



**João Diogo Sequeira Martins**

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

**Membranas Compósitas de  
Policaprolactona/Hidroxiapatite para  
Aplicação Estomatológica**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica

Orientador: Jorge Carvalho e Silva, Professor Auxiliar, FCT-UNL  
Co-orientador: Célia Reis Henriques, Professor Auxiliar, FCT-UNL  
Co-orientador: João Paulo Borges, Professor Auxiliar, FCT-UNL



# Membranas Compósitas de Policaprolactona/Hidroxiapatite para Aplicação Estomatológica

Copyright© 2011 - Todos os direitos reservados. João Diogo Sequeira Martins; Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

“A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor”.



*Aos meus pais, Ana Sequeira e João Martins, por serem os pilares da minha formação, e o meu exemplo de vida.*



*“Quando recebemos um ensinamento devemos recebê-lo como  
um valioso presente e não como uma dura tarefa”*

Albert Einstein



## Agradecimentos

Quero deixar aqui umas palavras de apreço como sinal de reconhecimento às diversas pessoas e entidades que me ajudaram e contribuíram, de forma directa ou indirecta, na realização deste trabalho.

Aos meus orientadores, Professor Jorge Silva e Professora Célia Henriques do grupo GREAT (Grupo de Engenharia de Tecidos) do Departamento de Física, e ao Professor João Paulo Borges do grupo de Materiais Poliméricos e Mesomorfos do Departamento de Ciência dos Materiais, pelo facto de me terem aceiteado como orientando e por todo o incansável apoio, empenho, incentivo e disponibilidade de partilha de conhecimentos que me prestaram durante a realização deste trabalho.

Ao Doutor Alexandre Santos do ISCSEM (Instituto Superior Ciências da Saúde Egas Moniz) pelo enquadramento fornecido ao tema deste trabalho.

À Professora Luísa Botelho do ITN (Instituto Tecnológico e Nuclear) por se ter disponibilizado e fornecido o material e equipamento necessários ao processo de esterilização utilizado.

À Professora Marise Almeida da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa, por se ter oferecido para nos ajudar na realização dos testes de degradação, bem como por ter fornecido todo o material necessário para a sua realização.

Ao Professor João Sottomayor do Departamento de Química, por ter permitido a utilização contínua do aparelho de medida de ângulos de contacto (goniómetro).

Ao Professor Rui Silva do grupo CENIMAT, por disponibilizar e preparar o SEM para obtenção das imagens.

Ao Dr. Carlos Novo do grupo UEIPM do IHMT por ceder os seus laboratórios para a cultura celular, bem como à Bióloga Sofia Prata pelo auxílio prestado na realização dos testes de citotoxicidade e adesão celular.

Aos meus pais, irmão e avós, porque a eles lhes devo tudo o que hoje sou.

Aos meus colegas e companheiros da luta, Valdir Tavares, Mafalda Fernandes, Ana Marques, Rita Rosa e Joana Fonseca, que foram como uma segunda família nestes últimos tempos. O convívio, a alegria, a amizade e a muita entajuda foram fundamentais para a concretização do objectivo final.

Ao meu magnífico grupo de amigos, Bernardo Azevedo, Pedro Martins, Leonardo Martins, Sérgio Mendes, Filipe Catarino, Hugo Pereira, Joaquim Horta, Nuno Fernandes e Rita Rosa, pela amizade, pelo magnífico convívio e experiências partilhadas nestes cinco anos de Faculdade.

Para finalizar agradeço a uma das pessoa mais importante da minha vida, a minha namorada Sónia Serra. Obrigado por todo o amor, apoio e carinho incansável, pela paciência, compreensão e determinação que me transmite.

## Resumo

A Engenharia de Tecidos é uma área multidisciplinar que procura desenvolver novas metodologias ou terapias capazes de auxiliar o corpo humano a reparar um órgão ou tecido lesado e recuperar a forma e função desse órgão ou tecido. Em Medicina Dentária, mais propriamente na Terapia Periodontal, é frequente a utilização de membranas oclusivas para impedir a invaginação do tecido mole, criando uma janela de tempo e espaço para a lenta regeneração do tecido periodontal.

O presente trabalho teve como objectivo a produção de uma membrana oclusiva biodegradável para uso na regeneração tecidual guiada ou na regeneração óssea guiada, através da electrofiação de soluções contendo policaprolactona e hidroxiapatite.

Foram produzidos quatro tipos de membranas compósitas incorporando diferentes percentagens do biocerâmico em relação ao biopolímero desde 0% até 30%.

As membranas produzidas foram caracterizadas mecanicamente através de ensaios de tracção, medição de ângulos de contacto e foram ainda sujeitas a testes de degradação, de bioactividade, de citotoxicidade e de adesão celular. A análise morfológica foi efectuada recorrendo à microscopia electrónica de varrimento (SEM).

Os ensaios de tracção revelaram que a incorporação do biocerâmico na composição da membrana a fragiliza. Contudo não compromete nem as suas propriedades mecânicas nem a sua integridade para a finalidade que se pretende. A medição dos ângulos de contacto revelou a eficácia do tratamento químico com NaOH na hidrofilição das membranas. As membranas apresentam uma degradação adequada à aplicação pretendida, não apresentando indícios de degradação até 4 semanas, num meio que mimetiza o ambiente da aplicação. Subsequentemente o teste de imersão em SBF (*simulated body fluid*) confirma que a presença de hidroxiapatite melhora a bioactividade da membrana, nomeadamente favorece a formação de apatite. Os testes de citotoxicidade e de adesão celular confirmaram a aptidão destas membranas para interagir com o meio biológico uma vez que não apresentam citotoxicidade e por sua vez apresentam uma viabilidade celular superior ao controlo.

Palavras-chave: Electrofiação; Policaprolactona; Hidroxiapatite; Regeneração Tecidual Guiada; Regeneração Óssea Guiada.



## Abstract

Tissue Engineering is a multidisciplinary field that seeks to develop new methodologies or therapies to help the human body repair a damaged organ or tissue and restore the form and the function of that organ or tissue. In dentistry, more specifically in periodontal therapy, occlusive membranes are used to prevent the ingrowth of soft tissue, creating a window of time and space to the slow regeneration of periodontal tissue.

The aim of this study was to develop a biodegradable occlusive membrane, which can be used in guided tissue regeneration or guided bone regeneration, by electrospinning solutions containing polycaprolactone and hydroxyapatite.

Four types of composite membranes were produced incorporating different percentages of bioceramic in relation to the biopolymer, 0% HAp (HAp: PCL = 00:10), 10% HAp (HAp: PCL = 1:10), 20% HAp (HAp: PCL = 2:10), 30% HAp (HAp: PCL = 3:10).

The membranes produced were mechanically characterized by tensile tests, measurement of contact angles and were still subject to degradation, bioactivity, cytotoxicity and cellular adhesion tests. Morphological analysis was performed using scanning electron microscopy (SEM).

Tensile tests revealed that the incorporation of a bioceramic in the membrane composition weakens it. However it does not compromise nor its mechanical properties nor its integrity for the intended purpose. Contact angle measurements revealed the effectiveness of the chemical treatment with NaOH in the membranes hydrophilization. The membranes have an adequate degradation rate for the intended application, no showing evidence of degradation up to 4 weeks in a medium that mimics the application environment. Subsequently, SBF (simulated body fluid) immersion tests confirmed that the presence of hydroxyapatite improves the bioactivity of the membrane, favoring apatite formation. Cytotoxicity and cellular adhesion tests revealed no cytotoxicity and greater relative cell viability compared to control, proving the good ability of this membranes to interact with the biological environment.

Keywords: Electrospinning; Polycaprolactone; Hydroxyapatite; Guided tissue regeneration; Guided bone regeneration.



## Índice de Matérias

Agradecimentos .....	IX
Resumo .....	XI
Abstract .....	XIII
Índice de Matérias .....	XV
Índice de Figuras .....	XIX
Índice de Tabelas .....	XXIII
Lista de Abreviaturas e Siglas .....	XXV
Lista de Símbolos .....	XXVII
1 Introdução .....	1
1.1 Enquadramento .....	1
1.2 Doença Periodontal .....	3
1.2.1 Membranas oclusivas .....	7
1.3 Biomateriais .....	8
1.3.1 Polímeros .....	9
1.3.1.1 Policaprolactona .....	9
1.3.2 Biocerâmicos .....	11
1.3.2.1 Hidroxiapatite .....	11
1.4 Electrofiação .....	12
1.4.1 Parâmetros a ter em conta no processo da Electrofiação: .....	15
1.4.1.1 Parâmetros da solução polimérica: .....	15
1.4.1.1.1 Peso Molecular .....	15
1.4.1.1.2 Viscosidade .....	16
1.4.1.1.3 Tensão Superficial .....	16
1.4.1.1.4 Condutividade da solução .....	17
1.4.1.2 Parâmetros de produção: .....	18
1.4.1.2.1 Caudal da solução .....	18
1.4.1.2.2 Distância Agulha-Colector .....	18
1.4.1.2.3 Tensão Aplicada .....	19
1.4.1.2.4 Efeito do Colector .....	19

1.4.1.2.5	Diâmetro Interno da Agulha.....	20
1.4.1.3	Parâmetros ambientais:.....	20
1.4.1.3.1	Temperatura .....	20
1.4.1.3.2	Humidade .....	20
2	Materiais e Métodos .....	23
2.1	Montagem Experimental .....	23
2.2	Preparação das Soluções.....	24
2.2.1	Materiais .....	24
2.2.2	Preparação das soluções .....	25
2.2.3	Produção das membranas .....	26
2.3	Métodos pós-produção .....	27
2.3.1	Caracterização das Membranas.....	27
2.3.1.1	Medição da Porosidade.....	27
2.3.1.1.1	Determinação da Densidade da HAp.....	28
2.3.1.2	Tratamento Químico com NaOH.....	29
2.3.1.3	Ensaios de Tracção.....	29
2.3.1.4	Medição do Ângulo de Contacto .....	32
2.3.1.5	Testes de Degradação .....	33
2.3.1.6	Teste de Bioactividade .....	34
2.3.1.7	Testes de Citotoxicidade e Adesão Celular .....	35
2.3.1.8	Análise Morfológica – SEM .....	38
2.3.2	Esterilização .....	38
3	Apresentação e Discussão dos Resultados .....	41
3.1	Parametrização da Produção .....	41
3.1.1	Variação da concentração.....	41
3.1.2	Variação do caudal.....	42
3.1.3	Variação da tensão.....	44
3.1.4	Variação da distância agulha-colector .....	46
3.2	Produção das Membranas Compósitas de PCL e HAp.....	48
3.2.1	Composição das membranas compósitas de PCL e HAp .....	49
3.2.2	Alterações Morfológicas das fibras com a adição de HAp .....	49

---

3.2.3	Alteração das propriedades mecânicas com a adição da HAp .....	50
3.2.4	Nova abordagem para a produção das membranas compósitas de PCL e HAp ...	53
3.3	Caracterização das Membranas .....	54
3.3.1	Porosidade .....	54
3.3.2	Ensaio de Tracção .....	55
3.3.3	Ângulos de Contacto .....	57
3.3.4	Degradação .....	59
3.3.5	Bioactividade .....	62
3.3.6	Teste de Citotoxicidade e Adesão Celular .....	64
4	Conclusões e Perspectivas Futuras .....	67
5	Bibliografia .....	71
	Anexos .....	A.1
A.	Testes de Biodegradação .....	A.1
	Especificações de reagentes .....	A.1
	Preparação de soluções .....	A.1
B.	Procedimento dos Teste de Citotoxicidade e de Adesão Celular .....	B.1
	Contagem Celular .....	B.1
	Método MTT por contacto directo (Teste de Citotoxicidade) .....	B.2
	Adesão Celular .....	B.2
C.	Procedimento usado na Determinação da densidade da HAp .....	C.1



## Índice de Figuras

Figura 1.1 – Diferenças entre o periodonto saudável e doença periodontal, adaptado [4].	3
Figura 1.2 - Tratamentos estabelecidos para os defeitos periodontais, adaptado [5].	5
Figura 1.3 – Tipos de regeneração periodontal: A) Cirurgia periodontal + Alisamento radicular, deixando o defeito vazio (1 – Primeiras células a chegarem ao local da lesão, as células epiteliais; 2 – Fibroblastos; 3– Osso; 4 – Ligamento Periodontal); B) GTR; C) Utilização de enxerto ósseo [2].	6
Figura 1.4 – Combinação do procedimento da GTR e técnicas de enxerto ósseo [2].	6
Figura 1.5 – Polimerização por abertura do anel da $\epsilon$ -caprolactona.	10
Figura 1.6 - Estrutura da Policaprolactona.	10
Figura 1.7 – Fórmula linear da Hidroxiapatite.	11
Figura 1.8 - Representação esquemática de um sistema de electrofiação horizontal [21].	13
Figura 1.9 - Representação esquemática da formação de um jacto durante o processo de electrofiação. (a) Formação do cone de Taylor devido ao campo eléctrico aplicado. (b) Jacto emerge do cone de Taylor. (c) A tensão superficial causa o relaxamento da forma cónica de Taylor. A fiação do jacto começa com uma região estável linear, que depois se torna instável, devido em parte à repulsão de cargas, mostrando tipicamente movimentos espirais ou “chicotadas” [24].	14
Figura 1.10 - A – Com uma elevada viscosidade as moléculas de solvente estão distribuídas pelos moléculas poliméricas entrelaçadas; B – Com uma baixa viscosidade as moléculas de solvente tendem a aglomerar-se devido à acção da tensão superficial.	17
Figura 2.1 - Sistema de electrofiação utilizado	23
Figura 2.2 - Montagem auxiliar que assegura o movimento de rotação e translação horizontal do colector	24
Figura 2.3 - Aspecto das soluções poliméricas utilizadas: A – Solução de PCL; B – Solução de PCL/HAp.	25
Figura 2.4 - Gráfico tensão vs deformação típico de um polímero. 1 - Região Elástica; 2- Região Plástica; 3 – Tensão Máxima de Tracção; 4 – Tensão de Ruptura.	30
Figura 2.5 - Máquina de tracção acoplada a uma unidade computacional IBM.	31
Figura 2.6 - Célula de carga da máquina de tracção utilizada	31
Figura 2.7 - Montagem do sistema óptico para a medição do ângulo de contacto	32
Figura 2.8 - Interface gráfica do software CAM2008.	33
Figura 2.9 – Caixa de poços com as membranas em SBF.	35
Figura 2.10 – Mecanismo pelo qual o MTT é reduzido em formazan [32].	36
Figura 2.11 – Caixa de poços com as 24 membranas para o teste de citotoxicidade.	36
Figura 2.12 – Grupo de controlo negativo para o teste de citotoxicidade.	37
Figura 2.13 – Grupo de controlo positivo para o teste de citotoxicidade.	37
Figura 2.14 – Caixa de poços com as 24 membranas para o estado da adesão celular.	37
Figura 2.15 - Câmara utilizada para o processo de esterilização	39

Figura 2.16 - Esquema do suporte com a posição dos dosímetros ao longo do período de esterilização.....	40
Figura 3.1 - Imagens obtidas por microscopia óptica de fibras de PCL: A e B - [8%] p/p; C e D - [10%] p/p; E e F - [15%] p/p. A, C e E – ampliação 100x B, D e F – ampliação 500x.....	42
Figura 3.2 - Imagens obtidas por microscopia óptica de fibras de PCL: A e B - Caudal 0,1ml/h; C e D - Caudal 0,3ml/h; E e F - Caudal 0,5ml/h; G e H - Caudal 0,7ml/h; I e J - Caudal 1,0ml/h. A, C, E, G e I – ampliação 100x B, D, F, H e J – ampliação 500x.....	44
Figura 3.3 - Imagens obtidas por microscopia óptica de fibras de PCL: A e B - Potencial 9kV; C e D - Potencial 11kV; E e F - Potencial 13kV; G e H - Potencial 15kV; I e J - Potencial 17kV. A, C, E, G e I – ampliação 100x B, D, F, H e J – ampliação 500x. ....	46
Figura 3.4 - Imagens obtidas por microscopia óptica de fibras de PCL: A e B - Distância agulha-colector; C e D - Distância agulha-colector 22cm; E e F - Distância agulha-colector 25cm; G e H - Distância agulha-colector 28cm; I e J - Distância agulha-colector 31cm. A, C, E, G e I – ampliação 100x B, D, F, H e J – ampliação 500x. ....	48
Figura 3.5 - Imagens SEM de fibras compósitas de PCL e HAp: A) HAp 0%, ampliação 1000x B) HAp 10%, ampliação 500x C) HAp 20%, ampliação 500x D) HAp 30%, ampliação 500x. ...	49
Figura 3.6 - Curva de tracção da membrana HAp 0% .....	50
Figura 3.7 - Curva de tracção da membrana HAp 10% .....	51
Figura 3.8 - Curva de tracção da membrana HAp 20% .....	51
Figura 3.9 - Curva de tracção da membrana HAp 30% .....	52
Figura 3.10 - Imagens SEM de fibras compósitas de PCL e HAp utilizando a nova abordagem: A) HAp 0% B) HAp 10% C) HAp 20% D) HAp 30%; Ampliação 500x.....	54
Figura 3.11 – Curvas de tracção da membrana HAp 30%. ....	55
3.12 - Módulo de Young das diferentes membranas produzidas com os diferentes pós tratamentos.....	56
Figura 3.13 - Ângulos de contacto em função do pós-tratamento. ....	58
Figura 3.14 - Imagem de SEM evidenciando o encapsulamento das partículas de HAp pelo polímero.....	58
Figura 3.15 - Perda de Massa após os testes de degradação .....	59
Figura 3.16 - Imagens SEM da membrana de PCL, ampliação 1000x: A – sem tratamento; B – com tratamento químico com NaOH; C - com tratamento químico com NaOH e permanência de 4 semana em meio ácido; D - com tratamento químico com NaOH e permanência de 4 semana em meio enzimático.....	60
Figura 3.17 - Perda de Massa das membranas irradiadas .....	61
Figura 3.18 - Imagens SEM após 10 dias de imersão em SBF: A - PCL; B – HAp 10%; C - HAp 20%; D – HAp 30%; Ampliação 1000x.....	62
Figura 3.19 - Imagens SEM, após a imersão em SBF durante 30 dias: A e B – PCL; C e D – HAp 10%; E e F – HAp 20%; G e H – HAp 30%; A, C, E e G – sem tratamento químico com NaOH; B, D, F e H – com tratamento químico com NaOH; Ampliação 1000x. ....	63
Figura 3.20 – Poços após a incubação a 37°C durante 2 horas em MTT.....	64

Figura 3.21 – Caixa de 96 poços com as soluções contendo os sais de formazan dissolvidos para a leitura óptica..... 64

Figura 3.22 – Restos de sais de formazan presentes nas membranas após a dissolução em HCL e Isopropanol. .... 66

Figura 3.23 – Imagens SEM da adesão celular das membranas compósitas HAp 10% após 24 horas em meio de cultura, ampliação 200x. .... 66

Figura 3.24 – Imagem SEM da adesão celular das membranas compósitas HAp 10%, evidenciando processos celulares entre a célula e a superfície da fibra, ampliação 1000x. .... 66



## Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Constituintes do periodonto e suas características. ....	4
Tabela 2.1 – Dose de radiação gama recebida por cada dosímetro.....	40
Tabela 3.1 – Parâmetros estabelecidos para a produção das membranas compósitas de PCL e HAp.....	48
Tabela 3.2 – Composição inicial das soluções poliméricas.....	49
Tabela 3.3 - Propriedades mecânicas das membranas compósitas obtidas. ....	52
Tabela 3.4 – Parâmetros estabelecidos para a produção das membranas compósitas de PCL e HAp seguindo a nova abordagem.....	53
Tabela 3.5 - Composição das soluções poliméricas usando a nova abordagem. ....	53
Tabela 3.6 - Porosidade das membranas HAp:PCL.....	55
Tabela 3.7 - Módulo de Young e respectivos desvios padrão das diferentes membranas produzidas com os diferentes pós tratamentos .....	56
Tabela 3.8 - Constituição e pH das condições de degradação. ....	59
Tabela 3.9 – Densidade Óptica e viabilidade celular relativa das membranas sem tratamento.	65
Tabela 3.10 - Densidade Óptica e viabilidade celular relativa das membranas com tratamento químico com NaOH. ....	65



## Lista de Abreviaturas e Siglas

Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – Alumina

Ca/P – razão entre íons Cálcio e Potássio

CAS – *Chemical Abstracts Service*

CENIMAT/I3N – Centro de Investigação de Materiais da Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-60 – Cobalto 60

d-PTFE – politetrafluoretileno de elevada densidade

EDTA - *Ethylenediaminetetraacetic acid*

e-PTFE – politetrafluoretileno expandido

FDA – *Food and Drug Administration*

GBR – *Guided Bone Regeneration*

GE – Gravidade Específica

GrEaT – Grupo de Engenharia de Tecidos da Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

GTR – *Guided Tissue Regeneration*

HAp – Hidroxiapatite

ISO – *International Organization for Standardization*

ITN – Instituto Tecnológico e Nuclear

MTT - *[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyl]*

NaOH – Hidróxido de Sódio

n-PTFE – politetrafluoretileno nano-poroso

p/p – fracção massa/massa

PBS – *Phosphate Buffer Solution*

PCL – Policaprolactona

PLA – Ácido Poliláctico

PTFE – Politetrafluoretileno ou Teflon

SBF – *Simulated Body Fluid*

SEM – *Scanning Electronic Microscopy*

UEIPM – Unidade de Ensino e Investigação em Parasitologia Médica

ZrO<sub>2</sub> – Zircónia

## Lista de Símbolos

$E$  – Módulo de Young

$M_n$  – Massa molecular

$\varepsilon$  – Deformação

$\varepsilon_u$  – Deformação à ruptura

$\rho$  – Densidade

$\rho^*$  – Densidade aparente

$\sigma$  – Tensão uniaxial

$\sigma_u$  – Tensão de ruptura



# 1 Introdução

## 1.1 Enquadramento

A Engenharia de Tecidos é uma área científica que surgiu para tentar colmatar a falta de dadores de órgãos e de tecido biológico, muito devido ao aumento da esperança média de vida. A substituição e reparação do tecido biológico lesado são conseguidas através do recurso a técnicas de produção inovadoras e materiais compatíveis com o organismo humano, nomeadamente os biomateriais. Uma das técnicas mais utilizadas em Engenharia de Tecidos é a electrofiação. Esta técnica surgiu na primeira metade do século XX, sendo uma técnica simples, bastante versátil e de baixo custo que permite a produção de matrizes à base de fibras, a partir de soluções poliméricas.

Estas fibras apresentam diâmetros na ordem dos micrómetros até às dezenas de nanómetros. A matriz assim obtida possui uma elevada porosidade, uma elevada razão superfície/volume e uma estrutura muito semelhante à matriz extracelular dos tecidos biológicos, essencial para actuarem como promotores da reparação e regeneração dos tecidos.

A doença periodontal é uma patologia oral infecciosa com uma elevada prevalência mundial, sendo a segunda maior causa de perda dentária. Esta patologia leva à destruição do suporte dentário, designado por periodonto.

Dois dos métodos de recuperação e regeneração do suporte dentário são a regeneração tecidual guiada (GTR) e a regeneração óssea guiada (GBR). Estes métodos envolvem a aplicação de barreiras oclusivas para impedir que o tecido epitelial e gengival, que possui uma maior taxa proliferativa que o periodonto, invadam o defeito e impeçam que o tecido correcto se regenere. Actualmente existe um vasto número de membranas oclusivas, contudo ainda não são consideradas membranas ideais.

O objectivo final deste trabalho surge da necessidade de desenvolver uma membrana oclusiva ideal que contemple as características de biocompatibilidade, oclusividade celular, manutenção e provisão do espaço durante o tempo necessário à regeneração do periodonto, permitir integração tecidual, de fácil utilização e de custo moderado. Foi por isso desenvolvida uma membrana compósita de PCL/HAp através do método de electrofiação que procura conciliar todas essas características.

O PCL é um polímero sintético, biocompatível, biodegradável, com boas propriedades mecânicas, mas hidrofóbico. No entanto, é possível torná-lo hidrofílico através de tratamentos químicos de superfície, nomeadamente o tratamento químico com NaOH.

A hidroxiapatite é um biocerâmico que pertence à família dos fosfatos de cálcio, muito semelhante à fase mineral do osso, possuindo propriedades osteocondutoras. É por isso bastante utilizada na regeneração óssea.

Tendo em conta este panorama, foram definidos os seguintes objectivos:

- Produzir pela técnica de electrofiação uma membrana compósita PCL/HAp a partir de soluções poliméricas contendo PCL e HAp comercial;
- Determinar a eficácia do tratamento químico, utilizado para tornar a membrana hidrofílica;
- Caracterizar mecanicamente a membrana obtida;
- Determinar a taxa de degradação e a bioactividade das membranas;
- Determinar a citotoxicidade e a viabilidade celular das membranas.

Esta dissertação encontra-se organizada em 4 capítulos:

No capítulo 1 é feito um enquadramento do tema relativo ao trabalho proposto. É apresentada uma breve definição do que é a doença periodontal, bem como dos métodos utilizados para recuperar o tecido por ela lesado. Este capítulo apresenta uma pequena introdução sobre os biomateriais e nela são apresentados os polímeros utilizados neste trabalho. O capítulo termina com a apresentação mais detalhada da técnica de electrofiação bem como dos parâmetros que a regem.

Após a consolidação das bases teóricas, o capítulo 2 começa por apresentar a montagem experimental utilizada para a produção das membranas. De seguida apresenta todos os processos pós-produtivos de modificação e caracterização que estas sofreram, desde o tratamento químico de superfície até à esterilização por radiação gama.

O capítulo 3 é dedicado à apresentação dos resultados e sua discussão. Inicia com a parametrização da técnica experimental, passando pelas dificuldades encontradas durante o processo de obtenção das membranas. São ainda apresentados e discutidos os resultados obtidos de toda a caracterização mecânica e biológica efectuada, nomeadamente dos testes de tracção, medição do ângulo de contacto, testes de degradação, testes de bioactividade e os testes de citotoxicidade e viabilidade celular.

A dissertação é finalizada no capítulo 4, onde são apresentadas as principais conclusões a retirar deste trabalho bem como das perspectivas futuras para a sua continuação.

## 1.2 Doença Periodontal

A doença periodontal é uma patologia infecciosa produzida por bactérias Gram-negativas, com níveis de prevalência elevados, sendo a segunda maior causa de perda dentária na população mundial, a seguir à cárie dentária. É definida como uma doença sujeito e sito-específica, que evolui continuamente com períodos de exacerbação e remissão, resultando de uma resposta inflamatória e imune do hospedeiro à presença de bactérias e seus produtos [1].

A falta de dentes é considerada uma desvantagem social devido a problemas de fala e estética, pelo que têm um alto impacto no bem-estar emocional. Além de afectar os tecidos de suporte dos dentes, a evidência actual sugere que a periodontite crónica tem um risco associado de complicações sistémicas. É mais prevalente entre os adultos de meia-idade e a incidência da doença aumenta com o envelhecimento da população [2].

De acordo com a classificação mais recente, que resultou do workshop internacional em 1999, as doenças do periodonto incluem uma vasta lista de condições que envolvem as estruturas de suporte do dente [3]. Destas, a periodontite, em contraste com a gengivite, origina destruição do periodonto. A figura 1.1 mostra as diferenças entre saúde periodontal e periodontite.

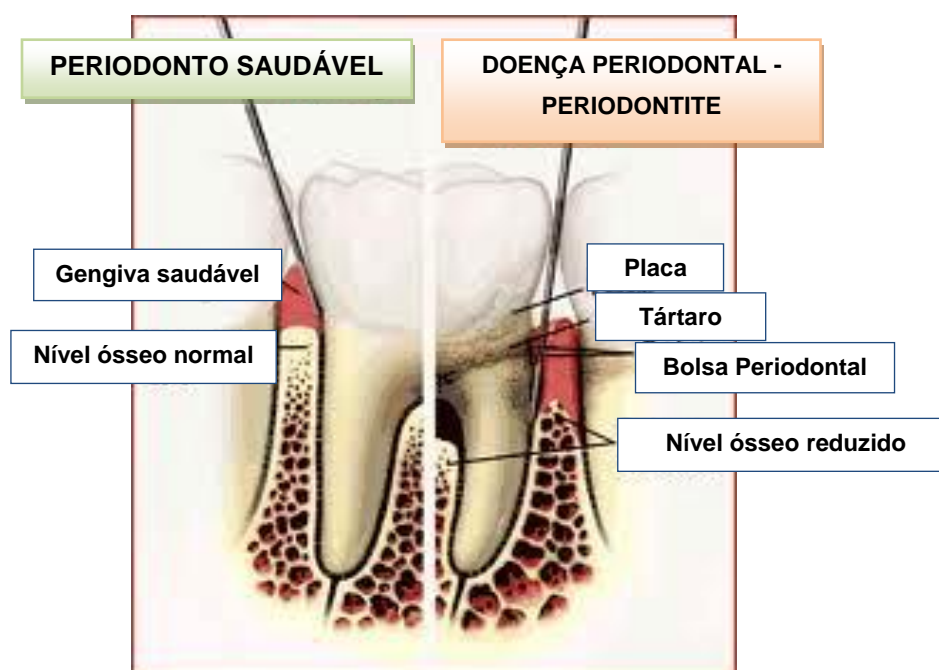


Figura 1.1 – Diferenças entre o periodonto saudável e doença periodontal, adaptado [4].

O periodonto, cuja função é fornecer ancoragem dos dentes aos maxilares (maxila e mandíbula) e promover a nutrição do dente, é um tecido complexo composto por: gengiva aderida, cimento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar [5].

Tabela 1.1 - Constituintes do periodonto e suas características.

CONSTITUINTES DO PERIODONTO	CARACTERÍSTICAS
<b>Gengiva Aderida</b>	Tecido epitelial de elevada taxa proliferativa.
<b>Cimento radicular</b>	Tecido mineralizado especializado que reveste a superfície radicular do dente.
<b>Ligamento periodontal</b>	Tecido conjuntivo especializado fibroso; Liga a superfície radicular do dente ao sulco gengival; Muito vascularizado; Ajuda o dente a suportar as forças compressivas que ocorrem durante a mastigação e, ajudam-no a permanecer embutido no osso.
<b>Osso alveolar</b>	O principal constituinte é a hidroxiapatite.

O resultado ideal do tratamento da doença periodontal é fazer com que os tecidos voltem ao seu estado original antes que a infecção recomece, usando técnicas de regeneração periodontal. Seguindo este conceito, a regeneração periodontal é definida como a reconstrução de tecido lesado, para que a forma e a função das estruturas perdidas sejam restauradas [2].

Desta forma, a reduzida capacidade inata do tecido periodontal para se regenerar e o âmbito limitado da regeneração do tecido em defeitos periodontais demonstra a necessidade de desenvolver procedimentos clinicamente eficazes para regenerar tecidos periodontais.

Com o aparecimento da engenharia de tecidos, surgiram novas alternativas aos métodos convencionais (alisamento radicular convencional ou cirurgia periodontal juntamente com alisamento radicular) para regeneração dos tecidos periodontais de suporte. Deste modo, há uma ampla gama de opções de tratamento que estão disponíveis para os clínicos, tais como membranas de barreira, auto-enxertos, aloenxertos de osso desmineralizado liofilizado, enxertos de origem bovina (xenoenxertos) e combinações de membranas de barreira com materiais de preenchimento [2]. A figura 1.2 apresenta algumas das opções de tratamento estabelecidas para os defeitos periodontais.

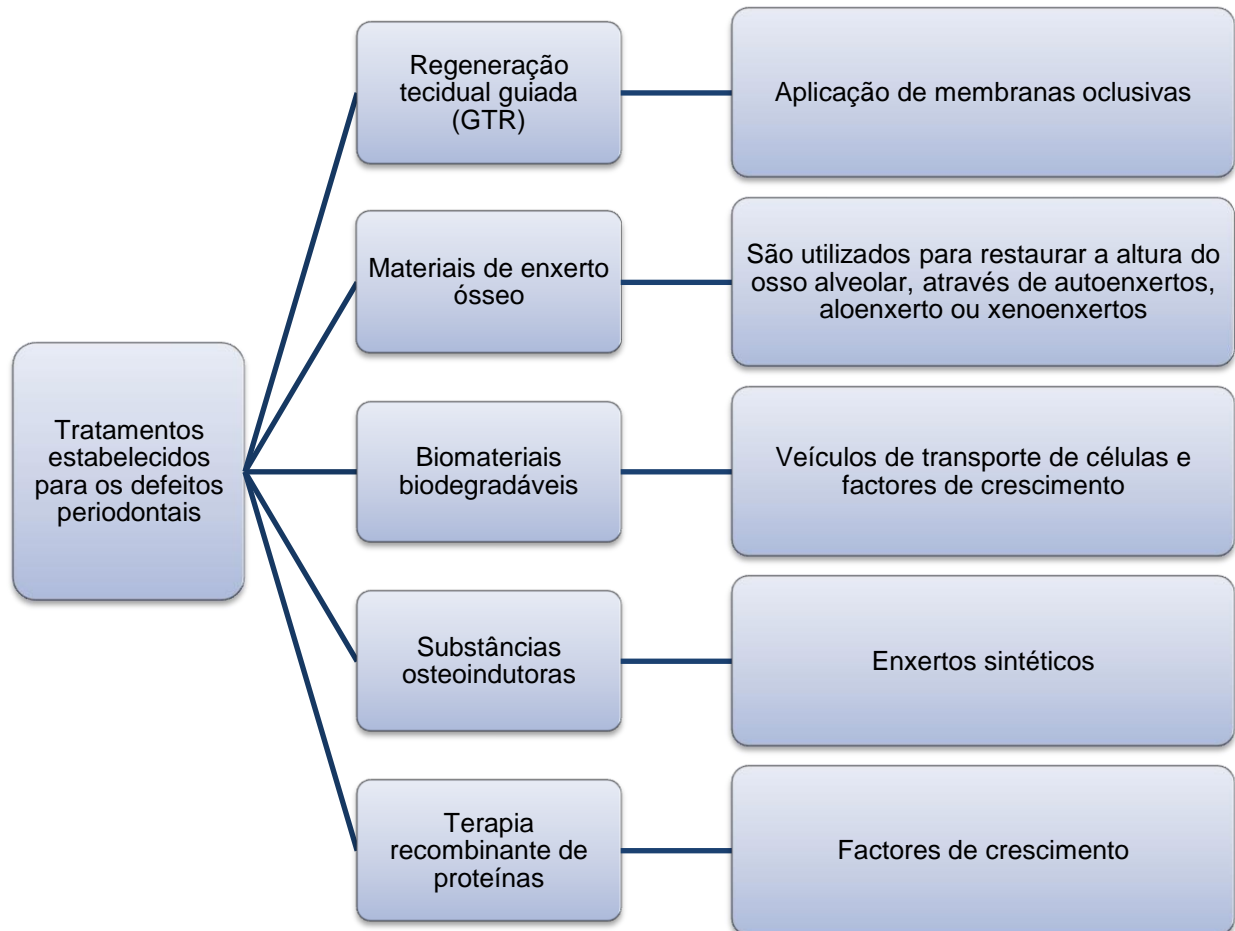


Figura 1.2 - Tratamentos estabelecidos para os defeitos periodontais, adaptado [5].

Em alternativa aos materiais de preenchimento e à reduzida gama de materiais utilizados para a produção de membranas de barreira, procedeu-se no presente trabalho ao desenvolvimento de uma nova membrana para aplicação estomatológica. Esta membrana é composta por um biopolímero biodegradável e biocompatível sintético conjugado com um biocerâmico, com capacidades osteocondutoras.

O processo de GTR, desenvolvido em 1980, tem por objectivo a aplicação de uma membrana oclusiva para prevenir que o tecido conjuntivo, de rápido crescimento, migre para a zona do defeito periodontal, fornecendo deste modo o tempo adequado para a reconstrução dos componentes do periodonto (ligamento periodontal, cemento radicular e osso alveolar) , [2, 6].

A utilização de membranas oclusivas proporciona um recrutamento de células progenitoras não diferenciadas do tecido periodontal saudável, promovendo, assim, a celularização das zonas afectadas. Ao criar as condições espaciais e temporais necessárias para a regeneração do tecido periodontal, a GTR é um procedimento valioso com resultados clínicos benéficos em determinadas defeitos periodontais como os defeitos verticais e lesões de furca grau II. Como tal, este procedimento é amplamente utilizado em clínicas de periodontologia, tendo sido estabelecido como uma técnica básica na medicina regenerativa periodontal [2].

De modo similar ao GTR, o conceito de regeneração óssea guiada (GBR) é aplicado aos locais de implantes dentários, onde a membrana é usada para cobrir o defeito ósseo de modo a permitir um novo crescimento ósseo, prevenindo, assim a invasão do tecido fibroso no local enxertado [6]. A figura 1.3 e 1.4 apresentam alguns tipos de tratamento para os defeitos periodontais.

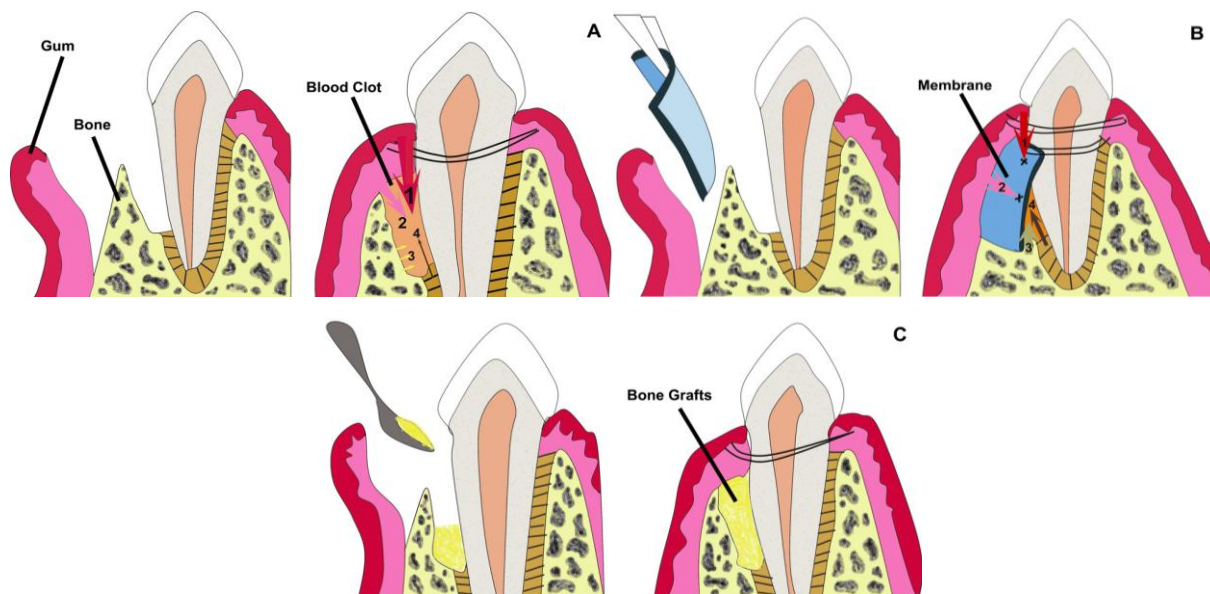


Figura 1.3 – Tipos de regeneração periodontal: A) Cirurgia periodontal + Alisamento radicular, deixando o defeito vazio (1 – Primeiras células a chegarem ao local da lesão, as células epiteliais; 2 – Fibroblastos; 3– Osso; 4 – Ligamento Periodontal); B) GTR; C) Utilização de enxerto ósseo [2].

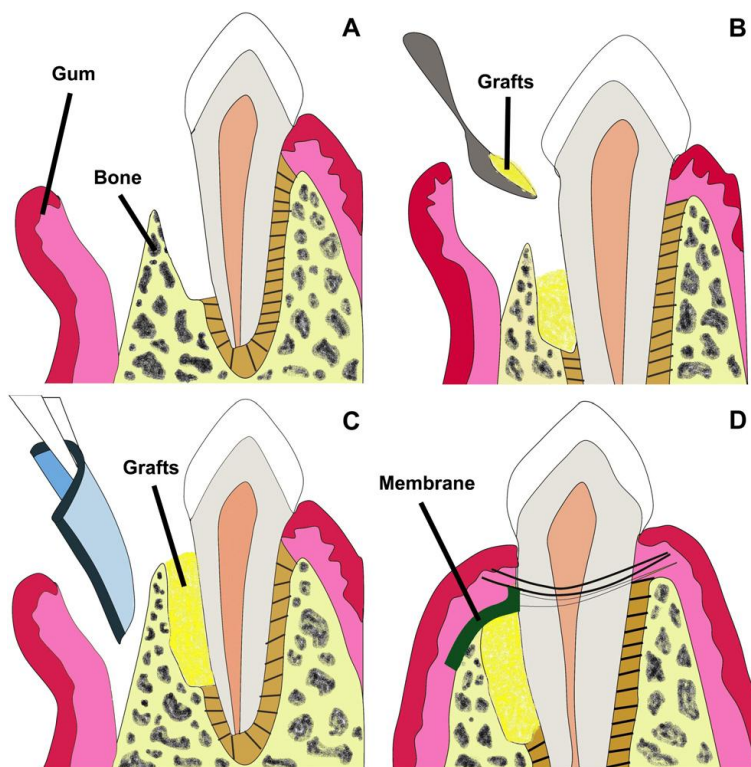


Figura 1.4 – Combinação do procedimento da GTR e técnicas de enxerto ósseo [2].

### 1.2.1 Membranas oclusivas

Atualmente, existe no mercado um vasto número de membranas oclusivas. Estas podem ser divididas em não reabsorvíveis e biodegradáveis. O politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) é o material de eleição utilizado para o fabrico das membranas não reabsorvíveis. No que diz respeito às membranas biodegradáveis, estas são fabricadas maioritariamente com ácido poliláctico (PLA) e colagénio.

Entre os produtos comerciais existentes destacam-se as membranas não reabsorvíveis: ACE<sup>®</sup> (politetrafluoretileno não texturizado (PTFE); ACE Surgical Supply Co., Brockton, USA), Cytoplast<sup>®</sup> Regentex GBR-200 (politetrafluoretileno de elevada densidade (d-PTFE); Oraltronics Dental Implant Technology GmbH, Bremem, Germany), TefGen-FD<sup>®</sup> (politetrafluoretileno nano-poroso (n-PTFE); Lifecore Biomedical GmbH, Alfter, Germany), Gore-Tex<sup>®</sup> (politetrafluoretileno expandido (e-PTFE), Gore and Associates Inc., Flagstaff, USA); e as membranas biodegradáveis: Resodont (colagénio do tipo I de origem equestre; Resorba, Nurnberg, Germany), BioGide (colagénio tipo I e III de origem suína; Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Switzerland), TutoDent (colagénio tipo I de origem bovina; Tutogen Medical GmbH, Neunkirchen, Germany), BioMend (colagénio; Sultzzer Calcitek Inc., Carlsbad, USA), Guidor (éster de ácido poliláctico; John O. Butler Co., Chicago, USA), Resolut (polímero de poliláctico e poliglicol; Gore and Associates Inc., Flagstaff, USA), EpiGuide (ácido poliláctico; THM Biomedical Inc., Duluth, USA) e Inion (co-polímero de carbonato de trimetileno, ácido poliláctico e poliglicólido; Inion Oy, Tampere, Finland) [6-9].

Apesar do elevado número de membranas oclusivas existentes no mercado, estas ainda não reúnem todas as características de uma membrana ideal. As características desejáveis de uma membrana ideal incluem: biocompatibilidade, oclusividade celular, manutenção e provisão do espaço durante o tempo necessário à regeneração do periodonto, permitir integração tecidual, de fácil utilização e de custo acessível [10].

As membranas não reabsorvíveis necessitam sempre de uma segunda cirurgia para a sua remoção. Para ultrapassar esta desvantagem começaram-se a utilizar materiais biodegradáveis, como o ácido poliláctico e o colagénio. Ainda assim, à semelhança das membranas de PTFE, as membranas de ácido poliláctico apresentam efeitos citotóxicos causados por produtos de degradação ácidos. Esta citotoxicidade para além de comprometer a migração e a morfologia dos fibroblastos gengivais humanos, induz morte celular [7].

A integração in vivo das membranas de PTFE e de ácido poliláctico é bastante inferior quando à observada com as membranas de colagénio. Isto acontece porque tendem a sofrer uma exposição precoce ao ambiente oral, levando a uma colonização bacteriana na sua superfície e conseqüentemente a uma acumulação de placa. Isto resulta num menor ganho ao nível de inserção à sondagem nos defeitos intraósseos [8].

Por sua vez as membranas de colagénio apresentam uma excelente citocompatibilidade. Contudo, foram relatadas diversas complicações após o uso de materiais colagénicos, nomeadamente uma degradação muito cedo da membrana que origina uma perda precoce de material e, conseqüentemente a uma certa invaginação de tecido epitelial. Uma boa membrana oclusiva deve manter a sua função pelo menos durante um período de 4-6 semanas para permitir que a regeneração do sistema periodontal seja alcançada com sucesso [11]. Para ultrapassar o problema da rápida degradação é possível reticular o colagénio. Contudo, este apresenta como desvantagem a limitação da adesão e proliferação das células humanas do ligamento periodontal e osteoblastos [8].

### **1.3 Biomateriais**

A Engenharia de Tecidos é uma área da Engenharia Biomédica, que tem como principal objectivo a substituição do tecido biológico danificado, ou a substituição de tecido que já não desempenha de modo apropriado a sua função. Esta área de investigação aplica os conhecimentos das ciências exactas e da vida bem como da engenharia para desenvolver novos substitutos biológicos. O processo de electrofiação é um dos processos utilizados pela engenharia de tecidos para a obtenção destes mesmos substitutos. Quando se pretende desenvolver um substituto biológico, é necessário ter em atenção qual o material utilizado no seu fabrico.

É por isso que esta área leva a uma constante procura de novos materiais para as aplicações biomédicas. É nesse sentido que surge o conceito de biomaterial: um material, de origem sintética ou natural, usado com o intuito de interagir com os sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar, ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo. Um biomaterial tem que ser biocompatível, isso é a habilidade do material para induzir uma resposta do hospedeiro apropriada para a aplicação em causa [12].

Existe uma vasta gama de materiais que podem ser considerados biomateriais. Estes podem ser classificados consoante a sua composição química ou comportamento biológico. Quanto à composição química os biomateriais podem ser classificados como metais, cerâmicos, polímeros ou compósitos. Em relação ao comportamento biológico podem-se classificar como bioinertes, biotolerados, bioactivos ou reabsorvíveis/bioestáveis.

Neste trabalho foram utilizados apenas dois tipos de biomateriais, um polímero e um cerâmico, com o fim de produzir uma membrana compósita para fins estomatológicos, e portanto neste trabalho apenas estarão em foco os polímeros e os cerâmicos.

### 1.3.1 Polímeros

O processo de electrofiação utiliza maioritariamente uma solução polimérica para a produção de substitutos biológicos à base de nanofibras. Um polímero consiste numa longa cadeia de moléculas, com unidades de repetição designadas por monómeros, que estão covalentemente ligados.

Os polímeros são muito atractivos pois a grande maioria tem um reduzido custo, são relativamente fáceis de sintetizar, e são feitos de compostos orgânicos, sendo neste aspecto e nas suas propriedades macromoleculares comparáveis à grande maioria dos componentes funcionais do ambiente biológico, lípidos, proteínas e polissacarídeos [12]. Para além disso a sua baixa viscosidade permite uma moldagem em formas bastante complexas, resistentes e inertes.

Os polímeros podem ser classificados consoante a sua origem como naturais ou sintéticos. Os polímeros naturais têm uma clara vantagem sobre os sintéticos, para além de serem biocompatíveis, são naturalmente degradados pelas enzimas presentes no organismo [13]. Contudo apresentam como desvantagem uma menor capacidade mecânica que a maioria dos polímeros sintéticos. Os polímeros sintéticos por sua vez podem ser modificados através de determinados processos tais como a incorporação de materiais bioactivos ou absorção de proteínas tornando-os biocompatíveis e com locais de reconhecimento celular.

Os polímeros de interesse para a área da Engenharia de Tecidos são:

- Biodegradáveis, ou seja que possam ser reabsorvidos pelo organismo sem necessitar de remoção cirúrgica;
- Biocompatíveis, que minimizem a reacção biológica por parte do hospedeiro;
- Não tóxicos, isto é, que os produtos da sua degradação não comprometam a viabilidade celular;
- Que apresentem uma taxa de degradação concordante com taxa de crescimento tecidual, para não interferir com o desenvolvimento do novo tecido;
- Esterilizáveis [12].

#### 1.3.1.1 Policaprolactona

Neste trabalho foi utilizado um polímero sintético designado por policaprolactona (PCL). A Policaprolactona é um poliéster alifático linear, que deriva da síntese química do petróleo. Pode ser obtida através da polimerização por abertura do anel da  $\epsilon$ -caprolactona, como mostra a figura 1.5.

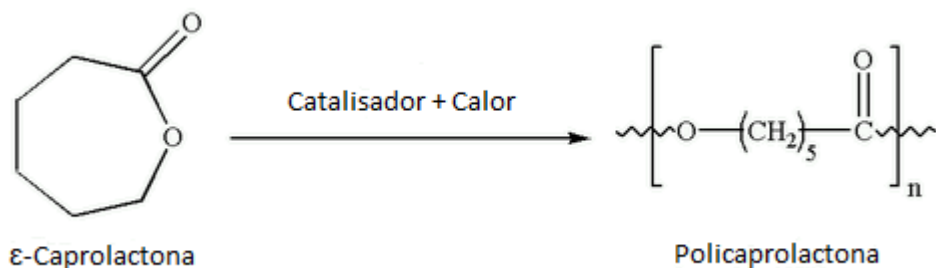


Figura 1.5 – Polimerização por abertura do anel da  $\epsilon$ -caprolactona.

O PCL possui uma temperatura de transição vítrea de  $-60^{\circ}\text{C}$  e um baixo ponto de fusão, entre  $55\text{-}60^{\circ}\text{C}$ , dependendo este último do grau de cristalinidade que por sua vez é ditado pelo seu peso molecular (normalmente entre  $3000\text{-}100000\text{ g mol}^{-1}$ ). É um polímero biocompatível, biodegradável, com um custo reduzido. Apresenta propriedades elastoméricas, tornando-se bastante apelativo para a produção de *scaffolds* em engenharia de tecidos. É um material aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), e tem sido utilizado para diversos fins clínicos [14]. A principal desvantagem deste polímero é a sua hidrofobicidade, sendo insolúvel em qualquer tipo de solução aquosa, o que dificulta a adesão celular, bem como interações biológicas com o meio. O ângulo de contacto da água com o PCL é de cerca de  $120^{\circ}$ . O PCL é degradado por hidrólise das suas ligações éster. Por ser hidrofóbico e semi-cristalino, apresenta uma taxa de degradação muito lenta, estando esta também dependente do peso molecular do polímero (cerca de 2-4 anos em meio aquoso) [14].

A sua fórmula linear é  $(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_2)_n$ . A figura 1.6 seguinte apresenta a estrutura química da Policaprolactona.

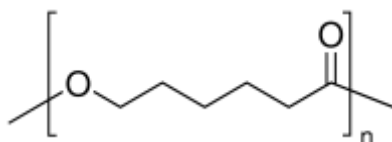


Figura 1.6 - Estrutura da Policaprolactona.

Tanto para esta aplicação como para outras aplicações relacionadas com a área de Engenharia de Tecidos em que o objectivo final do material desenvolvido é reparar ou substituir tecido biológico é necessário que este apresente características que favoreçam uma boa adesão, proliferação celular na sua superfície e que interaja biologicamente com o meio [14]. Uma dessas características é a hidrofiliidade do material. Um material hidrofílico apresenta uma melhor adesão e proliferação celular que um material hidrofóbico.

Para ultrapassar o problema da sua hidrofobicidade natural, os *scaffolds* de policaprolactona são sujeitos muitas vezes a técnicas de modificação de superfície para alterar as suas propriedades superficiais químicas e/ou físicas. Os tratamentos usados podem modificar a

superfície existente ou então cobri-la com um material diferente, capaz de realizar interações biológicas. Actualmente, existem para o PCL quatro tipos de tratamentos para modificação de superfície:

- Tratamento de plasma, que melhora a hidrofiliabilidade através da formação de grupos contendo oxigénio à superfície;
- Tratamento químico com um reagente alcalino, normalmente o hidróxido de sódio (NaOH);
- Cobrir ou absorver proteínas da matriz extracelular, introduzindo assim locais de reconhecimento celular para melhorar a interacção célula-biomaterial;
- Misturar componentes biologicamente activos, fornecendo sinais para o material celular [14].

O processo de tratamento químico com NaOH, será descrito mais adiante uma vez que foi utilizado no decorrer deste trabalho para modificar a superfície das membranas electrofiadas.

### 1.3.2 Biocerâmicos

Os cerâmicos são materiais inorgânicos, que são compostos por elementos metálicos e não metálicos. Os biocerâmicos são materiais cerâmicos que são biocompatíveis e são maioritariamente usados para fins ortopédicos e dentários. Este tipo de material apresenta elevada dureza, grande resistência a altas temperaturas mas possui uma elevada fragilidade. São exemplos de biocerâmicos a alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), a zircónia ( $\text{ZrO}_2$ ), os fosfatos de cálcio, vidro bioactivo e o vidro cerâmico [12]. Os biocerâmicos podem ser classificados, consoante a sua interactividade biológica com o tecido vivo, como bioinertes, bioactivos, bioabsorvíveis ou não reabsorvíveis.

#### 1.3.2.1 Hidroxiapatite

A hidroxiapatite é um biocerâmico bioactivo e bioabsorvível, que pertence à grande família dos fosfatos de cálcio. Os fosfatos de cálcio são compostos que na sua composição apresentam o ião cálcio e o ião fosfato e são muito idênticos à fase inorgânica do osso natural, designada por apatite natural, tendo esta o estatuto de fosfato de cálcio básico. Existem inúmeros fosfatos de cálcio, sendo a principal diferença entre si a razão molar entre o ião cálcio e o ião fosfato (razão Ca/P). Os principais compostos envolvidos na síntese destes materiais são o carbonato de cálcio e o ácido fosfórico.

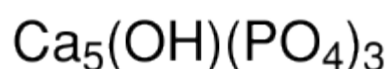


Figura 1.7 – Fórmula linear da Hidroxiapatite.

A HAp pertence ao grupo das apatites e a sua razão molar Ca/P é 1,67. As apatites são minerais isomórficos hexagonais, cujo cristal é formado pelas repetições tridimensionais da unidade básica estrutural, a célula unitária. O sufixo hidro evidencia que esta apatite apresenta uma elevada concentração de grupos hidroxilo, havendo também a fluorapatite, a clorapatite e a bromapatite, tendo estas elevadas concentrações de flúor, cloro e bromo.

A hidroxiapatite, bem como os restantes fosfatos de cálcio, são dos poucos materiais classificados como bioactivos. Isto significa que são capazes de uma interacção dinâmica com o tecido biológico. Sendo a HAp quimicamente muito semelhante à fase mineral do osso, capaz de suportar o crescimento ósseo e a osteointegração e apresentar propriedades mecânicas semelhantes às de tecidos como a dentina e o esmalte, revela-se um biomaterial muito interessante para as aplicações ósseas. Além disso, é um material não citotóxico, que não provoca resposta de corpo estranho ou inflamatória no hospedeiro, apresentando ainda uma aparente habilidade para se ligar ao tecido hospedeiro. É por isso amplamente utilizada sob diversas formas em implantes, revestimento sólido ou poroso para fins ortopédicos, dentários e aplicações maxilofaciais.

Em termos de propriedades físicas e mecânicas, a HAp apresenta uma densidade de 3,16 g/cm<sup>3</sup>, tendo ainda um elevado ponto de fusão de 1660 °C e um módulo de Young da ordem dos 70-90 GPa.

## 1.4 Electrofiação

A electrofiação (*electrospinning* na literatura inglesa) é um processo simples que permite a produção de nanofibras, na ordem das dezenas de nanómetros até poucos micrómetros, aplicando-se uma diferença de potencial entre dois eléctrodos, um que coincide com a origem da solução polimérica e outro que actua como colector [14-16]. É um processo que envolve carregar electricamente uma solução polimérica [17]. Actualmente, é a única técnica bem estabelecida capaz de produzir estruturas nanofibrosas de um modo contínuo [16].

O interesse no comportamento de finos jactos líquidos sujeitos a um campo eléctrico remonta ao trabalho descrito por Lord Rayleigh em 1882 [18].

A origem da electrofiação data da primeira metade do século XX, através de várias patentes por Cooley, Morton (ambas em 1902), Norton (1936) e por Formhals nos anos 30 e 40. Apesar disso, esta técnica não foi comercialmente adoptada devido à competição com outras técnicas de fiacção usadas para fabricar fibras poliméricas, tendo a electrofiação permanecido como técnica obscura de fiacção até meados dos anos 90. Foi nessa altura Darrell H. Reneker e colaboradores demonstraram o potencial desta técnica para a investigação nanotecnológica, uma vez que o material polimérico produzido possui diâmetro na escala submicrométrica, e é de reduzido custo de preparação [19, 20]. Para além disso, a electrofiação pode ser usada com uma diversidade de materiais poliméricos e compostos e pode ser facilmente acomodado dentro de um laboratório de investigação [14].

Do ponto de vista instrumental é um processo simples, uma vez que apenas necessita de uma fonte de alta tensão, de um recipiente para a solução polimérica (normalmente uma seringa, com uma agulha de material condutor acoplada na ponta), de uma bomba infusora (para controlo do caudal) e de um colector de material condutor ligado à terra [15, 17].

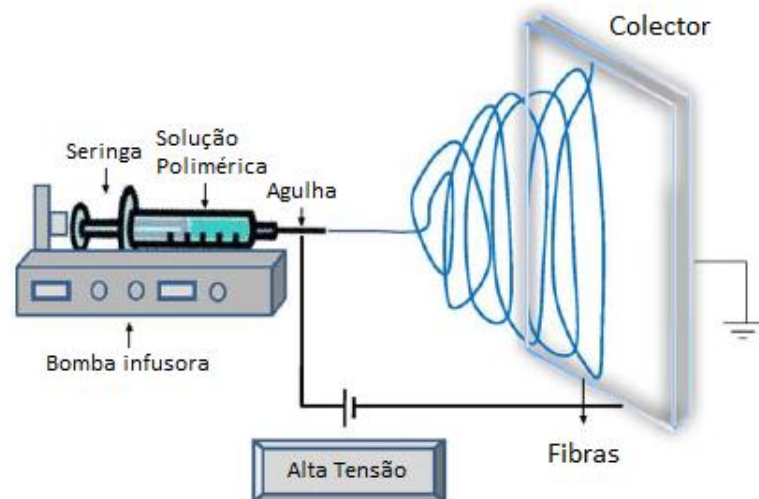


Figura 1.8 - Representação esquemática de um sistema de electrofição horizontal [21].

O processo de electrofição pode ser dividido em três fases:

1. Iniciação do jacto e extensão do mesmo ao longo de uma linha recta (região linear);
2. Surgimento/aumento de uma instabilidade de flexão e ainda o alongamento do jacto, que o tornam muito longo e fino enquanto segue um caminho espiralado;
3. Solidificação do jacto em nanofibras e colecção das mesmas numa placa metálica [22].

Durante o processo de electrofição existe uma competição de forças entre:

- A repulsão electrostática coulombiana entre elementos adjacentes carregados dentro do jacto (responsáveis pelo estiramento/alongamento do jacto);
- As forças viscoelásticas e a tensão superficial que contrariam o estiramento/alongamento do jacto [17].

No processo de electrofição, uma solução polimérica que inicialmente é mantida na ponta de uma agulha ou capilar pela sua tensão superficial é carregada electricamente utilizando uma fonte de alta tensão. Uma vez carregada a solução as cargas superficiais criam uma força repulsiva de sentido oposto à tensão superficial. Com o aumento da intensidade do campo eléctrico, a superfície hemisférica do fluido na ponta da agulha/capilar alonga dando origem à formação de uma forma cónica hiperbólica, designada por cone de Taylor. Aumentando ainda

mais a intensidade do campo eléctrico, este atingirá um ponto crítico a partir do qual no jogo de forças a repulsão electrostática coulombiana começa a sobrepor-se à tensão superficial, dando origem a um jacto que emerge da ponta do cone de Taylor [16, 17, 19, 23]. Uma vez que o jacto está electricamente carregado, a sua trajectória pode ser controlada por um campo eléctrico [19].

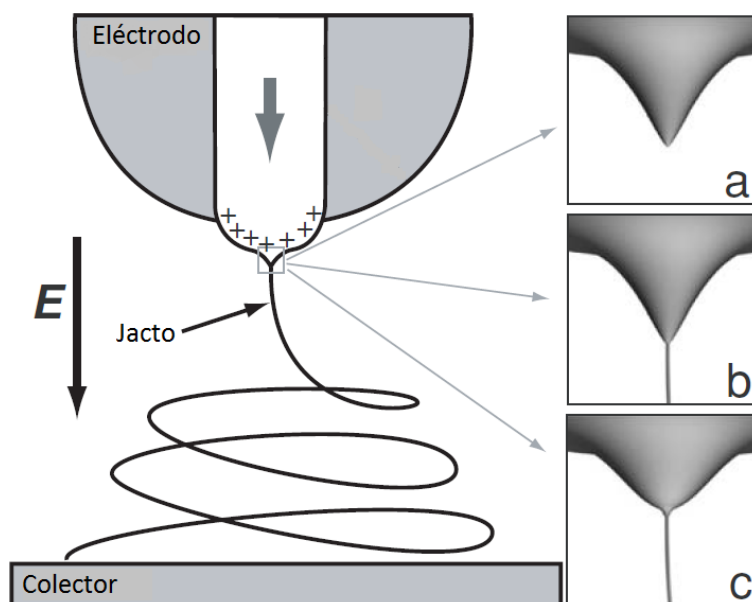


Figura 1.9 - Representação esquemática da formação de um jacto durante o processo de electrofiação. (a) Formação do cone de Taylor devido ao campo eléctrico aplicado. (b) Jacto emerge do cone de Taylor. (c) A tensão superficial causa o relaxamento da forma cônica de Taylor. A fiação do jacto começa com uma região estável linear, que depois se torna instável, devido em parte à repulsão de cargas, mostrando tipicamente movimentos espirais ou “chicotadas” [24].

O processo de electrofiação, é um processo bastante instável e a preservação do cone de Taylor necessita de um delicado balanço entre o caudal da solução polimérica e a taxa de extracção electrostática. Se a taxa de extracção, que depende da alta tensão aplicada e da distância entre a fonte e o colector, for demasiado pequena, a solução acumula na ponta da agulha e o jacto emerge de uma gota em constante crescimento. Se por sua vez o caudal for demasiado pequeno, o cone de Taylor colapsa e o jacto passa a emergir do interior da agulha [17].

Como referido anteriormente, após o jacto emergir do cone de Taylor é observada uma região linear junto da agulha. O seu comprimento varia consoante as condições de processamento, bem como devido à instabilidade da razão entre o caudal e a extracção. Normalmente, após um trajecto de curta distância, devido às forças repulsivas entre cargas transportadas pelo jacto, a região linear torna-se numa região de grande instabilidade onde ocorrem processos de flexão e de “chicotadas” causando e promovendo um estiramento mais severo do jacto. Assim, o jacto vai ficando cada vez mais alongado e fino, que devido à conformação e entrelaçar das cadeias poliméricas não parte, dando origem a nanofibras [16, 17, 22, 25]. Esta zona de

instabilidade assemelha-se a uma forma cónica com o vértice no final da região linear, que se designa por envelope [18, 26].

Durante o trajecto do jacto, entre a agulha ao colector, o solvente vai evaporando dando origem às nanofibras.

As características das nanofibras bem como a viabilidade do processo de electrofiação dependem do polímero e do solvente usados e também das condições experimentais utilizadas, tais como o caudal da solução polimérica, a distância entre a fonte e o colector e a alta tensão aplicada entre a fonte e o colector. Com este processo pretende-se a obtenção de nanofibras de diâmetro uniforme, sem a presença de aglomerados esféricos de solução denominados contas ou fusos, sendo o fuso uma forma mais alongada da conta.

#### **1.4.1 Parâmetros a ter em conta no processo da Electrofiação:**

Do ponto de vista de processamento esta técnica torna-se mais complicada, uma vez que é um sistema multiparamétrico com várias soluções possíveis, sendo a electrofiação governada pelas propriedades da solução polimérica, por parâmetros de processamento e por parâmetros ambientais [14]. As propriedades a considerar neste processo relativamente à solução polimérica são a viscosidade, a tensão superficial e a condutividade, estando estas directamente relacionadas com a concentração da solução polimérica, o solvente, o peso molecular e a natureza do polímero usado. Relativamente aos parâmetros de processamento (montagem) que influenciam a fiação das fibras são a alta tensão aplicada à solução de polímero, o diâmetro da agulha que está acoplada ao recipiente que contém a solução, o caudal de solução polimérica que sai da agulha (controlado pela bomba infusora), a distância entre a fonte e o colector, a forma e o movimento do colector e a tensão aplicada ao colector. Quanto aos parâmetros ambientais podemos ter em conta principalmente a temperatura e a humidade [15].

##### **1.4.1.1 Parâmetros da solução polimérica:**

###### **1.4.1.1.1 Peso Molecular**

O peso molecular de um polímero representa o tamanho da cadeia polimérica, possuindo uma influência directa na viscosidade das soluções poliméricas, uma vez que determina a quantidade de entrelaçamentos das cadeias poliméricas no solvente [13]. Para além, disso tem também um ligeiro efeito na tensão superficial e na condutividade da solução.

Aumentando o peso molecular do polímero o diâmetro das nanofibras tende também a aumentar.

#### 1.4.1.1.2 Viscosidade

A viscosidade é um parâmetro que é fortemente influenciado pela concentração da solução polimérica. A viscosidade da solução é função da concentração do polímero nela dissolvido: quanto maior a concentração, maior a viscosidade. Como referido anteriormente, depende também da massa molecular do polímero, e para uma mesma concentração de polímero, quanto maior a massa molecular do mesmo maior é a viscosidade da solução polimérica.

Existe um gama de valores de viscosidade para a qual o processo de electrofiação é viável, não podendo a viscosidade de uma solução ser nem muito baixa nem muito elevada. Quando a viscosidade de uma solução é muito baixa, a solução escorre livremente pela agulha e ao sujeita-la a um campo eléctrico irá ocorrer *electrospray*. Para baixos valores de viscosidade a existência de um grande número de moléculas do solvente para poucos entrelaçamentos de cadeias poliméricas reflectir-se-á numa influência dominante por parte da tensão superficial ao longo do jacto electrofiado, causando a formação de contas ao longo da fibra [13].

Com o aumento da viscosidade, há um aumento das forças viscoelásticas devido a um maior número de entrelaçamentos de cadeias na solução. Com este aumento, as forças viscoelásticas começam a sobrepor-se à tensão superficial, e assim é observada uma alteração gradual na forma das contas, passam de uma forma esférica para uma forma mais achatada, os fusos. A distância média entre contas também aumenta. Outra alteração verificada com o aumento da viscosidade é o aumento do diâmetro das fibras, pois há uma maior oposição ao estiramento [27].

A partir de um certo valor de viscosidade é possível obter fibras livres de contas. Contudo existe também um valor de viscosidade a partir do qual é impossível electrofiar a solução, pois torna muito difícil a infusão de solução através da seringa. Além disso, quando a viscosidade é muito elevada a solução tem tendência a acumular e a secar na ponta da agulha mesmo antes do processo de electrofiação se poder iniciar.

A viscosidade influencia ainda a área de deposição: quanto maior a viscosidade menor será a área de deposição, pois esta tende a atenuar a instabilidade do jacto diminuindo o raio do correspondente cone (envelope).

#### 1.4.1.1.3 Tensão Superficial

A tensão superficial depende maioritariamente da composição de solvente/s escolhido para dissolver o polímero [28].

A natureza e concentração do polímero usado também afectam a tensão superficial. A tensão superficial tem tendência a diminuir a área superficial por unidade de massa de um fluido.

O processo de electrofiação tem início a partir do momento em que a tensão superficial é vencida. Contudo, durante o trajecto do jacto até ao colector, a tensão superficial pode ser

responsável pela formação de contas ao longo do jacto. Quando existe um elevado número de moléculas de solvente livres, a tendência é para que as moléculas congreguem e adoptem uma forma esférica devido à tensão superficial.

Se a tensão superficial for elevada, pode ocorrer a quebra da solução em gotas (*electrospray*). Se aumentarmos a concentração da solução, e conseqüentemente a sua viscosidade, o número de cadeias entrelaçadas aumenta, e aumentará também a interacção entre as moléculas do solvente e do polímero. Isto leva a que quando a solução é esticada, devido à influência da carga aplicada, as moléculas do solvente irão difundir-se pelas cadeias entrelaçadas do polímero e assim reduzir-se-á a tendência para que as moléculas do solvente se agreguem devido à tensão superficial. Conseqüentemente, irá diminuir-se também a formação de contas nas nanofibras (figura 1.10).

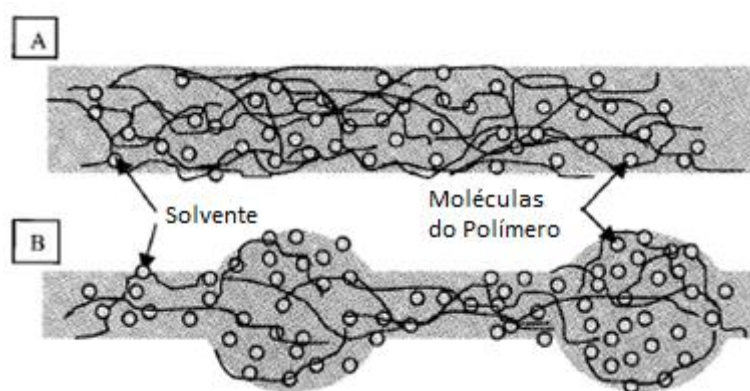


Figura 1.10 - A – Com uma elevada viscosidade as moléculas de solvente estão distribuídas pelas moléculas poliméricas entrelaçadas; B – Com uma baixa viscosidade as moléculas de solvente tendem a aglomerar-se devido à acção da tensão superficial.

Uma solução com uma tensão superficial relativamente reduzida favorece a obtenção de nanofibras sem contas. Uma outra forma de reduzir a tensão superficial é adicionar um surfactante à solução [13].

#### 1.4.1.1.4 Condutividade da solução

A condutividade, como a tensão superficial, depende maioritariamente da composição de solvente(s) utilizado(s).

Na electrofiação o estiramento da solução é causado pela repulsão entre as cargas à sua superfície. Por isso quanto maior forem as cargas transportadas pelo jacto electrofiado, ou seja quanto maior a condutividade da solução, maior será o seu estiramento devido a uma maior repulsão electrostática e a uma maior zona de instabilidade. Assim soluções com maior condutividade possibilitam a formação de fibras mais finas e sem contas, uma vez que haverá um estiramento vigoroso que contrariará a formação de aglomerados de solução. Baixos valores de condutividade irão favorecer a formação de contas, devido a um estiramento

incompleto do jacto [13]. Se a solução possuir condutividade zero, não haverá formação de fibras.

#### **1.4.1.2 Parâmetros de produção:**

##### 1.4.1.2.1 Caudal da solução

Este parâmetro controla a quantidade de solução polimérica que chega à ponta da agulha, e que está disponível para ser extraída pela força exercida pelo campo eléctrico sobre a solução carregada. O caudal possui um intervalo limitado de valores para o qual é possível proceder ao processo de fiação. Se o caudal for demasiado pequeno poderá levar a interrupções no jacto devido à quantidade insuficiente de solução na ponta da agulha. Já um caudal elevado poderá levar a uma acumulação de solução na ponta da agulha devido à insuficiente taxa de extracção por parte do campo eléctrico.

Em geral, um aumento do caudal conduz ao aumento do diâmetro das nanofibras ou do tamanho das contas, dado que há mais solução disponível. Como o volume de solução é maior, o solvente demorará mais tempo a secar e por isso necessitará de um maior tempo de voo para secar. Caso contrário, o solvente residual poderá conduzir à fusão das fibras quando estas chegam ao colector, produzindo um filme.

##### 1.4.1.2.2 Distância Agulha-Colector

A distância entre a fonte e o colector influencia principalmente o tempo de voo da solução e a intensidade do campo eléctrico. Uma curta distância implica um tempo de voo curto, mas também um campo eléctrico mais intenso, o que por sua vez implica uma maior aceleração das fibras em direcção ao colector o que contribui para um tempo de voo ainda menor. Por outro lado, uma distância longa implica um tempo de voo maior, e também um campo eléctrico mais fraco, que leva a uma menor aceleração das fibras em direcção ao colector dando origem a um tempo de voo ainda maior.

Para distâncias curtas o que normalmente acontece é que devido ao curto tempo de voo, o solvente não tem tempo suficiente para evaporar o que dá origem a uma fusão de fibras quando atingem o colector, e conseqüentemente a uma deposição de fraca qualidade.

Distâncias longas podem dar origem a dois efeitos distintos. Por um lado, o tempo de voo maior permite um maior alongamento das fibras, dando origem a fibras mais finas. Mas, por outro lado, como o campo eléctrico é mais fraco, a aceleração das nanofibras na direcção do colector também diminui, fazendo diminuir a intensidade da corrente entre a agulha e o colector. Assim, a auto-repulsão de cargas transportadas pelo jacto diminui e em consequência a força de alongamento é menor. Caso a distância seja grande demais as fibras podem mesmo nem chegar ao colector.

A morfologia das fibras só é alterada até à completa evaporação do solvente, momento a partir do qual não ocorre mais estiramento das fibras mesmo estas estando a voar em direcção ao colector, carregadas e sujeitas ao campo eléctrico. Sendo assim, o estiramento das fibras deve ocorrer antes de as forças viscoelásticas se tornarem dominantes, e que estas não permitam que as fibras sejam mais estiradas. Diz-se por isso que as fibras, a partir da evaporação completa do solvente, ficam morfologicamente “congeladas” [17].

#### 1.4.1.2.3 Tensão Aplicada

Um dos elementos cruciais no processo de electrofiação é a criação de uma diferença de potencial entre a solução e o colector, através da alta tensão aplicada na solução. Esta alta tensão irá induzir na solução as cargas necessárias para que juntamente com o campo eléctrico externo formem uma força electrostática que supere a tensão superficial da solução, e se dê início ao processo de electrofiação.

Para que o processo de electrofiação ocorra é necessário aplicar um potencial mínimo até que a tensão superficial da solução seja ultrapassada. Geralmente valores acima dos 6kV são capazes de deformar a gota de solução na ponta da agulha, até formar o cone de Taylor durante a iniciação do jacto [13]. A importante preservação do cone de Taylor depende essencialmente do balanço entre o potencial aplicado e o caudal a que a bomba está a infundir a solução. Potenciais mais elevados originam um cone de Taylor mais pequeno e menos estável e, caso a taxa de extracção electrostática seja maior que a taxa de infusão por parte da bomba, o cone de Taylor tende a colapsar e o jacto passa a emergir do interior da agulha.

Quando a diferença de potencial entre a fonte e o colector é alterada, ocorre uma alteração na carga da solução polimérica e no campo eléctrico a que a solução está sujeita. Com o aumento da diferença de potencial há um aumento da carga da solução polimérica bem como um aumento do campo eléctrico.

À semelhança do que se passa com a distância entre a fonte e o colector, aumentar a diferença de potencial também apresenta dois efeitos distintos. Como referido anteriormente, o aumento do campo eléctrico leva a um aumento da aceleração das fibras em direcção ao colector. Isto origina tempos de voo muito curtos, e por isso menor zona de instabilidade, consequentemente menor estiramento do jacto e fibras de diâmetro maior. Por outro lado, como também já referido, quanto maior o campo eléctrico, maior é o número de cargas presentes no jacto, e maior será a auto-repulsão ao longo do jacto, aumentando assim o estiramento do mesmo.

#### 1.4.1.2.4 Efeito do Colector

Na maioria dos sistemas de electrofiação, a placa colectora é feita de material condutor como uma folha de alumínio. É normalmente ligada à terra para que a diferença de potencial entre a fonte e o colector seja estável. Sendo um material condutor, facilita a dissipação das cargas

residuais das nanofibras, evitando que as cargas das primeiras fibras depositadas exerçam uma força de repulsão sobre as fibras posteriores, e isso permite que mais fibras sejam atraídas para o colector.

O movimento do colector influencia principalmente a morfologia das fibras. Um colector estacionário permite uma deposição aleatória das fibras e um colector rotatório permite a obtenção de fibras alinhadas.

#### 1.4.1.2.5 Diâmetro Interno da Agulha

O diâmetro interno da agulha utilizada tem também um certo efeito no processo de electrofiação. Diâmetros internos mais pequenos reduzem a probabilidade de entupimento da agulha, devido à menor exposição da solução à atmosfera durante o processo de fiação.

#### 1.4.1.3 Parâmetros ambientais:

##### 1.4.1.3.1 Temperatura

A temperatura da solução, bem como do ambiente que circunda o jacto, afecta a taxa de evaporação do solvente e a viscosidade da solução polimérica. Um aumento da temperatura aumenta a taxa de evaporação do solvente e reduz a viscosidade da solução. [13].

A diminuição da viscosidade resulta na obtenção de fibras de menor diâmetro: como as forças viscoelásticas diminuem, as forças electrostáticas repulsivas produzem um estiramento mais efectivo do jacto. Existe uma relação inversa entre a temperatura e a viscosidade [21].

O aumento da taxa de evaporação promove a formação de nanofibras com maior diâmetro devido ao aumento da viscosidade do jacto e diminui a ocorrência de fusão de pontos de contacto devido à presença de solventes residuais nas nanofibras colectadas.

##### 1.4.1.3.2 Humidade

A humidade do ambiente no qual se está a proceder a técnica de electrofiação pode influenciar a morfologia das fibras resultantes. Para valores de humidade muito baixas, um solvente de base aquosa volátil poderá secar muito rapidamente. Humidades baixas favorecem a formação de fibras com maior diâmetro pois a evaporação do solvente é acompanhada de um aumento da viscosidade da solução e conseqüente aumento das forças viscoelásticas que se opõem ao estiramento do jacto [13].

Em soluções não aquosas e com polímeros não solúveis em água, o aumento da humidade atmosférica provoca o aparecimento de pequenos poros circulares na superfície das fibras. Valores bastante elevados de humidade dão origem a um aumento do tamanho dos poros, até à sua coalescência, formando estruturas não uniformes. Tem sido também sugerido que a elevada humidade pode facilitar a descarga das fibras electrofiadas [21].

Relativamente, a soluções de base aquosa a diminuição da taxa de evaporação do solvente atrasa a solidificação das fibras e favorece o aparecimento de contos.



## 2 Materiais e Métodos

Este capítulo aborda os materiais e os métodos utilizados na produção e na caracterização das soluções e das matrizes usadas durante a elaboração deste trabalho.

### 2.1 Montagem Experimental

A figura 2.1 apresenta o sistema de electrofiação utilizado para estudar a parametrização do processo e para produzir as membranas compósitas de PCL e HAp.

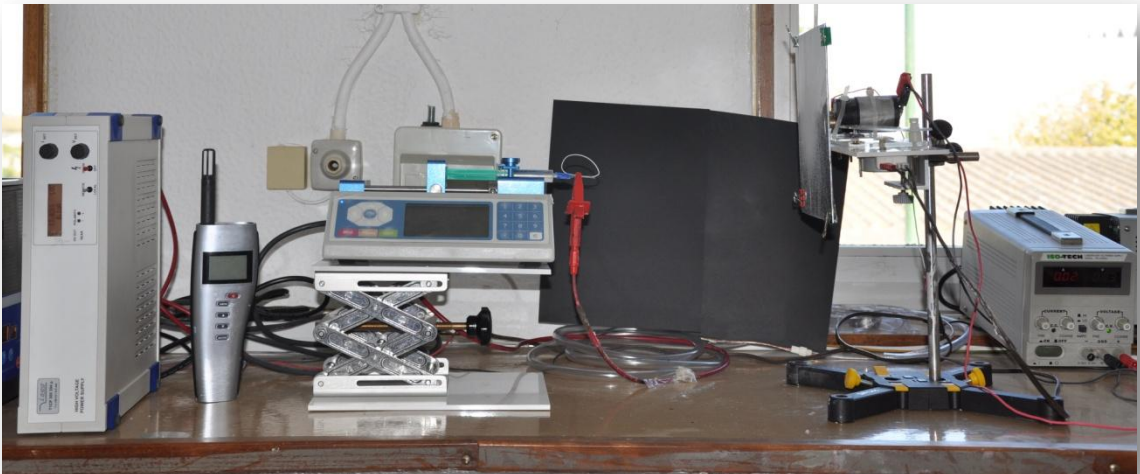


Figura 2.1 - Sistema de electrofiação utilizado

Como referido no capítulo introdutório os principais elementos necessários para se proceder à electrofiação são uma fonte de alta tensão (neste caso produzida pelo grupo de investigação GREAT), uma bomba infusora (Fusion100 da CHEMYX), um recipiente para colocar a solução polimérica (seringa INJEKT® 2-piece 5ml B|BRAUN com uma agulha de calibre 22 acoplada na ponta) e um colector (placa metálica 20 cm x 20 cm, revestida com folha de alumínio comercial e ligada à terra). Na montagem experimental foi utilizado um colector vertical que possui movimento de rotação bem como de translação horizontal, para permitir uma maior uniformidade espacial da deposição.

O movimento rotacional e translacional do colector é assegurado por uma montagem auxiliar, que acopla um sistema mecânico, dois motores eléctricos e uma fonte de tensão, como mostra a figura 2.2

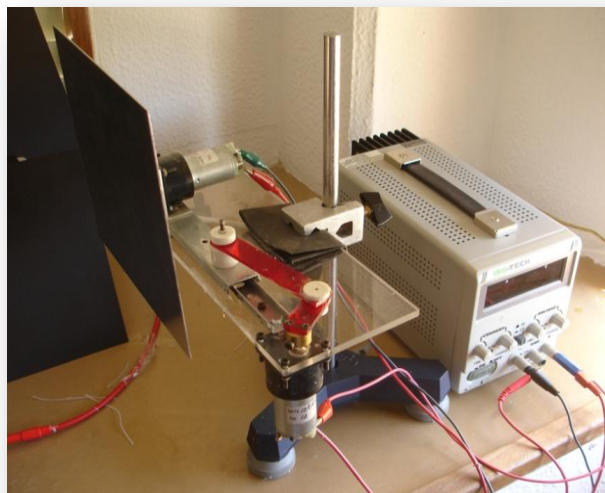


Figura 2.2 - Montagem auxiliar que assegura o movimento de rotação e translação horizontal do coletor

## 2.2 Preparação das Soluções

### 2.2.1 Materiais

Os materiais utilizados para a produção das soluções poliméricas foram os seguintes: o biopolímero policaprolactona, o biocerâmico hidroxiapatite, ambos adquiridos à Sigma-Aldrich, e o solvente clorofórmio (triclorometano) adquirido à Carlo Erba Reagents. As especificações contidas nas embalagens são as seguintes:

Policaprolactona:

- CAS<sup>1</sup> : 24980 – 41 – 4;
- $M_n$  : 70 000 – 90 000;
- $\rho$  : 1,145 g/cm<sup>3</sup>;
- Ponto de fusão : 60°C;
- Fórmula linear :  $(C_6H_{10}O_2)_n$ .
- Lote : #MKBB88278

Hidroxiapatite:

- CAS : 1306 – 06 – 5;
- $M$  : 502,31 g/mol;
- $\rho$  : não disponível;
- Fórmula linear :  $Ca_5OH(PO_4)_3$ ;

<sup>1</sup> do inglês *Chemical Abstracts Service*

- Lote : 8345A.

Clorofórmio:

- CAS : 1306 – 06 – 5;
- $\rho$  : 1,479 – 1,483 g/cm<sup>3</sup>;
- Ponto de fusão : 61,0 – 61,5°C
- Pureza:  $\geq$  99%
- Lote : V1A960111C

Todos os materiais foram usados como adquiridos.

## 2.2.2 Preparação das soluções

A preparação das soluções de PCL foi feita dissolvendo os grânulos de PCL no solvente, constituído por 100% de clorofórmio. O modo de preparação das soluções de PCL e HAp é idêntico, mas neste caso adiciona-se primeiro o pó de HAp ao solvente e só depois é que se junta o PCL. A adição dos biomateriais era feita com agitação magnética contínua para garantir uma boa homogeneidade da solução. As soluções eram mantidas em agitação até o polímero se dissolver completamente no solvente. A figura 2.3 apresenta o aspecto final das soluções.

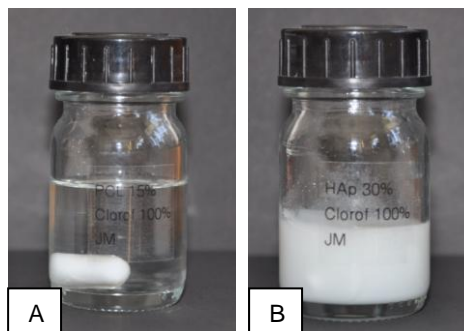


Figura 2.3 - Aspecto das soluções poliméricas utilizadas: A – Solução de PCL; B – Solução de PCL/HAp.

Durante o processo de agitação é necessário ter o cuidado de evitar a formação de bolhas de ar na solução, pois podem provocar a interrupção do processo de electrofiação, causando perturbações no jacto e na deposição das fibras. Se ocorrer a introdução de ar nas soluções é necessário deixá-las em repouso até as bolhas migrarem até à superfície.

As soluções foram preparadas em diferentes concentrações. O método usado para calcular a concentração do polímero é descrito na equação (2.1). É expressa a concentração em % p/p:

$$\% \frac{\text{peso polímero}}{\text{peso solução}} = \frac{m_{\text{polímero}}}{m_{\text{polímero}} + m_{\text{solvente}}} \times 100 \quad (2.1)$$

Onde  $m_{polímero}$  é a massa do polímero e  $m_{solvente}$  a massa do solvente.

A concentração do biocerâmico foi estabelecida de um modo ligeiramente diferente. É também uma concentração expressa em % p/p e que segue a equação (2.2):

$$\% \frac{\text{peso biocerâmico}}{\text{peso polímero}} = \frac{m_{biocerâmico}}{m_{polímero}} \times 100 \Rightarrow [HAp] = x\% [PCL] \quad (2.2)$$

Na equação (2.2)  $m_{biocerâmico}$  é a massa de biocerâmico.

Foram adicionadas as quantidades de polímero e biocerâmico às soluções para se obter a proporção em peso HAp:PCL de 0:1, 1:10, 2:10, e 3:10, correspondendo respectivamente a 0,10,20 e 30% de conteúdo de HAp relativamente ao PCL.

Para facilitar a nomenclatura das soluções e das deposições a sua designação teve como base a percentagem de HAp relativamente ao PCL presente na solução, ou seja HAp 0%, HAp 10%, HAp 20% e HAp 30%.

### 2.2.3 Produção das membranas

Para dar início ao processo de electrofiação, procede-se à colocação da seringa, contendo a solução polimérica, no suporte da bomba infusora e coloca-se o crocodilo, que irá aplicar o potencial entre a agulha e o colector, na região metálica da agulha acoplada à seringa. Após estar tudo montado no devido local, coloca-se o colector em rotação e translação horizontal, a bomba é programada para debitar o caudal pretendido e a fonte de alta tensão é ligada e escolhe-se o potencial a aplicar.

Ao ser aplicado o potencial na ponta da agulha, como o colector está ligado à terra, estabelece-se um campo eléctrico entre este e a ponta da agulha. O campo eléctrico guia assim a solução polimérica em direcção ao colector fechando o circuito. A electrofiação das soluções decorreu à temperatura ambiente e com um caudal estável imposto pela bomba infusora.

Para a análise morfológica das fibras, foi deixado o processo de electrofiação decorrer durante 15 a 20 minutos, até se visualizar com nitidez uma área branca na folha colectora (sinal de que há já uma concentração suficiente de fibras para se proceder à análise morfológica). Foram recolhidas imagens das deposições com um microscópio óptico Nikon Eclipse LV100 com objectivas de 10x e 50x, e foi verificada a aparência da deposição (existência de fibras, presença de contas/fusos e uniformidade dos diâmetros das fibras) para verificar a influência dos parâmetros de produção utilizados na morfologia das mesmas.

As membranas em estudo foram electrofiadas durante 6 horas, para assim garantir uma espessura suficiente que permitisse a realização dos testes necessários à sua caracterização.

Os parâmetros utilizados durante a produção foram os seguintes: caudais entre 0.1 e 1 ml/h, potenciais entre 9 kV e 17 kV e uma distância agulha-colector entre 19 cm e 31 cm.

## 2.3 Métodos pós-produção

### 2.3.1 Caracterização das Membranas

Para a caracterização das membranas produzidas por electrofiação realizaram-se medições de porosidade, efectuaram-se testes mecânicos, testes de hidrofiliidade, testes de degradação e ainda teste de bioactividade.

#### 2.3.1.1 Medição da Porosidade

A porosidade é uma medida do espaço vazio da membrana. É a razão entre o volume vazio e o volume total da membrana. A porosidade de um material pode ser calculada pela equação (2.3):

$$Porosidade = \left(1 - \frac{\rho^*}{\rho_s}\right) \times 100 \quad (2.3)$$

Onde  $\rho^*$  é a densidade aparente e  $\rho_s$  a densidade do material utilizado.

A densidade aparente do material é dada por  $\rho^* = \frac{m}{v}$ , em que  $m$  e  $v$  são, respectivamente, a massa e o volume medidos da amostra.

Para membranas apenas de PCL, o denominador da equação (2.3) é  $\rho_s = \rho_{PCL}$ . Quando estamos presente membranas compósitas, o denominador  $\rho_s = \rho_{compósito}$  e é obtido seguindo a equação (2.4):

$$\rho_{compósito} = \frac{m_{PCL} + m_{HAP}}{V_{PCL} + V_{HAP}} = \frac{m_{PCL} + m_{HAP}}{\frac{m_{PCL}}{\rho_{PCL}} + \frac{m_{HAP}}{\rho_{HAP}}} = \frac{\rho_{PCL} \times \rho_{HAP}}{\rho_{HAP} \times \frac{m_{PCL}}{m_T} + \rho_{PCL} \times \frac{m_{HAP}}{m_T}} \quad (2.4)$$

Onde  $\frac{m_{PCL}}{m_T}$  e  $\frac{m_{HAp}}{m_T}$  são as respectivas frações mássicas do PCL e da HAp presentes em cada amostra.

Para o cálculo das porosidades foram recortados 5 amostras de cada tipo de membrana, com dimensões 2 cm x 2 cm. Foi medida ainda a espessura de cada amostra e determinada a sua massa. Com os dados recolhidos foi calculada a densidade aparente de cada amostra, e através de análise estatística calculada a porosidade de cada tipo de membrana.

#### 2.3.1.1.1 Determinação da Densidade da HAp

Uma vez que a densidade da HAp,  $\rho_{HAp}$ , não estava disponível nas especificações presentes no rótulo da embalagem foi necessário proceder à determinação da mesma.

Para se determinar a densidade da HAp, foi utilizado um método de determinação da gravidade específica. A gravidade específica não é mais do que a razão entre a densidade do material e a densidade da água a uma dada temperatura, isto é  $GE = \frac{\rho_{material}}{\rho_{água}}$ . Assim, sabendo a densidade da água, conseguimos determinar a densidade da HAp.

A água utilizada neste procedimento foi água destilada que apresenta uma densidade  $\rho_{20^\circ C} = 0,9982 \text{ g/cm}^3$  a  $20^\circ C$ .

Assim, para o trabalho realizado, a expressão  $GE = \frac{\rho_{material}}{\rho_{água}}$  pode ser escrita na forma  $\rho_{HAp} = \rho_{água} \times GE$ , em que  $GE$  pode ser laboratorialmente obtida através da equação (2.5).

$$GE = \frac{M_2 - M_1}{(M_4 - M_1) - (M_3 - M_2)} \quad (2.5)$$

Onde,

$M_1$  – massa do balão volumétrico vazio

$M_2$  - massa do balão volumétrico com o biocerâmico

$M_3$  - massa do balão volumétrico cheio com o biocerâmico e água

$M_4$  - massa do balão volumétrico cheio de água

O numerador da equação (2.5) representa a massa de biocerâmico e o denominador a massa de água que ocupa o mesmo volume que o biocerâmico. O protocolo seguido encontra-se no Anexo C.

### 2.3.1.2 Tratamento Químico com NaOH

Sendo o PCL um polímero hidrofóbico e o objectivo deste trabalho produzir membranas para aplicação estomatológica, tornou-se necessário efectuar um tratamento das membranas para lhes mudar a química da sua superfície, tornando-as hidrofílicas.

Um modo de modificar a química da superfície do PCL é através da emersão do biomaterial numa solução aquosa de NaOH. Este método introduz grupos hidroxilo e induz uma modificação da cadeia lateral no PCL através da introdução de grupos carboxilato (-COOH), melhorando a molhabilidade do material. A diminuição da hidrofobicidade é conseguida à custa de ligeiros efeitos electronegativos das funcionalidades da carbonila e da hidroxila [14].

O processo utilizado é um processo simples. Inicialmente foi preparada uma solução aquosa de NaOH com uma concentração de 5 M, e as membranas a tratar foram colocadas na solução durante um período de 2 horas. Após esse período eram bem lavadas com água destilada e colocadas a secar no excicador sob vácuo.

Contudo este processo revelou não ser totalmente eficaz, pois a membrana não se tornava completamente hidrofílica, havendo regiões que continuavam inalteradas. Este facto é explicado pela incapacidade da solução de NaOH penetrar nos poros da membrana, devido à sua tensão superficial. O processo utilizado sofreu então uma ligeira alteração. Aquando da submersão da membrana no NaOH o recipiente foi colocado num excicador acoplado a uma bomba de vácuo para que o ar aprisionado no interior da membrana fosse substituído pela solução de NaOH. Após não ser observada mais nenhuma bolha de ar a sair da membrana, também coincidente com o afundar desta no líquido, o recipiente foi retirado do excicador e o tratamento prosseguiu até completar as 2 horas.

### 2.3.1.3 Ensaio de Tracção

Os ensaios de tracção foram utilizados para determinar as propriedades mecânicas das membranas. As propriedades mecânicas descrevem as respostas características dos materiais quando lhes são aplicadas cargas ou deslocamentos externos.

Um teste de tracção consiste na aplicação uniaxial de uma carga traccionária sobre um corpo de prova, provocando o seu alongamento e estiramento até à ruptura [29].

Através do registo das deformações que o material vai sofrendo ao longo do teste de tracção e das cargas que induziram essas mesmas deformações, é possível construir um gráfico tensão vs deformação, que permite avaliar o comportamento do material durante o ensaio.

Sendo aplicada uma carga perpendicularmente à secção de um dado material, define-se tensão uniaxial,  $\sigma$ , como o quociente entre a carga uniaxialmente aplicada,  $F$ , e a área seccional do material perpendicular à carga, ou seja  $\sigma = \frac{F}{A}$  (N/m<sup>2</sup> ou Pa). A deformação ou

extensão,  $\varepsilon$ , define-se neste caso como o quociente entre a variação de comprimento sofrida pelo material,  $\Delta l$ , e o seu comprimento inicial,  $l_0$ , isto é  $\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0}$ .

A figura 2.4 apresenta um gráfico tensão vs deformação típico para um material polimérico.

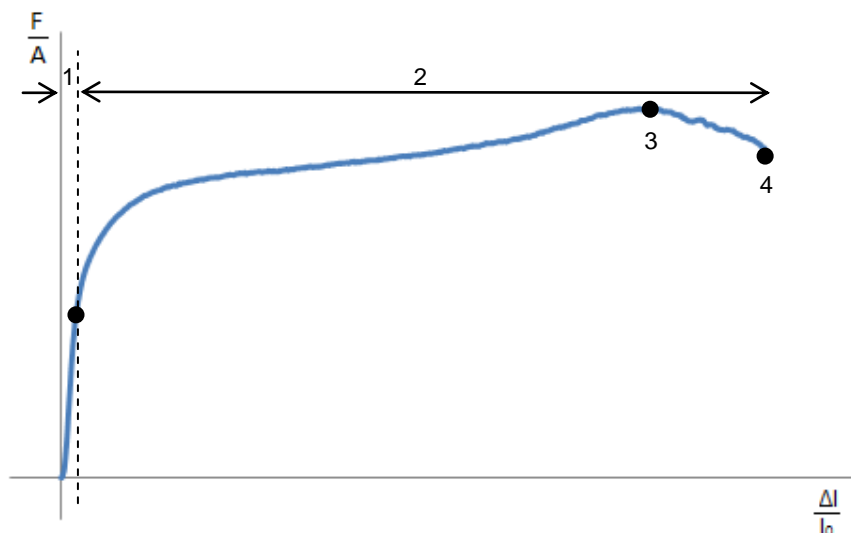


Figura 2.4 - Gráfico tensão vs deformação típico de um polímero. 1 - Região Elástica; 2- Região Plástica; 3 – Tensão Máxima de Tracção; 4 – Tensão de Ruptura.

No gráfico tensão vs deformação (figura 2.4), o início linear da curva é designado por região elástica (1). Nesta região a extensão do material é directamente proporcional à tensão aplicada, sendo esta proporcionalidade denominada por Lei de Hooke. De acordo com a Lei de Hooke a tensão,  $\sigma$ , é o produto entre a extensão,  $\varepsilon$ , e uma constante  $E$ , denominada por Módulo de Young ou módulo de elasticidade:  $\sigma = E\varepsilon$ . Para estes valores de extensão o material recuperará a comprimento inicial após a remoção da carga aplicada.

Quando a tensão ultrapassa um determinado valor limite, a deformação do material entra numa região plástica (2). Uma vez nessa região, o material apresentará uma deformação permanente mesmo após a remoção da carga aplicada.

Dentro da região plástica a tensão atingirá um ponto máximo, a que se designa por tensão máxima de tracção (3), e após esse valor começa a ocorrer a estrição do material até à sua ruptura. O ponto no qual se dá a ruptura designa-se por tensão de ruptura (4).

Os ensaios de tracção das membranas foram efectuados recorrendo a uma máquina de tracção, com uma célula de carga de 20 N, ligada a uma unidade computacional onde estava instalado o software “Minimat” (*Minimat Control Software Version 1.60 February 1994 (c) P.L. Thermal Science 1984-94 Reometric Scientific Ltd.*).



Figura 2.5 - Máquina de tracção acoplada a uma unidade computacional IBM

Foram recortadas 12 amostras de cada tipo de deposição por cada ensaio de tracção realizado, com as dimensões 1 cm x 3 cm. Após serem recortadas foram medidas as espessuras de cada, usando um micrómetro digital de resolução 10  $\mu\text{m}$  (*Mitutoyo Corp., Kawasaki, Japan*). O valor da espessura é a média das três medidas realizadas.

Uma vez medida a espessura a amostra é colocada no suporte da máquina de tracção, e presa nas garras do mesmo. O resto do ensaio é operado computacionalmente, no programa "Minimat". Foi estabelecida uma velocidade de 5 mm/min com uma carga máxima aplicada de 20 N.

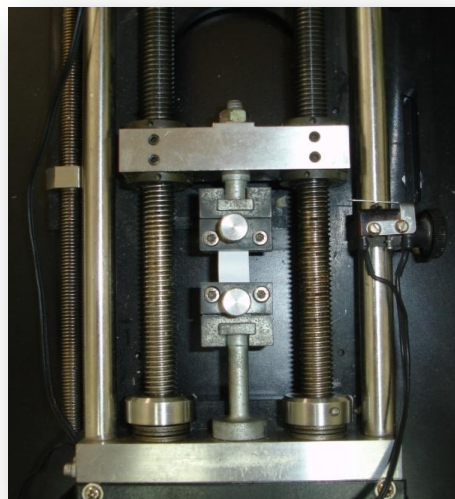


Figura 2.6 - Célula de carga da máquina de tracção utilizada

Os dados da carga e do deslocamento de cada amostra foram gravados pelo software computacional sendo posteriormente transferidos para o software Excel do Microsoft Office para serem analisados e convertidos em curvas de tensão vs deformação para obtenção do módulo de Young,  $E$ , da tensão à ruptura,  $\sigma_u$ , e da deformação à ruptura,  $\epsilon_u$ .

Todos os valores de carga adquiridos foram convertidos para valores de tensão por normalização individual à área medida da secção da amostra testada transversal à tracção.

#### 2.3.1.4 Medição do Ângulo de Contacto

A hidrofiliidade é uma importante característica que os *scaffolds* biológicos devem possuir. Um método de medir o grau de hidrofiliidade de um material é através da medição do ângulo de contacto que uma gota de água forma com a superfície do material. Para ser medido o ângulo de contacto das membranas foram utilizados um sistema óptico e o *software* CAM2008 da KSV.

Este método baseia-se na aquisição de projecções da imagem de uma gota por parte do sistema óptico, sendo posteriormente analisadas pelo software que calcula o ângulo que a gota de água forma com a superfície das membranas. O ângulo formado, entre o plano tangente da fase líquido-ar e o plano formado entre o sólido-líquido, expressa o carácter hidrofóbico se for superior a  $90^\circ$  e hidrofílico se for inferior a  $90^\circ$ . As figuras 2.7 e 2.8 ilustram a montagem do sistema óptico e a interface gráfica do *software* utilizado.

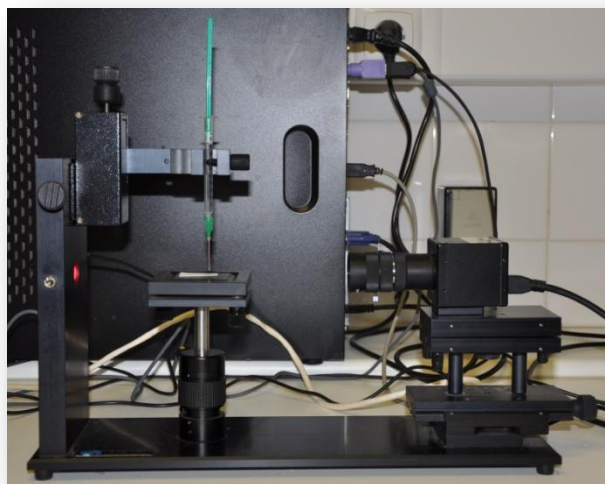


Figura 2.7 - Montagem do sistema óptico para a medição do ângulo de contacto

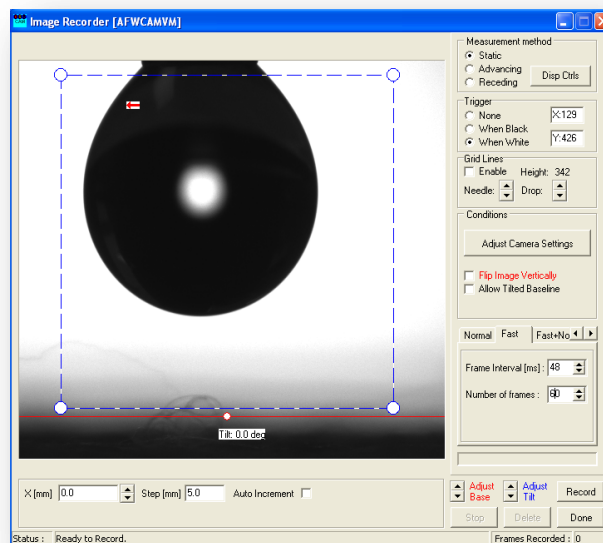


Figura 2.8 - Interface gráfica do software CAM2008.

Para efectuar a medição do ângulo de contacto foram cortadas 2 amostras rectangulares de cada tipo de membrana. Uma para medição do ângulo de contacto sem tratamento químico e outra previamente mergulhada durante 2 h numa solução aquosa de NaOH antes da medição do ângulo de contacto. Foram efectuadas 10 medições em cada amostra. Foi ainda feita uma análise estatística dos dados obtidos da qual resultou um ângulo de contacto médio para cada tipo de membrana com o respectivo tratamento.

#### 2.3.1.5 Testes de Degradação

Quando se está a desenvolver um material para aplicação médica, com o intuito de ajudar a reparar ou substituir momentaneamente um determinado tecido, é desejável que esse material seja biodegradável para evitar uma cirurgia adicional de extracção quando já tiver cumprido o seu objectivo. Por outro lado, mesmo que o biomaterial utilizado seja biodegradável, é necessário estudar a sua taxa de degradação para saber se esta é adequada à aplicação para a qual o biomaterial se destina.

Foram por isso realizados durante este trabalho testes de degradação. Os testes de degradação foram efectuados com 3 meios diferentes e durante 2 períodos distintos. Os meios utilizados foram: um meio ácido (condição 1), um meio tampão a pH fisiológico (condição 2) e um meio tampão a pH fisiológico com uma enzima (condição 3). A condição 3 pretende representar o ambiente no qual o material desenvolvido será aplicado, o ambiente oral. Por esse motivo foi utilizada um tipo de enzima que está presente no ambiente oral e que é passível de causar degradação nas membranas fabricadas. A enzima utilizada foi a Acetilcolinesterase, que pertence à família das esterases. As esterases são um tipo de enzima que transforma os ésteres num ácido e num álcool através de uma reacção química com a

água, designada por hidrólise, degradando portanto o PCL uma vez que este é um poliéster. A preparação dos meios foi feita segundo o protocolo apresentado no anexo A.

Para cada condição foram efectuados dois tempos de estudo diferentes: 1 semana e 4 semanas. Para efectuar este teste foram cortadas 4 amostras com as dimensões 2 cm x 2 cm da membrana de PCL e da membrana com a maior razão HAp/PCL, a HAp 30%, para cada tipo de condição e tempo.

Para além das amostras anteriores foram ainda recortadas 5 amostras das mesmas membranas PCL e HAp 30%. Estas amostras foram sujeitas ao tratamento químico de NaOH e ao processo de esterilização para saber qual a sua influência na sua taxa de degradação. Das 5 amostras da HAp 30%, 4 foram colocadas sob a condição 2 durante o período de 1 semana, e a última amostra foi colocada também sob a condição 2 mas durante o período de 4 semanas. Do mesmo modo, das 5 amostras de PCL, 4 foram colocadas sob a condição 3 durante o período de 1 semana, e a última amostra foi também colocada sob a condição 3 mas durante o período de 4 semanas. A selecção da condição 2 para a membrana HAp 30% e da condição 3 para a membrana de PCL deve-se ao simples facto de o denominador comum das duas membranas ser o polímero PCL e como a verificar-se degradação na condição 3 esta apenas afectaria o polímero, esta selecção permite verificar se o processo de esterilização influencia a degradação das membranas nos diferentes meios.

O método utilizado para aferir se houve degradação foi através do registo do peso das amostras antes e depois do período de degradação, ou seja através da perda mássica.

#### **2.3.1.6 Teste de Bioactividade**

Neste trabalho foram realizados testes de bioactividade para aferir se as membranas têm capacidade de promover a precipitação de apatite na sua superfície, uma vez que um dos tecidos que se pretende regenerar é o tecido ósseo. Para a realização dos testes de bioactividade foi utilizada uma solução designada por *Simulated Body Fluid* (SBF), que mimetiza o plasma humano.

A solução de SBF foi produzida laboratorialmente seguindo o protocolo descrito na literatura [30].

Os testes foram efectuados em todas as membranas por 4 períodos de tempo diferentes: 4 dias, 10 dias, 20 dias e 30 dias. Foram cortadas 2 amostras de cada membrana para cada período de tempo, com as dimensões 1 cm x 1 cm, uma vez que se pretendeu verificar se o tratamento de NaOH também influenciaria a formação de apatite, sendo por isso uma das amostras, sujeite a um prévio tratamento químico de 30 minutos com NaOH. As amostras foram colocadas em caixas de 24 poços e posteriormente foi pipetada em cada poço a quantidade de SBF aproximadamente 100x o volume das amostras (2 ml nos poços que continham as membranas de PCL e 1,5 ml nos poços que continham as membranas HAp 10%

e HAp 30% e 1,7 ml nos poços que continham a membrana HAp 20%). A figura 2.9 apresenta uma das caixas de 24 poços utilizada, já com as membranas e a solução de SBF.



Figura 2.9 – Caixa de poços com as membranas em SBF.

O teste é efectuado numa estufa a 37°C durante os respectivos períodos. Devido à evaporação da água, a solução de SBF foi renovada de 2 em 2 dias, retirando a solução remanescente e pipetando solução nova para os poços.

Após o respectivo período, as amostras foram retiradas da estufa e o SBF restante foi retirado com cuidado para evitar que qualquer possível deposição de apatite fosse danificada. Seguidamente, foi sugado todo o resto de solução que impregnava as membranas com papel absorvente sendo posteriormente transferidas para um pedaço de folha de alumínio e submetidas a um processo de secagem numa estufa a 40°C, durante 2 dias.

No final as amostras foram observadas num microscópio electrónico de varrimento, para se observar a possível formação de apatite na superfície das membranas.

#### 2.3.1.7 Testes de Citotoxicidade e Adesão Celular

Para aferir a qualidade das membranas enquanto estrutura de suporte ao metabolismo celular, procederam-se a testes de citotoxicidade bem como a culturas celulares. Este procedimento foi realizado no campus do IHMT, em colaboração com a Dra. Sofia Prata, Bióloga da empresa de cerâmicos CERAMED, nos laboratórios da UEIPM, gentilmente cedidos pelo Dr. Carlos Novo.

Para este procedimento foi necessária uma preparação prévia da linha celular SA-OS2 (osteoblastos derivados de um osteosarcoma humano), multiplicados em meio de cultura (meio McCoy suplementado com soro fetal bovino a 15%) a partir de uma alíquota congelada. Todas as operações envolvidas no manuseamento das células e respectivos meios foram realizadas em condições de assepsia, com material estéril e em câmara de fluxo laminar.

O teste de citotoxicidade foi efectuado pelo método MTT por contacto directo. O [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyl], comercialmente designado MTT, é um sal amarelo que

mede a actividade de enzimas mitocondriais (desidrogenases) presentes nas células viáveis. As desidrogenases reduzem o MTT num produto púrpura denominado formazan. A quantidade do produto formazan é proporcional ao número de células viáveis presentes no meio, e pode ser quantificado através da densidade óptica a 570 nm. Quanto maior a densidade óptica, maior é o número de células viáveis [31]. A figura 2.10 apresenta os processos pelos quais o MTT é decomposto em formazan.

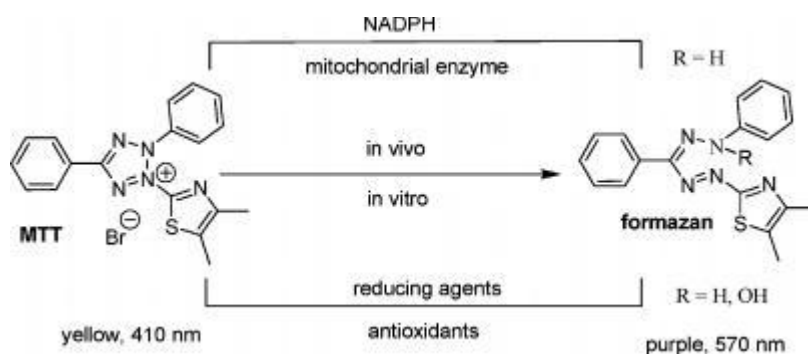


Figura 2.10 – Mecanismo pelo qual o MTT é reduzido em formazan [32].

Tanto para o teste de citotoxicidade como para a adesão celular foram cortadas 3 amostras de cada tipo de membrana, e posteriormente coladas em lamelas circulares de 12 mm diâmetro. A esterilização foi efectuada por radiação gama.

O teste de citotoxicidade teve dois grupos de controlo, denominados controlo negativo e controlo positivo. O grupo de controlo negativo possui apenas 1 ml de suspensão celular no poço, ao qual foi atribuída 100% de viabilidade celular, enquanto o grupo de controlo positivo possui 1 ml de suspensão e 500 µl de etanol, para a viabilidade celular ser nula.

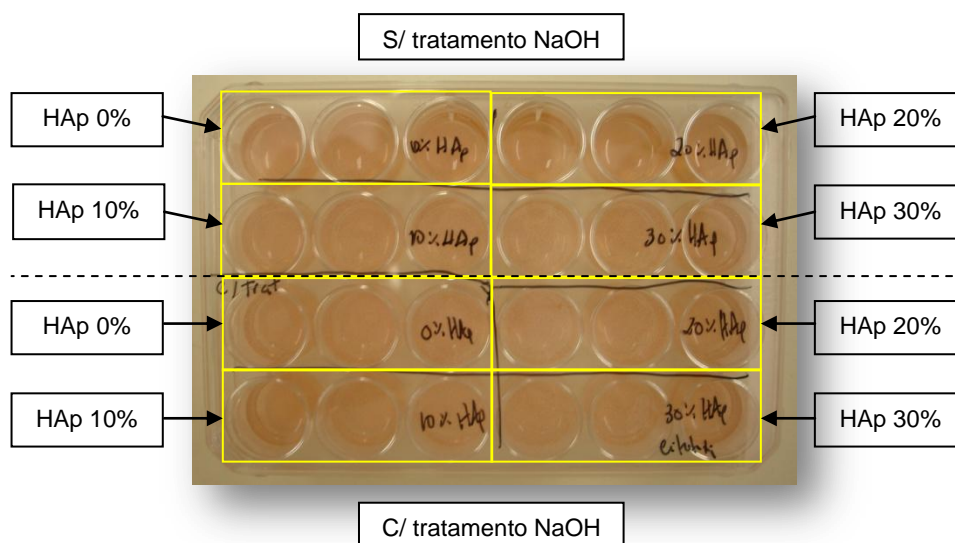


Figura 2.11 – Caixa de poços com as 24 membranas para o teste de citotoxicidade.

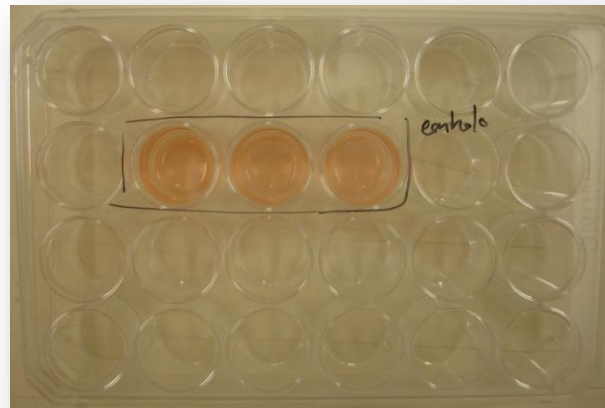


Figura 2.12 – Grupo de controlo negativo para o teste de citotoxicidade.

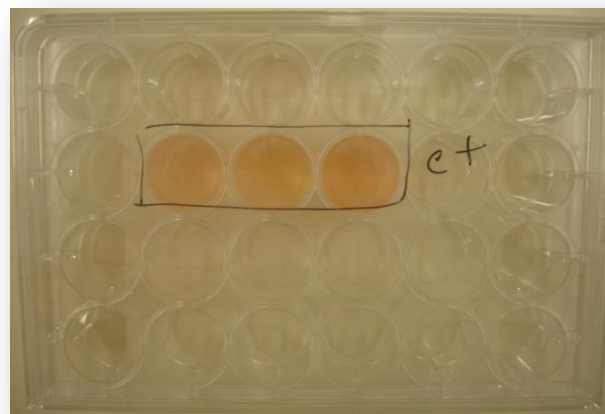


Figura 2.13 – Grupo de controlo positivo para o teste de citotoxicidade.

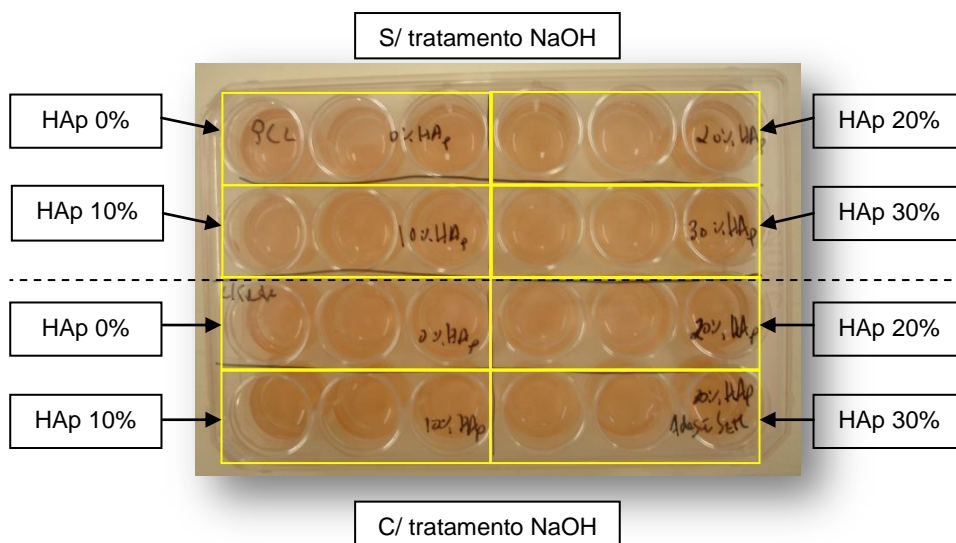


Figura 2.14 – Caixa de poços com as 24 membranas para o estado da adesão celular.

O protocolo seguido para os testes de citotoxicidade bem como para a adesão celular encontram-se no Anexo B.

### **2.3.1.8 Análise Morfológica – SEM**

A microscopia electrónica de varrimento (*SEM* – Scanning Electronic Microscopy) foi utilizada para estudar a estrutura e morfologia da superfície das membranas. A imagem de SEM é obtida através do sinal produzido pela detecção dos electrões secundário, emitidos quando a amostra é atingida pelo feixe de electrões incidente. O feixe incidente é proveniente de um filamento de tungsténio aquecido [8].

A preparação das amostras passa pela sua colocação num disco metálico, e fixadas recorrendo ao uso de uma fita-cola dupla face de carbono o que permite estabelecer um contacto eléctrico entre o disco metálico e as amostras a analisar. Após colocadas todas as amostras, a preparação é revestida com uma fina camada da liga ouro-paládio que melhora o contraste da imagem através do escoamento das cargas electrostáticas.

A microscopia electrónica de varrimento foi feita recorrendo a um equipamento Zeiss DSM-962 (CENIMAT/I3N).

### **2.3.2 Esterilização**

Esterilização é um termo que designa qualquer processo capaz de eliminar todas as formas de vida microbiana, incluindo agentes transmissíveis como fungos, bactérias e vírus, entre outros. Todos os dispositivos criados para fins médicos têm que passar por um processo de esterilização, para assegurar que o ambiente biológico a tratar não seja contaminado com microrganismos indesejáveis.

A esterilização pode ser conseguida recorrendo a diferentes tipos de procedimentos, tais como vapor ou calor húmido, exposição ao gás de óxido de etileno, tratamento de plasma a baixa temperatura, calor seco e radiação de alta energia [33].

Contudo nem todos estes métodos apresentados podem ser utilizados no dispositivo criado neste trabalho. Processos que envolvam temperaturas elevadas, tais como calor húmido e calor seco, terão que ser colocados de parte uma vez que o polímero usado possui um baixo ponto de fusão, cerca de 60°C, e tal tratamento destruiria a membrana. Sendo um dispositivo muito poroso é necessário escolher uma técnica que garanta a completa penetração do agente esterilizador e que ao mesmo tempo este não deixe resíduos susceptíveis de danificar o dispositivo ou de afectar a viabilidade e a capacidade proliferativa das células [33, 34]. Pelas razões descritas o método escolhido neste trabalho foi a esterilização através de radiação de alta energia, mais concretamente a radiação gama, que devido ao seu elevado poder penetrativo permite uma esterilização mais uniforme.

Tanto as doses como os processos de validação para a esterilização de dispositivos médicos utilizando a radiação, estão definidos pela norma ISO 11137. A dose mínima para esterilização bacteriana está estabelecida nos 25 kGy [33].

As amostras foram irradiadas no ITN (Instituto Tecnológico e Nuclear) com radiação gama de fontes Co-60 da Graviner, Lda, UK. A figura 2.15 mostra o aparelho utilizado.



Figura 2.15 - Câmara utilizada para o processo de esterilização

A câmara possui 4 níveis de altura, e o suporte das amostras foi colocado no 2º, sendo este o mais perto das fontes de Co-60 e por isso tendo um maior débito de dose. Entende-se por débito de dose a quantidade de radiação ionizante à qual um indivíduo ou material está exposto ou que recebe por unidade de tempo. O tempo de esterilização total foi calculado segundo o débito de dose médio no nível 2, o que resultou num total de 11 horas e 20 minutos. Para assegurar uma melhor distribuição de dose o suporte das amostras foi invertido a meio do período de esterilização, às 5 horas e 40 minutos.

Para verificar a dose efectiva recebida pelas amostras foram colocados 6 dosímetros em volta destas. Através da absorvância dos dosímetros a 651 nm registada após o período de esterilização, foi calculada a dose efectiva recebida pelas amostras. A figura 2.16 ajuda a interpretar a colocação dos dosímetros ao longo do período de esterilização.

Dosímetros: Amber (lote P)  
 Local: Nível 2 (A2-C2)  
 Tempo de irradiação: 5h40 + 5h40

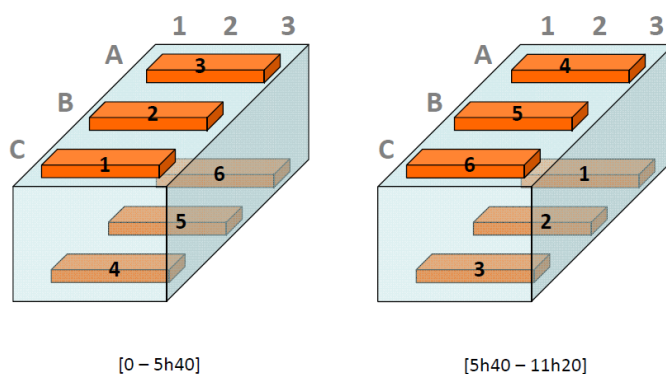


Figura 2.16 - Esquema do suporte com a posição dos dosímetros ao longo do período de esterilização.

A dose recebida pelas amostras durante o processo de esterilização variou entre 22,4 e 27,4 kGy. A tabela 2.1 apresenta o quadro com os valores de dose recebida por cada dosímetro.

Tabela 2.1 – Dose de radiação gama recebida por cada dosímetro

Dosímetro	Dose (kGy)
1	23,5
2	27,4
3	24,7
4	25,0
5	27,3
6	22,4

## **3 Apresentação e Discussão dos Resultados**

### **3.1 Parametrização da Produção**

Como referido na introdução teórica, a técnica de electrofiação é uma técnica multi-paramétrica. Como tal, um dos primeiros objectivos deste trabalho passou pela determinação das condições ideais de produção das membranas compósitas de PCL e HAp. A morfologia das fibras é bastante afectada pelos parâmetros da solução e de processamento da electrofiação.

Para estudar a influência de cada parâmetro na morfologia das fibras, utilizaram-se as condições padrão referidas na literatura (concentração 10% p/p, distância agulha-colector 25 cm, caudal 0,5 ml/h e potencial aplicado 13 kV) e a partir delas variou-se, à vez, apenas um dos parâmetros mantendo os outros constantes. Os parâmetros estudados foram: a concentração da solução polimérica, o caudal da solução, o potencial aplicado e a distância agulha-colector. Neste estudo foram utilizadas soluções poliméricas de PCL dissolvido em clorofórmio.

#### **3.1.1 Variação da concentração**

Sabe-se, que a concentração da solução polimérica tem uma grande influência no diâmetro das fibras obtidas. Um aumento de concentração origina um aumento do diâmetro das fibras e também o desaparecimento de fibras com contas.

Nesta análise manteve-se o potencial aplicado a 13kV, a distância agulha-colector a 25cm e o caudal a 0,5ml/h. Foi alterada apenas a concentração da solução polimérica utilizada, variando esta entre 8 e 15% p/p.

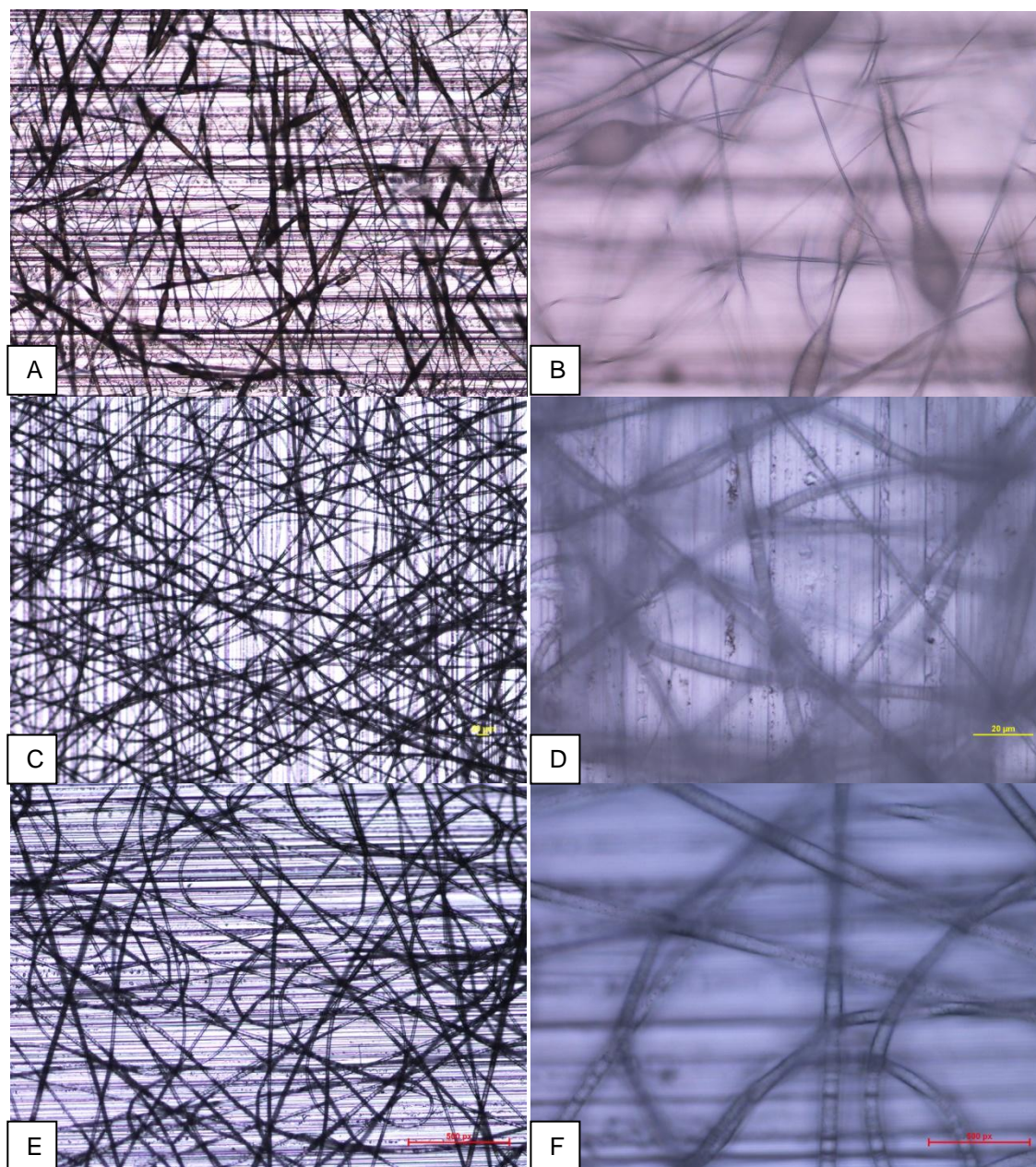
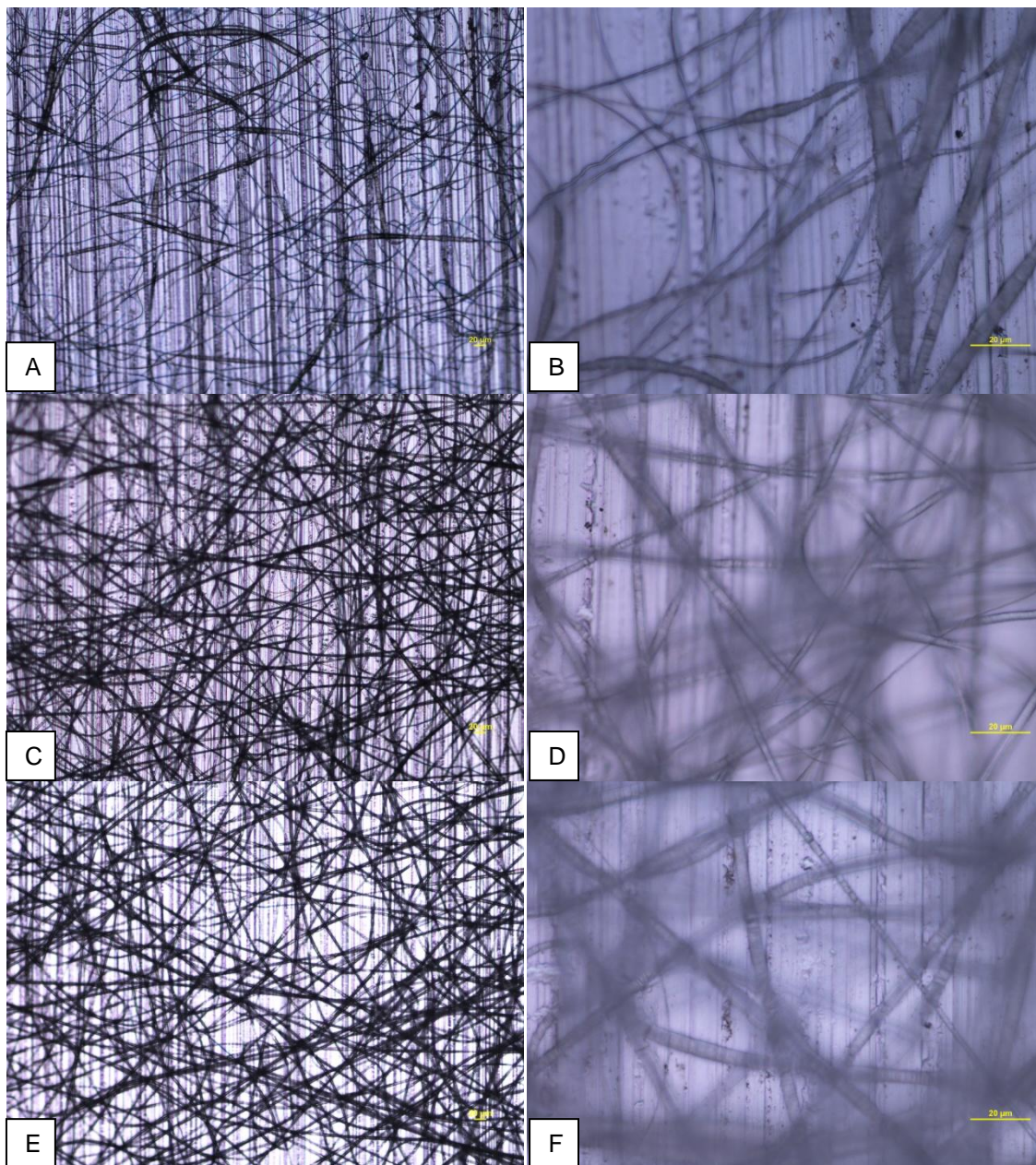


Figura 3.1 - Imagens obtidas por microscopia óptica de fibras de PCL: A e B - [8%] p/p; C e D - [10%] p/p; E e F - [15%] p/p. A, C e E – ampliação 100x B, D e F – ampliação 500x.

Como é possível observar pelas imagens B, D e F da figura 3.1, o aumento da concentração da solução polimérica tende a fazer desaparecer as contas/fusos nas fibras obtidas. Podemos observar ainda através das imagens C e E da figura 3.1, uma maior uniformidade na morfologia das fibras para valores de concentração maiores.

### 3.1.2 Variação do caudal

À semelhança da concentração, um aumento do caudal tende a originar fibras com diâmetros maiores. Nesta análise foi alterado apenas o caudal entre a entre 0,1h e 1ml/h.



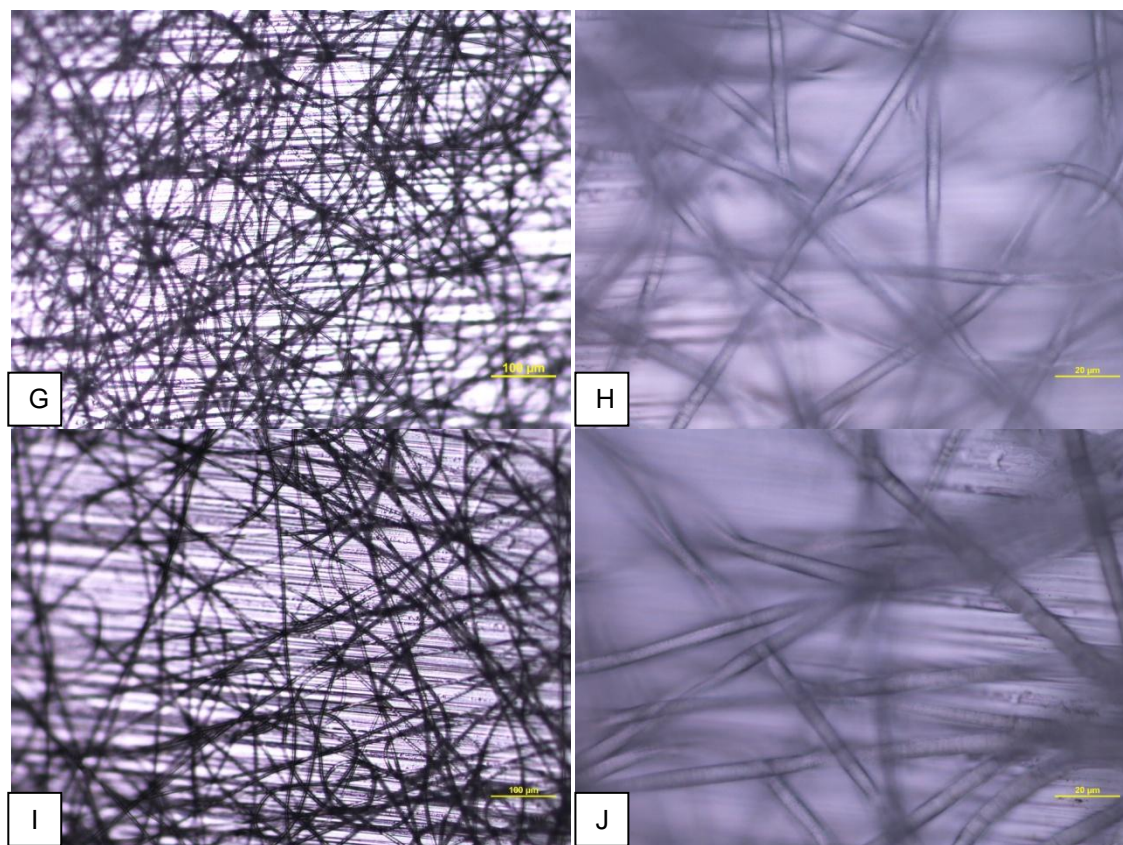


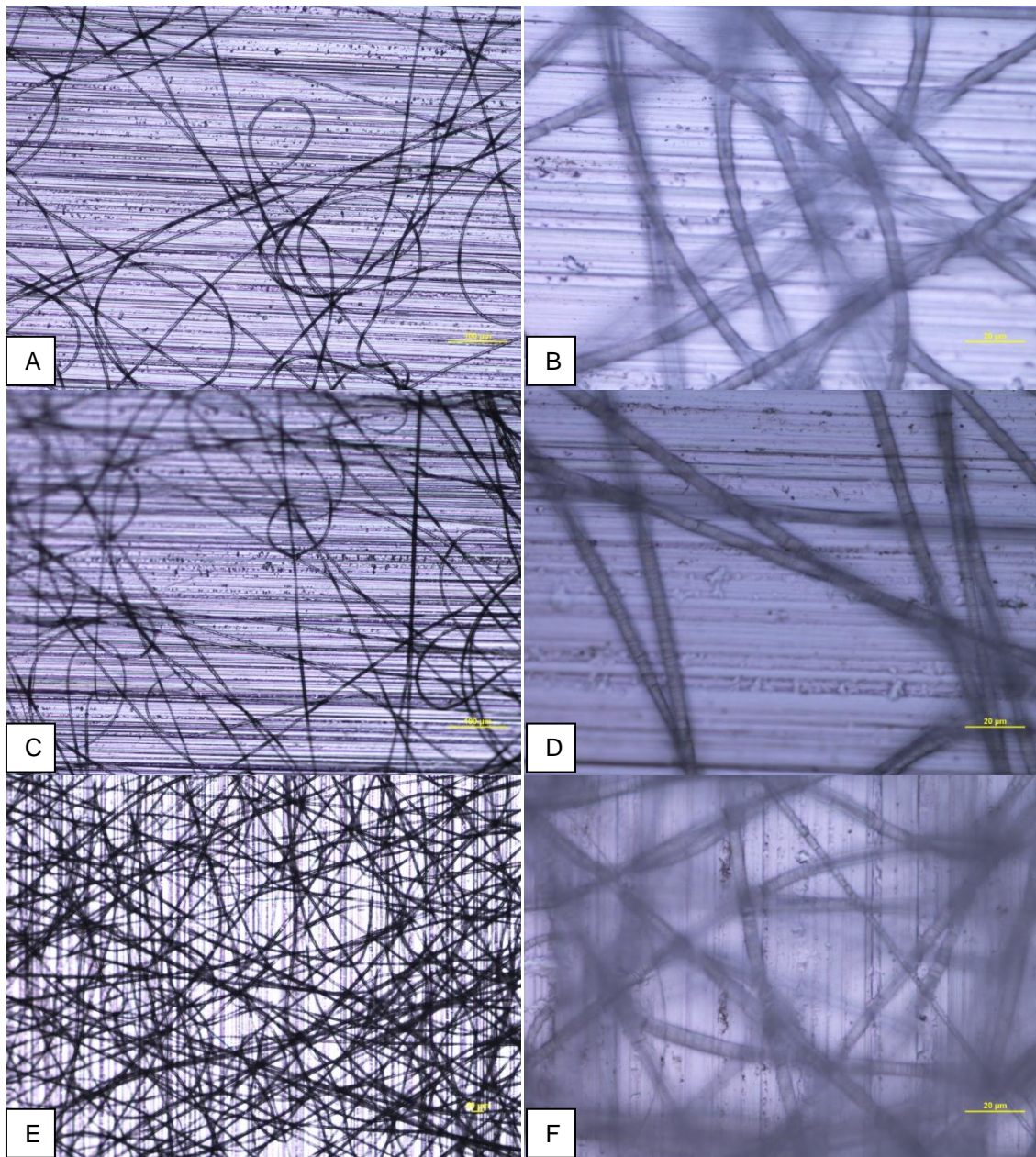
Figura 3.2 - Imagens obtidas por microscopia óptica de fibras de PCL: A e B - Caudal 0,1ml/h; C e D - Caudal 0,3ml/h; E e F - Caudal 0,5ml/h; G e H - Caudal 0,7ml/h; I e J - Caudal 1,0ml/h. A, C, E, G e I – ampliação 100x B, D, F, H e J – ampliação 500x.

As imagens A e B da figura 3.2 evidenciam uma falta de uniformidade no diâmetro das fibras. Isto, deve-se ao reduzido caudal em relação à taxa de extracção electrostática, fazendo com que apareçam fibras mais finas devido à pouca disponibilidade de solução na ponta da agulha.

Com o aumento do caudal, como podemos verificar nas imagens C a J da figura 3.2, há um ligeiro aumento do diâmetro das fibras, bem como o desaparecimento das fibras mais finas tornando a deposição mais uniforme.

### 3.1.3 Variação da tensão

Para analisar o efeito da tensão na morfologia das fibras, mantiveram-se as condições padrão, alterando apenas o potencial aplicado, variando-o entre 9 e 17kV.



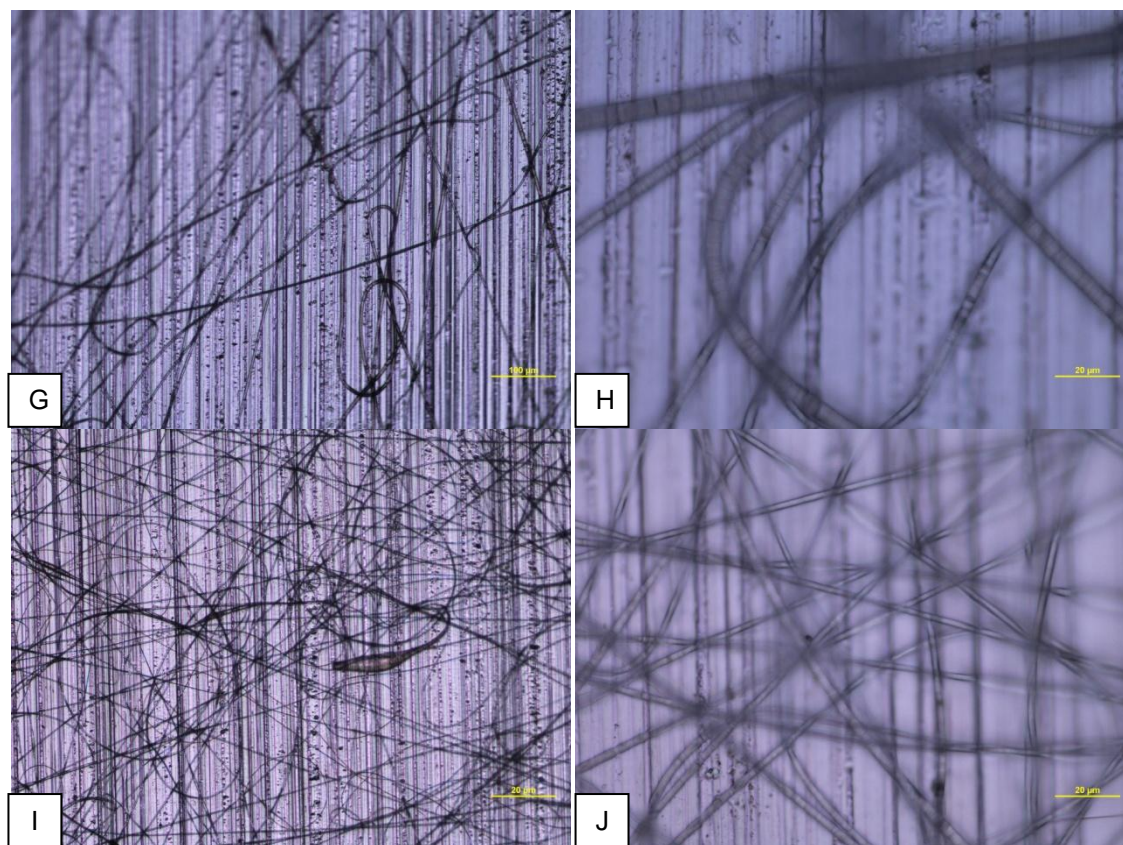
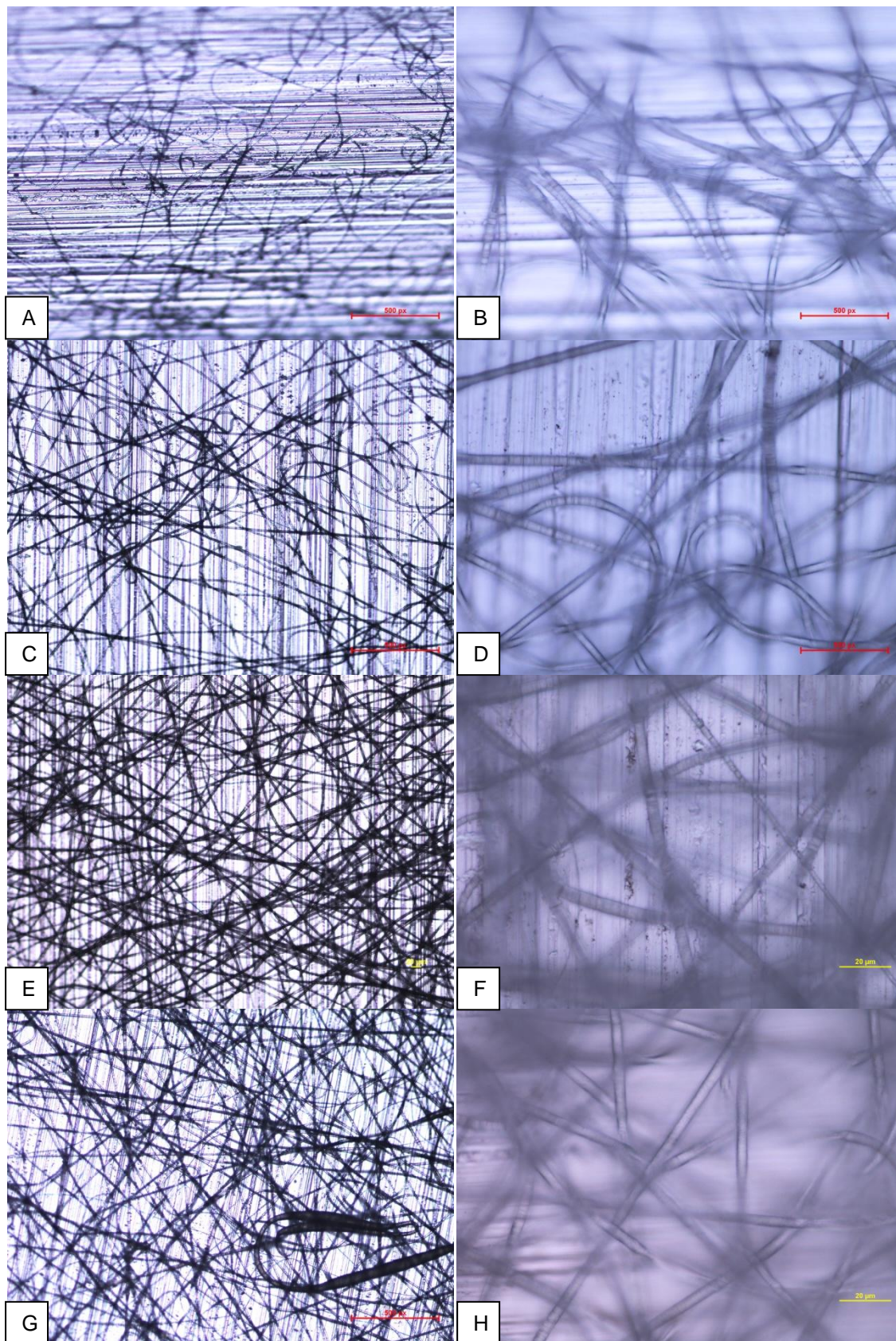


Figura 3.3 - Imagens obtidas por microscopia óptica de fibras de PCL: A e B - Potencial 9kV; C e D - Potencial 11kV; E e F - Potencial 13kV; G e H - Potencial 15kV; I e J - Potencial 17kV. A, C, E, G e I – ampliação 100x B, D, F, H e J – ampliação 500x.

Como descrito no capítulo introdutório, o aumento de tensão poderá ter dois efeitos distintos na morfologia das fibras. Por um lado, pode aumentar o diâmetro das fibras, pois aumenta a aceleração do jacto em direcção ao colector diminuindo a região de instabilidade levando a um menor estiramento das fibras. Por outro lado, pode aumentar o estiramento e devido à maior auto-repulsão gerada pelo aumento das cargas transportadas pelo jacto. As imagens da figura 3.3 parecem evidenciar o segundo efeito, verificando-se uma tendência para a diminuição do diâmetro das fibras com o aumento da tensão.

### 3.1.4 Variação da distância agulha-colector

O efeito deste parâmetro foi testado do mesmo modo que todos os anteriores. Mantiveram-se as condições padrão, apenas variando-se a distância agulha colector entre 19 e 31cm.



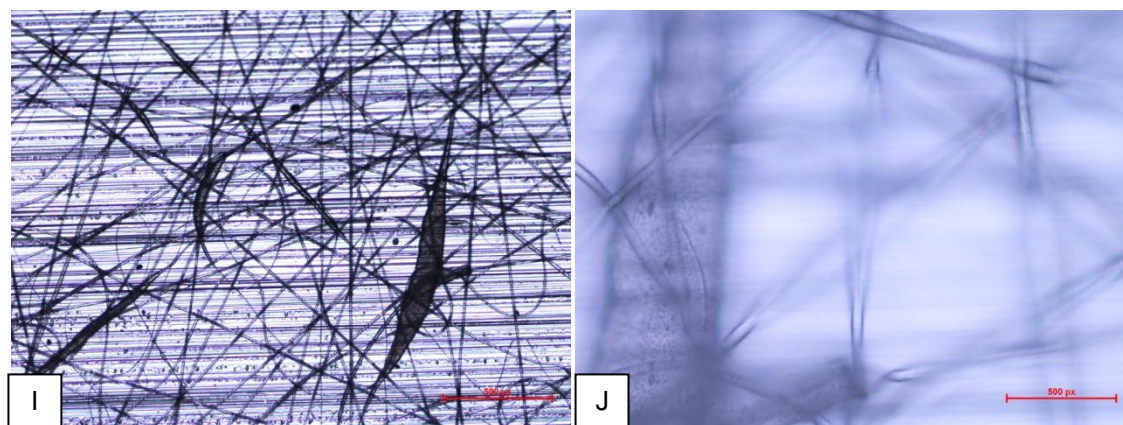


Figura 3.4 - Imagens obtidas por microscopia óptica de fibras de PCL: A e B - Distância agulha-colector; C e D - Distância agulha-colector 22cm; E e F - Distância agulha-colector 25cm; G e H - Distância agulha-colector 28cm; I e J - Distância agulha-colector 31cm. A, C, E, G e I – ampliação 100x B, D, F, H e J – ampliação 500x.

Observando a figura 3.4 verifica-se que, inicialmente, com o aumento da distância há um aumento do diâmetro das fibras, o que está de acordo com o descrito no capítulo introdutório. Nota-se também uma maior uniformidade de diâmetros.

Contudo, a partir dos 28 cm as deposições começam a apresentar fusos com uma elevada quantidade de solução e as fibras deixam de apresentar uma distribuição de diâmetros uniforme. Este facto é devido ao duplo efeito que apresentam as distâncias longas. Por um lado, o tempo de voo maior permite um maior alongamento das fibras, dando origem a fibras mais finas. Mas por outro lado, como o campo eléctrico é mais fraco, a aceleração das fibras na direcção do colector também diminui, fazendo diminuir a intensidade da corrente entre a agulha e o colector. Assim, a auto-repulsão de cargas transportadas pelo jacto diminui e como consequência a força de alongamento é menor. As contas alongadas devem-se, provavelmente, a um estiramento incompleto, ou não uniforme, do jacto.

### 3.2 Produção das Membranas Compósitas de PCL e HAp

Com base nos resultados obtidos na parametrização dos parâmetros de produção de membranas de PCL, foram determinados quais seriam os parâmetros a utilizar para a produção de todas as membranas a utilizar durante o trabalho.

A tabela 3.1 apresenta os parâmetros escolhidos:

Tabela 3.1 – Parâmetros estabelecidos para a produção das membranas compósitas de PCL e HAp

<b>Concentração</b>	15% p/p
<b>Caudal</b>	0,5 ml/h
<b>Potencial</b>	13 kV
<b>Distância agulha-colector</b>	25 cm

### 3.2.1 Composição das membranas compósitas de PCL e HAp

O primeiro objectivo estabelecido foi o de estudar as alterações morfológicas e alterações nas propriedades mecânicas com a introdução da HAp nas membranas de PCL. Para tal foram introduzidas diferentes proporções de HAp relativamente à massa de PCL utilizada para produzir a solução polimérica.

Tabela 3.2 – Composição inicial das soluções poliméricas

Nome da Deposição	Concentração PCL (p/p)	Concentração HAp (p/p)	Percentagem HAp/PCL
HAp 0%	15%	0,0%	0%
HAp 10%	15%	1,5%	10%
HAp 20%	15%	3,0%	20%
HAp 30%	15%	4,5%	30%

### 3.2.2 Alterações Morfológicas das fibras com a adição de HAp

Para analisar as alterações morfológicas foram obtidas imagens de microscopia electrónica de varrimento. A figura 3.5 apresenta as imagens obtidas.

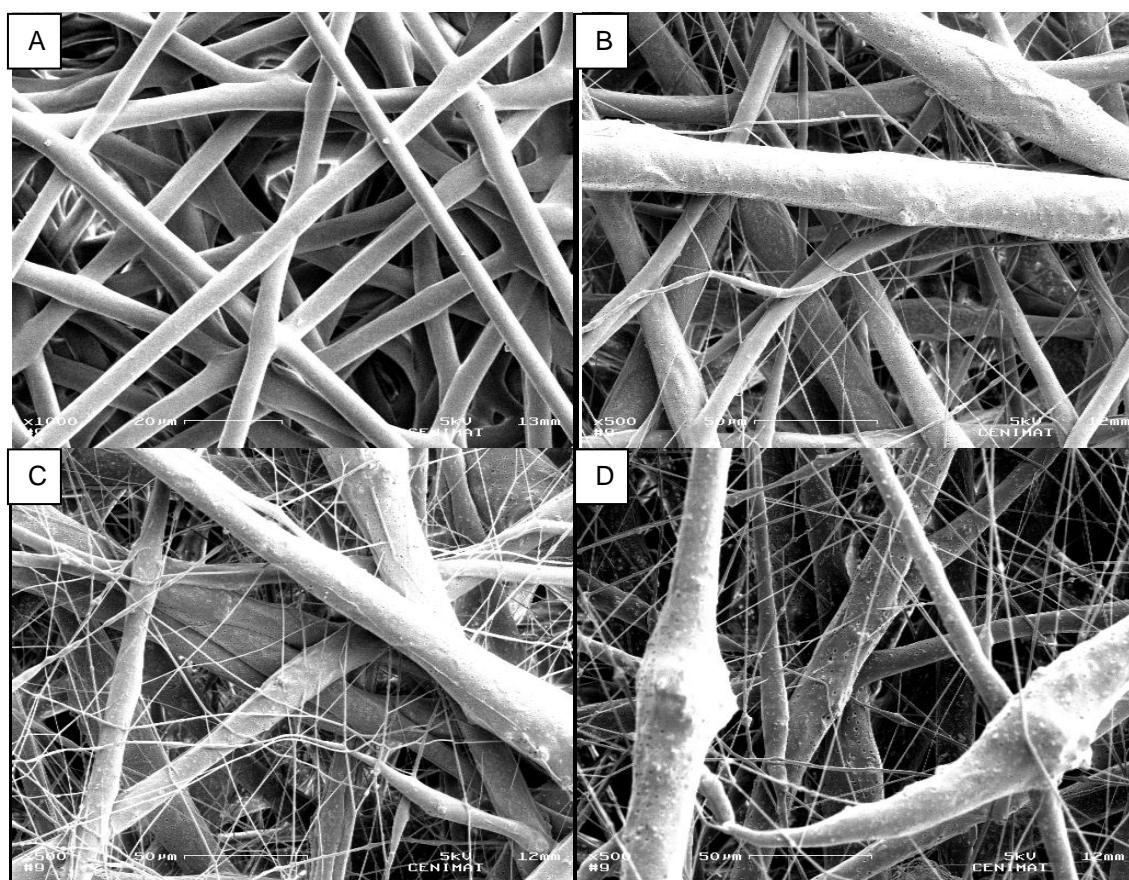


Figura 3.5 - Imagens SEM de fibras compósitas de PCL e HAp: A) HAp 0%, ampliação 1000x B) HAp 10%, ampliação 500x C) HAp 20%, ampliação 500x D) HAp 30%, ampliação 500x.

Como podemos observar pelas imagens da figura 3.5, a morfologia das fibras é bastante afectada com a introdução da HAp na composição da solução. É evidente que as fibras se tornam bastante irregulares, apresentando regiões com diâmetros bastante elevados, onde se encontram os grânulos do biocerâmico, e regiões muito finas em que não existe presença da HAp.

Isto sugere que durante o processo de electrofiação, não foi conseguida uma boa dispersão da HAp. Para além disso tendo os grânulos de HAp uma tendência para arrastar solução em seu redor, faz com que nas regiões em que não existe a presença do biocerâmico a solução disponível seja reduzida o que leva a um estiramento mais vigoroso nestas zonas fazendo surgir fibras muito finas.

### 3.2.3 Alteração das propriedades mecânicas com a adição da HAp

Analisando as propriedades mecânicas das membranas, verificamos que a adição da HAp na composição da solução polimérica afecta drasticamente a elasticidade da membrana. Para além disso as membranas tornaram-se bastante frágeis, rompendo à mínima força de tracção nelas exercida. As figuras 3.6 a 3.9 e a tabela 3.3 evidenciam isso mesmo.

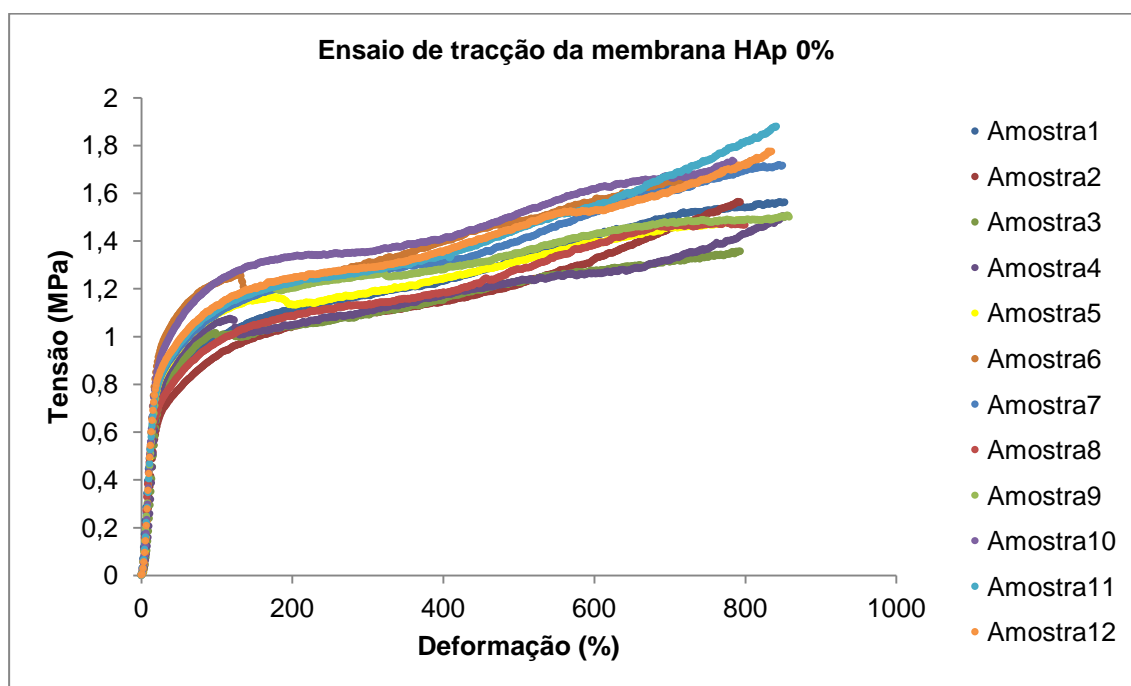


Figura 3.6 - Curva de tracção da membrana HAp 0%

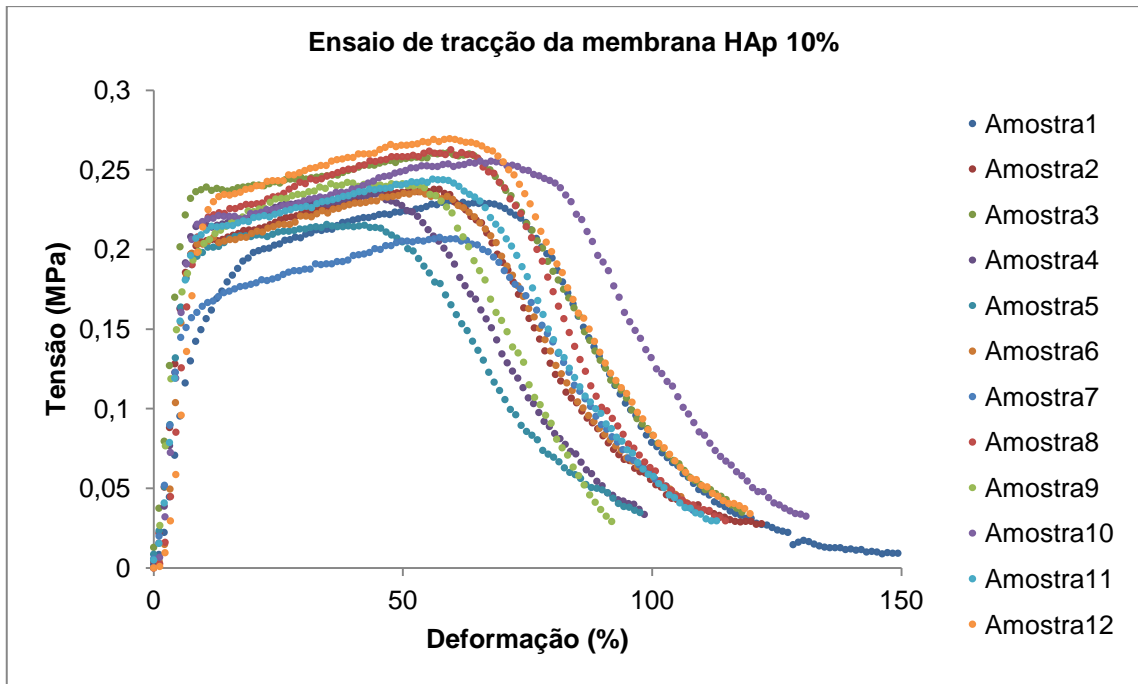


Figura 3.7 - Curva de tração da membrana HAp 10%

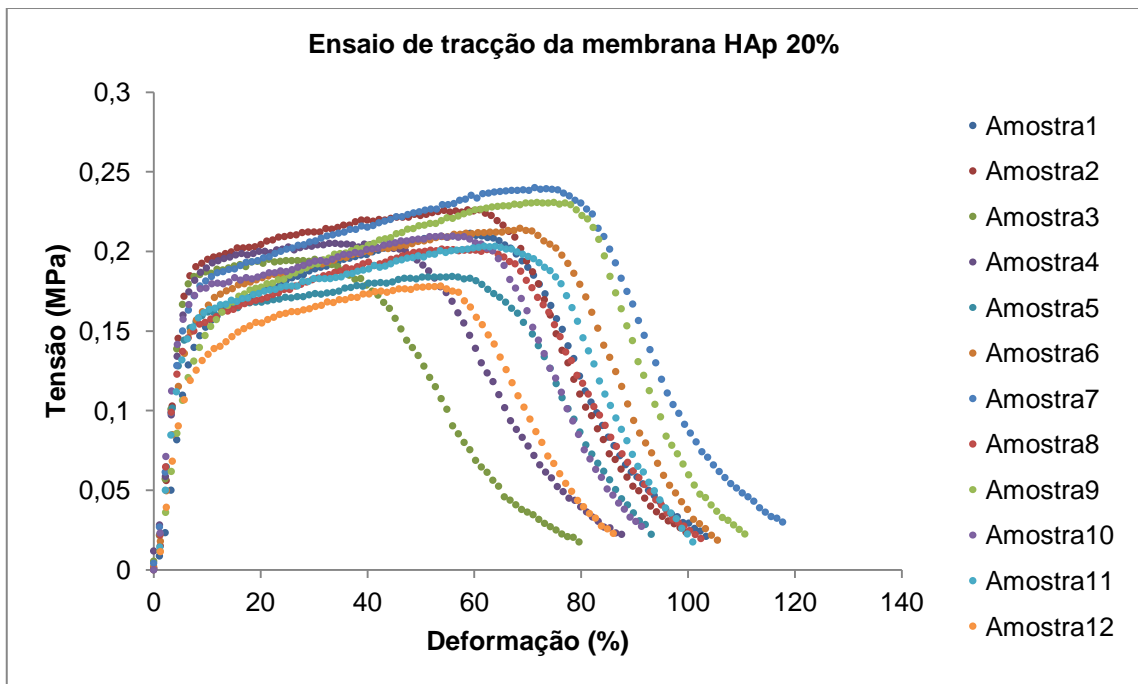


Figura 3.8 - Curva de tração da membrana HAp 20%

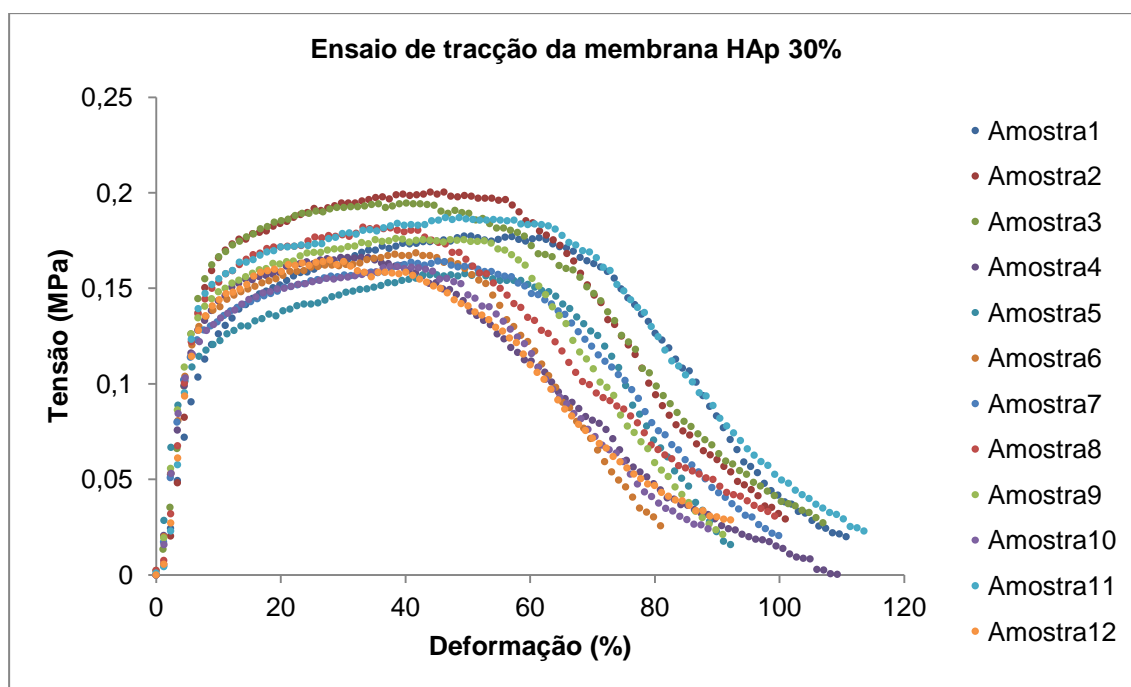


Figura 3.9 - Curva de tração da membrana HAp 30%

Tabela 3.3 - Propriedades mecânicas das membranas compósitas obtidas.

	Módulo de Young (Mpa)	Deformação à Ruptura (%)	Tensão de Ruptura (MPa)
HAp 0%	5,3	> 800	> 1,6
HAp 10%	3,6	59	0,2
HAp 20%	3,1	60	0,2
HAp 30%	2,6	49	0,2

Através da tabela 3.3, podemos observar que o aumento da proporção HAp:PCL tende a diminuir todas as propriedades mecânicas membrana.

Após estas duas análises tornou-se evidente que era necessário mudar a abordagem pela qual seriam produzidas as membranas, uma vez que para a aplicação desejada, GTR e GBR, é necessário uma membrana cuja principal função é servir de barreira e de providenciar o espaço necessário à regeneração do tecido pretendido sem que colapse durante o período do tratamento.

A sua aplicação final é no ramo estomatológico em procedimentos cirúrgicos onde muitas vezes o local de implantação é de difícil acesso, sendo necessário ter bastante perícia manual. Além disso, o modo de acondicionamento da membrana pode ser um pouco agressivo, sendo por vezes fixada através de pinos biodegradáveis, cola médica ou suturas. Pelas razões

descritas em cima será necessário que a membrana tenha alguma resistência mecânica, que apresente uma certa elasticidade, e às quais se alie um fácil manuseamento, para evitar a sua ruptura durante a cirurgia [35].

### 3.2.4 Nova abordagem para a produção das membranas compósitas de PCL e HAp

Como o objectivo do trabalho era produzir membranas compósitas de PCL e HAp, a exclusão da incorporação do biocerâmico na solução foi posta de parte. A solução encontrada foi utilizar um sistema de bombeamento de solução duplo, isto é utilizar uma bomba infusora que permitisse bombear duas soluções. Assim utilizou-se uma solução apenas de PCL combinada com uma solução que continha PCL e HAp, permitindo assim contornar o problema das propriedades mecânicas registadas com as soluções compósitas. A solução de apenas PCL garantia assim a estabilidade da membrana devido às suas propriedades elastoméricas.

Durante os primeiros testes desta nova abordagem/sistema foi verificado que seria necessário aumentar o caudal de infusão da solução, bem como diminuir a concentração polimérica das soluções contendo o biocerâmico, uma vez que estas soluções estavam a secar na ponta da agulha. Sendo assim os parâmetros estabelecidos para a produção das membranas passaram a ser os apresentados na tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Parâmetros estabelecidos para a produção das membranas compósitas de PCL e HAp seguindo a nova abordagem.

<b>Caudal</b>	1 ml/h
<b>Potencial</b>	13 kV
<b>Distância agulha-colector</b>	25 cm

A tabela 3.5 apresenta a composição das soluções poliméricas, mantendo as mesmas proporções HAp:PCL na membrana, utilizando a nova abordagem.

Tabela 3.5 - Composição das soluções poliméricas usando a nova abordagem.

Nome da Deposição	Solução de PCL	Solução Compósita de PCL e HAp		Percentagem HAp/PCL
	Concentração PCL (p/p)	Concentração PCL (p/p)	Concentração HAp (p/p)	
HAp 0%	15%	-	-	0%
HAp 10%	15%	10%	2,5%	10%
HAp 20%	15%	10%	5%	20%
HAp 30%	15%	10%	7,5%	30%

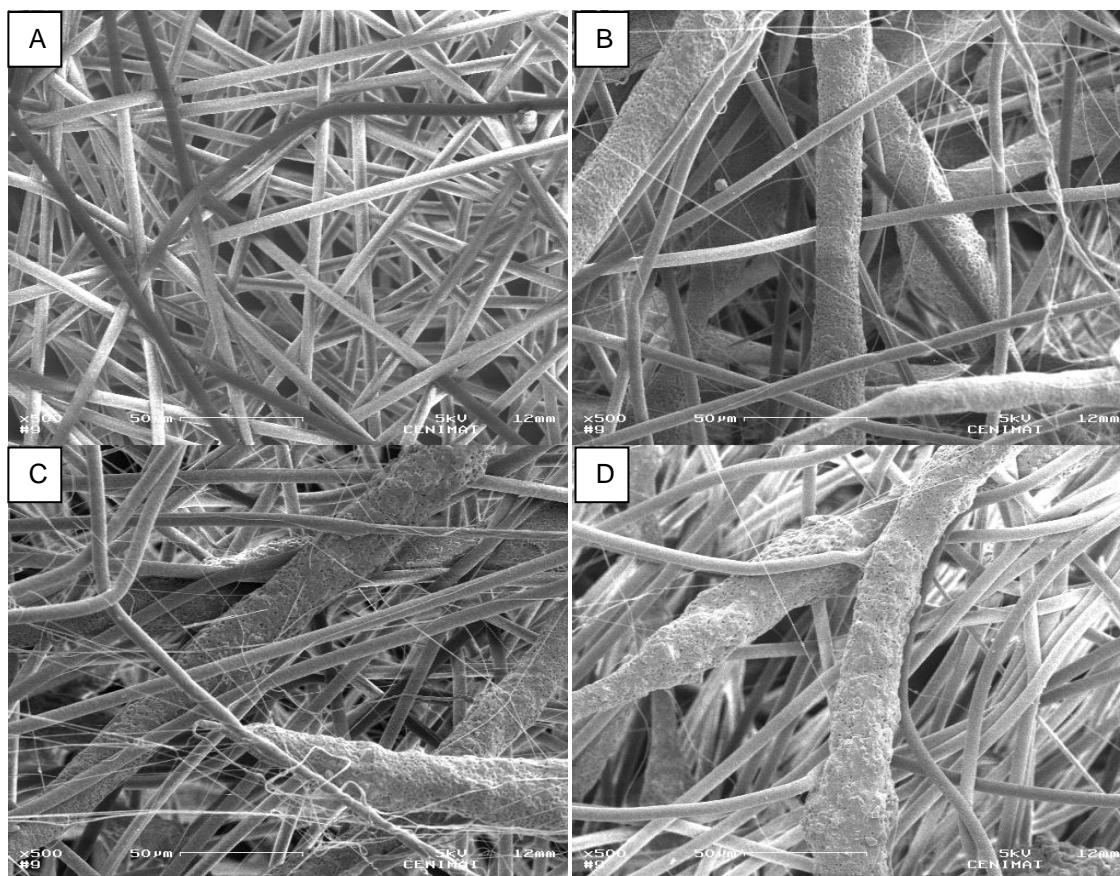


Figura 3.10 - Imagens SEM de fibras compostas de PCL e HAp utilizando a nova abordagem: A) HAp 0% B) HAp 10% C) HAp 20% D) HAp 30%; Ampliação 500x.

### 3.3 Caracterização das Membranas

Para se proceder à caracterização mecânica das membranas obtidas, foram utilizados todos os diferentes tipos de fibras (HAp 0%, HAp 10%, HAp 20% e HAp 30%) com todos os diferentes tipos de pós-tratamento (sem tratamento, tratamento químico com NaOH e esterilização combinada com tratamento químico com NaOH).

#### 3.3.1 Porosidade

Através do método utilizado para determinar a gravidade específica, foi obtido um valor de 2,90 g/cm<sup>3</sup> para a densidade da HAp, tendo sido este o valor utilizado para os cálculos da porosidade das membranas.

A porosidade das membranas, obtida através do tratamento estatístico de dados é apresentada na tabela 3.6.

Tabela 3.6 - Porosidade das membranas HAp:PCL

Proporção HAp:PCL	Porosidade (%)
0:1	84,2 ± 0,5
1:10	84,0 ± 1,3
2:10	84,5 ± 1,0
3:10	84,2 ± 0,7

Analisando a tabela 3.6, pode-se constatar que as membranas obtidas apresentam todas uma elevada porosidade, na ordem dos 84%, valor concordante com a porosidade obtida para matrizes de PCL produzidas no trabalho realizado por Gomes e colaboradores [15]. Através desta análise não se observa nenhuma relação entre a proporção de HAp:PCL da membrana e sua a porosidade. Aparentemente a porosidade não é alterada pela introdução do biocerâmico.

### 3.3.2 Ensaios de Tracção

Os testes de tracção demonstram que as membranas produzidas têm uma boa resistência mecânica e uma elevada elasticidade, suportando extensões mínimas de 800%, o que torna estas membranas adequadas para a aplicação desejada, uma vez que serão passíveis de resistir ao processo cirúrgico, ao seu modo de acondicionamento, aos métodos de fixação no local e de não colapsarem durante o tratamento. A figura 3.11 mostra as curvas de tracção da membrana HAp 30% que são idênticas às curvas de tracção dos outros tipos de membrana (PCL, HAp 10% e HAp 20%).

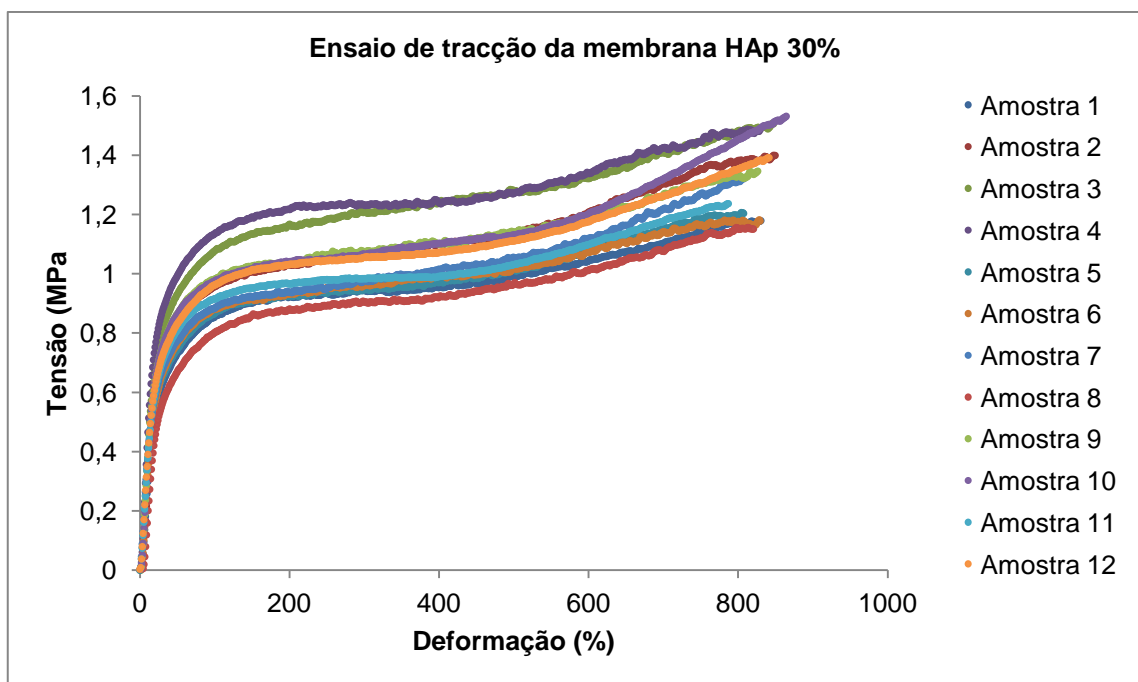
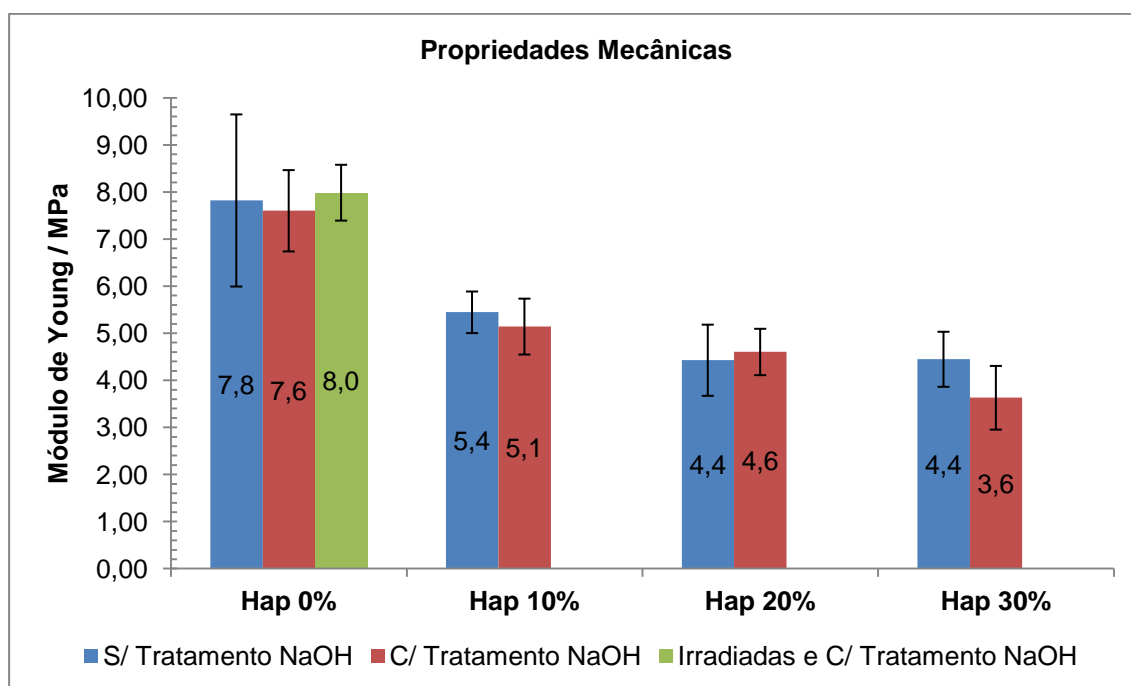


Figura 3.11 – Curvas de tracção da membrana HAp 30%.

No gráfico e tabela seguintes apresentam-se os valores médios do Módulo de Young e respectivo desvio padrão obtidos a partir dos ensaios de tracção efectuados a cada tipo de membrana e cada tipo de pós-tratamento.



3.12 - Módulo de Young das diferentes membranas produzidas com os diferentes pós tratamentos

Tabela 3.7 - Módulo de Young e respectivos desvios padrão das diferentes membranas produzidas com os diferentes pós tratamentos

Membrana	Tratamentos	Módulo de Young (Mpa)	Desvio Padrão (Mpa)
HAp 0%	S/ NaOH	7,8	1,8
	C/ NaOH	7,6	0,9
	Irradiadas e C/ NaOH	8,0	0,6
HAp 10%	S/ NaOH	5,4	0,4
	C/ NaOH	5,1	0,6
HAp 20%	S/ NaOH	4,4	0,8
	C/ NaOH	4,6	0,5
HAp 30	S/ NaOH	4,4	0,6
	C/ NaOH	3,6	0,7

Analisando a figura 3.12 e a tabela 3.7 podemos verificar que o módulo de Young das membranas de PCL é de  $7,8 \pm 1,8$  MPa e que é concordante com a literatura [15, 36]. Relativamente às membranas compósitas de PCL e HAp não existe na literatura uma consensualidade nos que diz respeito ao módulo de Young deste tipo de membranas. Fujihara e colaboradores, à semelhança dos resultados obtidos durante este trabalho e representados

na figura 3.12, verificaram que a introdução de um biocerâmico na composição das fibras induz uma diminuição das propriedades mecânicas [35]. Contudo, Yang e colaboradores verificaram que a introdução do biocerâmico melhora as propriedades mecânicas através de um mecanismo de dissipação energética introduzido pelas nanopartículas biocerâmicas [6].

Analisando agora o efeito do tratamento no módulo de Young obtido, podemos verificar pela figura 3.12, que não existem diferenças significativas entre o Módulo de Young das membranas que não sofreram pós tratamento e aquelas que sofreram um pós tratamento químico de NaOH. Este facto é concordante com o trabalho realizado por Ghasemi-Mobarakeh e colaboradores [37].

Relativamente ao efeito da esterilização com radiação gama, apenas foram realizados testes de tracção em membranas de PCL irradiadas, pois a radiação a afectar algum dos componentes será o polímero e não o biocerâmico. Observando assim a figura 3.12 relativamente ao grupo HAp 0%, podemos verificar que relativamente às propriedades mecânicas do material, a radiação também não induziu quaisquer diferenças significativas, como já tinha sido relatado na literatura [33, 34].

Se tivermos em conta apenas os resultados dos ensaios mecânicos podemos afirmar que tanto o tratamento químico com NaOH como a esterilização com radiação gama não induzem alterações significativas na estrutura da membrana, sendo bons métodos de hidrofilar e esterilizar a membrana, respectivamente.

### **3.3.3 Ângulos de Contacto**

Os resultados obtidos das medições dos ângulos de contacto das membranas são apresentados na figura 3.13.

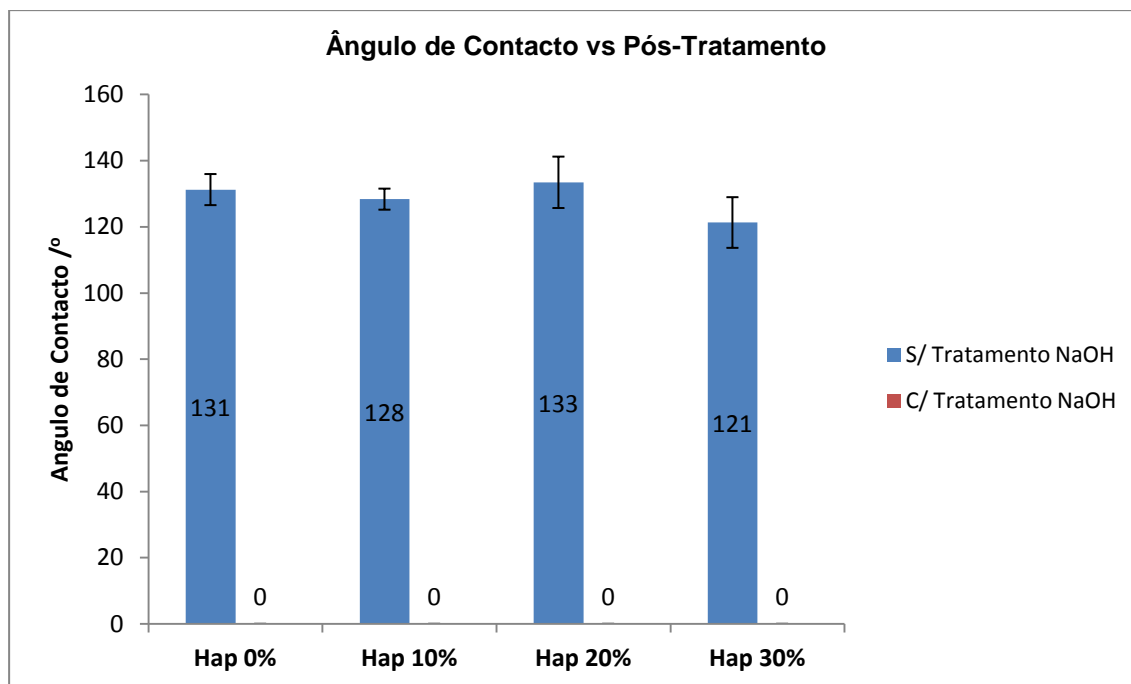


Figura 3.13 - Ângulos de contacto em função do pós-tratamento.

Podemos observar pela figura 3.13 que não existe nenhuma relação entre a proporção de HAp:PCL da membrana e o ângulo de contacto que esta forma com a gota de água. Isto pode ser explicado pelo encapsulamento das partículas de HAp pelo polímero, estando a HAp pouco exposta, sendo comprovado pela figura 3.14 que apresenta uma imagem de SEM deste tipo de membrana.



Figura 3.14 - Imagem de SEM evidenciando o encapsulamento das partículas de HAp pelo polímero.

Analisando a relação entre o pós-tratamento e o ângulo de contacto, podemos verificar que o tratamento químico com NaOH torna a membrana hidrofílica, estando de acordo com os trabalhos presentes na literatura [37, 38].

Comprova-se assim que o tratamento químico com uma solução de NaOH é bastante eficaz para tornar um material hidrofóbico num material hidrofílico, tornando-se assim um bom método para a engenharia de tecidos com vista a aumentar a adesão e facilitar a migração e proliferação celular bem com as interações entre o material e o ambiente biológico.

### 3.3.4 Degradação

Os resultados obtidos relativamente à degradação das membranas compósitas são apresentados na figura 3.15. A tabela 3.8 apresentam a constituição e o pH de cada condição.

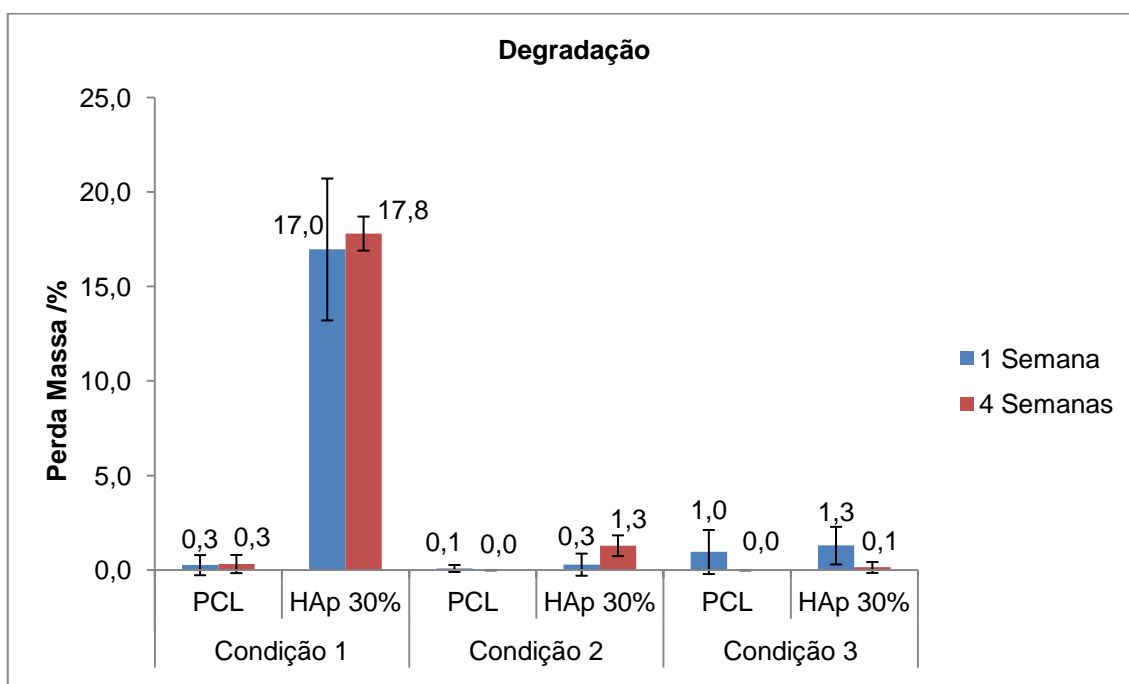


Figura 3.15 - Perda de Massa após os testes de degradação

Tabela 3.8 - Constituição e pH das condições de degradação.

Condição	Constituição e pH
1	Tampão ácido acético/acetato de sódio pH 3,74
2	Tampão de fosfato pH 7,2
3	Solução enzimática: Acetilcolinesterase 1U/mL em Tampão de fosfato pH 7,2

Analisando a figura 3.15 observamos que a perda de massa do PCL para os dois períodos de degradação bem como para as condições 1 e 2, foi insignificante. Este resultado era esperado uma vez que o PCL tem uma taxa de degradação bastante lenta, sendo degradado apenas por hidrólise das sua ligações éster, e está de acordo com a literatura [14, 39].

Analisando o PCL para a condição 3 é verificado que apesar de ligeiramente superior a perda de massa não é significativamente maior, mesmo apesar de estar presente num ambiente que contém uma esterase. Este resultado é concordante com a literatura, em que é referido que o principal modo pelo qual ocorre a degradação de um poliéster de elevado peso molecular ( $M_n > 5000$ ) é a cisão hidrolítica aleatória e que os processos de biodegradação (acção de bio-organismos, como enzimas e células, na cisão das ligações éster da cadeia principal) apenas ocorrem na fase final da degradação polimérica. É referido ainda que na degradação não existe uma contribuição inicial significativa por parte das enzimas, estando estas apenas envolvidas na degradação de subprodutos de menor peso molecular ( $M_n < 5000$ ) [39]. Os resultados obtidos são confirmados pela figura 3.16 que apresenta imagens de SEM da membrana de PCL sem pós tratamento, PCL com pós tratamento de NaOH e PCL com pós tratamento após o período de 4 semanas de degradação em meio ácido e enzimático.

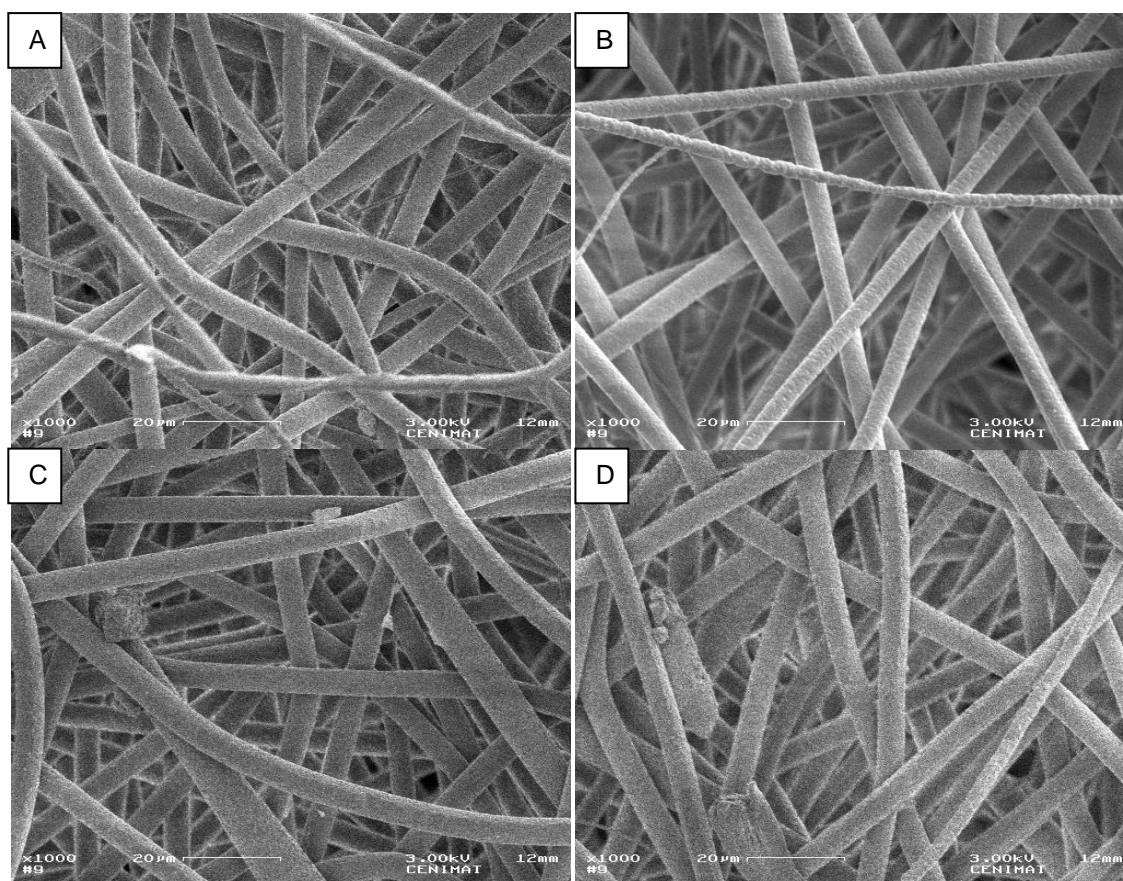


Figura 3.16 - Imagens SEM da membrana de PCL, ampliação 1000x: A – sem tratamento; B – com tratamento químico com NaOH; C - com tratamento químico com NaOH e permanência de 4 semana em meio ácido; D - com tratamento químico com NaOH e permanência de 4 semana em meio enzimático

Pelas imagens de SEM podemos observar que não há alteração significativa da membrana após o teste de degradação, bem como dos diferentes meios a que se procedeu o teste.

Fazendo uma análise à membrana compósita, podemos verificar que se comporta de modo semelhante à membrana de PCL para as condições 2 e 3, ou seja não apresenta perdas mássicas significativas. Este facto deve-se à baixa taxa de degradação que a HAp apresenta

em ambientes fisiológicos, sendo a escala temporal de anos, em fluidos corporais a pH neutro ou por reabsorção mediado por osteoclástos através de um microambiente ácido resultante da secreção de enzimas e transporte de iões [40]. Contudo para a condição 1, as membranas compósitas apresentam uma perda mássica significativa, cerca de 17%, logo no período de 1 semana e que não se altera significativamente após 4 semanas. Este resultado é explicado devido à dissolução da HAp em meio ácido, como é referido na literatura [40, 41].

A figura 3.17 apresenta os resultados da perda de massa relativamente às membranas que passaram pelo processo de esterilização.

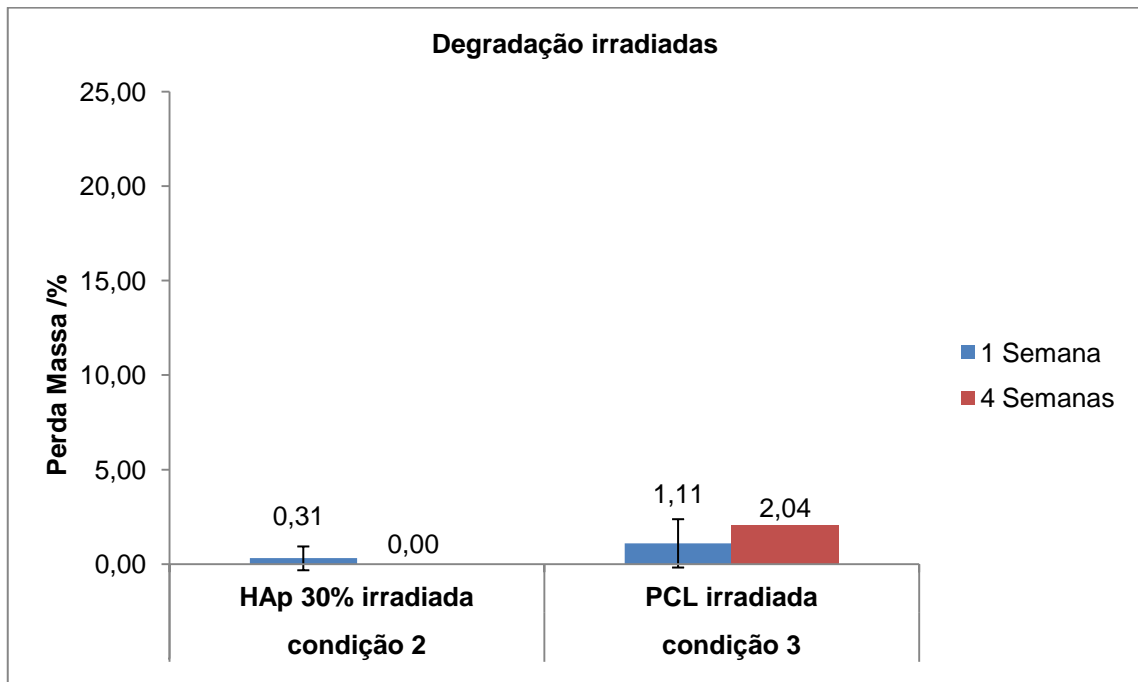


Figura 3.17 - Perda de Massa das membranas irradiadas

Podemos verificar que o processo de esterilização não aumenta a taxa de degradação da membrana, uma vez que a perda de massa nas membranas irradiadas é coincidente com a perda de massa nas membranas que não passaram pelo processo de esterilização. Este é um resultado esperado pois de acordo com o trabalho de Cottam e colaboradores, a radiação diminui a taxa de degradação do polímero [34].

Quando se projecta uma membrana para a GTR ou GBR, é necessário que esta mantenha a sua integridade durante um período de pelo menos 4 a 6 semanas para que haja regeneração do tecido periodontal [11]. Relativamente aos resultados da degradação podemos concluir que as membranas produzidas preenchem os requisitos para poderem ser usadas nas técnicas de GTR e GBR uma vez que apresentam uma degradação relativamente insignificante ao fim das 4 semanas.

### 3.3.5 Bioatividade

Os resultados relativamente aos testes de bioatividade foram obtidos através da simples apreciação de imagens de SEM das amostras. A figura 3.18 apresenta as imagens SEM das amostras de PCL (A), HAp 10% (B), HAp 20% (C) e HAp 30% (D), após 4 dias de imersão numa solução de SBF, a 37°C.

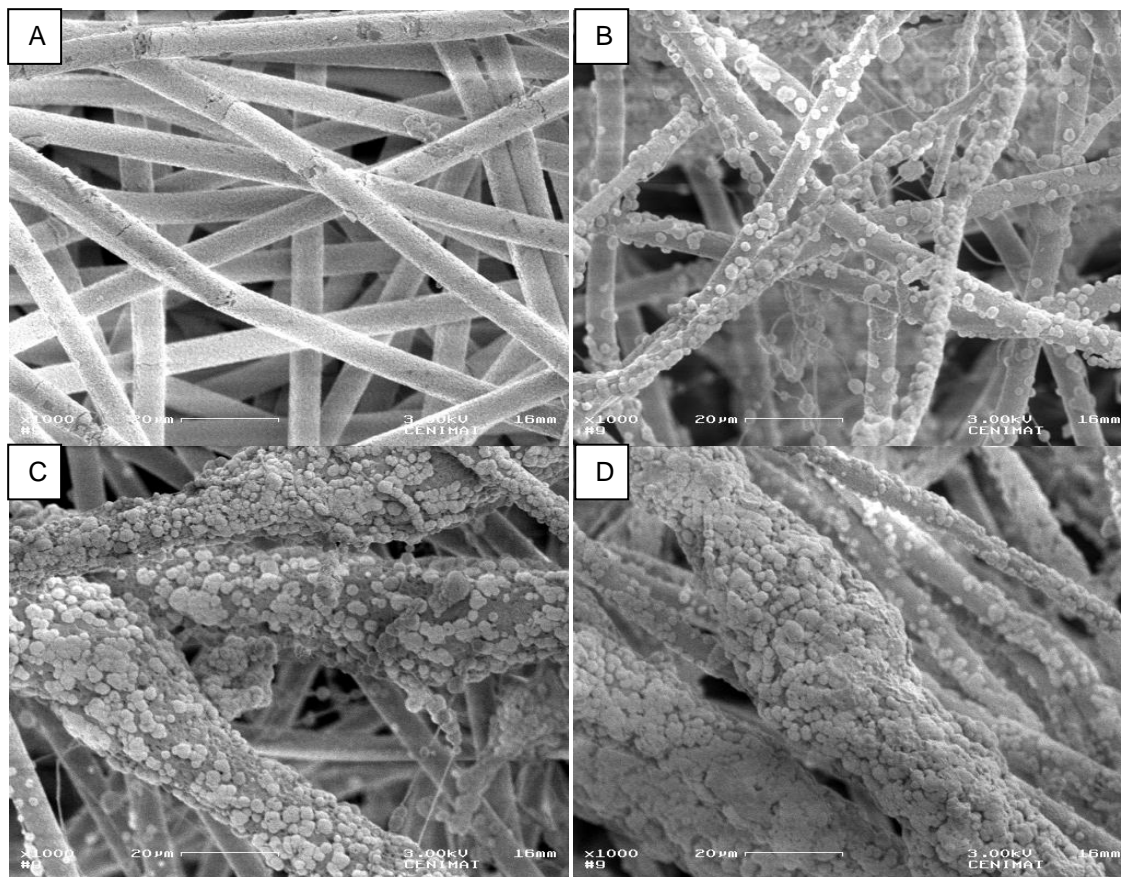


Figura 3.18 - Imagens SEM após 10 dias de imersão em SBF: A - PCL; B – HAp 10%; C - HAp 20%; D – HAp 30%; Ampliação 1000x.

A figura 3.18 mostra a formação de apatite na superfície das fibras. A incorporação de um biocerâmico com propriedades osteocondutoras favorece a formação de apatite na superfície das fibras porque o biocerâmico funciona como semente para a nucleação e formação da apatite [42].

Como referido na literatura, tornou-se evidente também através dos testes de bioatividade que o tratamento químico com NaOH favorece a deposição de apatite na superfície das fibras, uma vez que aumenta os pontos de nucleação de apatites [14]. A figura 3.19 apresenta as imagens das membranas, com e sem tratamento de NaOH, demonstrando os resultados obtidos.

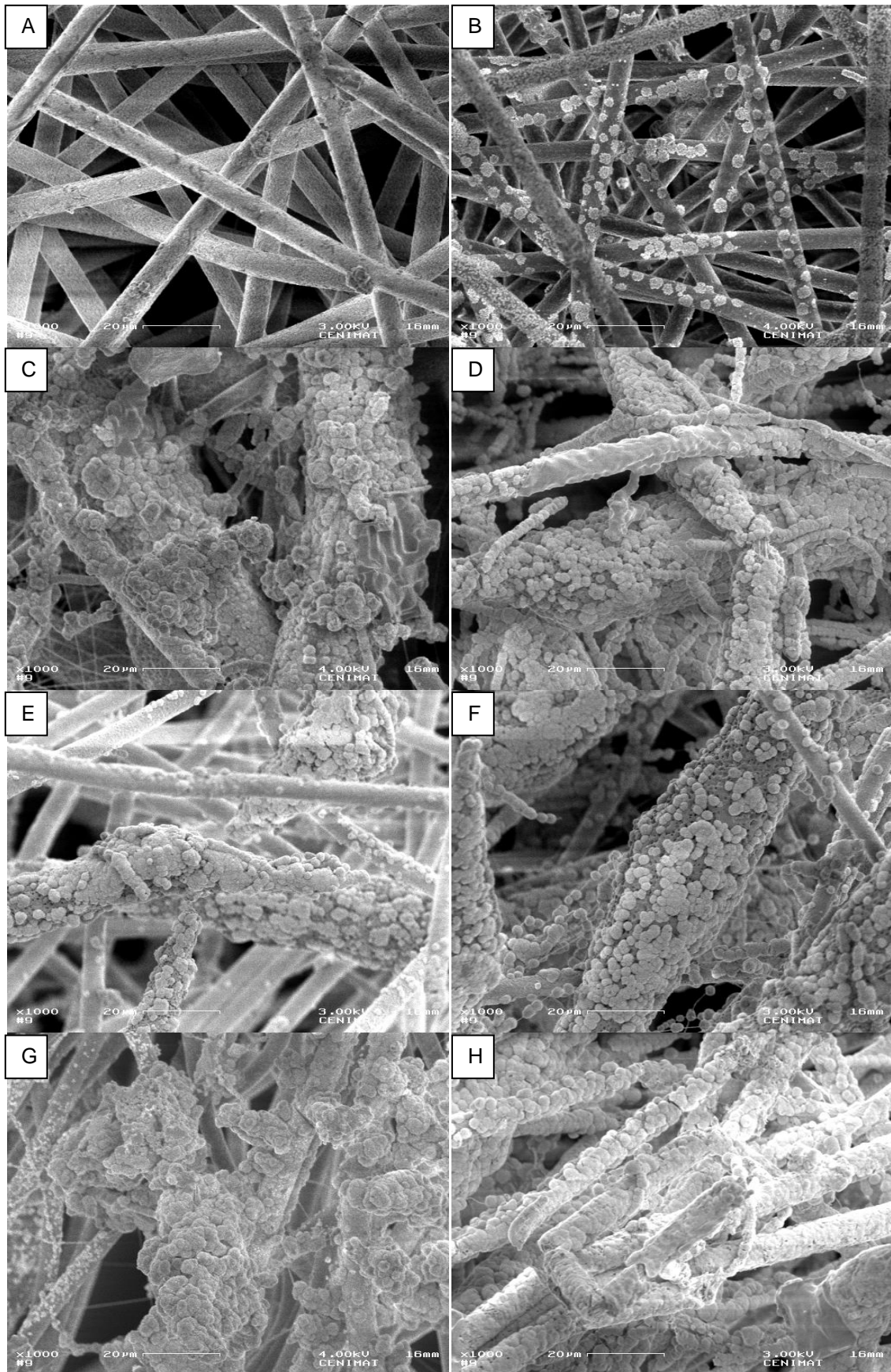


Figura 3.19 - Imagens SEM, após a imersão em SBF durante 30 dias: A e B – PCL; C e D – HAp 10%; E e F – HAp 20%; G e H – HAp 30%; A, C, E e G – sem tratamento químico com NaOH; B, D, F e H – com tratamento químico com NaOH; Ampliação 1000x.

### 3.3.6 Teste de Citotoxicidade e Adesão Celular

O teste de citotoxicidade foi efectuado recorrendo ao método MTT por contacto directo. O resultado obtido após a incubação a 37°C durante 2 horas em MTT é apresentado na figura 3.18.

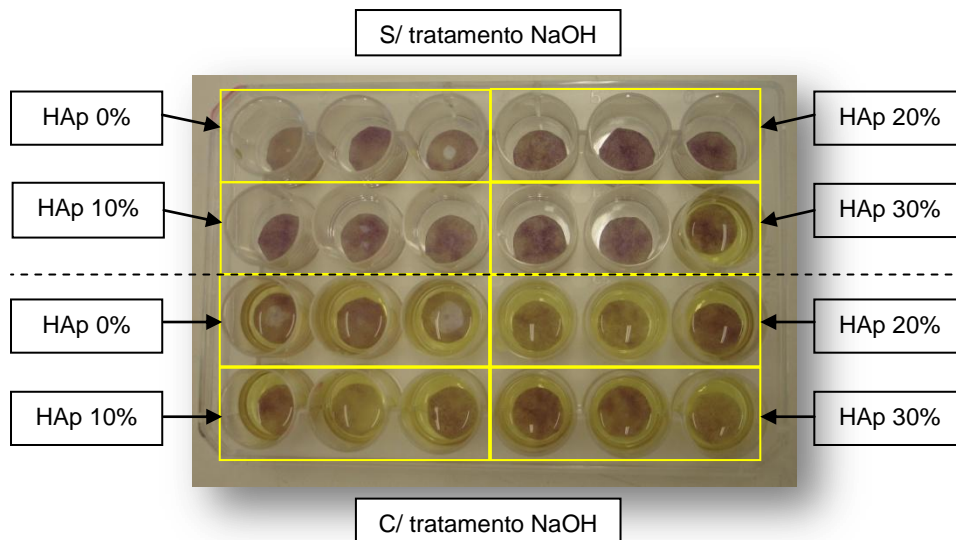


Figura 3.20 – Poços após a incubação a 37°C durante 2 horas em MTT.

A coloração púrpura nas membranas demonstra a formação de sais de formazan, indicando a presença de células viáveis.

A viabilidade celular relativa das amostras foi calculada através da realização de leituras da densidade óptica das soluções nas quais foram dissolvidos os sais de formazan contidos em cada amostra. A figura 3.19 mostra a placa de poços utilizada com as respectivas soluções.

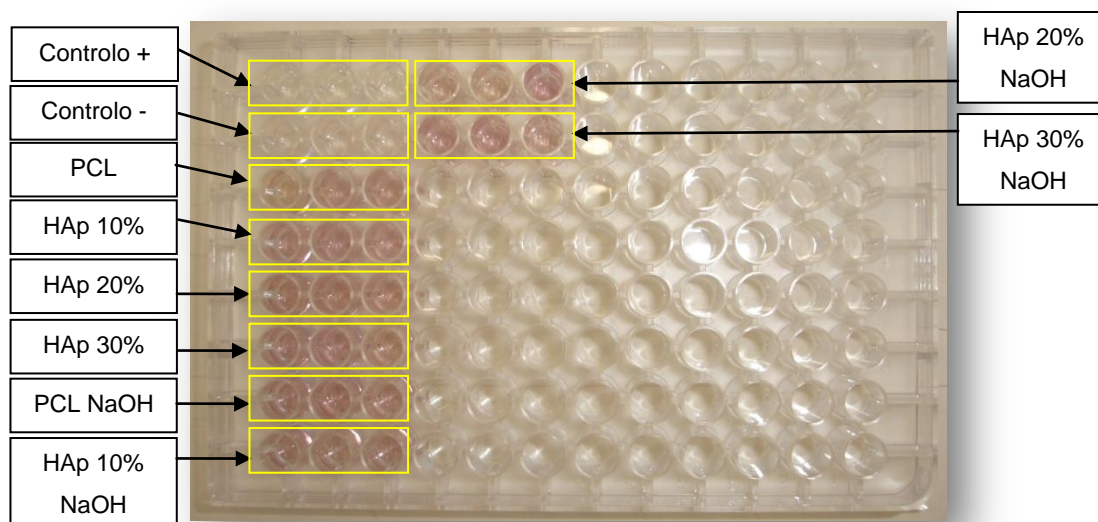


Figura 3.21 – Caixa de 96 poços com as soluções contendo os sais de formazan dissolvidos para a leitura óptica.

Tomando como referência os valores de controlo negativo e considerando o seu valor médio como valor máximo de viabilidade celular (100%), calculou-se a viabilidade celular relativa de cada tipo de membrana. As tabelas 3.9 e 3.10 apresentam os resultados obtidos.

Tabela 3.9 – Densidade Óptica e viabilidade celular relativa das membranas sem tratamento.

Densidade Óptica						
	Controlo -	Controlo +	PCL	HAp 10%	HAp 20%	HAp 30%
<b>Réplica 1</b>	0,115	0,088	0,202	0,231	0,258	0,240
<b>Réplica 2</b>	0,122	0,084	0,222	0,249	0,252	0,239
<b>Réplica 3</b>	0,197	0,056	0,220	0,207	0,215	0,210
<b>Média</b>	0,145	0,076	0,215	0,229	0,242	0,230
<b>Desvio Padrão</b>	0,045	0,017	0,011	0,021	0,023	0,017
<b>Viabilidade celular média %</b>	100%	53%	148%	158%	167%	159%

Tabela 3.10 - Densidade Óptica e viabilidade celular relativa das membranas com tratamento químico com NaOH.

Densidade Óptica						
	Controlo -	Controlo +	PCL NaOH	HAp 10% NaOH	HAp 20% NaOH	HAp 30% NaOH
<b>Réplica 1</b>	0,115	0,088	0,233	0,229	0,157	0,234
<b>Réplica 2</b>	0,122	0,084	0,246	0,194	0,140	0,230
<b>Réplica 3</b>	0,197	0,056	0,208	0,222	0,227	0,166
<b>Média</b>	0,145	0,076	0,229	0,215	0,175	0,210
<b>Desvio Padrão</b>	0,045	0,017	0,019	0,019	0,046	0,038
<b>Viabilidade celular média %</b>	100%	53%	158%	149%	121%	145%

Analisando então os valores de densidade óptica das membranas produzidas, pode concluir-se que os *scaffolds* construídos apresentam uma taxa de viabilidade elevada, promovendo o crescimento e a proliferação celular.

Os valores apresentados encontram-se mesmo assim subvalorizados pois a dissolução numa solução de HCl e isopropanol dos sais de formazan contidos nas membranas, não foi conseguida de forma completa, pois como demonstra a figura 3.20 ainda ficaram muitos cristais de formazan nas membranas.

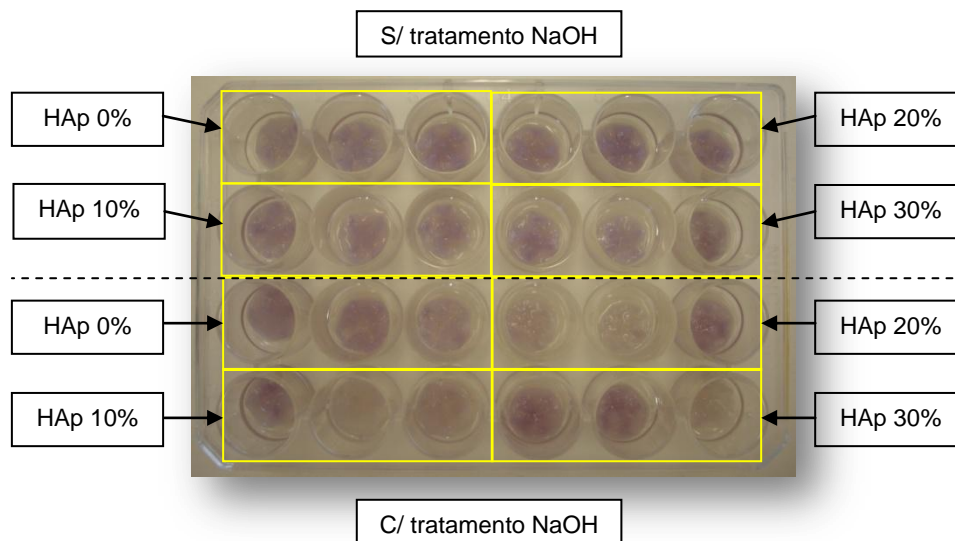


Figura 3.22 – Restos de sais de formazan presentes nas membranas após a dissolução em HCL e Isopropanol.

Em termos de adesão celular, como se pode observar pelas figuras 3.23 e 3.24, as membranas permitiram a adesão das células. Após 24 h de cultura, as células apresentam uma morfologia alongada e são visíveis múltiplos processos celulares o que evidencia uma boa adesão às fibras das membranas compostas.

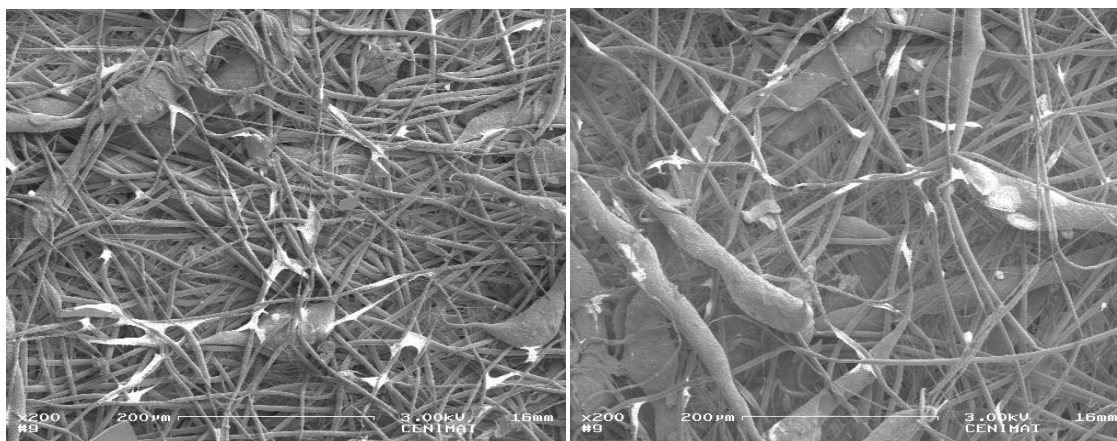


Figura 3.23 – Imagens SEM da adesão celular das membranas compostas HAp 10% após 24 horas em meio de cultura, ampliação 200x.

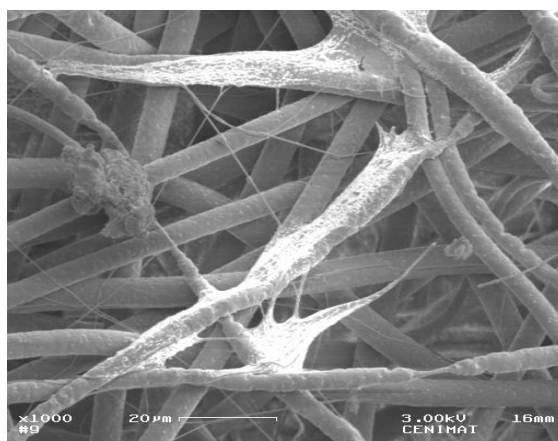


Figura 3.24 – Imagem SEM da adesão celular das membranas compostas HAp 10%, evidenciando processos celulares entre a célula e a superfície da fibra, ampliação 1000x.

## 4 Conclusões e Perspectivas Futuras

O tema da presente dissertação, Membranas Compósitas de Policaprolactona/Hidroxiapatite para Aplicação Estomatológica, insere-se na área dos Biomateriais e na Engenharia de Tecidos. Teve com principal objectivo a produção de uma membrana oclusiva através do método de electrofiação, com propriedade osteocondutoras, para a regeneração do tecido periodontal lesado devido à doença periodontal.

Neste contexto, a criação de uma membrana de fibras à base de policaprolactona e hidroxiapatite permite concluir que foi realizada com sucesso a primeira etapa de desenvolvimento de uma membrana oclusiva para aplicação estomatológica.

Durante o presente trabalho foi detectada alguma dificuldade em produzir membranas com uma boa dispersão da HAp e com as propriedades físicas desejadas, a partir de uma única solução compósita de PCL/HAp. A solução encontrada foi um bombeamento de solução duplo, onde se utilizou uma solução apenas de PCL combinada com uma solução compósita PCL/HAp, para garantir a estabilidade da membrana devido às propriedades elastoméricas do PCL.

Através da técnica de electrofiação, foi possível produzir membranas compósitas de forma relativamente simples e rápida. Com o objectivo de caracterizar morfologicamente e mecanicamente as membranas compósitas, foram produzidas membranas de PCL com a incorporação de diferentes percentagens de HAp: 0%, 10%, 20% e 30%.

Após a obtenção das membranas foi utilizado um processo químico de tratamento de superfície para tornar as membranas hidrofílicas, o que lhes permite uma melhor interacção, adesão e proliferação celular. O método que se revelou mais eficaz e que permitia um tratamento mais homogéneo, necessita que aquando da imersão da membrana na solução, o recipiente que as contem, seja colocado num excicador associado a uma bomba de vácuo para retirar o ar aprisionado no interior dos poros da membrana, e que este seja substituído pela solução de NaOH.

As membranas obtidas apresentam todas uma elevada porosidade, 84%, não havendo nenhuma relação entre a percentagem de HAp na membrana e a sua porosidade.

Através dos ensaios de tracção e após a análise das propriedades mecânicas foi possível observar que a incorporação do biocerâmico na constituição da membrana induz uma diminuição das suas propriedades mecânicas. Além disso foi possível concluir que os pós tratamentos utilizados, tanto o tratamento químico com o NaOH como o processo de esterilização, não afectam as propriedades mecânicas da membrana.

A medição do ângulo de contacto e as imagens SEM permitiram concluir que as partículas de HAp estão encapsuladas no polímero, uma vez que o ângulo de contacto não apresenta diferenças significativas entre os diferentes tipos de membrana. A medição do ângulo de contacto permitiu ainda concluir que o tratamento químico com NaOH é extremamente eficaz na hidrofilição das membranas, uma vez que estas passaram de um ângulo de contacto na ordem dos 130° para 0°.

Os testes de degradação revelaram que as membranas apresentam uma taxa de degradação adequada ao tipo de aplicação desejada, pois não sofreram degradação aparente durante o período de 4 semanas num ambiente que mimetiza o ambiente da boca (condição 3). Apenas foi verificada degradação nas membranas compósitas na condição ácida (condição 1) pois a HAp dissolve-se em meio ácido. A taxa de degradação não é, aparentemente, alterada com o processo de esterilização.

Os testes de bioactividade revelaram que a introdução do biocerâmico na composição das membranas favorece claramente a formação de apatites na superfície das fibras, tendo possivelmente funcionado como semente para a nucleação e formação das apatites.

Os testes de citotoxicidade das membranas realizados com osteoblastos mostraram uma elevada viabilidade celular relativa, sendo esta superior em todos os tipos de membrana relativamente ao controlo. Isto indica que as membranas não apresentam toxicidade. Além disso indica também que o método de esterilização utilizado se revelou eficaz na medida em que não modificou o material tornando-o citotóxico. Para além disso as membranas revelaram apresentar uma boa adesão celular na sua superfície.

Um melhoramento possível será o desenvolvimento de um sistema mecânico de bombeamento que permita obter uma dispersão mais homogénea das soluções fiadas.

A realização de testes de degradação mais completos serão importantes para uma melhor compreensão da taxa de degradação da membrana, nomeadamente testes com um maior período de duração e diferentes tipos de ambientes enzimáticos. A realização de testes *in vivo* será também fundamental para aferir o comportamento e o desempenho da membrana colocada num organismo, uma vez que *in vivo* a taxa de degradação é superior.

Quanto a futuros testes biológicos com células dever-se-ia dar seguimento ao teste de citotoxicidade, através de testes de proliferação celular para confirmar os bons resultados obtidos no teste de citotoxicidade.

Um dos possíveis desenvolvimentos futuros será a produção de uma membrana compósita de 3 camadas, sendo constituída por uma camada interior semelhante à membrana desenvolvida neste trabalho, que permite uma regeneração óssea mais rápida, uma camada intermédia constituída apenas por fibras de PCL, de ligação entre as duas camadas externas e de garantia da oclusividade da membrana, e uma camada exterior que na sua constituição em vez de um biocerâmico deveria possuir um agente anti-bacteriano, como o polímero quitosano, que permita combater possíveis infecções.



## 5 Bibliografia

1. Almeida, R.F., et al., *Associação entre doença periodontal e patologias sistémicas*. Rev Port Clin Geral, 2006. **22**: p. 379-390.
2. Chen, F.M., et al., *A review on endogenous regenerative technology in periodontal regenerative medicine*. Biomaterials, 2010. **31**(31): p. 7892-927.
3. Armitage, G.C., *Development of a classification system for periodontal diseases and conditions*. Ann Periodontol, 1999. **4**(1): p. 1-6.
4. Periodontology, A.A.o. *Types of Gum Disease*. 2011; Available from: <http://www.perio.org/consumer/2a.html>.
5. Chen, F.M. and Y. Jin, *Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities*. Tissue Engineering: Part B, 2010. **16**(2): p. 219-55.
6. Yang, F., et al., *Development of an electrospun nano-apatite/PCL composite membrane for GTR/GBR application*. Acta Biomaterialia, 2009. **5**(9): p. 3295-304.
7. Alpar, B., et al., *Compatibility of resorbable and nonresorbable guided tissue regeneration membranes in cultures of primary human periodontal ligament fibroblasts and human osteoblast-like cells*. Clinical Oral Investigations, 2000. **4**(4): p. 219-225.
8. Kasaj, A., et al., *In vitro evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration*. Head & Face Medicine, 2008. **4**(1): p. 22-29.
9. Wang, H.L., M. Miyauchi, and T. Takata, *Initial attachment of osteoblasts to various guided bone regeneration membranes: an in vitro study*. Journal of Periodontal Research, 2002. **37**(5): p. 340-4.
10. Polimeni, G., et al., *Histopathological observations of a polylactic acid-based device intended for guided bone/tissue regeneration*. Clinical Implant Dentistry and Related Research, 2008. **10**(2): p. 99-105.
11. Bottino, M.C., V. Thomas, and G.M. Janowski, *A novel spatially designed and functionally graded electrospun membrane for periodontal regeneration*. Acta Biomaterialia, 2010. **7**(1): p. 216-24.
12. Jandt, K.D., *Evolutions, Revolutions and Trends in Biomaterials Science – A Perspective*. Advanced Engineering Materials, 2007. **9**(12): p. 1035-50.
13. Ramakrishna, S., et al., *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*. 1 ed. 2005, Singapore: World Scientific.
14. Cipitria, A., et al., *Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds - a review*. Journal of Materials Chemistry, 2011. **21**(26): p. 9419-53.
15. Gomes, S., et al., *Electrospinning poly( $\epsilon$ -caprolactone) from acetic acid solutions for tissues engineering applications - Trabalho não publicado*. 2010, Faculty of Science and Technology, New University of Lisbon: Almada.
16. Shueren, L.V., et al., *An alternative solvent system for the steady state electrospinning of polycaprolactone*. European Polymer Journal, 2011. **47**(6): p. 1256-63.
17. Henriques, C., et al., *A Systematic Study of Solution and Processing Parameters on Nanofiber Morphology Using a New Electrospinning Apparatus*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2009. **9**(6): p. 3535-45.
18. Theron, S.A., E. Zussman, and A.L. Yarin, *Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polymer solutions*. Polymer, 2004. **45**(6): p. 2017-30.
19. Doshi, J. and D.H. Reneker, *Electrospinning Process and Applications of Electrospun Fibers*. Journal of Electrostatics, 1995. **35**(2-3): p. 151-60.

20. Reneker, D.H. and I. Chun, *Nanometre diameters of polymer, produced by electrospinning*. Nanotechnology, 1996. **7**(3): p. 216-23.
21. Bhardwaj, N. and S.C. Kundu, *Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique*. Biotechnology Advances, 2010. **28**(3): p. 325-47.
22. Fong, H. and D.H. Reneker, *Electrospinning and the Formation of Nanofibers, in Structure formation in polymeric fibers*, D.R. Salem, Editor. 2001, Hanser: Munich. p. 225-46.
23. Patanaik, A., V. Jacobs, and R.D. Anandjiwala, *Experimental study and modeling of the electrospinning process*, in *86th Textile Institute World Conference*. 2008: Hong Kong. p. 1160-68.
24. Burger, C., B.S. Hsiao, and B. Chu, *Nanofibrous Materials and their Applications*. Annual Review of Materials Research, 2006. **36**(1): p. 333-68.
25. Wong, S.C., A. Baji, and S. Leng, *Effect of fiber diameter on tensile properties of electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone)*. Polymer, 2008. **49**(21): p. 4713-22.
26. Reneker, D.H., et al., *Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning*. Journal of Applied Physics, 2000. **87**(9): p. 4531-47.
27. Fong, H., I. Chun, and D.H. Reneker, *Beaded nanofibers formed during electrospinning*. Polymer, 1999. **40**(16): p. 4585-92.
28. Kanafchian, M., M. Valizadeh, and A.K. Haghi, *Electrospun nanofibers with application in nanocomposites*. Korean Journal of Chemical Engineering, 2011. **28**(2): p. 428-39.
29. João, C.F.C., *Produção de Microfibras Compósitas de Quitosano e Hidroxiapatite pela Técnica de Fiação Úmida - Tese de Mestrado*, in *Physics and Materials Department*. 2010, Faculty of Science and Technology, New University of Lisbon: Almada.
30. Jalota, S., S.B. Bhaduri, and A.C. Tas, *Using a synthetic body fluid (SBF) solution of 27 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> to make bone substitutes more osteointegrative*. Material Science and Engineering C, 2008. **28**(1): p. 129-40.
31. Wan, H., et al., *The cytotoxicity evaluation of Kevlar and silicon carbide by MTT assay*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1994. **5**(6-7): p. 441-45.
32. Liu, Y. and M.G. Nair, *An Efficient and Economical MTT Assay for Determining the Antioxidant Activity of Plant Natural Product Extracts and Pure Compounds* Journal of Natural Products, 2010. **73**(7): p. 1193-95.
33. Di Foggia, M., et al., *Effects of sterilisation by high-energy radiation on biomedical poly( $\epsilon$ -caprolactone)/hydroxyapatite composites*. Journal of Materials Science. Materials in Medicine, 2010. **21**(6): p. 1789-97.
34. Cottam, E., et al., *Effect of sterilisation by gamma irradiation on the ability of polycaprolactone (PCL) to act as a scaffold material*. Medical Engineering & Physics, 2009. **31**: p. 221-226.
35. Fujihara, K., M. Kotaki, and S. Ramakrishna, *Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers*. Biomaterials, 2005. **26**(19): p. 4139-47.
36. Del Gaudio, C., et al., *Structural characterization and cell response evaluation of electrospun PCL membranes: Micrometric versus submicrometric fibers*. Journal of Biomedical Materials Research. Part A, 2008. **89**(4): p. 1028-39.
37. Ghasemi-Mobarakeh, L., et al., *Bio-functionalized PCL nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering*. Materials Science and Engineering: C, 2010. **30**(8): p. 1129-36.
38. Chen, F., C.N. Lee, and S.H. Teoh, *Nanofibrous modification on ultra-thin poly( $\epsilon$ -caprolactone) membrane via electrospinning*. Materials Science and Engineering: C, 2007. **27**(2): p. 325-32.
39. Lam, C.X., et al., *Dynamics of in vitro polymer degradation of polycaprolactone-based scaffolds: accelerated versus simulated physiological condition*. Biomedical Materials, 2008. **3**(3): p. 034108.

40. Dellinger, J.G., A.M. Wojtowicz, and R.D. Jamison, *Effects of degradation and porosity on the load bearing properties of model hydroxyapatite bone scaffolds*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2006. **77**(3): p. 563-71.
41. Margolis, H.C. and E.C. Moreno, *Kinetics of hydroxyapatite dissolution in acetic, lactic, and phosphoric acid solutions*. Calcified Tissue International, 1992. **50**(2): p. 137-43.
42. Kanjwal, M.A., et al., *Fabrication of Poly(caprolactone) Nanofibers Containing Hydroxyapatite Nanoparticles and Their Mineralization in a Simulated Body Fluid*. Fibers and Polymers, 2011. **12**(1): p. 50-6.



## **Anexos**

### **A. Testes de Biodegradação**

#### **Especificações de reagentes**

- 1 - Acetato de sódio anidro: Sigma-Aldrich, Lotell 059k0049
- 2 - Pastilhas - “Buffer tablets pH 7,2 for microscopy” Merck
- 3 - Azida de sódio: HIMedia, Lote 3-1625
- 4 - Acetilcolinesterase Sigma, Ref: C2888

#### **Preparação de soluções**

- 1 - Tampão ácido acético/acetato de sódio pH 3,74

A solução tampão foi feita, por mistura de duas soluções:

Solução A - 0,5 M de ácido acético, feita por diluição de uma solução 1M de ácido acético.

Solução B – 0,1 M de acetato de sódio feita por pesagem.

A solução tampão foi suplementada com 0,04% (m/v) de azida de sódio para impedir o crescimento bacteriano.

- 2 - Tampão de fosfato pH 7,2

A solução foi feita dissolvendo num litro de água uma pastilha cuja composição é 0,63 g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e 0,31 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

A solução tampão foi suplementada com 0,04% (m/v) de azida de sódio para impedir o crescimento bacteriano.

- 3 - Solução enzimática: Acetilcolinesterase 1U/mL em Tampão de fosfato pH 7,2

A solução de acetilcolinesterase foi preparada, de acordo com as especificações do fabricante, dissolvendo o liofilizado em 1 litro de solução tampão pH 7,2 de modo a obter-se a actividade enzimática de 1 U/mL de solução.

A solução foi suplementada com 0,04% (m/v) de azida de sódio para impedir o crescimento bacteriano.



## B. Procedimento dos Teste de Citotoxicidade e de Adesão Celular

1. Observou-se ao microscópio óptico invertido a monocamada celular de osteoblastos, previamente preparada;
2. Removeu-se o meio de cultura do frasco que continha os osteoblastos e lavou-se a monocamada celular com 5 ml de PBS;
3. Adicionou-se 3 ml de tripsina a 0,25% (w/v) em EDTA para hidrolisar as proteínas dos osteoblastos responsáveis pela sua aderência à parede do frasco;
4. O recipiente contendo as células foi posteriormente colocado a incubar durante 5 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>;
5. Após retirar as células da estufa adicionaram-se 2 ml de meio completo para inactivar a tripsina;
6. Posteriormente transferiu-se a solução para falcons, que foram a centrifugar durante 8 minutos a 1500 rpm;
7. Rejeitou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em 1 ml de meio completo para a contagem das células;

### Contagem Celular

8. Da suspensão devidamente homogeneizada retirou-se 10 µl de suspensão celular e 20 adicionaram-se 20 µl de azul tripano (corante de exclusão: entra nas células não viáveis-permeabilizáveis);
9. Pipetou-se uma amostra para a câmara de contagem, o hematocitómetro, após a devida montagem da lamela;
10. De seguida procedeu-se à contagem do número de células viáveis e inviáveis presentes no campo de contagem, recorrendo a um microscópio óptico invertido;
11. Após a contagem calculou-se a concentração de células viáveis presentes na suspensão celular, através da equação:

$$C = n \times 10^4 \times dil$$

em que  $C$  (concentração) representa o número de células existentes em 1 ml de suspensão celular,  $n$  a média do número de células viáveis observado por campo da câmara de contagem, e  $dil$  o factor de diluição (neste trabalho o  $dil$  foi de 3);

12. Dilui-se a suspensão celular com meio completo para obter  $6 \times 10^4$  células/ml. A 1,65 ml da suspensão celular adicionaram-se 52,35 ml de meio de cultura completo. Para os testes de citotoxicidade utilizaram-se 30 ml (3 ml para o controlo, 3 ml para o controlo positivo, e os restantes 24 ml para distribuir pelas 3 réplicas de cada tipo de

membrana) e para a adesão celular 24 ml (apenas colocados nas réplicas de cada tipo de membrana);

13. Posteriormente pipetou-se 1 ml da suspensão celular para cada poço, já com as membranas previamente colocadas;
14. No controlo positivo foram adicionados 500 µl de etanol, para que a viabilidade celular seja nula;
15. As placas foram colocadas numa estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

### **Método MTT por contacto directo (Teste de Citotoxicidade)**

16. Retirou-se o meio dos poços e lavou-se a monocamada com PBS;
17. Adicionou-se 500 µl de MTT em PBS a cada poço;
18. Incobaram-se as amostras a 37°C durante 2 horas;
19. Retirou-se a solução de MTT e resuspenderam-se os sais com 1 ml de HCL em isopropanol;
20. Após a dissolução dos sais procedeu-se à leitura da densidade óptica no leitor de placas a 595 nm;
21. Por fim calculou-se a % viabilidade celular relativa;

### **Adesão Celular**

22. Retirou-se o meio dos poços e lavou-se a monocamada com PBS;
23. De seguida fixaram-se as células com Gluteraldaído a 2,5% em PBS durante 24 horas;
24. Lavaram-se os poços com PSB;
25. Desidrataram-se as células com soluções de Etanol a 70%, 80%, 90% e 100%, por períodos de 10 minutos excepto a última solução que foi mantida nos poços até à sua completa evaporação;
26. Após a secagem levaram-se as amostras ao SEM.

### **C. Procedimento usado na Determinação da densidade da HAp**

1. Pesar o balão volumétrico ( $M_1$ ), numa balança com uma resolução de 0,001g
2. Colocar 5 g do biocerâmico no balão volumétrico, e posteriormente pesar o balão volumétrico ( $M_2$ ).
3. Adicionar água destilada, apenas até cobrir o biocerâmico. Agitar suavemente para misturar o biocerâmico com a água.
4. Colocar o balão volumétrico num excicador.
5. Operando a bomba de vácuo reduzir a pressão gradualmente, ate cerca de 25 mm de mercúrio.
6. Manter o balão volumétrico no excicador até se deixar de observar movimento de ar – bolhas de ar que abandonam o espaço entre partículas de hidroxiapatite.
7. Desligar o vácuo, retirar o balão do excicador e preencher o volume restante com água destilada.
8. Pesar o balão volumétrico cheio com o biocerâmico e com água ( $M_3$ ).
9. Esvaziar, lavar e secar bem o balão volumétrico.
10. Encher o balão volumétrico com água destilada, e posteriormente pesar a sua massa ( $M_4$ ).