportamento fisiológico: Os bioativos são materiais, onde em sua superfície ocorrem ligações químicas com o tecido ósseo, fato conhecido como osteointegração. Os reabsorvíveis ou biorreabsorvíveis são materiais que atuam por um determinado período junto aos tecidos biológicos e depois são degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo, sem necessidade de outra intervenção cirúrgica. Os mais conhecidos são os biovidros, as vitrocerâmicas à base de fosfato de cálcio, a hidroxiapatita e os compostos de fosfato de cálcio (ALLO *et al.*, 2012).

Os bioinertes são materiais tolerados pelo organismo, mas a formação do tecido envoltório é mínima. Os mais conhecidos são: alumina, zircônia, titânio e suas ligas e materiais carbonosos (ALLO *et al.*, 2012).

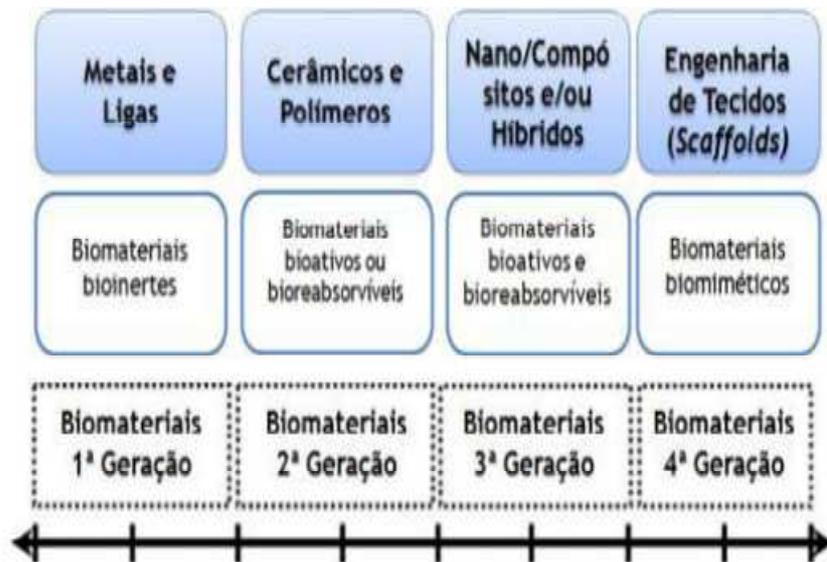


Figura 2. Representação esquemática da evolução dos biomateriais (adaptado de Allo *et al.*, 2012).

Na primeira geração foram desenvolvidos os materiais bioinertes, cujo foco para seu desenvolvimento era o de não provocar reação de corpo estranho no organismo. Conceitos de biocompatibilidade e biodegradabilidade fazem parte da segunda e terceira geração de biomateriais que inclui os materiais capazes de estimular respostas celulares específicas em nível molecular. Essas gerações são interpretadas de forma conceitual e não cronológica, visto que cada uma delas representa uma evolução nas propriedades dos materiais envolvidos, de acordo com as necessidades e exigências que surgiam (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de novos biomateriais para a regeneração tecidual óssea tem contribuído para o aumento da expectativa de vida de pessoas que sofrem com doenças como a osteoporose ou traumas por acidentes (PILIPCHUK *et al.*, 2015).

Embora uma grande variedade de estratégias terapêuticas com base em diferentes tipos esteja sendo estudada, há uma necessidade profunda de compreensão dos processos biológicos e os mecanismos subjacentes às interações entre células e biomateriais durante a cascata de formação do novo tecido. Uma das estratégias para essas terapias é a utilização de um arcabouço tridimensional (*scaffolds*), que se assemelhe ao tecido ósseo (PILIPCHUK *et al.*, 2015).

Arcabouços 3D são matrizes tridimensionais que funcionam como suporte para regeneração de tecidos perdidos ou danificados. Atualmente é uma das técnicas mais promissoras em desenvolvimento devido a sua biodegradabilidade, por permitir a adesão, a proliferação e migração celular, com o objetivo de regenerar de forma controlada, o tecido danificado (ANSARI *et al.*, 2013). Na Figura 3 tem-se a imagem de arcabouço 3D.



Figura 3. Imagem dos Arcabouços tridimensionais de Alginato de Sódio, Fibroína da Seda e Hidroxiapatita produzidos nesse estudo.

Recentemente, esses arcabouços estão sendo produzidos com arquitetura tridimensional e geometrias definidas com precisão, pois critérios como: porosidade e tamanho de poros precisam ser levados em consideração controlando assim, o arranjo das células e dos materiais bioativos (KIM *et al.*, 2015).

Idealmente, após a degradação total do arcabouço, o tecido deverá recuperar sua função, sem a necessidade de intervenção clínica para remover o implante. No entanto, este não é suficiente para restaurar a funcionalidade completa do tecido (YAGUE *et al.*, 2014).

O sucesso da regeneração tecidual óssea depende, em grande parte, da produção de arcabouços tridimensionais porosos semelhantes à matriz extracelular natural do osso (KUNDU *et al.*, 2013).

A Tabela 2 mostra o esquema representativo dos parâmetros estrutural e biológico dos arcabouços 3D, que são essenciais para a regeneração tecidual óssea.

Tabela 2. Parâmetros estrutural e biológico, dos arcabouços 3D.

Função do arcabouço	Característica necessária
Não provocar resposta inflamatória de toxicidade <i>in vivo</i> .	Deve ser biocompatível, sem provocar qualquer efeito tóxico local ou sistêmico.
Fixação de células e formação do novo tecido.	Forma específica tridimensional
Promover a migração das células.	Possuir uma microestrutura porosa e conectividade entre os poros.
Permitir adesão, proliferação e diferenciação celular.	Possuir uma topografia de superfície que permita adesão, proliferação e diferenciação celular.
Possuir propriedades de degradação.	Comportamento de degradação à medida que ocorre a formação do novo tecido.

Fonte: Adaptado de (YAGUE *et al.*, 2014).

Atuais avanços no campo dos biomateriais e da biologia celular permitem que os arcabouços possam abranger a maioria das características citadas (CHATZINIKOLAIDOU *et al.*, 2016). Para isso, a escolha do material a ser usado como biomaterial depende da análise de uma série de requisitos que devem ser considerados.

Cerâmicas bioativas como a hidroxiapatita e biopolímeros como alginato de sódio e fibroína da seda têm sido amplamente desenvolvidos e analisados em compósitos para esta finalidade (KUNDU *et al.*, 2013).

3.3.1 Hidroxiapatita (HA)

A hidroxiapatita (HA) é um fosfato de cálcio, de fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com uma relação molar de $(\text{Ca}/\text{P}) = 1,67$. É uma cerâmica bioativa, que tem sido utilizada em procedimentos clínicos, por mais de 25 anos devido à semelhança com os constituintes minerais dos ossos e dentes humanos, podendo ter origem nos corais e algas, ser derivado de mineral ósseo natural, ou ainda desenvolvido sinteticamente (FOOK *et al.*, 2010). A Tabela 3 apresenta um comparativo da composição mineral do osso e da hidroxiapatita.

Tabela 3 – Composição mineral do osso e da hidroxiapatita. Adaptado de (FOOK *et al.*, 2010).

Composição química	Osso%	Hidroxiapatita%
Cálcio	37,0	39,03
Fósforo	16,0	18,7
Carbonato	4,0	2,0
Magnésio	0,4	0,14
Sódio	0,6	0,12
Potássio	0,05	<0,05

A estrutura porosa da hidroxiapatita funciona como suporte passivo à neoformação vascular, desta forma, a porosidade irá permitir a migração e proliferação de osteoblastos e células mesenquimais, além da deposição de matriz óssea nos espaços vazios, o que resulta em formação de um novo tecido ósseo permeando o biomaterial implantado (WANG *et al.*, 2013).

A hidroxiapatita vem sendo bastante utilizada com o objetivo de verificar sua função na regeneração óssea, sendo comprovada essa sua propriedade osteocondutora, com resultados satisfatórios o suficiente para ser indicada como alternativa para a enxertia óssea na rotina clínica (JIN *et al.*, 2014). A Figura 4 mostra a representação esquemática da estrutura da célula unitária da hidroxiapatita.

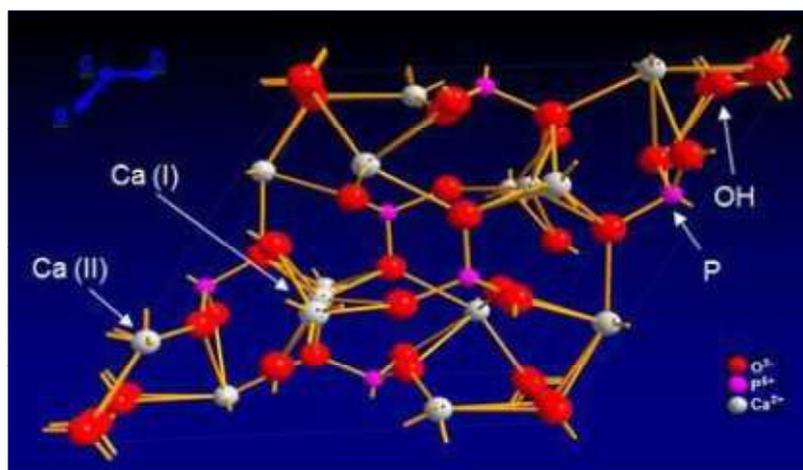


Figura 4. Estrutura da célula unitária da HAp, mostrando os átomos formadores do mineral: cálcio (Ca), hidrogênio (H), fósforo (P) e os grupos hidroxila (OH⁻). Fonte: Adaptado de (Muñoz, 2011).

A célula unitária da HAp hexagonal é formada por 10 íons de cálcio localizados em sítios não equivalentes, quatro no sítio I, tetraédricos (Ca1) e seis no sítio II, 6 átomos de fósforo, 24 átomos de oxigênio e 2 íons OH⁻. Os cátions cálcio (Ca²⁺) são agrupados em 2 sítios não equivalentes, 6 íons cálcio Ca²⁺ [Ca (II)] e 4 íons no sítio Ca²⁺ [Ca (I)]. Existem 6 átomos de fósforo e o grupo OH ocupando 1 sítio. Na estrutura da HAp existem ainda 3 sítios que são ocupados por 24 átomos de oxigênio (COSTA, 2009).

Recentemente vários métodos estão sendo utilizados na síntese da hidroxiapatita a saber: métodos químicos por via úmida, incluindo precipitação aquosa, hidrólise, processo sol-gel, dentre outros, pois, a hidroxiapatita quando sintetizada em laboratório fica livre de impurezas o que retarda a osteogênese. Além disso, o tamanho, a forma e a porosidade do produto, podem ser controlados e pré-determinados (RODRIGUES *et al.*, 2012).

O interesse da hidroxiapatita como biomaterial é explicado claramente por sua biocompatibilidade e bioatividade (PECK *et al.*, 2011). Porém, sua baixa resistência mecânica, restringe seu uso a aplicações, onde não se requer esforços mecânicos, como recobrimento de próteses dentárias e maxilofacial, implantes dentários, otorrinolaringologia, aumento da crista alveolar, defeitos periodontais, cirurgia de coluna, recobrimento pulpar entre outros (YAQUE *et al.*, 2014).

No entanto, arcabouços de natureza mais frágil de base polimérica têm sido estudados em nosso grupo e suas aplicações visam desde defeito crítico de osso, que não exige esforço mecânico intenso, até defeito osteocondral e regeneração de tecido pulpar.

Assim, para manter o implante de forma segura, com propriedades físico-químicas adequadas e características desejáveis ao reparo, pode-se associa-lo em compósitos por promover maior eficiência nesse processo reparador, com vários tipos de biopolímeros, dentre eles o alginato de sódio e a fibroína da seda (CUOZZO *et al.*, 2014), principalmente com o intuito de potencializar sua propriedade osteocondutora, sua capacidade de fixação ao osso e sua resistência mecânica (FAN *et al.*, 2012).

O termo compósito é empregado, para designar a combinação de dois ou mais materiais, onde mantêm sua identidade física e química inicial. As propriedades mecânicas do material resultante, normalmente são superiores aos dos componentes individualmente (LOW *et al.*, 2006).

Atualmente têm-se usado polímeros sintéticos bioabsorvíveis, a fim de melhorar a estrutura física e química, bem como, fornecer condições hidrofílicas e hidrofóbicas, padrão de degradação e propriedades mecânicas a exemplo do alginato de sódio (RAJKUMAR *et al.*, 2011).

3.3.2 Alginato de Sódio (AS)

Alginato é um biopolímero extraído de diferentes espécies de macroalgas, principalmente algas marrons, tais como, *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystid pyrifera* (MENG *et al.*, 2013).

Em termos moleculares, o alginato de sódio é da família dos copolímeros binários, composto por ligações 1-4 de ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L gulurônico, (ver Figura 5), as quais podem variar em composição e sequência, arranjadas em blocos de homopolímeros (GG e MM), junto com blocos alternados (MG), ao longo da cadeia. (MENG *et al.*, 2013).

O alginato de sódio é um polímero capaz de encapsular e imobilizar uma variedade de células na engenharia tecidual, porque é biocompatível e biodegradável. Possui alta bioadesividade³, não tóxico, baixo custo, além disso, o alginato de sódio, em presença do cálcio e outros íons divalentes, podem trocar o íon sódio de sua estrutura por um íon divalente, ocorrendo geleificação. Estas ligações se acomodam de maneira tridimensional para formar uma estrutura no formato de “egg-box” (JIAO *et al.*, 2016).

Essa interação intermolecular entre cátions e grupos carboxílicos das cadeias do alginato, promovendo uma estrutura tridimensional gelatinosa permite a inclusão de algumas moléculas bioativas em sua matriz polimérica por meio de interações eletrostáticas e de Van Der Waals devido à perda de água (NAYAK *et al.*, 2013).

A diferença na sequência dos blocos determinará a flexibilidade da cadeia, influenciando na solubilidade e estabilidade do gel que será formado. Blocos MG, por exemplo, formam cadeias mais flexíveis e mais solúveis em pH baixos (MENG *et al.*, 2013).

³ Propriedade que determinados materiais tem, de serem capazes de se ligarem a substratos biológicos de duas maneiras: aderindo à camada mucosa (mucoadesividade) ou à membrana celular (citoadesividade).

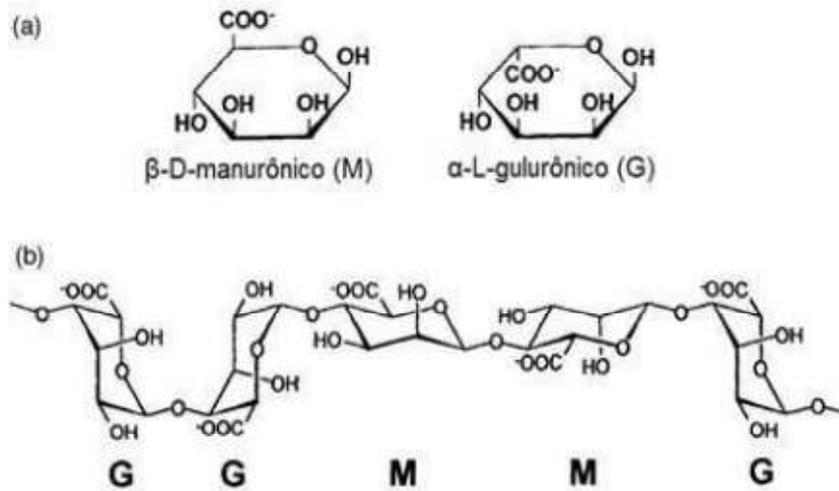


Figura 5. Estrutura dos monômeros do ácido algínico (a) e a representação estrutural de um fragmento da cadeia polimérica do ácido algínico (b), onde o bloco M formado pelo ácido β -D-manurônico e o bloco G formado pelo ácido α -L-gulurônico (Adaptado de Draget et al. 2011).

Outro biopolímero, agora da família das proteínas, que se tornou alvo de pesquisa e vem se mostrando promissor nas formulações de biocompósitos é a fibroína da seda (FS). Não só por melhorar a resistência mecânica do compósito, mas também, por incrementar a biocompatibilidade e biodegradabilidade do material (KUNDU *et al.*, 2010; HO *et al.*, 2012; KO *et al.*, 2013).

3.3.3 Fibroína de seda (FS)

Atualmente, busca-se utilizar polímeros com disposição de cargas elétricas, elasticidade e resistência, ou seja, com características físico-químicas que favoreçam uma melhor interação com as células. Um polímero que representa tais propriedades é a fibroína produzida pelo bicho da seda (POLAK, 2013).

A fibroína da seda é um biopolímero natural, presente na casca dos casulos produzidos pela espécie *Bombyx mori*. A seda produzida pelo bicho-da-seda tem ótimas propriedades mecânicas, além de biocompatibilidade favorável, biodegradabilidade, flexibilidade, boa permeabilidade ao vapor de água e mínima reação inflamatória (ZHAO *et al.*, 2014).

O fio de seda (Figura. 6) é composto, principalmente, por dois tipos de proteínas: a fibroína (70 a 80 %) e sericina (30 a 20%) (CHEN *et al.*, 2014).

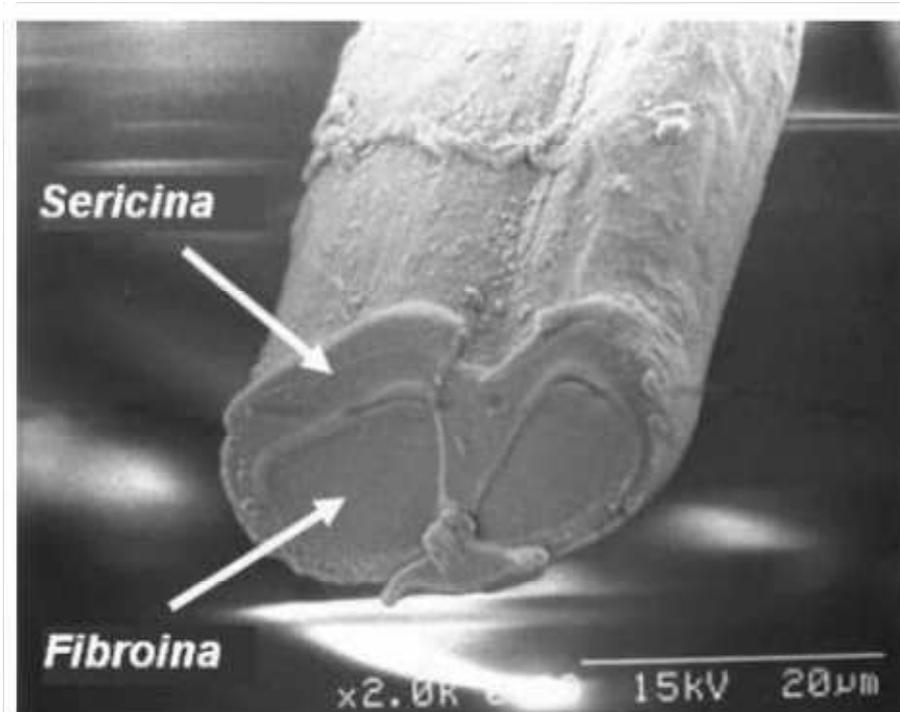


Figura 6. Microscopia da fibra de fibroína da seda Adaptado de (Kato, 2012).

A fibroína é uma proteína fibrosa com caráter hidrofóbico, sendo o principal produto no processamento da seda, além de ser uma fibra natural valiosa. A composição e orientação da fibroína formam uma estrutura semicristalina, que é composta por duas regiões (Figura 7) altamente organizadas: a parte cristalina composta pela estrutura secundária: folha- β , sendo a mais estável, denominada seda II, responsável pela resistência mecânica, a parte amorfa, α -hélice que confere a elasticidade e flexibilidade da seda e enovelamento aleatório, também são chamadas de seda I. A estrutura da fibroína da seda I é uma estrutura solúvel em água que ao ser exposta ao calor ou processo de fiação, facilmente se converte em uma estrutura da fibroína da seda II (KUNDU *et al.*, 2010).

Sericina é uma proteína de caráter hidrofílico, constituída por 17 aminoácidos e dentre os principais estão a serina (28 %), a glicina (16,3 %), o ácido aspártico (17,9 %) e a treonina (7,7 %). É a responsável pela liga entre os fios de fibroína, formando a estrutura do casulo (CHEN *et al.*, 2014).

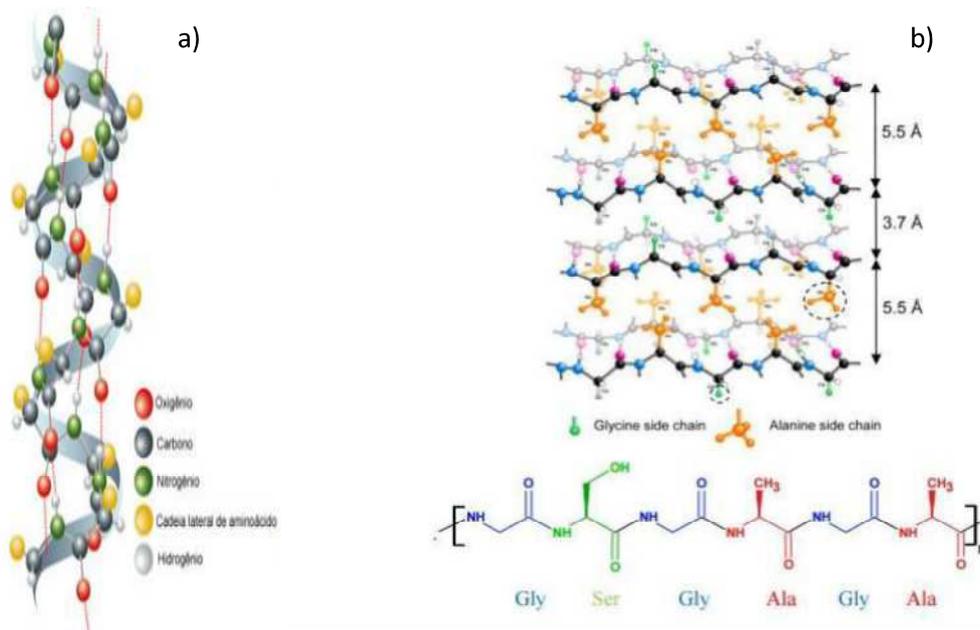


Figura 7. Esquema ilustrativo da estrutura secundária da fibroína de seda: (a) α -hélice e (b) Estrutura da folha β e principais aminoácidos em sua composição (Adaptada de GARRETT; GRISHAM, 2009).

A FS tem sido investigada como um biomaterial promissor em várias aplicações biomédicas, incluindo suturas cirúrgicas, membranas, hidrogéis e microesferas, sistema de liberação controlada de fármacos, e na engenharia tecidual óssea (HYUNRYUNG *et al.*, 2014).

A sua biocompatibilidade e excelente potencial para substituir o colágeno da matriz extracelular oferecem vantagens sobre outros biomateriais sintéticos.

No entanto, apesar das propriedades mecânicas como resistência a tração e dureza a aplicação de biomateriais somente à base de FS, sem nenhuma modificação na área da regeneração óssea é ainda um desafio. Assim, há uma necessidade de desenvolver compósitos a base de fibroína (JIN *et al.*, 2014).

CAPÍTULO IV
REVISÃO DA LITERATURA

4.1 ARCABOUÇOS 3D À BASE DOS MATERIAIS SELECIONADOS (AS, FS, HA)

Recentemente, vários trabalhos vêm sendo realizados, visando superar as limitações dos tratamentos convencionais vigentes e procurado avançar no desenvolvimento de novos biomateriais que englobe uma quantidade maior de características essenciais à regeneração óssea (SARTUQUI *et al.*, 2016; SHIM *et al.*, 2017).

Anteriormente, os arcabouços (*scaffolds*) propostos para atuarem na Engenharia Tecidual Óssea eram preparados apenas com materiais cerâmicos, entretanto, a existência de alguns problemas difíceis de serem solucionados, com o arcabouço unicamente cerâmico, como a baixa degradabilidade, baixa propriedade mecânica e baixa resistência à fratura dentre outros, impulsionaram novas pesquisas na produção de arcabouços utilizando compósitos polímero/cerâmico (LIMA *et al.*, 2013; SERRA *et al.*, 2015; SARTUQUI *et al.*, 2016).

CHEN *et al.* (2014), em seu estudo, verificaram que as propriedades mecânicas inadequadas e degradabilidade rápida do colágeno podem limitar suas aplicações. E, além disso, o mesmo é extraído de tecido animal ou produzido por métodos transgênicos, o que dificulta o controle das infecções cruzadas e possui um custo elevado, tornando-se necessário obter fontes alternativas que substituam essa matriz orgânica (LIMA *et al.* 2013).

JIN *et al.* (2014), em seu estudo demonstraram que arcabouços de fibroína da seda/hidroxiapatita, podem ser utilizados como carreadores que promovem uma liberação controlada e bem-sucedida de células mesenquimais, derivadas da placenta humana, para reparar defeitos ósseos. Eles observaram que não somente as células transplantadas sobrevivem e proliferam no seu novo microambiente, como também participam na reparação dos tecidos, conduzindo à neoformação óssea.

TEIMOURI *et al.* (2015) estudando a biocompatibilidade de compósitos a base de hidroxiapatita e fibroína observaram em seus resultados um aumento evidente no número de células ao longo de 7 dias. Isso demonstra que os compósitos foram biocompatíveis e não tóxicos para as células da linhagem MC3T3-E1

Nesse contexto, a fibroína de seda (FS), secretada pelo bicho da seda *Bombyx mori*, vem sendo largamente estudada por possuir certas propriedades desejáveis, incluindo biocompatibilidade e baixa imunogenicidade, uma vez que é uma das proteínas mais abundantes encontradas naturalmente, podendo ser obtida facilmente e com baixo custo (JIN *et al.*, 2014).

Alguns pesquisadores mostraram que as redes de fibroína tridimensionais contribuíram com a disseminação e crescimento celular. Recentemente, a FS vem demonstrando desempenho promissor como material em arcabouços para engenharia tecidual de regeneração óssea (LEE *et al.*, 2012; HYUNRYUNG *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2014).

Apesar de vários relatos onde os compósitos à base de FS/HA foram utilizados na regeneração óssea, com resultados promissores, géis de alginato são cada vez mais utilizados como arcabouços para a cultura de células em estudos biomédicos.

Estes géis podem ser facilmente adaptados, para servir tanto em arcabouço 2D ou, mais fisiologicamente relevantes, em arcabouço 3D (LEE *et al.*, 2012).

ZHANG *et al.* (2015) produziram um compósito de fibroína da seda e alginato de sódio e observaram a adesão e o crescimento celular sobre a superfície do arcabouço, indicando que esse compósito pode ser potencialmente utilizado na engenharia tecidual óssea.

Além da importância dos biopolímeros FS e AS, vale ressaltar, a influência da HA nos compósitos. SERRA *et al.* (2015), em seu estudo com arcabouços, relataram que a difusão dos íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} ao longo do biomaterial permite a criação de uma camada de HA. Esta camada cria uma interface entre o implante e os tecidos circundantes e estimula a atividade celular de osteoblastos, aumentando a deposição de matriz óssea na área lesada.

Nesse contexto, a alternativa de desenvolvimento de um arcabouço à base de alginato e fibroína, como matriz orgânica em arcabouço tridimensional, que contenha hidroxiapatita é uma alternativa promissora para a área da engenharia tecidual óssea. Tudo leva a crer, que os arcabouços produzidos nesse estudo deverão ter um efeito sinérgico, com melhores propriedades biológicas, em comparação aos descritos na literatura.

4.2 POROSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DE PORO

A porosidade é um parâmetro de suma importância para o crescimento tecidual ósseo no interior de biomateriais, pois permite a migração celular, vascularização e difusão de nutrientes, possibilitando assim, uma ótima osteogênese e a formação de um novo osso ao longo dos arcabouços e do tecido circundante (KIM *et al.*, 2015).

Dependendo da aplicação pretendida, o tamanho de poro deve ser cuidadosamente controlado e compatível com o fenótipo celular de interesse, porém o efeito das dimensões dos poros na regeneração dos tecidos é assegurado por estudos

experimentais que demonstraram uma porosidade ótima de 5 µm para a neovascularização, 5-15 µm para o crescimento dos fibroblastos, cerca de 20 µm para o crescimento dos hepatócitos, 20-125 µm para a regeneração de pele de mamífero adulto, 40-100 µm para crescimento osteóide (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

HAN *et al.* (2010), utilizando o método de liofilização estudaram a estrutura porosa de arcabouços 3D de hidroxiapatita e alginato, onde observaram que seus arcabouços exibiram estrutura altamente porosa com boa interconectividade, sendo que o tamanho de poros variaram entre 80 a 200 µm. Esses mesmos autores também relataram que o tamanho de poro e a porosidade podem ser reduzidos com reticulação por Ca²⁺. Em seu experimento a porosidade do arcabouço de alginato não reticulado foi de 90,8% enquanto que a porosidade do arcabouço reticulado com Ca²⁺ foi de 70%.

FOOK *et al.* (2010), afirmam que a porosidade diminui a resistência mecânica do material isoladamente, porém a existência de poros com dimensões adequadas pode favorecer o crescimento do tecido neoformado.

De acordo com a literatura, poros com dimensões demasiadamente pequenas para osteoblastos, as células não conseguirão proliferar ao longo do arcabouço, pois tende a dificultar o trânsito celular e a penetração de vasos sanguíneos para a região, dificultando também, a secreção da matriz extracelular, função primordial no caso da célula óssea. Poros com dimensões elevadas criam um espaço vazio muito grande, que dificulta o contato das células com a superfície do poro e com os vasos, podendo desencadear um processo de morte celular (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

ALIDADI *et al.* (2017), estudando arcabouços de quitosana e arcabouços com cimento de PMMA (poli(metilmetaacrilato)), observaram através de microscopia eletrônica que o tamanho médio de poro ficou em torno de 175 µm, com porosidade média para os arcabouços de quitosana de 70%, porém os arcabouços de PMMA apresentaram baixa porosidade (20 - 30%) onde a interconectividade não era claramente visível após o processo de liofilização. A interconectividade é outro fator fundamental entre os poros e não deve ser inferior a 50 µm, uma vez que o osteoblasto possui em média 30 µm de diâmetro (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

4.3 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

A adesão das células à superfície de um biomaterial é um dos principais fatores que definem a sua biocompatibilidade. Porém a proliferação celular nos dá indícios, que o biomaterial além de biocompatível, proporciona um ambiente adequado a regeneração

óssea e o número de células aderidas desempenha um papel importante na produção da matriz extracelular (SHARMA *et al.*, 2016).

Estudos têm mostrado que, compósito de biopolímeros associados com a hidroxiapatita pode melhorar a viabilidade celular de osteoblastos (TEIMOURI *et al.*, 2015; LIU *et al.* 2015; PARIS, *et al.* 2015; MING *et al.* 2015; VENKATESAN, *et al.* 2015).

Entre os vários trabalhos reportados sobre a bioatividade de arcabouços porosos foram destacados nesse estudo o de SAMANDARI *et al.* (2016), onde em seu ensaio sobre bioatividade com a solução do fluido corpóreo (SBF), durante 7, 14 e 28 dias, eles demonstraram que partículas de apatitas foram depositadas na superfície irregular dos suportes e que após 28 dias de imersão em SBF toda a superfície foi coberta por cristais de apatitas.

Porém é sabido da importância da porosidade no arcabouço tridimensional e a sua diminuição, conseqüentemente, dificultará a passagem de nutrientes e oxigênio bem como a migração e diferenciação celular. Isso foi demonstrado por LI *et al.* (2010) que estudaram a bioatividade *in vitro* de arcabouços poliméricos bioabsorvíveis porosos, incorporando microesferas de hidroxiapatita e observaram com células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 a capacidade dos arcabouços em melhorar a regeneração do tecido ósseo. Os autores concluíram que as propriedades de superfície desses materiais, bem como a porosidade são muito importantes para a adesão celular.

SARTUQUI *et al.* (2016), trabalhando com arcabouços de colágeno e hidroxiapatita, observaram após 21 dias de imersão em SBF espaços entre os cristais de apatitas devido a uma degradação parcial do arcabouço nesse tempo de imersão e, com isso, houve uma destruição parcial na apatita depositada. Nesse sentido, se faz necessário um maior rigor no controle da degradação dos arcabouços, como muito bem enfatizado por KAR *et al.* (2015) em seu estudo sobre as propriedades biológicas, de degradação e de bioatividade sobre a importância de uma base polimérica que possua propriedades de degradação controlada interagindo juntamente com a hidroxiapatita.

LIMA *et al.* (2013), em seu trabalho com fibroína, hidroxiapatita e quitosana concluíram que a introdução da fibroína da seda nesse compósito permitiu otimizar as propriedades biológicas, melhorando o crescimento celular e diferenciação osteogênica. Trabalho semelhante foi realizado por BHARDWAJ & KUNDU (2011), que estudaram um compósito de fibroína da seda e quitosana, onde verificaram que o aumento da proporção da fibroína nesse compósito melhorou significativamente as propriedades mecânicas, biológicas e de degradação.

SRINIVASAN *et al.* (2012), estudando a proliferação de células MG-63, em arcabouços contendo alginato, demonstraram viabilidade celular, indicando a

biocompatibilidade dos seus compósitos. Com esse mesmo objetivo, JIN *et al.* (2012), estudaram um compósito a base de hidroxiapatita, alginato e quitosana, onde demonstraram em seu ensaio de citotoxicidade que o compósito obtido não tem efeitos citotóxicos nas células cultivadas, apresentando boa biocompatibilidade e osteocondutividade para engenharia tecidual óssea.

De todos os estudos que citamos até aqui, pode-se inferir que a junção de HA com algum biopolímero biodegradável e não citotóxico como quitosana, alginato, colágeno, dentre outros, já dão resultados muito interessantes no que diz respeito à adesão e proliferação de células. No entanto, compósitos que tem em sua composição HA, FS e um polissacarídeo tipo alginato ou quitosana, parecem ter uma potencialidade maior no processo de colonização de células, sobretudo osteoblásticas.

Não está ainda estabelecida na literatura, a influência de cada componente, em compósitos deste tipo, com relação à porosidade do arcabouço, à adesão, proliferação e diferenciação de células de linhagens osteoblásticas. Perguntas como: Há diferenças significativas nestas propriedades quando se compara um arcabouço de alginato puro com um arcabouço formado de um compósito à base dos três componentes (HA, FS e AS)? Qual o efeito da FS na porosidade dos arcabouços? A diferenciação celular, que é uma propriedade almejada é aumentada em função da adição ou na concentração de algum destes componentes? Ainda não foram respondidas definitivamente na literatura encontrada.

Neste sentido, fica demonstrada com esta revisão, que o tema abordado neste trabalho tem relevância e apresenta aspectos inéditos no que diz respeito ao estudo e caracterização de compósitos baseados em AS, FS e HA visando determinar a influência da composição dos mesmos na porosidade e resposta biológica de células de linhagens osteoblásticas.

CAPÍTULO V
MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIAIS

A hidroxiapatita foi sintetizada por via úmida a partir das soluções de hidróxido de cálcio (Dinâmica Química Contemporânea Ltda) e ácido fosfórico (85% U.S.P. - N.F./F.C.C. – Synth) conforme procedimento baseado em MOREIRA *et.al.* (2016).

As concentrações das soluções foram ajustadas para a obtenção de uma HA com razão cálcio/fósforo de 1,67 (HA estequiométrica). Para garantir a formação da hidroxiapatita como única fase precipitada do fosfato de cálcio, a solução foi misturada num balão volumétrico a uma temperatura de 60°C onde o pH do meio foi mantido em torno de 10 com a adição de KOH. O meio ficou sob agitação à temperatura ambiente por 24 h, em seguida a solução foi filtrada a vácuo, lavada com água ultrapura até neutralização do meio e seco em estufa a 100°C.

A hidroxiapatita obtida foi macerada e peneirada para obtenção do pó com uma granulometria $\leq 120 \mu\text{m}$. O alginato de sódio de média viscosidade obtido de algas marrom *Macrocystis pyrifera* foi fornecido pela Sigma-Aldrich e a Fibroína da seda obtida do *Bombyx mori* foi fornecida pela *Huzhou Xintiansi Bio-tech Co Ltd.* (China).

5.2 MÉTODOS

A metodologia utilizada nesse estudo foi esquematizada através do diagrama apresentado na Figura 8.

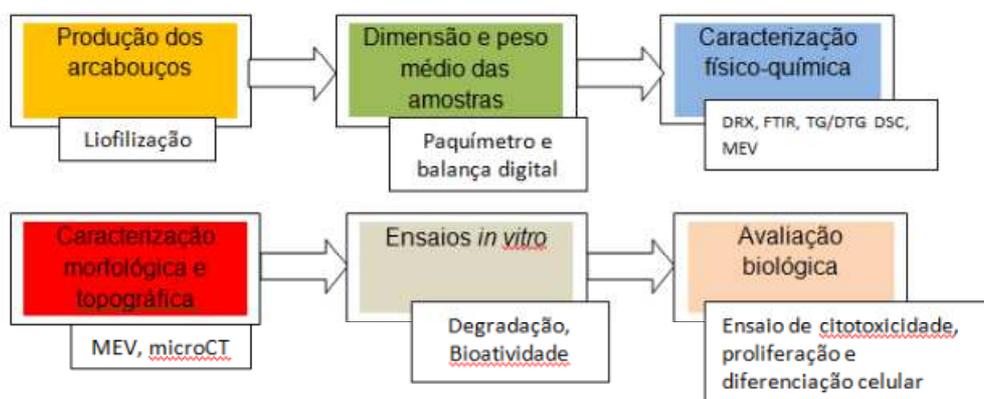


Figura 8: Resumo das etapas realizadas.

5.2.1 PRODUÇÃO DOS ARCABOUÇOS

Os arcabouços foram produzidos por liofilização a partir da mistura física do alginato de sódio (AS), da fibroína da seda (FS) e da hidroxiapatita (HA). Os quais foram categorizados em quatro grupos distintos, com concentração mássica total de 6% em diferentes porcentagens de cada material.

Quatro béqueres contendo 100 mL de água foram dispostos em sequência e ao primeiro foi adicionado uma massa de 6,000 g de AS, formando uma solução 60% m/v (grupo I). Ao segundo foi adicionado uma massa de 1,500 g de AS, 1,500 g de FS e 3,000 g da HA sintetizada (grupo II). Ao terceiro foi adicionado 3,000 g de AS, 1,500 g de FS e 1,500 g da HA (grupo III). Ao quarto foi adicionado 2,100 g de AS, 2,100 g de SF e 1,800 g da HA (grupo IV). Estas misturas foram mantidas sob agitação magnética a 25°C por um tempo de 1 h, para garantir uma maior homogeneização da mistura. Após este tempo, as misturas foram dispostas em moldes cilíndricos de teflon, com 1 mm de diâmetro e 0,5 mm de altura, congelados em um ultra freezer a -80°C por 24 h e liofilizados (liofilizador modelo Terroni LS3000), também por 24 h.

Após a liofilização, os arcabouços foram reticulados em uma solução contendo 0,1 mol/L de CaCl_2 , seguido de lavagem com água ultrapura e novamente congelados por 24 h a -80°C e reliofilizados por mais 24 h. O CaCl_2 reticula as cadeias de AS impedindo que a estrutura 3D dos arcabouços colapse em contato com água. Foram produzidos aproximadamente 380 arcabouços de cada grupo.

Após a liofilização de cada grupo, as porcentagens em massa dos componentes de cada arcabouço são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Composição em massa dos arcabouços tridimensionais.

GRUPOS	COMPOSIÇÃO
GRUPO I / CONTROLE	100% ALGINATO
GRUPO II	25% AS 25% FS 50% HÁ
GRUPO III	50% AS 25% FS 25% HÁ
GRUPO IV	35% AS 35% FS 30% HÁ

5.2.2 DIMENSÕES E PESO MÉDIO DAS AMOSTRAS

Os arcabouços 3D foram preparados, medidos através de um paquímetro e pesados em balança digital (Marta, modelo AY220), visando sua utilização em placas de cultura celular de 24 poços. Medidas em triplicatas de cada grupo do diâmetro, espessura e massa foram feitas e os resultados apresentados como média \pm desvio padrão.

5.2.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

5.2.3.1 Difração de Raios X (DRX)

Para determinação das fases cristalinas, os compósitos produzidos foram macerados em almofariz de ágata e em seguida realizadas as análises por difração de raios X (DRX), utilizando um difratômetro modelo XRD-6000 com radiação monocromática CuK ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) (Shimadzer, Japão) e tubo operacional com potencial de 40 kV e corrente de 30 mA. Os difratogramas de DRX foram obtidos variando 2θ de 10° a 60° e com uma velocidade de varredura de $2^\circ/\text{min}$.

5.2.3.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier usando refletância total atenuada (FTIR- ATR)

A caracterização química dos arcabouços foi realizada, por espectroscopia de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier, usando o modo de refletância total atenuada (FTIR-ATR), utilizando um espectrômetro modelo Varian 640-IR operando em um intervalo de $2000 - 800 \text{ cm}^{-1}$, com resolução de 4 cm^{-1} e média de 128 varreduras por amostra.

5.2.3.3 Análise Termogravimétrica (TG)

As propriedades térmicas dos arcabouços foram analisadas utilizando equipamento modelo STA 449 F3 JUPITER (NETZSCH), as amostras foram colocadas

em suporte de alumina operando no intervalo de temperatura de 25°C a 1000°C com uma razão de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de nitrogênio.

5.2.3.4 Análise Térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Os processos físicos e químicos envolvendo variação de energia foram analisados por DSC, utilizando o analisador modelo DSC 200 F3 fabricante NETZSCH em uma faixa de temperatura de 0 a 250°C e razão de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de nitrogênio.

5.2.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E TOPOGRÁFICA

5.2.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As características de microestrutura e morfologia dos arcabouços produzidos foram determinadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando um microscópio modelo JSM-6460LV (Jeol Japão), operando de 5 kV a 15 Kv. Os compósitos foram imersos em nitrogênio líquido e em seguida fraturados para melhor visualização da microestrutura interna, porém, para obtenção de melhor contraste das imagens as amostras foram recobertas com ouro. O tamanho dos poros das amostras foi analisado, a partir de análises do *software* gratuito de código aberto chamado imageJ, utilizando aumento diferentes de MEV de várias regiões dos arcabouços, totalizando um quantitativo de ± 5 poros por imagem.

5.2.4.2 Microtomografia Computadorizada (μ CT)

As imagens da microarquitetura dos arcabouços foram coletadas, utilizando um tomógrafo computadorizado via transmissão de raios X de Bruker microCT (modelo SkyScan 1174, Kontich, Bélgica).

O *software* de análise utilizado para o processamento das imagens tomográficas para caracterização, da porosidade, distribuição de tamanho de poros, anisotropia, entre outros foram CTVox™ (versão 2.6.0 r908-64bit, de Bruker microCT) e CTan™ (versão 1.13.5.1-64bit, de Bruker microCT) e CTvol (versão 2.2.3.0-64bit, De Bruker microCT). Para os cálculos das funções de correlação e (inter) conectividade de poros, utilizou-se o *software* IMAGO® (Image Analysis System, versão 2.4.11).

As imagens tomográficas foram recolhidas colocando as amostras no interior da câmara do tomógrafo. As imagens foram obtidas utilizando as seguintes configurações do sistema tomográfico: tensão de operação ajustada em 35 kV e corrente elétrica com 800 μ A. A técnica empregada para obtenção de uma imagem tomográfica envolveu a aquisição de um grande número de radiografias do objeto (fatias de imagem), obtidas pela medição da intensidade de raios X transmitidos através da amostra, em diferentes posições angulares. As amostras foram submetidas a um giro de 180 graus, com um passo angular de 1 grau, produzindo 180 radiografias (projeções) por imagem, contendo cada uma 652 \times 652 Pixels. Na saída da fonte de raios X utilizou-se um filtro de Al com 0,25 mm de espessura. Algoritmos matemáticos apropriados foram então usados, para reconstruir o objeto tridimensional.

5.2.5 ENSAIOS *IN VITRO* COM OS ARCABOUÇOS

Os ensaios *in vitro* de degradação, bioatividade, adesão e avaliação biológica, foram realizados no Laboratório de Biomateriais do Departamento de Ciências e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

5.2.5.1 Ensaio de Degradação

O ensaio *in vitro* de degradação dos arcabouços foi realizado em solução salina tamponada (PBS) com pH e temperatura de $7,2 \pm 0,02$ e $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$, respectivamente. Todas as amostras foram imersas na solução e incubadas a 37°C e 5% de CO_2 durante intervalos de 1, 7, 14 e 21 dias. Os arcabouços foram pesados, antes da imersão na solução e, após cada período, foram lavados com água bidestilada, congelados, liofilizados e finalmente repesados. A degradação foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$D\% = \frac{m_f}{m_0} * 100 \quad \text{equação 1}$$

sendo:

D% = percentagem de degradação

m_0 = massa inicial

m_f = massa final

5.2.5.2 Estudo de Bioatividade *In Vitro*

A bioatividade dos arcabouços foi investigada, através da imersão das amostras numa solução simuladora corpórea (SBF), com concentrações de íons semelhantes aos do plasma sanguíneo humano (Tabela 5), conforme descrito por KOKUBO *et al.* (2006).

Os ensaios foram realizados em triplicata e em condições fisiológicas, ou seja, as amostras foram imersas no fluido por 10 minutos e posteriormente incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ em tubos falcon fechados, durante os períodos de tempo de 1, 7 e 14 dias. Após o período especificado, as amostras foram lavadas três vezes com água bidestilada, para remoção dos sais minerais adsorvidos. Após o tempo de ensaio, para a observação da formação de apatitas na superfície do arcabouço, os mesmos foram liofilizados e caracterizados por difração de raios X.

Tabela 5. Reagentes utilizados na preparação de 1 litro de SBF. Adaptado de (KOKUBO *et al.* 2006).

Íon		Concentrações de íons (mM)	
<i>Plasma sanguíneo</i>		<i>SBF</i>	
Na ⁺	142,0	142,0	
K ⁺	5,0	5,0	
Mg ²⁺	1,5	1,5	
Ca ²⁺	2,5	2,5	
Cl ⁻	103,0	147,8	
HCO ³⁻	27,0	4,2	
HPO ₄ ²⁻	1,0	1,0	
SO ₄ ²⁻	0,5	0,5	
pH	7,2-7,4	7,4	

5.2.6 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

5.2.6.1 Processo de Esterilização

A esterilização é um critério importante na produção de arcabouços, que servirão como suporte para regeneração de tecido ósseo, pois dela depende a segurança e a eficácia desses biomateriais. Sua realização se faz, através de processos físicos ou químicos que inativa toda forma de vida microbiana (QUI *et al.*, 2011).

Um total de 1500 arcabouços produzidos para esse estudo foi esterilizado no laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, por processo de irradiação gama (cobalto 60) com dose de 25 kGy/min e tempo de irradiação de 718 min, de acordo com a ABNT ISO 13485: 2004, com o objetivo de avaliar a adesão, proliferação e diferenciação de células pré-osteoblásticas e osteoblásticas.

5.2.6.2 Cultura Celular

Para fins de avaliação biológica, nos arcabouços tridimensionais porosos produzidos, os ensaios foram realizados seguindo os padrões ISO 10993-5: 1999 e 10993-12: 1996, de dispositivos médicos.

Cultivaram-se linhagens de células fibroblásticas de rato (L929), pré-osteoblásticas de rato (MC3T3-E1; CRL – 2594- ATCC) e linhagem celular de osteosarcoma humano (MG-63; CRL – 1427- ATCC).

Após descongelamento, as células foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, onde diariamente foram monitoradas, através de microscópio óptico (Motic AE31) para visualização das mesmas e possíveis troca de meio de cultura, ou quando se encontravam com mais de 85% de confluência, iniciava-se o procedimento de repicagem, onde as células eram lavadas com solução salina tamponada (PBS) para retirada das proteínas, em seguida colocava-se, 1,5 mL de tripsina/EDTA (Cultilab) para soltá-las da garrafa, logo após eram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos e ressuspensas em garrafa de cultivo com ± 5 mL de meio de cultura específico para cada linhagem e 10% de soro fetal bovino (SFB). Todos os procedimentos foram realizados dentro da capela de fluxo laminar.

5.2.6.3 Ensaio de Citotoxicidade

Para o ensaio de citotoxicidade foram utilizadas células fibroblásticas de rato (L929), cedidas pela Universidade Federal Fluminense proveniente do Banco de Células do Estado do Rio de Janeiro.

As células foram cultivadas com meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de L-glutamina, 1% de penicilina e 1% de estreptomicina (Sigma–Aldrich), mantidas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. A viabilidade celular foi obtida em triplicata pelo método colorimétrico do MTT - 3-(4-5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina.

Antes do ensaio, o biomaterial ficou imerso em 10 mL de DMEM por 24 h. Em seguida, foram distribuídos em placa de 24 poços e sobre eles, foram colocadas 5×10^5 células na superfície dos arcabouços e adicionado 2 mL do meio com soro. O controle negativo foi feito com a mesma quantidade de células cultivadas diretamente na placa de cultura e o positivo foi feito, utilizando o meio com 10% de DMSO. As placas foram incubadas em estufa de CO₂ por 24 h. Após a incubação, o meio foi descartado e, em cada poço da placa foi adicionado 800 µL de MTT e colocado em estufa a 37°C por 3 h. Após a retirada dessa solução, foi adicionado 800 µL de isopropanol acidificado com HCl por 10 minutos. Em seguida, foi distribuído 150 µL em cada poço, numa placa de 96 poços e a absorbância foi lida em 570 nm, pelo leitor de placa Elisa –SYNERGY – H1 (*Microplate Reader*).

5.2.6.4 Análise de proliferação celular

Para análise da proliferação celular, a linhagem (MG-63; CRL – 1427- ATCC), foi cultivada com meio de cultura DMEM e a linhagem (MC3T3-E1; CRL – 2594- ATCC) foi cultivada com meio de cultura Alfa MEM ambos suplementados com 10% de SFB, 1% de L-glutamina, 1% de penicilina - estreptomicina (Sigma – Aldrich), mantidas a 37°C em estufa com 5% de CO₂.

Inicialmente, os arcabouços de cada grupo ficaram imersos em tubo Falcon por 24 h, com 10 mL DMEM ou Alfa MEM a depender da linhagem. Após o término desse tempo, foi distribuído em placas de 24 poços. Sobre os arcabouços foram depositadas 1×10^5 células contidas em 30 µL do meio apropriado para cada linhagem. Após 5 min, foram adicionados 2 mL do meio apropriado em cada poço contendo os arcabouços. Em seguida as placas foram incubadas na estufa de CO₂ a 37°C por 7, 14 e 21 dias trocando-se o meio a cada 48h. Foi realizado, um conjunto de três experimentos independentes para cada tipo de arcabouço e linhagem de células.

A viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico do MTT. Esse método serve para medir a atividade da redutase mitocondrial em células vivas, ou seja, ocorre a redução do anel tetrazólico do MTT nas mitocôndrias e resulta na formação de cristais de formazan (E, Z- 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan) de cor azul por células metabolicamente ativas. Nesse ensaio uma solução de 1000 µL de MTT foi colocada em contato com a superfície das amostras ensaiadas em cada tempo, e colocado em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 3h. Após a retirada dessa solução, foi adicionado 800 µL de isopropanol acidificado com HCl por 10 minutos. Em seguida, foram distribuídos 150 µL em cada poço numa placa de 96 poços e a absorbância foi lida

em 570 nm pelo leitor de placa Elisa –SYNERGY – H1 (Microplate Reader), para análise da proliferação celular.

A análise de proliferação celular foi baseada em curva padrão previamente determinada onde é correlacionada a absorbância em 570 nm com o número de células vivas.

5.2.6.5 Análise da diferenciação celular

A diferenciação celular foi realizada através do método da fosfatase alcalina (ALP) utilizando as linhagens (MG-63; CRL – 1427- ATCC) e (MC3T3-E1; CRL – 2594- ATCC), cultivada com meio de cultura DMEM e Alfa MEM, respectivamente, suplementado com 10% de SFB, 1% de L-glutamina, 1% de penicilina - estreptomicina (Sigma – Aldrich), mantida a 37°C em estufa com 5% de CO₂. As amostras ensaiadas com as células por 7, 14 e 21 dias, foram permeadas com 0,5% de Triton X-100 e incubadas em solução tampão alcalina de p-nitrofenilfosfato como substrato (20 mM p-nitrofenilfosfato + 100 mM dietanolamina 98% + 10 mM MgCl₂, pH 9,5) durante 30 minutos a 37°C. A reação enzimática foi finalizada pela adição de uma solução contendo 0,1 M de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e 1 M de hidróxido de sódio (solução *stop*). A atividade enzimática foi medida pela absorbância a 405 nm no leitor de placa Elisa –SYNERGY – H1 (Microplate Reader), ou seja, pela determinação colorimétrica do p-nitrofenol (produto da hidrólise do p-nitrofenilfosfato). Todos os reagentes utilizados durante o procedimento experimental foram provenientes da Sigma-Aldrich.

Finalmente, a atividade da fosfatase alcalina foi calculada a partir de uma curva padrão de p-nitrofenilfosfato (de 50 a 3200 nmol/L), e os resultados foram expressos em nanomols de p-nitrofenol (PNP) produzido por 10⁴ células (nmol PNP/10⁴ células).

5.2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Testes estatísticos foram aplicados a partir da coleta dos dados em triplicata e expressos como média ± desvio padrão, calculados através do *software* Origin 8. A significância estatística dos dados foi avaliada pela análise de variância ANOVA (one-way) seguida do teste Tukey e os valores de probabilidade p inferiores a 0,05 foram considerados significativos (p < 0,05).

CAPÍTULO VI
RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 DIMENSÕES E MASSA MÉDIA DAS AMOSTRAS

A Tabela 6 mostra a média, bem como, os respectivos desvios-padrão do diâmetro, da espessura e da massa dos arcabouços produzidos.

Tabela 6. Média e desvio-padrão das dimensões e da massa em (mg) dos grupos I, II, III e IV.

Amostras	Diâmetro (mm) \pm SD	Espessura (mm) \pm SD	Massa (g) \pm SD
Grupo I	95 \pm 3,6	45 \pm 10,0	33 \pm 8,5
Grupo II	77 \pm 10,5	35 \pm 2,0	17 \pm 1,6
Grupo III	95 \pm 2,9	40 \pm 5,0	37 \pm 5,3
Grupo IV	83 \pm 7,6	36 \pm 2,0	18 \pm 2,1

Sendo: SD (*standard deviation*) – Desvio Padrão

As dimensões e a massa média do grupo I foram similares as do grupo III, podemos atribuir ao teor de alginato de sódio ser maior nesses grupos. Notamos uma diminuição significativa em todas as dimensões analisadas no grupo II, o qual possui maior teor de hidroxiapatita, que conferiu a esse grupo uma maior contração e variação entre os diâmetros dessas amostras e menor massa média. No grupo IV, que tem as percentagens em massa dos componentes do arcabouço aproximadamente equilibradas, percebe-se, ao considerar o desvio padrão das medidas, que não há diferenças apreciáveis no diâmetro e espessura do arcabouço em relação ao grupo I e III. No entanto, há um leve decréscimo da massa média em relação a estes grupos, mas não há diferença em relação ao grupo II. Os diâmetros e espessuras podem ser considerados aproximadamente iguais com um leve desvio para o grupo II (maior quantidade de HA) e as massas médias são iguais entre os pares dos grupos I/III e II/IV. Todavia, as especificações das medidas dos arcabouços satisfazem os critérios para serem usados nas placas de 24 poços nos ensaios biológicos com células.

6.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

6.2.1 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

Na Figura 9 são apresentados os difratogramas dos pós puros, do alginato de sódio, da fibroína da seda, da hidroxiapatita sintetizada e dos arcabouços produzidos.

Os principais picos dos pós puros são identificados por um asterisco e, os referentes à hidroxiapatita, foram identificados de acordo com o padrão constante na biblioteca de padrões de difração de raios X (JCPDS *card*: 09-0432).

Na Figura 9a, o difratograma da FS apresenta um perfil predominante amorfo, mas com picos característicos em 20,6° e 24,3° correspondentes a estrutura tipo folha- β (LIMA *et al.*, 2013).

Segundo a literatura o AS é geralmente semicristalino devido à forte interação entre as cadeias poliméricas por ligação de hidrogênio intermolecular. Dois picos de difração a 2θ com valores em torno de 14,1° e 22,3° foram observados e são devidos à reflexão do plano (110) da unidade poliguluronato, (200) do plano polimanuronato, respectivamente. Há também a presença de um grande halo amorfo ente 39° - 50°.

Com relação a HA os principais picos do difratograma da hidroxiapatita, conforme padrão (JCPDS *card*: 09-0432), correspondentes aos planos (002), (211), (112), (300) em valores de 2θ igual a: 26,1°; 31,9°; 32,2° e 33,2° respectivamente.

Analisando os difratogramas da Figura 9b, pode-se constatar que o grupo I, formado apenas de alginato, já não apresenta mais os picos característicos do AS a 2θ iguais em 14,1° e 22,3°. Isto se deve ao fato do processamento do arcabouço por liofilização favorecer a amorfização da estrutura do material. Já para os arcabouços II, III e IV o pico de difração a 2θ em 20,6° atribuída à FS está presente, corroborando com o descrito por ZHANG *et al.* (2015), que encontraram um pico de difração em 20,1° (2θ) ao analisarem arcabouços de FS e AS, onde de acordo com esses autores e também com LIU *et al.* (2015), este pico refere-se ao componente folha- β da fibroína da seda, o qual não foi notado no grupo I. É possível observar também nos difratogramas dos grupos II, III e IV, que tem a presença da HA na sua composição, como visualizado pela presença dos picos característicos dessa fase. Ainda pode-se inferir que não há deslocamentos destes picos, indicando que não houve mudança da estrutura da HA (nem mudança de fase). Apenas um alargamento típico devido à amorfização advinda do processamento das amostras por liofilização.

O processo de amorfização já era esperado e desejado para a aplicação pretendida destes arcabouços, uma vez que, regiões altamente cristalinas são frágeis, devido ao seu maior módulo de elasticidade e conseqüentemente, menor grau de deformação frente a um impacto. Além disso, os materiais cristalinos possuem lenta taxa de reabsorção, e a presença de materiais amorfos podem acelerar esse processo equilibrando a taxa de reabsorção frente a uma taxa de remodelação (CARLO *et al.*, 2012).

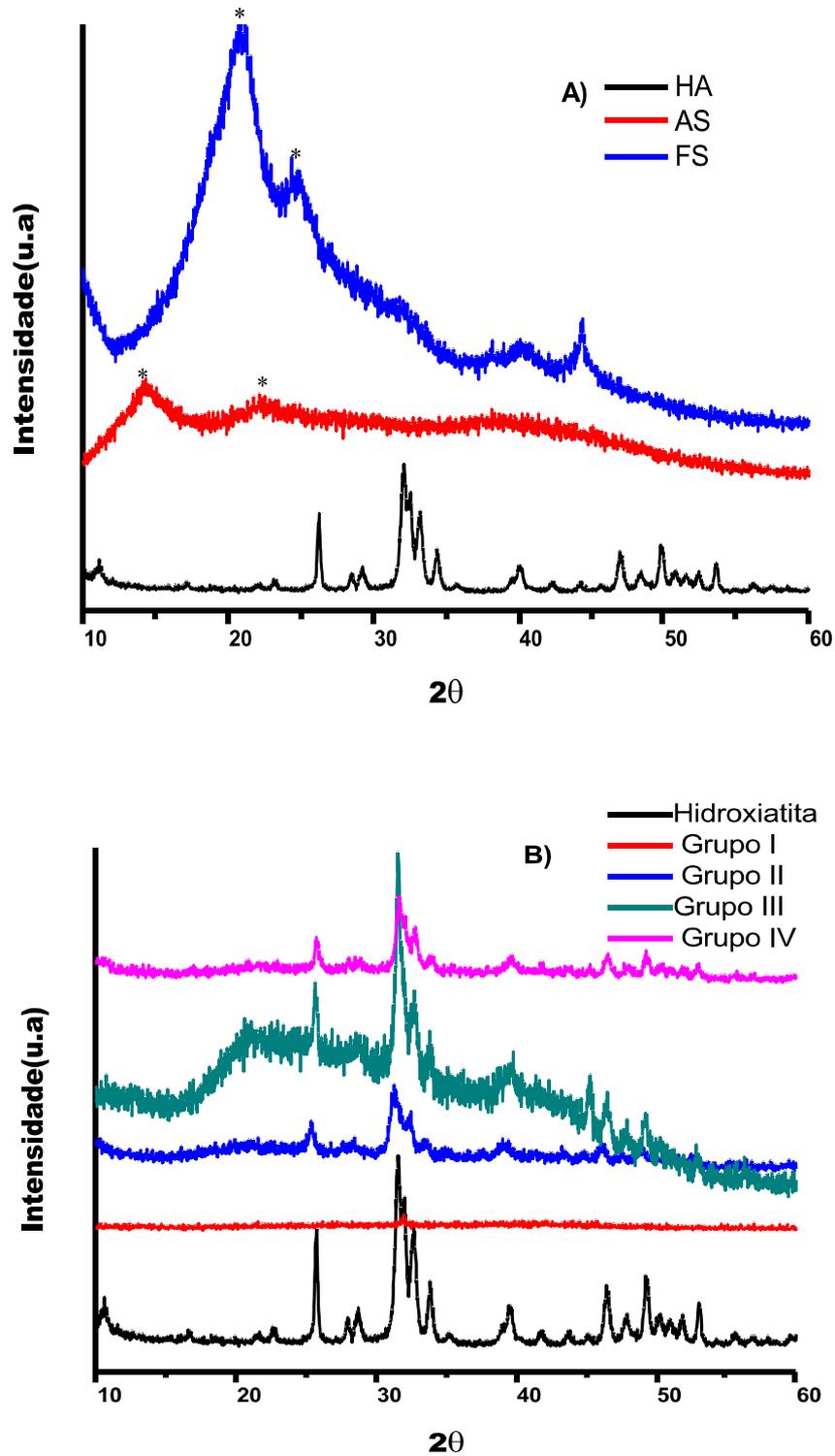


Figura 9. Difrátogramas de DRX em a) os pós puros da Fibroína da Seda (FS), do Alginato de Sódio (AS), e da Hidroxiapatita (HA) e b) da Hidroxiapatita pura e dos grupos I, II, III e IV. Os asteriscos marcam os principais picos identificados.

6.2.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER UTILIZANDO REFLETÂNCIA TOTAL ATENUADA (FTIR- ATR)

Os espectros de FTIR-ATR dos pós precursores e arcabouços produzidos (grupos de I a IV) são apresentados na Figura 10 a e b.

A fibroína apresenta um espectro com bandas centradas em 1625, 1518, 1450 e 1230 cm^{-1} atribuídas respectivamente às bandas de amida I (ν C=O), amida II (δ NH), deformação dos grupamentos CH_2 da unidade de repetição alanina-glicina (δ CH_2 (AG_n)) e amida III (δ O-C-N) referente à estrutura folha β da FS corroborando com os dados de DRX (LIMA *et al.*, 2013)

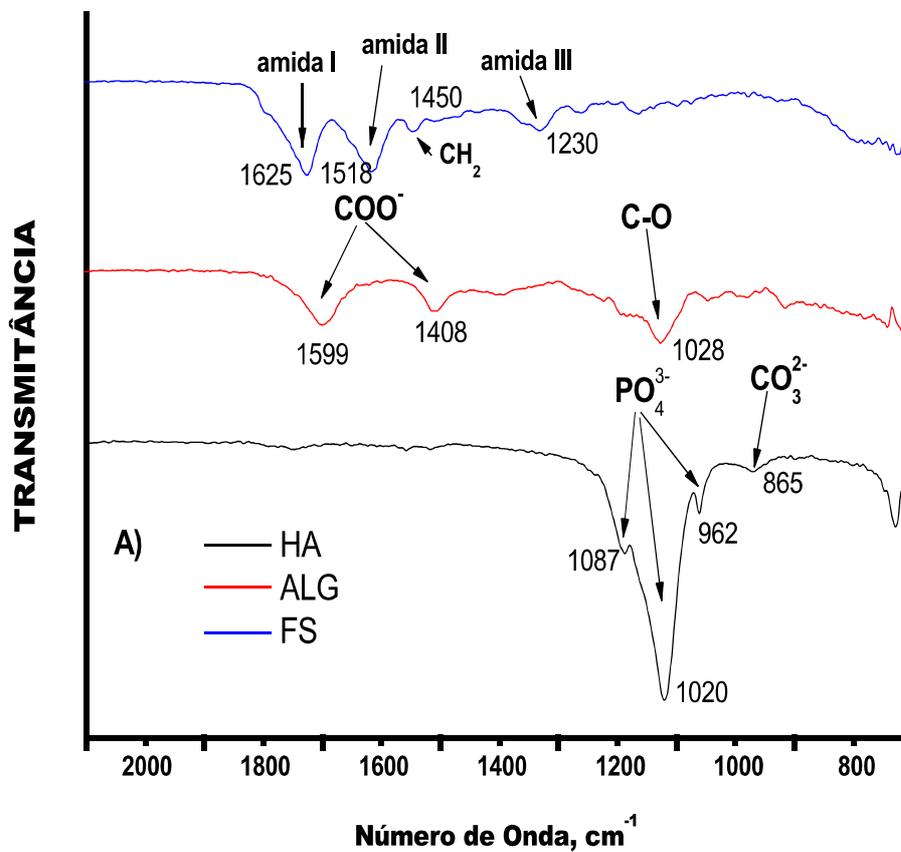
O espectro do alginato de sódio apresenta bandas em 1599, 1408 e 1028 cm^{-1} que correspondem aos estiramentos simétricos e assimétricos do íon carboxilato (ν_s e ν_{as} COO^-) e vibrações do grupo C-O do anel sacarídico, respectivamente. Vibrações menores aparecem na região de 960 a 890 cm^{-1} que são típicas dos resíduos dos ácidos manurônico e gulurônico que compõe a cadeia do alginato (LOPES *et al.*, 2016, VOO *et al.*, 2012).

A HA tem um espectro de FTIR dominado pelas vibrações do grupo fosfato, com uma intensa banda centrada em 1020 cm^{-1} e duas menores centradas em 1087 e 962 cm^{-1} relacionadas, com os estiramentos do grupo fosfato e uma pequena banda em 865 cm^{-1} correspondente ao grupo carbonato, que foi incorporado no sítio do grupo fosfato da HA (SIMÕES *et al.*, 2018).

O grupo I, arcabouço formado apenas de alginato, apresenta as bandas correspondentes ao estiramento assimétrico 1599 cm^{-1} e simétrico 1408 cm^{-1} do íon carboxilato deslocados para 1593 e 1421 cm^{-1} , respectivamente. Isto se deve à substituição dos íons Na^+ nos resíduos de ácido urônico (manurônico e gulurônico) pelo íon Ca^{2+} devido o processo de reticulação, onde os arcabouços ficaram imersos por 10 minutos numa solução de cloreto de cálcio, pois há mudança na densidade de carga, no raio e na massa atômica do cátion. Este deslocamento demonstra a participação dos íons carboxilatos no processo de reticulação do alginato (VOO *et al.*, 2012).

Nos grupos II, III e IV percebe-se claramente a banda centrada em torno de 1022 cm^{-1} que nestes grupos podem ser atribuídas às vibrações do grupo fosfato da HA juntamente com a vibração do grupo C-O do anel sacarídico do alginato. Nenhum deslocamento significativo foi evidenciado indicando que não há mudança na estrutura

da HA durante a formação dos compósitos. A banda de amida I da FS aparece nestes grupos na mesma região de 1625 cm^{-1} e, se for feito a razão entre a banda em 1022 cm^{-1} (predominantemente do grupo fosfato da HA) com a banda em torno de 1625 cm^{-1} (amida I da FS) a razão encontrada segue a tendência das razões de HA/FS da cada arcabouço: 1,61 (razão HA:FS = 2,00 - grupo II), 1,33 (razão HA:FS = 1,17 - grupo IV) e 1,22 (razão HA:FS = 1,00 - grupo III).



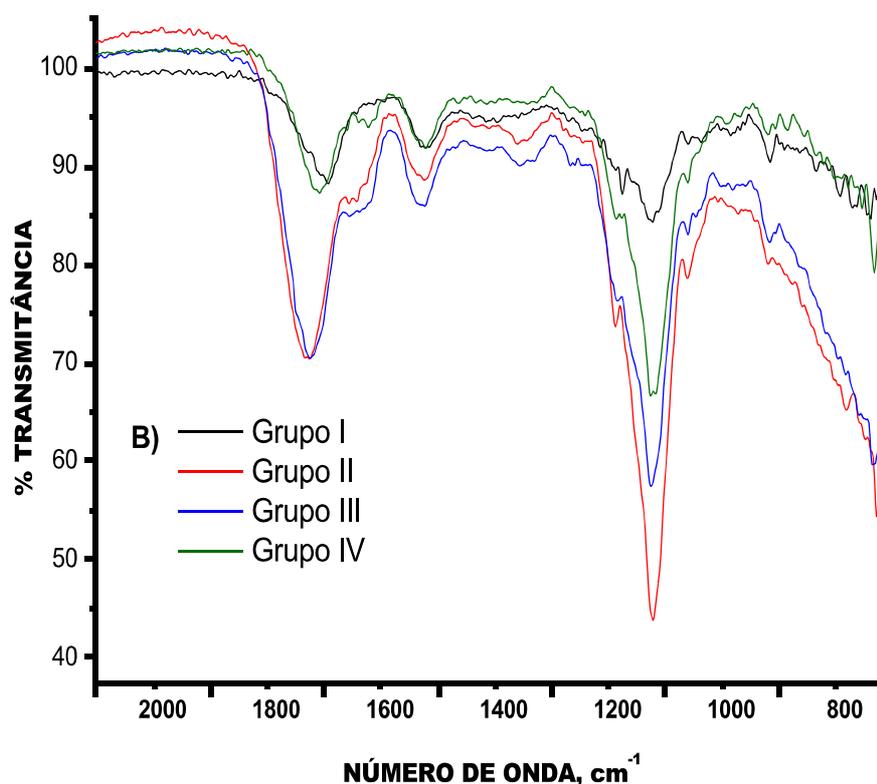


Figura 10. Espectros de transmitância no infravermelho (FTIR-ATR) **a)** os pós puros da Fibroína da Seda (FS), do Alginato de Sódio (AS), e da Hidroxiapatita (HÁ) e **b)** dos grupos de arcabouços produzidos e reticulados.

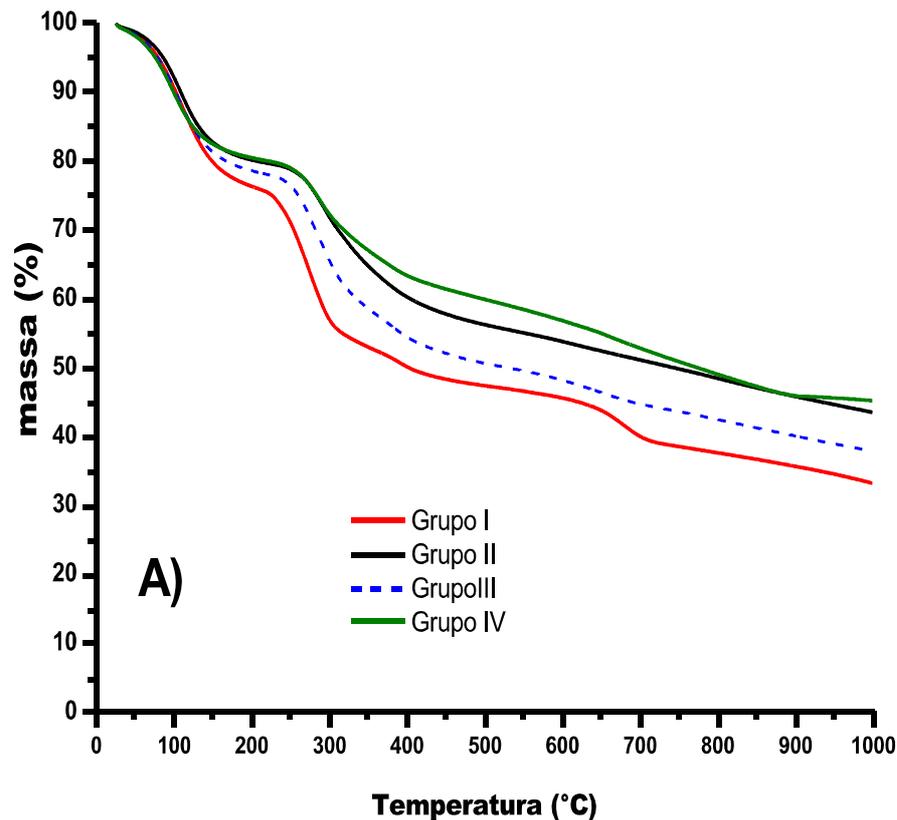
6.2.3 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TG)

O comportamento de degradação térmica dos arcabouços foi estudado através da análise termogravimétrica. Foram feitas as curvas de TG/DTG dos compósitos reticulados, que fornece informações sobre a estabilidade térmica dos materiais (Figuras 11 a e b).

Os compostos apresentaram curvas TG com perfis de decomposição térmica semelhantes. Em todos os grupos foram observadas a primeira perda de massa, em torno de 100°C, com 10%, que pode ser atribuída à umidade das amostras e a decomposição de oligossacarídeos (HAN *et al.*, 2010). Na faixa entre 200 – 300°C há outra perda de massa, atribuída à decomposição dos biopolímeros, onde os grupos II e III tiveram perda de 22% e 25%, respectivamente.

Pela curva de DTG, observa-se que os compostos apresentaram eventos térmicos parecidos. Porém, diferenças nas curvas de DTG para o grupo I, (composto formado apenas por alginato) foram observadas, com pequenas diferenças de comportamento entre 400 e 700°C, que podem ser atribuídos a resíduos de carbonatos, uma vez que o compósito foi reticulado com cloreto de cálcio ou ainda possivelmente, a material orgânico do biopolímero.

O remanescente do biomaterial resistiu a temperaturas acima de 1000°C. RAYNAUD *et al.*, (2002), investigando as propriedades térmicas do pó de hidroxiapatita, descobriram que a primeira perda de peso ocorreu entre 1000°C e 1450°C, ocasionada pela desidroxilação da hidroxiapatita, acompanhada da formação de fosfato de tricálcio e fosfato de tetracálcio em monóxido.



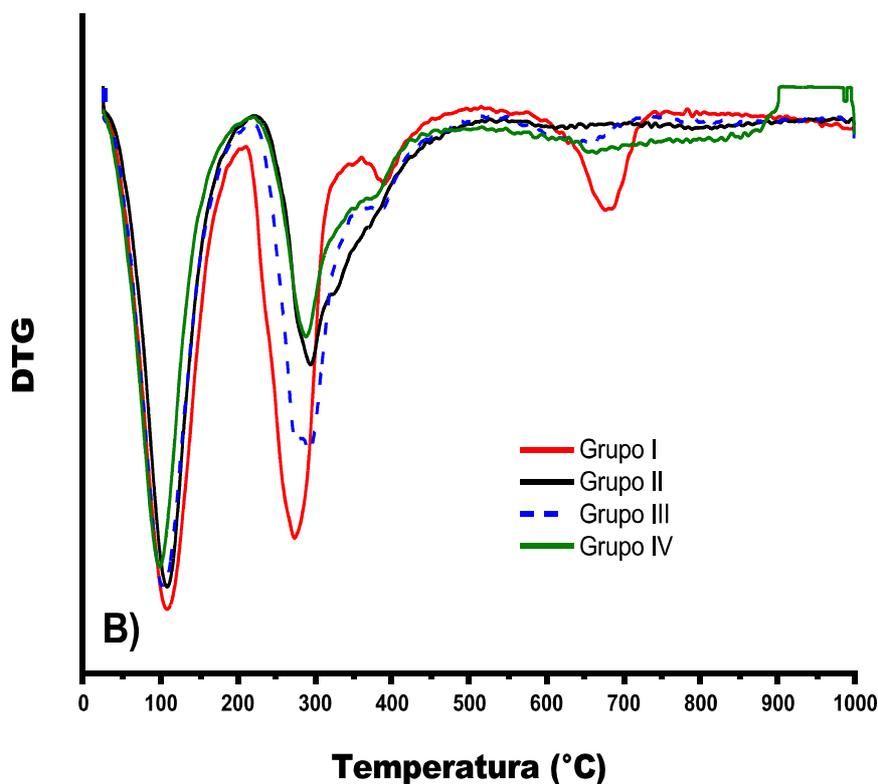


Figura 11. Análise termogravimétrica das amostras de arcabouços de alginato de sódio, fibroína da seda e hidroxiapatita até a temperatura de 1000°C com uma razão de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de nitrogênio: (a) curvas de perda de massa dos arcabouços, (b) derivadas das curvas.

6.2.4 ANÁLISE TÉRMICA POR CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

As curvas de DSC (Figura 12) permitem a compreensão dos eventos térmicos ocorridos durante o aquecimento dos materiais.

Foram observados picos endotérmicos nas amostras, variando entre 90°C a 120°C, que se pode atribuir à liberação de água dos compósitos que não foi totalmente removida, mesmo depois das amostras terem sido secadas em estufa a vácuo a 60°C após liofilização. Embora, a capacidade de retenção de água de um compósito, seja um fator crítico para a sua eficácia na vascularização, a absorção da mesma, permite que as amostras atuem no meio de cultura de forma mais eficaz, pois a água é de fácil assimilação das células e possibilita sua infiltração nos arcabouços 3D, durante a cultura, podendo ocasionar também, o crescimento celular por aderência às superfícies dos arcabouços (TEIMORI *et al.*, 2015).

TORRES *et al.* (2013), relatam que a hidrofiliçidade e a porosidade dos arcabouços são propriedades físico-químicas importantes para regeneração tecidual óssea.

A análise em estudo também mostrou que todas as amostras não apresentam transição térmica (após o primeiro evento de perda de água entre 90°C e 120°C) até a temperatura de 250°C, resultado considerado importante para um biomaterial, pois demonstra que até essa faixa de temperatura, não ocorre decomposição, corroborando com os estudos relatados na literatura que mostram a decomposição de biopolímeros entre 280°C e 300°C aproximadamente (ELLINEGHAM *et al.*, 2015).

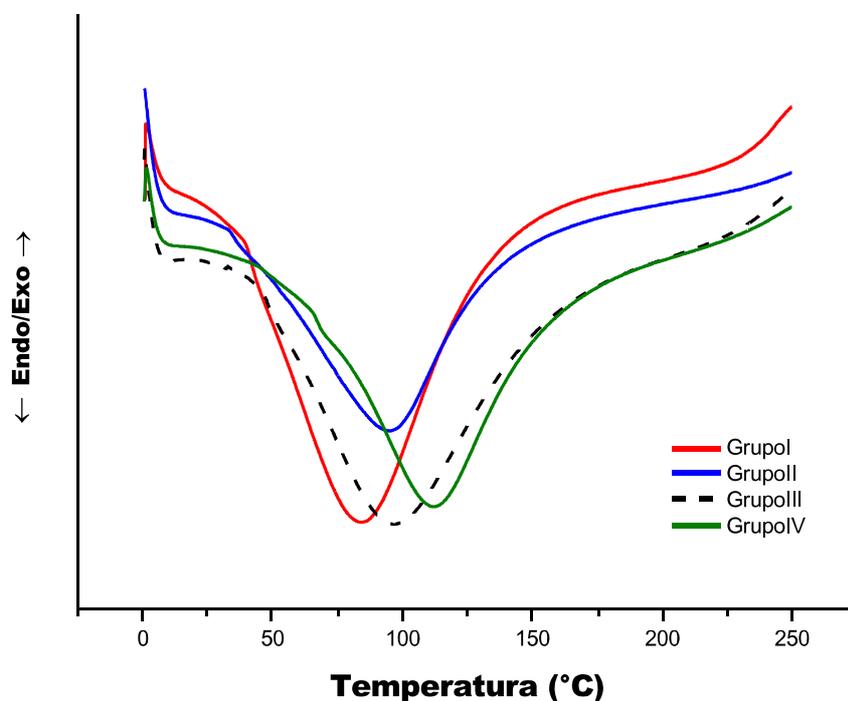


Figura 12. Termograma de DSC dos grupos de arcabouços produzidos e reticulados analisados em uma faixa de temperatura de 0 a 250°C e razão de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de nitrogênio.

6.3 MORFOLOGIA e TOPOGRAFIA

6.3.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

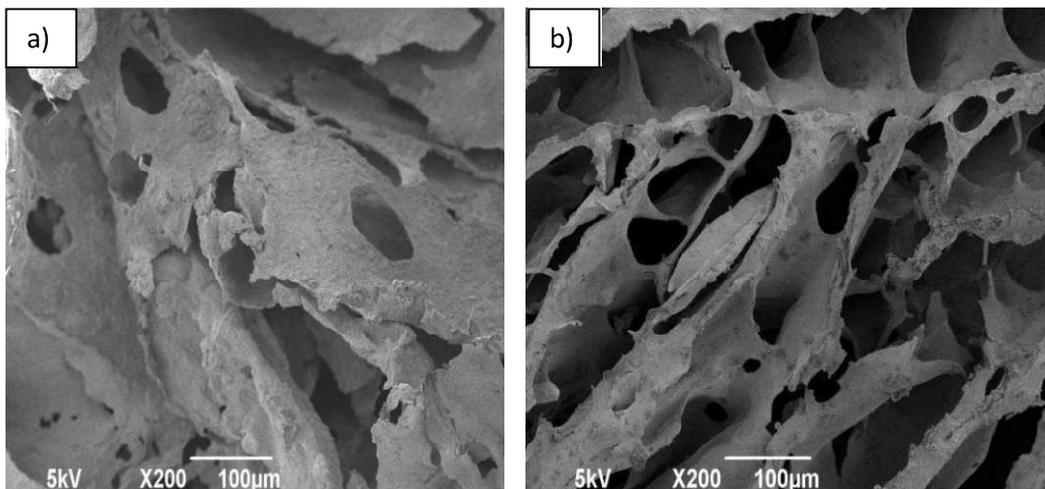
A estrutura porosa e a interconexão tridimensional de poros dos arcabouços em estudo é uma consequência da técnica de congelamento e liofilização em alto vácuo. A visualização da morfologia interna dos arcabouços foi feita por microscopia

eletrônica de varredura (Figura 13) e o tamanho de poro foi quantificado através do *software imageJ*. O quantitativo em micrometro do tamanho de poro das amostras é apresentado na Figura 14.

As amostras do grupo I, com 100% de alginato, apresentaram poros com formas bem definidas e tamanho médio de 85 μm , similares aos dos grupos II e III que apresentaram tamanho de poros de 83 μm e 95 μm , respectivamente. No grupo IV contendo em sua composição 30% de HA foi possível observar, que o diâmetro dos poros diminuiu (77 μm) embora os mesmos se apresentassem espessos e mais conectados que os demais grupos.

VENKATESAN *et al.* (2015), em seu artigo de revisão citando LI e colaboradores, relataram que arcabouços formados por alginato e hidroxiapatita, foram investigados para mimetizar o osso natural e que a adesão e proliferação de células aconteceu sobre arcabouços com tamanho de poros de 150 μm .

No entanto, vários estudos apontam em direções diferentes com relação ao tamanho de poros ideal para potencializar os três processos celulares, de adesão, proliferação e diferenciação celular. O que está estabelecido é que arcabouços 3D com tamanhos de poros entre 50 – 300 μm podem ter efeitos diferentes nos três processos celulares citados acima, mas não há uma regra geral determinada. Tudo depende do tipo de célula, do tipo de tecido onde arcabouço será implantado e, conseqüentemente, das propriedades mecânicas (CIARA & FERGAL, 2010; CIARA *et al.*, 2010; VASSILIS & DAVID, 2005; BONARTSEV *et al.*, 2018).



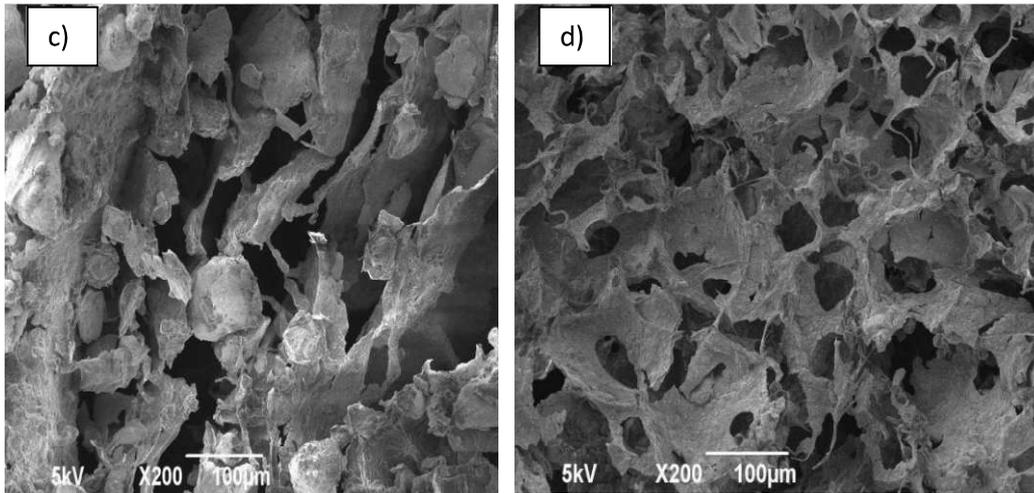


Figura 13. Micrografias dos grupos: a) Grupo I; b) Grupo II; c) Grupo III; d) Grupo IV.

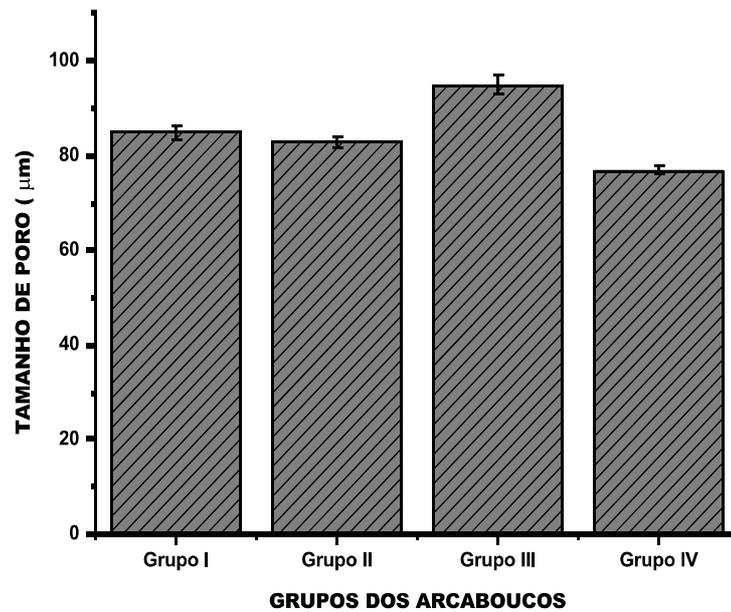


Figura 14. Quantitativo em micrometro do tamanho de poro dos grupos de arcabouços produzidos e reticulados.

6.3.2 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (μ CT)

A microestrutura de materiais porosos, possui geometrias complexas, que envolve tanto a forma, quanto a distribuição e conectividade dos poros (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Através da técnica de microtomografia computadorizada de alta resolução via transmissão de raios X, foram analisados, parâmetros morfométricos quantificados no presente estudo, a saber: porosidade total, a distribuição do volume total dos poros, a conectividade e o grau de anisotropia da estrutura porosa, como mostrado na Tabela 7.

Os arcabouços apresentaram propriedades físicas semelhantes, com valores de porosidade variando entre $57,2 \pm 2,3 \%$ e $65,3 \pm 1,7\%$, esses valores são semelhantes aos encontrados por MCNAMARA et al. (2014), que ao investigar a fibroína da seda em arcabouços porosos a base de hidroxiapatita para regeneração óssea, mostraram em seus resultados, arcabouços exibindo porosidade total de até $62,9 \pm 2,7\%$.

Outra característica importante exibida por todos os arcabouços, consiste na pequena quantidade de poros fechados, que variou de 0,28% a 0,56%. Para todos os arcabouços analisados neste trabalho, a função de correlação espacial e conectividade variou de 158 mm^3 a 373 mm^3 indicando que o espaço poroso está altamente correlacionado, favorecendo o transporte de nutrientes para o interior dos arcabouços, proporcionando uma estrutura favorável para a ligação de células e crescimento de novo tecido.

As amostras dos grupos I e II apresentaram similaridade nos valores morfométricos estudados. O grupo IV, o qual dispõe de menor tamanho de poro ($77 \mu\text{m}$), também apresentou uma menor percentagem de poros fechados e um menor grau de anisotropia, o que conseqüentemente contribuiu para o aumento da conectividade, pois quanto menor a percentagem de poros fechados, maior a conectividade entre eles, garantindo que o transporte de nutrientes para o interior do arcabouço seja maximizado (OLIVEIRA et al., 2016).

Por outro lado, o compósito do grupo III apresenta a maior percentagem de porosidade ($85 \mu\text{m}$), com poros maiores que os demais compósitos demonstrando anisotropia e razoável percentagem de poros fechados, o que causou uma baixa conectividade e densidade em mm^3 por poro, em relação aos demais arcabouços.

Tabela 7. Parâmetros morfométricos dos arcabouços à base de alginato, fibroína e hidroxiapatita.

Grupos dos arcabouços	Total de porosidade (%)	Porosidade fechada (%)	Grau de anisotropia	Conectividade e densidade de material/poros (mm⁻³)
Grupo I	61,4 ± 1,5	0,56	1,5 ± 0,3	158
Grupo II	63,6 ± 1,6	0,36	1,6 ± 0,3	181
Grupo III	65,3 ± 1,7	0,35	1,4 ± 0,3	132
Grupo IV	57,2 ± 2,3	0,28	1,2 ± 0,1	373

A composição química desses arcabouços tem importante papel no desempenho do biomaterial uma vez que estão relacionadas às propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade do mesmo, que, somadas às características físicas, indicam se a matriz porosa do arcabouço cumpre os requisitos mínimos e necessários para a proliferação celular (PATI *et al.*, 2015).

As Figuras 15 e 16 apresentam imagens tridimensionais dos arcabouços porosos de alginato, fibroína e hidroxiapatita reconstruídas através da tomografia computadorizada.

Para LUNDIN (2013) a tomografia, bem como sua capacidade de revelar imagens tridimensionais através de alguns programas de reconstrução, tornou possível a exploração minuciosa da arquitetura óssea permitindo a avaliação de sua constituição. Essa técnica é capaz de proporcionar imagens e estruturas de forma nítida, com um contraste elevado, sendo muito importante para a avaliação do tecido ósseo.

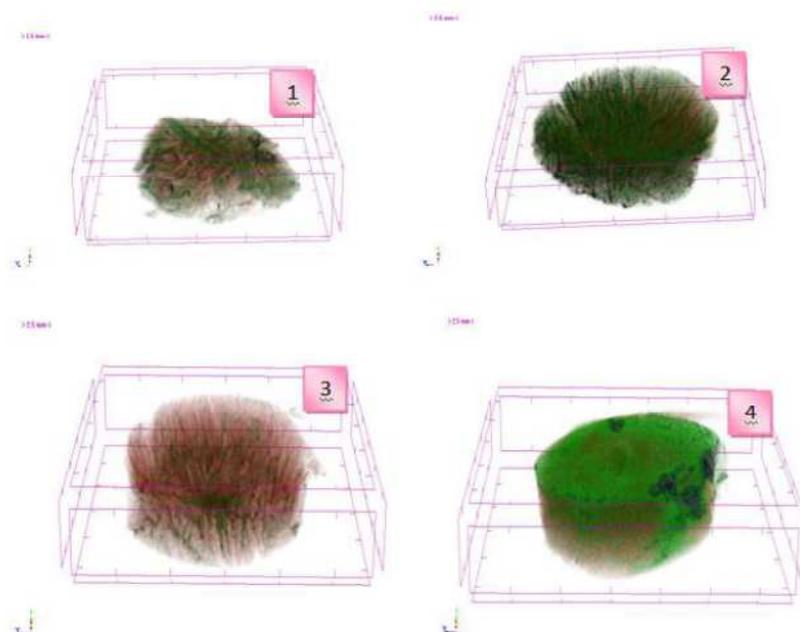


Figura 15. Imagens tomográficas tridimensionais reconstruídas dos arcabouços utilizando a renderização direta do volume, onde em 1,2,3 e 4 representam os grupos de arcabouços I, II, III e IV respectivamente.

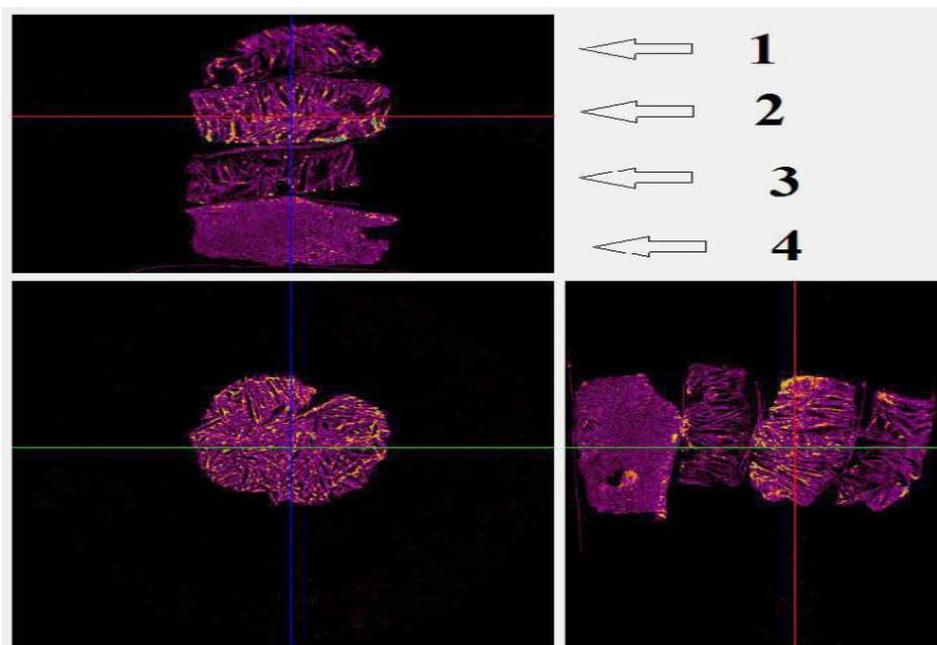


Figura 16. Imagens tomográficas tridimensionais coronal, sargital e transaxial reconstruídas dos arcabouços porosos, onde em 1,2,3 e 4 representam os grupos de arcabouços I, II, III e IV respectivamente.

Uma maneira de visualizar como os poros são distribuídos dentro da estrutura dos arcabouços é através da imagem tridimensional, reconstruída usando o algoritmo matemático *Double Cubes*, onde em (1) apresenta $\text{vol} = 19 \text{ mm}^3$, (2) $\text{vol} = 27 \text{ mm}^3$, (3) $\text{vol} = 29 \text{ mm}^3$ e (4) $\text{vol} = 32 \text{ mm}^3$, com a cor vermelha representando a fase sólida e a amarela representando a fase porosa do arcabouço.

Todas as imagens foram reconstruídas usando um volume de aproximadamente 28 mm^3 , que é o volume médio representativo do objeto. A partir da análise visual das imagens mostradas na Figura 17, pode-se observar que todas exibem certa porosidade com poros conectados, onde a imagem 4 (grupo IV) exhibe poros visuais com diâmetros menores do que os demais arcabouços enquanto a imagem 3 (grupo III) visualmente exhibe poros com diâmetros maiores.

Um dos grandes desafios na fabricação de arcabouços porosos é justamente conseguir equilibrar a porosidade do material, com a resistência mecânica adequada. Daí a importância em se produzir compósitos de hidroxiapatita com base polimérica (LIU et al. 2015).

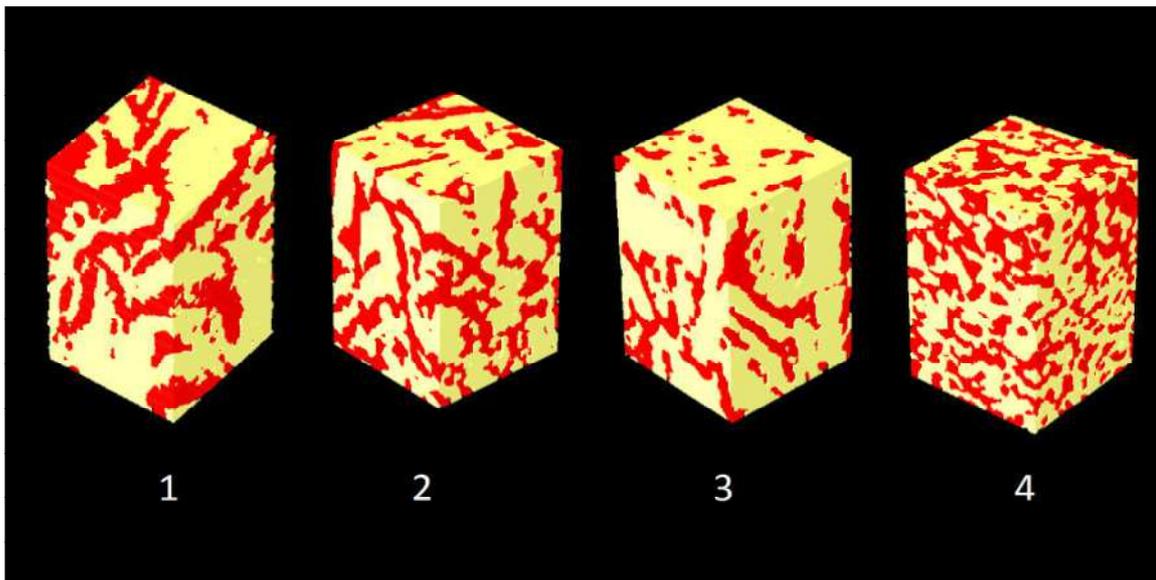


Figura 17. Imagens tomográficas tridimensionais reconstruídas dos arcabouços usando o método matemático Algoritmo *Double-Time Cubes*. Grupo I (1), Grupo II (2), Grupo III (3), Grupo IV (4).

6.4 ENSAIOS *IN VITRO* COM OS ARCABOUÇOS

6.4.1 ENSAIO DE DEGRADAÇÃO

A fim de verificar se os arcabouços produzidos resistiriam aos ensaios biológicos com células nos tempos de 1, 7, 14, e 21 dias, foi feito um ensaio de biodegradação em tampão PBS, onde a variação de percentagem de massa dos arcabouços reticulados é mostrada na Figura 18.

Observa-se nos tempos estudados, que a degradação ocorreu lentamente em todos os grupos. Comparando o grupo I e III foi verificado um comportamento similar pois aos 21 dias eles atingiram variação de massa de 38% e 37% respectivamente, o que pode ser explicado pelo fato desses grupos apresentarem maior teor de alginato.

De acordo com LI *et al.* (2016) as biocerâmicas apresentam baixa taxa de degradação corroborando com os grupos II e IV, compósitos com maior teor de hidroxiapatita em relação ao grupo III, a variação de massa atingiu 33% e 30% respectivamente aos 21 dias, conferindo à forte influência dos biopolímeros.

Portanto, pode-se concluir que a taxa de degradação pode ser controlada ajustando o teor de HA na matriz do polímero, isso significa que, além da importância em se produzir arcabouços através de compósitos, faz necessário os ajustes de teor de cada material, para que a integridade física e mecânica seja suficiente para serem utilizados na regeneração do tecido ósseo.

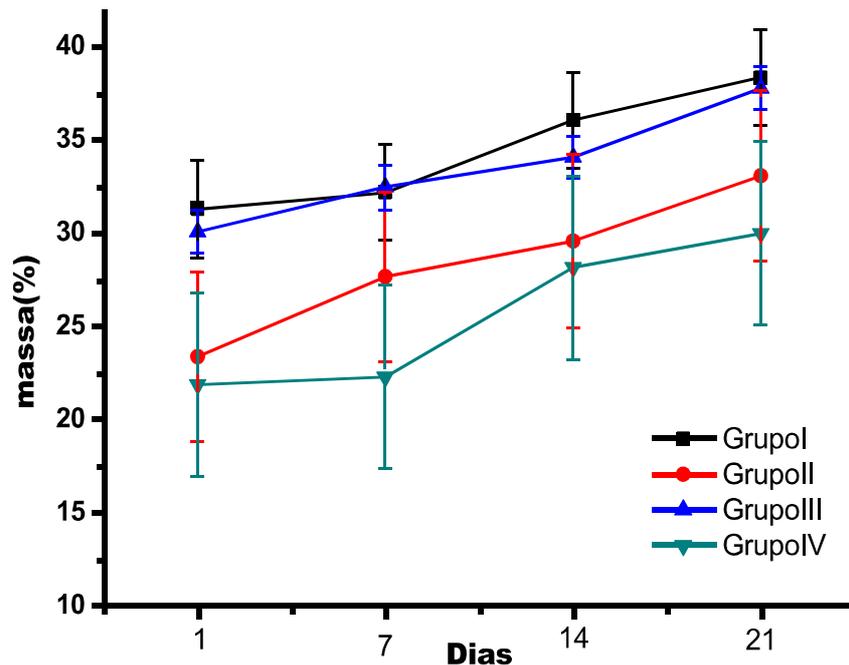


Figura 18. Variação da porcentagem de massa dos arcabouços em função do tempo de imersão na solução de PBS.

6.4.2 ENSAIO DE BIOATIVIDADE

A capacidade de um biomaterial ativar células ósseas é frequentemente avaliada, através da formação de apatitas na sua superfície (KOKUBO *et al.*, 2006).

A bioatividade dos arcabouços foi analisada, por imersão em solução que simula o fluido corporal (SBF - *Simulated Body Fluid*) a qual possui concentração iônica semelhante à do plasma sanguíneo humano durante 1, 7 e 14 dias, (KOKUBO *et al.*, 2006).

Foi verificada por MEV, como mostrado na Figura 19, à deposição mineral após 14 dias de imersão.

Observou-se que o grupo I formado apenas por alginato, quando imerso em SBF, apresentou alterações morfológicas com o aumento na espessura laminar da sua superfície, mostrando poros espessos, porém interconectados. Isso demonstra que o mesmo é apropriado não somente para adesão e proliferação como também para migração celular. O compósito do grupo II mostrou deposição mais proeminente e

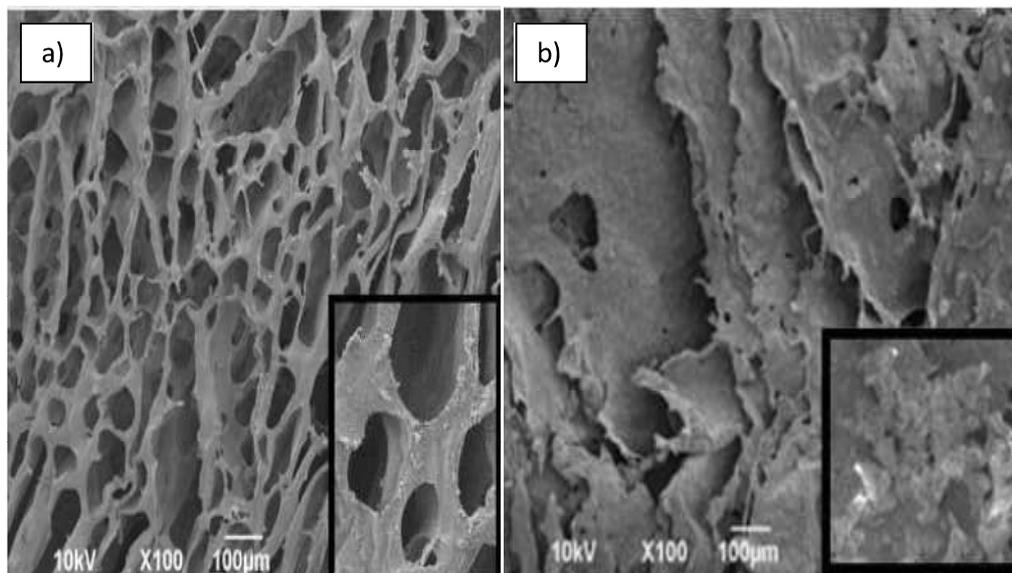
aumento de cristais de apatita, o que já era esperado, devido esse grupo possuir um maior teor de hidroxiapatita.

ROGINA *et al.* (2016), em seu estudo com arcabouços de hidroxiapatita e quitosana, concluíram que a quantidade de HA no compósito influencia na porosidade, na forma dos poros e sobre a topografia do arcabouço, o que causa efeitos importantes na adesão e proliferação celular.

Foi verificado no compósito III, grupo esse que possui um maior teor de alginato que o grupo II, uma diminuição na porosidade em relação ao grupo controle, o que pode ser justificada tanto pela contribuição da HA no compósito quanto pela imersão em SBF após 14 dias. Percebe-se no compósito IV a formação de estruturas com morfologia esféricas semelhantes ao observado para apatitas biológicas, que tendem a se depositar sobre a superfície interna dos poros (SARTUQUI *et al.*, 2016).

Justamente o que se espera que o arcabouço possua: uma superfície topográfica capaz de permitir não somente a adesão celular, mas que as células consigam de forma significativa encontrar um microambiente apropriado para sua proliferação e diferenciação.

Diante do que foi observado, pode-se afirmar que existem mudanças topográficas, químicas e físicas com as variações de percentagens de cada material nos compósitos produzidos.



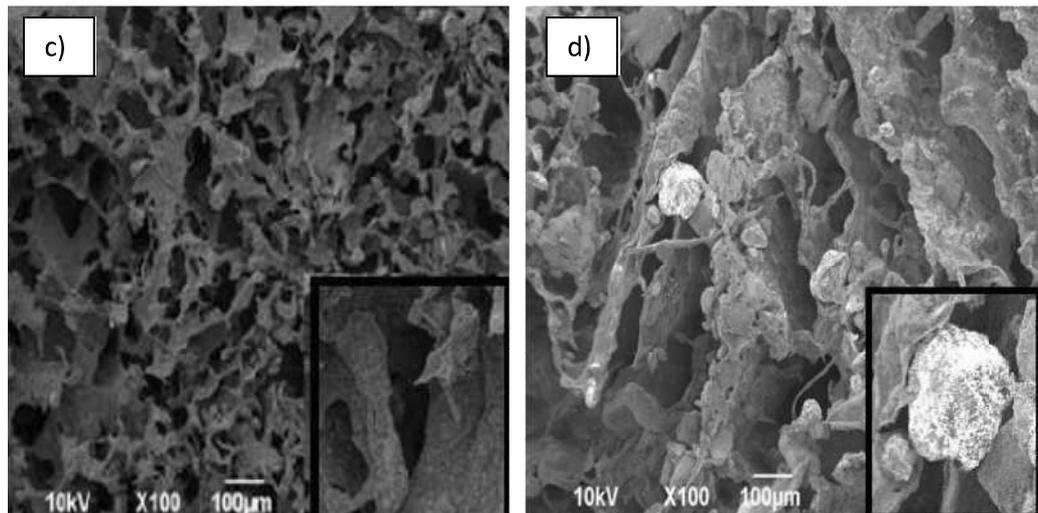


Figura 19. Micrografias da área de superfície dos arcabouços imersos em SBF após 14 dias. (a) grupo I (controle); (b) grupo II; (c) grupo III; (d) grupo IV.

A Figura 20 mostra os difratogramas de DRX dos compósitos estudados após imersão em SBF. Os principais picos dos difratogramas apresentados foram comparados ao padrão (JCPDS *card*: 09-0432) e corresponde ao plano (211), o principal da hidroxiapatita, em valor de 2θ igual a $32,2^\circ$.

Percebem-se claramente no grupo I, regiões predominantemente amorfas, atribuídas ao alginato, que ao longo do tempo de imersão em SBF, apresentou picos cristalinos conferindo a esse grupo certa bioatividade. Nos demais arcabouços verificaram-se um aumento tanto na intensidade quanto no estreitamento principalmente nos picos correspondentes a hidroxiapatita, o que revela a deposição de apatita em suas superfícies.

Deste modo, comprova-se a bioatividade dos biomateriais sintetizados, corroborando com o estudo de TEIMOURI *et al.* (2015), que demonstraram a formação de apatita no biomaterial a base de fibroína, gelatina e nano-hidroxiapatita (nHAp), após a imersão em SBF por 14 dias.

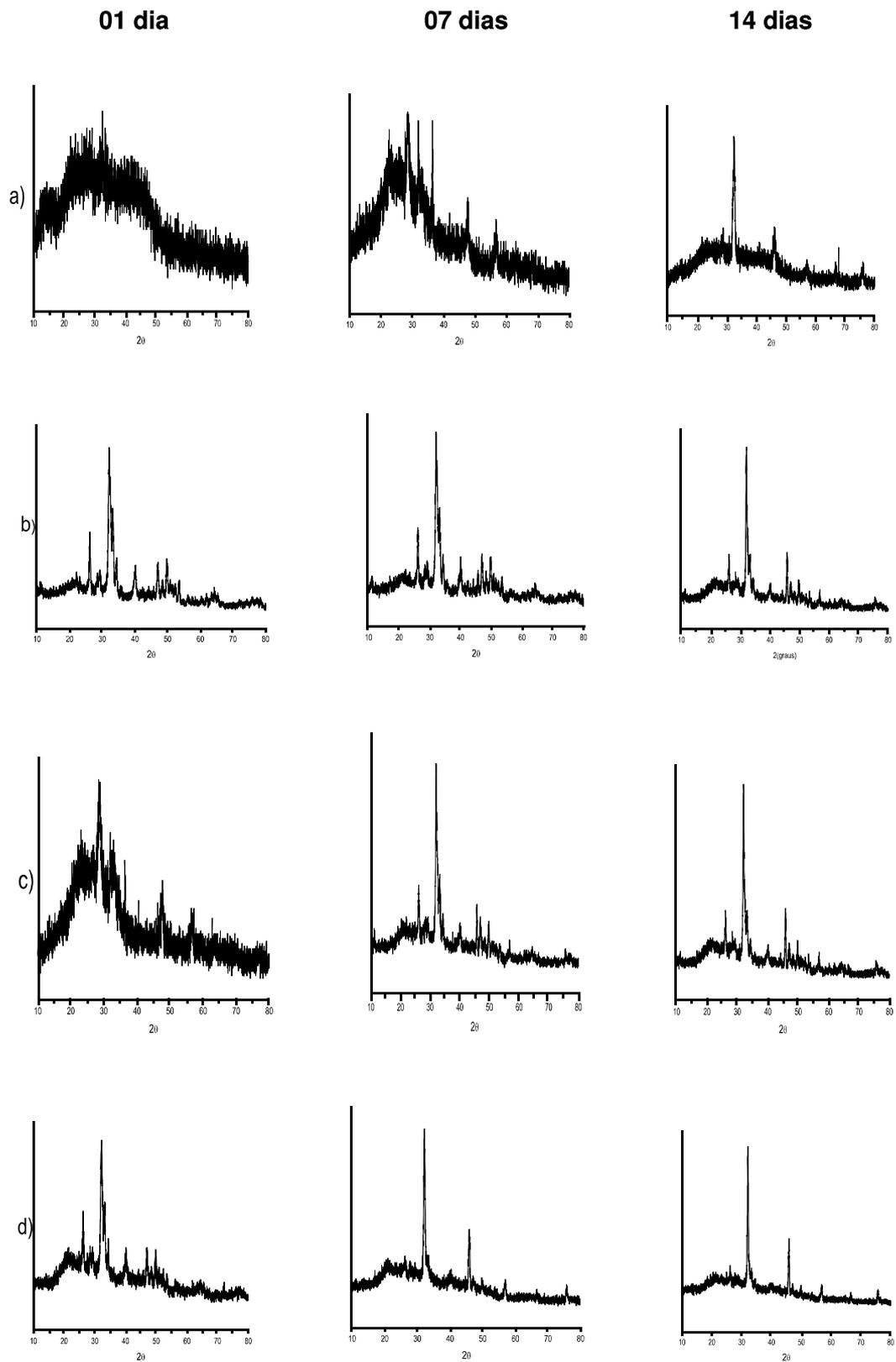


Figura 20. Difratoqramas dos compósitos após 1, 7 e 14 dias em SBF: (a) Grupo I; (b) Grupo II; (c) Grupo III; (d) Grupo IV.

6.5 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

6.5.1 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

O ensaio de citotoxicidade foi realizado com células fibroblásticas de rato L929 (Figura 21), através do método de MTT que é um método desenvolvido para avaliar possíveis efeitos citotóxicos em células.

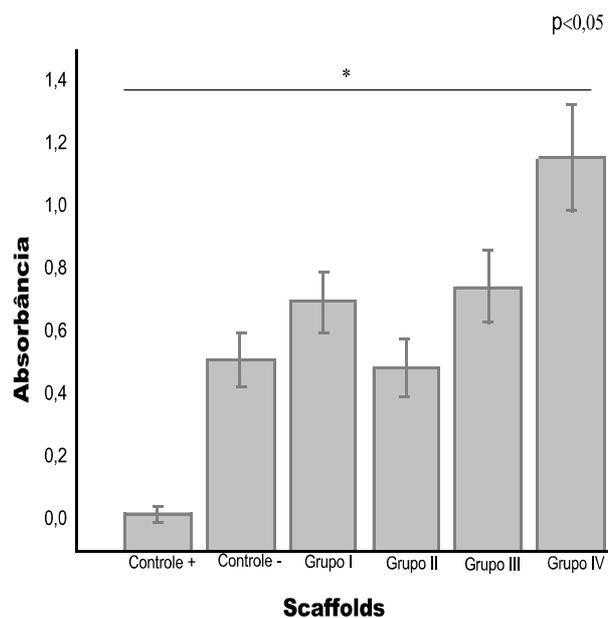


Figura 22. Ensaio de citotoxicidade dos grupos com células fibroblásticas de rato (L929), através do método colorimétrico – MTT. Apresentando comparativo entre os controles positivo e negativo. (* estatisticamente diferente).

Em bioengenharia tecidual óssea, o arcabouço utilizado como suporte temporário deve apresentar excelente biocompatibilidade, propriedades de superfície necessárias como não citotoxicidade e osteocondutividade (LUO *et al.*, 2016).

A viabilidade celular observada nas amostras após 24h de análise foi comparada com o controle positivo e negativo para citotoxicidade. No controle positivo notamos um decréscimo na absorbância o que caracteriza morte celular e isso não foi evidenciado nos grupos em estudo indicando que não há efeito citotóxico sobre a sobrevivência e adesão das células nos arcabouços reticulados. Além disso, há diferença significativa entre o controle positivo e os grupos testados. Dessa forma, os

resultados indicam que os materiais escolhidos neste estudo são biocompatíveis e podem ser utilizados na regeneração tecidual óssea.

6.5.2 ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

A proliferação celular dos arcabouços produzidos foi testada pelo ensaio de MTT utilizando células da linhagem pré-osteoblásticas de rato (MC3T3-E1; CRL – 2594- ATCC) e da linhagem celular de osteosarcoma humano (MG-63; CRL – 1427- ATCC), a fim de avaliar o comportamento dessas linhagens frente à superfície do biomaterial.

O número de células foi correlacionado com a absorbância em 570 nm (ensaio com MTT) através da curva padrão das linhagens estudadas (Figuras 22 e 23).

De acordo com os resultados obtidos nas curvas, foi determinado que uma inoculação de 1×10^5 células na superfície de cada arcabouço era suficiente para se obter uma resposta no ensaio de MTT mensurável e dentro da faixa de validade da lei de Bee Lambert.

A Figura 22, que mostra a linearização dos dados para as células da linhagem MC3T3-E1 que apresentou um coeficiente de correlação da reta $R^2 = 0,998$. Já a curva padrão para as células da linhagem MG-63 (Figura 23) apresentou um $R^2 = 0,995$. Estes resultados são considerados muito bons para valores de correlações lineares.

De posse das curvas padrões, as células de cada linhagem foram inoculadas nos arcabouços e cultivadas por 7, 14 e 21 dias.

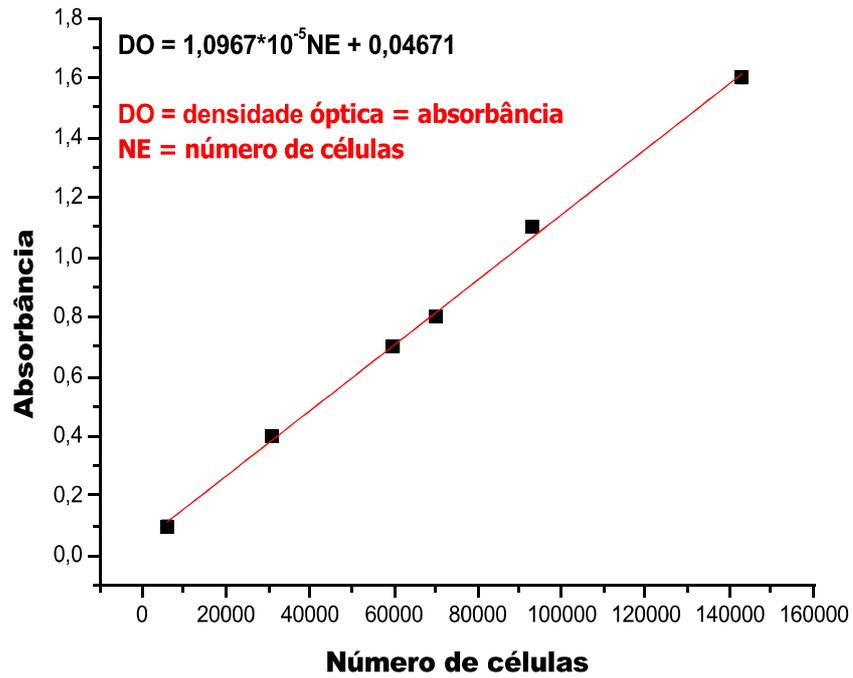


Figura 22. Curva padrão da linhagem MC3T3-E1 demonstrando o número de células em função da absorbância.

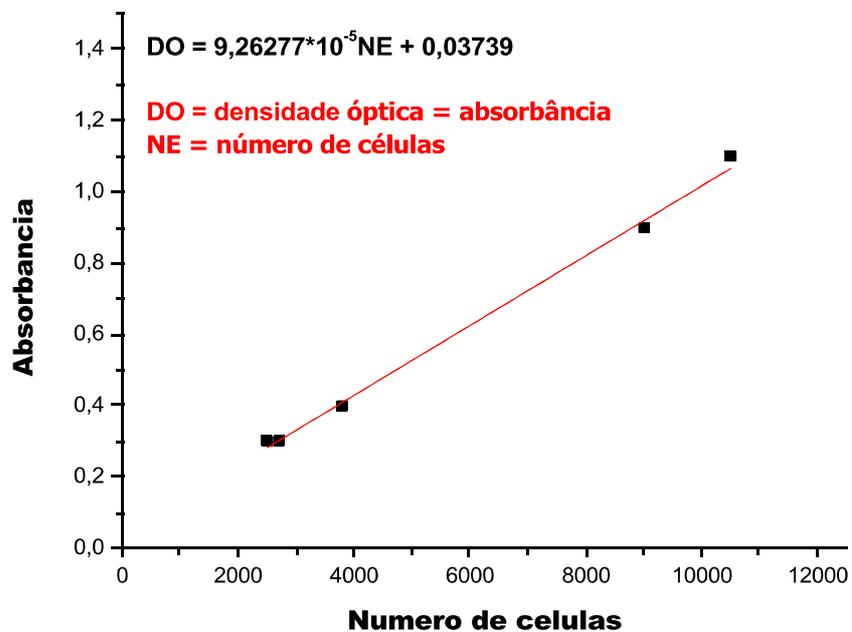


Figura 23. Curva padrão da linhagem MG-63 demonstrando o número de células em função da absorbância.

A Figura 24 mostra os resultados obtidos com as células MC3T3-E1 para cada grupo nos respectivos dias.

Observa-se um aumento expressivo de células logo após 7 dias de cultivo, em todos os grupos. Segundo EILBAGI *et al.* (2016), a evidência de proliferação celular após 7 dias de cultivo revela os efeitos das propriedades físicas e químicas da superfície do biomaterial apropriadas à regeneração do tecido ósseo. Todavia é sabido que nesse intervalo de tempo ocorre um aumento na atividade celular, devido ao acelerado metabolismo que é necessário para fixação, proliferação e sobrevivência das células.

O grupo II demonstrou um crescimento inicial baixo, em relação aos demais, com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo IV. Este fato pode ser explicado pelas características morfológicas do compósito que como verificado por tomografia computadorizada, possui baixa conectividade entre os poros, o que pode ter dificultado inicialmente a proliferação celular para essa linhagem de células.

Percebe-se aos 14 dias, que as células tiveram crescente proliferação principalmente no grupo I, porém, não apresentando diferença significativa com os demais grupos.

Contudo no decorrer dos 21 dias foi verificada uma diminuição no número de células no grupo III e notou-se que há diferença significativa entre os grupos I e IV, respectivamente. Essa diminuição na proliferação celular ocorreu, possivelmente, devido às características morfológicas e topográficas desse compósito, que possui maior grau de anisotropia em relação aos demais grupos, como apresentado nas análises de microestrutura e de topografia. Ao mesmo tempo, nota-se um aumento com diferença significativa na proliferação do grupo IV, que embora tenha apresentado menor percentual de porosidade também demonstrou menor percentual de poros fechados e conseqüentemente uma melhor conectividade, o que contribuiu de forma significativa para o melhor desempenho na proliferação celular.

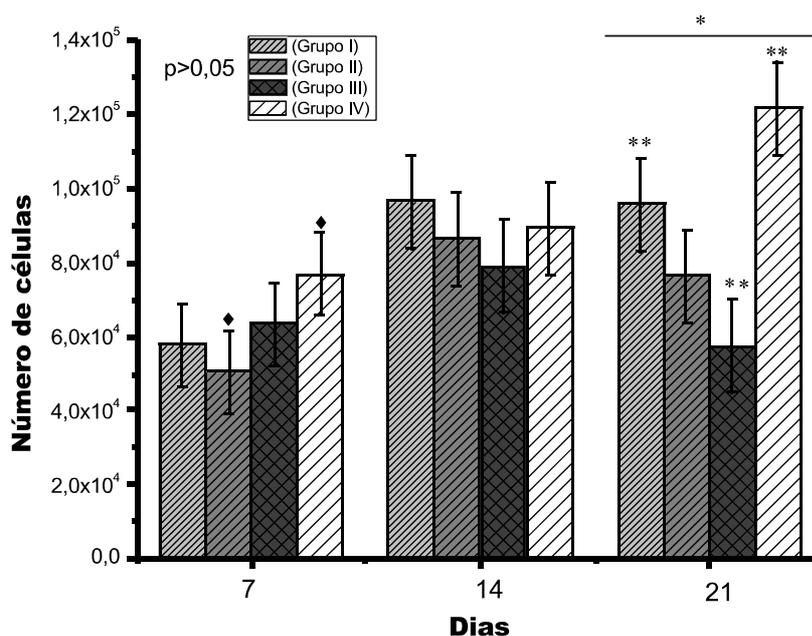


Figura 24. Ensaio de proliferação celular dos grupos I, II, III e IV, com células pré-osteoblásticas de rato (MC3T3-E1) através do método colorimétrico – MTT durante 7, 14 e 21 dias (*, **estatisticamente diferente).

Quando estudado o comportamento das células MG-63 inoculadas nos arcabouços (Figura 25), nota-se a ocorrência de atividade celular aos 7 dias de incubação em todos os compósitos, esse mesmo comportamento foi verificado com as células MC3T3-E1 aos 7 dias de incubação. Essa notável proliferação é devida principalmente à potencialização das propriedades inerentes da superfície desses arcabouços.

O grupo I (grupo controle) demonstrou proliferação progressiva, com diferença estatística significativa aos 7 dias em relação aos grupos II e IV, porém não atingindo o platô (proliferação máxima) aos 14 dias como os demais grupos, todavia, a proliferação para esse grupo ocorreu de forma contínua, embora lenta até os 21 dias.

Nos tempos estudados e entre os grupos II, III e IV a diferença não foi significativa, como notado no ensaio com as células MC3T3-E1, algumas diferenças entre os grupos, isso pode ser justificado pelas características de osteosarcoma inerente a linhagem MG-63. No entanto percebe-se uma leve diminuição na proliferação desses grupos ao atingir os 21 dias de cultivo. Resultados semelhantes foram encontrados em outros trabalhos (JIN *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2015; TEIMOURI *et al.*, 2015).

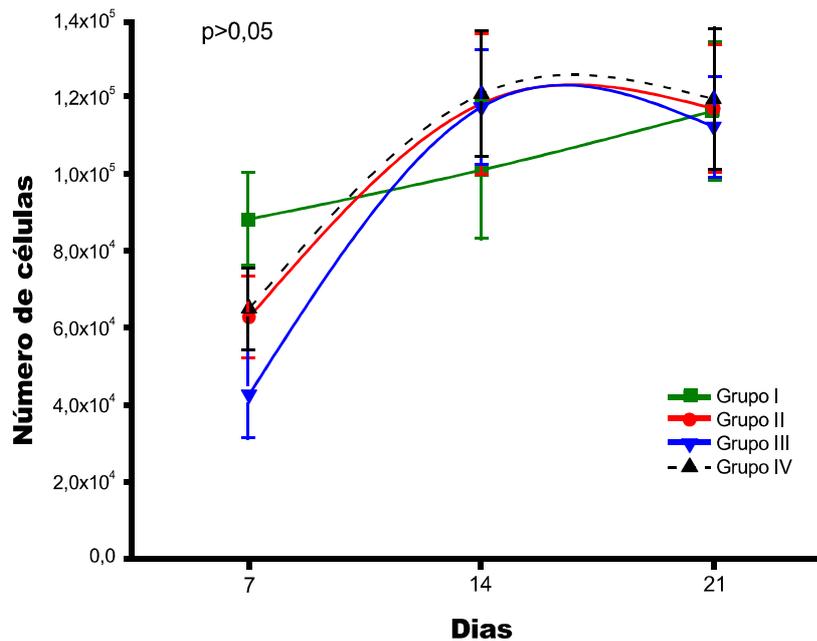


Figura 25. Ensaio de proliferação celular dos grupos I, II, III e IV, com células osteoblásticas de osteosarcoma humano (MG-63) através do método colorimétrico – MTT durante 7, 14 e 21 dias. (GI estatisticamente diferente entre os tempos 7 e 14 dias; GI em 7 dias estatisticamente diferente de GII e GIV; $p < 0,05$).

6.5.3 ANÁLISE DA DIFERENCIAÇÃO OSTEoblástica

A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima utilizada como marcador na primeira fase da diferenciação de osteoblastos (LIMA *et al.*, 2013). A Figura 26 apresenta a curva padrão em nmols p-nitrofenil-fosfato em função da absorbância, a qual apresentou um $R^2 = 0,985$. Através desta foi possível determinar a concentração da fosfatase alcalina das células aderidas ao arcabouço.

Os arcabouços demonstraram atividade enzimática durante os períodos estudados. Segundo HU *et al.* (2017), isso representa um efeito positivo para a neoformação óssea devido à presença da hidroxiapatita e dos polissacarídeos naturais.

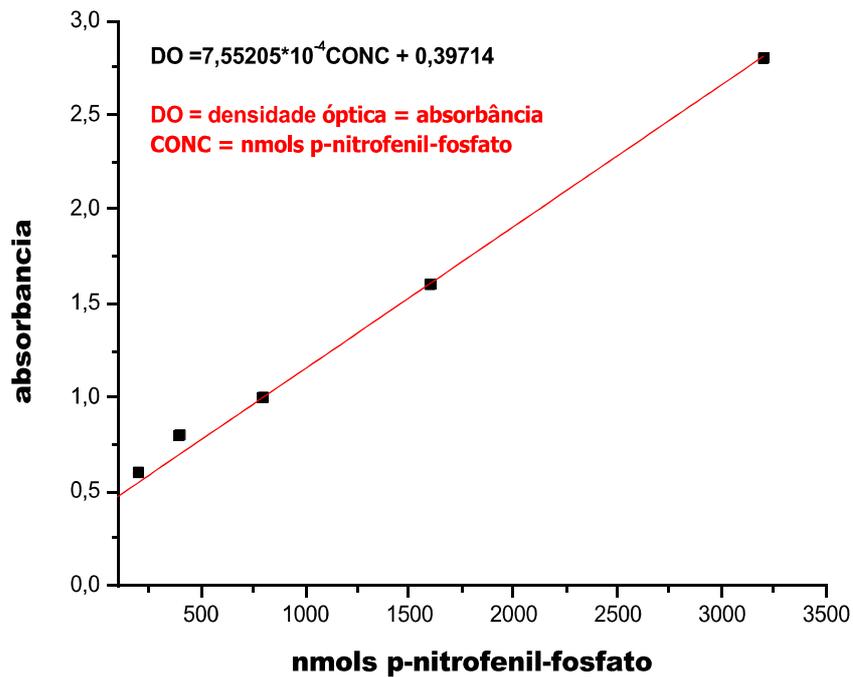


Figura 26. Curva padrão em nmols p-nitrofenil-fosfato em função da absorvância para determinação da atividade enzimáticas das células.

Nesse estudo foi possível observar a atividade da fosfatase alcalina (Figuras 27 e 28) em 7, 14 e 21 dias, das células pré-osteoblásticas de rato (MC3T3-E1) e da linhagem celular de osteosarcoma humano (MG-63), respectivamente.

Observou-se um aumento gradativo na atividade enzimática, das células MC3T3-E1 nos compósitos, durante os períodos estudados como apresentado na Figura 27. Porém, aos 14 dias foi verificada uma leve diminuição, não significativa, na atividade enzimática do grupo III, que se intensificou aos 21 dias. Esses resultados corrobora com os apresentados para proliferação celular, confirmando a possível ocorrência de morte das células. Uma leve diminuição também foi verificada no grupo IV aos 21 dias, que pode ser atribuída à maturação osteoblástica, expressando menor atividade enzimática.

LIMA *et al.* (2013) também comentaram que a deposição da matriz extracelular, ocorre antes do início da mineralização e que, nesse período, a atividade da fosfatase alcalina tende a diminuir.

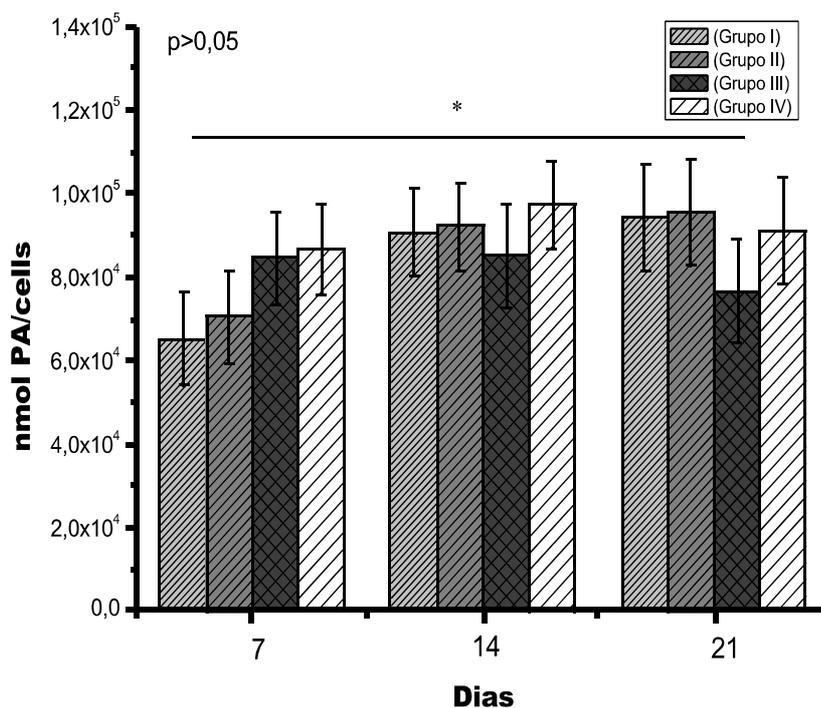


Figura 27. Ensaio da ALP das células pré-osteoblásticas de rato (MC3T3-E1) nos grupos I, II, III e IV, durante 7, 14 e 21 dias (*, estatisticamente diferente).

Em relação às células MG-63, em contato com os compósitos dos grupos II e IV observou-se maior pico de atividade enzimática, aos 14 e 21 dias, respectivamente. Essa análise corrobora com o ensaio de proliferação celular, onde esses grupos estão em consonância nos períodos analisados. Ambos os grupos demonstraram diferença significativa em relação ao grupo I nos tempos estudados.

O arcabouço do grupo III demonstrou uma atividade enzimática regular, com diferença significativa em relação ao grupo IV em todos os períodos e no período de 14 e 21 dias em relação ao grupo I e II respectivamente. Pode-se concluir que o compósito do grupo IV demonstrou melhor desempenho na atividade biológica, com células MG-63 seguido do grupo II, corroborando com os resultados obtidos com a linhagem MC3T3-E1.

JO *et al.* (2017) ao trabalharem com beads de FS/AS/HA *in vivo*, concluíram que houve formação óssea elevada em calvária de rato, não induzindo reações inflamatórias de corpo estranho. Esses autores propuseram que esse compósito pode ser aplicado na engenharia de tecido ósseo e nós acrescentamos mais precisamente, que esse compósito seja produzido em proporções equilibradas de cada material, pois

de acordo com o que foi demonstrado nesse estudo com arcabouços porosos, existe uma forte influência da fibroína da seda, do alginato de sódio e da hidroxiapatita. Todavia se faz necessário o controle dos percentuais de cada material no compósito para uma mimetização mais significativa da matriz extracelular óssea.

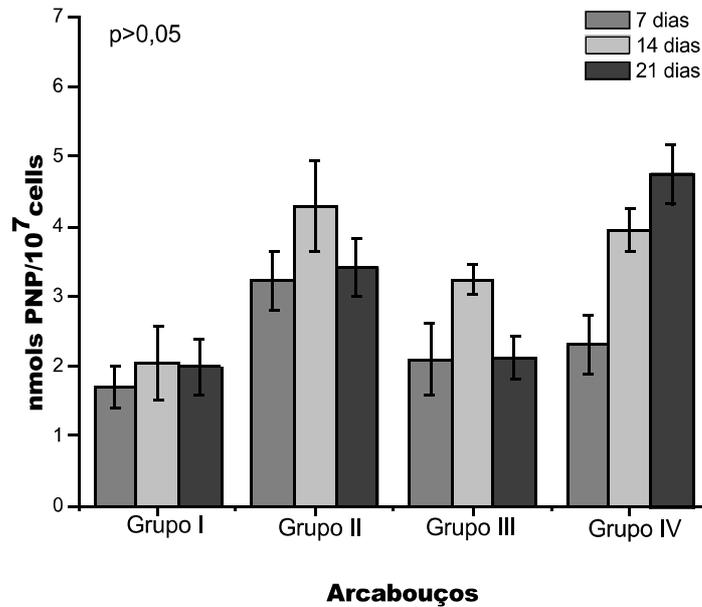


Figura 28. Ensaio do ALP mostrando a fosfatase alcalina das células MG-63 dos grupos I, II, III e IV durante 7, 14 e 21 dias de cultura. GI estatisticamente diferente de GII e GIV em todos os tempos; GIII estatisticamente diferente de GIV em todos os tempos; GIII estatisticamente diferente de GI (14 dias); GIII estatisticamente diferente de GII (21 dias); GII estatisticamente diferente entre os tempos de 7e 14 dias.

CAPÍTULO VII

CONCLUSÃO

As análises físico-químicas permitiram observar que a metodologia empregada na produção dos arcabouços foi eficaz, confirmando a interação física entre os materiais utilizados. A adição dos biopolímeros fibroína da seda e alginato de sódio, tornou os arcabouços menos cristalinos e que a taxa de degradação pode ser controlada ajustando o teor de HA na matriz do polímero.

O ensaio de bioatividade foi realizado com sucesso, onde após 14 dias de imersão em SBF, foi confirmado através de MEV e DRX, apatita depositada na superfície dos arcabouços, onde podemos afirmar que existem mudanças topográficas, químicas e físicas com as variações de percentagens de cada material nos compósitos produzidos.

Todos os compósitos foram considerados biocompatíveis, visto que os biomateriais produzidos em proporções diferentes, demonstraram através da microtomografia computadorizada, uma composição topográfica e de microestrutura capazes de promover adesão, proliferação e diferenciação osteogênica. No entanto, foi verificado por ensaios biológicos que o compósito do Grupo IV, contendo uma proporção com porcentagem equilibrada dos três componentes apresentou melhor resposta para proliferação e diferenciação para ambas as linhagens celulares MC3T3-E1 e MG-63, sendo, portanto, viáveis para utilização como suportes na regeneração do tecido ósseo.

CAPÍTULO VIII

PERSPECTIVAS PARA **TRABALHOS FUTUROS**

Espera-se que os resultados obtidos neste estudo possam contribuir, para a continuidade na utilização desses biomateriais destinados a regeneração do tecido ósseo.

As perspectivas para trabalhos futuros baseiam-se na evolução natural desse tema, portanto sugere-se:

- Visualização das amostras cultivadas com as duas linhagens de células com 7, 14 e 21 dias por MEV;
- Ensaio de imunofluorescência para visualização das células em microscópio de fluorescência;
- Testes *in vivo* dos arcabouços, especialmente em defeito crítico de calvária de rato.

CAPÍTULO IX
REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

- ALIDADI, S.; et al. "Comparative study on the healing potential of chitosan, polymethylmethacrylate, and demineralized bone matrix in radial bone defects of rat". *Carbohydrate Polymers*, v. 166 pp 236-248, 2017.
- ALLO, B.A.; "Nanocompósitos Bioativos e Biodegradáveis e Biomateriais Híbridos para Regeneração Óssea". *Journal of Functional Biomaterials*, v.3 pp 432-463, 2012.
- ANSARI, S. et al. "Functionalization of scaffolds with chimeric anti-BMP-2 monoclonal antibodies for osseous regeneration". *Biomaterials*, v.34, n.38, pp10191-10198, December 2013.
- ATCC. American Type Culture Collection. CRL – 2594. MC3T3-E1 Subclone 14. Virginia, 2011.
- BABU, R.S.; OGLE, A.O.; "Tissue Response: Biomaterials, Dental Implants, and Compromised Osseous tissue". *Dental Clinics of North America*, v.59, pp 305-315, 2015.
- BHARDWAJ, N.; KUNDU, S.C. "Silk fibroin protein and chitosan polyelectrolyte complex porous scaffolds for tissue engineering applications". *Carbohydrate Polymers*, v.85, n.2, pp 325-333, 2011.
- BOER DE, H.H.; et al. "Dry bone histology of bone tumours". *International Journal of Paleopathology*, v. 21, pp 21-56, 2018.
- BONARTSEV, A.P.; et al. "Poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ethylene glycol) scaffolds with different microstructure: the effect on growth of mesenchymal stem cells". *Biotech*, v.8, 2018.
- CARREIRA, A.C.; et al. "Bone Morphogenetic Proteins: Facts, Challenges, and Future Perspectives". *Journal of Dental Research*, v.93, n.4, pp 335-345, 2014.
- CARLO R. et al. "Desenvolvimento e caracterização de membranas rígidas, osteocondutoras e reabsorvíveis de polihidroxibutirato e hidroxiapatita para regeneração periodontal". *Polímeros*, v. 22, p. 73- 79, 2012.
- CHATZINIKOLAIDOU, M.; et al. "Recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) immobilized on laser-fabricated 3D scaffolds enhance osteogenesis". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 149, pp 233-242, 2017.
- CHATZINIKOLAIDOU, M.; et al. "and growth of human bone marrow mesenchymal stem cells on precise-geometry 3D organic-inorganic composite scaffolds for bone repair". *Materials Science and Engineering: C*, v.48, pp 301-309, 2016.
- CHEN, L. et al. "Preparation and evaluation of collagen-silk fibroin / hydroxyapatite nanocomposites for bone tissue engineering". *International Journal of biological macromolecules*, vol. 65, pp 1-7, April 2014.
- CIARA, M.M.; et al. "Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds". *Cell Adhesion & Migration*, v.4, pp 377-381, 2010.
- CIARA, M.M.; et al. "The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering". *Biomaterials*, v.31, pp 461-466, 2010.

- COSTA, A.C.F.M.; “Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações”. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, V.4, PP 29-38, 2009.
- CUOZZO, R.C. et al. “Zinc alginate–hydroxyapatite composite microspheres for bone repair”. *Ceramics International*, v. 40, n.7, pp. 11369-11375, 2014.
- DRAGET, K. I.; et al. “Alginates In: Steinbuchel A, Rhee SK (eds) Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry: Properties, Production, and Patents”. *Wiley. Winheim*, p. 1-30, 2005.
- ELLINGHAM, S.T.D.; et al. “Thermogravimetric analysis of property changes and weight loss in incinerated bone”. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, v. 438, pp 239-244, 2015.
- EILBAGI, M.; et al.” Mechanical and cytotoxicity evaluation of nanostructured hydroxyapatite-bredigite scaffolds for bone regeneration”. *Materials Science and Engineering: C* ,v.68, pp 603-612, 2016.
- ERTESVÁG, H.; VALLA, S. “*Biosynthesis and applications of alginates*, *Polymer Degradation and Stability*, v. 59, P. 85-91, 1998.
- FAN, Z.X. et al. “The placenta-derived mesenchymal versus bone marrow cells for repair of segmental bone defects in a rabbit model”. *Febs j.*, v. 279, pp. 2455-2465, 2012.
- FOOK, A.C.B.M.; APARECIDA, A.H.; FOOK, M.V.L. “Desenvolvimento de biocerâmicas porosas de hidroxiapatita para utilização como scaffolds para regeneração óssea” *Revista Santa Maria*, v.15, n.3, pp.392-399, 2010.
- GARRETT; GRISHAM. *Biochemistry – Fibroin and β -keratin: β -sheet proteins* 2009.
- GU, Q.; et al. “Macrophages and bone inflammation”. *Journal of Orthopaedic Translation*, v.10, pp 86-93, 2017.
- HAN, J.; et al. “Alginate–chitosan/hydroxyapatite polyelectrolyte complex porous scaffolds Preparation and characterization”. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 46, pp 199-205, 2010.
- HANKENSON, K.D.; et al. “Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration”. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 94, pp 03-12, 2015.
- HU, Y.; et al. “Biomimetic mineralized hierarchical hybrid scaffolds based on in situ synthesis of nano-hydroxyapatite/chitosan/chondroitin sulfate/hyaluronic acid for bone tissue engineering”. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.157, pp 93-100, 2017.
- HYUNRYUNG, K. et al. “Electrospun nanofibers composed of silk fibroin containing Mechanically reinforced hydroxyapatite nanoparticles”. *Materials Science and Engineering: C*, v. 40, pp 324-335, July 2014.
- ISO. International Organization for Standardization. ISO 10993-5: 1999. Biological evaluation of medical devices, part 5: tests for in vitro cytotoxicity. Genebra, 1999. ISO. International Organization for Standardization.

ISO 10993-12: 1996. Biological evaluation of medical devices, part 12: sample preparation and reference materials. Genebra, 1996.

JIAO et al. Sodium alginate/graphene oxide aerogel with enhanced strength-toughness and its heavy metal adsorption study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 83, 133-142, 2016.

JIN, J. et al. "The transplantation of human mesenchymal stem cells derived from the placenta in a silk fibroin / hydroxyapatite scaffold improves bone repair in rabbits" *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 118, n.6, pp. 593-598, 2014.

JIN, H.H.; et al. "In vivo evaluation of porous hydroxyapatite/chitosan–alginate composite scaffolds for bone tissue engineering". *International Journal of Biological Macromolecules*, v .51, n.5, pp 1079-1085, 2012.

JO, Y.Y.; et al. "Silk Fibroin-Alginate-Hydroxyapatite Composite Particles in Bone Tissue Engineering Applications In Vivo". *International Journal of Molecular Sciences*, v.18, 2017.

KAR, S.; et al. "Microwave-assisted synthesis of porous chitosan modified montmorillonite hydroxyapatite composite scaffolds". *International Journal of Biological Macromolecules*, v .82, pp 628-636, 2015.

KATO, N.; "The succinate Umami inhibits the proliferation of cancer cells". *Hiroshima University*, 2012. Disponível em: www.hiroshima-u.ac.jp/en/top/research_HU/researchnow/no18. Acesso em 02 . Jul. 2016.

KIM, H.L.; et al. "Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite/alginate/chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering". *Materials Science and Engineering: C*, v.54, n.1, pp 20-25, 2015.

KUNDU, B.; et al. "Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations". *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 65, pp 457-470, 2013.

KUNDU, B.; SUBHAS, B.; KUNDU, C. "Osteogenesis of human stem cells in silk biomaterial for regenerative therapy". *Progress in Polymer Science*, v. 35, p. 1116-1127, 2010.

KO, D.Y.; et al. "Recent progress of in situ formed gels for biomedical applications". *Progress in Polymer Science*, v.38, pp 672-701, 2013.

KOKUBO, T.; et al. "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?". *Biomaterials*, v .27, pp 2907-2915, 2006.

LEE, K.Y.; MONEY, D.J. "Alginate: properties and biomedical applications" *Advancement of Science Polymers*, v.37, n.01, pp.106-126, 2012.

LI, L.H.; et al. "In vitro bioactivity of bioresorbable porous polymeric scaffolds incorporating hydroxyapatite microspheres". *Acta Biomaterialia*, v .6, pp 2525-2531, 2010.

LIMA, P.A. et al. "Preparation, characterization and biological test of 3D-scaffolds based on chitosan, fibroin and hydroxyapatite for bone tissue engineering". *Materials Science and Engineering: C*, v.33, n.6, pp 3389-3395, 2013.

LIU, M.; et al. "In vitro evaluation of alginate/halloysite nanotube composite scaffolds for tissue engineering". *Materials Science and Engineering: C*, v.49, n.1, pp 700-712, 2015.

LOPES, J. R.; et al. "Production and characterization of films containing poly(hydroxybutyrate) (PHB) blended with esterified alginate (ALG-e) and poly(ethylene glycol) (PEG)". *Journal Applied Polymer Science*, app 44362, 2016.

LOW, I. M.; et al., "Ceramic matrix composites – Microstructure, properties and applications", *Woodhead publishing limited, Cambridge* 2006.

LOZANO,C.; et al. "Osteogenesis induced by a three-dimensional bioimplant composed of demineralised bone matrix, collagen, hydroxyapatite, and bone marrow-derived cells in massive bone defects: An experimental study". *Tissue and Cell*, v.50, pp 69-78, 2018.

LUO, Z.Y.Y.; et al. "Peptide-incorporated 3D porous alginate scaffolds with enhanced osteogenesis for bone tissue engineering". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v .143, pp 243-251, 2016.

LUNDIN,E.L.; et al. "Automatic registration of 2D histological sections to 3D microCT volumes: Trabecular bone". *Bone*, v.105, pp 173-183, 2017.

MCNAMARA, S.L.; et al. "Silk as a bioadhesive sacrificial binder in the fabrication of hydroxyapatite load bearing scaffolds". *Biomaterials*, v.35, pp 6941-6953, 2014.

MELKE, J.; et al. "Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering". *Acta Biomaterialia*, pp 1742-7061, 2015.

MENG, S.; LIU, Y. "Alginate block fractions and their effects on membrane fouling". *Scivese science direct*, v.47 pp. 6618-6627, 2013.

MING, J. et al. "Silk fibroin /sodium alginate fibrous hydrogels regulated hydroxyapatite crystal growth". *Materials Science and Engineering: C*, v.51, n.1, pp 287-293, 2015.

MOREIRA,P.M.; et al. "Ternary cyclodextrin polyurethanes containing phosphate groups: Synthesis and complexation of ciprofloxacin"., *Carbohydrate Polymers*,v.151, pp 557-564, 2016.

MUÑOZ, E.M.V.; et al. "Hydroxyapatite-Based Materials: Synthesis and Characterization". *Biomedical Engineering – Frontiers and Challenges*, pp. 75-98, 2011.

NAYAK, A.K; et al. "Plantago ovata F. Mucilage-Alginate Mucoadhesive Beads for Controlled Release of Glibenclamide: Development, Optimization, and In Vitro-In Vivo Evaluation". *Journal of Pharmaceutics*, ID 151035, pp 11, 2013.

OLIVEIRA, J.M.; et al. "Chitosan-based scaffolds for tissue regeneration: Preparation and microstructure". *European Journal of biomedical and pharmaceutical sciences*, v.3, pp15-24, 2016.

OLIVEIRA, L.S.A.F.; et al., "Biomaterials for bone regeneration – Methods of analyses and future perspectives". *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 2010.

- PARIS, J.L.; et al. "Tuning dual-drug release from composite scaffolds for bone regeneration". *International Journal of Pharmaceutics*, v. 486, pp 30-37, 2015.
- PATI, F.; et al. "Ornamenting 3D printed scaffolds with cell-laid extracellular matrix for bone tissue regeneration". *Biomaterials*, v. 37, pp 230-241, 2015.
- PECK, M. et al. "The tissue engineering by self-assembly". *Biomed. Mater*, pp. 218-224, 2011.
- PILIPCHUK, S.P; et al. "Tissue engineering for bone regeneration and osseointegration in the oral cavity". *Dental Materials*, v.31, pp 317-338, 2018.
- POLAK, R. et al. "Inhibition of calcification of bovine pericardium after treatment with biopolymers, E-beam irradiation and in vitro endothelialization". *Materials Science and Engineering: C*, v.33, n.01, pp. 85-90, January, 2013.
- QUI, Q.; "Sterilization of Biomaterials of Synthetic and Biological Origin". *Biomaterials*, pp 127 – 144, 2011.
- RAJKUMAR, M.; et al. "Development of nanocomposites based on hydroxyapatite/sodium alginate: Synthesis and characterization". *Materials Characterization*, v.62, pp 469-479, 2011.
- RAYNAUD, S.; et al. "Synthesis, characterisation and thermal stability of powders". *Biomaterials*, v. 23, pp 1065-1072, 2002.
- RODRIGUES, L.R.; et al. "Synthesis and characterization of nanocrystalline hydroxyapatite gel and its application as scaffold aggregation". *Estreia. Res.*, v.15, pp 974-980, 2012.
- ROGINA, A.; et al. "Macroporous poly(lactic acid) construct supporting the osteoinductive porous chitosan-based hydrogel for bone tissue engineering". *Polymer*, v. 98, pp 172-181, 2016.
- SAMANDARI, S.S.; et al. "In vitro evaluation for apatite-forming ability of cellulose-based nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering". *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 86, pp 434-442, 2016.
- SARTUQUI, J.A.; et al. "Biomimetic fiber mesh scaffolds based on gelatin and hydroxyapatite nano-rods: Designing intrinsic skills to attain bone repair abilities". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 145, pp 382-391, 2016.
- SERRA, I.R.; et al. "Production and characterization of chitosan/gelatin/ β -TCP scaffolds for improved bone tissue regeneration". *Materials Science and Engineering: C*, v. 55, pp 592-604, 2015.
- SHARMA, C.; et al. "Fabrication and characterization of novel nano-biocomposite scaffold of chitosan–gelatin–alginate–hydroxyapatite for bone tissue engineering". *Materials Science and Engineering: C*, v.69, pp 416-427, 2016.
- SHIM, K.; et al. "Fabrication of micrometer-scale porous gelatin scaffolds for 3D cell culture". *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 50 pp 183-189, 2017.

- SIMÕES, F.B.; et al. "Isolated effects of microwave radiation on the solid-liquid interface reactions between hydroxyapatite nanocrystals and silver ions". *Ceramics International*, v.44, pp. 16960-16971, 2018.
- SOWJANYA, J.A.; et al." Biocomposite scaffolds containing chitosan/alginate/nano-silica for bone tissue engineering". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v .109, pp 294-300, 2013.
- SRINIVASAN, S.R.; et al. "Biocompatible alginate/nano bioactive glass ceramic composite scaffolds for periodontal tissue regeneration". *Carbohydrate Polymers*, v. 87, pp 274-283, 2012.
- TEIMOURI, A.; et al. "Preparation, characterization, degradation and biocompatibility of different silk fibroin based composite scaffolds prepared by freeze-drying method for tissue engineering application". *Polymer Degradation and Stability*, v. 121, pp 18-29, 2015.
- TORMENA, F.V.; "Um modelo de remodelamento ósseo utilizando potenciais termodinâmicos generalizados". 183f. Tese (Doutorado em Engenharia-PPGMNE) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2009.
- TORRES, A.L.; et al. "Bioactive polymeric–ceramic hybrid 3D scaffold for application in bone tissue regeneration". *Materials Science and Engineering: C*, v.33, pp 4460-4469, 2013.
- TURNBULL, G.; et al. "3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering". *Bioactive Materials*, v.3, pp 278-314, 2018.
- VASSILIS, K.; et al. "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis". *Biomaterials*, v.26, pp 5474-5491, 2005.
- VENKATESAN, J.; et al. "Alginate composites for bone tissue engineering: A review". *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 72, pp 269-281, 2015.
- VOO, R.; et al. "Flexibility improvement of epoxy nanocomposites thin films using various flexibilizing additives". *Composites Part B: Engineering*, v.43, pp.3037-3043, 2012.
- YAGUE, M.A.F. et al. Biomimetic approaches in bone tissue engineering: biological strategies and physicommechanical Integrating ". *Advanced Drug Delivery Reviews*, September 2014.
- YAMAMOTO, M.; RAFII, S.; RABBANY, S. "Biomaterials scaffold for nanopathophysiology" *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 74, pp. 104-114, 2014.
- YU, W.; et al." In vitro and in vivo evaluation of MgF2 coated AZ31 magnesium alloy porous scaffolds for bone regeneration". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v .149, pp 330-340, 2017.
- WANG, H. et al. "Comparative studies on ectopic bone formation in porous hydroxyapatite scaffolds with complementary pore structures". *Acta Biomaterialia*, v. 9, n.9, pp. 8413-8421, September 2013.
- WU, S.; et al. "Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering". *Materials Science and Engineering: R: Reports*, v.80, pp 1-36, 2014.

ZHANG, H.; et al. "Silk fibroin/sodium alginate composite nano-fibrous scaffold prepared through thermally induced phase-separation (TIPS) method for biomedical applications". *Materials Science and Engineering: C*, v.55, pp. 8-13, 2015.

ZHAO, Z. et al. "Development of silk fibroin modified poly(L-lactide)–poly(ethylene glycol)–poly(L-lactide) nanoparticles in supercritical CO₂". *Powder Technology*, v.268, pp. 118-125, December, 2014.

ZIMMERMAN, H.A.; et al. "Chemical Differentiation of Osseous, Dental, and Non-skeletal Materials in Forensic Anthropology using Elemental Analysis". *Science & Justice*, v.55, pp 131-138, 2015.