



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MATERIAIS PARA ENGENHARIA**

**ANA ANGÉLICA MARTINS COSTA MOURONER**

**ESTUDO *IN VIVO* DA BIOCAMPATIBILIDADE E DEGRADAÇÃO DE  
BLENDAS DE POLI ( $\epsilon$ - CAPROLACTONA) ASSOCIADA OU NÃO A  
HIDROXIAPATITA E TETRACICLINA**

**Itajubá  
2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**MATERIAIS PARA ENGENHARIA**

**ANA ANGÉLICA MARTINS COSTA MOURONER**

**ESTUDO *IN VIVO* DA BIOCAMPATIBILIDADE E DEGRADAÇÃO DE**  
**BLENDAS DE POLI ( $\epsilon$ - CAPROLACTONA) ASSOCIADA OU NÃO A**  
**HIDROXIAPATITA E TETRACICLINA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em  
Materiais para Engenharia como parte dos  
requisitos para obtenção do Título de Doutora em  
Ciências em Materiais para Engenharia.

Área de Concentração: Biomateriais

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Sachs.**

**Co-orientador: Prof. Dr. Alvaro A. A. de Queiroz.**

**Dezembro de 2017**

**Itajubá**

## **DEDICATÓRIA**

Ao meu bem mais precioso, minha querida filha Mariana Martins Mouroner, que me deu a oportunidade de conhecer a forma mais linda de amar.

Ao meu querido esposo, Aelfclêniton Mouroner, por todo amor, apoio, confiança e incentivo.

Aos meus familiares que me apoiam em todos os momentos de minha vida, especialmente, meus dedicados pais Leomax Batista e Maria Angélica Martins, pelo carinho, afeto, compreensão, torcida e pelas palavras de incentivo em todos os momentos importantes da minha vida.

A Deus, pela presença constante em minha vida, por me guiar para os caminhos do bem, por me confortar a cada momento, me dando força física e espiritual para seguir, refletir e aprender todos os dias.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Aos meus orientadores neste estudo, Prof<sup>a</sup>. Dra. Daniela Sachs e Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz, por todo ensinamento, compreensão, atenção, dedicação e profissionalismo. Minha eterna admiração e agradecimento.

À Amanda de Carvalho Pereira Moraes, pela contribuição técnica e científica para o desenvolvimento deste trabalho, por sua amizade, convivência, aprendizado e incentivo.

## **AGRADECIMENTOS**

A Faculdade de Medicina de Itajubá, pela oportunidade de desenvolvimento conjunto deste trabalho.

Ao Prof. Prof. Dr. Nilo César do Vale Baracho, professor do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina de Itajubá, pela colaboração realizada com os ensaios *in vivo*.

Ao Hudson Umeok Jr (aluno de graduação em Medicina), pelo auxílio com os experimentos nos animais.

Ao Laboratório de Análises Clínicas, LABCLIN, pela colaboração com as dosagens bioquímicas do presente estudo.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

A todos os companheiros do laboratório.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

MOURONER, AAMC. Estudo *in vivo* da biocompatibilidade e degradação de blendas de Poli ( $\epsilon$ - caprolactona) associada ou não a Hidroxiapatita e Tetraciclina. Universidade Federal de Itajubá, 2017.

## RESUMO

Polímeros biodegradáveis com boas propriedades mecânicas e biocompatibilidade são amplamente aplicados para preparação de arcabouços porosos a serem utilizados na regeneração dos tecidos ósseos. No entanto, estes materiais, geralmente não são bioativos e possuem baixa osteogênese *in vivo*. Desta forma, biocompósitos contendo materiais bioativos (como hidroxiapatita) e biodegradáveis (como os polímeros), estão sendo intensamente estudados, combinando as vantagens de ambos. Nos últimos anos, houve um aumento acentuado do número de pacientes com problemas ortopédicos, destacando-se a osteomielite, com progressiva infecção do osso e tecido circundante, após procedimentos cirúrgicos. Assim, antibióticos devem ser introduzidos durante a implantação óssea para evitar infecções prolongadas. Baseado no exposto acima, o presente trabalho visou investigar a biocompatibilidade e biodegradação *in vivo* de amostras de blendas de Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) de baixo peso molecular (BPM-PCL) com PCL de alto peso molecular associada ou não à hidroxiapatita e ou tetraciclina. Para realização do estudo as blendas foram implantadas no tecido subcutâneo de ratos e as análises foram conduzidas nos períodos de 7, 14, 30, 180 e 360 dias, após implantação. A avaliação da biocompatibilidade foi realizada a partir de dosagens bioquímicas no sangue do animal, após implantação das pastilhas, para verificação da função renal e hepática. Observou-se que os valores encontrados para as dosagens séricas dos biomarcadores não indicam dano renal e/ou hepático, passível de detecção por análise sanguínea. Se observarmos os grupos de forma geral, não foram detectadas alterações que determinem uma diferenciação entre os mesmos. A biodegradação das blendas foi investigada com base na avaliação da perda de massa, da alteração da estrutura polimérica, propriedades mecânicas e morfológicas. A variação de perda de massa para os Grupos I (blenda PCL), II (blenda PCL/hidroxiapatita), III (blenda PCL/tetraciclina), IV (blenda PCL/ tetraciclina/ hidroxiapatita) foram, respectivamente, 10,27%, 12,38%, 14,88% e 16,65%. Até trinta dias de implantação, a cinética de degradação foi de segunda ordem, considerando o período total de implantação (360 dias), a cinética foi de ordem zero. As micrografias indicaram que o processo de degradação das amostras se dá por erosão superficial. Após os 30 dias de implante, houve aumento da resistência mecânica das pastilhas e a incorporação da hidroxiapatita e tetraciclina interferiu nas propriedades mecânicas do material antes e após implantação *in vivo*. Considerando  $T_{onset}$ ,  $T_{offset}$ ,  $T_{máx}$ , percebe-se que após implantação, todos os grupos analisados apresentaram resultados que indicam diminuição na estabilidade térmica do material, sendo necessária uma menor faixa de temperatura para ocorrer o processo de degradação. Observou-se que até 30 dias de implantação ocorreu aumento da cristalinidade e após seis meses, houve uma diminuição da entalpia de fusão ( $\Delta H_f$ ) em 52,5%, com consequente diminuição da cristalinidade das blendas. Os resultados da análise do FTIR (Infravermelho transformada de Fourier) determinam redução da intensidade do pico característico dos grupos ésteres do PCL em suas bandas de absorção. Desta forma, verifica-se que as blendas de PCL associada ou não a hidroxiapatita e tetraciclina são biocompatíveis e apresentaram lenta taxa de degradação ao longo de um ano de implantação *in vivo*.

**Palavras-chave: Poli ( $\epsilon$ -caprolactona), Tetraciclina, Hidroxiapatita, Biocompatibilidade, Degradação e Marcadores Bioquímicos.**

MOURONER, AAMC. In vivo study of the biocompatibility and degradation of Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) blends associated or not with Hydroxyapatite and Tetracycline. Federal University of Itajubá, 2017.

## ABSTRACT

Biodegradable polymers with good mechanical properties and biocompatibility are widely applied for the preparation of porous frameworks to be used in the regeneration of bone tissues. However, these materials are generally non-bioactive and have low osteogenesis *in vivo*. In this way, biocomposites containing bioactive materials (like hydroxyapatite) and biodegradable (like the polymers), are being intensively studied, combining the advantages of both. In recent years, there has been a marked increase in the number of patients with orthopedic problems, especially osteomyelitis, with progressive infection of the bone and surrounding tissue after surgical procedures. Thus, antibiotics can be introduced during bone implantation to prevent infections. Based on the above, the present work aimed to investigate the biocompatibility and *in vivo* biodegradation of low molecular weight Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) blends (BPM-PCL) with high molecular weight PCL associated with or not to hydroxyapatite and / or tetracycline. For the study, the blends were implanted in the subcutaneous tissues of rats and the analyzes were conducted in the periods of 7, 14, 30, 180 and 360 days after implantation. The biocompatibility evaluation was performed from biochemical measurements in the blood of the animal, after implantation of the blends, to verify renal and hepatic functions. It was observed that the values found for the serum dosages of the biomarkers do not indicate renal and / or hepatic damage, which can be detected by blood analysis. By observing the groups in general, no changes were detected to determine a differentiation between them. The biodegradation of the blends was investigated based on the evaluation of the mass loss, the alteration of the polymer structure, mechanical and morphological properties. The variation of mass loss for Groups I (blends PCL), II (PCL blends / hydroxyapatite), III (PCL blends / tetracycline), IV (PCL / tetracycline / hydroxyapatite blends) were, respectively, 10.27%, 12.38%, 14.88% and 16.65%. Until thirty days of implantation, the kinetics of degradation was of second order, considering the total implantation period (360 days), the kinetics was zero order. The micrographs indicated that the degradation process of the samples is due to surface erosion. After 30 days of implantation, there was an increase in the mechanical strength of the frameworks and the incorporation of Hydroxyapatite and Tetracycline interferes in the mechanical properties of the material before and after implantation *in vivo*. Considering  $T_{onset}$ ,  $T_{offset}$ ,  $T_{max}$ , it can be noticed that after the implantation, all of the analyzed groups presented results indicating a decrease in the thermal stability of the material, being necessary a lower temperature range to occur the degradation process. It was observed that up to 30 days of implantation, the crystallinity increased and after six months, there was a decrease of enthalpy of fusion ( $\Delta H_f$ ) in 52.5%, with consequent decrease in the crystallinity of the blends. The results of the FTIR (Transformed Fourier Infrared) analysis determine reduction of the peak intensity characteristic of the PCL ester groups in their absorption bands. Thus, PCL blends, whether or not associated with hydroxyapatite and tetracycline, are shown to be biocompatible and presented a slow rate of degradation over a year of *in vivo* implantation.

**Keywords:** Poly ( $\epsilon$ -caprolactone), Tetracycline, Hydroxyapatite, Biocompatibility, Degradation and Biochemical Markers.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2. 1</b> - Rede Cristalina da hidroxiapatita. Fonte: ALMQVIST <i>et al.</i> 1999.....	22
<b>Figura 2. 2</b> - Fórmulas estruturais de $\epsilon$ -caprolactona (A), Poli-( $\epsilon$ -caprolactona) (B).....	25
<b>Figura 2. 3</b> - Estrutura química do cloridrato de tetraciclina.....	30
<b>Figura 2. 4</b> - Ilustração esquemática dos três tipos do fenômeno de erosão: a) Erosão de superfície, (b) Erosão em massa com autocatálise, c) Erosão em massa sem autocatálise. Fonte: (VIEIRA <i>et al.</i> , 2011).....	35
<b>Figura 4. 1</b> - Representação da sequência do procedimento cirúrgico realizado para implantação do arcabouço .....	49
<b>Figura 4. 2</b> - Demonstração da extrapolação da reta na curva da TGA, para especificação da $T_{onset}$ e $T_{offset}$ das amostras analisadas no estudo. [Adaptado de Canevarolo, 2004].....	53
<b>Figura 4. 3</b> – Demonstração da determinação da $T_{máx}$ a partir da TGA e DTG, para as análises em estudo.....	54
<b>Figura 5. 1</b> - Níveis séricos de creatinina após os períodos de implantação do biomaterial nos animais. Grupo I: blenda de PCL; Grupo II: Blenda de PCL/HAp; Grupo III: Blenda de PCL/TCH; Grupo IV: Blenda de PCL/TCH/HAp *: diferente estatisticamente do controle. 57	
<b>Figura 5. 2</b> - Níveis séricos de ureia após os períodos de implantação do biomaterial nos animais. . Grupo I: blenda de PCL; Grupo II: Blenda de PCL/HAp;Grupo III: Blenda de PCL/TCH; Grupo IV: Blenda de PCL/TCH/HAp *: diferente estatisticamente do controle...59	
<b>Figura 5. 3</b> - Níveis séricos de ácido úrico após os períodos de implantação do biomaterial nos animais. . Grupo I: blenda de PCL; Grupo II: Blenda de PCL/HAp; Grupo III: Blenda de PCL/TCH; Grupo IV: Blenda de PCL/TCH/HAp *: diferente estatisticamente do controle...61	
<b>Figura 5. 4</b> - Níveis séricos de fósforo após os períodos de implantação do biomaterial nos animais. . Grupo I: blenda de PCL; Grupo II: Blenda de PCL/HAp; Grupo III: Blenda de PCL/TCH; Grupo IV: Blenda de PCL/TCH/HAp *: diferente estatisticamente do controle...63	
<b>Figura 5. 5</b> - Níveis séricos de proteína total após os períodos de implantação do biomaterial nos animais. . Grupo I: blenda de PCL; Grupo II: Blenda de PCL/HAp; Grupo III: Blenda de PCL/TCH; Grupo IV: Blenda de PCL/TCH/HAp *: diferente estatisticamente do controle...65	
<b>Figura 5. 6</b> - Níveis séricos da albumina após os períodos de implantação do biomaterial nos animais. . Grupo I: blenda de PCL; Grupo II: Blenda de PCL/HAp; Grupo III: Blenda de PCL/TCH; Grupo IV: Blenda de PCL/TCH/HAp *: diferente estatisticamente do controle...68	
<b>Figura 5. 7</b> - Níveis séricos do TGO após os períodos de implantação do biomaterial nos animais. . Grupo I: blenda de PCL; Grupo II: Blenda de PCL/HAp; Grupo III: Blenda de PCL/TCH; Grupo IV: Blenda de PCL/TCH/HAp *: diferente estatisticamente do controle...70	
<b>Figura 5. 8</b> - Níveis séricos do TGP após os períodos de implantação do biomaterial nos animais. . Grupo I: blenda de PCL; Grupo II: Blenda de PCL/HAp;Grupo III: Blenda de PCL/TCH; Grupo IV: Blenda de PCL/TCH/HAp *: diferente estatisticamente do controle...72	
<b>Figura 5. 9</b> - % Perda de massa para o estudo de degradação <i>in vivo</i> .....	77
<b>Figura 5. 10</b> - Gráficos da Cinética de Degradação para o Grupo I.....	79

<b>Figura 5. 11</b> - Gráficos da Cinética de Degradação para o Grupo II.....	79
<b>Figura 5. 12</b> - Gráficos da Cinética de Degradação para o Grupo III.....	80
<b>Figura 5. 13</b> - Gráficos da Cinética de Degradação para o Grupo IV.....	80
<b>Figura 5. 14</b> - Pastilhas retiradas do animal após 180 e 360 dias de implantação.....	81
<b>Figura 5. 15</b> - % Perda de massa para o estudo de degradação <i>in vivo</i> após 360 dias.....	82
<b>Figura 5. 16</b> - Gráficos da Cinética de Degradação para o Grupo I.....	83
<b>Figura 5. 17</b> - Gráficos da Cinética de Degradação para o Grupo II.....	83
<b>Figura 5. 18</b> - Gráficos da Cinética de Degradação para o Grupo III.....	84
<b>Figura 5. 19</b> - Gráficos da Cinética de Degradação para o Grupo I.....	84
<b>Figura 5. 20</b> - Micrografias das blendas de PCL (GI) observadas pelo MEV, para os períodos de 7, 14 e 30 dias após implantação. A: Aumento de 200x; B: Aumento de 200x; C: Aumento de 100x; D: Aumento de 100x; E: Aumento de 1K; F: Aumento de 1k; G: Aumento de 1k; H: Aumento de 1k.....	86
<b>Figura 5. 21</b> - Micrografias da blenda de PCL (GI) observadas pelo Smartzoom 5 full report, dos períodos de 180 e 360 dias após implantação. A: Aumento de 100x; B: Aumento de 100x; C: Aumento de 1000x; D: Aumento de 1000x.....	87
<b>Figura 5. 22</b> - Micrografias das blendas PCL/HA (GII) observadas pelo MEV, para os períodos de 7, 14 e 30 dias após implantação. A: Aumento de 400x; B: Aumento de 400x; C: Aumento de 100x; D: Aumento de 100x; E: Aumento de 1K; F: Aumento de 1k; G: Aumento de 1k; H: Aumento de 1k.....	88
<b>Figura 5. 23</b> - Micrografias das blendas de PCL (GII) observadas pelo Smartzoom 5 full report, dos períodos de 180 e 360 dias após implantação.....	89
<b>Figura 5. 24</b> - Micrografias das blendas de PCL/TCH (GIII) observadas pelo MEV, para os períodos de 7, 14 e 30 dias após implantação. A: Aumento de 400x; B: Aumento de 400x; C: Aumento de 400x; D: Aumento de 400x; E: Aumento de 1k; F: Aumento de 1k; G: Aumento de 1k; H: Aumento de 1k.....	90
<b>Figura 5. 25</b> - Micrografias das blendas de PCL (G III) observadas pelo Smartzoom 5 full report, dos períodos de 180 e 360 dias após implantação. A: Aumento de 100x; B: Aumento de 100x; C: Aumento de 1K; D: Aumento de 1K.....	91
<b>Figura 5. 26</b> - Micrografias das blendas de PCL/HAp/TCH (G IV) observados pelo MEV, para os períodos de 7, 14 e 30 dias após implantação. A: Aumento de 400x; B: Aumento de 400x; C: Aumento de 400x; D: Aumento de 400x; E: Aumento de 1k; F: Aumento de 1k; G: Aumento de 1K; H: Aumento de 1k.....	92
<b>Figura 5. 27</b> - Micrografias das blendas de PCL (GIV) observadas pelo Smartzoom 5 full report, dos períodos de 180 e 360 dias após implantação. A: Aumento de 100x; B: Aumento de 400x; C: Aumento de 1k; D: Aumento de 100x; E: (Aumento de 400x); F: Aumento de 1k.....	93
<b>Figura 5. 28</b> -. Propriedades Mecânicas de compressão das blendas de PCL implantados para avaliação da degradação <i>in vivo</i> .....	96
<b>Figura 5. 29</b> - Curvas Termogravimétricas do Grupo I (blenda de PCL) sem degradar e após cada período de implantação <i>in vivo</i> .....	99
<b>Figura 5. 30</b> - Comparação entre as Curvas Termogravimétricas do Grupo I (blenda de PCL) após 7, 14 e 30 Dias de Implantação <i>in vivo</i> .....	101

<b>Figura 5. 31</b> - Comparação entre as Curvas Termogravimétricas do Grupo I (blenda de PCL) após 180 e 360 Dias Implantação <i>in vivo</i> .....	101
<b>Figura 5. 32</b> - Curvas Termogravimétricas do Grupo II (blenda de PCL/ HAp) sem degradar e após cada período de implantação <i>in vivo</i> .....	102
<b>Figura 5. 33</b> - Comparação entre as Curvas Termogravimétricas do Grupo II (Grupo II (Blenda de PCL/ HAp) dos arcabouços sem degradar e após 7,14 e 30 dias de implantação <i>in vivo</i> .....	104
<b>Figura 5. 34</b> - Comparação entre as Curvas Termogravimétricas do Grupo II (PCL/BPM-PCL 20/80% / HAp) após 180 e 360 Dias de Implantação <i>in vivo</i> .....	104
<b>Figura 5. 35</b> - Curva Termogravimétrica do Grupo III (blenda de PCL/TCH) sem degradar e após cada período de implantação <i>in vivo</i> .....	105
<b>Figura 5. 36</b> - Comparação entre as Curvas Termogravimétricas do Grupo III (PCL/BPM-PCL 20/80% / TCH) após 7, 14 e 30 Dias de Implantação <i>in vivo</i> .....	107
<b>Figura 5. 37</b> - Comparação entre as Curvas Termogravimétricas do Grupo III (PCL/BPM-PCL 20/80% /TCH) após 180 e 360 Dias de Implantação <i>in vivo</i> .....	107
<b>Figura 5. 38</b> - Curva Termogravimétrica do Grupo IV (blenda de PCL/ HAp/ TCH) sem degradar e após cada período de implantação <i>in vivo</i> .....	108
<b>Figura 5. 39</b> - Comparação entre as Curvas Termogravimétricas do Grupo IV (PCL/BPM-PCL 20/80% / HAp /TCH) após 7, 14 e 30 Dias de Implantação <i>in vivo</i> .....	110
<b>Figura 5. 40</b> - Comparação entre as Curvas Termogravimétricas do Grupo IV (PCL/BPM-PCL 20/80% /HAp/TCH) após 180 e 360 Dias de Implantação <i>in vivo</i> .....	110
<b>Figura 5. 41</b> - Comparação das Curvas de DSC da blenda de PCL (Grupo I), até 180 dias de implantação <i>in vivo</i> , utilizando o segundo ciclo de aquecimento.....	114
<b>Figura 5. 42</b> - Espectro do FTIR para todos os grupos em função do tempo de degradação. <b>A:</b> Grupo I (blenda de PCL) até 30 dias de implantação; <b>B:</b> Grupo I, 180 e 360 dias; <b>C:</b> Grupo II (blenda PCL/HAp) até 30 dias de implantação; <b>D:</b> Grupo II, 180 e 360 dias I; <b>E:</b> Grupo III (blenda de PCL/TCH) até 30 dias de implantação; <b>F:</b> Grupo III, 180 e 360 dias; <b>G:</b> Grupo IV ( blenda PCL/HAp/TCH) até 30 dias de implantação e <b>H:</b> Grupo IV, 180 e 360 dias.....	116
<b>Figura 5. 43</b> - Comparação dos espectros do FTIR para todo o Grupo I (blenda de PCL) em função do tempo de implantação <i>in vivo</i> .....	118
<b>Figura 5. 44</b> - Comparação dos espectros do FTIR para todo o Grupo II (blenda de PCL/HAp) em função do tempo de implantação <i>in vivo</i> .....	118
<b>Figura 5. 45</b> - Comparação dos espectros do FTIR para todo o Grupo III (blenda de PCL/TCH) em função do tempo de implantação <i>in vivo</i> .....	119
<b>Figura 5. 46</b> - Comparação dos espectros do FTIR para todo o Grupo IV (blenda de PCL/HAp/TCH) em função do tempo de implantação <i>in vivo</i> .....	119

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2. 1-</b> Valores de referência para ratos wistar de parâmetros bioquímicos investigados no presente estudo.....	45
<b>Tabela 4. 1.</b> Especificação dos componentes incorporados em cada grupo de pastilha.....	48
<b>Tabela 4. 2 –</b> Metodologia e finalidade empregada nos exames bioquímicos.....	51
<b>Tabela 4.3 -</b> Principais bandas de absorção infravermelhas do PCL (Fonte: Gurlek <i>et al.</i> , 2017).....	52
<b>Tabela 5. 1-</b> Média e desvio padrão da Creatinina (mg/dL) analisados após os períodos de implantação <i>in vivo</i> do biomaterial. * diferente estatisticamente do controle.....	56
<b>Tabela 5. 2 -</b> Média e desvio padrão da Ureia (mg/dL) analisados após os períodos de implantação <i>in vivo</i> do biomaterial. * diferente estatisticamente do controle.....	58
<b>Tabela 5. 3-</b> Média e desvio padrão do Ácido Úrico (mg/dL) analisados após os períodos de implantação <i>in vivo</i> do biomaterial.* diferente estatisticamente do control.....	60
<b>Tabela 5. 4 -</b> Média e desvio padrão do Fósforo (mg/dL) analisados após os períodos de implantação <i>in vivo</i> do biomaterial. * diferente estatisticamente do controle.....	62
<b>Tabela 5. 5-</b> Média e desvio padrão de Proteínas Totais (g/dL) e analisados após os períodos de implantação <i>in vivo</i> do biomaterial. * diferente estatisticamente do controle.....	64
<b>Tabela 5. 6 -</b> Média e desvio padrão de Albumina (g/dL) analisados após os períodos de implantação <i>in vivo</i> do biomaterial. * diferente estatisticamente do controle.....	67
<b>Tabela 5. 7 -</b> Média e desvio padrão de TGO (U/L), analisado após os períodos de implantação <i>in vivo</i> do biomaterial. * diferente estatisticamente do controle.....	69
<b>Tabela 5. 8 -</b> Média e desvio padrão de TGP (U/L), analisado após os períodos de implantação <i>in vivo</i> do biomaterial. * diferente estatisticamente do controle.....	71
Tabela 5. 9 - Módulo de Young após implantação <i>in vivo</i> .....	95
<b>Tabela 5. 10 -</b> Grupo I- $T_{onset}$ , $T_{offset}$ , $T_{máx}$ e a porcentagem de resíduo final.....	100
<b>Tabela 5. 11 -</b> Grupo II - $T_{onset}$ , $T_{offset}$ , $T_{máx}$ e a porcentagem de resíduo final.....	103
<b>Tabela 5. 12 -</b> Grupo III - $T_{onset}$ , $T_{offset}$ , $T_{máx}$ e a porcentagem de resíduo final.....	106
<b>Tabela 5. 13-</b> Grupo IV - $T_{onset}$ , $T_{offset}$ , $T_{máx}$ e a porcentagem de resíduo final.....	109
<b>Tabela 5. 14 -</b> Valores médios das propriedades térmicas e morfológicas das blendas sem degradar <i>in vivo</i> .....	112
<b>Tabela 5. 15 -</b> Valores médios das propriedades térmicas e morfológicas da blenda de PCL (Grupo I) em seus respectivos períodos de implantação <i>in vivo</i> .....	112

## LISTA DE SIGLAS

AST: Aspartato Aminotransferas	PGA: ácido poliglicólico
ALT: Alanina Aminotransferase	PLA: ácido polilático
ACPs: Fosfato de cálcio amorfo	PVA: poli (álcool vinílico)
BPM: Baixo Peso Molecular	PCL: Poli ( $\epsilon$ -caprolactona)
BCPs: Fosfato de Cálcio Bifásico	SAA: Amilóide sérico A
CPCs: Cerâmicas de fosfato de cálcio	TFG: filtração glomerular
CRP: Proteína C-reativa	TCP: Tricálcio fosfato
DSC: Calorimetria Exploratória Diferencial	tRNA: RNA transportador
DTG: Termogravimetria Derivada	TCA: Ácido Tricarboxílico
EUA: Estados Unidos da América	TGA: Análise termogravimétrica
FTIR: Infravermelho transformada de Fourier	TCH: Tetraciclina
	$T_g$ : Transição vítrea
FDA: Food and Drug Administration	$T_f$ : Temperatura de fusão
GGT: gama GT	TGP: Transaminase Glutâmica Pirúvica
IRA: Insuficiência Renal Aguda	TGO: Transaminase Glutâmica Oxalacética
HAp: Hidroxiapatita	$T_{onset}$ : Temperatura inicial extrapolada da TG
$M_i$ : massa no início dos experimentos	$T_{offset}$ : Temperatura final extrapolada da TG
$M_f$ : massa final dos experimentos	$T_{máx}$ : Temp. da taxa de degradação máxima
MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura	UNIFEI: Universidade Federal de Itajubá
NOCC: N, O-Carboximetil Chitosan	VC: Vanomicina
mRNA: RNA mensageiro	

## SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	14
2.0 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
CAPÍTULO I - ENGENHARIA DOS TECIDOS E OS BIOMATERIAIS .....	17
1.0 ENGENHARIA DOS TECIDOS .....	17
2.0 BIOMATERIAIS .....	18
2.1 Cerâmicas.....	19
Hidroxiapatita.....	21
2.2 POLÍMEROS .....	24
Poli ( $\epsilon$ -Caprolactona) .....	25
CAPÍTULO II - CLORIDRATO DE TETRACICLINA.....	30
CAPÍTULO III – BIODEGRADAÇÃO.....	34
1.0 MECANISMOS DA BIODEGRADAÇÃO .....	35
CAPÍTULO IV - BIOCMPATIBILIDADE .....	38
1.0 RESPOSTAS DO TECIDO AO BIOMATERIAL.....	38
2.0 AVALIAÇÃO DOS INDICADORES BIOLÓGICOS (BIOMARCADORES) .....	40
2.1 Marcadores da Função Renal.....	41
2.2 Marcadores da Função Hepática.....	43
3.0 INVESTIGAÇÕES <i>IN VIVO</i> .....	44
3. OBJETIVOS .....	46
3.1 OBJETIVO GERAL.....	46
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	46
4.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
5.0 APRESENTAÇÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	55
5.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS APÓS IMPLANTAÇÃO DO MATERIAL <i>IN VIVO</i> . .....	55
5.2 ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DAS BLENDA APÓS IMPLANTAÇÃO <i>IN VIVO</i> A PARTIR DA AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS .....	77
6.0 CONCLUSÃO .....	120
REFERÊNCIAS.....	121

## 1.0 INTRODUÇÃO

Os tecidos e órgãos que constituem o corpo humano estão sempre sujeito a doenças e traumas que podem resultar em dor, perda da função e restrição dos movimentos, podendo causar, inclusive, incapacidade. Também se observa que os avanços da medicina têm levado ao aumento da expectativa de vida da população e, conseqüentemente, das doenças relacionadas à velhice, destacando-se os problemas relacionados à estrutura óssea, como a osteoporose e a perda de massa óssea. Problemas relacionados ao osso, também atingem frequentemente os jovens, em sua fase mais produtiva, em decorrência de acidentes, destacando-se os automobilísticos e os de trabalho (HELMUS; GIBBONS; CEBON, 2008; KAWACHI *et al.*, 2000).

O Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad (INTO), localizado no Rio de Janeiro, é considerado referência ortopédica no Sistema Único de Saúde (SUS). Se considerar o percentual de cirurgias ortopédicas realizadas nesta instituição, observa-se uma evolução ao longo dos anos. Nos quatro primeiros meses de 2014 foram efetivadas, no INTO, 1.908 cirurgias, de janeiro a abril de 2015 o número subiu para 3.289 cirurgias, destacando-se que do total de operações feitas neste período, 36% foram consideradas de alta complexidade. Em maio de 2016 foram realizados 9,1 mil procedimentos. Em 2017 foi publicado no site do portal Brasil, que o INTO é responsável, atualmente, por 72,3% das cirurgias de traumatologia e ortopedia de alta e média complexidade realizadas no Rio de Janeiro (RJ) e por 54,4% das cirurgias desse tipo ocorridas no estado (Portal Brasil. Disponível em: [www.brasil.gov.br](http://www.brasil.gov.br). publicado: 15/05/2017).

Para permitir que as funções desempenhadas sejam mantidas, em muitos casos, o tratamento envolve a remoção do tecido ou órgão afetado e sua substituição por um enxerto de tecido vivo ou um análogo artificial. Recentemente, a Engenharia de Tecidos Biológicos tem voltado seu foco para obtenção de arcabouços moleculares para a medicina regenerativa. Sendo considerada uma abordagem promissora para gerar estruturas que podem imitar as propriedades dos tecidos nativos (GURLEK *et al.*, 2017; RONCA *et al.*, 2016).

Muitos esforços têm sido feitos no desenvolvimento de materiais avançados e técnicas de fabricação para projetar dispositivos no campo da prótese e engenharia de tecidos (RONCA *et al.*, 2016). A estratégia da engenharia dos tecidos tem emergido com alternativas de tratamento onde a maioria das abordagens envolve a utilização de arcabouços, que forneçam suporte estrutural para o local do defeito durante a reparação (BLACKWOOD

*et al.*, 2012). Destacando-se o desenvolvimento de arcabouço poroso biocompatível e biodegradável (RONCA *et al.*, 2016).

Para o desenvolvimento de equipamentos biomédicos implantáveis na área médica, os biomateriais têm sido cada vez mais aceitos. As classes de biomateriais, como metais, cerâmicas, polímeros e compósitos destes são ferramentas úteis para essas estruturas, destacando-se dispositivos obtidos a partir de polímeros, que são considerados excelentes candidatos devido, principalmente à sua versatilidade (GURLEK *et al.*, 2017).

As vantagens da utilização de polímeros biorreabsorvíveis são inúmeras quando comparados com outros materiais tradicionalmente utilizados. Com relação aos dispositivos metálicos, eliminam-se os riscos de corrosão sofrida por um grande número de metais, liberando partículas que podem provocar resposta inflamatória no organismo, e degradam no organismo, de forma gradual e biocompatível, ou seja, sem promover respostas inadequadas ao organismo. Além do mais, os materiais metálicos apresentam módulos de elasticidade superior ao do osso, e são, muitas vezes, implantes temporários que necessitam de um segundo procedimento cirúrgico para sua retirada (SANTOS *et al.*, 2007; MINATA *et al.*, 2013). No entanto, para utilização na regeneração óssea, esses polímeros apresentam algumas desvantagens, como falta de bioatividade e baixa osteogênese *in vivo* (HOU *et al.*, 2016), características que favorecem a neoformação óssea.

A poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) é um polímero alifático semicristalino que tem sido extensivamente estudada para reparação e regeneração dos tecidos, devido à sua natural biocompatibilidade, biodegradabilidade, flexibilidade e baixa taxa de degradação. Além do mais, possui aprovação dos EUA e do Food and Drug Administration (FDA) para utilização em dispositivos médicos e entrega de medicamentos (KIM *et al.*, 2004; DASH; KONKIMALLA, 2012; PUGA *et al.*, 2012; SAHOO *et al.*, 2010b, CHUENJITKUNTAWORN *et al.*, 2010; GURLEK *et al.*, 2017; LUO *et al.*, 2016; HOU *et al.*, 2016).

O osso é um material compósito heterogêneo formado por material inorgânico (mineral de hidroxiapatita (HAp)), uma mistura de compostos orgânicos (matriz colágena, proteínas não colágenas e lipídios) e água (JUNQUEIRA, 2008). Desta forma, estruturas desenvolvidas para substituição óssea e utilização como biomateriais ortopédicos, compostas por materiais orgânico/inorgânico são mais promissoras, comparado com metal, liga de metal e materiais cerâmicos (NITHYA; MEENAKSHI SUNDARAM, 2015). Neste sentido, observa-se que os biocompósitos que contêm materiais bioativos, como as cerâmicas, e polímeros biodegradáveis estão sendo amplamente investigados para utilização óssea, pois

combinaram as vantagens tanto do polímero orgânico, quanto dos materiais inorgânicos, imitando, desta forma o osso natural e mantendo a biocompatibilidade (HOU *et al.*, 2016; NITHYA; MEENAKSHI SUNDARAM, 2015).

Dentre as cerâmicas, a hidroxiapatita sintética é a mais utilizada na preparação de matrizes para e tecido ósseo, devido à sua similaridade com a fase mineral dos ossos e por possuir propriedades biocompatíveis e osteocondutoras (METSGER, 1999; KIM *et al.*, 2004; KAWACHI *et al.*, 2000).

Desta forma, o desenvolvimento de compósitos orgânicos/inorgânicos para materiais ortopédicos têm atraído muita atenção nestes últimos anos, devido à amplitude destes problemas de saúde junto à população (KAWACHI *et al.*, 2000; NITHYA; MEENAKSHI SUNDARAM, 2015). Com base no exposto, nos propomos estudar arcabouços de PCL associado ou não a HAp, considerando que estes materiais desempenham um papel importante em arcabouços delineados para uso em engenharia tecidual.

Dentre os antibióticos mais frequentemente utilizados na engenharia de tecidos ósseos, destacam-se as tetraciclina (TCH), um marcador de mineralização óssea que além das propriedades antimicrobianas, apresentam propriedades farmacológicas adicionais como atividade anticolagenásica, inibição de reabsorção de osso, ação anti-inflamatória e uma habilidade para promover a adsorção de fibroblastos e tecido conectivo em superfícies radiculares (GOLUB *et al.*, 1991; ESPOSITO, 1997; SEYMOUR, 1995; PATARO, 2003). Segundo Karuppuswamy *et al.* (2015), que avaliaram nanofibras de PCL/TCH, a incorporação da TCH no arcabouço de PCL além de beneficiar sua liberação também auxilia no processo de regeneração do osso e da pele. Neste sentido, a TCH foi incorporada em alguns dos arcabouços que nos propomos a estudar.

Tendo em vista a metabolização do material, torna-se necessário a avaliação dos efeitos sistêmicos dos produtos de degradação do polímero implantado *in vivo*, e uma das formas de se avaliar, é através da dosagem de marcadores bioquímicos específicos das vias de metabolização.

Entender como o dispositivo ou arcabouço degrada é fundamental para estudar o seu funcionamento. Tendo em vista o número reduzido de publicações que avaliam arcabouços de PCL, implantados em longo prazo, e os parâmetros bioquímicos após implantação *in vivo* do mesmo, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a biocompatibilidade, através do perfil renal e hepático nos animais submetidos ao estudo, e a degradação *in vivo* da blenda de PCL associado ou não a HAp e/ou TCH. Tendo em vista que, nosso principal foco é utilizar os arcabouços para atuar na regeneração óssea.

## 2.0 REVISÃO DA LITERATURA

### CAPÍTULO I - ENGENHARIA DOS TECIDOS E OS BIOMATERIAIS

#### 1.0 ENGENHARIA DOS TECIDOS

Nas áreas biomédicas e nas engenharias tem-se alcançado avanços que possibilitam o desenvolvimento de técnicas que minimizem o dano e permitam uma melhoria na qualidade de vida. A engenharia de tecidos é uma abordagem promissora para gerar estruturas que podem imitar as propriedades dos tecidos nativos (GURLEK *et al.*, 2017).

A engenharia de tecidos pode ser definida como uma área multidisciplinar em que aplica os princípios da engenharia e da ciência da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos que permitem a restauração, o melhoramento ou a manutenção das funções dos tecidos e órgãos. O termo engenharia de tecidos pode ser separado em duas palavras, tecido e engenharia. Um tecido é definido como um grupo de diferentes tipos de células que apresentam diferentes tipos de fenótipos, mas em conjunto realizam uma função específica, o termo engenharia refere-se aplicação do conhecimento para construir e implantar no ser humano (BLACKWOOD *et al.*, 2012; VERMA; SINGH, 2014).

O principal objetivo da bioengenharia é superar as limitações dos tratamentos convencionais em uso, baseados na cirurgia reconstrutora ou no transplante de órgãos. Sobretudo, sendo capaz de produzir substitutos para órgãos e tecidos que apresente tolerância imunológica, o que possibilita sua implantação no paciente sem risco de rejeição pelo organismo (SACHLOS; CZERNUSZKA, 2003).

O foco da bioengenharia tecidual tem sido a criação de tecidos para enxerto, capazes de promover ou aumentar a osteogênese no sítio de defeito ósseo. Segundo Gurlek *et al.* (2017) as classes de biomateriais, tais como metais, cerâmicas, polímeros, bem como compósitos têm sido ferramentas úteis para a formação dessas estruturas e os polímeros servem como excelentes candidatos na engenharia dos tecidos, devido à sua versatilidade.

Os compósitos consistem em qualquer material multifásico que exiba uma proporção significativa das propriedades de ambas as fases que o constituem, de tal modo que é obtida uma melhor combinação de propriedades (CALLISTER, 2002).

Neste sentido, a Engenharia dos tecidos, pretende combinar os avanços no campo dos biomateriais, como por exemplo, a utilização de biomateriais em arcabouços (“*scaffolds*”), e

da biologia celular e molecular, de forma que os enxertos ósseos possam abranger a maioria ou todas as características ideais: serem biocompatíveis, osteoindutivos, osteocondutivos, porosos, integrativos e mecanicamente compatíveis com o osso nativo (FRÖHLICH *et al.*, 2008; EL-GHANNAM, 2005).

## **2.0 BIOMATERIAIS**

Os biomateriais podem ser definidos como “qualquer substância ou combinação de substâncias, que não sejam drogas, de origem natural ou sintética, que pode ser utilizada por um período de tempo, como um todo ou parte de um sistema, que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo” (DEE *et al.* 2002). Outras definições surgiram e a definição de consenso do biomaterial segundo Black (2006) caracteriza o biomaterial como “um material destinado a interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função no corpo”.

Quanto ao tipo, os biomateriais podem ser classificados em: polímeros sintéticos e naturais, cerâmicas, metais e que são manufacturados ou processados para se adequarem à utilização em meio biológico. A diversidade de intervenções e modificações em geral, bem como, as propriedades de superfície, tem feito com que os biomateriais atinjam uma enorme quantidade de aplicações (ROLIM, 2010; BAUER *et al.*, 2013 ).

Dentre suas utilizações, podem ser citados como exemplos dispositivos biomédicos (como biossensores, tubos de circulação sanguínea, sistemas de hemodiálise), materiais implantáveis (como suturas, placas, substitutos ósseos, tendões, telas ou malhas, válvulas cardíacas, lentes, dentes), dispositivos para a liberação de medicamentos (na forma de filmes, implantes subdérmicos e partículas), órgãos artificiais (como coração, rim, fígado, pâncreas, pulmões, pele) e curativos, dentre muitos outros (PIRES *et al.*, 2015).

Como uma alternativa aos enxertos ósseos, nos processos de regeneração do tecido ósseo, a aplicação de biomateriais sintéticos é relevante, pois eles não danificam os tecidos saudáveis, não aumentam os riscos de contaminações virais e bacterianas, além de serem disponibilizados comercialmente (WILLIAMS, 1987).

Para serem utilizados como substitutos do tecido ósseo os biomateriais precisam proporcionar uma estrutura adequada, que servirá de suporte para a neoformação óssea, promovendo a adesão celular e subsequente crescimento tecidual, admitindo a difusão de células e nutrientes através do seu arcabouço (PRECHEUR, 2007; ROSE *et al.* 2004). Estes

ainda podem ser ter boa dissolução e absorção, ao mesmo tempo em que permitem e estimulam a formação óssea (WAN *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2009).

Além disso, os biomateriais devem atuar imediatamente após a implantação e ser capaz de remodelar e integrar com o organismo. Eles devem ser biocompatíveis, biodegradáveis e osteocondutivos, proporcionando a recruta ou indução de osteoblastos ou de células precursoras de osteoblastos para o sítio lesado e de fatores regulatórios que promovam esse recrutamento, assim como o crescimento celular neste local (ALBREKTSSON *et al.*, 2001; VUNJAKNOVAKOVIC; KAPLAN, 2006; WAN *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2009). Além disso, eles devem proporcionar uma estrutura adequada, que permita suporte para a neoformação óssea (PRECHEUR, 2007).

Neste sentido, um biomaterial ideal ainda precisa ser esterilizável, ser disponível em quantidade suficiente, ser osteoindutor e formar arcabouço capaz de fornecer suporte mecânico ao novo osso e impedir o crescimento de tecido fibroso ou invaginação de tecido muscular para dentro da falha (CUTTER; MEHRARA, 2006; AABOE *et al.*, 1995).

Recentemente, uma das linhas de pesquisa mais importantes na engenharia de tecido ósseo é o desenvolvimento dos biomateriais em arcabouço (“*scaffolds*”), que consiste num arcabouço tridimensional poroso, com propriedades bioativas e biodegradáveis, que serve de molde para formação do novo tecido (LIU; MA, 2004). Além disso, devem mimetizar os meios químicos e físicos do tecido saudável, para permitir migração, diferenciação e proliferação tecidual e permitir suporte mecânico (OLIVEIRA, 2010). Considerando estes parâmetros, escolhemos este tipo de estrutura para avaliar em nosso estudo.

## **2.1 Cerâmicas**

As cerâmicas podem ser de origem natural ou sintética, e sua utilização como biomateriais vem sendo relatada desde 1894. Neste contexto, as cerâmicas de fosfato de cálcio (CPCs) é uma classe de materiais biocompatível e bioativa que também é muito utilizada para a reparação do tecido ósseo (DOROZHKIN; EPPLE, 2002). As CPCs possuem propriedades de superfície ideais para a adesão e proliferação dos osteoblastos e estimulam a formação de osso novo e, portanto são osteocondutoras e osteoindutoras, respectivamente (LEE *et al.*, 2006; ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001). A capacidade osteoindutora das CPCs *in vivo* está associada à solubilidade e capacidade de reabsorção das CPCs (SAMAVEDI; WHITTINGTON; GOLDSTEIN, 2013). As quatro CPCs mais comumente utilizadas são:

HAp, fosfato de cálcio amorfo (ACPs), fosfato de cálcio bifásico (BCPs) e tricálcio fosfato (TCP) (SAMEVEDI *et al.*, 2013). A TCP ocorre em duas fases,  $\alpha$  e  $\beta$ , no entanto  $\beta$ -TCP é mais usada na regeneração óssea do que  $\alpha$ -TCP. Apesar das excelentes propriedades bioativas e biocompatíveis as CPCs tem baixa resistência à fratura e capacidade de suporte de carga o que limita a sua aplicação na forma monolítica (DE AZA ET AL., 2014; ATAOLLAHI ET AL., 2014).

De fato, suas limitações estão relacionadas à sua baixa rigidez estrutural, de forma que não pode ser utilizada em regiões de grande esforço mecânico, pois sua natureza porosa aumenta o risco de fraturas (WAN *et al.*, 2006; KAWACHI, 2000, SAMAVEDI *et al.*, 2013). Dessa forma, trabalhos recentes têm procurado aumentar a capacidade de carga e resistência das CPCs usando como reforço outros materiais biocompatíveis como polímeros (PRAMANIK; KAR, 2009; SHIRAZI ET AL., 2015).

As cerâmicas implantáveis foram intituladas biocerâmicas e, baseadas em seu comportamento biológico em certos ambientes, são agrupadas em três categorias: as cerâmicas relativamente bioinertes, as cerâmicas bioativas ou com superfície reativa e as cerâmicas biodegradáveis ou reabsorvíveis (GRECO; PRINZ; SMITH, 2005).

As cerâmicas relativamente bioinertes são cerâmicas contendo carbono não absorvível, alumina, zircônia e nitretos de silício. Depois de implantada, mantém suas propriedades físicas e mecânicas. Geralmente apresentam boa resistência e funções de deslizamento, sendo utilizadas nas formas densas e porosas. São usadas tipicamente como implantes de suporte estrutural produzindo, por exemplo, substituintes da cabeça do fêmur (GRECO; PRINZ; SMITH, 2005).

As cerâmicas bioativas incluem vidros, cerâmicas-vidros e materiais baseados em fosfato de cálcio. São caracterizadas pela habilidade em provocar a sua volta, respostas ósseas e teciduais, o que lhes confere vantagem na fixação do implante ou redução do estresse. Têm sido empregadas como revestimento em camadas e partículas de encaixe nas cirurgias ortopédicas e dentárias (GRECO; PRINZ; SMITH, 2005).

As biodegradáveis incluem fosfato de cálcio, alumínio, coralina, HAp e TCP. São degradadas pelos tecidos que as circundam e devido a sua estrutura porosa, podem estimular o crescimento tecidual. Têm sido usadas na fabricação de vários implantes ortopédicos (GRECO; PRINZ; SMITH, 2005).

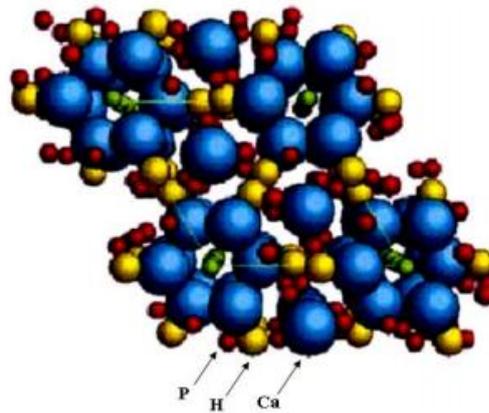
As cerâmicas possuem um alto tempo de degradação *in vivo*, dependendo do local implantado esta característica pode ser vantajosa, por permitir a remodelação óssea no local do implante (ABUKAVA *et al.*, 2006).

As cerâmicas de fosfato de cálcio têm se destacado entre as biocerâmicas, sendo mundialmente utilizadas para reparar e aumentar o tecido ósseo. Possuem propriedades de superfície que suportam a proliferação e adesão de osteoblastos, além de não apresentarem respostas a corpo estranho ou inflamações, ausência de toxicidade local e sistêmica, e aparente habilidade em associar-se ao tecido hospedeiro (ALBREKTSSON *et al.*, 2001; LONG, 2008; SAMAVEDI *et al.*, 2013). Estas características positivas podem ser explicadas pela natureza química desses materiais. Para estes tipos de cerâmicas os íons de cálcio e fosfato não interferem na função celular e fisiológica dos tecidos adjacentes, acarretando uma favorável resposta tecidual ao tratamento. Dentro de certos limites, a liberação destes íons pode participar como estimuladores da regeneração óssea e da reprecipitação de uma camada de osso neoformado (LEGEROS, 2002).

Os fosfatos de cálcio estão sendo investigados para utilização nos sistemas de liberação de fármacos. Alguns estudos com experimentos em animais mostram que estes sistemas suportados em biocerâmicas são promissores para o controle de infecções ósseas (OGAWA; PLEPIS, 2002; NITHYA E MEENAKSHI SUNDARAM, 2015).

### **2.1.1 Hidroxiapatita**

A Hidroxiapatita é mundialmente utilizada para regeneração óssea por ser um constituinte mineral natural encontrado no osso, representando de 30 a 70% da massa dos ossos e dentes. Sua fórmula estequiométrica é  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , com razão Ca/P geralmente igual a 1,67. Entre as CPCs é a mais estável e o menos solúvel (FULMER *et al.*, 1992; KAWACHI *et al.*, 2000, SAMEVEDI *et al.*, 2013). Segundo Keller & Hibst (1990), uma temperatura de  $700^\circ\text{C}$  é suficiente para provocar a fusão da hidroxiapatita. A seguir, será demonstrada a rede cristalina da hidroxiapatita (Figura 2.1).



**Figura 2. 1** - Rede Cristalina da hidroxiapatita. Fonte: ALMQVIST *et al.* 1999.

Os monocristais naturais de HAp geralmente exibem uma conformação hexagonal. Sua estrutura permite substituições catiônicas e aniônicas isomorfas com grande facilidade. O cálcio pode ser substituído por metais tais como o  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ , etc., os grupos fosfatos por carbonatos e vanadatos e as hidroxilas por carbonatos, flúor e cloro. Essas substituições acarretam um aumento de defeitos estruturais e distorções na rede que provocam alterações de propriedades como solubilidade, reatividade térmica e estabilidade podendo ainda, alterar a cristalinidade, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais e a textura superficial da estrutura da hidroxiapatita (COSTA *et al.*, 2009; MAVROPOULOS, 1999; MARTIN; BROWN, 1997).

A semelhança estrutural da hidroxiapatita sintética com a apatita óssea mineral somada a suas propriedades de biocompatibilidade e osteointegração permite contato e adaptação quando implantada ao tecido ósseo, tornando-a substituta do osso humano em implantes e próteses (TEXEIRA, 2009; EANES, 1980). Também apresentam importante propriedade de osteocondução e são capazes de promover uma interação direta com o tecido ósseo, podendo ser classificado como bioativo (SCHWENGBER, 2009).

Nos estudos que utilizam arcabouços constituídos por HAp para regeneração óssea tem-se observado que a presença dela pode facilitar a adsorção específica de proteínas séricas que ajudam a regular a adesão e proliferação das células, a dissolução gradual das partículas HAp constituídas por íons de cálcio e fosfato podem ajudar a regular o comportamento das células vizinhas, servem como fonte de fosfato inorgânico para aumentar a mineralização das células ósseas e a quantidade de partículas de HAp incorporada deve influenciar a deposição de apatita sobre a superfície das células (CHUENJITKUNTAWORN, *et al.*, 2010).

Vários estudos têm demonstrado o potencial osteoindutivo dos materiais cerâmicos à base de fosfato de cálcio (RIPAMONTI, 1996; ZHANG *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2011). Dentre as biocerâmicas que tem demonstrado osteoindução intrínseca, destaca-se, a HAp, fosfato de cálcio bifásico poroso (BCP), o TCP. Yang *et al.* (2011) desenvolveu um estudo para investigar osteoindução em rato com a utilização de dois tipos de materiais biocerâmica: HAp e  $\beta$ -TCP. Para confirmar a neoformação óssea nos locais ectópicos no músculo dos ratos, foram utilizadas a coloração Imuno-histoquímica (IHQ) e a coloração vermelho de Alizarina S (um quelante marcador de fluorescência para o cálcio), onde se observou que HAp e  $\beta$ -TCP podem induzir a formação de osso no modelo de ratos.

Entretanto, a HAp apresenta fragilidade e baixa resistência, característica das cerâmicas. Segundo Blackwood *et al.* (2012), estes produtos cerâmicos, encontrados na natureza, se quebram facilmente quando utilizados sozinhos pois lhe faltam robustez estrutural. Tendo em vista que, quando implantada no tecido ósseo, está sujeita a tensões mecânicas inerentes à própria dinâmica da região, para serem utilizadas efetivamente nos compartimentos sujeitos a carga, suas propriedades mecânicas devem ser melhoradas (KIM *et al.*, 2004). Outro fator limitante para utilização clínica da hidroxiapatita é sua lenta biodegradação. Estudos realizados têm demonstrado que ela começa ser reabsorvida gradualmente após 4 a 5 anos de implante. Para alguns tipos de implantes, um biomaterial necessita ser reabsorvível, pois os processos de degradação deverão ser concomitantes com a reposição do osso em formação (KAWACHI *et al.*, 2000).

Desta forma, a relação entre as velocidades de neoformação óssea e de absorção do biomaterial é de grande importância na obtenção do substituto ósseo ideal e alguns fatores que interferem na velocidade de degradação é a porosidade, cristalinidade, tamanho e forma das partículas (SCHWENGBER, 2009).

A HAp encontra-se disponível no mercado em forma de blocos ou partículas, densos ou porosos. Estas diversas formas já foram estudadas com relação às suas propriedades, sendo observada que as formas densas demonstraram degradação mais lenta, ao decorrer do tempo. Pequenas variações na geometria e propriedades físico-químicas podem causar também significantes mudanças na resposta biológica. Em um estudo realizado por TAMPIERE *et al.* (2001), pode-se observar que alterações no tamanho dos poros permitem a HAp uma forte adesão ao osso contribuindo para uma interligação mecânica que resulta numa firme fixação do material com o tecido ósseo.

## 2.2 POLÍMEROS

Os polímeros são moléculas grandes caracterizadas pela múltipla repetição de um ou mais tipo de átomos ou grupos de átomos ligados entre si, ao longo de sua cadeia. Na área de saúde, a grande maioria dos materiais utilizados para a confecção de dispositivos biomédicos são polímeros (PARK; BRONZINO, 2002).

Estes podem ser classificados de acordo com sua origem (naturais ou sintéticos), natureza química (poliésteres, poliamidas, polianidros, etc.), composição dos monômeros (homopolímero, copolímero ou blendas), estabilidade molecular (degradável ou não degradável), solubilidade em água (hidrofílico ou hidrofóbico) e arquitetura molecular (linear, ramificada, estrelada, grafitizada, dendrímica). Todas essas características irão influenciar no desempenho dos dispositivos poliméricos.

Os polímeros biodegradáveis sofrem ataques por elementos biológicos que agredem sua integridade estrutural acarretando a formação de fragmentos ou subprodutos de degradação que podem ser removidos do sítio de ação, mas não do organismo. Já os polímeros biorreabsorvíveis caracterizam-se pela degradação resultante da redução de tamanho e são reabsorvidos *in vivo* (VERT, *et al.*, 1992; BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2006).

Segundo SANTOS *et al.*, (2007), os biorreabsorvíveis são eliminados por rotas metabólicas do organismo, com eliminação total do material e dos subprodutos de degradação (compostos de baixa massa molar) sem efeitos colaterais residuais.

Muitos polímeros biodegradáveis e não citotóxicos estão sendo cada vez mais aceitos para fabricação de dispositivos médicos, direcionados para várias aplicações, como dispositivos na forma de mini placas e parafusos para fixação de fraturas (em substituição aos tradicionais implantes metálicos), suturas cirúrgicas, dispositivos empregados na liberação controlada de fármacos, dispositivos ortopédicos e arcabouços na engenharia de tecidos (JAIN, 2000; BARBANTI *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2011).

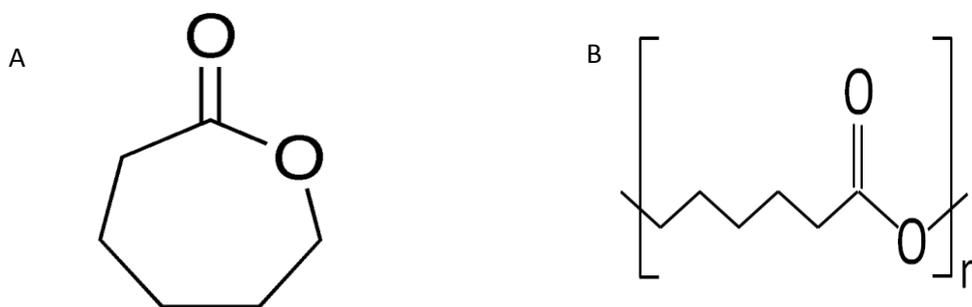
Na engenharia dos tecidos ósseos o interesse no desenvolvimento de matriz de polímeros biodegradáveis sintéticos têm crescido intensamente durante as duas últimas décadas (WANG *et al.*, 2011; BLACKWOOD *et al.*, 2012; MOEINI *et al.*, 2017). Dentre as vantagens para utilização dos polímeros, destaca-se a sua adaptabilidade a um grande número de conformações estruturais (variações dos constituintes dos monômeros, em diferentes razões, controle das condições de polimerização e introdução de vários grupos funcionais) e baixa associação à resposta imune (BLACKWOOD *et al.*, 2012; SWETHA *et al.*, 2010).

Devido à sua natureza, estes materiais têm sido cada vez mais aceitos, para substituição aos tradicionais implantes metálicos (WANG, *et al.*, 2011). Esses materiais apresentam inúmeras vantagens frente aos dispositivos metálicos, em especial o fato de degradarem no organismo, de forma gradual não necessitando de remoção cirúrgica após a aplicação pretendida. Esse processo ocorre de forma biocompatível, ou seja, sem promover respostas inadequadas ao organismo, e assim, pode contornar alguns dos problemas relacionados com a segurança, a longo prazo, dos dispositivos não degradáveis. Outro fator relevante é a tensão que o metal impõe ao osso neoformado, tendo como resultado um osso mais propício a sofrer novamente uma fratura ( KATTI *et al.*, 2002; MINATA, *et al.*, 2013).

Os principais polímeros utilizados com a finalidade de reparo do tecido ósseo são o ácido poliglicólico (PGA), ácido polilático (PLA), ácido polihidroxibutirato (PHB) e a policaprolactona (PCL) (ABUKAWA *et al.*, 2006; OH *et al.*, 2006; PRECHEUR, 2007).

### 2.2.1 Poli ( $\epsilon$ -Caprolactona)

O PCL é obtido através da polimerização do monômero  $\epsilon$ -caprolactona por abertura do seu anel cíclico, apresentando fórmula molecular  $(C_6H_{10}O_2)_n$  (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010). As fórmulas estruturais da  $\epsilon$ -caprolactona, poli-( $\epsilon$ -caprolactona), podem ser visualizadas na Figura 2.2.



**Figura 2. 2** - Fórmulas estruturais de  $\epsilon$ -caprolactona (A), Poli-( $\epsilon$ -caprolactona) (B).

O PCL é um poliéster alifático com caráter hidrofóbico, resultante da presença de grupos metilênicos não polares e um único grupo éster relativamente polar em cada unidade que se repete. Tem alta permeabilidade, baixo ponto de fusão ( $60^{\circ}C$ ) e estabilidade ao calor. É um polímero muito dúctil e apresenta baixa rigidez, com um módulo de elasticidade em torno

0,21- 0,44 GPa (DE QUEIROZ *et al.*, 2002; DE ALMEIDA & DE QUEIROZ, 2003; DE ALMEIDA & DE QUEIROZ *et al.*, 2004).

Este polímero dissolve bem em solventes orgânicos comuns (CHUENJITKUNTAWORN *et al.*, 2010). Sendo solúvel também em clorofórmio, diclorometano, benzeno, tolueno, ciclohexanona e 2-nitropropano a temperatura ambiente. Tem baixa solubilidade em acetona, 2-butanona, acetato de etila, dimetilformamida, acetonitrila e insolúvel em álcool, éter de petróleo e éter etílico (COULEMBIER, 2006).

O PCL é considerado um polímero semicristalino, apresentando cristalinidade entre 40-60%. Este parâmetro é um fator importante na degradação dos poliésteres alifáticos, pois vários estudos relatam que a lenta taxa de degradação *in vivo* do PCL (2 a 4 anos) está relacionado com sua cristalinidade, hidrofobicidade e peso molecular (ZHAO *et al.*, 2008; SAHOO *et al.*, 2010 a; WOODRUFF E HUTMACHER 2010; DASH; KONKIMALLA, 2012).

Desde a década passada, a investigação sobre este polímero tem aumentado devido à sua versatilidade, revelando-se promissor para aplicações médicas, como: suturas, vasos sanguíneos artificiais, dispositivos de liberação controlada de fármacos, substitutos ósseos e revestimento de feridas (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010; SAHOO *et al.*, 2010 a).

As pesquisas com o PCL iniciaram na área de biomateriais juntamente com a área de engenharia dos tecidos entre 1990 e 2000 (WOODRUFF e HUTMACHER, 2010). Devido à sua natural biocompatibilidade, biodegradabilidade e gradual reabsorção após implantação, o PCL tem sido extensivamente estudado para liberação controlada de fármacos e engenharia dos tecidos, com aprovação dos EUA e do Food and Drug Administration (FDA), com aplicações em vários tipos de formulações e para indicações craniofaciais (DASH; KONKIMALLA, 2012; PUGA *et al.*, 2012; SAHOO *et al.*, 2010b, CHUENJITKUNTAWORN *et al.*, 2010; GURLEK *et al.*, 2017; LUO *et al.*, 2016; HOU *et al.*, 2016).

O PCL destaca-se por sua aplicação como matriz para o crescimento celular, por possuir propriedades mecânicas fundamentais que servem como um arcabouço em enxertos aloplásticos, onde as propriedades mecânicas devem ser mantidas até que o processo de regeneração do tecido biológico se complete (OYANE *et al.*, 2005; BAYRAK, 2016). Este polímero possui flexíveis propriedades mecânicas (módulo de elasticidade, resistência à tração, alongamento) tornando-o adequado para diversas aplicações médicas (DASH; KONKIMALLA, 2012). Neste sentido, segundo Bayrak *et al.* (2016), a extensiva utilização dos arcabouços/enxertos fabricados de PCL refere-se a sua força e elasticidade podendo

fornecer suporte a longo prazo para tecidos moles e servir de substrato para o crescimento e remodelação dos mesmos.

Estudo realizado para avaliar a biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* das matrizes puras de PCL, associadas com hidroxiapatita (PCL/HAp) e com o antibiótico vancomicina (VC) (PCL/HA/VC) para obter protótipos implantáveis, demonstrou, a partir dos resultados histológicos, que o compósito PCL/HAp facilitou a osteocondução a partir de 30 dias do implante, proporcionando estrutura para deposição do tecido ósseo recém-formado. Esta característica manteve-se ao longo dos períodos de 60 e 90 dias pós-implante. Os dados indicaram o potencial do PCL como biomaterial para a aplicação na engenharia de tecidos, assim como para a obtenção de dispositivos implantáveis, capazes de melhorar a osteointegração (DA SILVA, 2011).

Nithya e Meenakshi Sundaram (2015) estudaram um composto orgânico-inorgânico com base em HAp e PCL que apresentou formas adequadas para preenchimento de defeitos ósseos. Além disso, os testes *in vitro* revelaram que o arcabouço processado tinha potencial para uso em sistemas de administração de medicamentos e os estudos de biodegradação e citotoxicidade demonstraram que o nanocompósito HAp-PCL associado com ciprofloxacina seria adequado para implantes ósseos sustentáveis, pois tiveram boa interação com o tecido natural e as células. A degradação do polímero ajudou na liberação do fármaco e na prevenção de um segundo procedimento cirúrgico.

O PCL apresenta atoxicidade natural e compatibilidade com vários tecidos do corpo torna-o um material ideal para ser utilizado na engenharia dos tecidos (DASH; KONKIMALLA, 2012). Uma pesquisa desenvolvida para determinação da biocompatibilidade e toxicidade de matrizes de PCL/HAp *in vitro* (através dos ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade, imunotoxicidade e hemocompatibilidade) e *in vivo* em ratos constatou que as matrizes, em ambos os modelos experimentais, mostraram-se isentas de toxicidade (DA SILVA, 2011).

Embora o PCL esteja sendo amplamente utilizado como matriz polimérica, suas aplicações são frequentemente limitadas por vários inconvenientes, incluindo a limitada atividade biorregulatória, hidrofobia e lenta taxa de degradação (SAHOO *et al.*, 2010b). Uma solução para estes problemas é que o PCL possui grande vantagem de formar blendas com outros polímeros permitindo alterações de suas propriedades físico-químicas (CALIL *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2003), que resultam no aumentando de sua hidrofiliabilidade e sua taxa de degradação.

O PCL de alto peso molecular tem apresentado problemas significativos quanto ao processo de reabsorção. Estudos sobre a degradação *in vivo* do PCL relatam que dependendo da massa molecular do dispositivo ou implante, a degradação total ocorre em um período de 1 a 3 anos (SJ; BJ, 1992; KIM et al., 2004).

Considerando que, a cinética de degradação é altamente dependente do peso molecular do(s) polímero(s), a modulação do peso molecular do PCL oferece algumas vantagens para o desenvolvimento de arcabouços na engenharia tecidual. Recentemente, o grupo de pesquisa da UNIFEI que estuda os polímeros bioativos e biomiméticos desenvolveu procedimentos de síntese do polímero PCL de baixo peso molecular (BPM-PCL) cuja cinética de biorreabsorção é muito mais elevada que os PCL's comerciais, além de possuir rotas de sínteses mais brandas e um menor custo de produção (De QUEIROZ, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2003; DE ALMEIDA; DE QUEIROZ *et al.*, 2004).

Diante do exposto, foi decidido realizar a produção de blendas de PCL a partir do PCL de elevado peso molecular e o BPM-PCL com o objetivo específico de melhorar sua biodegradabilidade no processo de regeneração óssea.

Segundo Blackwood *et al.*, (2012), os poliésteres, como o PCL, não possuem nenhuma capacidade osteoindutoras para torná-los adequados para a substituição óssea. Atualmente, os materiais mais comumente utilizados para promover a osteoindução são baseados na HAp e TCP, mas estes materiais são bastante quebradiços quando utilizados sozinhos. Diante disto, compósitos, constituídos por uma fase de suporte estrutural e por uma segunda fase que promova a infiltração e diferenciação celular oferecem um potencial para facilitar a cura mais rápida do defeito.

Neste sentido, novos estudos têm sido realizados com objetivo de solucionar as desvantagens das cerâmicas e polímeros, e de desenvolver biomateriais sintéticos híbridos ou compósitos, que possuam as vantagens de ambas, porém com melhores taxas de reabsorção após a implantação e melhor resistência mecânica (WAN; NACAMULI; LONGAKER, 2006).

Neste contexto, para aliar as propriedades de osteocondutividade e osteoindutividade, bioatividade, reabsorção e suporte estrutural, a HAp e a PCL têm sido combinados para a obtenção de compósitos de PCL/HAp. A compatibilidade do PCL com a HAp tem sido relatada (KIM *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2009; DA SILVA, 2011; DASH; KONKIMALLA, 2012; BAYRAK, 2016; NITHYA E MEENAKSHI SUNDARAM, 2015; RONCA, *et al.* 2016; MOEINI *et al.*, 2017).

Moeini *et al.* (2017) estudaram nanocompósitos PCL contendo HAp preparados por técnicas solvothermal *in situ*. Os ensaios celulares *in vitro* sugeriram que os arcabouços de HAp / PCL não eram tóxicos para célula de osteossarcoma humano. Portanto, os arcabouços preparados poderiam ser promissores para a regeneração óssea sem carga por causa de suas boas propriedades mecânicas e capacidade de promover o crescimento da apatita.

## CAPÍTULO II - CLORIDRATO DE TETRACICLINA

As TCH são antibióticos de largo espectros que afetam organismos anaeróbicos e facultativos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e micoplasmas, por sua potente atividade bacteriostática (PATARO *et al.*, 2003). Na Figura 2.3 encontra-se demonstrada a estrutura química do cloridrato de tetraciclina.

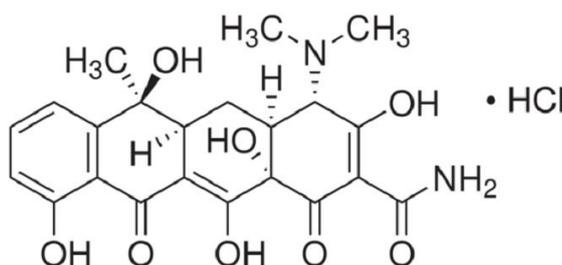


Figura 2. 3 - Estrutura química do cloridrato de tetraciclina.

A TCH atuam pela inibição da síntese proteica, bloqueando a ligação do aminoacil tRNA ao complexo ribossômico mRNA. Esta ligação reversível ocorre principalmente na subunidade ribossômica 30S dos microrganismos sensíveis, impedindo a replicação e levando a morte celular (RANG; DALE, 2007).

A TCH compõe a Lista dos Medicamentos Essenciais da Organização Mundial de Saúde, uma das relações de medicamentos mais importantes, necessárias em um sistema de saúde de base. (Disponível em: [http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML\\_2017\\_ExecutiveSummary.pdf](http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML_2017_ExecutiveSummary.pdf)).

As tetraciclina são bastante eficazes no tratamento de infecções ósseas e exercem um efeito direto no microambiente ósseo que apresenta um efeito benéfico nos processos de regeneração tecidual (COELHO *et al.*, 2008).

Tais fármacos também possuem propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras, uma vez que reduzem a atividade fagocitária dos leucócitos polimorfonucleares e a quimiotaxia de neutrófilos e leucócitos. Apresentam, ainda, ação antilipase e inibem diretamente as enzimas colagenolíticas, favorecendo o reparo do tecido conjuntivo, e conseqüentemente, a inibição de reabsorção de osso. Possui uma habilidade para promover a adsorção de fibroblastos e tecido conectivo em superfícies radiculares e ainda atuam como promotores da proliferação de células osteoblásticas. Desta forma, a tetraciclina apresenta

propriedades farmacológicas e biológicas favoráveis para a reconstrução óssea (GOLUB *et al.*, 1991; DELAISSÉ *et al.*, 2000; PATARO *et al.*, 2003; COELHO *et al.*, 2008).

Coelho *et al.* (2008) observaram que os dados obtidos em seu estudo sugerem que a exposição de células de medula óssea humana, cultivadas em condições que favorecem o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico, a uma concentração de 1 µg.ml<sup>-1</sup> quer de doxiciclina, quer de minociclina (ambas pertencentes ao grupo das TCH) resultou num aumento da proliferação celular durante a fase exponencial, que foi acompanhado pela expressão das funções osteoblásticas (elevada atividade da fosfatase alcalina e formação de depósitos de fosfato de cálcio). Estes resultados sugerem que, para além das suas propriedades antimicrobianas e anticolagenolíticas, estes dois antibióticos, quando utilizados em baixas concentrações, atuam como promotores da proliferação das células osteoblásticas.

Com seu uso como antibiótico em humanos, a absorção ocorre por via oral, variando entre 75 e 77% da dose ingerida e, sua distribuição ocorre facilmente pela maioria dos líquidos do organismo, inclusive bile e líquido sinovial, ascítico e pleural. Apresenta, ainda, tendência a localizar-se nos ossos, fígado, baço, tumores e dentes (MOREJON *et al.*, 2003). As formas de pomada tópica são utilizadas para tratar infecções bacterianas da pele e do osso.

A meia-vida normal da TCH é de 6 a 11 horas, sendo que as concentrações terapêuticas, que consistem nas concentrações entre as geradoras de efeito mínimo eficaz (limite mínimo) e efeito máximo tolerado (efeito tóxico), podem ser alcançadas após 2 a 3 dias. Sua excreção ocorre de forma inalterada e se faz primordialmente pela urina, razão pela qual se recomenda atenção ao estado da função renal do paciente. A eliminação também pode ocorrer por via fecal e pelo leite materno (WANNMACHER, 1999; MOREJON *et al.*, 2003).

Adicionalmente, a tetraciclina pode servir como marcador para microscopia. Ela se deposita com grande afinidade sobre a matriz óssea recém-formada e por ser fluorescente, possibilita a realização de uma técnica para avaliar a velocidade de formação óssea, um parâmetro importante para o estudo do crescimento ósseo e para diagnóstico de certas doenças neste tecido (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; PAUTKE *et al.*, 2010).

Em um estudo realizado por Köse *et al.* (2003), detectaram a mineralização produzida por osteoblastos através de imagens produzidas por microscopia confocal. As partes mineralizadas da matriz óssea foram fluorescentemente identificadas pela incubação de uma cultura de osteoblastos por 24 horas em uma solução de 3 mg/ml de TCH (KÖSE *et al.*, 2003).

Em virtude da grande quantidade de grupos funcionais doadores elétricos presentes na molécula de tetraciclina, em sua parte inferior (Figura 2.3), elas em solução formam, com

grande facilidade, complexos metálicos. Com o  $\text{Ca}^{++}$ , liga-se de forma estável (quelatos), que podem, de um lado, prejudicar a coagulação sanguínea e, de outro, induzir alterações ósseas e do esmalte dentário em fase de desenvolvimento (FOYE, 1995). Segundo Horbylon (2008), a união da TCH com o cálcio encontrado no tecido ósseo parece ser reversível, ou seja, ela tem a capacidade de ser liberada lentamente, exercendo sua atividade antimicrobiana.

Dentre as doenças que podem ser tratadas com TCH, a osteomielite refere-se a uma infecção óssea, geralmente, decorrente de complicações de fraturas, e causada por bactérias, que, ao longo do tempo, pode resultar na destruição do próprio osso (NITHYA E MEENAKSHI SUNDARAM, 2015). Yenice *et al.* (2002) e Venkatasubbu *et al.* (2011), relataram que implantes biodegradáveis, carregados de antibiótico para uso potencial no tratamento localizado de infecções do osso, podem ser utilizados. Nestes casos, são necessárias altas concentrações locais de antibióticos, durante cinco semanas a vários meses. Assim, a liberação local de fármacos seria vantajosa reduzindo as possibilidades de reações sistêmicas, que podem ocorrer devido à alta dosagem destes fármacos.

WOO *et al.* (2000), ressalta ainda, que a introdução do agente antimicrobiano no dispositivo médico é bastante benéfica, pois além de fornecer altas concentrações locais de antibiótico, aumenta a chance das bactérias ao redor do implante serem mortas antes de formar biofilmes. Em um estudo realizado por Pataro *et al.* (2003), onde se avaliou a atividade biológica de compósitos de polímeros biodegradáveis em uma matriz de biocerâmica com adição de TCH, foi constatado que a sua adição influenciou favoravelmente a resposta biológica dos materiais.

O aprisionamento de fármacos em matrizes biodegradáveis são sistemas comuns de liberação controlada. A dissolução da matriz é afetada por hidrólise ou ação enzimática. Se apenas a biodegradação da matriz dirigir a liberação do fármaco, uma taxa constante de liberação pode ser obtida, de modo que a área superficial do dispositivo mantenha-se constante. Contudo, esse fato dificilmente ocorre. Na realidade, se o fármaco for hidrofílico pode difundir através da matriz, por apresentar grande força de difusão (WONG; MOONEY, 1997), o que poderia ocorrer com a TCH. A liberação controlada de cloridrato de TCH pode beneficiar a regeneração mais rápida dos osteoblastos, fibroblastos e outros tipos de células (KARUPPUSWAMY *et al.*, 2015).

Dentre os antibióticos mais comumente utilizados na engenharia de tecidos ósseos destacam-se as TCH. De fato, ela é uma importante ferramenta para a análise histológica para avaliar a remodelação óssea *in vivo*, pois são os únicos fluorocromos aprovados para aplicação em seres humanos (PAUTKE *et al.*, 2010).

Karuppuswamy *et al.* (2015) em seu estudo, constatou que o PCL carregado com TCH mostrou potencial promissor como substrato para aplicação nos sistemas de liberação de drogas em biomedicina e cuidados de saúde.

## CAPÍTULO III – BIODEGRADAÇÃO

A princípio o processo de biodegradação do PCL foi investigado para o desenvolvimento de embalagens plásticas biodegradáveis. Alguns anos mais tarde, o estudo foi direcionado para o desenvolvimento de implantes biorreabsorvíveis, direcionados para utilização nos sistemas de liberação controlada de fármacos (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

Um dos principais requisitos para escolha de um biomaterial sintético que será utilizado no reparo ósseo é a biodegradabilidade (RHEE, 2004). Os implantes que atuam como prótese permanente ou no processo de regeneração celular precisam dar espaço ao novo tecido que será regenerado, desta forma, eles precisam degradar no meio em que estão implantados (DA SILVA, 2012).

A biodegradabilidade consiste no fenômeno em que o material é degradado ou solubilizado em fluidos tissulares, desaparecendo do sítio a qual foi implantado. O ideal é que o tempo de degradação do material permita a ocorrência do processo de regeneração ou cura do sítio comprometido e que seu processo de degradação gere produtos atóxicos que sejam facilmente metabolizados e liberados do corpo (OLIVEIRA, 2010).

Outro fator a ser considerado são as propriedades mecânicas da área implantada, estas devem ser mantidas, ou seja, a degradação do material deve ocorrer em um ritmo no qual seja possível que a regeneração óssea possa formar um tecido com as propriedades mecânicas mais próximas do tecido original. Qualquer variação dessas propriedades resultantes da degradação *in vivo* do material deve ser compatível ao processo de restabelecimento do sítio de implantação (OLIVEIRA, 2010; RHEE, 2004).

O Processo de biodegradação associada ao grau de erosão é geralmente estimado a partir da medição de perda de massa (VIEIRA, *et al.*, 2011). A percentagem de perda de massa pode ser calculada de acordo com a equação 01.

$$\% \text{ Massa perdida} = \frac{(M_i - M_t)}{M_i} \times 100 \quad (\text{Equação 01})$$

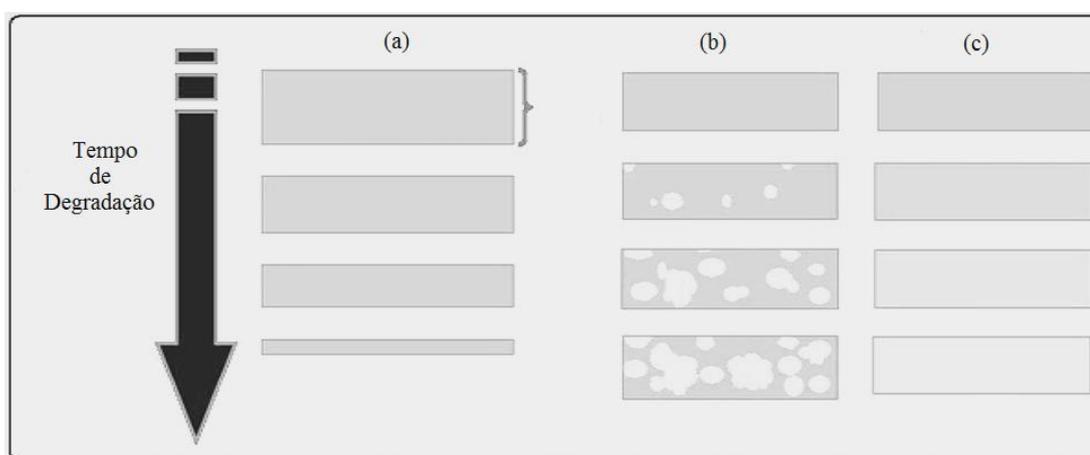
Onde:  $M_i$  é a massa no início dos experimentos (mg) e o  $M_t$  massa final para cada tempo (mg).

## 1.0 MECANISMOS DA BIODEGRADAÇÃO

Biomateriais podem ser classificados em polímeros degradáveis hidroliticamente e enzimaticamente (NAIR; LAURENCIN, 2007), de acordo com o mecanismo de clivagem das ligações covalentes. Ambos os mecanismos levam à erosão dos polímeros (KATTI *et al.*, 2002). Degradação se refere à quebra da ligação entre os monômeros e oligômeros, onde cada cadeia do polímero é clivada em frações e erosão se refere ao fenômeno físico de dissolução e difusão das frações de menor peso molecular da matriz polimérica no meio (SUN *et al.*, 2006).

A maior parte dos compostos poliméricos naturais, tais como o colágeno ou quitosana, são submetidos à degradação enzimática e sua taxa de degradação varia, significativamente, com o local do implante e entre hospedeiros, dependendo da concentração da enzima no local. As enzimas são moléculas grandes incapazes de difundir para as regiões cristalinas. Assim, eles promovem erosão de superfície. Contudo, para a maioria dos materiais biodegradáveis, especialmente polímeros sintéticos, a hidrólise passiva é o mecanismo mais importante de degradação (VIEIRA *et al.*, 2011).

O processo de erosão que acontece a partir do fenômeno de hidrólise pode se apresentar de três formas distintas e estão representados na figura 2.4.



**Figura 2. 4** - Ilustração esquemática dos três tipos do fenômeno de erosão: a) Erosão de superfície, (b) Erosão em massa com autocatálise, c) Erosão em massa sem autocatálise. Fonte: (VIEIRA *et al.*, 2011)

O primeiro é a erosão heterogênea ou erosão de superfície (Fig. 2.4 (a)), em que a hidrólise ocorre na região perto da superfície, e à medida que a superfície é erodida e removida, a hidrólise progride para o núcleo do material. Isso ocorre quando a taxa de cisão hidrolítica da cadeia e produção de oligômeros e monômeros, que se difundem para o ambiente, é mais rápida do que a taxa de penetração de água no polímero completo.

Também pode ser observada a erosão em massa autocatalítica, demonstrada na Fig. 2.4 (b), onde são observadas estruturas ocas formadas em consequência da retenção de produtos no interior do material, como ácidos carboxílicos, que provocam uma redução local no pH e, por conseguinte, acelera a degradação (GOPFERICH, 1996). Outro tipo é a erosão em massa homogênea ou sem autocatálise (Fig.2.4 (c)), em que a hidrólise ocorre simultaneamente em todo material. Neste caso, a difusão é considerada como ocorrendo instantaneamente. Assim, a diminuição do peso molecular, a redução das propriedades mecânicas, e a perda de massa também ocorrem simultaneamente em toda a amostra (LAM *et al.*, 2008; VIEIRA *et al.*, 2011).

Atualmente, tem sido relatado que a degradação de poliésteres alifáticos pode ocorrer via três mecanismos: hidrólise química, por agentes biológicos (enzimas) e degradação térmica. O PCL está sujeito à biodegradação devido à susceptibilidade de suas ligações éster alifático à hidrólise. A degradação hidrolítica de poliésteres semicristalinos ocorre em dois estágios (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010): O primeiro estágio inicia com a difusão de água para dentro do arcabouço nas regiões amorfas que são menos organizadas e permitem a difusão de água de forma mais fácil. O segundo estágio começa quando a maioria das regiões amorfas está degradada e o ataque hidrolítico procede da borda para o centro dos domínios cristalinos.

A fragmentação interna produz frações com comprimentos dependentes do peso molecular inicial do polímero. A perda de peso, a partir da formulação, inicia quando o comprimento dos fragmentos de PCL produzidos torna-se pequeno o suficiente para ser difundido através da matriz polimérica para o meio. Este processo de perda de massa inicia-se num estágio mais tarde (4-6 meses) da degradação do PCL (DASH; KONKIMALLA, 2012).

Estudos conduzidos em animais indicam que na degradação *in vivo* há evidências de uma menor participação de enzimas, onde a degradação do PCL ocorre de forma mais lenta, sendo possível a observação de duas etapas: A primeira, por volta dos seis meses, está relacionada com a hidrólise espontânea das ligações ésteres catalisada pelos grupos carboxílicos terminais da cadeia polimérica. Nessa etapa, a massa molecular do polímero vai reduzindo, mas não ocorre perda de massa do implante, uma vez que a hidrólise ocorre em toda a extensão da cadeia polimérica gerando fragmentos ainda insolúveis em meio aquoso. A segunda etapa, com duração de cerca de três meses, inicia quando a massa molecular do polímero se reduz mais intensamente. Nessa etapa, iniciam-se a perda de massa do implante, pela produção de oligômeros menores, solúveis em meio aquoso, ocorre o processo de erosão,

que fragiliza o implante e causa a perda da resistência mecânica e sua fragmentação (PITT *et al*, 1981; SUN *et al*, 2006).

Tem sido relatado que o PCL é um poliéster hidrofóbico que se degrada lentamente, com um tempo de degradação variando de 2 a 4 anos (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010). No estudo realizado por Seyednejad *et al* (2012) não foi observada degradação de PCL após três meses de implantação *in vivo*. De acordo com os autores, o fato pode ser atribuído à concentração das enzimas que degradam o PCL, presentes no indivíduo, que é muito baixo para ser eficaz. Em conformidade com esta pesquisa, Lam *et al*. (2009) também mostrou que até 6 meses, os mecanismos celulares (por exemplo, degradação enzimática) não desempenham um papel na degradação dos arcabouços de PCL.

Para poliésteres alifáticos, as taxas de hidrólise são afetadas pela temperatura, estrutura molecular, densidade dos grupos ésteres e estímulo mecânico. O grau de cristalinidade pode ser um fator adicional de grande importância. A cristalinidade pode ser definida como “arranjo ordenado e uma repetição regular de estruturas atômicas ou moleculares no espaço”, uma vez que os domínios cristalinos são menos permeáveis à penetração de água, o processo de hidrólise será retardado. O pH do meio aquoso também afeta as taxas de reação de degradação (KIRBY, 1972). Para os ensaios realizados *in vivo* o pH e a temperatura serão mantidos nos valores homeostáticos (VIEIRA *et al.*, 2011).

Desta forma, percebe-se que a biodegradação de formulação polimérica é dependente da natureza da estrutura polimérica, da hidrofobicidade, cristalinidade, tamanho da cadeia, presença ou ausência de enzima e dos parâmetros do produto, tais como, tamanho de partícula, área superficial, porosidade, processo de fabricação e a geometria (DASH; KONKIMALLA, 2012).

Após a fragmentação do implante, a degradação e biorreabsorção do PCL prosseguem por meio da fagocitose dos fragmentos, principalmente pelos macrófagos e células polimorfonucleares. Uma vez dentro dos fagossomos as partículas podem ser hidrolisadas pelas enzimas presentes no local (WOODWARD, 1985).

Os produtos gerados são metabolizados através do ciclo do ácido tricarbóxico (TCA) ou eliminados diretamente pela secreção renal e fezes, sem acúmulo nos principais órgãos do corpo (SUN *et al*, 2006; MATSUI, 2007).

## **CAPÍTULO IV- BIOCMPATIBILIDADE**

Diante da crescente descoberta de novos biomateriais, o desenvolvimento de metodologias, para garantir sua eficácia e segurança, tem encontrado grande destaque nas pesquisas científicas. Em se tratando de biomateriais, é imprescindível garantir que estes sejam biocompatíveis.

Biocompatibilidade é geralmente definida como a capacidade de um biomaterial de desempenhar uma função específica sem provocar quaisquer efeitos locais ou sistêmicos indesejáveis ao destinatário. Contudo, é importante resaltar que a resposta de um material específico pode variar de um sítio de aplicação para outro, estando a biocompatibilidade não apenas relacionada com as características do material, mas também com a situação na qual um material é usado (WILLIAMS, 2008).

A chave para o entendimento da biocompatibilidade consiste na determinação de quais mecanismos (químicos, bioquímicos, fisiológicos, físicos, dentre outros) estão atuando e por que estão atuando, sob condições associadas altamente específicas entre o contato do biomateriais e os tecidos do corpo, e também, determinar quais as consequências destas interações (WILLIAMS, 2008).

### **1.0 RESPOSTAS DO TECIDO AO BIOMATERIAL**

A resposta do tecido aos biomateriais depende de uma variedade de fatores, incluindo as propriedades físico-químicas do implante, a reatividade (bioativo ou inerte), a superfície, biodegradabilidade, biorreabsorção, assim como a duração e local de implantação (BURUGAPALLI K, PANDIT, 2007).

O implante desses materiais promove uma resposta inflamatória que esta envolvida no processo de cicatrização. Esta fase caracteriza-se, de início, por fenômenos de natureza vascular, com congestão, hiperemia e saída de células dos vasos sanguíneos íntegros, situados ao redor da lesão. Os primeiros elementos celulares a se localizarem na área são os neutrófilos polimorfonucleares e, a seguir, elementos mononucleares, linfócitos e monócitos (ANDERSON, 1988; KUMAR *et al.*, 2010).

A resposta inflamatória ocorre em todos os tecidos vascularizados após uma injúria de qualquer que seja sua natureza. Por volta do terceiro dia, caso não haja infecção e as condições do meio resultarem ideais, inicia-se o processo reparação propriamente dito. Neste processo, as células mais frequentes são mononucleares, principalmente monócitos, que se

transformarão em macrófagos, cuja função será remover os restos estranhos que por ventura possam permanecer no local da lesão. Caso haja materiais estranhos sem possibilidade de serem eliminados, os macrófagos darão origem às chamadas células gigantes de corpo estranho, capazes de fagocitar os restos que aí permanecerem. Este tipo de resposta ocorre com todos os materiais que permanecerem por muito tempo sem serem eliminados, mesmo estes sendo biocompatíveis, como é o caso dos polímeros biorreabsorvíveis (YUKI, 2010).

Desta forma, as reações do organismo após implantação de biomateriais podem incluir lesão, interações do sangue com o material, a formação da matriz provisória, inflamação aguda, inflamação crônica, desenvolvimento do tecido de granulação, reação de corpo estranho e desenvolvimento de cápsula fibrosa (ANDERSON *et al.*, 2008).

Sabe-se que o surgimento da cápsula fibrosa ao redor do implante é geralmente um fenômeno natural que resulta, inevitavelmente, do mecanismo de defesa do organismo chamado de "reação de corpo estranho". Se o material for totalmente reabsorvido, as células gigantes remanescentes e a fibrose tenderão a também desaparecer restando uma cicatriz, pois no processo inicial traumático ao redor do implante os tecidos foram lesados. Tal resposta e suas diversas fases evolutivas são consideradas fisiológicas (KUMAR, 2010; FRANCA *et al.*, 2011).

Essas reações têm sido investigadas em animais, constatando-se que consiste numa série de processos inter-relacionados cujo resultado final pode variar, dependendo da suscetibilidade do material estranho à fagocitose, da incorporação por células gigantes, da inflamação ou isolamento pela fibrose. Nos humanos, o processo de formação da cápsula é similar nos modelos de animais (FRANCA *et al.*, 2011), onde a etiologia do endurecimento anormal ao redor dos implantes humanos está relacionada com a produção de colágeno e elastina pelos fibroblastos.

A degradação do polímero determina o tipo e a intensidade da resposta inflamatória e o que determina isto, é o surgimento de partículas monoméricas e poliméricas liberadas durante a degradação do polímero *in vivo*. A resposta inflamatória pode ser oriunda de produtos tóxicos provenientes da degradação ou pela mudança de rugosidade superficial e forma de implante durante a liberação de fragmentos. Além disso, a própria fagocitose destes atua como fator importante na modulação da resposta inflamatória. Ela modifica o processo funcional do macrófago, que é o pivô na resposta inflamatória tecidual e na ação de corpo estranho. Além disso, os fragmentos fagocitados podem acarretar morte celular por necrose e a liberação do conteúdo destas células mortas pode levar a uma resposta inflamatória aguda (LAM *et al.*, 1993).

## **2.0 AVALIAÇÃO DOS INDICADORES BIOLÓGICOS (BIOMARCADORES)**

Para avaliação da segurança do material, torna-se necessário a verificação de possíveis efeitos tóxicos sistêmicos e locais. A monitorização biológica da exposição aos agentes químicos, propriamente ditos, significa a medida da substância ou seus metabólitos em vários meios biológicos, como sangue, urina, ar exalado e outros (AMORIM, 2003). Desta forma, os sinais clínicos e os testes laboratoriais de hematologia e bioquímica sérica, podem ser utilizados para avaliação da toxicidade *in vivo* do material implantado e determinação de sua biocompatibilidade (DA SILVA, 2011).

Biomarcador é toda substância ou produtos de biotransformação, assim como, qualquer alteração bioquímica precoce, cuja determinação nos fluidos biológicos e tecidos, avalie a intensidade de exposição e o risco à saúde. Os biomarcadores são valiosos na determinação de riscos permitindo confirmar diagnósticos de intoxicação aguda ou crônica, avaliação de efetividade de tratamento, prognóstico de casos individuais e monitorização frente ao uso de agentes químicos (AMORIM, 2003).

Os biomarcadores podem ser um método alternativo para medir um resultado (usando critérios de avaliação indireta), caso não seja possível medir diretamente a resposta do paciente mediante ensaios clínicos. Um claro exemplo do uso de um biomarcador como critério indireto de avaliação é o desenvolvimento de antiretrovirais para o tratamento da infecção por HIV e AIDS. Anteriormente, os estudos se baseavam em critérios objetivos de avaliação, como a progressão da infecção pelo HIV ou a sobrevivência dos pacientes. Atualmente, as mudanças nas células (por exemplo, na concentração de "linfócitos T CD4") e mudanças na concentração plasmática do RNA do vírus da imunodeficiência humana (HIV) podem ser usadas como critérios indiretos de avaliação. Na Lesão Hepática Induzida por Fármacos (LHIF), que representam a principal causa de Falha Hepática Aguda (FHA) nos Estados Unidos da América e no Reino Unido, o estabelecimento de um diagnóstico preciso geralmente é muito difícil e tem sido feito, essencialmente, na exclusão de outras causas de disfunção hepática, quando verificado um painel de biomarcadores hepáticos com valores anormais (VERMA, 2009).

Segundo Danilchenko *et al.* (2011), a avaliação pré-clínica nas investigações *in vivo* é necessária para descobrir como as mudanças na estrutura e composição do biomaterial investigado afeta o comportamento dos organismos vivos.

Os biomarcadores usados para documentar as alterações pré-clínicas ou efeitos adversos à saúde, decorrentes da absorção e exposição de substâncias químicas são chamados de biomarcadores de efeito, sendo considerados parâmetros biológicos, medidos no organismo (AMORIM, 2003).

Alguns indicadores de efeito possibilitam a avaliação de uma substância química no órgão alvo, a partir da medida de uma alteração biológica associada a esta ação. Desta forma, destacam-se os biomarcadores de nefrotoxicidade, avaliando o dano renal, biomarcadores de hepatotoxicidade, através da atividade de várias enzimas (ex. aminotransferases), avaliando o dano no fígado causado devido à metabolização das substâncias e de seus metabólitos reativos e ainda biomarcadores de neurotoxicidade e de genotoxicidade (AMORIM, 2003).

Neste sentido, considerando que o polímero em estudo é biorreabsorvível, ou seja, são completamente eliminados pelas rotas metabólicas do organismo, torna-se de fundamental importância avaliar as vias de metabolização e excreção do organismo, através dos marcadores bioquímicos, diagnosticando qualquer alteração decorrente da presença desses materiais *in vivo*.

## **2.1 Marcadores da Função Renal**

Os rins estão envolvidos em muitas funções corporais crítica. Considerando que a excreção dos produtos da metabolização e da biodegradação dos compostos ocorre, principalmente, pelas vias renais, um dos parâmetros fundamentais para se comprovar a eficácia e segurança de determinados agentes e através da avaliação da função renal. Segundo Henry (2008), a alteração na função renal é uma das causas mais comuns de toxicidade medicamentosa decorrente da excreção inadequada dos medicamentos ou de seus metabólitos.

Nos testes de função renal, pode-se levar em consideração a ureia e a creatinina sérica. Estes são marcadores de possível alteração na taxa de filtração glomerular, servindo como parâmetros de evolução, monitoramento do tratamento e progressão da doença renal (DUNCAN *et al.*, 1994).

A ureia é o produto final do metabolismo proteico e sua excreção ocorre pelas vias renais. Quarenta por cento ou mais é reabsorvido pelos túbulos renais, logo, seus níveis sanguíneos constituem uma indicação da função renal e podem servir como índice da taxa de filtração glomerular (SCHOSSLER *et al.*, 2001). A ureia é uma dos parâmetros mais populares para avaliar a função renal, no entanto, a utilidade é limitada porque pode haver

uma destruição de até 70 a 80% do glomérulo, antes que seja observado um aumento na concentração deste marcador. Desta forma, a aplicabilidade de suas quantificações é significativamente potencializada quando considerados juntamente com a determinação da creatinina (HENRY, 2009).

A depuração plasmática de creatinina endógena também é usada para estimar a taxa de filtração glomerular (TFG), ou seja, avalia a função renal (BROWN *et al.*, 1990; HENRY, 2009). A creatinina é formada no músculo pela remoção irreversível e não enzimática de água do fosfato de creatina, que é originada do metabolismo de aminoácidos. A dosagem da creatinina é mais indicada para avaliação da função renal, pois a quantidade de creatinina presente nos rins é mais constante e não é reabsorvida nos túbulos renais, como a ureia (STEVEN; SCOTT, 2002). A relação normal entre nitrogênio uréico sanguíneo e creatinina plasmática varia de 10:1 a 15:1, e, quando esse valor é superior a 20:1, torna-se sugestivo de IRA pré-renal (COSTA *et al.*, 2003).

Outros parâmetros que também avaliam a função renal é a dosagem do fósforo e ácido úrico. Na Insuficiência Renal Aguda (IRA), os níveis séricos de fósforo, normalmente, estão elevados. O ácido úrico consiste no produto final de degradação dos ácidos nucleicos e do catabolismo das purinas e mais de 95% são encontrados na forma de urato monossódico. A maior parte do ácido úrico corporal é sintetizado no fígado e mucosa intestinal. Aproximadamente dois terços do urato são excretados pelos rins. A hiperuricemia pode resultar de inúmeros distúrbios e condições associadas com a produção aumentada de uratos e/ou excreção renal reduzida, encontrada em pacientes com insuficiência renal crônica. Em algumas pessoas a hiperuricemia pode precipitar o desenvolvimento de IRA (HENRY, 2009). A excreção de ácido úrico tem sido proposta como um teste mais específico e sensível em determinar e diferenciar casos de necrose tubular aguda que é a forma mais frequente de IRA em um hospital, responsável por 70% dos casos (ANDERSON; SCHRIER, 1996).

Com danos mais grave ao aparelho de filtração glomerular será permitido a passagem de proteínas, com a albumina em maior quantidade. Considerando que a depuração de um composto filtrado pelos glomérulos é inversamente proporcional à concentração plasmática (considerando uma taxa de produção constante), torna-se necessário a mensuração das proteínas para investigar a função renal (HENRY, 2009).

## 2.2 Marcadores da Função Hepática

O fígado é o maior e mais complexo dos órgãos internos sendo, dentre outras funções, o principal local para a síntese de proteínas plasmáticas, destacando-se a albumina, e o principal local do metabolismo de drogas lipossolúveis, bem como de outros compostos potencialmente tóxicos. Devido a maior função do fígado no metabolismo e excreção de drogas e xenobióticos, frequentemente, sinais de toxicidade decorrentes do uso destas substâncias são manifestação neste órgão. Nos Estados Unidos da América a principal causa de lesão no fígado com desenvolvimento de insuficiência hepática aguda é o uso de drogas (CUI; PAULES, 2010; BAILLIE; RETTIE, 2011).

Na insuficiência hepática aguda, a maior parte das proteínas sintetizadas no fígado terá sua concentração diminuída, e este declínio também pode ser observado na hepatopatia aguda se acentuando com a hepatopatia crônica.

Por serem células que possuem um metabolismo complexo, os hepatócitos, contêm concentrações elevadas de inúmeras enzimas. Com a lesão hepática, geralmente estas enzimas extravasam para o plasma e podem ser úteis para o diagnóstico e monitoramento da lesão hepática (HENRY, 2009).

As enzimas aspartato aminotransferase (AST), também denominada de transaminase glutâmica-oxalacética (TGO) e alanina aminotransferase (ALT), também denominada transaminase glutâmica-pirúvica (TGP) são enzimas intracelulares presentes em grandes quantidades no citoplasma dos hepatócitos. A ALT (TGP) é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto 80% da AST (TGO) estão presentes na mitocôndria. Esta diferença tem auxiliado no diagnóstico e prognóstico de doenças hepáticas. Em dano hepatocelular leve a forma predominante no soro é de origem citoplasmática, ou seja, ALT/TGP, fazendo com que se eleve rapidamente após a lesão hepática. Enquanto em lesões graves há liberação da enzima mitocondrial, elevando a relação AST/ALT e demonstrando lesões mais profundas (SCHUMANN *et al*, 2002; MOTTA, 2003). Portanto, estas enzimas podem ser consideradas marcadores da disfunção, com elevação significativa nessas lesões teciduais (KAMARUL, *et al.*, 2014).

O TGP/ALT, também pode ser encontrado, em moderadas quantidade, no rim e em pequenas quantidades no coração e na musculatura esquelética (SCHUMANN *et al*, 2002). As atividades mais elevadas de AST (TGO) também são encontradas no miocárdio, fígado,

músculo esquelético, com pequenas quantidades nos rins, pâncreas, baço, cérebro, pulmões e eritrócitos (MOTTA, 2003). Segundo Coles (1986), em pequenos animais, o aumento desta enzima é verificado em situações de desordens inflamatórias e degenerativas da musculatura esquelética, bem como em cardiomiopatias, por exemplo, isquemia, congestão, necrose, neoplasia e trauma.

### **3.0 INVESTIGAÇÕES *IN VIVO***

Para avaliação de biomateriais, os testes em animais são procedimentos inerentes à estimativa da biocompatibilidade, antes que um novo biomaterial possa ser utilizado clinicamente (DA SILVA, 2011). De fato, nos ensaios pré-clínicos os animais de experimentação são comumente utilizados. O rato foi o primeiro mamífero domesticado com fins científicos e é o animal mais usado em laboratório. A linhagem não-endogâmica Wistar (*Rattus norvegicus*) uma das mais utilizadas ao redor do mundo, é um modelo para pesquisa por seu pequeno porte, seu ciclo biológico curto, baixo custo de criação e grau de similaridade genética com seres humanos. Aproximadamente, 80% de seu DNA é idêntico ao do homem (GIBBS *et al.*, 2004).

Alguns trabalhos com valores de referência de parâmetros bioquímicos de animais não tratados estão descritos na literatura, onde se observa que há grandes diferenças entre alguns deles, o que confirma as variações de manuseio, intraespécie, de metodologia e devido às diversidades geográficas. Alguns valores de referência dos parâmetros bioquímicos, encontrados na literatura para ratos Wistar machos, investigados no presente estudo, estão demonstrados na Tabela 2.1 (HOOPER *et al.*, 2007; ORLANDINI, 2012; KAMARUL *et al.*, 2014; MELO *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2014).

**Tabela 2. 1- Valores de referência para ratos wistar de parâmetros bioquímicos investigados no presente estudo.**

	Hooper <i>et al</i> (2007) <sup>a</sup>	Orlandini (2012) <sup>b</sup>	Melo <i>et al</i> (2012) <sup>c</sup>	Lima <i>et al</i> (2014) <sup>d</sup>	Kamarul <i>et al</i> , (2014) <sup>e</sup>
Creatinina (mg/dL)	0,4 ± 0,1 (Jovem) 0,5 ± 0,1 (Adulto)	0,31 ± 0,05 0,21-0,40 <sup>f</sup>	0,5 ± 0,05 0,44-0,64 <sup>f</sup>	0,58 ± 0,24 (38) 0,24/1,20 <sup>f</sup>	--
Ureia (mg/dL)	36,6 ± 5,9 (Jovem) 44,7 ± 7,1 (Adulto)	52,27 ± 4,09 45,35 - 59,97 <sup>f</sup>	35,9 ± 3,58 30-42 <sup>f</sup>	39 6,7 ± 8,97 (38) 45,35/59,97 <sup>f</sup>	--
Ácido Úrico mg/dL	--	--	1.3 ± 0,34 0,9 - 2,0 <sup>f</sup>	1,81 ± 0,67 (18) 1 - 3,2 <sup>f</sup>	--
Proteínas Totais g/dL	6,2 ± 0,5 (Jovem) 6,1 ± 1,4 (Adulto)	6,55 ± 2,3 6,16 - 6,96 <sup>f</sup>	6,2 ± 0,26 5,4 - 6,6 <sup>f</sup>	5,75 ± 0,87 (37) 4,0 - 6,9 <sup>f</sup>	6,5 ± 3,02
Albumina g/dL	3,6 ± 0,3(Jovem) 3,7 ± 0,2(Adulto)	2,58 (2,41-2,64) 2,20-2,93 <sup>f</sup>	2,65 ± 0,30 2,10-5,40 <sup>f</sup>	3,0 ± 0,12 (38) 2,7-3,5 <sup>f</sup>	1,017 ± 1,17
TGO/AST U/L	156,8 ± 59,5(Jovem) 135,6 ± 35,6 (Adulto)	96 (83-104) 69-131 <sup>f</sup>	131,7 ± 23,09 81-180 <sup>f</sup>	131,33 ± 43,99 (33) 61-210 <sup>f</sup>	189,67 ± 13,71*
TGP/ALT U/L	68,6 ± 5,6(Jovem) 50,1 ± 4,1(Adulto)	48,6 ± 6,9 36-59 <sup>f</sup>	48,4 ± 6,46 36-48 <sup>f</sup>	57,5 5± 11,95 (33) 36-59 <sup>f</sup>	71,00 ± 4,24*

- Valores: média ± desvio padrão; Punção cardíaca; Anestesia: Dióxido de carbono; Idade não informada.
- Valores: média ±desvio padrão/Mediana; percentil 25-percentil 75; Punção cardíaca; Anestesia: xilazina e cetamina; Idade: três meses; Número: 20 animais; Sem jejum prévio.
- Valores: média ± desvio padrão; Artéria mesentérica superior; Anestesia: Éter etílico 50%; Idade: 2 a 3 meses; Número: 24 animais; Jejum de 12 horas.
- Valores: média ±desvio padrão (Número de animais). Punção cardíaca. Anestesia: xilazina e cetamina. Idade: 2 a 3 meses; Jejum de 12 horas.
- Valores: média ±desvio padrão; Punção cardíaca. Anestesia: Inalação com Dióxido de carbono; Adultos.
- Por faixa de valores (mínimo e máximo). \*IU/L

## **4.0 OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a biocompatibilidade e a degradação da blenda de PCL associado ou não a HAp e/ou T, após um ano de implantação *in vivo*, em ratos. Tendo em vista que, o principal foco do estudo é uma futura utilização dos compostos no processo de regeneração óssea.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar os parâmetros bioquímicos através da investigação do perfil renal e hepático, dos animais de experimentação que receberam o biomaterial, após cada período de estudo;
- Determinar a degradação das blendas a partir da variação da massa das pastilhas, depois de retiradas dos animais, nos períodos estabelecidos;
- Avaliar as variações químicas das blendas de PCL após implantação;
- Observar possíveis alterações das propriedades térmicas do material;
- Analisar a microestrutura das pastilhas, quando retiradas dos animais, nos períodos instituídos.

## **4.0 MATERIAIS E MÉTODO**

### **4.1 MATERIAIS**

PCL de baixo peso molecular (BPM-PCL) (20.000 g/mol), sintetizado no Centro de Estudos, Investigação e Inovação em Materiais Biofuncionais e Biotecnologia (CEEIMB) da UNIFEI (De Queiroz et al., 2002) e PCL (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>). Foi produzida a blenda polimérica, na proporção de 20% do PCL (65.000 g/mol) e 80% BPM-PCL. Foram acrescentados em alguns compostos, HAp sintética absorvível (HPA-91 JHS Biomateriais<sup>®</sup>) e/ou TCH (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>).

### **4.2 PRODUÇÃO DOS ARCABOUÇOS COM AS BLENDA DOS POLÍMEROS**

As blendas de PCL/BPM-PCL 20/80% foram preparadas utilizando clorofórmio como solvente, a temperatura ambiente e com agitação constante. Após a solubilização dos polímeros, a solução foi vertida em placas de petri para evaporação do solvente. Depois da evaporação o filme foi tritura em grau e peneirado, para garantir a homogeneidade dos grãos. Foram confeccionados mais três grupos de arcabouços onde foram acrescentados 10% HAp e/ou 10% TCH. Dessa forma, investigamos o perfil de degradação de 4 grupos de pastilhas confeccionadas com blenda de PCL/BPMPCL. Na tabela 4.1 estão especificados os diferentes grupos utilizados no estudo.

Foram confeccionadas pastilhas de 9 mm de diâmetro e 0,9 mm de espessura utilizando molde cilíndrico sob pressão de 370 MPa com uma prensa hidráulica. Todas as pastilhas foram esterilizadas com uso de radiação gama antes de serem utilizados nos ensaios de degradação.

**Tabela 4. 1. Especificação dos componentes incorporados em cada grupo de pastilha.**

<b>Grupos</b>	<b>Componentes</b>
<b>Grupos I</b>	PCL- Sigma-Aldrich / 20% BPM-PCL /80%
<b>Grupos II</b>	PCL- Sigma-Aldrich / 20% BPM-PCL 80% + 10% Hidroxiapatita
<b>Grupos III</b>	PCL-- Sigma-Aldrich / 20% BPM-PCL /80% + 10% Cloridrato de Tetraciclina
<b>Grupos IV</b>	PCL- Sigma-Aldrich / 20% BPM-PCL /80% + 10% Hidroxiapatita + 10% Cloridrato de Tetraciclina

### **4.3 ANIMAIS**

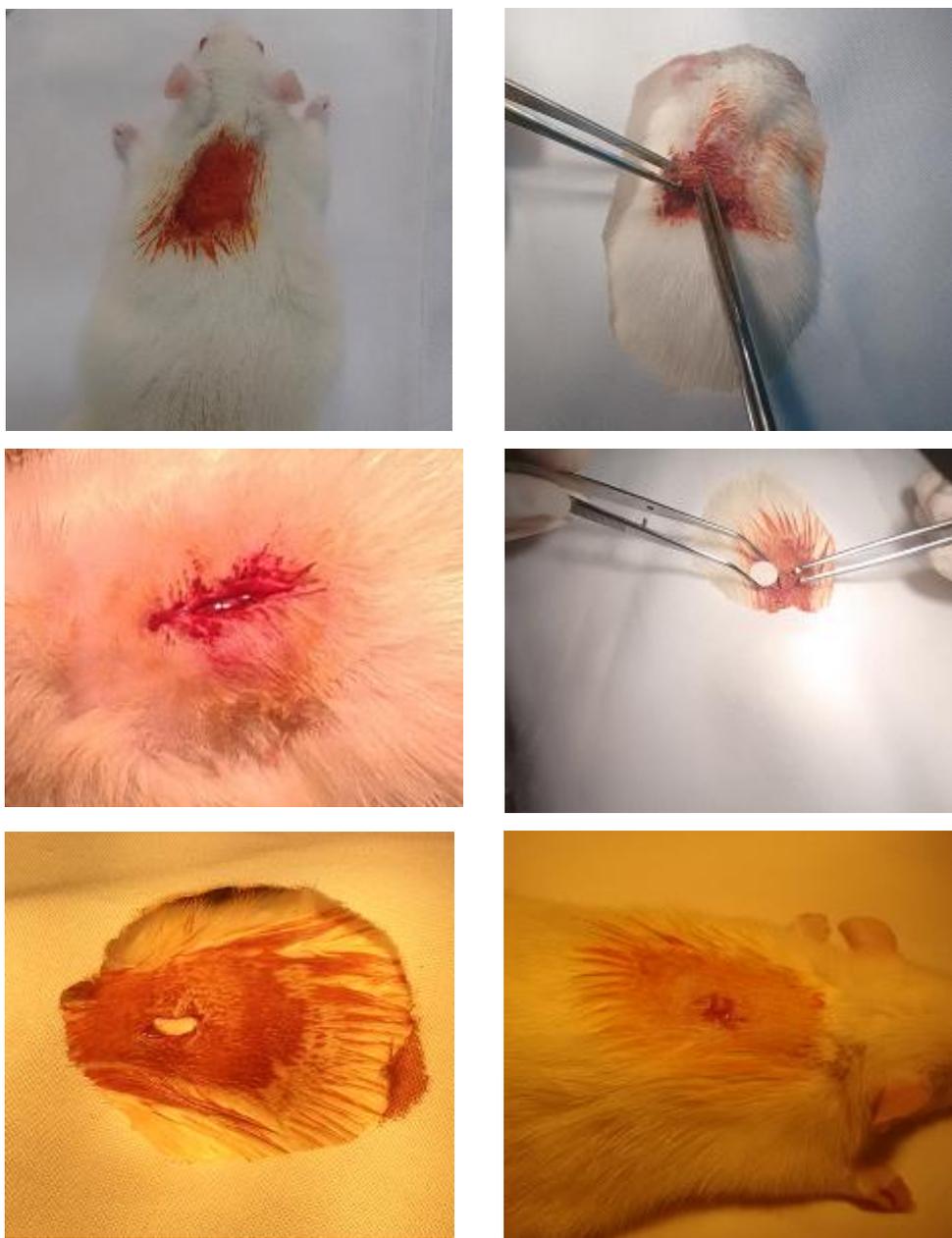
Os experimentos *in vivo* com os animais foram desenvolvidos após o parecer de aprovação do comitê de ética de uso animal da Faculdade de Medicina de Itajubá (n°16/2013).

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) adultos e machos, da linhagem Wistar, padrão sanitário convencional, com idade inicial de 60 dias, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina de Itajubá. Todos os animais foram mantidos em gaiolas com livre acesso a água e ração. Utilizou-se 25 animais por grupo, para cada período de tempo foram selecionados cinco animais, totalizando 125, considerando os quatro grupos experimentais e o Grupo Controle.

### **4.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO PARA IMPLANTE DO BIOMATERIAL**

Cada amostra foi implantada no tecido subcutâneo do dorso de ratos. Após a pesagem, os animais foram anestesiados com Cloridrato de Ketamina 50mg/kg e Cloridrato de Xilazina 10mg/kg pela administração intraperitoneal, utilizando seringas e agulhas descartáveis. Após a anestesia foi realizada tricotomia da região dorsal do animal, seguida da assepsia com iodopovidona (PVPI), incluindo a pelagem ao redor e colocado um campo cirúrgico fenestrado estéril, com dimensões de 20 x 20 cm, confeccionado para expor a região da cirurgia e cobrir o restante do corpo, prevenindo eventuais contaminações. Foi realizado uma incisão de 1,5 cm, com auxílio de um bisturi, no centro do dorso do animal. O biomaterial foi colocado no tecido subcutâneo e o tecido epitelial foi suturado. Foi administrado o analgésico tramadol 2mg/kg por via intraperitoneal após cirurgia e o pentabiótico. Alguns animais (n=5, para cada período) foram submetidos ao procedimento cirúrgico sem implantação do

biomaterial, estes serviram como o grupo controle no estudo. A seguir, estão representadas as imagens que caracterizam a sequência do procedimento que foi realizado para implantação do implante (Fig.4.1).



**Figura 4. 1-** Representação da sequência do procedimento cirúrgico realizado para implantação do arcabouço

## **4.5 PROCEDIMENTOS PARA EUTANÁSIA E RETIRADA DO BIOMATERIAL**

Nos períodos de 7, 14, 30, 180 e 360 dias após a cirurgia, os animais de cada grupo foram eutanasiados, a fim de se observar processos inflamatórios agudos e crônicos. Nestes períodos o biomaterial implantado e o tecido no local do implante foram removidos, lavados com solução salina e reservados para posteriores análises. A eutanásia dos animais foi realizada com punção aspirativa do ventrículo esquerdo, após anestesia com Ketamina (50mg/kg) / Xilazina (10mg/kg) por via intra-peritoneal. É importante salientar que a punção aspirativa do ventrículo esquerdo com retirada de grande volume de sangue do animal, produz hipovolemia importante e morte.

## **4.6 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS**

O sangue retirado por punção aspirativa do ventrículo esquerdo durante a eutanásia foi utilizado para realização de ensaios bioquímicos que avaliaram a função renal e hepática do animal durante o período experimental. O sangue colhido em tubo sem anticoagulante foi centrifugado à 2000 rpm durante 10 minutos e o soro obtido (3 mL/rato) guardado em tubos fechados em congelador (-4°C), para posteriores dosagens laboratoriais. As análises foram realizadas por espectrofotometria, utilizando-se kits comerciais da Labtest<sup>®</sup>, seguindo as recomendações do fabricante e analisadas em um analisador bioquímico semiautomático. As análises bioquímicas realizadas incluíram a dosagem de creatinina, ureia, ácido úrico, fósforo, proteínas totais, albumina, alanina amino transferase (ALT/TGP), Aspartato Amino Transferase (AST/TGO).

A Tabela 4.2 resume as metodologias adotadas para os testes bioquímicos e a finalidade de sua investigação.

**Tabela 4. 2 – Metodologia e finalidade empregada nos exames bioquímicos.**

<b>Exame</b>	<b>Metodologia</b>	<b>Finalidade</b>
<b>Ureia</b>	Sistema enzimático-colorimétrico (Labtest®)	Marcador de Função Renal
<b>Ácido Úrico</b>	Enzimático (Labtest®)	Marcador de Função Renal
<b>Creatinina</b>	Colorimétrico (Labtest®)	Marcador de Função Renal
<b>Fósforo</b>	Colorimétrico (Labtest®)	Marcador de Função Renal
<b>Proteínas Totais</b>	Colorimétrico (Labtest®)	Marcador de Função Renal e Hepática.
<b>Albumina</b>	Colorimétrico (Labtest®)	Marcador de Função Renal e Hepática
<b>ALT/TGP</b>	Cinética UV-IFCC (Labtest®)	Marcador de Função Hepática
<b>AST/TGO</b>	Cinética UV-IFCC (Labtest®)	Marcador de Função Hepática

#### **4.7 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DOS ARCABOUÇOS APÓS IMPLANTAÇÃO *IN VIVO***

Todas as pastilhas implantadas nos animais foram analisadas pelas técnicas a seguir, para avaliação da degradação do biomaterial.

##### **I) Variação da Massa**

O percentual de massa perdida (normalizada) foi calculado para cada pastilha determinando a diferença entre a massa no início ( $M_i$ ) dos experimentos e ao final para cada tempo ( $M_t$ ), de acordo com a equação 01. Antes da realização das pesagens em uma balança analítica, as amostras retiradas dos animais foram lavadas com água destilada e colocadas no dessecador por um período de 48 horas.

$$\% \text{ Massa perdida} = \frac{M_i - M_t}{M_i} \times 100 \quad (\text{Equação 01})$$

## II) Avaliação química da degradação por infravermelho

Foram realizados espectros na região do infravermelho utilizando a técnica de Infravermelho transformada de Fourier (FTIR) com o espectrofotômetro da Perkin Elmer modelo Spectrum 100. Para cada amostra o experimento foi repetido cinco vezes, cada um com dez varreduras. As principais bandas de absorção no infravermelho que caracterizam o PCL podem ser visualizadas na Tabela 4.2.

Tabela 4. 3 - Principais bandas de absorção infravermelhas do PCL (Fonte: Gurlek *et al.*, 2017)

cm <sup>-1</sup>	Atribuições
2949	Alongamento CH <sub>2</sub> assimétrico
2865	Alongamento CH <sub>2</sub> simétrico
1727	Estiramento de carbonila (C-O)
1293	C-O e C-C alongamento na fase cristalina
1240	COC assimétrico
1190	OC-O alongamento
1170	COC simétrico
1157	C-O e C-C alongamento no amorfo

## III) Avaliação da superfície e morfologia do biomaterial

A microestrutura e morfologia das amostras foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando-se microscópio Shimadzu SS550, e o microscópio óptico digital Smartzoom 5 full report. Para o MEV utilizou-se tensão de operação de 10-30 keV. As amostras foram fraturadas, fixadas em um suporte metálico com fita adesiva de carbono e recobertas com ouro, utilizando com corrente de 8 mA durante 120-180s sob vácuo.

## IV) Calorimetria Exploratória Diferencia (DSC)

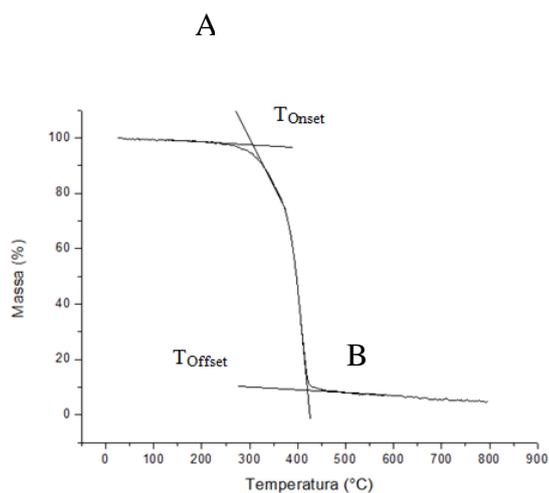
Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial foi realizada utilizando o aparelho Shimadzu DSC-060 em atmosferas de nitrogênio. As amostras com aproximadamente 5mg foram colocadas em cadinhos de alumínio, prensadas, e submetida a dois ciclos de aquecimento (- 80°C a 80°C). A taxa de aquecimento foi de 10°C/min. A temperatura de fusão, variação de entalpia, temperatura de transição vítrea e grau de cristalinidade das

amostras foram determinados a partir do segundo aquecimento. A porcentagem de cristalinidade (X) foi estimada usando um valor de 139,5 J/g para o entalpia de fusão ( $\Delta H_f$ ) do PCL cristalino (MAS ESTELLES *et al.*, 2008) e foi estimada de acordo com a equação 02.

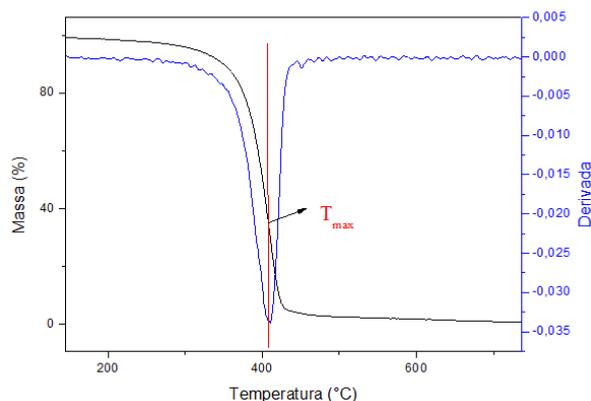
$$X = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_f(\text{PCL } 100\% \text{ Cristalino})} \times 100 \quad (\text{Equação 02})$$

#### V) Análise termogravimétrica (TGA)

Análise Termogravimétrica foi realizada usando aquecimento com a taxa de 10°C/min no aparelho Mettler TG 50, com atmosfera de nitrogênio. A porcentagem de massa perdida foi registrada para cada amostra em função do acréscimo de temperatura, partindo de 25°C até 700°C. Os resultados são apresentados em porcentagem da massa inicial, no eixo-y, e a temperatura, no eixo-x. O processo de decomposição ocorre entre o ponto A e B, mas pode-se utilizar  $T_{\text{onset}}$  e  $T_{\text{offset}}$  que caracterizam, respectivamente, a temperatura extrapolada de início e fim do processo de decomposição (Figura 4.2). Outro parâmetro utilizado para caracterizar o material é  $T_{\text{máx}}$ , estabelecido pelo pico mais intenso da derivada na curva da TGA (Figura 4.3).



**Figura 4. 2** - Demonstração da extrapolação da reta na curva da TGA, para especificação da  $T_{\text{onset}}$  e  $T_{\text{offset}}$  das amostras analisadas no estudo. [Adaptado de Canevarolo, 2004].



**Figura 4.3** – Demonstração da determinação da  $T_{m\acute{a}x}$  a partir da TGA e DTG, para as análises em estudo.

## VI) Propriedades mecânicas

A avaliação do módulo de elasticidade das amostras ao longo do período de degradação foi realizada utilizando o aparelho TMA 40 (Mettler), através da análise termomecânica. Foram realizadas compressões crescentes de 0,1, 0,2 e 0,5 N permanecendo a compressão por 0,5 minutos antes de mudar para um valor maior. A deformação provocada por cada compressão foi medida ( $\mu\text{M}$ ) para posterior cálculo do módulo de elasticidade do material.

### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tratados no programa GraphPad Prism<sup>®</sup>. Em parâmetros com distribuição normal, as amostras foram submetidas à análise de variância (ANOVA/one way/Dunnett). Considerando que, para todas as análises, as diferenças de  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas.

## **5.0 APRESENTAÇÃO, ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.**

### **5.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS APÓS IMPLANTAÇÃO DO MATERIAL *IN VIVO*.**

Considerando que a biocompatibilidade indica a habilidade do material para realizar sua atividade com apropriada resposta do hospedeiro, em uma aplicação específica, possíveis desvios do número de células e das taxas dos componentes não celulares do sangue, após a realização de procedimentos experimentais que avaliam a biocompatibilidade de materiais implantados no organismo, são critérios importantes para avaliar a extensão da homeostasia. Segundo Vieira (2007), os marcadores bioquímicos podem servir como sinalizadores do sucesso ou insucesso de uma determinada terapia, sendo de grande importância na determinação dos efeitos induzidos pelo material.

Os biomarcadores são ferramentas utilizadas, buscando-se estabelecer uma relação entre a exposição aos agentes químicos e os efeitos na saúde dos indivíduos expostos. A importância do uso destes biomarcadores como parâmetros biológicos de exposição às substâncias químicas deve-se ao fato de eles estarem mais diretamente relacionados aos efeitos na saúde, por isso, podem oferecer uma melhor estimativa do risco (AMORIN, 2003).

Para o estudo da segurança do material, torna-se necessário a verificação de possíveis efeitos tóxicos sistêmicos e locais. Os sinais clínicos e os testes laboratoriais, de hematologia e bioquímica sérica, podem ser utilizados para avaliação da toxicidade *in vivo* do material implantado e, conseqüentemente, na determinação de sua toxicidade sistêmica. A avaliação da biocompatibilidade a partir do uso de biomateriais pode ser realizada utilizando a dosagens de marcadores bioquímicos da função renal e hepática, considerando a metabolização do polímero, a fim de investigar a resposta do organismo após implantação do arcabouço (DA SILVA, 2011; KAMARUL, *et al.*, 2014).

Para uma abordagem mais significativa e considerando que para determinados marcadores bioquímicos o intervalo de variação de normalidade é amplo, também foram utilizados alguns valores de referência encontrados na literatura, para a mesma espécie dos animais. Em alguns casos, não foi possível encontrar dados para todos os períodos do estudo em questão.

Os dados da avaliação dos parâmetros bioquímicos após implantação do material *in vivo* estão representados em Figuras (da Figura 5.1 a 5.8) e Tabelas (da Tabela 5.1 a 5.8) e para os grupos que apresentaram resultados diferentes estatisticamente do grupo controle ( $p <$

0,05) foi colocado um asterisco em cima da barra correspondente. Os resultados citados como alterados, atendem a este requisito.

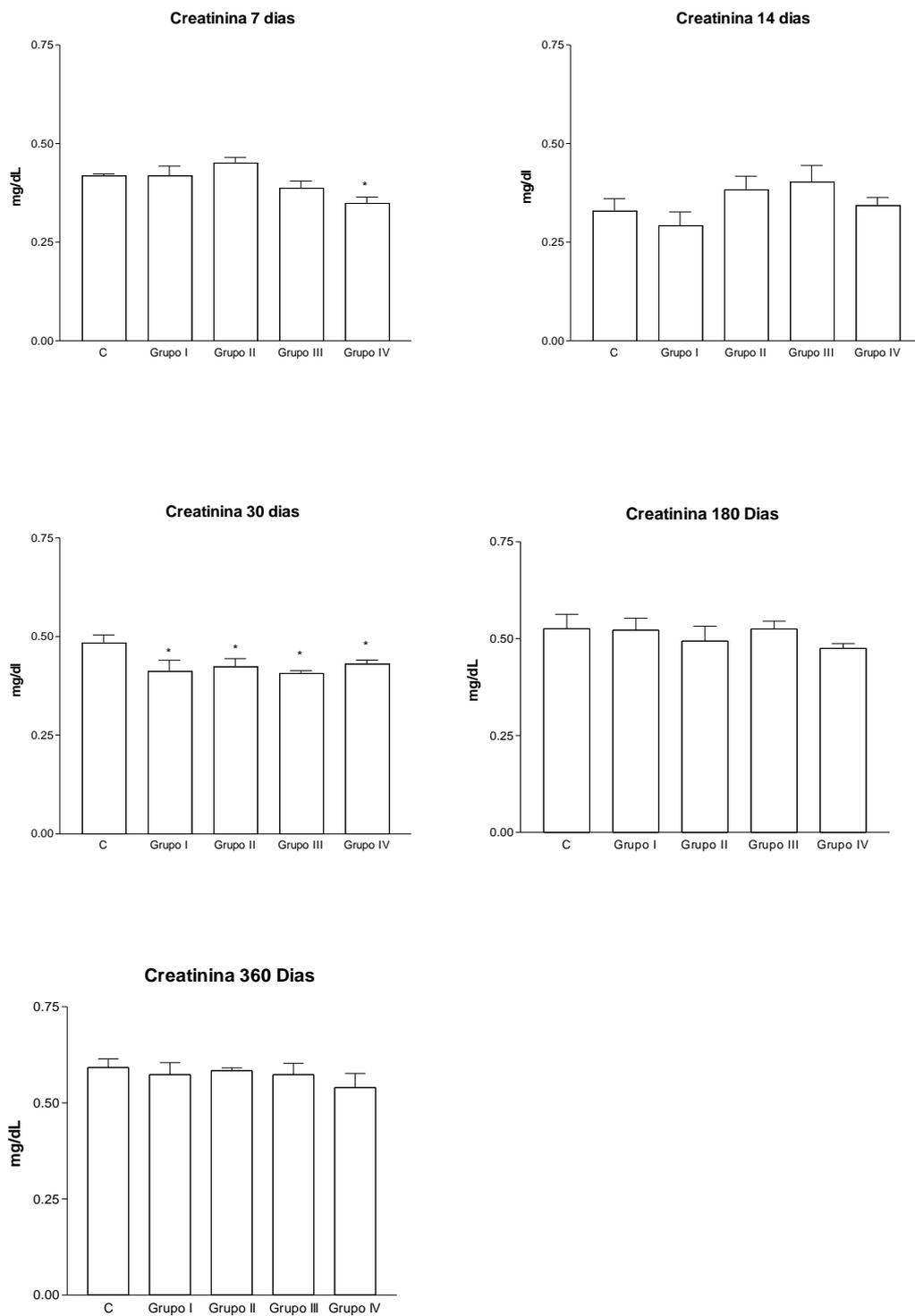
Os níveis de Creatinina no sangue dos animais foram medidos no intuito de identificar possíveis danos na função renal, principalmente no que diz respeito à filtração glomerular. Estes dados estão apresentados na Figura 5.1 e Tabela 5.1.

Após sete dias de implantação foi observado que apenas o Grupo IV, apresentou-se com valores distintos do grupo controle, demonstrando resultados inferiores. Após quatorze dias, não houve alteração em nenhum grupo. Aos trinta dias, todos os grupos apresentaram resultados inferiores ao grupo controle, mas com níveis dentro dos valores de referência citados em alguns estudos (Tabela 2.1, p.45). Para os períodos de cento e oitenta e trezentos e sessenta dias não foram observados diferenciação das dosagens, quando comparados com o controle.

**Tabela 5. 1-** Média e desvio padrão da Creatinina (mg/dL) analisados após os períodos de implantação *in vivo* do biomaterial. GI: blenda de PCL; GII: Blenda de PCL/HAp;GIII: Blenda de PCL/TCH; GIV: Blenda de PCL/TCH/HAp.\* diferente estatisticamente do controle.

<b>Dosagem</b>	<b>C</b>	<b>GI</b>	<b>GII</b>	<b>GIII</b>	<b>GIV</b>
<b>Creatinina 7 Dias</b>	0,420 ± 0,01	0,42 ± 0,05	0,45 ± 0,03	0,39 ± 0,04	0,35 ± 0,03*
<b>Creatinina 14 Dias</b>	0,33 ± 0,06	0,30 ± 0,06	0,38 ± 0,07	0,40 ± 0,09	0,34 ± 0,04
<b>Creatinina 30 Dias</b>	0,48 ± 0,04	0,41 ± 0,05*	0,43 ± 0,04*	0,40 ± 0,01*	0,43 ± 0,02*
<b>Creatinina 180 Dias</b>	0,53 ± 0,08	0,50 ± 0,07	0,49 ± 0,08	0,52 ± 0,04	0,47 ± 0,02
<b>Creatinina 360 Dias</b>	0,59 ± 0,05	0,57 ± 0,07	0,58 ± 0,01	0,57 ± 0,06	0,54 ± 0,07

Observa-se que com o aumento da idade houve um aumento dos índices séricos da creatinina para todos os grupos. Se observarmos o grupo controle os valores foram de 0,42 (± 0,007), após sete dias, para 0,59 (± 0,05), após 360 dias.



**Figura 5. 1** - Níveis séricos de creatinina após os períodos de implantação do biomaterial nos animais. Grupo I: blenda de PCL; Grupo II: Blenda de PCL/HAp; Grupo III: Blenda de PCL/TCH; Grupo IV: Blenda de PCL/TCH/HAp \*: diferente estatisticamente do controle.

A dosagem sérica da creatinina pode ser menos sensível em algumas doenças renais precoces, sua determinação é considerada mais específica para a avaliação da função

glomerular. Desta forma, a associação das dosagens de ureia e creatinina são mais eficazes para avaliar a disfunção renal.

Com base no exposto, os níveis de ureia foram dosados nos animais e os resultados estão representados na Figura 5.2 e Tabela 5.2.

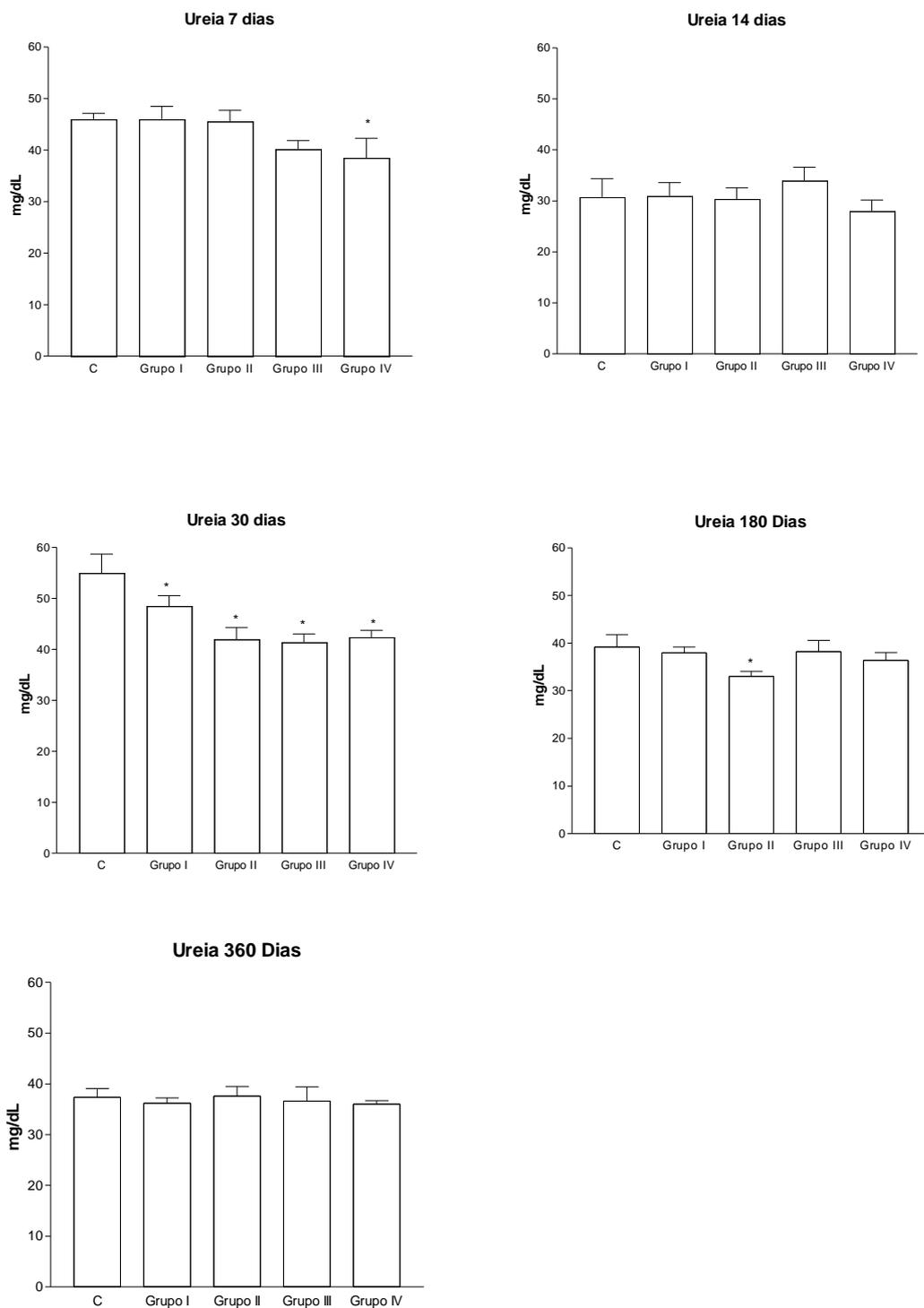
Após sete dias de implantação, apenas o Grupo IV apresentou resultados distintos do controle, demonstrando níveis inferiores. Após quatorze dias não houve nenhuma alteração significativa. Aos trinta dias de implantação, todos os grupos apresentaram níveis de ureia inferior ao grupo controle. Para os períodos de avaliação crônica (180 e 360 dias) apenas o Grupo II, após 180 dias, demonstrou alteração, com resultado inferior ao controle.

Após análise, percebeu-se uma relação existente entre ambas as dosagens (creatinina e ureia), pois exibiram perfis de alteração semelhantes, se diferenciando apenas o GII em 180 dias, que apresentou níveis sanguíneos diminuídos apenas para ureia.

Como o dano renal é caracterizado pelo aumento dos níveis sanguíneos destes marcadores, as alterações dos resultados encontrados no estudo não indicam dano renal, pois os índices diminuíram.

**Tabela 5. 2** - Média e desvio padrão da Ureia (mg/dL) analisados após os períodos de implantação *in vivo* do biomaterial. GI: blenda de PCL; GII: Blenda de PCL/HAp;GIII: Blenda de PCL/TCH; GIV: Blenda de PCL/TCH/HAp.\* diferente estatisticamente do controle.

<b>Dosagem</b>	<b>C</b>	<b>GI</b>	<b>GII</b>	<b>GIII</b>	<b>GIV</b>
<b>Ureia 7 Dias</b>	46,0 ± 2,55	46,0 ± 5,00	45,6 ± 4,78	40,2 ± 3,6	38,5 ± 7,55*
<b>Ureia 14 Dias</b>	30,7 ± 7,14	31,0 ± 5,2	30,4 ± 4,78	34,0 ± 5,8	28,0 ± 4,85
<b>Ureia 30 Dias</b>	55 ± 7,40	48,5 ± 4,12*	42,0 ± 5,1*	41,4 ± 3,65*	42,4 ± 3,05*
<b>Ureia 180 Dias</b>	39,2 ± 5,80	38,0 ± 2,64	33,0 ± 2,45*	38,2 ± 4,64	36,4 ± 3,65
<b>Ureia 360 Dias</b>	37,4 ± 3,78	36,2 ± 2,28	37,6 ± 4,22	36,6 ± 6,23	36,0 ± 1,41



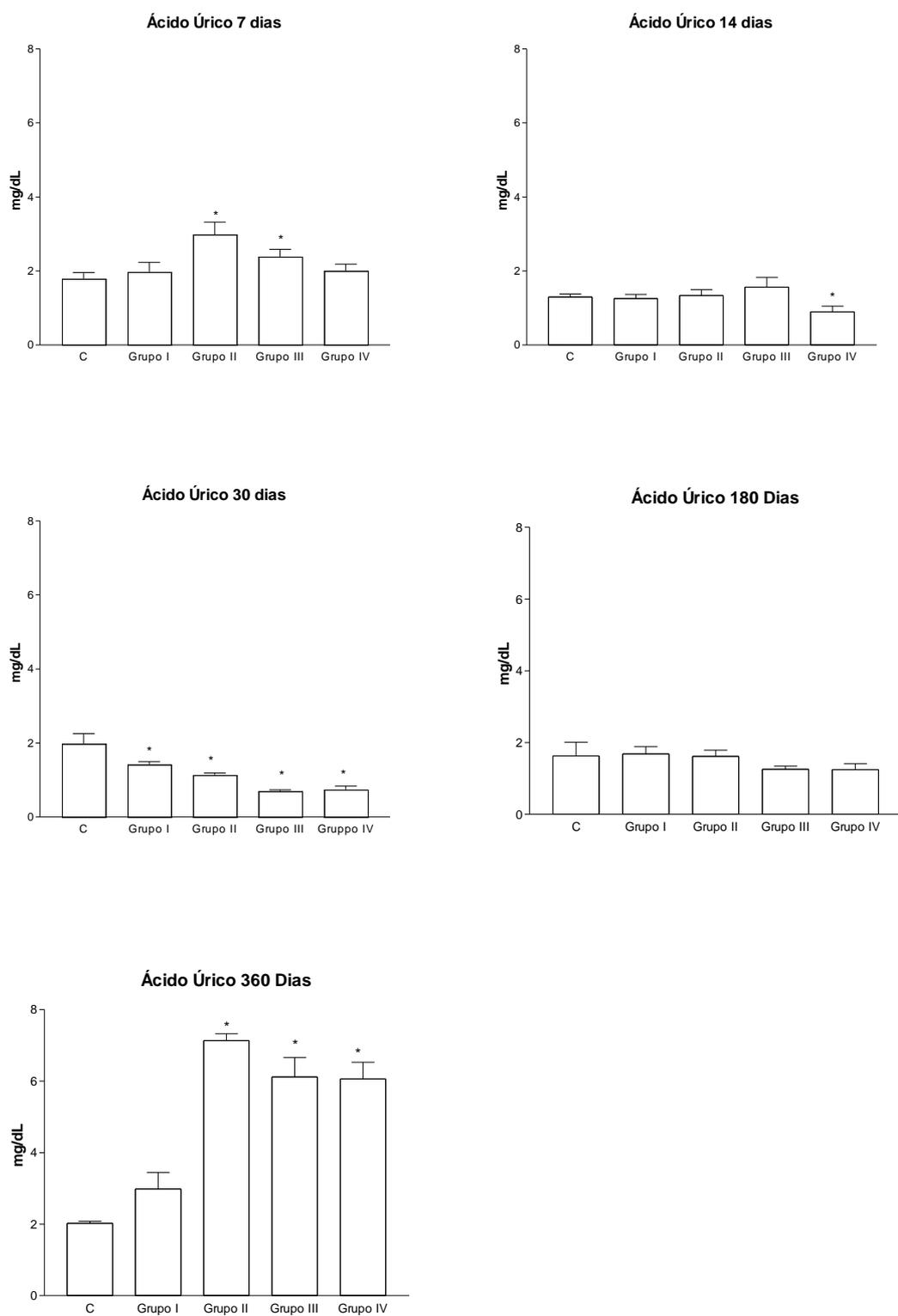
**Figura 5. 2-** Níveis séricos de ureia após os períodos de implantação do biomaterial nos animais. . Grupo I: blenda de PCL; Grupo II: Blenda de PCL/HAp; Grupo III: Blenda de PCL/TCH; Grupo IV: Blenda de PCL/TCH/HAp \*: diferente estatisticamente do controle.

A dosagem sanguínea do ácido úrico também pode ser utilizada para fornecer uma noção indireta do estado da filtração renal. A concentração do ácido úrico (Tabela 5.3 e

Figura 5.3) após sete dias de implantação mostra-se alterada para o Grupo II e III, demonstrando valores superiores ao controle. Aos quatorze dias apenas o Grupo IV apresentou alteração, exibindo níveis inferiores ao controle. Após trinta dias, houve uma redução dos níveis de ácido úrico para todos os grupos. Para o período seguinte (180 Dias) não houve distinção dos resultados. Após trezentos e sessenta dias os Grupos II, III e IV apresentaram resultados de 7,13 ( $\pm 0,42$ ), 6,11 ( $\pm 1,22$ ), 6,06 ( $\pm 0,93$ ), respectivamente. Estes valores se mostraram bem superiores ao grupo controle ( $2,02 \pm 0,12$ ) e ao referencial teórico consultado, onde foi citada uma variação de 0,9- 1,64 mg/dL (MELO *et al*, 2012) e uma variação de 1,14- 2,6 (LIMA *et al*, 2014) para os valores de normalidade.

**Tabela 5. 3-** Média e desvio padrão do Ácido Úrico (mg/dL) analisados após os períodos de implantação *in vivo* do biomaterial. GI: blenda de PCL; GII: Blenda de PCL/HAp; GIII: Blenda de PCL/TCH; GIV: Blenda de PCL/TCH/HAp.\* diferente estatisticamente do controle.

Dosagem	C	GI	GII	GIII	GIV
Ác. Úrico 7 Dias	1,79 $\pm$ 0,37	1,98 $\pm$ 0,51	2,98 $\pm$ 0,58*	2,39 $\pm$ 0,47*	2,01 $\pm$ 0,30
Ác. Úrico 14 Dias	1,30 $\pm$ 0,06	1,25 $\pm$ 0,20	1,33 $\pm$ 0,32	1,56 $\pm$ 0,45	0,89 $\pm$ 0,27*
Ác. Úrico 30 Dias	1,98 $\pm$ 0,48	1,42 $\pm$ 0,12*	1,13 $\pm$ 0,09*	0,07 $\pm$ 0,01*	0,74 $\pm$ 0,16*
Ác. Úrico 180 Dias	1,63 $\pm$ 0,75	1,68 $\pm$ 0,40	1,62 $\pm$ 0,37	1,26 $\pm$ 0,15	1,25 $\pm$ 0,37
Ác. Úrico 360 Dias	2,02 $\pm$ 0,12	2,98 $\pm$ 0,79	7,13 $\pm$ 0,42*	6,11 $\pm$ 1,22*	6,06 $\pm$ 0,93*



**Figura 5. 3** - Níveis séricos de ácido úrico após os períodos de implantação do biomaterial nos animais. . Grupo I: blenda de PCL; Grupo II: Blenda de PCL/HAp; Grupo III: Blenda de PCL/TCH; Grupo IV: Blenda de PCL/TCH/HAp \*: diferente estatisticamente do controle.

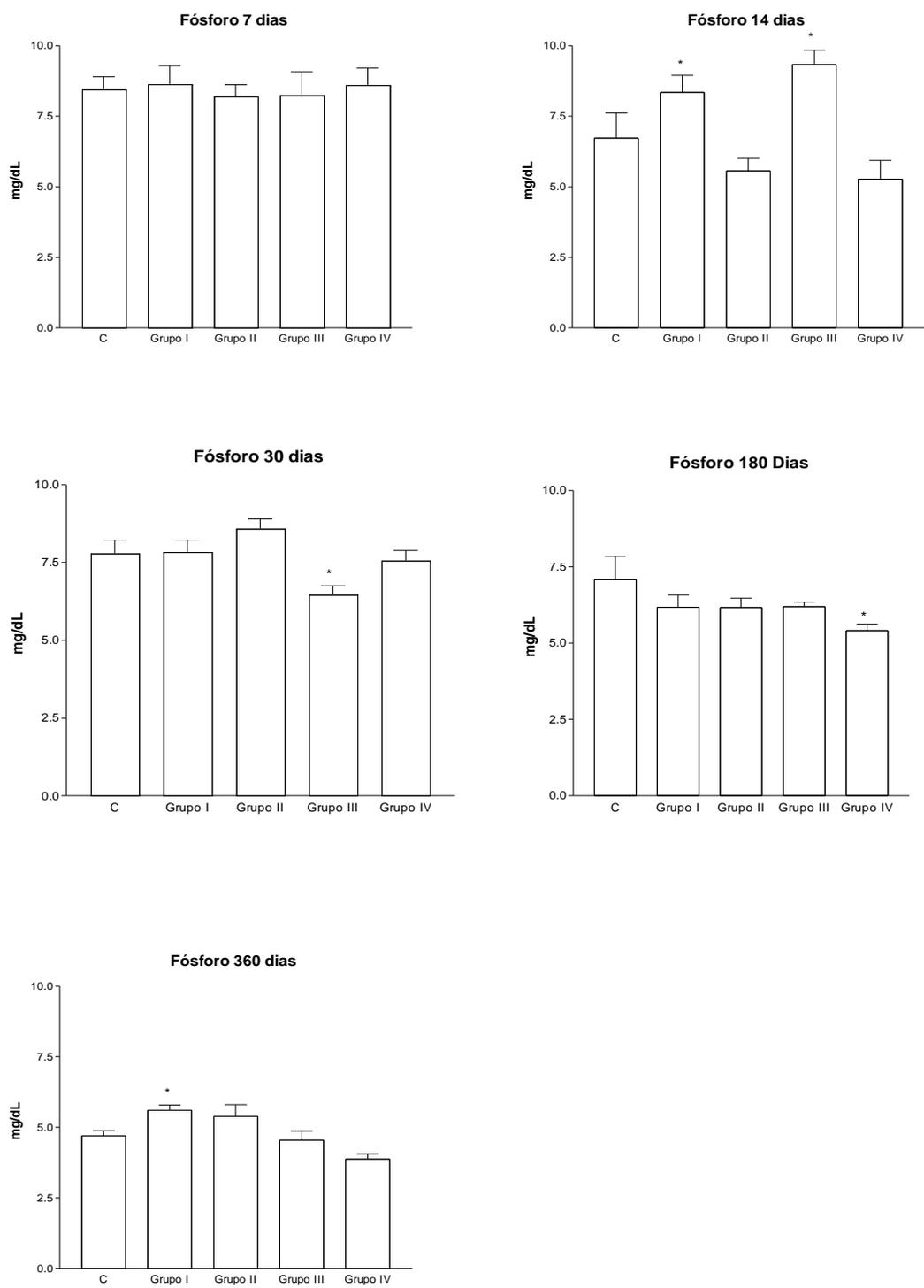
Tendo em vista que a concentração plasmática de fosfato aumenta na insuficiência renal aguda e, progressivamente, nos estágios mais avançados da Insuficiência Renal Crônica (IRC), os níveis de fósforo (Tabela 5.4 e Figura 5.4) também foram investigados.

A concentração sanguínea do fósforo nos animais, após sete dias de implantação, não apresentou alteração quando comparado com o controle. Para o período seguinte (14 dias), o Grupo I e III exibiram resultados superiores ao controle (6,73 mg/dL  $\pm$  1,53), sendo 8,34 mg/dL ( $\pm$  1,20) e 9,32 mg/dL ( $\pm$  0,90), respectivamente. Aos trinta e cento e oitenta dias, o Grupo III e o Grupo IV, apresentaram níveis inferiores ao controle. Após trezentos e sessenta dias não há alteração significativa, com base em todas as análises realizadas no estudo.

Não foram encontrados estudos em ratos que referenciem os níveis de normalidade para este marcador, como em quatorze dias o Grupo I e III não apresentou níveis de creatinina, ureia e ácido úrico elevados, o aumento da dosagem de fósforo nestes grupos não sugerem uma alteração renal.

**Tabela 5. 4** - Média e desvio padrão do Fósforo (mg/dL) analisados após os períodos de implantação *in vivo* do biomaterial. GI: blenda de PCL; GII: Blenda de PCL/HAp; GIII: Blenda de PCL/TCH; GIV: Blenda de PCL/TCH/HAp. \* diferente estatisticamente do controle.

Dosagem	C	GI	GII	GIII	GIV
<b>Fósforo 7 Dias</b>	8.45 $\pm$ 1,28	8.64 $\pm$ 1.13*	8.19 $\pm$ 1,03	8,24 $\pm$ 1,86*	8,60 $\pm$ 1,03
<b>Fósforo 14 Dias</b>	6,73 $\pm$ 1,53	8,34 $\pm$ 1,20	5,56 $\pm$ 0,88	9,32 $\pm$ 0,90	5,29 $\pm$ 1,33
<b>Fósforo 30 Dias</b>	7,80 $\pm$ 0,85	7,84 $\pm$ 0,77	8,59 $\pm$ 0,62	6,47 $\pm$ 0,64*	7,57 $\pm$ 0,73
<b>Fósforo 180 Dias</b>	7,08 $\pm$ 1,71	6,17 $\pm$ 0,9	6,16 $\pm$ 0,70	6,20 $\pm$ 0,29	5,41 $\pm$ 0,47*
<b>Fósforo 360 Dias</b>	4,70 $\pm$ 0,3	5,60 $\pm$ 0,42*	5,38 $\pm$ 0,93	4,55 $\pm$ 0,72	3,87 $\pm$ 0,32

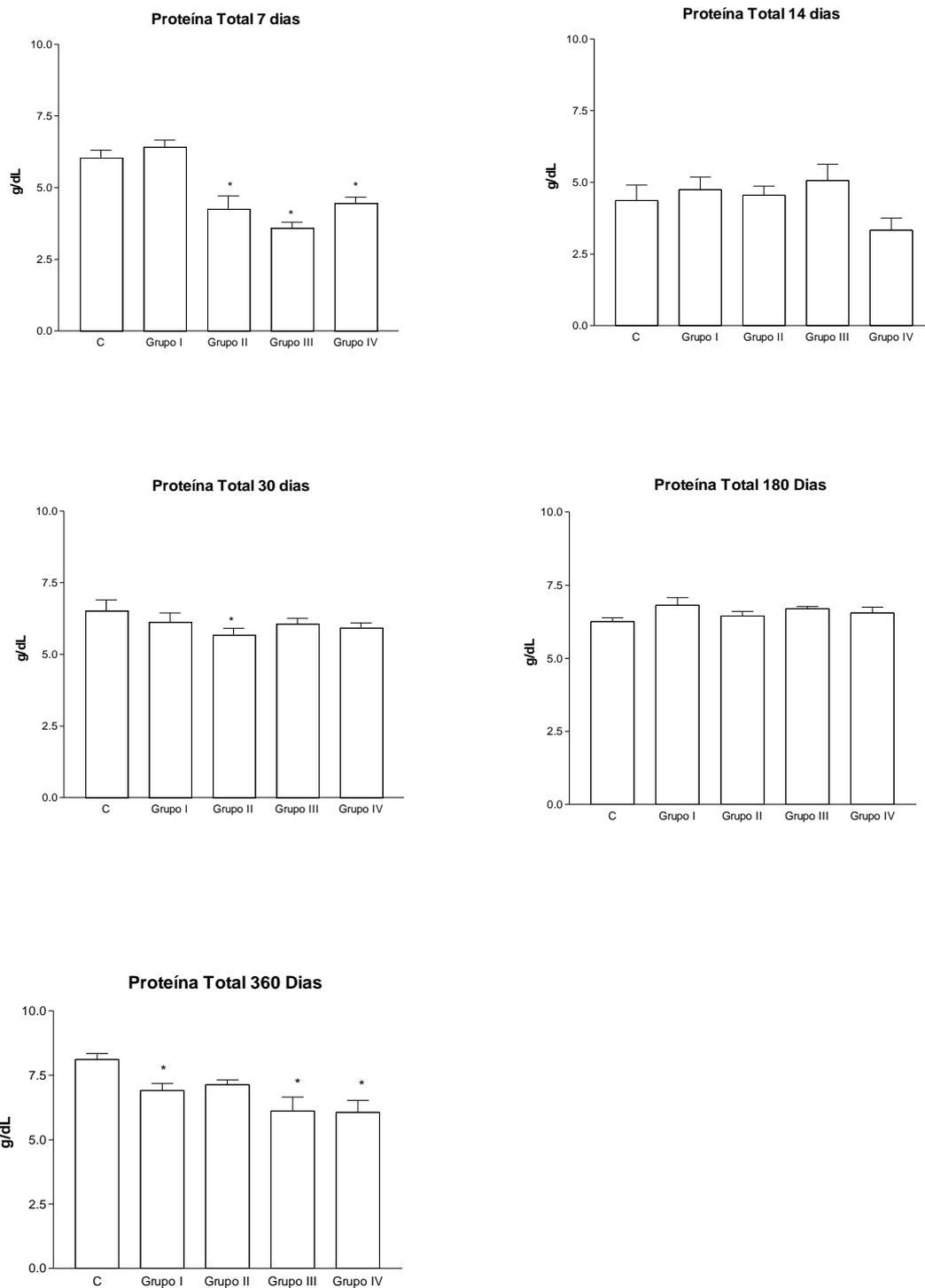


**Figura 5. 4** - Níveis séricos de fósforo após os períodos de implantação do biomaterial nos animais. . Grupo I: blenda de PCL; Grupo II: Blenda de PCL/HAP; Grupo III: Blenda de PCL/TCH; Grupo IV: Blenda de PCL/TCH/HAP \*: diferente estatisticamente do controle.

No presente estudo, a dosagem das proteínas totais foi utilizada para avaliar tanto a função renal (KAMARUL *et al.*, 2014) quanto a hepática e poderá ser visualizada na Figura 5.5 e Tabela 5.5.

**Tabela 5. 5-** Média e desvio padrão de Proteínas Totais (g/dL) e analisados após os períodos de implantação *in vivo* do biomaterial. GI: blenda de PCL; GII: Blenda de PCL/HAp; GIII: Blenda de PCL/TCH; GIV: Blenda de PCL/TCH/HAp. \* diferente estatisticamente do controle.

<b>Dosagem</b>	<b>C</b>	<b>GI</b>	<b>GII</b>	<b>GIII</b>	<b>GIV</b>
<b>Proteínas T 7 Dias</b>	6,05 ± 0,71	6,43 ± 0,57	4,26 ± 1,01*	3,60 ± 0,39*	4,47 ± 0,34*
<b>Proteínas T 14 Dias</b>	4,37 ± 1,08	4,74 ± 0,88	4,55 ± 0,71	5,06 ± 0,98	3,33 ± 0,84
<b>Proteínas T 30 Dias</b>	6,53 ± 0,76	6,13 ± 0,63	5,89 ± 0,50*	6,08 ± 0,41	5,93 ± 0,32
<b>Proteínas T 180 Dias</b>	6,26 ± 0,27	6,82 ± 0,59	6,4 ± 0,36	6,70 ± 0,15	6,5 ± 0,43
<b>Proteínas T 360 Dias</b>	8,11 ± 0,52	6,90 ± 0,62*	7,13 ± 0,42	6,11 ± 1,22*	6,06 ± 0,93*



**Figura 5. 5-** Níveis séricos de proteína total após os períodos de implantação do biomaterial nos animais. . Grupo I: blenda de PCL; Grupo II: Blenda de PCL/HAp; Grupo III: Blenda de PCL/TCH; Grupo IV: Blenda de PCL/TCH/HAp \*: diferente estatisticamente do controle.

Após sete dias de implantação os Grupos II, III e IV apresentaram resultados inferiores ao controle. A redução dos níveis de proteínas, geralmente, pode estar relacionada como consequência das perdas sanguíneas, deficiências nutricionais e debilitação orgânica, o que indica que estes resultados possam estar relacionados com o período pós-operatório a qual os animais foram submetidos. Para o período seguinte, nenhuma alteração foi observada. Após trinta dias apenas o Grupo II se diferenciou do controle, apresentando resultados inferiores.

Aos cento e oitenta dias, não houve alteração dos resultados. Aos trezentos e sessenta dias foi observado que todos os grupos apresentaram resultados inferiores ao grupo controle. Se analisarmos os grupos controles dos períodos anteriores, podemos observar que neste período houve um aumento de seu índice, o que pode ter acarretado na diferenciação dos resultados.

De forma geral, estes resultados (aos 360 dias) não indicam alteração para os níveis de proteína total, pois mesmo os resultados que se diferenciaram do controle, encontram-se dentro das faixas de referência de normalidade, encontrados em estudos científicos: 6,1g/dL  $\pm$  1,4 (Adulto) (HOOPER *et al.*, 2007); 6,55 1g/dL  $\pm$  2,3 (ORLANDINI, 2012); 6,51g/dL  $\pm$  3,02 (KAMARUL *et al.*, 2014) ; 6,21g/dL  $\pm$  0,26 (MELO *et al.*, 2012) ; 5,751g/dL  $\pm$  0,87 (LIMA *et al.*, 2014), ou dentro da média apresentada no próprio estudo.

As quantificações de proteínas totais e albumina são frequentemente incluídas nos amplos painéis de perfil bioquímicos, sendo o painel da função hepática composto de proteínas totais e albumina e o painel da função renal incluído a albumina (HENRY, 2009).

Considerando que a produção da albumina ocorre no fígado e que danos mais graves nos rins acarretarão à passagem da albumina para urina, sua dosagem é frequentemente utilizada como parâmetro para avaliação da função renal e hepática. As doenças hepáticas e renais geralmente apresentam níveis plasmáticos diminuídos deste marcador. A concentração de albumina dosada no estudo está demonstrada na Tabela 5.6 e Figura 5.6.

Para o primeiro período de avaliação (sete dias), os níveis de albumina apresentaram valores normais, quando comparado com o controle. Após quatorze dias, foi observado que os Grupos I, II e III exibiram resultados superiores ao grupo controle (1,62g/dL  $\pm$  0,37), apresentando valores de 2,14 g/dL ( $\pm$  0,37), 2,11 g/dL ( $\pm$  0,40) e 2,46 g/dL ( $\pm$  0,41), respectivamente. Percebe-se que apesar de estar maior que o controle, se assemelha ao período anterior (sete dias).

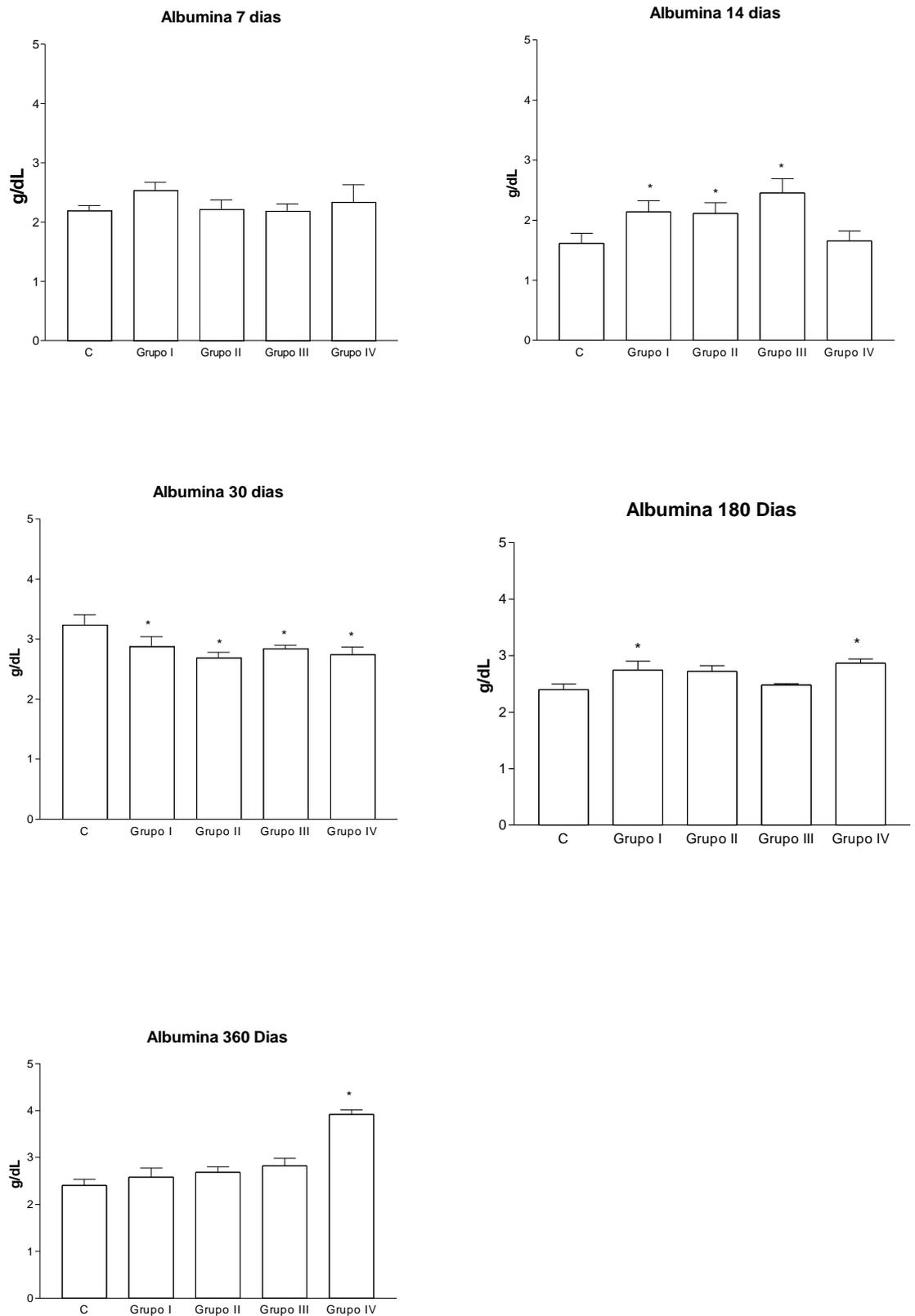
**Tabela 5. 6** - Média e desvio padrão de Albumina (g/dL) analisados após os períodos de implantação *in vivo* do biomaterial. GI: blenda de PCL; GII: Blenda de PCL/HAp; GIII: Blenda de PCL/TCH; GIV: Blenda de PCL/TCH/HAp. \* diferente estatisticamente do controle.

<b>Dosagem</b>	<b>C</b>	<b>GI</b>	<b>GII</b>	<b>GIII</b>	<b>GIV</b>
<b>Albumina 7 Dias</b>	2,20 ± 0,21	2,54 ± 0,29	2,22 ± 0,37	2,20 ± 0,27	2,34 ± 0,57
<b>Albumina 14 Dias</b>	1,62 ± 0,37	2,14 ± 0,37*	2,11 ± 0,40*	2,46 ± 0,41*	1,65 ± 0,37
<b>Albumina 30 Dias</b>	3,24 ± 0,28	2,88 ± 0,32*	2,69 ± 0,19*	2,84 ± 0,12*	2,75 ± 0,26*
<b>Albumina 180 Dias</b>	2,39 ± 0,22	2,74 ± 0,35*	2,72 ± 0,22	2,48 ± 0,04	2,86 ± 0,16*
<b>Albumina 360 Dias</b>	2,40 ± 0,25	2,58 ± 0,43	2,68 ± 0,27	2,82 ± 0,36	3,92 ± 0,17*

Após trinta dias, todos os grupos exibiram resultados inferiores ao controle, mas, relacionados com algumas literaturas consultadas, estes dados encontram-se dentro dos níveis de normalidade (2,65 ± 0,30 (MELO *et al.*, 2012); 3,0 ± 0,12 (LIMA *et al.*, 2014)) e indicam ser devido ao aumento do controle, quando comparado com os outros períodos.

Para avaliação de possíveis alterações crônicas (período de 180 e 360 dias) foi observado que, no período de 180 dias o Grupo I (2,74g/dL ± 0,35) e o Grupo IV (2,86 ± 0,16), demonstraram resultados superiores ao controle (2,39 ± 0,22). Para o período de 360 dias, apenas o Grupo IV apresentou diferenciação do controle (2,40 g/dL ± 0,25) apresentando resultados de 3,92 g/dL (± 0,17).

De forma geral, pode ser observado que as dosagens observadas para todos os períodos variaram entre 2,0 e 3,0 g/dL. Ao se observar os valores de referência para normalidade dos níveis de albumina encontrados na literatura científica para ratos Wistar (HOOPER *et al.*, 2007; ORLANDINI, 2012; MELO *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2014), constata-se que os índices variaram entre 2,0 e 4,0 g/dL (Tabela 2.1, p.45) e até com resultados inferiores (1,017± 1,17) (KAMARUL *et al.*, 2014).



**Figura 5. 6** - Níveis séricos da albumina após os períodos de implantação do biomaterial nos animais. . Grupo I: blenda de PCL; Grupo II: Blenda de PCL/HAp; Grupo III: Blenda de PCL/TCH; Grupo IV: Blenda de PCL/TCH/HAp \*: diferente estatisticamente do controle.

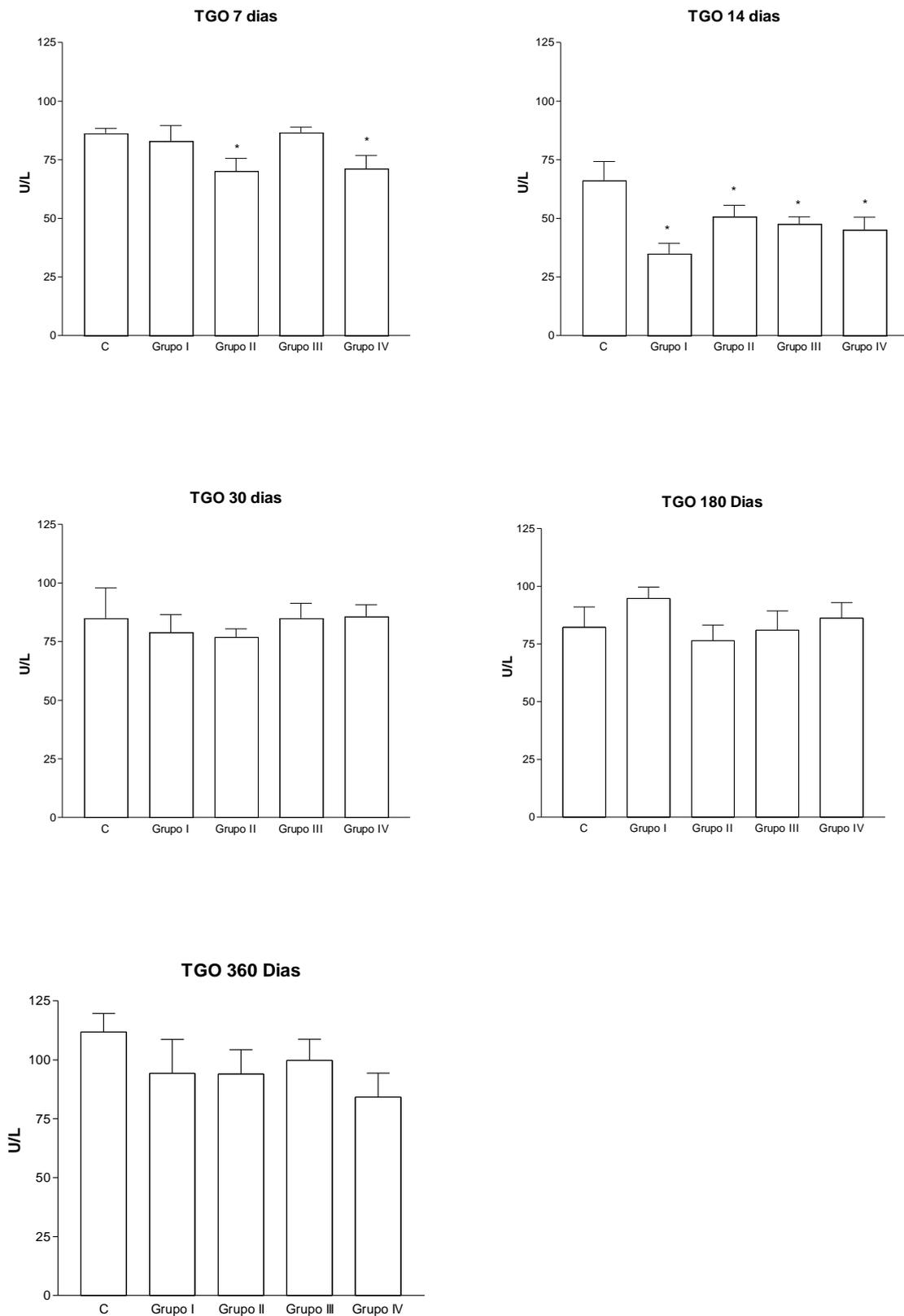
O sinal característico de lesão hepatocelular aguda é o aumento das transaminases, tipicamente em mais de oito vezes os valores de referência limites (HENRY, 2008). Com a intenção de analisar o funcionamento do fígado e possíveis alterações hepatotóxicas, foram dosadas as enzimas hepáticas TGO/AST e TGP/ALP. Os resultados para o TGO podem ser visualizados na Tabela 5.7 e Figura 5.7.

**Tabela 5. 7** - Média e desvio padrão de TGO (U/L), analisado após os períodos de implantação *in vivo* do biomaterial. GI: blenda de PCL; GII: Blenda de PCL/HAp;GIII: Blenda de PCL/TCH; GIV: Blenda de PCL/TCH/HAp.\* diferente estatisticamente do controle.

Dosagem	C	GI	GII	GIII	GIV
<b>TGO 7 Dias</b>	86,20 ± 4,87	83,0 ± 14,68	70,25 ± 10,69*	86,60 ± 5,22	71,25 ± 11,09*
<b>TGO 14 Dias</b>	66,25 ± 15,92	35,00 ± 7,55*	50,75 ± 9,53*	47,67 ± 5,13*	45,20 ± 11,95*
<b>TGO 30 Dias</b>	85,00 ± 22,27	79,0 ± 14,90	77,00 ± 7,58	85,00 ± 14,09	85,75 ± 9,95
<b>TGO 180 Dias</b>	82,2 ± 26,54	94,7 ± 9,84	76,5 ± 13,53	81,0 ± 14,42	86,2 ± 14,92
<b>TGO 360 Dias</b>	111,8 ± 17,58	98,5 ± 21,27	94,0 ± 20,64	99,8 ± 20,2	84,2 ± 0,14

Para o primeiro período de análise (sete dias) observou-se que os níveis de TGO para os Grupos II e IV foram inferiores ao controle. Após 14 dias, os resultados foram semelhantes ao controle, observando que houve uma redução de todos os resultados com relação ao período anterior. Depois dos 30 dias, nenhum dos grupos se diferenciou do controle e os resultados se elevaram um pouco, ficando próximo das dosagens de sete dias. Para os períodos subsequentes (180 e 360 Dias), não houve alteração dos resultados, quando comparados com o controle. Pode ser observado que após os trezentos e sessenta dias houve uma elevação dos níveis de TGO, quando comparados com os períodos anteriores. Percebe-se que os valores obtidos no presente estudo encontram-se dentro dos níveis de normalidade referenciados na literatura para este marcador (HOOPER *et al.*, 2007; ORLANDINI, 2012; MELO *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2014; KAMARUL *et al.*, 2014).

É importante observar que danos hepáticos são caracterizados por aumento na dosagem sanguínea das transaminases e, em nosso estudo, as alterações observadas para o TGO consistiam em resultados inferiores do marcador, quando comparado com o controle, não indicando, desta forma, alterações hepáticas.



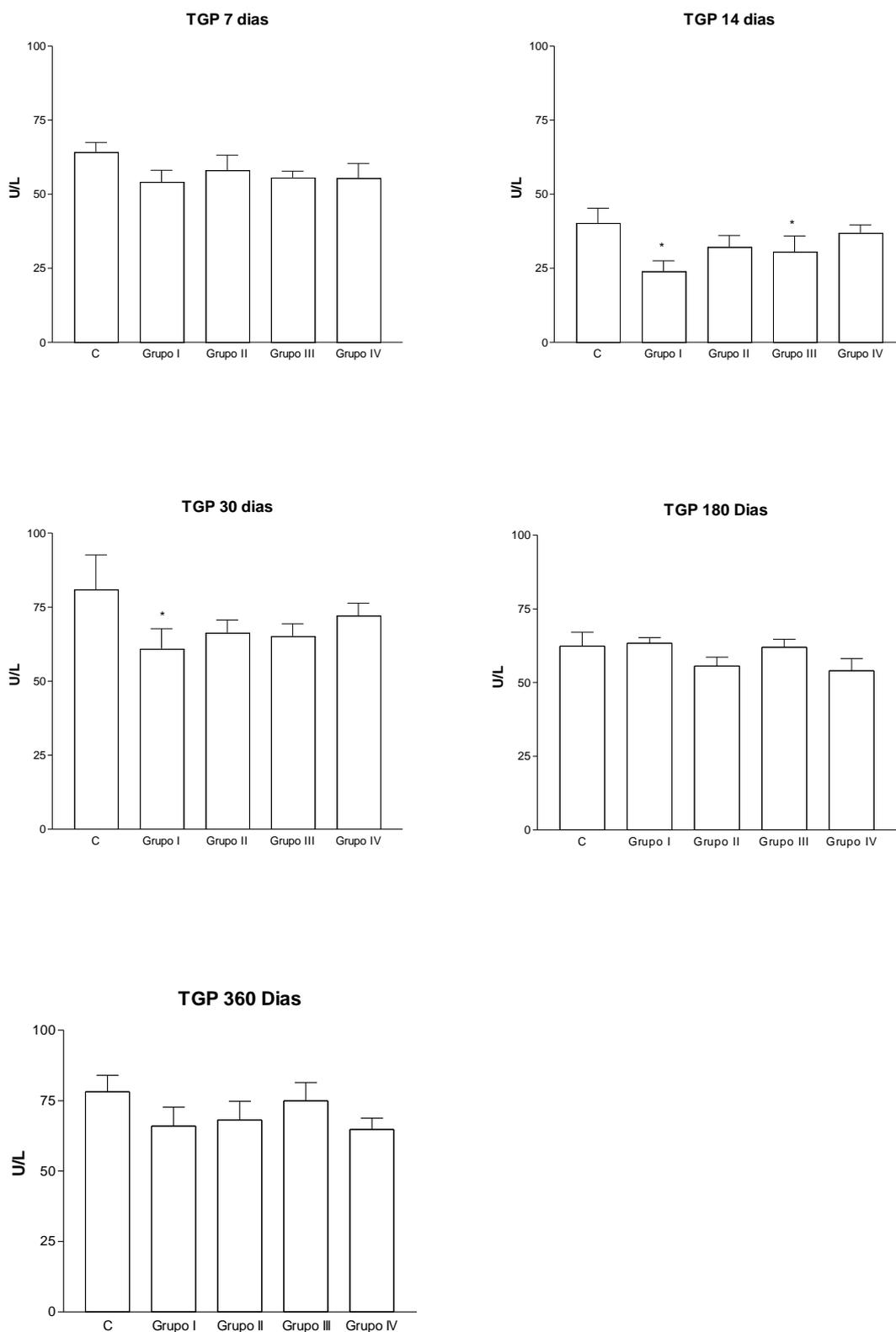
**Figura 5. 7-** Níveis séricos do TGO após os períodos de implantação do biomaterial nos animais. . Grupo I: blenda de PCL; Grupo II: Blenda de PCL/HAp; Grupo III: Blenda de PCL/TCH; Grupo IV: Blenda de PCL/TCH/HAp \*: diferente estatisticamente do controle.

A dosagem do TGP (Tabela 5.8 e Figura 5.8), após sete dias, apresentou níveis semelhantes ao controle. No período seguinte (14 dias), foram observados os resultados do Grupo I e III se diferenciando do controle com redução dos valores. Após trinta dias, os valores também se reestabelecem, se diferenciando do controle apenas o Grupo I, que demonstrou resultados inferiores. Para os tempos mais longos (180 e 360 dias) não foi observada diferenciação com seus respectivos controles.

**Tabela 5. 8** - Média e desvio padrão de TGP (U/L), analisado após os períodos de implantação *in vivo* do biomaterial. GI: blenda de PCL; GII: Blenda de PCL/HAp; GIII: Blenda de PCL/TCH; GIV: Blenda de PCL/TCH/HAp.\* diferente estatisticamente do controle.

<b>Dosagem</b>	<b>C</b>	<b>GI</b>	<b>GII</b>	<b>GIII</b>	<b>GIV</b>
<b>TGP 7 Dias</b>	64,25 ± 6,39	54,25 ± 7,59	58,20 ± 11,19	55,60 ± 5,00	55,50 ± 9,81
<b>TGP 14 Dias</b>	40,33 ± 8,50	24,0 ± 6,1*	32,25 ± 7,63	30,67 ± 9,67*	37,0 ± 5,34
<b>TGP 30 dias</b>	81,00 ± 20,07	61,0 ± 11,53*	66,40 ± 9,50	65,20 ± 9,34	72,00 ± 9,20
<b>TGP 180 Dias</b>	62,40 ± 10,45	63,4 ± 4,1	55,6 ± 6,7	62,0 ± 5,3	54,0 ± 9,3
<b>TGP 360 Dias</b>	78,2 ± 13,0	66,0 ± 15,0	68,2 ± 14,6	75,0 ± 12,9	64,75 ± 8,06

Com base nos resultados obtidos e na literatura consultada (44,5 U/L ± 10,4 (2 meses) (ZANG *et al.*, 2004); 33 U/L (24-49) (2 a 3 meses) (BOEHM *et al.*, 2007); 68,6 U/L ± 5,6 (Jovem) (HOOPER *et al.*, 2007) ;71,00 IU/L ± 4,24 ( KAMARUL *et al* , 2014) constatou-se que para todos os períodos de análise os dados obtidos, para análise de TGP, encontraram-se ou dentro da média de dispersão estatística estabelecida no estudo ou dentro dos valores de normalidade consultados ou um pouco maior que estes. Para os resultados superiores, observa-se que este fato é acompanhado pelo grupo controle, o que nos indica que este aumento não esteja relacionado ao polímero em estudo.



**Figura 5. 8** - Níveis séricos do TGP após os períodos de implantação do biomaterial nos animais. . Grupo I: blenda de PCL; Grupo II: Blenda de PCL/HAp; Grupo III: Blenda de PCL/TCH; Grupo IV: Blenda de PCL/TCH/HAp \*: diferente estatisticamente do controle.

A avaliação biológica leva em consideração a absorção por diferentes vias e rotas de exposição de um agente químico, permitindo avaliar a exposição global do indivíduo, fornecendo conhecimentos e evidências científicas necessárias para a aplicação de medidas de prevenção e controle da exposição aos agentes (AMORIN, 2003). Desta forma, se observa que os valores encontrados para as dosagens séricas dos marcadores renais e hepáticos avaliados no estudo, após os determinados períodos de implantação, indicam que os implantes não demonstraram dano renal e hepático, passível de detecção por análise sanguínea. Se observarmos os grupos de forma geral, não foram detectadas alterações que determinem uma diferenciação entre os mesmos, as alterações foram aleatórias.

Ressalta-se a importância da avaliação toxicológica para demonstrar a segurança sistêmica de biomateriais. Neste sentido, Kamarul *et al.* (2014) avaliou a biocompatibilidade *in vivo* de arcabouços sintéticos de PVA/NOCC, através de parâmetros bioquímicos, hematológicos, tecidual e imunohistoquímico, em três períodos distintos (5,10 e 15 dias) após implantação subcutânea em ratos. Os marcadores bioquímicos investigados foram potássio, ureia, creatinina, proteínas totais, albumina, globulina, ALT, AST e GGT. No quinto dia, quando comparados com o grupo controle, os ratos implantados com PVA / NOCC apresentaram alterações significativas ( $P < 0,05$ ) em todos os parâmetros bioquímicos, exceto para os níveis de albumina. No décimo dia, quando comparados com o controle, os ratos implantados com PVA / NOCC apresentaram alterações significativas nos níveis de GGT, ALP, ureia e potássio. No décimo quinto dia, quando comparado ao controle, a implantação de PVA / NOCC induziu alterações significativas nos níveis de potássio, ureia, ALP, ALT, AST, GGT, creatinina ( $P < 0,05$ ). Os resultados do estudo demonstraram sinais de toxicidade de PVA / NOCC, no que diz respeito à biocompatibilidade, embora a implantação de PVA / NOCC tenha produzido baixa resposta tecidual tóxica, não sendo determinado se a reação inflamatória é clinicamente significativa. Concluindo, portanto, que estudos adicionais são necessários para investigar tais biomateriais por causa de algumas possíveis preocupações em seu uso. Para esta linhagem, a disponibilidade de valores de referência para os biomarcadores é escassa, observa-se que a maioria dos estudos são antigos, avaliam um número reduzido de animais, não descrevem a metodologia utilizada ou, ainda, não fornecem todas as informações necessárias.

Higashisaka *et al.* (2011), consideram que as proteínas de fase aguda são biomarcadores para prever risco de doença inflamatória, doenças cardiovasculares e câncer após exposição por nanomateriais. Em seu estudo avaliaram as alterações da expressão de proteína de fase aguda (haptoglobina, proteína C-reativa (CRP) e amilóide sérico A (SAA))

no plasma após o tratamento com nanopartículas de sílica. Os resultados do ELISA mostraram que as proteínas foram significativamente aumentadas no plasma de camundongos expostos ao material sugerindo que a haptoglobina, CRP e SAA são biomarcadores altamente sensíveis e úteis para analisar o risco da exposição à nanomateriais e sua toxicidade. Ainda afirmam que tal informação seria vital para o futuro desenvolvimento de testes preditivos para avaliação da toxicidade potencial de novos nanomateriais com base em suas características físico-químicas.

O conhecimento do perfil bioquímico sérico de animais saudáveis é fundamental para a avaliação da homeostasia, das modificações induzidas por processos patológicos e dos resultados obtidos nos procedimentos experimentais. Estes valores têm norteado as pesquisas experimentais na busca de fornecer informações que subsidiam a relação entre resultados obtidos em animais saudáveis, doentes e tratados, permitindo discutir os dados obtidos e confirmar a eficácia ou não de determinada terapia ou intervenção clínica (LIMA *et al.*, 2014).

Observa-se que são escassas as pesquisas que estabelecem valores de referência para as provas bioquímicas, envolvidas na avaliação função renal e hepática, para os ratos Wistar criados no nosso país. Desta forma, o principal parâmetro para investigação de possíveis alterações nas dosagens sanguíneas dos animais em estudo foi o próprio grupo controle.

Ressalta-se que a comparação direta com resultados citados na literatura, na maioria das vezes, não é viável, pois se sabem que os valores hematológicos e bioquímicos de ratos são influenciados por vários fatores, relacionados com gênero, linhagem e genótipo e também podem ser influenciados pela idade, sexo, método de contenção e coleta de material, anestesia e nível de estresse (ORLANDINI, 2012; MELO *et al.*, 2012).

Desta forma, é imprescindível estabelecer, para cada estudo, os respectivos valores de referência dos animais normais (controle), garantindo que os animais pertençam à mesma linhagem, gênero e idade. Estes devem ser submetidos aos mesmos procedimentos, com a diferença que não receberão o material a ser estudado. De acordo com Peterino e Argentino-Storin (2006), para investigação de possíveis alterações, os resultados obtidos são comparados aos dos grupos controles do estudo e/ou aos valores de referência da literatura, sendo essenciais para interpretação.

Para uma abordagem mais significativa e considerando que para determinados marcadores bioquímicos o intervalo de variação de normalidade é amplo, também foram utilizados alguns valores de referência encontrados na literatura, para a mesma espécie dos

animais. Em alguns casos, não foi possível encontrar dados para todos os períodos do estudo em questão.

Em um estudo realizado por Hirsch *et al.* (2014) que avaliou o desempenho *in vivo* de arcabouços tridimensionais de polímero PCL, através do seu implante nos tecidos subcutâneos do dorso e na calvária de ratos, bem como a reação dos rins, pulmões e fígado após implantação. Observou-se que quanto à citotoxicidade sistêmica, avaliada através da análise dos eventos ocorridos nos rins, pulmões e fígado dos animais, a implantação do PCL no dorso dos ratos não promoveu alterações teciduais danosas nestes órgãos. Não sendo observada a presença de processo inflamatório, hiperplasia, metaplasia, displasia ou hemorragia. Resaltando os relatos científicos que afirmam a biocompatibilidade do PCL.

Diversos requisitos são necessários para que o material possa ser utilizado como dispositivo na área biomédica, sendo a interação apresentada pela interface polímero/tecido uma das características desejáveis no sucesso de um implante. Avaliar este tipo de resposta é bastante relevante para tornar efetiva a utilização de um material na área médica (MINATA *et al.*, 2013).

A implantação de um biomaterial, inevitavelmente, é sempre acompanhada por uma lesão tecidual decorrente do procedimento cirúrgico e da introdução de um material estranho no organismo, que inicia uma resposta inflamatória conhecida como reação de corpo estranho. Esta resposta é seguida pela formação de uma matriz provisória, que contém agentes bioativos que controlam o processo de cicatrização da ferida. Para o biomaterial implantado a reação tecidual é mais avançada e pode apresentar uma resposta inflamatória aguda, que é normalmente resolvido em menos de uma semana. Caso não desapareça, progride para uma inflamação crônica (ANDERSON *et al.*, 2008).

No momento de retirada das amostras implantadas após sete dias de estudo, observou-se que em todos os animais o implante foi encontrado no local de origem, em 89,65% dos animais, o implante foi encontrado íntegro, e não foi observada cápsula envolvendo o implante. Visualmente pode-se observar que 55,17% não apresentou rubor, 6,9% apresentou edema e em apenas 3,45% o tecido adjacente ao material implantado apresentou pus. Foram consideradas íntegras, as pastilhas que conseguiram manter sua forma, não se fragmentaram.

Após 14 dias todos os implantes estavam presentes no local de origem, íntegros e apresentando um tecido envolvendo a pastilha. Foi notado que os tecidos das áreas dos implantes apresentavam aspecto usual sem sinais inflamatórios, onde não foi observado rubor, edema e infecção no tecido subcutâneo em contato com o implante.

Para o período seguinte de investigação (30 dias), mantiveram-se todas as características observadas no período anterior, com a diferença que os implantes estavam envolvidos mais intensamente por um tecido de difícil remoção. Alguns autores relatam a presença de uma cápsula de fibrose descrita ao redor do material implantado. Esta capsula de fibrose nada mais é do que a resposta final do organismo a um corpo estranho de natureza não imunológica (MINATA *et al.*, 2013).

Com o passar do tempo, se tal material for totalmente reabsorvido, as células gigantes remanescentes e a fibrose tenderão a também desaparecer restando uma cicatriz, pois no processo de implantação do biomaterial os tecidos foram lesados (KUMAR *et al.*, 2010).

Nos períodos de 180 e 360 dias, não foi observado, no tecido subcutâneo em contato com o implante, nenhum sinal que indicassem um processo inflamatório. Alguns animais apresentaram fragmentos do implante dentro do tecido subcutâneo, indicando biorreabsorção das pastilhas.

Devido ao número reduzido de publicações, principalmente, em relação a efeitos crônicos, aos quais são raramente investigadas, as análises bioquímicas utilizadas no estudo, como parâmetros biológicos de exposição aos biomateriais foram de extrema importância, devido ao fato de estarem diretamente relacionados aos efeitos na saúde, oferecendo uma melhor estimativa do risco, pois consideraram a absorção e excreção por diferentes vias e rotas de exposição, permitindo avaliar a resposta global no organismo. Desta forma, as análises empregadas permitiram avaliar a toxicidade sistêmica das blendas.

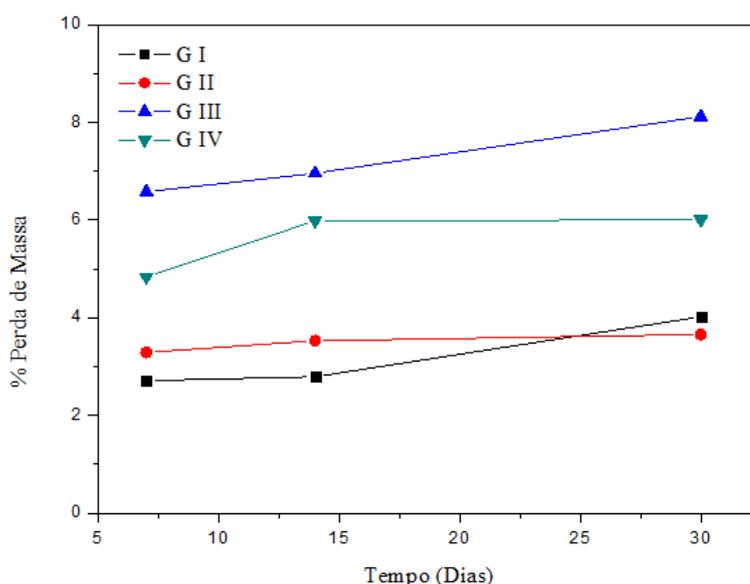
## 5.2 ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DAS BLENDA APÓS IMPLANTAÇÃO *IN VIVO* A PARTIR DA AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

### 5.2.1 Variação de Massa

Degradação do polímero é definida como "o produto químico resultando da reação de clivagem das ligações da cadeia principal produzindo oligômeros mais curto, monômeros, e / ou outros produtos de degradação com baixo peso molecular" (LAM *et al.*, 2009).

Quando se objetiva a produção de dispositivos implantáveis que degradem em uma taxa semelhante à taxa de formação/regeneração do tecido a ser reparado, é de primordial necessidade que se entenda o comportamento do material durante seu processo de degradação e a cinética envolvida neste processo (FERREIRA; MALMONGE, 2014).

Nos estudos de caracterização dos polímeros biorreabsorvíveis, a variação da massa é comumente utilizada para avaliar a degradação dos arcaouços. Desta forma, a degradação *in vivo* das blendas poliméricas implantadas subcutaneamente nos ratos, foram investigadas. A porcentagem de perda de massa apresentada para todos os grupos, nos períodos de 7, 14 e 30 dias podem ser visualizadas na Figura 5.9.



**Figura 5. 9** - % Perda de massa para o estudo de degradação *in vivo*.

Os Grupos I (Blenda de PCL), II (Blenda de PCL/HAp), III blenda (PCL/TCH), IV (Blenda de PCL/TCH/HAp), apresentaram perdas de 4,02%, 3,66%, 8,12% e 6,00%, respectivamente, após 30 dias de implantação *in vivo*. Podemos observar que o grupo que

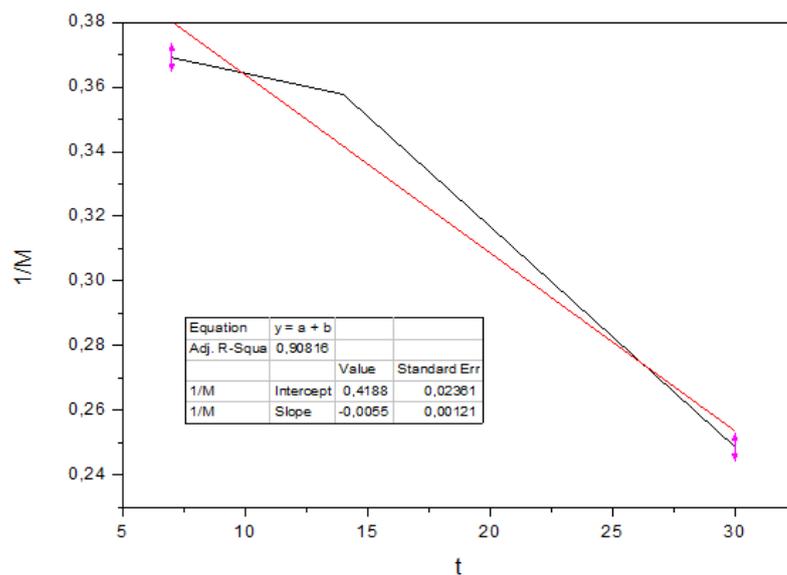
apresentou menor perda de massa foi o Grupo II, e o aumento observado para os Grupos III (8,12%) e IV (6,01%) deve-se a presença de TCH nas pastilhas, por ser um fármaco solúvel nos fluidos teciduais. O Grupo III apresenta em sua composição, uma maior porcentagem de TCH, justificando o fato de ter apresentado uma maior porcentagem de perda de massa, quando comparado com os demais grupos.

Percebe-se que nos Grupo II e III há uma redução na porcentagem de perda de massa no período de 30 dias, quando comparado ao período anterior, este fato pode estar relacionado com vestígios de tecido fibroso que envolvia a superfície externa do arcabouço e eram de difícil remoção, considerando que as pastilhas deveriam ser retiradas íntegras para as posteriores análises físico-químicas. Este fato também foi relatado por Seyednejad *et al.* (2012).

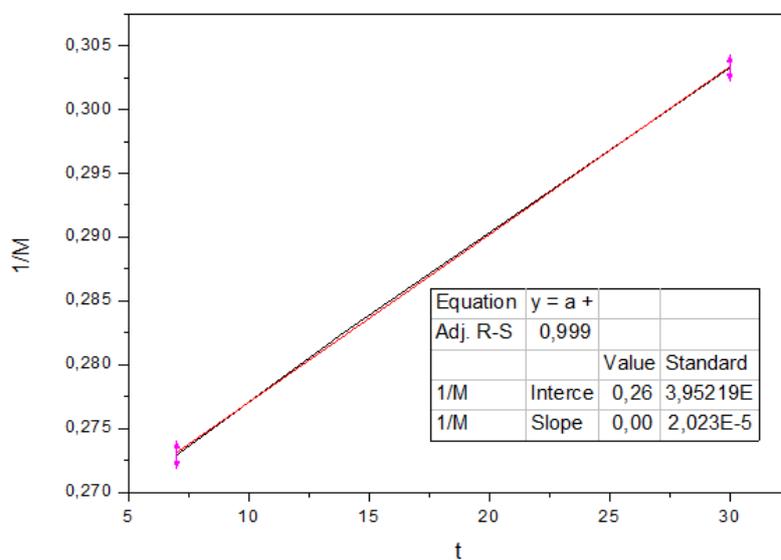
No estudo realizado por Seyednejad *et al.* (2012) que também avaliou a degradação de arcabouços de PCL após implantação subcutânea em ratos, observou-se que os arcabouços de PCL não sofreram nenhuma perda de massa durante os três meses de implantação. Já no estudo de Lam *et al.* (2009) após 6 meses de implantação *in vivo* o arcabouço de PCL apresentou uma perda de massa de 3%.

A cinética de degradação que estabelece o perfil de perda de massa para cada grupo pode ser visualizada nas Figuras a seguir (5.10 a 5.13). Todos os grupos apresentaram reação de segunda ordem, seguindo equação 03, onde  $M$  é a massa final (mg),  $K_c$  é a constante da cinética,  $t$  é o tempo (dias) e  $M_0$  é a massa inicial (mg).

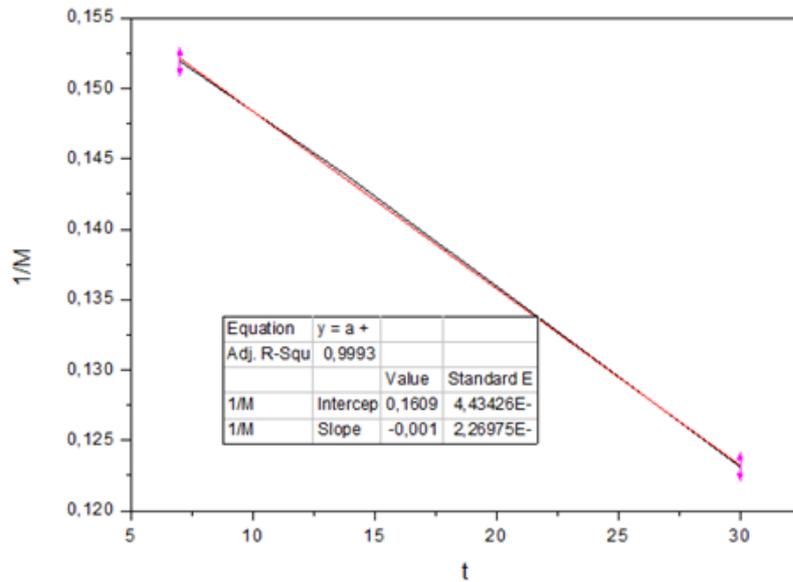
$$\frac{1}{M} = K_c t + \frac{1}{M_0} \quad (\text{Equação 03})$$



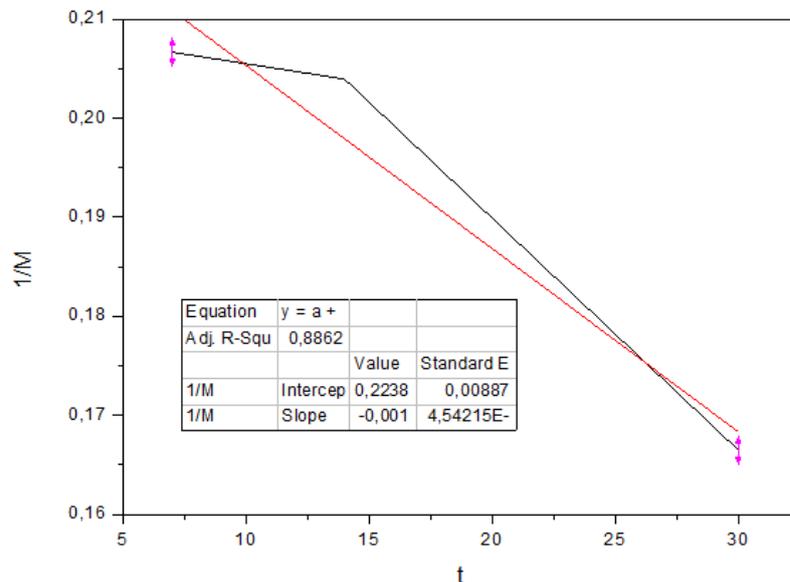
**Figura 5. 10** - Gráficos da Cinética de Degradação para o Grupo I (Blenda PCL).



**Figura 5. 11** - Gráficos da Cinética de Degradação para o Grupo II (Blenda PCL/HAp).



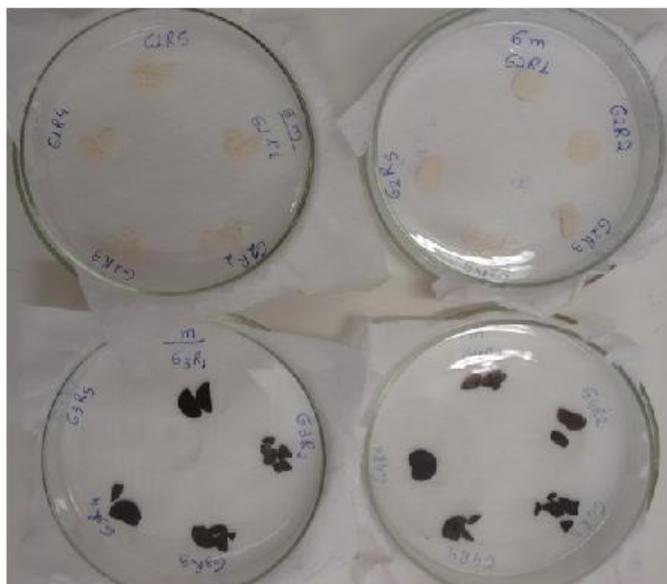
**Figura 5. 12** - Gráficos da Cinética de Degradação para o Grupo III (Blenda PCL/TCH).



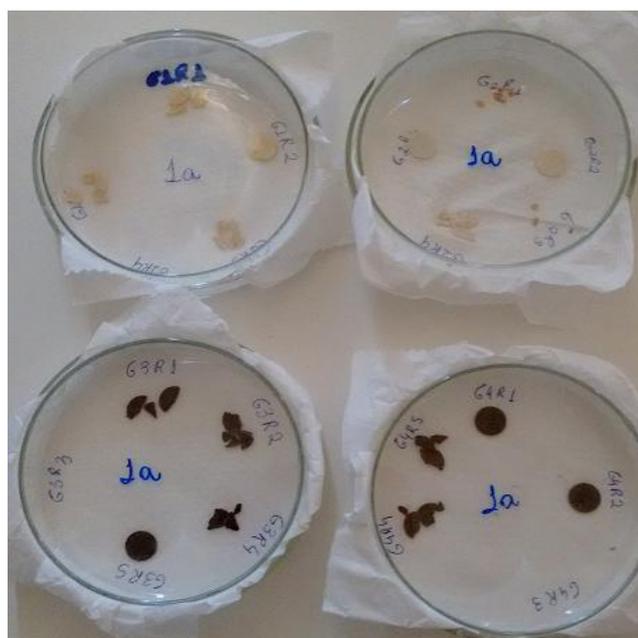
**Figura 5. 13** - Gráficos da Cinética de Degradação para o Grupo IV (Blenda PCL/HAp/TCH).

Após o período de 180 dias, a remoção das pastilhas foi mais difícil, devido ao longo tempo dentro do animal, elas estavam mais frágeis e mais impregnadas no tecido. Grande parte das amostras já se encontravam quebradas ou se despedaçavam no momento em que foram retiradas do animal, nem sempre foi possível retirar todos os pedaços do implante, 89,7% das pastilhas, disponíveis para análise encontravam-se fragmentadas. Desta forma, não foi possível calcular a variação de perda de massa de maneira fidedigna, devida ao número

reduzido de amostras inteiras e/ou a dificuldade de juntar todos os fragmentos das pastilhas. A seguir (Fig. 5.14) poderão ser visualizadas as imagens das pastilhas que foram retiradas do animal em ambos os períodos.



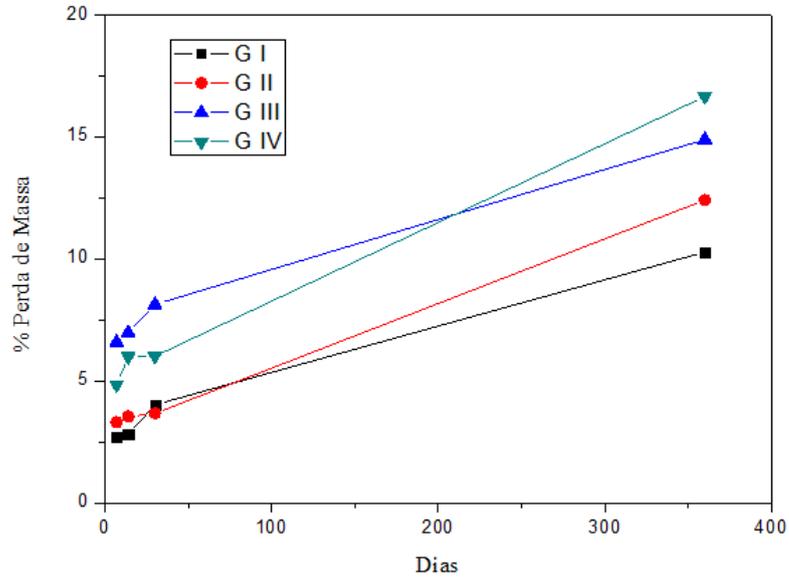
Após 180 dias



Após 360 dias

**Figura 5. 14** - Pastilhas retiradas do animal após 180 e 360 dias de implantação.

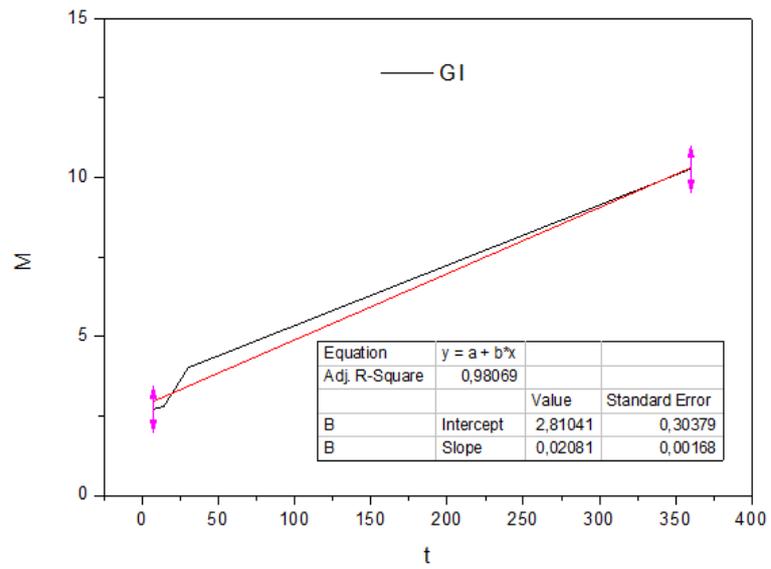
Após 360 dias, foi possível retirar as pastilhas sem que estas se partissem dentro do animal, algumas se fragmentaram no momento da limpeza e preparação das amostras para análise, sendo possível calcular a porcentagem de perda de massa. Para este período, duas pastilhas não foram encontradas nos animais. A variação de perda de massa para os Grupos I, II, III, IV foram, respectivamente, 10,27%, 12,38%, 14,88%, 16,65%, e poderá ser visualizada na Figura 5.15.



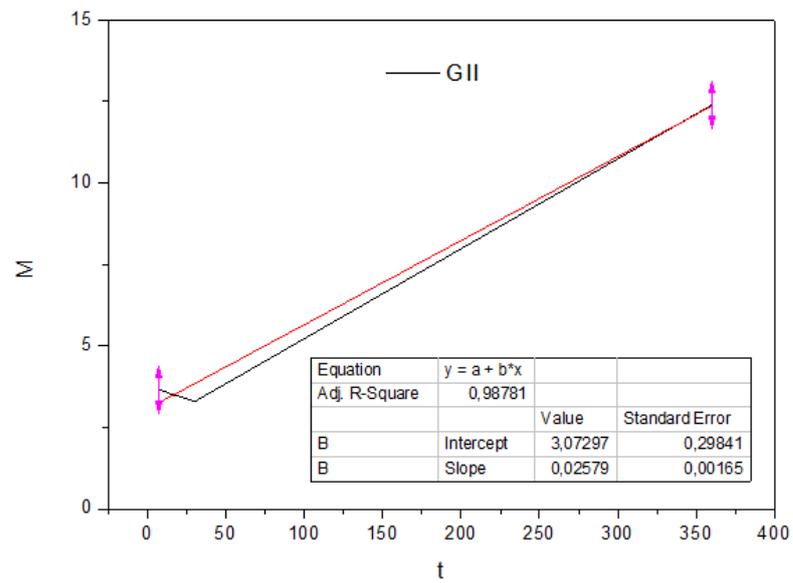
**Figura 5. 15** - % Perda de massa para o estudo de degradação *in vivo* após 360 dias.

A cinética de degradação após os trezentos e sessenta dias de implantação que estabelece o perfil de perda de massa para cada grupo pode ser visualizados nas figuras a seguir (5.16 a 5.19). Todos os grupos apresentaram reação de ordem zero, seguindo a equação 04, onde  $M$  é a massa final (mg),  $K_c$  é a constante da cinética,  $t$  é o tempo (dias) e  $M_0$  é a massa inicial (mg).

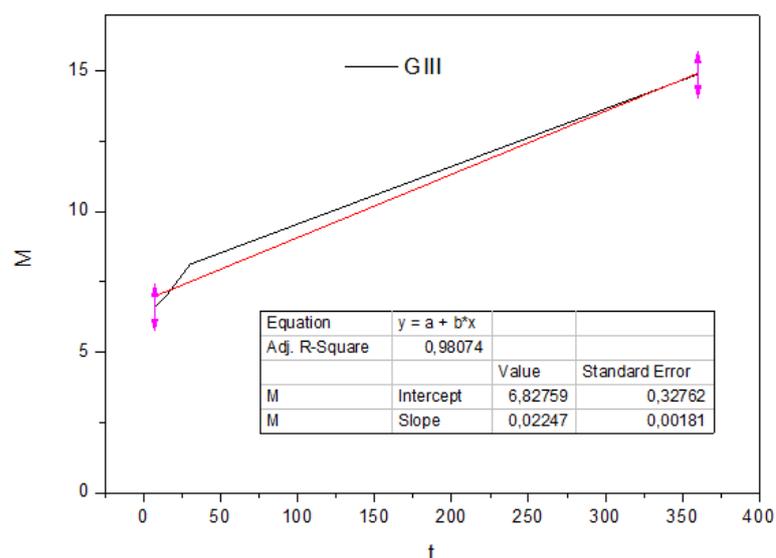
$$M = -K_c t + M_0 \quad \text{(Equação 04)}$$



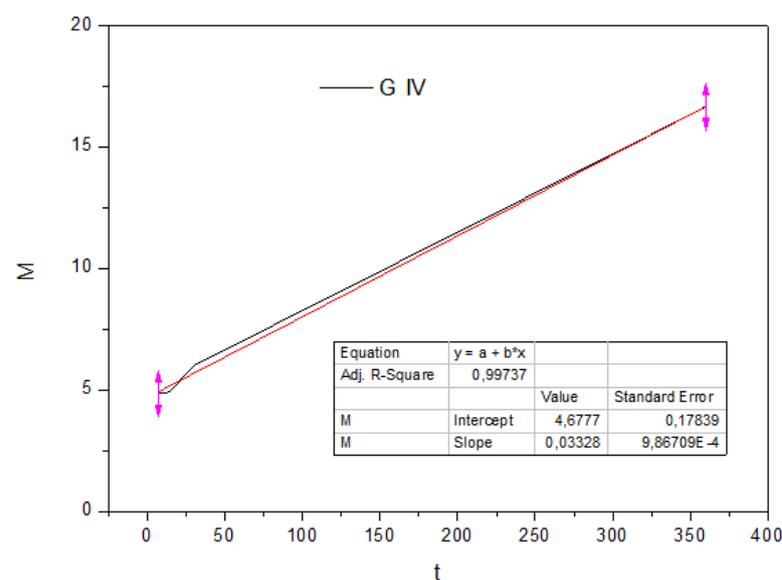
**Figura 5. 16** - Gráficos da Cinética de Degradação para o Grupo I (Blenda PCL).



**Figura 5. 17** - Gráficos da Cinética de Degradação para o Grupo II (Blenda PCL/HAp).



**Figura 5. 18** - Gráficos da Cinética de Degradação para o Grupo III (Blenda PCL/TCH).



**Figura 5. 19** - Gráficos da Cinética de Degradação para o Grupo IV (Blenda PCL/HAp/TCH).

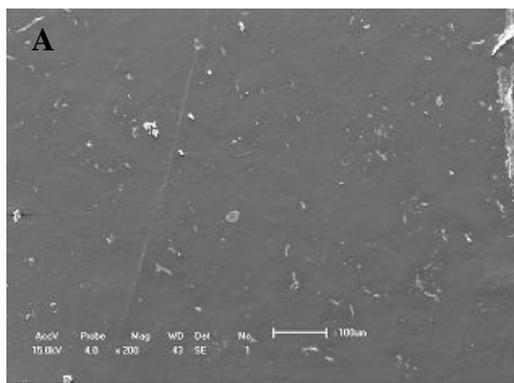
Ferreira e Malmonge (2014), realizaram as análises cinética e morfológica da degradação hidrolítica dos polímeros biorreabsorvíveis poli (hidroxibutirato-co-valerato) (PHBV), PCL e uma blenda polimérica destes dois polímeros (na composição 75/25 (PHBV/PCL)) através da comparação das amostras antes e após serem submetidos à degradação hidrolítica em solução tampão fosfato à 37°C durante tempos de incubação de 0,15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 dias. Para a análise morfológica utilizou-se de MEV e a análise cinética baseou-se nos resultados obtidos no ensaio de perda de massa. Os resultados alcançados levam a concluir que os polímeros biorreabsorvíveis estudados possuem

degradação lenta em solução tampão fosfato, além de sugerir como mecanismo preferencial a erosão superficial.

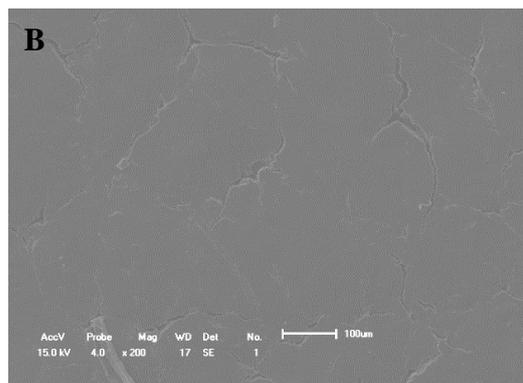
### **5.2.2 Avaliação da Superfície do Biomaterial**

A microestrutura das blendas implantadas nos animais, até o período de trinta dias, foi analisada através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) utilizando para o estudo as pastilhas que obtiveram porcentagem de degradação mais próximas da média. As análises das blendas para o período de cento e oitenta e trezentos e sessenta dias foram realizadas utilizando o microscópio óptico digital (Smartzoom 5 full report), pois o MEV da instituição estava inoperante. Após implantação *in vivo* pode-se observar que a morfologia global das pastilhas apresentaram diferenças visíveis quando comparada com as pastilhas no seu estado inicial (sem ser submetida ao estudo de degradação) e podem ser visualizadas a seguir.

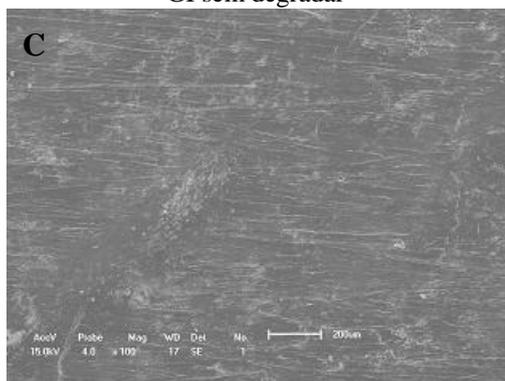
Nas Figuras 5.20 e 5.21 estão representadas as micrografias referentes ao Grupo I (blenda de PCL) em seus respectivos períodos de implantação *in vivo*.



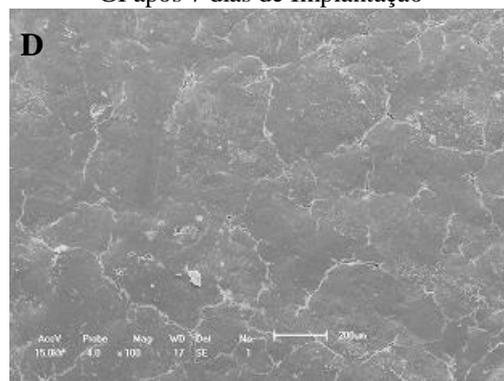
GI sem degradar



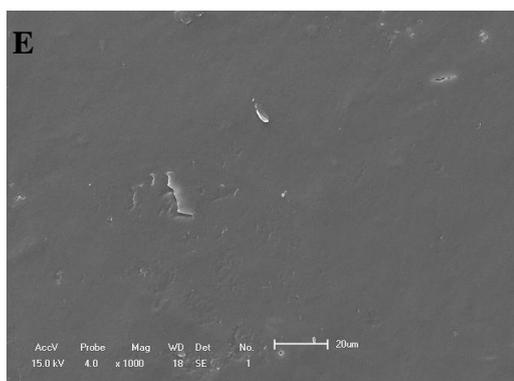
GI após 7 dias de Implantação



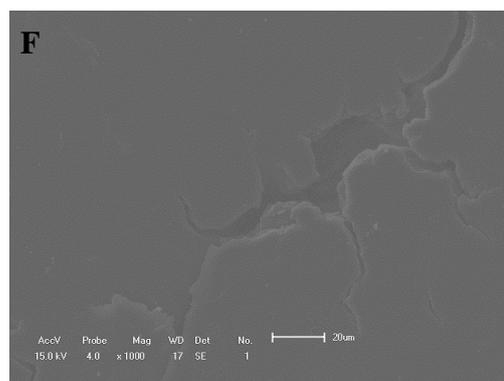
G I após 14 Dias de implantação



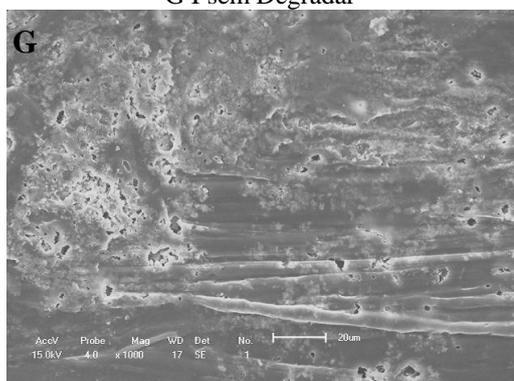
G I após 30 Dias de implantação



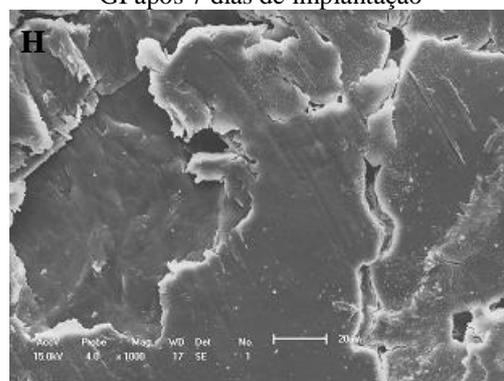
G I sem Degradar



GI após 7 dias de implantação



G I após 14 dias de implantação

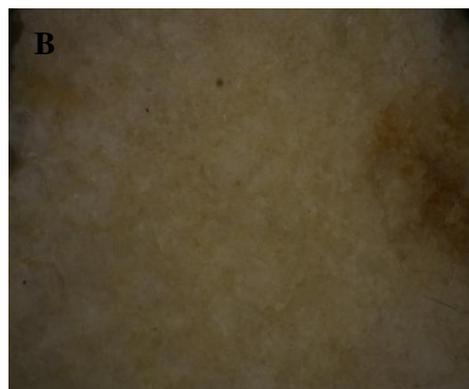


G I após 30 Dias de implantação

**Figura 5. 20** - Micrografias das blendas de PCL (GI) observadas pelo MEV, para os períodos de 7, 14 e 30 dias após implantação. A: Aumento de 200x; B: Aumento de 200x; C: Aumento de 100x; D: Aumento de 100x; E: Aumento de 1k; F: Aumento de 1k; G: Aumento de 1k; H: Aumento de 1k.



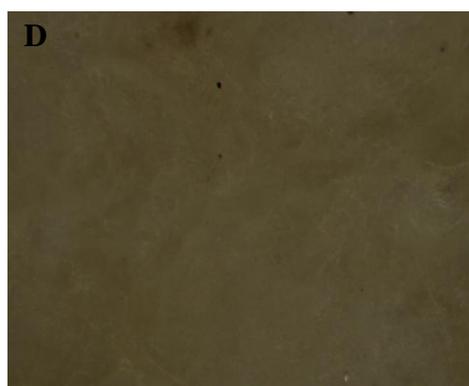
GI após 180 Dias de implantação



G I após 360 Dias de implantação



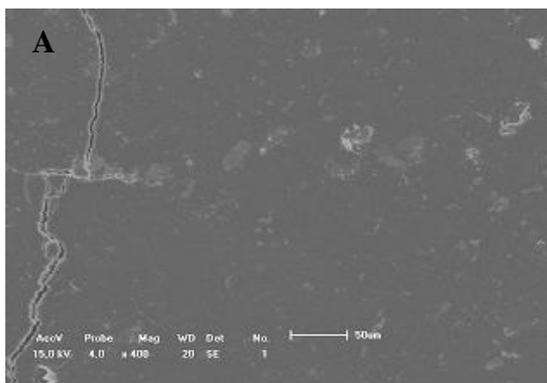
GI após 180 Dias de implantação



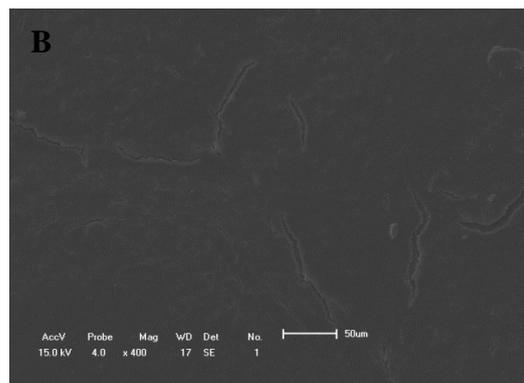
GI após 360 Dias de implantação

**Figura 5. 21** - Micrografias da blenda de PCL (GI) observadas pelo Smartzoom 5 full report, dos períodos de 180 e 360 dias após implantação. A: Aumento de 100x; B: Aumento de 100x; C: Aumento de 1000x; D: Aumento de 1000x.

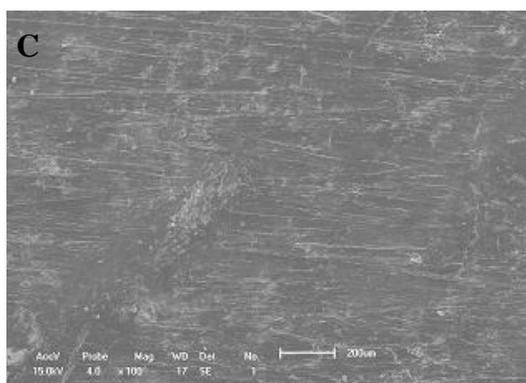
Nas Figuras 5.22 e 5.23 estão representadas as micrografias referentes ao Grupo II (blenda PCL/HAp) em seus respectivos períodos de implantação *in vivo*.



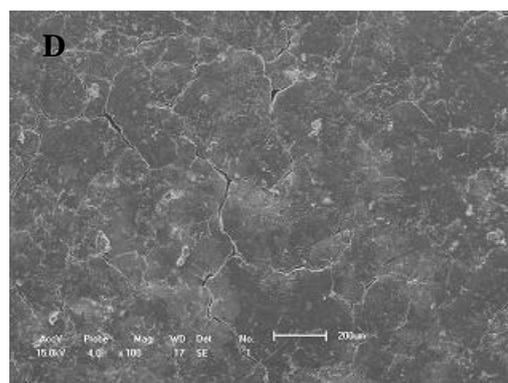
GII sem degradar



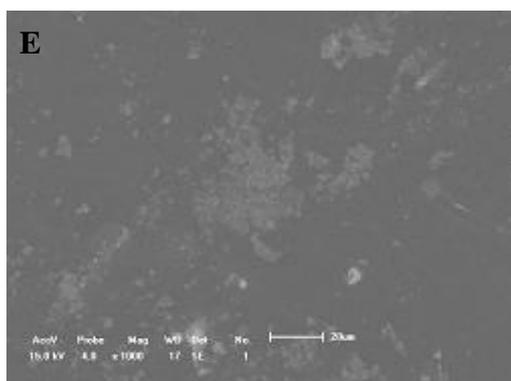
GII após 7 Dias de implantação



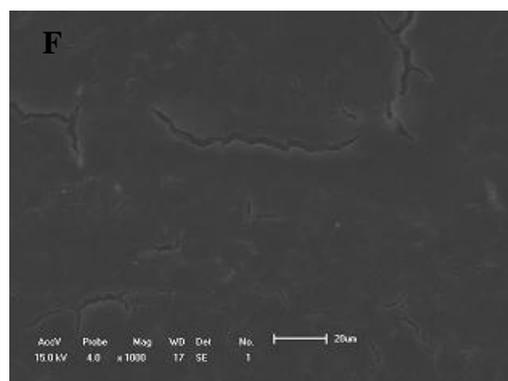
GII após 14 Dias de implantação



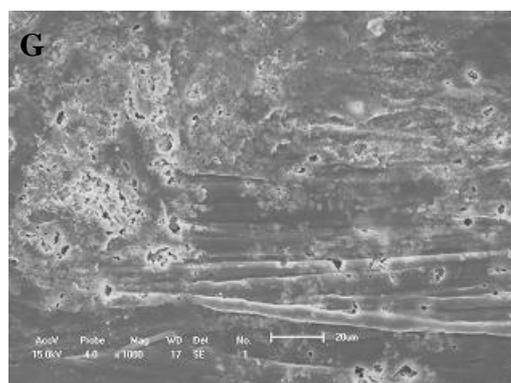
GII após 30 Dias de implantação



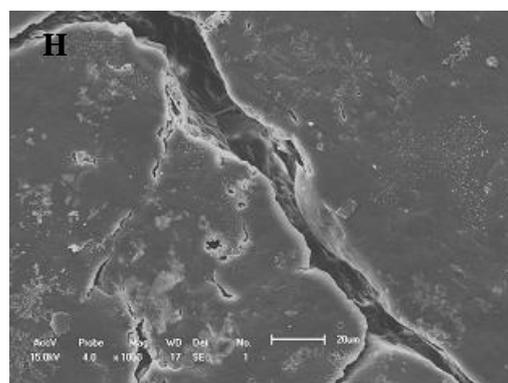
G II sem Degradar



GII após 7 dias de implantação



G II após 14 dias de implantação



G II após 30 dias de implantação

**Figura 5. 22** - Micrografias das blendas PCL/HA (GII) observadas pelo MEV, para os períodos de 7, 14 e 30 dias após implantação. A: Aumento de 400x; B: Aumento de 400x; C: Aumento de 100x; D: Aumento de 100x; E: Aumento de 1K; F: Aumento de 1k; G: Aumento de 1k; H: Aumento de 1k.



GII após 180 Dias de implantação  
(Aumento de 100x)



G II após 360 Dias de implantação  
(Aumento de 100x)



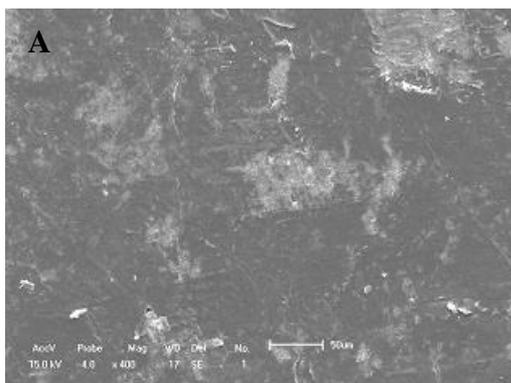
GII após 180 Dias de implantação  
(Aumento de 1K)



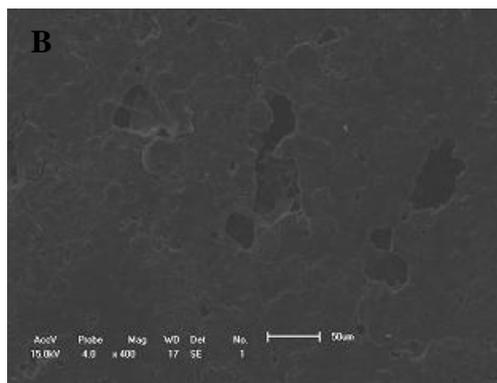
GII após 360 Dias de implantação  
(Aumento de 1K)

**Figura 5. 23** - Micrografias das blendas de PCL (GII) observadas pelo Smartzoom 5 full report, dos períodos de 180 e 360 dias após implantação.

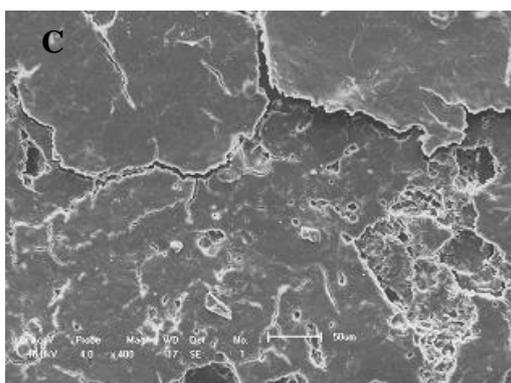
As Figuras 5.24 e 5.25 representam as micrografias referentes ao Grupo III (PCL/TCH) em seus respectivos períodos de implantação *in vivo*.



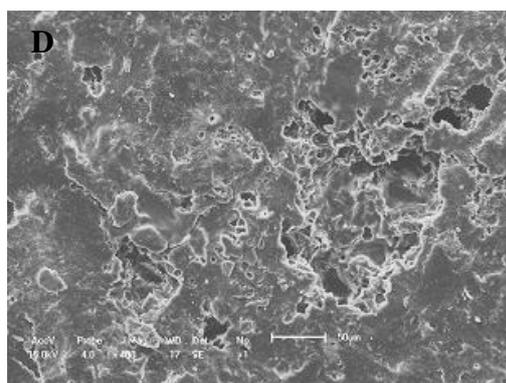
GIII sem degradar



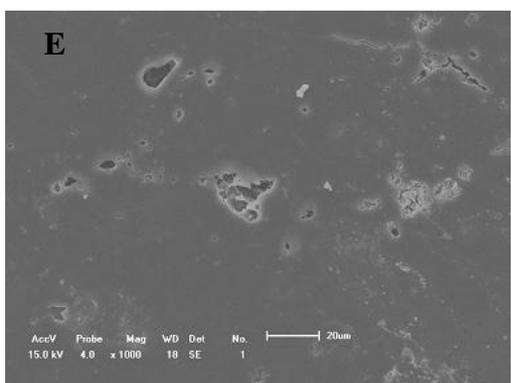
GIII após 7 Dias de implantação



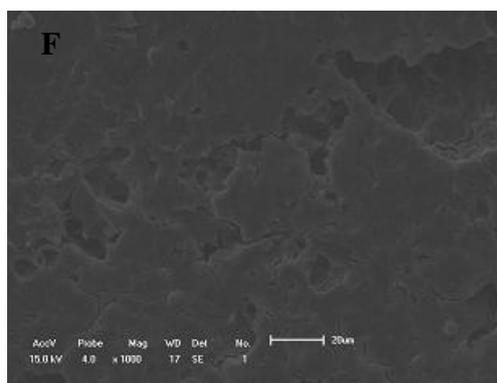
GIII após 14 Dias de implantação



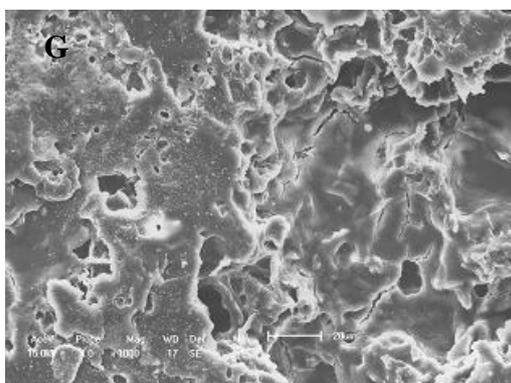
GIII após 30 Dias de implantação



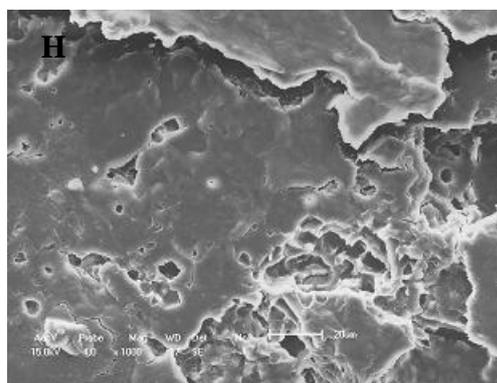
GIII sem degradar



GIII após 7 dias de implantação

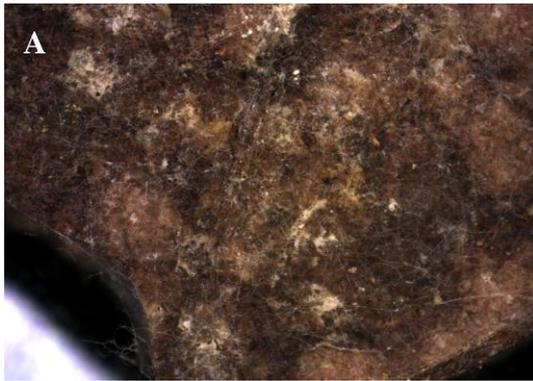


GIII após 14 dias de implantação



GIII após 30 dias de implantação

**Figura 5. 24** - Micrografias das blendas de PCL/TCH (GIII) observadas pelo MEV, para os períodos de 7, 14 e 30 dias após implantação. A: Aumento de 400x; B: Aumento de 400x; C: Aumento de 400x; D: Aumento de 400x; E: Aumento de 1k; F: Aumento de 1k; G: Aumento de 1k; H: Aumento de 1k.



GIII após 180 Dias de implantação



G III após 360 Dias de implantação



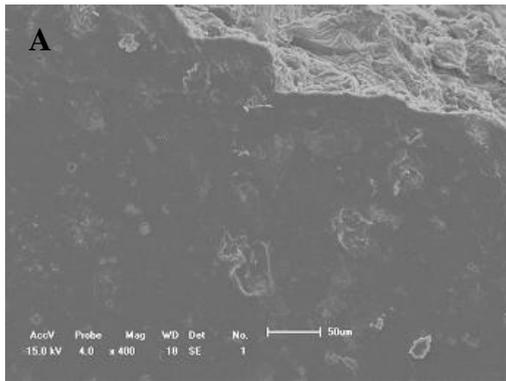
GIII após 180 Dias de implantação



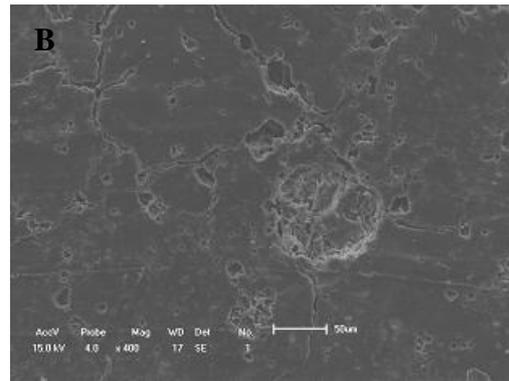
G III após 360 Dias de implantação

**Figura 5. 25** - Micrografias das blendas de PCL (GIII) observadas pelo Smartzoom 5 full report, dos períodos de 180 e 360 dias após implantação. A: Aumento de 100x; B: Aumento de 100x; C: Aumento de 1K; D: Aumento de 1K.

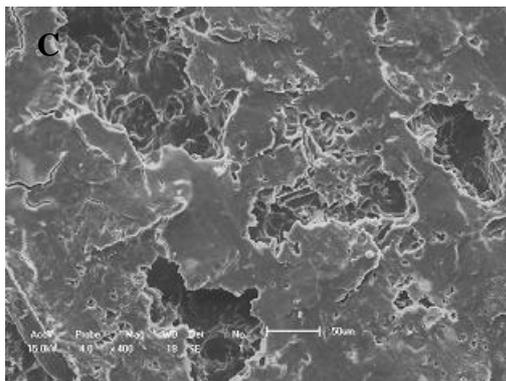
As Figuras 5.26 e 5.27 representam as micrografias referentes ao Grupo IV (PCL/HAp/TCH) em seus respectivos períodos de implantação *in vivo*.



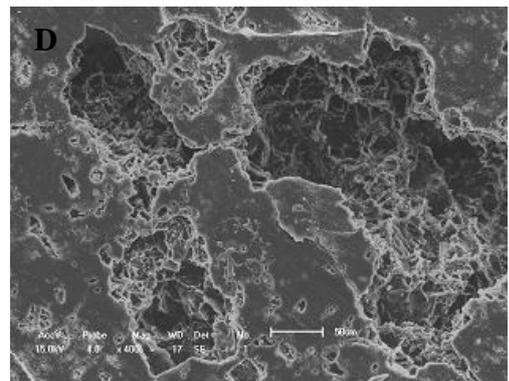
G IV sem degradar



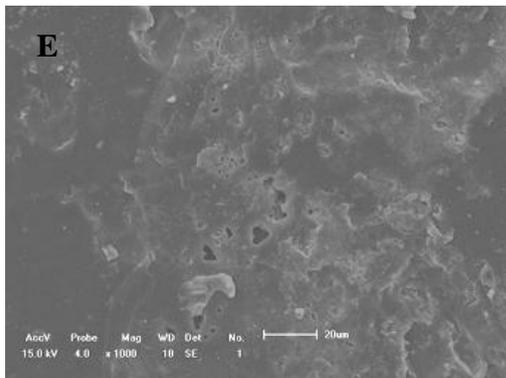
G IV após 7 Dias de implantação



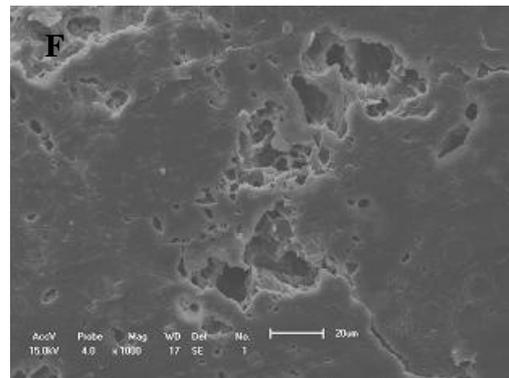
G IV após 14 Dias de implantação



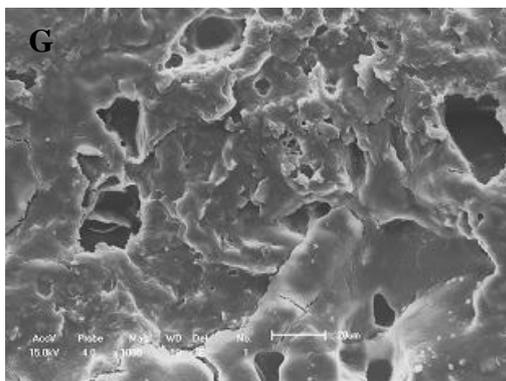
G IV após 30 Dias de implantação



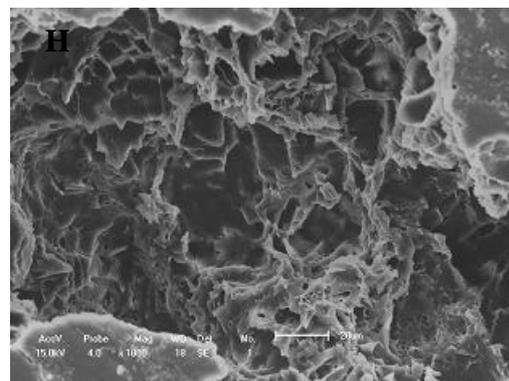
G IV sem degradar



G IV após 7 Dias de implantação

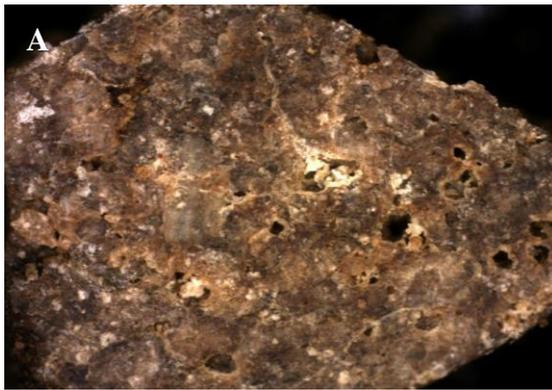


G IV após 14 Dias de implantação



G IV após 30 Dias de implantação

**Figura 5. 26** - Micrografias das blendas de PCL/HAp/TCH (G IV) observados pelo MEV, para os períodos de 7, 14 e 30 dias após implantação. A: Aumento de 400x; B: Aumento de 400x; C: Aumento de 400x; D: Aumento de 400x; E: Aumento de 1k; F: Aumento de 1k; G: Aumento de 1k; H: Aumento de 1k.



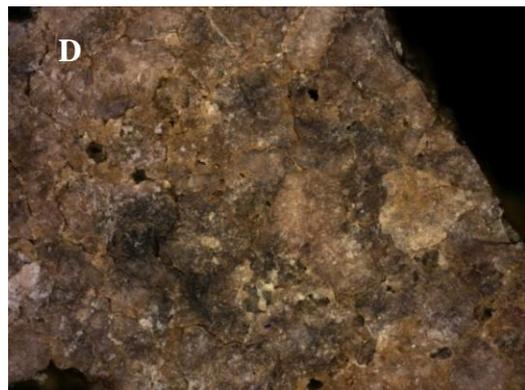
G IV após 180 Dias de implantação



G IV após 180 Dias de implantação



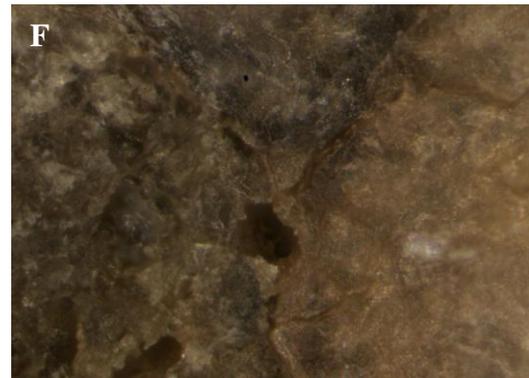
G IV após 180 Dias de implantação



G IV após 360 Dias de implantação



GIV após 360 Dias de implantação



GIV após 360 Dias de implantação

**Figura 5. 27-** Micrografias das blendas de PCL (GIV) observadas pelo Smartzoom 5 full report, dos períodos de 180 e 360 dias após implantação. A: Aumento de 100x; B: Aumento de 400x; C: Aumento de 1k; D: Aumento de 100x; E: (Aumento de 400x); F: Aumento de 1k.

A partir das micrografias pode ser observado que as pastilhas sofreram processos de degradação e erosão. À medida que aumenta o período de implantação, nota-se que as pastilhas apresentam trincas e desgastes superficiais com aspecto de depressões, aumentando

o número de poros nas estruturas. Em alguns grupos (Grupo III e IV), o aparecimento de poros foi mais acentuado, tanto em quantidade como em tamanho, com o surgimento de rachaduras que caracteriza um maior grau de degradação. Para estes grupos, o aparecimento mais evidente dos poros pode estar relacionado à liberação da tetraciclina, somada a degradação da blenda do PCL. Os Grupos I e II apresentaram uma menor quantidade de poros, mas com o aumento do tempo de implantação, as superfícies dos arcabouços apresentam textura mais áspera e variações de coloração, que indicam degradação celular.

Desta forma, as micrografias indicam que houve erosão superficial no processo de degradação. Tem sido relatado por alguns autores, que quando em contato com o sistema biológico e seus fluidos o mecanismo que prevalece na degradação de polímeros biorreabsorvíveis é a quebra de ligações hidroliticamente instáveis. Sendo amplamente aceito que a degradação hidrolítica de poli ( $\alpha$ -hidroxi ésteres) pode prosseguir através da superfície ou vias de degradação em massa (HOFFMAN *et al.*, 2009; LAM *et al.*, 2009).

A degradação de superfície e a erosão ocorrem quando a taxa de cisão da cadeia hidrolítica e a produção de oligômeros e monômeros que se difundem para o ambiente, são mais rápidas que a taxa de intrusão de água na massa do polímero, resultando em desgaste do dispositivo do polímero sem afetar o peso do volume interno do mesmo. Poliortoésteres são exemplos clássicos de polímeros que sofrem este tipo de erosão. A vantagem dos polímeros que destroem a superfície é a previsibilidade do processo de erosão. Estes dispositivos são desejados para entrega de medicamentos, onde a liberação da droga pode estar relacionada à taxa de erosão (GOPFERICH, 1996; LAM *et al.*, 2009).

Sabe-se que para atuar como substituto ósseo adequado, dentre outras características, o biomaterial deve ser poroso e apresentar boa conexão entre os poros para permitir adequada nutrição celular e crescimento tecidual. A porosidade, desta forma, irá permitir a migração e proliferação de osteoblastos e células mesenquimais, além da deposição de matriz óssea nos espaços vazios (YOSHIKAWA *et al.*, 2009; MASTROGIACOMO *et al.*, 2006). Desta forma, o aumento dos poros na estrutura das blendas em estudo após implantação *in vivo*, indica ser uma característica extremamente positiva, considerando que a finalidade de uso deste material é a aplicação na regeneração do tecido ósseo.

### **5.2.3 Propriedades Mecânicas**

Degradação do polímero é o primeiro passo do fenômeno de erosão e pode ser estimado medindo-se a degradação da força mecânica ou a diminuição do peso molecular. A completa erosão do polímero, geralmente, é conhecida por demorar muito mais tempo do que

a perda de resistência à tração (VIEIRA *et al.*, 2011). Desta forma, percebe-se a importância do estudo das propriedades mecânicas na avaliação da degradação das blendas poliméricas.

As propriedades mecânicas das pastilhas foram avaliadas a partir da determinação dos módulos de Young, um parâmetro mecânico fundamental para a engenharia e aplicação de materiais, pois está associado com a descrição de várias outras propriedades mecânicas e que proporciona uma medida da rigidez de um material sólido. Quanto maior o módulo de Young maior será a força necessária para deformar o material, desta forma, o material será mais rígido. O módulo de Young foi determinado para cada grupo, em quatro diferentes amostras, para cada período de tempo, onde uma carga compressiva foi aplicada em cada amostra. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 5.9.

**Tabela 5. 9 - Módulo de Young após implantação *in vivo*.**

	<b>Grupo I</b>	<b>Grupo II</b>	<b>Grupo III</b>	<b>Grupo IV</b>
	<b>(MPa)</b>	<b>(MPa)</b>	<b>(MPa)</b>	<b>(MPa)</b>
<b>Sem Degradar</b>	13,72	15,66	28,19	28,00
<b>7 Dias</b>	53,50	44,61	35,94	47,063
<b>14 Dias</b>	55,41	45,84	35,84	48,88
<b>30 Dias</b>	99,24	56,00	51,72	59,72

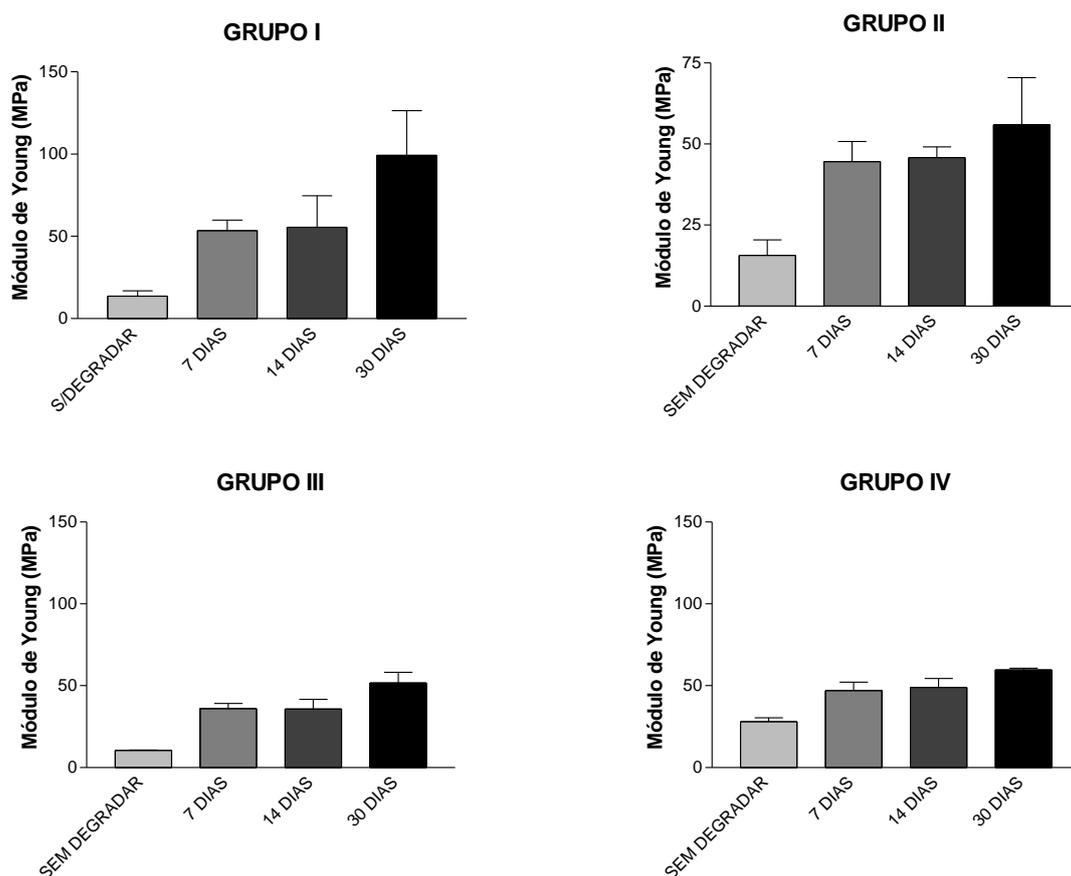
Observa-se que a propriedade mecânica de compressão das blendas de PCL, particularmente o módulo de Young, aumentou em todos os grupos após 30 dias de implantação, indicando aumento da rigidez. Sendo observado um maior aumento para o Grupo I, composto apenas por PCL.

Este aumento de rigidez do material também foi descrito por Lam *et al.* (2009) que estudou a degradação de arcabouços de PCL após 6 meses de implantação *in vivo*, constatando um aumento de 150%. Resultados semelhantes também foram encontrados nos estudos *in vitro* realizados por Kotek *et al.* (2011) e Lam *et al.* (2008), que estudam a degradação do PCL a partir de simulações das condições fisiológicas.

Segundo Woodruff e Hutmacher (2010), a degradação hidrolítica de poliésteres semicristalinos ocorre em dois estágios. O primeiro estágio inicia com a difusão de água para dentro do arcabouço nas regiões amorfas que são menos organizadas e permitem a difusão de água de forma mais fácil. O segundo estágio começa quando a maioria das regiões amorfas está degradada e o ataque hidrolítico procede da borda para o centro dos domínios cristalinos.

Percebe-se que no processo inicial da degradação o material perde primeiro a parte amorfa, mais frágil, ficando a região cristalina que é mais rígida.

Segundo Kotek, *et al.* (2011), o aumento subsequente gradual na cristalinidade é um resultado do processo de degradação, por si só, superior cristalinidade dos produtos de degradação com peso molecular inferior contribui para o aumento de uma cristalinidade global do sistema. Neste sentido, o aumento do módulo de Young nos primeiros períodos de degradação em nosso estudo, pode ser justificado pelo próprio processo de degradação. Na Figura 5.28 estão representados os valores do Módulo de Young, em gráficos de barra, para uma melhor visualização dos resultados.



**Figura 5. 28** -. Propriedades Mecânicas de compressão das blendas de PCL implantados para avaliação da degradação *in vivo*.

Se observarmos as pastilhas sem degradar percebemos que a incorporação da HAp e TCH na blenda de PCL aumentaram o módulo de Young. Ronca *et al.*, (2016), estudou arcabouços de PCL reforçado com nanopartículas de HAp e constatou que a introdução da cerâmica no arcabouço, na proporção de 10%, melhorou fortemente as propriedades

mecânicas de compressão, aumentando conseqüentemente, o módulo de compressão. Hou *et al.* (2016), estudou arcabouços bioativos de n-BPC e PCL-PEG-PCL e concluiu que a incorporação da biocerâmica melhorou significativamente a resistência.

Após implantação *in vivo*, percebe-se que o módulo de Young aumenta, mas em uma proporção menor que as blendas compostas apenas pelo PCL. Para os grupos compostos por TCH, este fato pode estar relacionado com a dissolução do fármaco no local implantado, que somados com o processo de degradação, favorecem com o aumento do número de poros e defeitos na superfície das blendas (observadas nas micrografias obtidas através do MEV), favorecendo a difusão de água na blenda. Com relação à HAp, como mostrados nos grupos II e IV, a explicação plausível poderia ser que a interface da biocerâmica com a matriz PCL tenha sido degradada substancialmente devido à hidrólise melhorada, através da difusão de água, indicando que a integração e a ligação do enchimento de reforço dentro da matriz polimérica tenham sido interrompidas. Enfatizamos, que a hidrofilia da fase HAp pode introduzir poros e trincas na superfície e defeitos no arcabouço enfraquecendo o material, como pôde ser visualizado nas imagens do MEV. Resultados semelhante podem ser observados no estudo desenvolvido por Lam *et al.* (2009), que avaliou a degradação *in vivo* de um arcabouço de PCL associado a TPC.

Desta forma, observa-se que a incorporação da HAp e/ou TCH na blenda provoca interferência nas propriedades mecânicas, tanto antes quanto depois da implantação *in vivo*.

A principal função de um arcabouço que será utilizado na regeneração dos tecidos ósseos é atuar temporariamente como suporte possibilitando a transferência de tensão ao longo do tempo em regiões do corpo lesionadas, facilitando e conduzindo o crescimento celular até que se finalize o processo de regeneração tecidual. Para alcançar esse objetivo é necessário que o arcabouço mantenha morfologia e propriedades mecânicas adequadas ao longo de todo o processo regenerativo, até que a região da lesão esteja totalmente recuperada (NAIR, 2007; CHEUNG, 2007).

Uns dos objetivos do desenvolvimento das blendas avaliadas neste trabalho e conciliar porosidade capaz de permitir a função celular e resistência mecânica semelhante ao osso que esta substituindo, evitando tensões na interface osso/implante. A princípio, os resultados do módulo de Young para os determinados grupos em estudo indicam que é mais adequado a utilização deste material para o osso trabecular, pois apresenta valores de resistência mecânica variando 2-12MPa nos ensaios de compressão (KAKUBO, 2003).

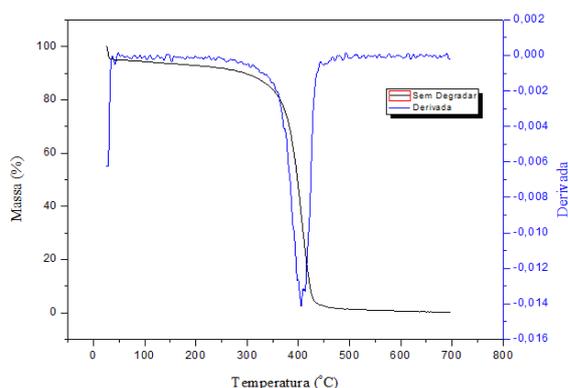
Após os períodos de 180 e 360 dias, não foi possível determinar o módulo de Young, devido à dificuldade remoção das pastilhas (como citado anteriormente), não houve um número suficiente de amostras íntegras para determinação do parâmetro.

#### 5.2.4 Comportamento térmico a partir da Análise Termogravimétrica (TGA)

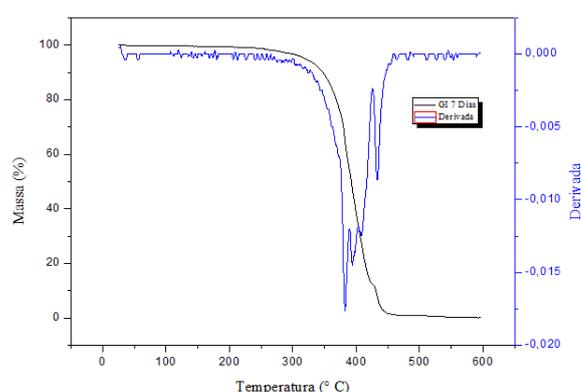
A TGA é uma técnica termoanalítica que fornece informações sobre a composição dos materiais e a sua estabilidade térmica. Esta técnica acompanha a variação de massa da amostra, em função da programação de temperatura (GRASSELLI, 1987). A partir destes dados é possível obter a Termogravimetria Derivada (DTG), que pode ser definida como um arranjo matemático, no qual a derivada da variação de massa em relação ao tempo ( $dm/dt$ ) é registrada em função da temperatura. Desta forma, a DTG será a derivada primeira da TGA. Na análise termogravimétrica, a curva de DTG é utilizada com intuito de melhorar a visualização dos eventos de degradação, melhorando a caracterização do respectivo polímero.

A partir dos termogramas e curvas de DTG podem ser determinados os valores de  $T_{onset}$ ,  $T_{máx}$ ,  $T_{offset}$ . A  $T_{onset}$  indica a temperatura inicial extrapolada da perda significativa de massa, representada pelo cruzamento da tangente na temperatura onde a massa ainda é constante, com outra tangente na inclinação da curva. A  $T_{máx}$  significa a temperatura da taxa de degradação máxima, onde ocorre a maior perda de massa dos materiais, representadas pelos picos da DTG, determinando o ponto de inflexão na curva de degradação. E  $T_{offset}$  consiste na temperatura final extrapolada, onde o processo de perda de massa se estabiliza.

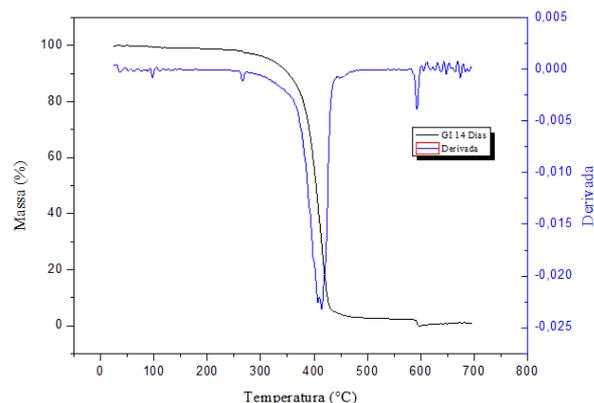
A Figura 5.29 demonstra as curvas termogravimétricas do Grupo I (blenda de PCL) para cada período de implantação *in vivo*, representadas a partir da porcentagem de perda de massa em função de uma taxa controlada de temperatura e sua DTG.



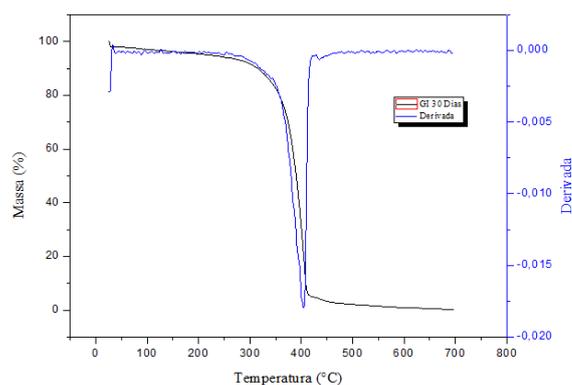
Sem degradar *in vivo*



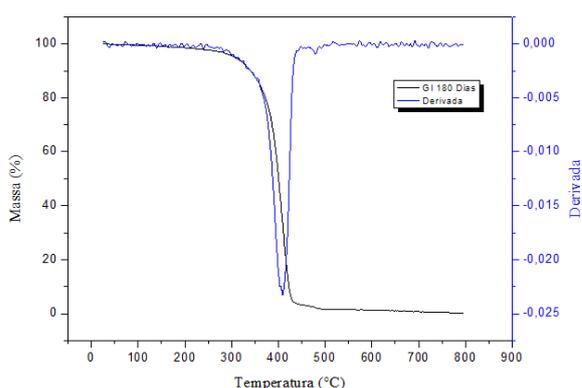
Após sete dias de implantação *in vivo*



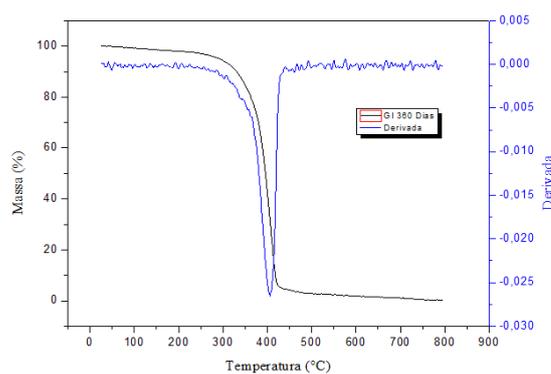
Após 14 dias de implantação *in vivo*.



Após 30 dias de implantação *in vivo*.



Após 180 dias de implantação *in vivo*.



Após 360 dias de implantação *in vivo*.

**Figura 5. 29** - Curvas Termogravimétricas do Grupo I (Blenda de PCL) sem degradar e após cada período de implantação *in vivo*.

Após o início da perda significativa de massa, a blenda de PCL (Grupo I), que não foi implantada no animal, apresentou no mínimo três etapas sobrepostas de decomposição. Aos sete dias de implantação ocorreu uma série de reações secundárias ou menores, simultaneamente ou próximas à reação principal (maior pico), indicando a possibilidade de vários mecanismos de degradação. Aos quatorze dias, observaram-se duas etapas parcialmente sobrepostas. Para os períodos seguintes, verificou-se apenas uma etapa de degradação.

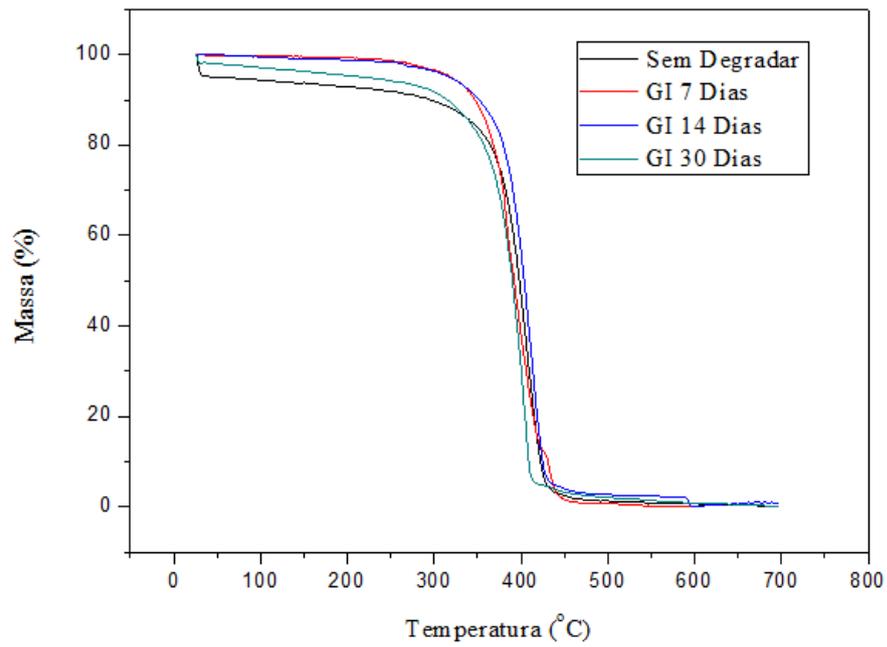
A partir da Figura 5.29 foram determinados os valores de  $T_{onset}$ ,  $T_{máx}$ ,  $T_{offset}$  e a porcentagem dos teores de resíduos finais da análise dos materiais que correspondem ao Grupo I. Estes dados podem ser visualizados na Tabela 5.10.

**Tabela 5. 10** - Grupo I (Blenda de PCL) -  $T_{onset}$ ,  $T_{offset}$ ,  $T_{m\acute{a}x}$  e a porcentagem de resíduo final.

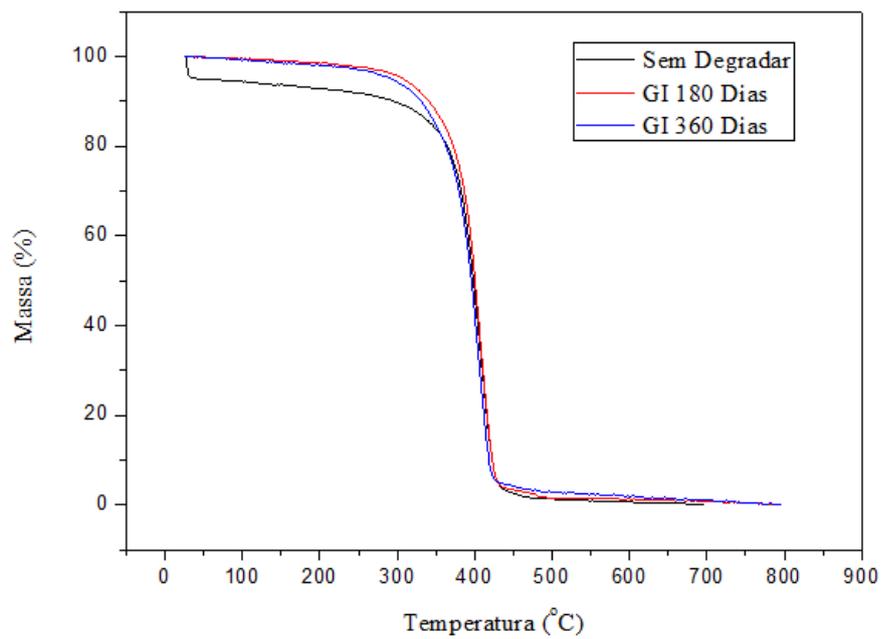
<b>Grupo I</b>	<b><math>T_{onset}</math> (C°)</b>	<b><math>T_{offset}</math> (C°)</b>	<b><math>T_{m\acute{a}x}</math> (C°)</b>	<b>Resíduo Final (%)</b>
<b>Sem Degradar</b>	368	438	406	1,55
<b>7 Dias</b>	335	450	379	1,04
<b>14 Dias</b>	327	454	415	2,94
<b>30 Dias</b>	319	411	402	3,64
<b>180 Dias</b>	325	432	410	1,84
<b>360 Dias</b>	321	425	406	3,69

Considerando todo período de estudo, verifica-se uma redução na  $T_{onset}$  de degradação de 368°C para 321° C (redução de 12,8%) e a  $T_{offset}$  de 438°C para 425°C. Desta forma, os resultados indicam que, para este grupo, os arcabouços mostraram-se menos estáveis termicamente.

As curvas correspondentes as variações de perda de massa em função da temperatura dos grupos em estudo, foram sobrepostas com intuito de melhorar a visualização das características térmicas dos materiais a medida que aumenta o tempo de implantação *in vivo* das blendas, facilitando a observação dos possíveis processos de degradação. Para melhor a explanação dos resultados, as comparações referentes ao Grupo I foram divididas em duas figuras, a primeira representa a comparação das pastilhas sem implantação e implantadas até o período de trinta dias (Figura 5.30), e a segunda, as que permaneceram 180 e 360 dias (Figura 5.31).

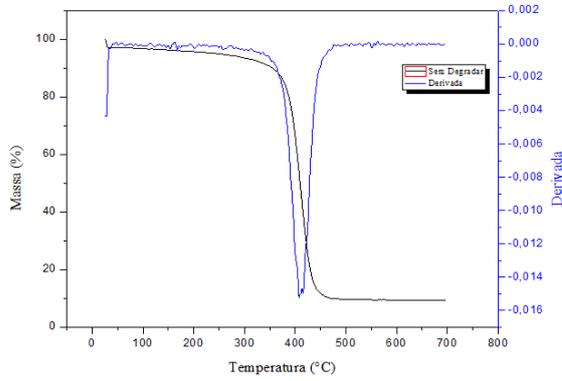


**Figura 5. 30** - Comparação entre as Curvas Termogravimétricas do Grupo I (Blenda de PCL) após 7, 14 e 30 Dias de Implantação *in vivo*.

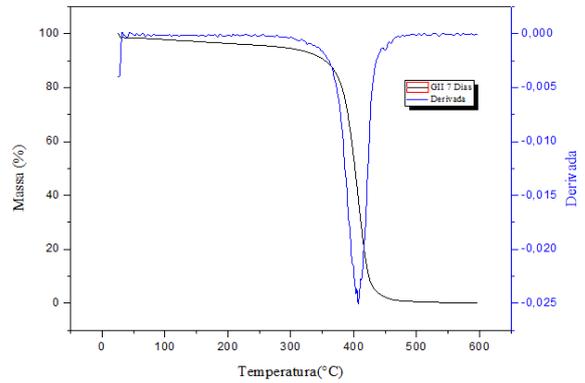


**Figura 5. 31** - Comparação entre as Curvas Termogravimétricas do Grupo I (Blenda de PCL) após 180 e 360 Dias Implantação *in vivo*.

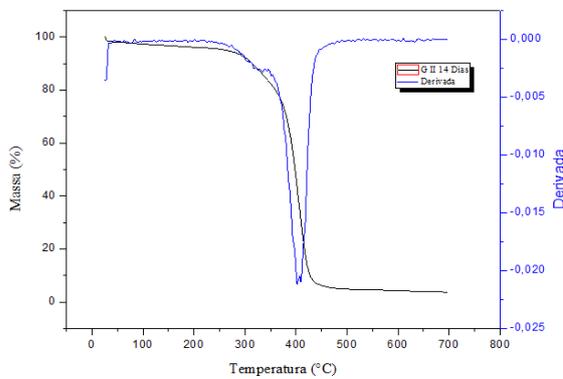
A Figura 5.32 representa as curvas termogravimétricas do Grupo II (Blenda de PCL/HAp) para cada período de implantação *in vivo*, representados a partir da porcentagem de perda de massa em função de uma taxa controlada de temperatura e sua DTG.



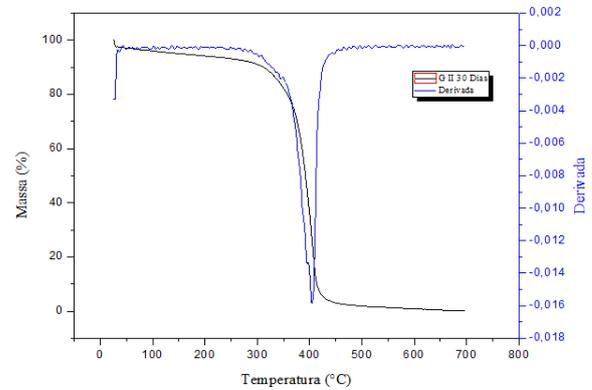
Sem Degradar *in vivo*



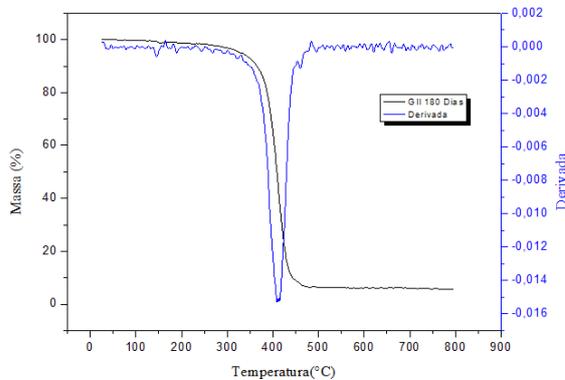
Após 7 Dias de Implantação *in vivo*.



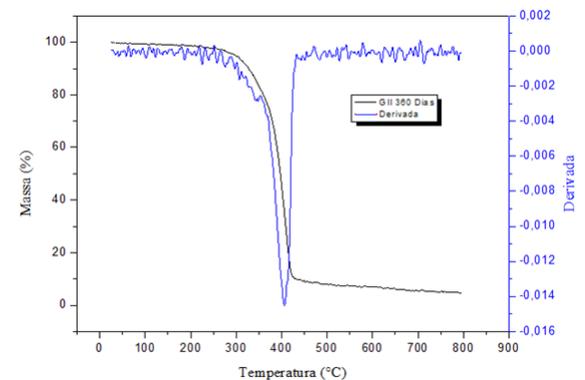
Após 14 Dias de Implantação *in vivo*



Após 30 Dias de Implantação *in vivo*



Após 180 Dias de Implantação *in vivo*



Após 360 dias de Implantação *in vivo*.

**Figura 5. 32** - Curvas Termogravimétricas do Grupo II (Blenda de PCL/ HAp) sem degradar e após cada período de implantação *in vivo*.

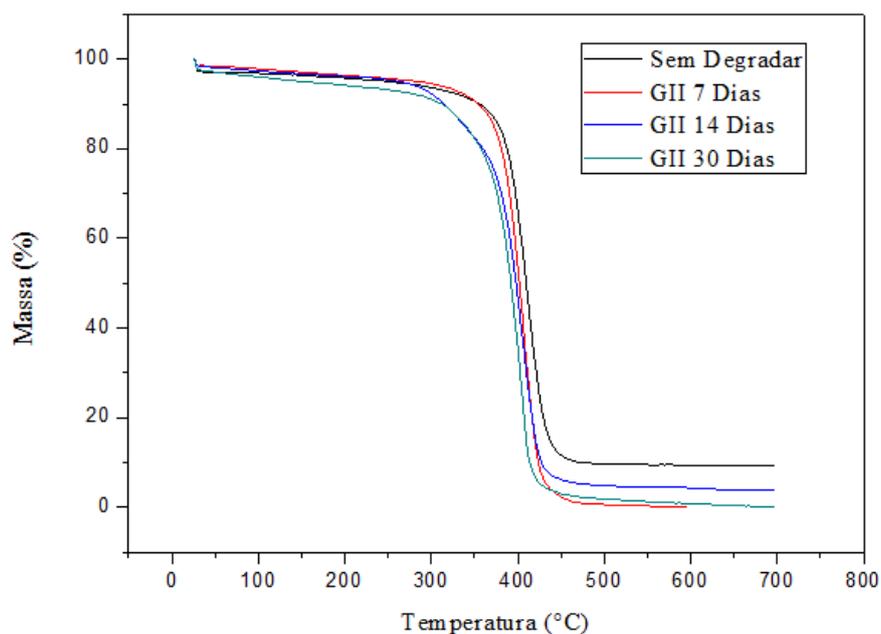
As blendas sem degradar *in vivo*, após sete, quatorze e trinta dias de implantação apresentaram duas etapas de degradação sobrepostas. Para os períodos posteriores foi verificada apenas uma etapa de degradação. A seguir (Tabela 5.11) segue a descrição das temperaturas correspondentes ao valor da  $T_{onset}$ ,  $T_{offset}$ ,  $T_{máx}$  e a porcentagem final de resíduo, para o Grupo II.

**Tabela 5. 11** - Grupo II (Blenda de PCL/ HAp) -  $T_{onset}$ ,  $T_{offset}$ ,  $T_{máx}$  e a porcentagem de resíduo final.

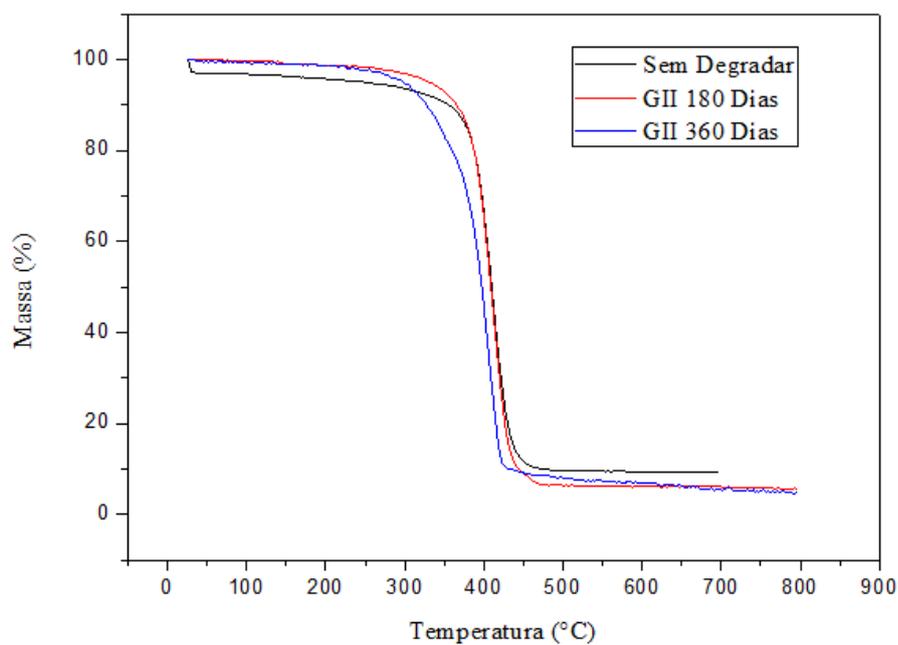
<b>Grupo II</b>	<b><math>T_{onset}</math> (C°)</b>	<b><math>T_{offset}</math> (C°)</b>	<b><math>T_{Máx}</math> (C°)</b>	<b>% Resíduo final</b>
<b>Sem Degradar</b>	353	458	406	9,66
<b>7 Dias</b>	349	437	403	0,58
<b>14 Dias</b>	292	428	400	5,19
<b>30 Dias</b>	313	416	400	2,54
<b>180 Dias</b>	347	434	412	6,58
<b>360 Dias</b>	305	421	407	8,84

Verifica-se uma redução na  $T_{onset}$  de degradação, para as amostras do Grupo II, de 353°C para 305°C (redução de 13,6%), considerando todo o tempo de estudo. A  $T_{offset}$  também apresentou redução, de 458°C para 420°C. Desta forma, observa-se que após trezentos e sessenta dias, houve uma alteração na faixa de temperatura de degradação do material, indicando que as blendas ficaram menos estáveis termicamente.

Nas Figuras 5.33 e 5.34 encontram-se representadas as comparações entre as Curvas Termogravimétricas do Grupo II (PCL/BPM-PCL 20/80% / HAp) sem e após implantação *in vivo*. A Figura 5.33 representa os períodos de 7, 14 e 30 dias após implantação. A Figura 5.34 representa os períodos de 180 e 360 dias após implantação.

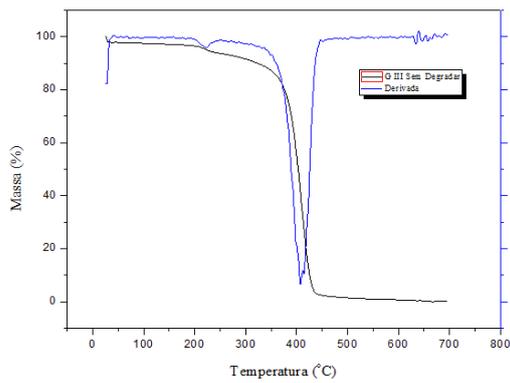


**Figura 5.33** - Comparação entre as Curvas Termogravimétricas do Grupo II (Blenda de PCL/ HAp) dos arcabouços sem degradar e após 7,14 e 30 dias de implantação *in vivo*.

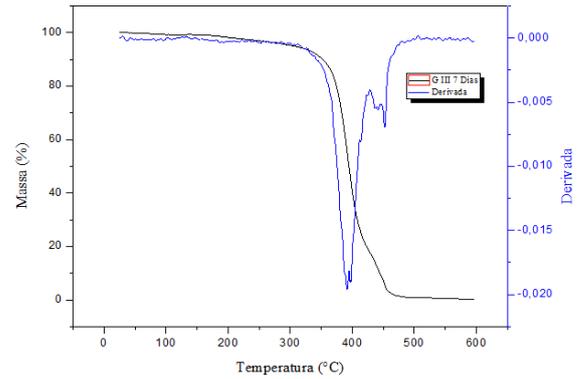


**Figura 5.34** - Comparação entre as Curvas Termogravimétricas do Grupo II (PCL/BPM-PCL 20/80% / HAp) após 180 e 360 Dias de Implantação *in vivo*.

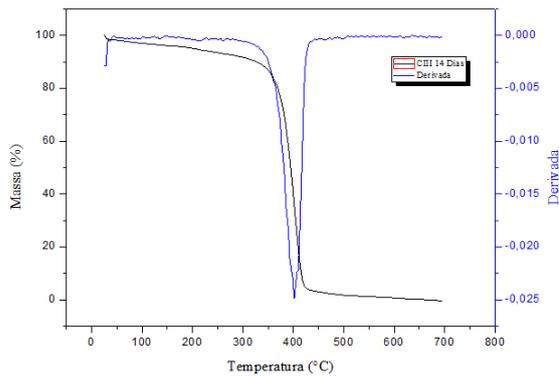
A Figura 5.35 expõe as curvas Termogravimétricas do Grupo III (Blenda de PCL/ TCH) sem implantação e após cada período de implantação *in vivo*, representados a partir da porcentagem de perda de massa em função de uma taxa controlada de temperatura e sua DTG.



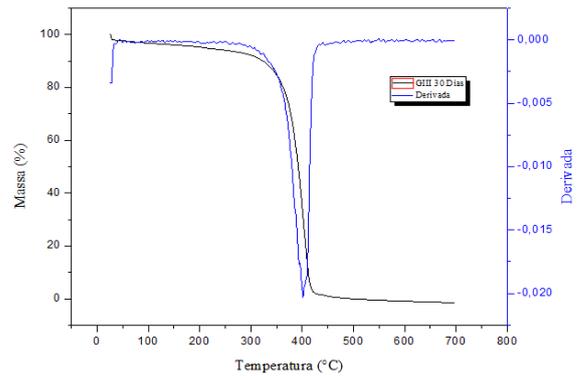
Sem degradar *in vivo*



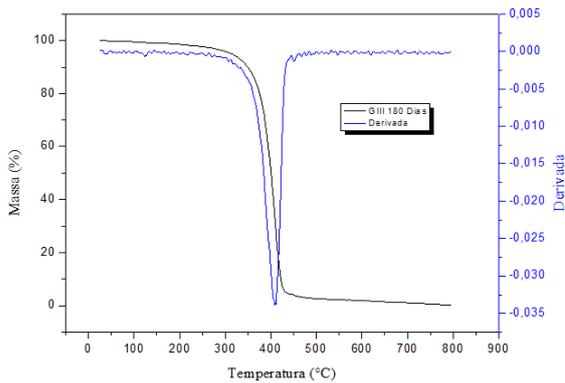
Após sete dias de implantação *in vivo*



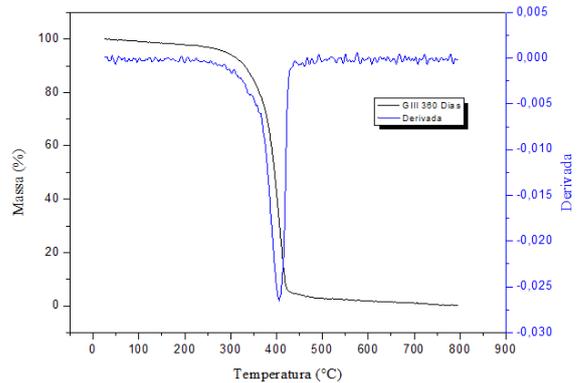
Após 14 dias de implantação *in vivo*



Após 30 dias de implantação *in vivo*



Após 180 dias de implantação *in vivo*



Após 360 dias de implantação *in vivo*

**Figura 5. 35** - Curva Termogravimétrica do Grupo III (blenda de PCL/TCH) sem degradar e após cada período de implantação *in vivo*.

As pastilhas que não sofreram implantação *in vivo* apresentaram no mínimo três etapas de degradação, observando um pico da DTG em 223 °C, que indica estar relacionado à degradação da TCH, que apresenta ponto de fusão entre 215°C–220 °C, este pico

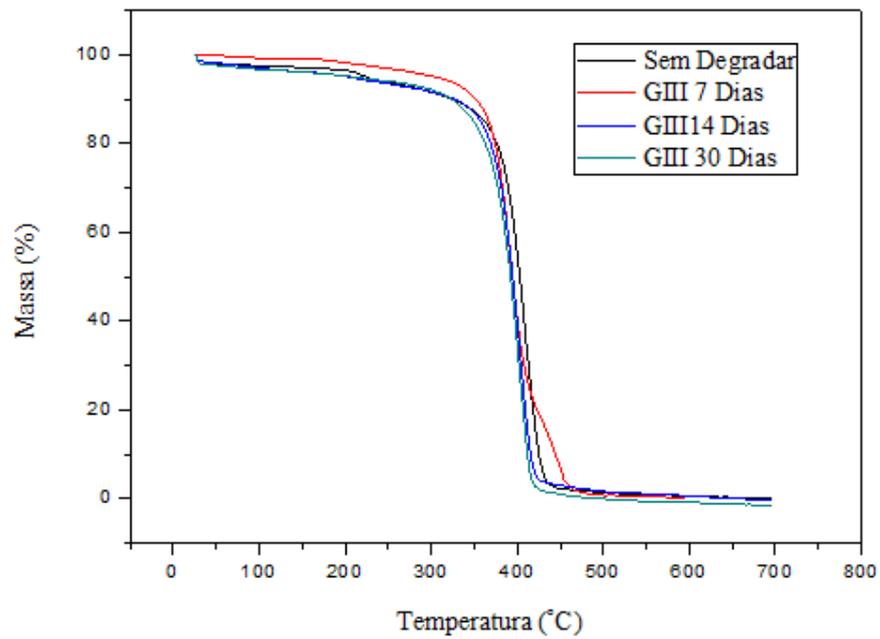
característico não foi observado nas pastilhas que foram implantadas, podendo estar relacionado com a liberação do fármaco para o meio implantado. Após sete dias verificaram-se no mínimo três etapas, umas sobrepostas e outra próxima a reação principal. Para os períodos subsequentes, foi observada apenas uma etapa de degradação.

Na Tabela 5.12 serão demonstradas as temperaturas correspondentes ao valor da  $T_{onset}$ ,  $T_{offset}$ ,  $T_{máx}$  e a porcentagem final de resíduo para o Grupo III.

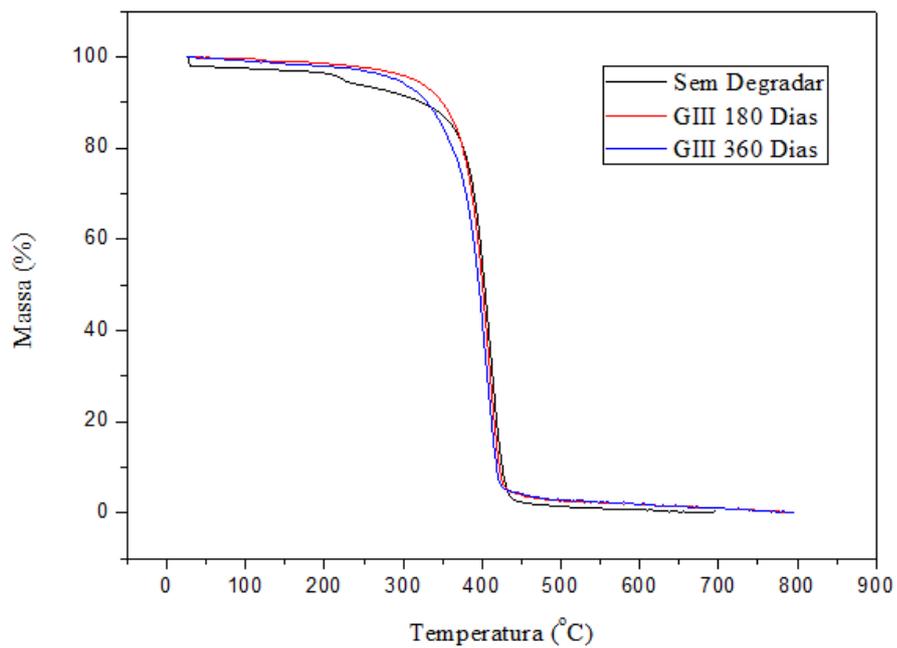
**Tabela 5. 12** - Grupo III (Blenda de PCL/ TCH) -  $T_{onset}$ ,  $T_{offset}$ ,  $T_{máx}$  e a porcentagem de resíduo final.

<b>Grupo III</b>	<b><math>T_{onset}</math> (C°)</b>	<b><math>T_{offset}</math> (C°)</b>	<b><math>T_{Máx}</math> (C°)</b>	<b>% Resíduo final</b>
<b>Sem Degradar</b>	355	429	405	1,82
<b>7 Dias</b>	349	461	391	1,10
<b>14 Dias</b>	344	419	402	2,60
<b>30 Dias</b>	311	417	401	0,51
<b>180 Dias</b>	339	424	408	3,23
<b>360 Dias</b>	320	422	405	3,35

De acordo com os valores apresentados na Tabela 5.12 observa-se que a  $T_{onset}$  diminui de 355° C para 319°C (redução de 10,14%) a  $T_{offset}$  varia de 429°C para 422°C. Desta forma, observa-se que ocorreu uma diminuição na faixa de temperatura, indicando uma redução da estabilidade térmica para o Grupo III. Na Figura 5.36 encontra-se representada a comparação entre as curvas termogravimétricas do Grupo III (PCL/TCH) antes da implantação e após 7, 14 e 30 dias. Na Figura 5.37, estão representadas as comparações com os períodos de 180 e 360 dias.

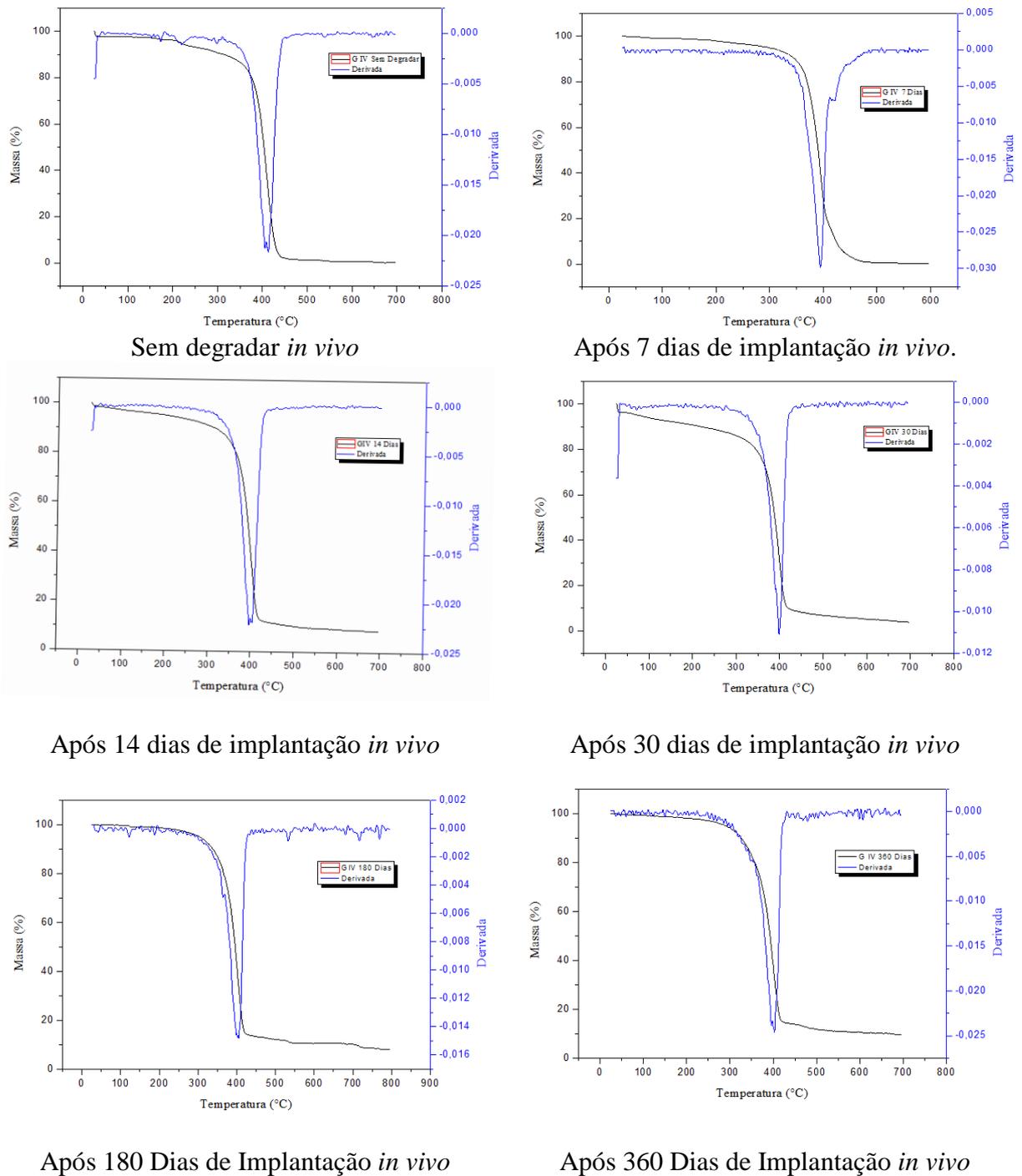


**Figura 5. 36** - Comparação entre as Curvas Termogravimétricas do Grupo III (PCL/BPM-PCL 20/80% / TCH) após 7, 14 e 30 Dias de Implantação *in vivo*.



**Figura 5. 37** - Comparação entre as Curvas Termogravimétricas do Grupo III (PCL/BPM-PCL 20/80% / TCH) após 180 e 360 Dias de Implantação *in vivo*.

A Figura 5.38 representa as curvas termogravimétricas do Grupo IV (PCL/HAp /TCH) para cada período de implantação *in vivo*, representados a partir da porcentagem de perda de massa em função de uma taxa controlada de temperatura e sua DTG.



**Figura 5.38** - Curva Termogravimétrica do Grupo IV (blenda de PCI/ HAp/ TCH) sem degradar e após cada período de implantação *in vivo*.

Nos termogramas e curvas de DTG apresentados nas Figuras 5.38 podem ser observados que semelhantemente ao Grupo III a DTG apresentada pelo Grupo IV, da pastilha

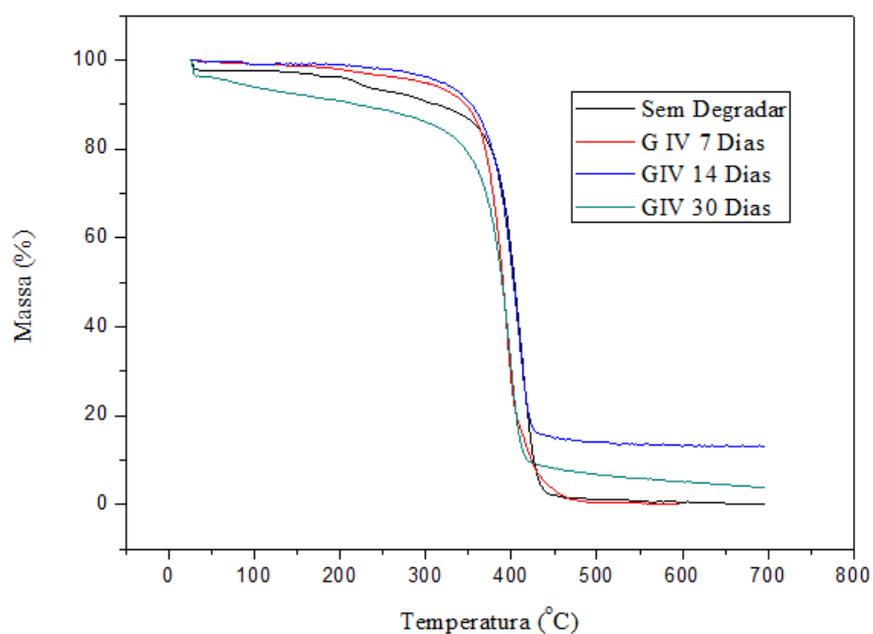
que não sofreu degradação *in vivo*, demonstra um pico em 220 °C, que indica estar relacionado à presença da TCH, este pico também não foi observado nas blendas implantadas. Para o grupo sem degradação *in vivo* e o implantado por quatorze dias verificaram-se duas etapas sobrepostas. Para o período de sete dias, duas reações de degradação foram observadas, com a segunda aparecendo no final da curva. Com trinta dias, uma única etapa é observada e para ambos os períodos subsequentes, no mínimo duas etapas são visualizados, indicando a possibilidade de vários mecanismos de degradação da blenda.

Na Tabela 5.13 é possível visualizar as temperaturas correspondentes ao valor da temperatura  $T_{onset}$  e temperatura  $T_{offset}$ , para o Grupo IV, com suas respectivas porcentagens de perdas de massa e o valor do ponto de inflexão na curva do TGA correspondente ao pico da derivada.

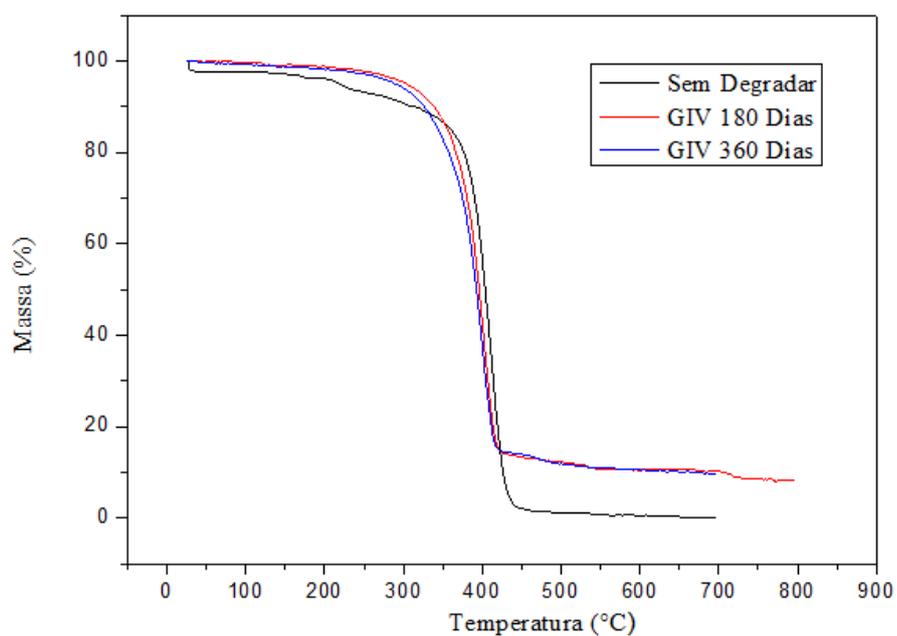
**Tabela 5. 13-** Grupo IV (PCL// HAp/ TCH) -  $T_{onset}$ ,  $T_{offset}$ ,  $T_{máx}$  e a porcentagem de resíduo final.

<b>Grupo IV</b>	<b><math>T_{onset}</math> (C°)</b>	<b><math>T_{offset}</math> (C°)</b>	<b><math>T_{Máx}</math> (C°)</b>	<b>% Resíduo final</b>
<b>Sem Degradar</b>	364	431	411	1,65
<b>7 Dias</b>	332	410	391	0,98
<b>14 Dias</b>	338	416	396	10,80
<b>30 Dias</b>	324	412	396	8,01
<b>180 Dias</b>	304	417	402	14,01
<b>360 Dias</b>	299	416	403	12,30

Com base nos dados apresentados na Tabela 5.13 observa-se que a  $T_{onset}$  diminui de 364°C para 299°C (redução de 17,8%) e a  $T_{offset}$  varia de 431°C para 416°C. Desta forma, observa-se que ocorreu uma diminuição na faixa de temperatura, indicando uma redução da estabilidade térmica para o Grupo IV. Nas Figuras 5.39 e 5.40 encontra-se representada a comparação entre os termogramas do Grupo IV (blenda de PCL/HAp/TCH) após implantação *in vivo*, para cada período de estudo.



**Figura 5. 39** - Comparação entre as Curvas Termogravimétricas do Grupo IV (PCL/HAp/TCH) após 7, 14 e 30 Dias de Implantação *in vivo*.



**Figura 5. 40** - Comparação entre as Curvas Termogravimétricas do Grupo IV (PCL/HAp/TCH) após 180 e 360 Dias de Implantação *in vivo*.

Observa-se que os Grupos II e IV apresentam uma maior porcentagem de resíduo final, quando comparado com os outros grupos. Este fato sugere estar relacionado com a presença de material inorgânico na blenda, desta forma, ocorre devido a presença da HAp nas

pastilhas. Com base na literatura consultada, apenas entre 800°C a 1300°C é que ocorre a decomposição do cálcio de  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6$  em  $\text{CaO}$  e  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , com diminuição na curva de TG (COSTESCU, 2010). Também foi relatado que entre 700 e 800 °C à formação de apatita amorfa, ocasionando ganho de peso antes dos 800°C (ALQAP *et al.* 2011). Neste contexto ainda, Azevedo *et al.* (2015) analisou o TGA/DTG da HAp e verificou uma acentuada perda de massa entre 150 e 1000 °C, associada ao início da descarbonização do material, em aproximadamente 1100 °C observou início da decomposição do material e a 1250 °C, uma transição de fases do produto da decomposição da HAp. Foi observada uma perda de massa em temperaturas superiores a 1150 °C, associada com a perda de água estrutural da HAp. Considerando que a análise de TG em estudo foi até 800°C, os estudos citados acima fortalecem os indícios de que o aumento da porcentagem dos resíduos é proveniente a presença da HAp.

Considerando  $T_{\text{onset}}$ ,  $T_{\text{offset}}$ ,  $T_{\text{máx}}$ , percebe-se que após implantação, todos os grupos analisados apresentaram resultados que indicam diminuição na estabilidade térmica do material, sendo necessária uma menor faixa de temperatura para ocorrer o processo de degradação. Mesmo ocorrendo uma diminuição da estabilidade térmica do material, os resultados indicam que os arcabouços de PCL apresentam lenta taxa de degradação, pois após um ano de pesquisa o grupo que apresentou maior redução na  $T_{\text{onset}}$ , diminuiu apenas 17,8% da temperatura que inicia o processo de degradação. Praticamente não houve alteração na  $T_{\text{máx}}$  das blendas.

### 5.2.5 Comportamento térmico a partir da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas de DSC têm como principal objetivo revelar o comportamento térmico das amostras ao longo de uma ampla faixa de temperatura. No presente estudo, foi determinada a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de fusão ( $T_f$ ), variação de energia ( $\Delta H_f$ ) e grau de cristalinidade das pastilhas sem degradar e do Grupo I (blenda de PCL) utilizando o segundo ciclo de aquecimento. Os valores obtidos de  $T_f$  no ensaio de DSC para a blenda de PCL, com ou sem associações, sem degradar *in vivo* foram de aproximadamente 51°C. A  $T_g$  variou entre aproximadamente -77 a - 80°C. Os valores do ponto de fusão ( $T_f$ ) encontrados na literatura para o PCL semicristalino foi entre 59 e 64°C, dependendo do conteúdo cristalino, e uma temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) em torno de -60°C (PEÑA *et al.*, 2006). A diferença dos resultados encontrados no presente estudo com os da literatura podem ser justificadas pelo peso molecular da blenda em estudo, composta por PCL de elevado peso molecular e o BPM-

PCL, na proporção de 20/80. Dentre as várias pesquisas analisadas observa-se que estas diferenças nas análises de DSC estão relacionadas às condições experimentais e a história térmica de cada amostra, além da massa molar. Observa-se também, que a incorporação da HAp e TCH diminuíram a cristalinidade da blenda. Na Tabela 5.14, estão descritos os valores das propriedades térmicas e morfológicas para todos os grupos de pastilhas envolvidos no estudo, sem sofrerem processos de degradação *in vivo*, onde  $T_g$  é a temperatura de transição vítrea,  $T_f$ , temperatura de fusão e  $\Delta H_f$  a entalpia de fusão.

**Tabela 5. 14** - Valores médios das propriedades térmicas e morfológicas das blends sem degradar *in vivo*.

<b>Grupos</b>	<b><math>T_g</math> (°C)</b>	<b><math>T_f</math> (°C)</b>	<b><math>\Delta H_f</math> (J/g)</b>	<b>Cristalinidade (%)</b>
<b>Grupo I</b>	-80.47	51,63	63,42	45
<b>Grupo II</b>	-80.04	51.22	61.08	44
<b>Grupo III</b>	-78,92	52.15	54,72	39
<b>Grupo IV</b>	-77,68	51.32	52.98	38

Na Tabela 5.15 estão descritos os valores das propriedades térmicas e morfológicas para o Grupo I, em seus respectivos tempos de implantação *in vivo*.

**Tabela 5. 15** - Valores médios das propriedades térmicas e morfológicas da blenda de PCL (Grupo I) em seus respectivos períodos de implantação *in vivo*.

<b>Grupo I</b>	<b><math>T_g</math> (°C)</b>	<b><math>T_f</math> (°C)</b>	<b><math>\Delta H_f</math> (J/g)</b>	<b>Cristalinidade (%)</b>
<b>Sem degradar</b>	-80.47	51.63	63,42	45
<b>7 Dias</b>	-78,85	53.56	64.89	47
<b>14 Dias</b>	-77.39	53.39	69.52	50
<b>30 Dias</b>	-81.33	53.36	70.06	50
<b>180 Dias</b>	- 79.04	58.12	35.81	25

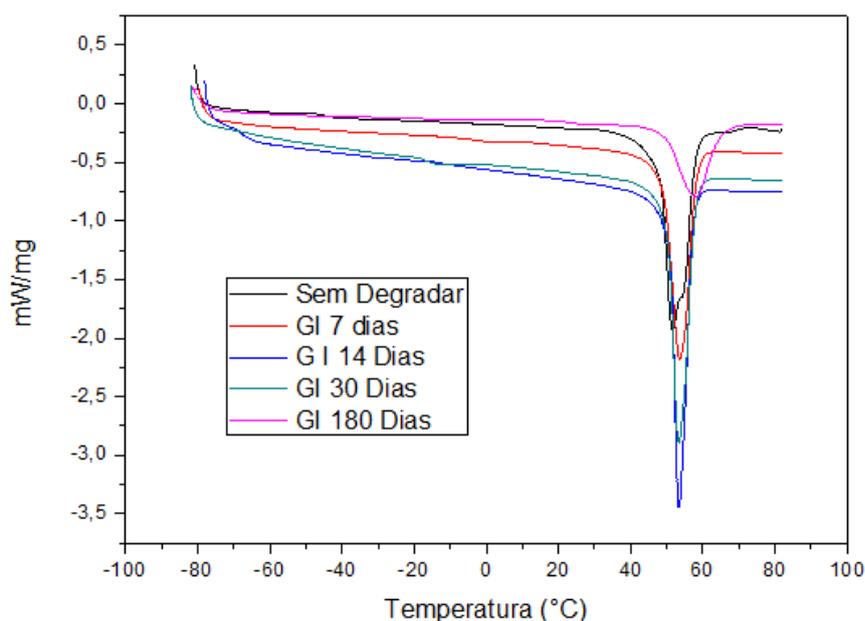
A temperatura de fusão da blenda aumentou após o primeiro período de implantação (de 51,63°C para 53,56°C após sete dias) e manteve-se praticamente inalterada até 30 dias. Após 180 dias observa-se um aumento de aproximadamente 5°C na temperatura de fusão, com relação ao período anterior.

Até os 30 dias de implantação, a entalpia de fusão aumentou conforme o período de implantação avançava, verificando um aumento de aproximadamente 11%, quando

comparado com as pastilhas que não foram implantados. Conseqüentemente, observou-se um aumento na cristalinidade para este mesmo período. Correlacionando estes dados com as características mecânicas das blendas em estudo, onde foi observado um aumento na resistência após este mesmo período de implantação, os resultados indicam que ocorreu o mecanismo de degradação por hidrólise susceptível aos poliésteres alifáticos. Nos processos de degradação dos polímeros o aumento da cristalinidade do material e conseqüentemente da rigidez não parece estar relacionado ao aumento da fase cristalina no material, mas a uma redução da relação amorfa. No estudo de Lam *et al.* (2009) foi observado que a cristalinidade média da PCL *in vivo* aumentou de 63% para cerca de 68% após 6 meses, independentemente do local de implantação. Os arcabouços de PCL/TCP, tiveram um aumento de 66% para cerca de 74% (SC) e 71% (IM), sem mudança significativa de cristalinidade para os diferentes locais de implantação ( $p < 0,05$ ).

Os valores encontrados para entalpia de fusão caracterizam as amostras como semicristalinas. Aos 180 dias de implantação, houve uma diminuição da entalpia de fusão de 52,5% e conseqüentemente, a cristalinidade da blenda de PCL, reduziu de 50% (até trinta dias de implantação) para 25%. Considerando o processo de hidrólise na degradação dos materiais, após as regiões amorfas serem degradadas, a água começa a penetrar lentamente nas regiões cristalinas do polímero, marcando o início da próxima fase da hidrólise, que implica em perda da cristalinidade (PITT *et al.*, 1981).

Na Figura 5.41 está representada a comparação das curvas de DSC da blenda de PCL (Grupo I), após 7, 14 e 30 dias de implantação *in vivo*, utilizando o segundo ciclo de aquecimento.



**Figura 5. 41** - Comparação das Curvas de DSC da blenda de PCL (Grupo I), até 180 dias de implantação *in vivo*, utilizando o segundo ciclo de aquecimento.

Seyednejad *et al.* (2012), estudou os arcabouços de PCL até três meses de implantação, as propriedades térmicas foram avaliadas através do DSC, e foi observado que a temperatura de fusão dos arcabouços PCL diminuiu ligeiramente após a implantação (de 54,8°C antes da implantação para 54,6°C ± 0,2 após 1 mês de implantação) e manteve-se inalterado posteriormente. O calor de fusão para esses arcabouços diminuiu de 67,6 J/g para 61,6 ± 2,7 J/g após um mês e depois aumentou para 65,7 J/g ± 1,2 depois de três meses. A porcentagem de cristalinidade desses arcabouços foi calculada com base no calor experimental de fusão relatado para PCL 100% cristalina (139,5 J/g). E foi possível constatar que as porcentagens de cristalinidade dos arcabouços PCL permaneceram dentro da constante de erro experimental (48% antes da implantação, 44% após um mês de implantação e 47% após três meses de implantação).

Logo os resultados indicam que, a partir das análises do DSC, as blendas de PCL em estudo apresentaram sinais de degradação após os 180 dias de implantação *in vivo*. Diferentemente do que foi encontrado em alguns estudos *in vivo*, onde foi demonstrada a ausência de degradação para este período. Sun *et al.* (2006) desenvolveram seu estudo em ratos e observaram que as cápsulas de PCL permaneceram intactas por 2 anos, fragmentando-se, apenas, após 30 meses. Pitt *et al.* (1981) mostraram que, para o período estudado nenhuma degradação para os implantes de PCL *in vivo* foi observada, Seyednejad *et al.* (2012) constataram que os andaimes de PCL não sofreram degradação no período de 3 meses, Lam *et*

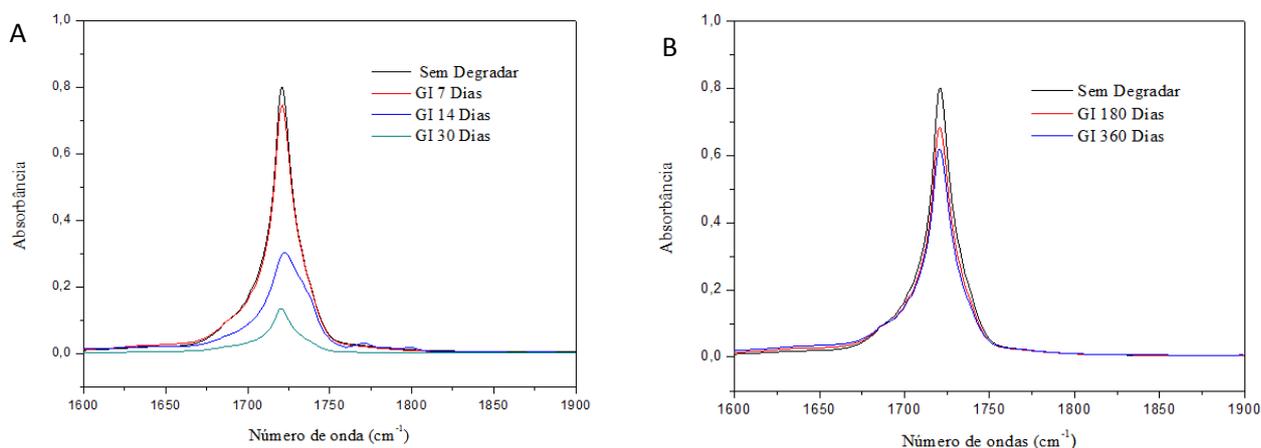
al. (2009) também constataram que até 6 meses *in vivo*, os mecanismos celulares (degradação enzimática) não desempenham um papel na degradação dos arcabouços de PCL.

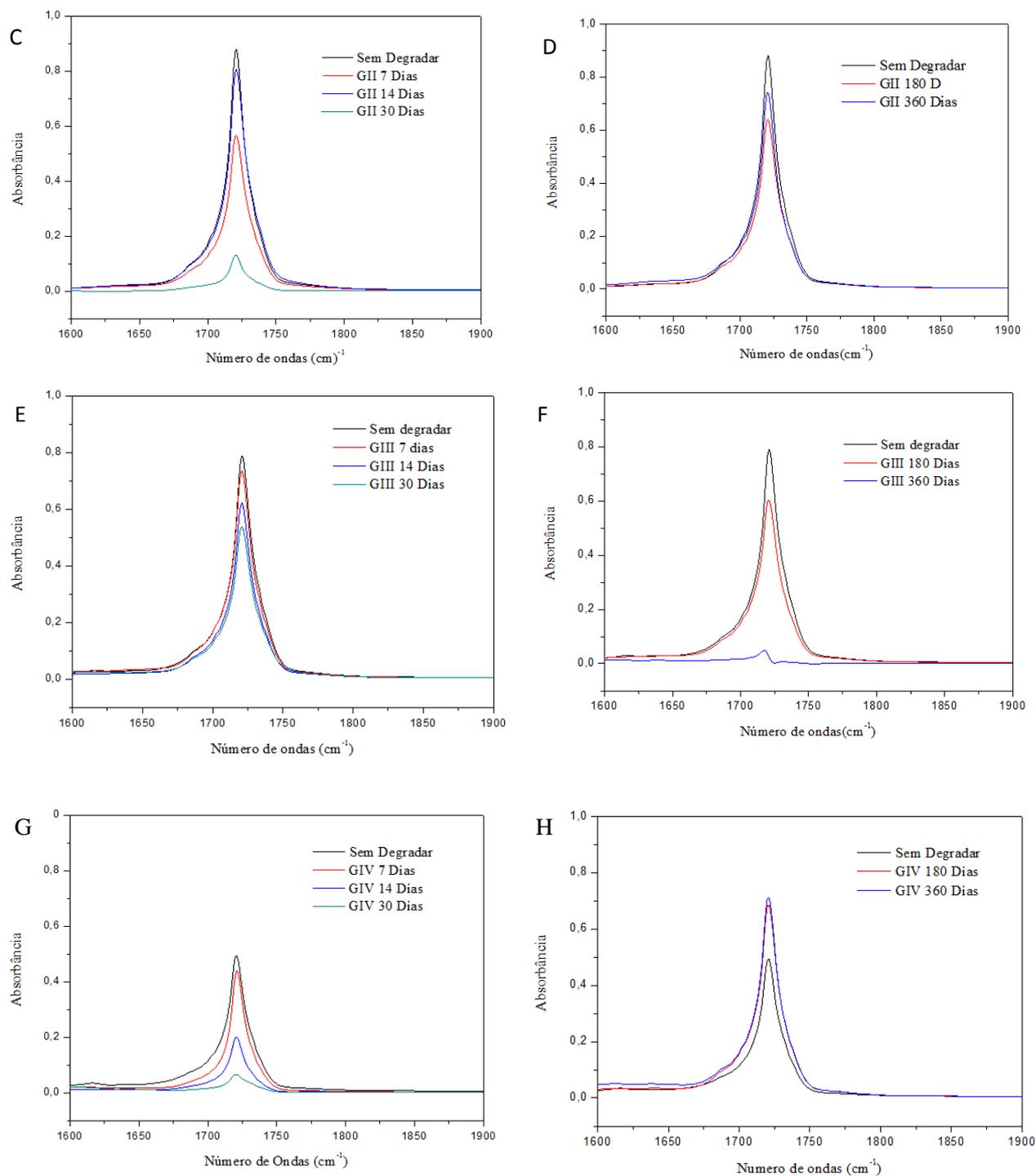
### 5.2.6 Avaliação Química da Degradação Através do FTIR

As bandas do infravermelho características de PCL foram definidas na Tabela 4.3. Os espectros no infravermelho dos ésteres apresentam como característica marcante a presença de duas bandas fortes, referentes ao estiramento da ligação C = O, na região de 1725-1750  $\text{cm}^{-1}$ , aproximadamente, esta banda correspondente a principal transmissão do pico de PCL (GURLEK *et al.*, 2017), e C - O, que estão representados em 1185-1275  $\text{cm}^{-1}$  e 1050-1160  $\text{cm}^{-1}$ .

Todas as amostras utilizadas no estudo tiveram sua estrutura química analisada através do FTIR após cada período de análise. Para melhor explanação dos resultados, as comparações foram divididas em duas imagens, a primeira representa a comparação das pastilhas que foram implantadas até o período de 30 dias, a segunda, as que permaneceram 180 e 360 dias.

A Figura 5.42 refere-se ao espectro na região correspondente à banda vibracional apresentada pelos ésteres, referentes ao estiramento da ligação C = O em 1721  $\text{cm}^{-1}$ .





**Figura 5. 42** - Espectro do FTIR para todos os grupos em função do tempo de degradação. **A:** Grupo I (blenda de PCL) até 30 dias de implantação; **B:** Grupo I, 180 e 360 dias; **C:** Grupo II (blenda PCL/HAp) até 30 dias de implantação; **D:** Grupo II, 180 e 360 dias I; **E:** Grupo III (blenda de PCL/TCH) até 30 dias de implantação; **F:** Grupo III, 180 e 360 dias; **G:** Grupo IV ( blenda PCL/HAp/TCH) até 30 dias de implantação e **H:** Grupo IV, 180 e 360 dias.

Como demonstrado na Figura 5.42, o espectro do FTIR do Grupo I e Grupo II, após 30 dias de degradação, apresentou uma considerável e gradativa redução da intensidade do pico característico dos grupos ésteres do PCL em sua banda de absorção ( $1721\text{ cm}^{-1}$ ). Este

processo está relacionado com a diminuição de intensidade relativa da carbonila na fase amorfa, relacionada às quebras das ligações éster do PCL.

Observa-se que a redução na intensidade dos picos para o Grupo III, em 30 dias de implantação, segue o mesmo perfil dos grupos anteriores, embora com menor intensidade. Para este mesmo período, o Grupo IV, apresenta uma maior redução da intensidade do pico, quando comparado com os outros grupos de estudo. De forma geral, observa-se que após 30 dias de implantação os espectros na região correspondente à banda vibracional apresentada pelos ésteres alifáticos saturados ( $1721-1750\text{ cm}^{-1}$ ), para todos os grupos de estudo, apresentaram redução na intensidade do pico, quando comparadas com as amostras iniciais (sem degradar), indicando a degradação do polímero em estudo. Diferentemente do citado Fukushima *et al.*, (2012) não foi observado, em nossos espectros, o aparecimento da típica banda de absorção do grupo carbonila pertencente ao ácido carboxílico formado pela quebra do grupo éster pertencente à cadeia do polímero ( $1738\text{ cm}^{-1}$ ), que pode estar relacionado há alguma biotransformação do PCL ou a liberação do derivado no organismo.

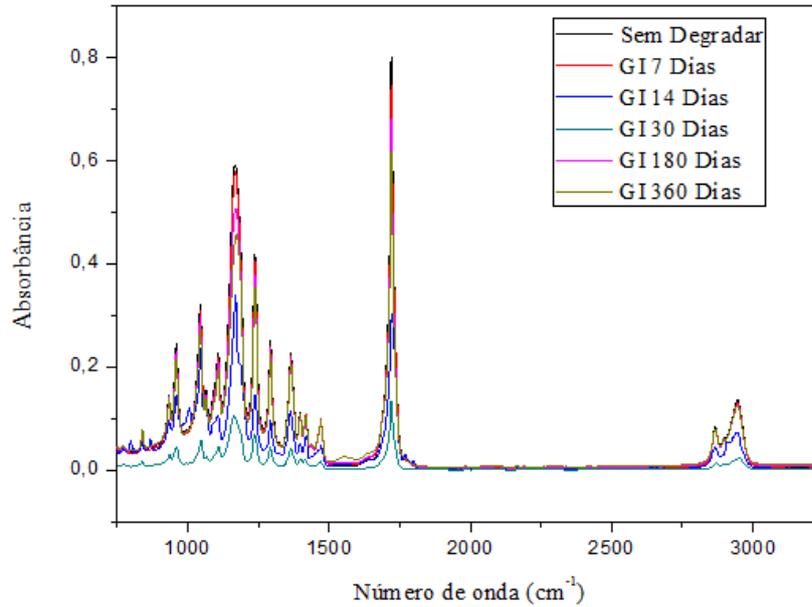
Aos 360 dias, o Grupo III apresentou uma brusca diminuição na intensidade do pico, referente ao estiramento da ligação  $C = O$ , na região de  $1725-1750\text{ cm}^{-1}$ , onde praticamente não houve absorção.

Para as outras bandas vibracionais características,  $1238(\text{cm}^{-1})$  e  $1169(\text{cm}^{-1})$ , que não foram representadas nos gráficos acima, observa-se o mesmo comportamento do estiramento da ligação  $C = O$  em  $1721\text{ cm}^{-1}$ , acompanhando com a redução ou não da intensidade do pico.

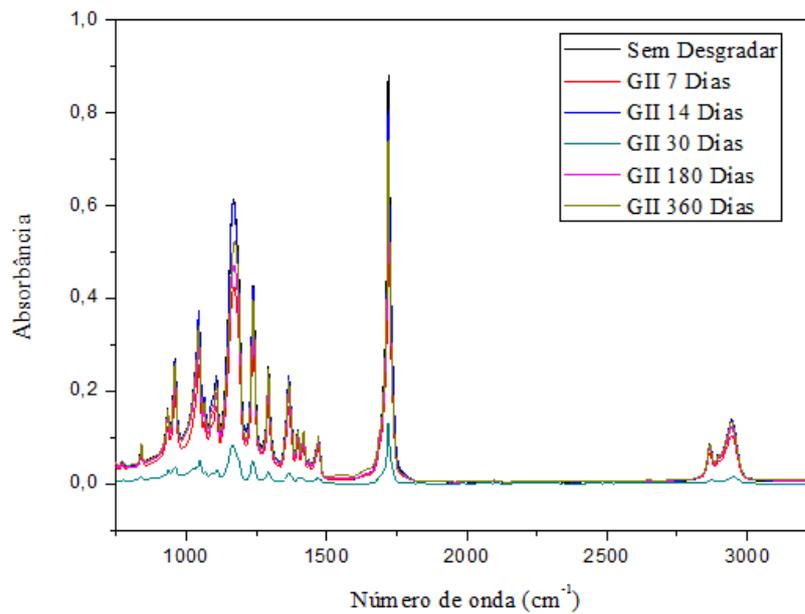
PCL é um poliéster alifático cujo seu mecanismo de degradação hidrolítica traz a quebra dos grupos ésteres com formação do grupo álcool e ácido carboxílico (FUKUSHIMA *et al.*, 2012). De acordo com Barbosa (2007) a observação dos espectros dos ácidos carboxílicos, geralmente, na região de número de ondas mais próximas de  $2500\text{ cm}^{-1}$ , é caracterizada pelo aparecimento de duas ou três bandas mais fracas sobrepostas. O formato desta banda de estiramento para o grupo OH (cobrindo a região de  $2500$  a  $3300\text{ cm}^{-1}$ ) é típico de ácidos carboxílicos, facilitando, assim, a identificação desse tipo de grupo funcional. Neste sentido, percebe-se que em nosso estudo que ocorreu à diminuição da intensidade dos grupos ésteres, mas não ocorreu o aumento no sinal em torno de  $3000-3200\text{ cm}^{-1}$ , não indicando a formação de ácido carboxílico devido ao processo de hidrolise do material.

A seguir (Figura 5.43), poderá ser visualizada a comparação dos espectros do FTIR para todos os grupos em função do tempo de degradação, em uma ampla faixa do espectro ( $\text{cm}^{-1}$ ). Para todos os grupos em estudo, observa-se sempre o mesmo comportamento de

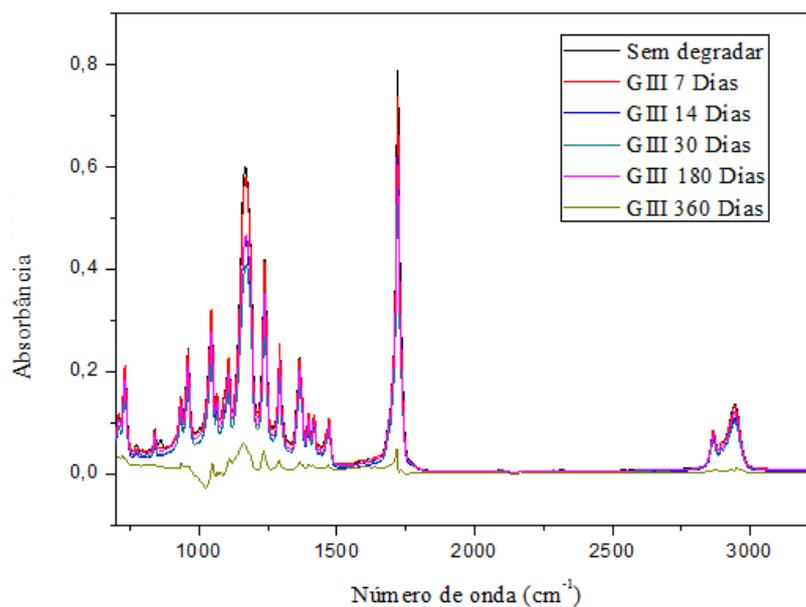
degradação, não verificando o aumento de um grupo químico em decorrência da degradação de outro.



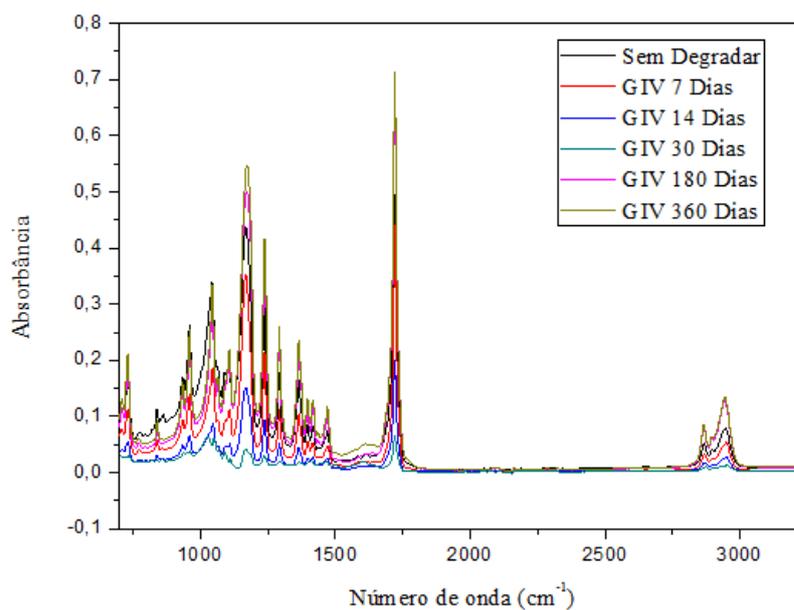
**Figura 5. 43** - Comparação dos espectros do FTIR para todo o Grupo I (Blenda de PCL) em função do tempo de implantação *in vivo*.



**Figura 5. 44** - Comparação dos espectros do FTIR para todo o Grupo II (Blenda de PCL/HAp) em função do tempo de implantação *in vivo*.



**Figura 5. 45** - Comparação dos espectros do FTIR para todo o Grupo III (Blenda de PCL/TCH) em função do tempo de implantação *in vivo*.



**Figura 5. 46** - Comparação dos espectros do FTIR para todo o Grupo IV (Blenda de PCL/HAp/TCH) em função do tempo de implantação *in vivo*.

Desta forma, percebe-se que após os períodos de implantação houve degradação química que caracteriza o processo de degradação das blendas de PCL associadas ou não a HAp e TCH.

## 6.0 CONCLUSÃO

- Neste trabalho, pode ser observado que a biodegradação das blendas de PCL com ou sem associações, ocorreu de forma biocompatível, onde as dosagens séricas dos marcadores renais e hepáticos avaliados no estudo, não indicam dano renal e hepático, passível de detecção por análise sanguínea.
- A permanência da blenda indica escassa reação inflamatória, compatível com o esperado quando dispositivos biorreabsorvíveis são empregados.
- Em consonância com todos os parâmetros físico-químicos analisados observa-se que as blendas em estudo sofreram lenta taxa de degradação ao longo de um ano, e os resultados indicam uma degradação superficial das pastilhas, com alteração química e mecânica, redução da cristalinidade, massa e, menos intensamente, da estabilidade térmica. Estas características podem ser benéficas em casos onde o material deva permanecer no organismo por um extenso período, como por exemplo, nas áreas de ortopedia, de modo geral.
- As blendas que apresentaram menor sinal de degradação foram as composta apenas pelo PCL (grupo I). A incorporação da TCH e HAp (grupo IV) na blenda facilitou o processo de degradação, pois o Grupo IV apresentou os maiores sinais de degradação, após implantação.

## REFERÊNCIAS

- AABOE, M.; PINHOLT, E.M; HJORTING-HANSEN, E. Healing of experimentally created defects: a review. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v.33, n.5, p.312-8, oct.1995.
- ABUKAWA, H. *et al.* The Engineering of Craniofacial Tissues in the Laboratory: A Review of Biomaterials for Scaffolds and Implant Coatings. **Dent. Clin. N. Am.**, v.50, p.205-216, 2006.
- ALBREKTSSON T, JOHANSSON C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **Eur Spine J**;10:S96–S101, 2001.
- ALQAP, A. *et al.* Thermal analysis on hydroxyapatite synthesis through mechanochemical method. **IFMBE Proceedings**, 35 *IFMBE*, 108–111. 2011. [http://doi.org/10.1007/978-3-642-21729-6\\_30](http://doi.org/10.1007/978-3-642-21729-6_30)
- ALMQVIST, N.; THONSON, N.H.; SMITH, B.L. Methods for fabricating and characterizing a new generation of biomimetic materials. *Materials Science & Engineering*. v. 7; p. 34- 43, 1999.
- AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 6, 158–170, 2003. <http://doi.org/10.1590/S1415-790X2003000200009>
- ANDERSON R.J.; SCHRIER R.W. **Acute renal failure**. In: SCHRIER RW & GOTTSCHALK CW. *Diseases of the kidney*, 6th ed., Little Brown, New York, p. 1069-1114, 1996.
- ANDERSON J.M. Inflammatory response to implants. **Am Soc Art Int Org**, 34(2): 101-107,1988.
- ANDERSON, J.M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG D.T. Foreign body reaction to biomaterials. **Semin Immunol**, v. 20, p. 86-100, 2008.
- ATAOLLAHI O. A. A comparison in mechanical properties of cermets of calcium silicate with Ti-55Ni and Ti-6Al-4V alloys for hard tissues replacement. *Scientific World Journal*. 2014;2014:616804.
- BAILLIE T A RETTIE A E. Role of biotransformation in drug-induce toxicity; Influence of intra and inter-species differences in drug metabolism. **Drug Metab Pharmacokinet**; 26; 15-29, 2011.
- BARBANTI, S.H.; ZAVAGLIA, C.A.C.; DUEK, E.A.R. Degradação Acelerada de Suportes de Poli (ε-Caprolactona) e Poli (D, L-Ácido Láctico-co-Ácido Glicólico) em Meio Alcalino. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 16, n° 2, p. 141-148, 2006.
- BARBOSA, L. C. A. Espectroscopia no Infravermelho: na Caracterização de Compostos Orgânicos. UFV - UNIV. FED. VICOSA, 189p, 2007.
- BAUER *et al.* Engineering biocompatible implante surfaces. Part. I: Materials and surfaces. **Progress Mater.Sci**, 58, 261-326, 2013.

BAYRAK, E., OZCAN, B., ERISKEN, C. Processing of polycaprolactone and hydroxyapatite to fabricate graded electrospun composites for tendon-bone interface regeneration. **Journal Polymer Engineering**, 37(43), 99–106. <http://doi.org/10.1515/polyeng-2016-0017>, 2016.

BOEHM *et al.* Clinical chemistry reference database for wistar rats and C57/BL6 mice. **Biological Chemistry**, v. 388, i. 11, p. 547-554, 2007.

BLACK, J. Biological performance of biomaterials. **In fundamental of biocompatibility**, Ed. J. Black, 4 th, Ed. Boca Raton, FL: CRC press-taylor e Francis.

BLACKWOOD K A , BOCK N, TIM R, DARGAVILLE T.R, WOODRUFF M. A. Scaffolds for Growth Factor Delivery as Applied to Bone Tissue Engineering. **International Journal of Polymer Science**, v.2012, p.1-25, 2012.

BROWN, S.A. *et al.* Determination of excretion of inulin, creatinine, sodium sulfanilate, and phenolsulfonphthalein to assess renal function in goats. **Am. J. Vet. Res.**, v.51, n. 4p.581-586, 1990.

BURUGAPALLI K, PANDIT A. Characterization of tissue response and in vivo degradation of cholecyst-derived extracellular matrix. **Biomacromolecules**, v. 8: 3439 e 51, 2007.

CALIL, M. R.; Gaboard, F.; Guedes, C. G. F.; Rosa, D. S. **Polymer Testing**, v.25, p.597–604, 2006.

CALLISTER JR., WILLIAM D., *Ciência e Engenharia dos Materiais: Uma Introdução*, 1<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro, LTC, 2002.

CANEVAROLO JUNIOR, S. V. *Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros*. [São Paulo]: Artliber. São Paulo : Artliber, 2004. 448 p.

CHEN, C.C. *et al.* Preparation and characterization of biodegradable PLA polymeric blends. **Biomaterials**, v.24, p. 1167–1173, 2003.

CHEN, K-Y. *et al.* Reconstruction of calvarial defect using a tricalcium phosphate-oligomeric proanthocyanidins cross-linked gelatin composite. **Biomaterials**, v.30, n.9, p.1682-1688, 2009.

CHEUNG, H. Y.; LAU, K. T.; LU, T. P.; HUI, D.; - A critical review on polymer-based bio-engineered materials for arcabouçodevelopment Composites: Part B. 38, 2007. p.291–300

CHUENJITKUNTAWORN, B. Polycaprolactone/Hydroxyapatite composite scaffolds: Preparation, characterization, and in vitro and in vivo biological responses of human primary bone cells. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 2010.

COELHO, M. J.; PINA, C.; FERRAZ, M. P. Efeito da doxiciclina e da minociclina em células osteoblásticas humanas: estudos in vitro. **CEBIME D**, Faculdade de Ciências da Saúde – UFP, 2006.

COLES, EH. **Veterinary Clinical Pathology**. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1986.

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

COSTA, J. A. C.; NETO, O. M. V.; NETO, M. M. Insuficiência renal aguda. *Medicina*, Ribeirão Preto, Simpósio: URGÊNCIAS E EMERGÊNCIAS NEFROLÓGICAS, 36: 307-324, abr./dez, 2003.

COSTESCU, A. et al., (2010). Physico-Chemical Properties Of Nano-Sized Hexagonal Hydroxyapatite Powder Synthesized By Sol-Gel. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 5(4), 989–1000.

COULEMBIER, O. et al. Controlled ring-opening polymerization to biodegradable aliphatic polyester: Especially poly (b-malic acid) derivatives. **Progress in Polymer Science**, 311, 723–747, 2006.

CUTTER, C. S.; MEHRARA, B. J. Bone Grafts and Substitutes. **J Long-Term Effects of Med Implants**, v.16, n.3, p.249–260, 2006.

CUI Y.; PAULES R.S. Use of transcriptomics in understanding mechanisms of drugs-induced toxicity. *Pharmacogenomics*, 11;573-85, 2010.

DASH, T. K.; KONKIMALLA, V. B. Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. **J of Controlled Release**, v.158, p.15-33, 2012.

DA SILVA, F. M. **Desenvolvimento, caracterização e estudo pré-clínico de dispositivos implantáveis biocompatíveis baseados no polímero Poli (ε-caprolactona)**, 2011, 143p. Tese (Doutorado). IPEN Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

DANILCHENKO, S.N. et al. Characterization and in vivo evaluation of chitosan-hydroxyapatite bone scaffolds made by one step coprecipitation method. **J of Biomedical Materials Research a**, v. 96A, ISSUE 4, 2011.

DE ALMEIDA, K.A.; DE QUEIROZ, A.A.A.; HIGA, O.Z.; ABRAHAM, G.A.; ROMÁN J.S. Macroporous poly (epsilon-caprolactone) with antimicrobial activity obtained by iodine polymerization. **J. Biomed. Mat. Res.Part A**, v.68<sup>a</sup>, n.3, p.473-78, 2003.

DE ALMEIDA, K.A. DE QUEIROZ, A.A.A. **Key Engin.Mat.**,v.16,p.589-592, 2004.

DE AZA PN, PENÑ JI, LUKLINSKA ZB, MESEGUER-OLMOL. 2014. Bioeutectic ceramics for biomedical application obtained by laser floatingzone method. *In vivo* evaluation. **Materials**, 7, 2395–2410.

DEE K.C., PULELO D. A., BIZIOS. R. An Introduction to tissue Biomaterial Interaction. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, Publications, 2002.

DELAISSÉ J.M. et al. Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. **Clin Chim Acta**, v. 291, p.223-34, 2000.

DE QUEIROZ, A. A. A. et al. Ring-Opening Polymerization of ε-Caprolactone by Iodine Charge-Transfer Complex. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v.40, n. 8, p. 714-722, 2002.

DOROZHKIN SV, Epple M. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed* 2002;41:3130–46.

DUNCAN, J.R.; PRASSE, K.W.; MAHAFFEY, E.A. Liver In: **Veterinary laboratory medicine: clinical pathology**. 3. ed. IOWA: State University, p.130-151, 1994.

EL-GHANNAM, A. Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering. **Expert Rev. Med. Devices**, v.2, n.1, p.87-101, 2005.

EANES, E. D. **Program Crystal Growth Characteristics**. vol. 3, p. 3-15, 1980.

ESPOSITO, E. et al. Biodegradable microparticles for sustained delivery of tetracycline to the periodontal pocket: formulatory and drug release studies. **J. Microencapsulation**, v. 14, n. 2, p. 175-187, 1997.

FRANCA, D. C. C. *et al.* Avaliação da biocompatibilidade de implantes de silicone gel em subcutâneo de ratos - estudo histomorfométrico. **RFO UPF**, Passo Fundo, v. 16, n. 1, abr. 2011. Disponível em: <[http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pidS1413-40122011000100015&lng=pt&nrm=iso](http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pidS1413-40122011000100015&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em 09 set. 2015.

FERREIRA F. A.; MALMONGE, S. M. DEGRADAÇÃO HIDROLÍTICA DE POLÍMEROS BIORREABSORVÍVEIS USADOS EM ENGENHARIA TECIDUAL: MECANISMO E CINÉTICA. Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 2014.

FRÖHLICH, M. et al. Tissue Engineered Bone Grafts: Biological Requirements, Tissue Culture and Clinical Relevance. **Curr. Stem Cell Res. Ther.**, v.3, n.4, p.254-264, 2008.

FUKUSHIMA, K. ; FEIJOO, J. L.; YANG, M. C. Abiotic degradation of poly(dl-lactide), poly(ε-caprolactone) and their blends. **Polymer Degradation and Stability**, 97(11), 2347–2355, 2012.

FULMER, M. T; MARTIN, R. I; BROWN, P. W. Formation of Calcium deficient Hydroxyapatite at near- physiological temperature. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 3, p. 299-305, 1992.

GIBBS R.A., et al.; Rat Genome Sequencing Project Consortium. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. **Nature**, Apr 1; 428 (6982): 493-521, 2004.

GIL, M.H; FERREIRA, P. Polissacarídeos como biomateriais. **Química**, v.100, p.72-74, 2006.

GOLUB , L.M., RAMAMURTHY, N.S., MCNAMARA, T.F. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutics implications for an old family of drugs. In: **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, 2(2), pp. 297-322, 1991.

GOPFERICH, A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. **Biomaterials**, 7, 103–114, 1996.

GRASSELLI J. G.; MOCADLO, S. E.; MOONEY, J. R. Applied Polymer Analysis and Characterization. New York: Hanser, 1987.

GRECO, R. S.; PRINZ, F. B.; SMITH, R.L. Nanoscale Technology in Biological Systems. Londres: CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 1st edition, 2005.

GURLEK, A. C., SEVINC, B., BAYRAK, E., & ERISKEN, C. Synthesis and characterization of polycaprolactone for anterior cruciate ligament regeneration. **Materials Science and Engineering C**, 71, 820–826, 2017.

HELMUS M. N. ; GIBBONS D. F. ; CEBON D. Biocompatibility: meeting a key functional requirement of next-generation medical devices. **Toxicologic Pathology**, 36 (1): 70-80, 2008. doi: 10.1177/0192623307310949

HENRY, J. B. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 20. Ed.-Barueri, São Paulo: Manole, 2008.

HIGASHISAKA K, *et al.* Acute phase proteins as biomarkers for predicting the exposure and toxicity of nanomaterials. **Biomater**. 2011; 32:3–9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.08.110.

HIRSCH, W. D. B. et al. **Analysis of Biocompatibility, Cytotoxicity and Bone Conductivity of Polycaprolactone: An *In Vivo* Study**. [Tese]. PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL, Porto Alegre, 2014.

HOOPER et al. **Biochemical profiles of rats Wistar (*Rattus norvegicus*) at laboratory animal breeding center**. Trabalho apresentado X Congresso Brasileiro da Ciência de Animais de Laboratório, VI Congresso Mundial da Ciência de Animais de Laboratório, V Encontro de Pesquisadores do Mercosul. COBEA (SBCAL), São Paulo, 2007.

HORBYLON, B. Z. **Estudo *in vitro* da cinética de desorção de doxiciclina e tetraciclina impregnadas a membranas de colágeno utilizadas como dispositivos de liberação medicamentosa local**, 2008. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

HOU, J. Degradability, cytocompatibility, and osteogenesis of porous scaffolds of nanobredigite and PCL – PEG – PCL composite. **International Journal of Nanomedicine**. 3545–3555, 2016.

HUANG, M. H. et al. Degradation and cell culture studies on block copolymers prepared by ring opening polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone in the presence of poly (ethylene glycol). **J.Biomed. Mater. Res**, v. 69A, p. 417-427, 2004.

JAIN, R. A. The Manufacturing Techniques of Various Drug Loaded Biodegradable Poly(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA) **Devices**. **Biomaterials**, 21, 2475-2490, 2000.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KAMARUL, T. Biocompatibility and toxicity of poly (vinyl alcohol)/N, O-carboxymethyl chitosan scaffold. **The Scientific World Journal**, 905103, 2014.

KARUPPUSWAMY, P. et al. Polycaprolactone nanofibers for the controlled release of tetracycline hydrochloride. **Materials Letters**, 141, 180–186, 2015.

KATTI, D. S. et al. Toxicity , biodegradation and elimination of polyanhydrides, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 54, 933–961, 2002.

KAWACHI, E.Y. et al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Quim Nova**, São Paulo, v.23, n.1, p.518-522, 2000.

KOKUBO, T.; KIM, H.; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials**, 24, 2003. p. 2161-2174.

KELLER, U.; HIBST, R. Ultrastructural changes of enamel and dentin following Er:YAG laser radiation on teeth. In: **LASER SURGERY: ADVANCED CHARACTERIZATION THERAPEUTIC, AND SYSTEMS II**. 1990. Proceedings. Califórnia: The International Society for Optical Engineering, 1990. v.1200, p. 408-415.

KIM, H. et al. Hidroxyapatite/poly ( $\epsilon$ -caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. **Biomaterials**. p.1279-1287, 2004.

KIRBY, A.J. Hydrolysis and formation of esters of organic acids. In: Bamford, C.H., Tipper, C.F.H. (Eds.), **Comprehensive Chemical Kinetics**. In: Ester Formation and Hydrolysis and Related Reactions. **Elsevier**, Amsterdam, v. 10, p. 57–202, 1972.

KOTEK, J. et al. Biodegradable polyester nanocomposites: The effect of structure on mechanical and degradation behavior. **European Polymer Journal**, 47(12), 2197–2207, 2011.

KÖSE, G.T. *et al.* Bone generation on PHBV matrices: an in vitro study. **Biomaterials**, v. 24, n. 27, p. 4999-5007, dec., 2003.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia: bases patológicas das doenças**, 8.ed., Elsevier Saunder, Rio de Janeiro, 2010.

LAM, C. X. F. *et al.* Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months in vitro and in vivo. **Journal of biomedical materials research**. Part A, 90(3), 906–19. 2009. doi:10.1002/jbm.a.32052

LAM, C. X. F.; SAVALANI, M. M., TEOH, S. H.; HUTMACHER, D. W. Dynamics of in vitro polymer degradation of polycaprolactone-based scaffolds: accelerated versus simulated physiological conditions. **Biomedical Materials**, 2008. doi:10.1088/1748-6041/3/3/034108.

LAM, K.H *et al* – **J. Biom. Mat. Res.**, 27, p.1569-1577, 1993.

LEE KY, *et al.* Ceramic bioactivity: progresses, challenges and perspectives. **Biomed Mater** 2006;1:R31–37.

LEGEROS, R.Z. Properties of Osteoconductive Biomaterials: Calcium Phosphates. **Clin Orthop Relat Res**, Nova York, v.395, p.81-98, feb., 2002.

LIMA, C. M. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, 10, 034601, 2014.

LIU, X.; MA, P.X. Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Ann. Biomed. Eng.**, v.32, n.3, p.477-486, 2004.

LONG, P.H. Medical Devices in Orthopedic Applications. **Toxicologic Pathology**, v.36, p.85-91, 2008.

LUO, L. *et al.* Polycaprolactone nanofibrous mesh reduces foreign body reaction and induces adipose flap expansion in tissue engineering chamber. **International Journal of Nanomedicine**, 11, 6471–6483, 2016.

MARTIN, R.I; BROWN, P.W. Aqueous formation of hydroxyapatite. **J Biomed Mater Res**, Hoboken, v.35, n.3, p.299-308, jun. 1997.

MAS ESTELLES J, et al. Physical characterization of polycaprolactone scaffolds. **J Mater Sci Mater Med**, 19:189e95, 2008.

MATSUI, M. **Correlações entre Estrutura Química, Super-Estrutura Macromolecular e Morfologia das Blendas e Redes Poliméricas à Base de Quitina e Poliuretano**. [Tese] Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MAVROPOULOS, E. **A Hidroxiapatita como Removedora de Chumbo**, 1999. Dissertação (Mestrado). Fundação Oswaldo Cruz. Escola Nacional de Saúde Pública e Toxicologia. Rio de Janeiro, 1999.

MASTROGIACOMO, M. et al. Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. **Biomaterials**, v.27, p.3230-3237, 2006.

MELO, M. G. D., DÓRIA, G. A. A., SERAFINI, M. R., & ARAÚJO, A. A. S. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, 8(4), 1–6, 2012.

MINATA, M. K. *et al.* Estudo da Biocompatibilidade da Blenda de Poli ( L-ácido láctico )/ Policaprolactona-triol. **Polímeros**, vol. 23, n. 2, p. 242-247, 2013.

MOREJON M. G., SALUP R. D., CUE M. B. Actualización en tetraciclinas. **Rev Cubana Farm**, v.37, n.3, p.1, 2003.

MOEINI S., *et al.*, In-situ solvothermal processing of polycaprolactone/hydroxyapatite nanocomposites with enhanced mechanical and biological performance for bone tissue engineering, **Bioactive Materials**, 2017.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica para o Laboratório: Princípios e Interpretações**. 4ª ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau; São Paulo: Robe editorial, EDUCS – Caxias do Sul, 2003.

NAIR, L.S., LAURENCIN, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, 32, 762–798, 2007.

NITHYA, R., & MEENAKSHI SUNDARAM, N. Biodegradation and cytotoxicity of ciprofloxacin-loaded hydroxyapatite-polycaprolactone nanocomposite film for sustainable bone implants. **International Journal of Nanomedicine**, 10, 119–127, 2015.

OGAWA, C. A.; PLEPIS, A. M. G. Liberação In vitro de Cloridrato de Ciprofloxacino em Compósitos Hidroxiapatita: Colágeno. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 12, n° 2, p. 115-122, 2002.

OH, S. et al. Bioceramics for Tissue Engineering Applications – A Review. **Am. J. Biochem. & Biotechnol.**, v.2, n.2, p.49-56, 2006.

OLIVEIRA, L. S. A. F, et al. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea- método de análise e perspectivas futuras. **R. Ci. méd. biol.**, v.9 (Supl.1), p.37-44, 2010.

ORLANDINI, L. F. **Avaliação de Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos em Ratos Wistar Expostos à Amônia por Inalação**, 2012, 66 p. [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

OYANE, A. *et al.* Simple surface modification of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) to induce its apatite-forming ability. **J. of Biomedical Materials Research Part A**, v.75 (A), n.1, p. 138-145, 2005.

PRAMANIK, S., Kar, K., 2009. Synthesis and characterizations of hydroxyapatite-poly(ether ether ketone) nanocomposite: acellular simulated body fluid conditioned study. In: Lim, C., GOH, J.H. (Eds.), Proceedings of the 13th International Conference on Biomedical Engineering. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 1309–1312.

PAUTKE C. *et al.* Characterization of eight different tetracyclines: advances in fluorescence bone labeling. **J Anat.**, 217(1):76-82, jul., 2010.

PARK, J. B.; BRONZINO, J. D. Biomaterials: Principles and Applications. Nova Iorque: CRC Press, 2002.

PATARO A.L, *et al.* Surface effects and desorption of tetracycline supramolecular complex on bovine dentine. **Biomaterials**, v. 24, p.1075-1080, 2003.

PEÑA, J.; CORRALES,T.; IZQUIERDO-BARBA, I.; DOADRIO, A. L.; VALLET-REGI, M. **Polym. Degrad. Stabil.**, 91, p.1424, 2006.

PETTERINO, C.; ARGENTINO-STORINO, A. Clinical chemistry and haematology historical data in control Sprague-Dawley rats from pre-clinical toxicity studies. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 57, i. 3, p. 213-219. 2006.

PIRES, A. L. R., BIERHALZ, A. C. K., & MORAES, Â. M. (2015). Biomaterials: Types, Applications, and Market. **Química Nova**, 38(7), 957–971.

PITT, C.G. Aliphatic Polyesters I. The Degradation of Poly/ $\epsilon$ -caprolactone in vivo. **Jornal of Applied Polymer Science**, vol. 26, 3779-3787, 1981.

PRECHEUR, H.V. Bone Graft Materials. **Dent. Clin. N. Am.**, v.51, p.729-746, 2007.

PUGA, A. M. *et al.* Hot melt poly- $\epsilon$ -caprolactone/poloxamine implantable matrices for sustained delivery of ciprofloxacin. **Acta Biomaterialia**, v.8, p.1507–1518, 2012.

RANG, H. P., DALE, M. M. **Farmacologia**. Elsevier. 6ªed., Rio de Janeiro, 2007.

RHEE, S. H.; CHOI, J.Y.; JIM, H. M. Preparation of a bioactive and degradable poly ( $\epsilon$ -caprolactone) silica hybrid through a sol-gel method. **Biomaterials**, 23:4915-4921, 2002.

RIPAMONTI, U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. **Biomaterials**, 17(1): 31-35, 1996.

ROLIM, A.E.H. **Avaliação de microesferas de hidroxiapatita, dopadas ou não com estrôncio, no reparo de defeito crítico, em calvária de rato**, 2010, 91p. Dissertação. Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Odontologia, Salvador, 2010.

RONCA, D., LANGELLA, F., CHIERCHIA, M., D'AMORA, U., RUSSO, T., DOMINGOS, M., ... AMBROSIO, L. Bone Tissue Engineering: 3D PCL-based Nanocomposite Scaffolds with Tailored Properties. **Procedia CIRP**, 49, 51–54, 2016.

ROSE, F.R. *et al.* In vitro assessment of cell penetration into porous hydroxyapatite scaffolds with a central aligned channel. **Biomaterials**, Guild ford, v.25, n.24, p.5507-5514, nov., 2004.

SACHLOS, E.; CZERNUSZKA, J.T. Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. **Eur. Cell Mater.**, v.5, p.29-40, 2003.

SAHOO S.; SASMAL, A.; NANDA, R.; PHANI, A. R.; NAYAK, P. L. Synthesis of chitosan–polycaprolactone blend for control delivery of ofloxacin drug. **Carbohydrate Polymers**, v.79, p.106–113, 2010.a

SAHOO S.; SASMAL, A.; NAYAK, P.; SAHOO, D. Synthesis and Characterization of Chitosan- Polycaprolactone Blended with Organoclay for Control Release of Doxycycline. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 118, p.3167–3175, 2010.b

SAMAVEDI *et al.* Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence an cell behavior. **Acta Biomater**, 9, 8037-8045, 2013.

SANTOS, A. R. J. Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 17, nº 4, p. 308-317, 2007.

SCHOSSLER, D. *et al.* Função renal de cães tratados com doses terapêuticas de flunixin meglumine e ketoprofeno durante o trans e pós-operatório. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 16, p. 46-51, 2001.

SCHUMANN G, *et al.* IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 5. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartate aminotransferase. **Clin Chem Lab Med**. 2002 Jul; 40(7): 725-33. Erratum in: Clin Chem Lab 154 Med. 48(5): 615-621, may, 2010.

SCHWENGBER, CD M. M. B. **Reparo Ósseo após Enxerto Ósseo Autógeno e Implante de Hidroxiapatita Absorvível Granulada sob Influência de Campo Magnético Estático: Estudo Experimental em Calvária de Ratos**. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SEYMOUR, R. A.; HEASMAN; P. A. Tetracyclines in the management of periodontal diseases. **J. Clin. Periodontol.**, v. 22, p. 22-35, 1995.

SEYEDNEJAD, H. *et al.* In vivo biocompatibility and biodegradation of 3D-printed porous scaffolds based on a hydroxyl-functionalized poly ( $\epsilon$ -caprolactone). **Biomaterials**, 33(17), 4309–18, 2012.

SHIRAZI, F.S., *et al.* 2015. Characterization and mechanical properties of calcium silicate/citric acid–based polymer composite materials. **Int. J. Appl. Ceram. Technol.** 12, 371–376.

SJ, H.; BJ, T. Biodegradable polymers. *Advances in pharmaceutical science*, London, 6, 101–64, 1992.

STEVEN, L.S.; SCOTT, M.S. Urinary Sistem. **In:Fundamentals of veterinary clinical pathology**. Iowa: Iowa State, p. 277-336, 2002.

SUN, H. *et al.* The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. **Biomaterials**, 27 1735–1740, 2006.

SWETHA, M. K. *et al.* Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of

nanohydroxyapatite-zinc for bone tissue engineering applications. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 12(1):167-172, 2012.

TAMPIERE, A.; CELOTTI, G.; SPRIO S.; DELCOGLIANO A.; FRANZESE S. Porosity-graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone. **Biomaterials**, 22:1365-1370, 2001.

TEIXEIRA, L.J. C. **Potencial osteocondutor de grânulos de hidroxiapatita em defeitos críticos na calvária de ratos**. 2009. 73f. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, 2009.

VERT, M. et al. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. **J Of Materials Science: Materials In Med**, 3, 432-446, 1992.

VERMA, A. e SINGH, A. *Animal Biotechnology*. United States, Elsevier. 2014.

VERMA S, KAPLOWITZ N. Diagnosis, management and prevention of drug-induced liver injury. *Gut*. 58(11):1555-64, 2009.

VIEIRA, A. C. et al. Mechanical study of PLA-PCL fibers during in vitro degradation. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, 4(3), 451-460, 2011.

VIEIRA, J. G. H. Diagnóstico laboratorial e monitoramento das doenças osteometabólicas. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 2, p. 75-82, abril, 2007.

VON RECUM, A.F.; LABERGE, M. Educational goals for biomaterials science and engineering: perspective view. **J. Appl. Biomater.**, v.6, p.137-144, 1995.

VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; KAPLAN, D.L. Tissue Engineering: The Next Generation. *Tissue Eng.*, v.12, n.12, p.3261-3263, 2006.

WANG, S.; LU, L.; GAO, C. & WANG, X. Polymeric Biomaterials for Tissue Engineering Applications. **Int. J. Polym. Sci**, article ID 148513, 2011.

WAN, D.C.; NACAMULI, R.P.; LONGAKER, M.T. Craniofacial Bone Tissue Engineering. **Dent. Clin. N. Am.**, v.50, n.2, p.175-190, 2006.

WANNMACHER L. Tetraciclina. IN: Wannmacher L, Ferreira MBC, editors. *Farmacologia clínica para dentistas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 199, p.197-9, 1999.

WILLIAMS, D.F. *Definitions in biomaterials*. Elsevier: New York, 1987.

WILLIAMS, D.F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v.29, n.20, p.2941-2953, Jul., 2008.

FOYE WO, *et al.* *Principles of Medicinal Chemistry*. 4<sup>a</sup> ed. Media: Williams e Wilkins; 1995. p. 794-798.

WONG, W.H.; MOONEY, D.J. Synthesis and properties of biodegradable polymers used as synthetic matrices for tissue engineering. In: ATALA, A; MOONEY, D.; VACANTI, Birkhäuser, cap. 4, p. 51-82, 1997.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer : Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, 35 1217-1256, 2010.

WOODWARD, S.C. The intracellular degradation of poly ( $\epsilon$ -caprolactone). **Journal of**

**Biomedical Materials Ressearch**, v.19, p.437-444, 1985.

YANG, Rui-na, *et al.* Osteoinduction by Ca-P biomaterials implanted into the muscles of mice. *J Zhejiang Univ-Sci B. Biomed & Biotechnol*, 12(7):582-590, 2011.

YENICE, I. *et al.* Biodegradable implantable teicoplanin beads for the treatment of boné infections. **International journal of pharmaceutics**, v. 242, p.271-275, dec, 2001.

YOSHIKAWA, H. *et al.* Interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. *J. R. Soc. Interface*, v.6, p.S341-348, 2009.

YUKI, I. *et al.* Intravascular tissue reactions induced by various types of bioabsorbable polymeric materials: correlation between the degradation profiles and corresponding tissue reactions. **Interv. Neuroradiol**, 52, p.1017, 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s00234-010-0657-x>

ZHANG, X.D.; YUAN, H.; DE GROOT, K. Calcium Phosphate Biomaterials with Intrinsic Osteoinductivity. The 6th World Biomaterials Congress. Kamuela, Hawaii, USA, p.1-13, 2000.

ZHANG *et al.* The comparison of the normal blood biochemical values of wistar rats with different age and sex. **Asian Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 4, i. 3, p. 215-218. 2004.