

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Escola de Engenharia

Programa de Pós-graduação de Engenharia de Minas, Metalúrgica e de
Materiais

PPGE3M

**FABRICAÇÃO DE ARCABOUÇO COMPÓSITO NANO E MICRO
ESTRUTURADOS DE HIDROXIAPATITA E POLI(HIDROXIBUTIRATO):
CARACTERIZAÇÃO MICROESTRUTURAL E ANÁLISE DE
BIOCOMPATIBILIDADE**

Christian Viezzer

Tese para obtenção do título em Engenharia

Porto Alegre

2013

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**FABRICAÇÃO DE ARCABOUÇO COMPÓSITO NANO E MICRO
ESTRUTURADOS DE HIDROXIAPATITA E POLI(HIDROXIBUTIRATO):
CARACTERIZAÇÃO MICROESTRUTURAL E ANÁLISE DE
BIOCOMPATIBILIDADE**

CHRISTIAN VIEZZER

Mestre em Engenharia

Proposta de tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais – PPGE3M, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutorado em Engenharia.

Área de concentração: Ciências e Tecnologia dos Materiais.

Porto Alegre

2013

Esta tese foi julgada para a obtenção do título de Doutor em Engenharia, na área de concentração de Ciências e Tecnologia dos Materiais e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e pela banca examinadora do Curso de Pós-Graduação.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Pérez Bergmann

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Madalena de Camargo Forte

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a Dra Denise Cantarelli Machado – Faculdade de Medicina – PUCRS

Prof^a Dr Fabrício Mezzomo Colares – Faculdade de Odontologia – UFRGS

Prof^a Dra Annelise Kopp Alves – Escola de Engenharia – UFRGS

Coordenador do PPGE3M:

Prof. Dr. Telmo R. Strohaecker

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a todas aquelas pessoas que, direta ou indiretamente, ajudaram a tornar possível a realização deste trabalho, em especial:

Ao Prof. Dr: Carlos Pérez Bergmann, à amizade, por todo apoio, conhecimento, credibilidade e por orientação deste trabalho;

À Prof. Dra. Maria Madela de Camargo Forte, pela coorientação, à amizade, disponibilidade e ajuda imprescindível para a realização deste trabalho.

Aos colegas e bolsistas do Laboratório de Materiais Cerâmicos e do Laboratório de Polímeros desta Universidade pelo auxílio, conhecimento, amizade e momentos de descontração durante esses anos.

Ao Diretor do Instituto de Pesquisas Biomédica – PUCRS, Paulo M.C Pitrez por dispor da utilização dos laboratórios.

Ao Tiago Giuliani Lopes do laboratório de Patologia – HSL/PUCRS

Aos professores, colegas e funcionários do PPGE3M, pelo conhecimento e o auxílio nas tarefas desenvolvidas durante o curso.

À CAPES, pela provisão da bolsa PDEE.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

Por fim, à minha família pelo apoio incondicional ao meu aperfeiçoamento. Em especial à Thamires Barreto Ferreira, por todo o amor, dedicação, apoio e compreensão.

RESUMO

As interações célula-célula e célula-material são identificadas como fatores-chave para o controle da diferenciação celular e produção da matriz extracelular (MEC). As células-tronco, tanto *in vivo* como *in vitro*, respondem aos sinais biológicos que estas recebem do microambiente circundante. Em resposta a estes estímulos, as células podem secretar diversos fatores para modular o microambiente e ativar células progenitoras. Esta indução leva ao aumento da expressão de proteínas da MEC que estão associadas com a adesão e proliferação celular, bem como com a mineralização da matriz. A partir da hipótese de que nanoestruturas influenciam na sinalização das células-tronco, buscou-se a fabricação de um arcabouço de poli(hidroxibutirato) com incorporação de hidroxiapatita (HAp) para mimetizar a matriz extracelular óssea. Usando a técnica de eletrofiação, foi possível a fabricação de arcabouços micro e nanoestruturados. A caracterização estrutural destes arcabouços e a avaliação de viabilidade, adesão e proliferação celular demonstraram que os arcabouços apresentam biocompatibilidade. Os resultados indicaram que os arcabouços contendo HAp produziram uma matriz mineralizada, indicativo de diferenciação das células-tronco mesenquimais em linhagem osteogênica. Assim sendo, os arcabouços demonstram ter uma aplicabilidade na regeneração óssea em locais que não são sujeitos a tensões excessivas.

Palavras chaves: Engenharia tecidual óssea, nanoestruturas, hidroxiapatita, PHB, células-tronco, matriz mineralizada.

ABSTRACT

The cell-cell and material-cell interactions are identified as key factors to cellular differentiation control and extracellular matrix production (ECM). The stem cells, *in vivo* and *in vitro*, respond to biological signals received by microenvironment surrounding. Through this stimulation cells can secrete many factors to modulate the microenvironment and activate progenitor cells. This induction enhance the ECM proteins expression that are associated to cellular adhesion and proliferation as well as matrix mineralization. Based on hypothesis that nanostructures influence on stem cell signalization, was sought the scaffold fabrication of poly(hydroxybutirate) with hydroxyapatite (HAp) incorporation to mimic a bone extracellular matrix. Through eletrospinning technique was possible fabricate micro and nanostructured scaffolds. The structural scaffolds characterization and viability, adhesion and cellular proliferation evaluation, demonstrated that scaffolds exhibit biocompatibility. Results showed that scaffold containing HAp produced a mineralized matrix indicating a potential mesenquimal stem cells differentiation in osteogenic lineage. In this pathway, scaffolds demonstrated have bone regeneration applicability in sites wich do not receive excessive loads.

Key-words: bone tissue engineering, nanostructures, hydroxyapatite, PHB, stem cell, mineralized matrix.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Número de publicações nos últimos anos referente a arcabouços e células-tronco para a regeneração óssea (<i>Science Direct: acessado em dez/13</i>). ...	16
Figura 1.2. Número de publicações nos últimos dez anos referentes a arcabouços ósseos fabricados com hidroxiapatita e PHB (<i>Science Direct: acessado em dez/13</i>). A utilização do (*) na palavra <i>electrospun</i> foi utilizado para a busca de ambas palavras <i>electrospinning</i> e <i>electrospun</i>	17
Figura 4.1. Exemplo da concepção de Engenharia Tecidual que envolve células e biomateriais na forma de arcabouços. Em a) Isolamento das células, b) Expansão em 2D; c) Cultura em arcabouço poroso 3D, d) Organização tecidual, e) Implantação do tecido engenheirado. Fonte: DVIR (2010).	22
Figura 4.2. Meio circundante que regulam as atividades celulares através da matriz extracelular (adaptado de ALBERTS, 2004).	25
Figura. 4.3. Estrutura do osso humano: da macroestrutura à nanoestrutura (adaptado de SADAT-SHOJAI, 2013).	28
Figura. 4.4. Célula unitária da hidroxiapatita no grupo espacial $P6_3/m$ (MOSTAFA, 2007).	31
Figura 4.5. Estrutura da molécula de PHB.	32
Figura 4.6. Desenho esquemático do equipamento de eletrofiação (adaptado de LIN, 2010).	35
Figura 5.1. Fluxograma da fabricação, caracterização e avaliação da biocompatibilidade dos arcabouços.	39
Figura 6.1. a) Difratoograma da hidroxiapatita, b) comparação da hidroxiapatita utilizada com a ficha 09-0432 da JPCDS.	50
Figura 6.2. Distribuição de tamanho das partículas de HA utilizadas: a) na fabricação dos arcabouços microestruturados; e b) sobrenadante em solução para obtenção de fibras nanoestruturadas.	51
Figura 6.3. Imagem dos arcabouços. A seta branca indica uma fração da membrana eletrofiadas. A seta preta indica os arcabouços utilizados na caracterização dos arcabouços: (a) PHB, (b) C1 e (c) C2.	54
Figura 6.4. Imagens obtidas por microscopia eletrônica da fibra C1. a-b) morfologia das fibras c) disposição da nanotextura ao longo das fibras, d) Espectro de EDS do arcabouço-e-f) distribuição do diâmetro das fibras e das nanoestruturas (e).....	56
Figura 6.5. Imagens obtidas por microscopia eletrônica da fibra C1. a-b) morfologia das fibras c) disposição da nanotextura ao longo das fibras, d) Espectro de EDS do arcabouço-e-f) distribuição do diâmetro das fibras e das nanoestruturas (e).....	57
Figura 6.6. Imagens obtidas por microscopia eletrônica da fibra C2. a-b) morfologia das fibras c) disposição da nanoestrutura ao longo das fibras, d) Espectro de EDS do arcabouço-e-f) distribuição do diâmetro das fibras e das nanoestruturas (e).....	58

Figura 6.7. Distribuição dos diâmetros das micro e nanoestruturas das fibras de PHB, C1 e C2: a) diâmetro das fibras, b) diâmetro das nanoestruturas e c) diâmetro da microestrutura do C1. Os quadrados dentro dos boxes são referentes à média e a linha referente à mediana.....	59
Figura 6.8. Espectro Raman da hidroxiapatita apresentando as bandas referentes aos grupos fosfatos. δ : deformação, ν : estiramento, s: simétrico, as: assimétrico....	63
Figura 6.9. Espectro Raman dos arcabouços demonstrando as bandas referentes aos grupos da hidroxiapatita e do polímero PHB. Em azul arcabouço de PHB, em preto arcabouço C1 e em vermelho arcabouço C2. δ : deformação, ν : estiramento, s: simétrico, as: assimétrico.	64
Figura 6.10. Curva ATG de perda de massa em relação à temperatura dos arcabouços em atmosfera de ar sintético.....	65
Figura 6.11. Curva da análise dinâmico-mecânica do arcabouço PHB:.....	66
Figura 6.12. Curva da análise dinâmico-mecânica do arcabouço C1: módulo de armazenamento e módulo de perda em função da temperatura.....	67
Figura 6.13. Curva da análise dinâmico-mecânica do arcabouço C2: módulo de armazenamento e módulo de perda em função da temperatura.....	67
Figura 6.14. Intereção do íon cálcio com os grupos carbonilas do PHB.	68
Figura 6.15. Histograma apresentando a caracterização imunofenotípica das células-tronco. Em a) CD3; b) CD45; c) CD49b e d) CD90.	69
Figura 6.16. Avaliação da citotoxicidade dos arcabouços.	70
Figura 6.17. Taxa de proliferação celular, densidade óptica em função do tempo de cultivo (* $p < 0,05$; $n=3$).	73
Figura 6.18. Cultura no dia 3 mostrando as células tronco-mesenquimais aderidas nos arcabouços a) PHB; b)C1; c) C2 e d) controle. As células estão coradas com Azul de Toluidina.....	75
Figura 6.19. Cultura no dia 7 mostrando as células tronco-mesenquimais aderidas nos arcabouços a) PHB; b)C1; c) C2 e d) controle. As células estão coradas com Azul de Toluidina.....	75
Figura 6.20. Cultura no dia 14 mostrando as células tronco-mesenquimais aderidas nos arcabouços a) PHB; b)C1; c) C2 e d) controle. As células estão coradas com Azul de Toluidina.....	76
Figura 6.21. Valores de densidade óptica de ALS nos arcabouços investigados em função de tempo, comparados à densidade óptica do osso cortical ($n=3$, $p < 0,05$)..	77
Figura 6.22. Valores de densidade óptica de ALS nos arcabouços investigados em função de tempo comparado entre os grupos (As barras corresponde as diferenças estatísticas entre os grupos).	79
Figura A.1. Imagens obtidas do MEV das fibras de PHB com diferentes fluxo de infusão no processo de eletrofiação. Em a) 1,5 mL/h, b) 3,0 mL/h e c) 2,0 mL/h.....	94
Figura A.2. Imagens obtidas do MEV das fibras de PHB/HA com diferentes fluxo de infusão no processo de eletrofiação. Em a) 3,5 mL/h, b) 4,0 mL/h e c) 2,0 mL/h.....	95

Figura A.3. Imagens obtidas do MEV das fibras de PHB em solução com diferentes concentrações de HA. Em a) 0,1 mg/mL, b) 0,2 mg/mL e c) 0,5 mg/ mL.....96

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Exemplos de biomateriais a base de fosfato de cálcio	30
Tabela 5.1. Materiais utilizados.	40
Tabela 5.2. Parâmetros de eletrofiação utilizados para a produção dos arcabouços.	44
Tabela 6.1 Tamanho médio das partículas de hidroxiapatita.	52
Tabela 6.2. Área superficial e volume e tamanho dos mesoporos.	62
Tabela 6.3. Temperatura de degradação dos arcabouços.....	65
Tabela 6.4. Classificação de citotoxicidade segundo a norma ISO 1099-5.....	70
.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

δ - Deformação

ν - Estiramento

ALP – Fosfatase alcalina

ALS – Vermelho de Alizarina S

ATG – Análise termogravimétrica

AzTol – Azul de Toluidina

BMP – Proteína morfogênica do osso

CD – *Cluster of differentiation*

D_{10} – Diâmetro a 10%

D_{50} – Diâmetro a 50%

D_{90} – Diâmetro a 90%

DMA – Análise dinâmico-mecânica

$D_{médio}$ – Diâmetro médio

DMEM - Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DPBS - Tampão fosfato de Dulbecco

DRX – Difração de raios X

EDS – *Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy*

EDTA - ácido etileno diamino tetra-acético

ERK – Proteína quinase regulada pela sinalização extracelular

FAK - Proteína quinase de adesão foca

FTCI - Isotiocianato de fluoresceína

GTP - *Trifosfato de guanidina*

MAPK – Proteínas quinases ativadas por mitógenos.

MEV – Microscopia Eletrônica de varredura

MTT - (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)

PHBV- Poli(hidroxi butirato-*co*-valerato)

RAMAN – Espectroscopia Raman

Rho – Fator de transcrição Rho

ROCK - Proteína quinase associada a Rho

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	19
3. LIMITAÇÕES DO TRABALHO DE PESQUISA	20
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
4.1. ENGENHARIA TECIDUAL	21
4.2. MATRIZ EXTRACELULAR	24
4.3. TECIDO ÓSSEO	27
4.4. BIOMATERIAIS NA ENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA	29
4.5. COMPÓSITOS ELETROFIADOS NA REGENERAÇÃO ÓSSEA.....	34
4.6. BIOCMPATIBILIDADE	37
5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	39
5.1. MATERIAIS.....	40
5.2. MÉTODOS.....	41
5.2.1. CARACTERIZAÇÃO DA HIDROXIAPATITA	41
5.2.2. FABRICAÇÃO DOS ARCABOUÇOS	42
5.2.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ARCABOUÇOS.....	44
5.2.4. AVALIAÇÃO DA BIOCMPATIBILIDADE	46
5.2-5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
6.1. TESTES PRELIMINARES	50
6.1.1 CRISTALINIDADE DA HAp.....	50
6.1.2 GRANULOMETRIA DA HAp	51
6.1.3. SELEÇÃO DOS ARCABOUÇOS.....	53
6.2. CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS.....	53
6.2.1. MORFOLOGIA DOS ACABOUÇOS.....	53
6.2.2. ÁREA SUPERFICIAL ESPECÍFICA E TAMANHO DE MESOPOROS.....	62
6.2.3. ANÁLISE DE FASES POR ESPECTROSCOPIA RAMAN	63
6.2.4. TEOR DE HIDROXIAPATITA NOS ARCABOUÇOS	64
6.2.5. CARACTERÍSTICAS VISCOELÁSTICA DOS ARCABOUÇOS	66

6.3 FENOTIPAGEM DA POPULAÇÃO DAS CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA	68
6.4. INTERAÇÃO CÉLULA-MATERIAL.....	69
6.4.1. CITOTOXICIDADE	69
6.4.2. ADESÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR	71
6.4.3. MINERALIZAÇÃO DOS ARCABOUÇOS.....	77
7. CONCLUSÕES.....	81
8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	82
REFERÊNCIAS.....	83
ANEXO A.....	94
Arcabouços eletrofiados de PHB.....	94
Arcabouços eletrofiados de PHB/HA	95
Arcabouços eletrofiados: solução de HA	96
ANEXO B	97
Tabela estatística: Proliferação	97
Tabela estatística: Mineralização	101

1. INTRODUÇÃO

O reparo de defeitos ósseos causados por traumas, neoplasias e doenças neonatais ainda é um grande desafio para a Medicina e Odontologia. Os profissionais dessas áreas se deparam muitas vezes com a necessidade de um enxerto para a recuperação das áreas afetadas. Os enxertos ósseos podem ser classificados de acordo com sua origem em autógenos (auto-enxerto), alógenos (proveniente de um doador da mesma espécie) ou aloplásticos (biomateriais).

As partes perdidas são, geralmente, preenchidas com enxerto ósseo autógeno (MURATA, 1999). No entanto, muitas vezes a retirada do enxerto autógeno pode acarretar em uma maior morbidade ao paciente como dor local e infecção, além de prolongar o tempo cirúrgico e elevar os custos do procedimento (MIRANDA, 2005). Por outro lado, os enxertos alógenos provenientes de bancos de tecidos vêm sendo utilizados com sucesso no reparo de perdas ósseas. Entretanto, apresentam algumas limitações como compatibilidade imunológica, transmissão de patógenos e a necessidade de drogas imunossupressoras devido ao risco da rejeição (JIANG, 2005).

Por esses motivos, nos últimos anos diversas pesquisas na área de Engenharia Tecidual vêm sendo realizadas no intuito de desenvolver novos materiais para a substituição e regeneração do tecido ósseo. O objetivo maior é proporcionar uma forma de substituir a utilização de enxertos de osso autógeno e/ou alógeno, através de uma matriz provisional, mimetizando a matriz óssea. Desta forma, espera-se que as células cresçam no material (arcabouço) promovendo a regeneração tecidual.

Diversos trabalhos sobre arcabouços compósitos ou poliméricos de origem natural e sintéticos, bem como métodos de fabricação, são encontrados na literatura. A Figura 1.1 mostra a o número de publicações nos últimos anos referente a arcabouços e células-tronco para a regeneração óssea.

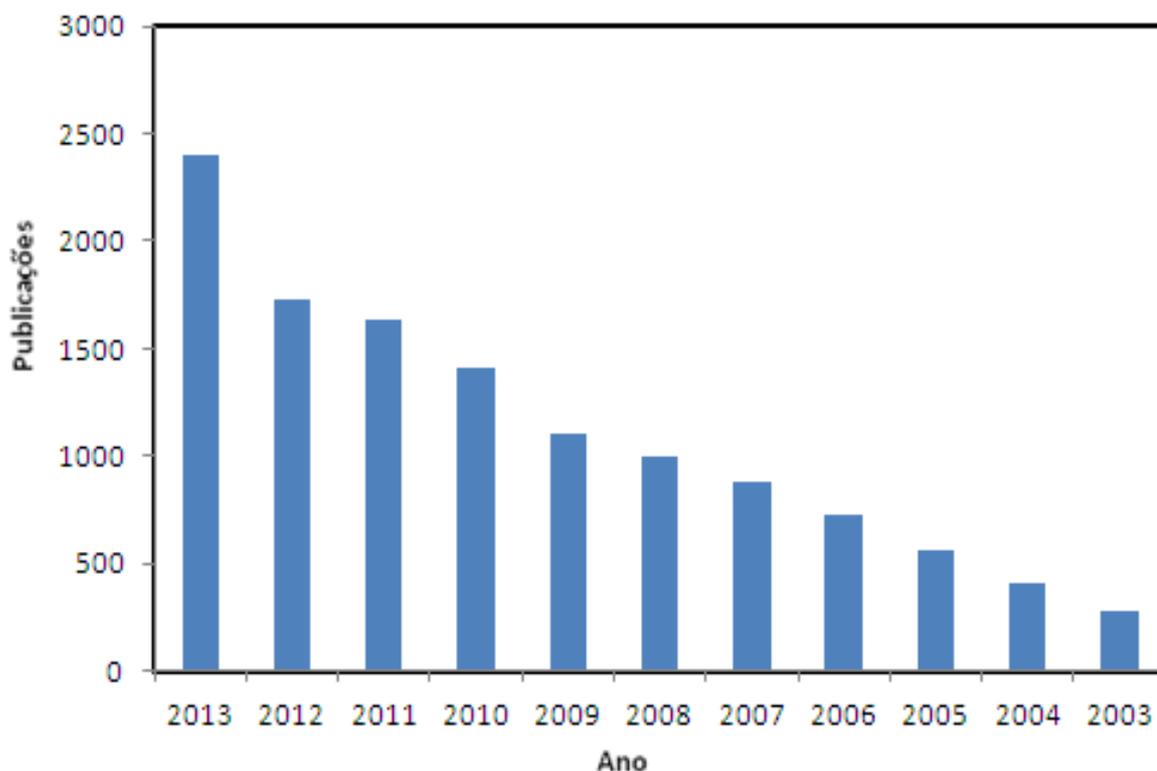


Figura 1.1. Número de publicações nos últimos anos referente a arcabouços e células-tronco para a regeneração óssea (*Science Direct: acessado em dez/13*).

No que tange à hidroxiapatita e ao poli[hidroxibutirato] (PHB), que são composto de interesse nesta Tese, pode-se acompanhar pelo gráfico da Figura 1.2 o crescimento nos últimos dez anos do número de trabalhos publicados versando sobre esses compostos. No entanto, quando se compara a fabricação de arcabouços eletrofiados com a utilização destes materiais, nota-se que existem poucos dados na literatura. Em se tratando da utilização em conjunto com células-tronco, o número de trabalhos é ainda menor. Muitos desses trabalhos contribuíram para o entendimento dos mecanismos envolvidos na diferenciação das células-tronco e as interações célula-material. Há um forte indicativo que *in vitro*, os arcabouços proporcionam uma boa adesão e proliferação das células-troncos e que quando estimulados com fatores químicos, promovem a diferenciação osteogênica produzindo uma matriz mineralizada (WEBSTER, 1999; LIAO, 2004; BRETT, 2004; KIM, 2005; SHIN, 2005; DETSCH, 2008; KIM, 2008; BAO, 2011; SANTOS, 2012).

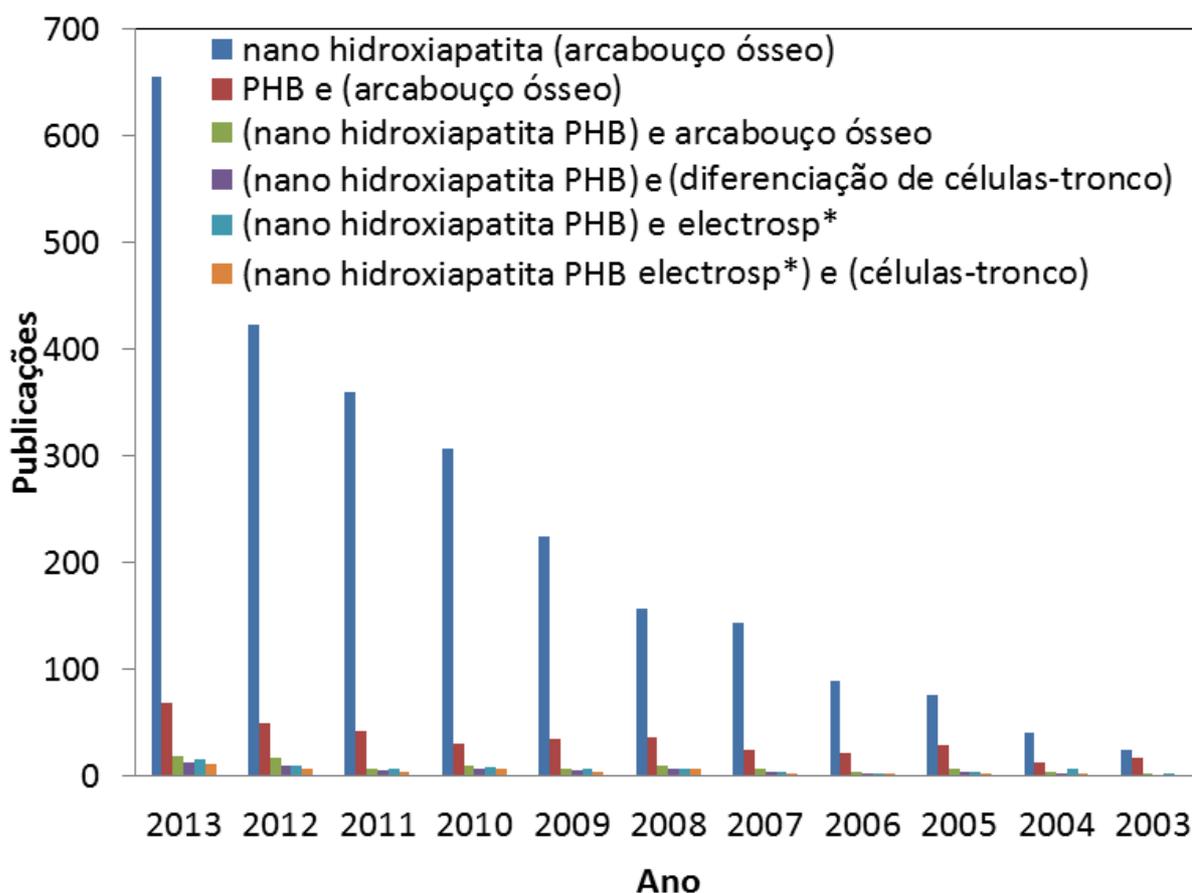


Figura 1.2. Número de publicações nos últimos dez anos referentes a arcabouços ósseos fabricados com hidroxiapatita e PHB (*Science Direct*: acessado em dez/13). A utilização do (*) na palavra electrosp foi utilizado para a busca de ambas palavras *electrospinning* e *electrospun*

As interações célula-célula e célula-material são identificadas como fatores-chave para o controle da diferenciação celular e produção da matriz extracelular [MEC] (OLIVARES-NAVARRETE, 2008; HAMIDOUICHE, 2009). Um dos principais mecanismos envolvidos nas interações célula-MEC ocorre através da associação dos receptores de superfície celular da família das integrinas $\beta 1$ e suas subunidades.

A integrina $\beta 1$ e suas subunidades, quando expressas pelas células, servem de receptores para as moléculas de colágeno, de fibronectina e de laminina (SHAH, 1999). Quando uma dessas está ligada aos domínios extracelulares das integrinas, desencadeiam uma série de sinais intracelulares que promovem a proliferação e diferenciação das células osteoblásticas (CARSON, 2009; LU, 2008).

Deste modo, a indução das células-tronco através desses fatores aumenta a expressão de proteínas da MEC, bem como a expressão de proteínas relacionadas à diferenciação osteogênica, tais como a osteopontina e osteocalcina (proteínas que possuem domínios de ligação ao cálcio) e fosfatase alcalina, que estão associadas à adesão, à proliferação celular e à mineralização da matriz extracelular óssea.

No entanto, existem poucos trabalhos na literatura que versem sobre a diferenciação das células-tronco, ou produção de matriz mineralizada no sentido contrário, ou seja, por intermédio dos arcabouços sem a estimulação de fatores químicos. Logo, faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias que permitam que o material induza a diferenciação nas células-tronco que elevariam a eficiência destes biomateriais.

Nos últimos anos, a Engenharia Tecidual obteve um grande progresso devido ao surgimento da Nanotecnologia. Alguns estudos apontam que o emprego de características nanoestruturadas na superfície dos arcabouços leva a um aumento da regeneração tecidual (BOISSEAU, 2011). A busca da melhoria nas propriedades destes arcabouços, através da Nanotecnologia em conjunto com células-tronco representa uma nova fronteira para a regeneração tecidual óssea.

As células aderem à MEC através das integrinas. A matriz-extracelular óssea é constituída por uma rede de colágeno com nanocristais de hidroxiapatita na qual proteínas não-colágenas e fatores de crescimento estão adsorvidas. Essa complexidade estrutural e organizacional da MEC óssea, no nível das interações célula-célula e célula-MEC, ocorrem em dimensões de alguns micrômetros a nanômetros (ENGEL, 2008).

Na tentativa de melhorar as propriedades de tais arcabouços, supõem-se que ao fornecer sítios nanoestruturado específicos de ligação a células, esses promoveriam a diferenciação celular. Desta forma, para a obtenção de arcabouços que mimetizam a matriz extracelular óssea, é fundamental o entendimento dos parâmetros no processo de fabricação de fibras para os arcabouços, aqui a técnica de eletrospinning (ou *electrospinning*, em inglês), correlacionando suas características microestruturais com a biocompatibilidade com as células-tronco e a produção de uma matriz mineralizada. Neste contexto, se insere este trabalho.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral desta tese foi fabricar um compósito nano/microestruturado de hidroxiapatita e poli(hidroxibutirato) pela técnica de eletrofição para o uso como arcabouço na regeneração óssea, e avaliar a biocompatibilidade *in vitro* deste com células-tronco mesenquimais de rato.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- I. Avaliar a estrutura cristalina e granulometria da hidroxiapatita;
- II. Avaliar o efeito da hidroxiapatita nos arcabouços;
- III. Avaliar a forma de incorporação da hidroxiapatita nos arcabouços;
- IV. Comparar a influência da estrutura dos arcabouços na adesão e proliferação de células-tronco mesenquimais de ratos;
- V. Avaliar o potencial osteoindutor dos arcabouços em células-tronco mesenquimais de rato.

3. LIMITAÇÕES DO TRABALHO DE PESQUISA

Os resultados obtidos neste trabalho de pesquisa foram avaliados levando-se em consideração as seguintes limitações experimentais:

I. No processamento por eletrofiação somente foram avaliadas as variáveis de vazão da solução polimérica. Não foi avaliado o efeito da tensão, temperatura e umidade ambiente;

II. Os ensaios realizados para a caracterização dos diâmetros das fibras possuem erros inerentes às próprias técnicas utilizadas. Os valores obtidos devem preferencialmente ser considerados de forma comparativa, e não em termos absolutos;

III. A análise granulométrica utilizou o modelo matemático Fraunhofer para a determinação do diâmetro das partículas de hidroxiapatita.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. ENGENHARIA TECIDUAL

A Engenharia Tecidual é um campo interdisciplinar que aplica os princípios da Engenharia e Ciências da Vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos de modo que estes restaurem, mantenham ou possam melhorar a função do tecido ou mesmo do órgão por inteiro (LANGER e VACANTI, 1993). Segundo Nichols (2008), a Engenharia Tecidual como alternativa para Medicina Regenerativa tem como função a reconstrução tecidual através de equivalentes de tecidos (arcabouços) para reparar as funções fisiológicas perdidas devido a doenças ou injúrias.

Um dos objetivos da Medicina Regenerativa é atender a essa necessidade com a fabricação e o crescimento celular em arcabouços que possam ser implantados cirurgicamente. Isso evitaria diversos problemas associados com enxertos alógenos e autógenos, que possuem disponibilidade limitada, compatibilidade imunológica, e transmissão de doenças (GENTLEMAN, 2009).

No entanto, a regeneração de um tecido ou órgão através desta técnica envolve processos complexos cuja razão e as formas são afetadas por muitos fatores. Tais fatores podem estar relacionados com o fenótipo da célula, densidade e sua distribuição espacial (CHENG, 2006), e a superfície do biomaterial modula uma série de respostas celulares, tanto *in vitro* como *in vivo* (KESELOWSKY, 2004). Estas respostas incluem adesão, sobrevivência, proliferação e diferenciação na expressão fenotípica (BRODBECK, 2001; ALLEN, 2003).

Deste modo, os biomateriais utilizados como arcabouço devem desempenhar um papel importante, fornecendo um ambiente compatível para o crescimento celular, conduzindo o desenvolvimento do tecido formado, assim como devem interagir e integrar-se com os tecidos circundantes após o implante.

A utilização de células na Engenharia Tecidual compreende biopsia de uma pequena fração do tecido do paciente e sua dissociação em células individuais. Estas células podem ser transplantadas diretamente no paciente ou expandidas *in vitro*, no interior de uma matriz, e em seguida reimplantadas no paciente (Figura 4.1).

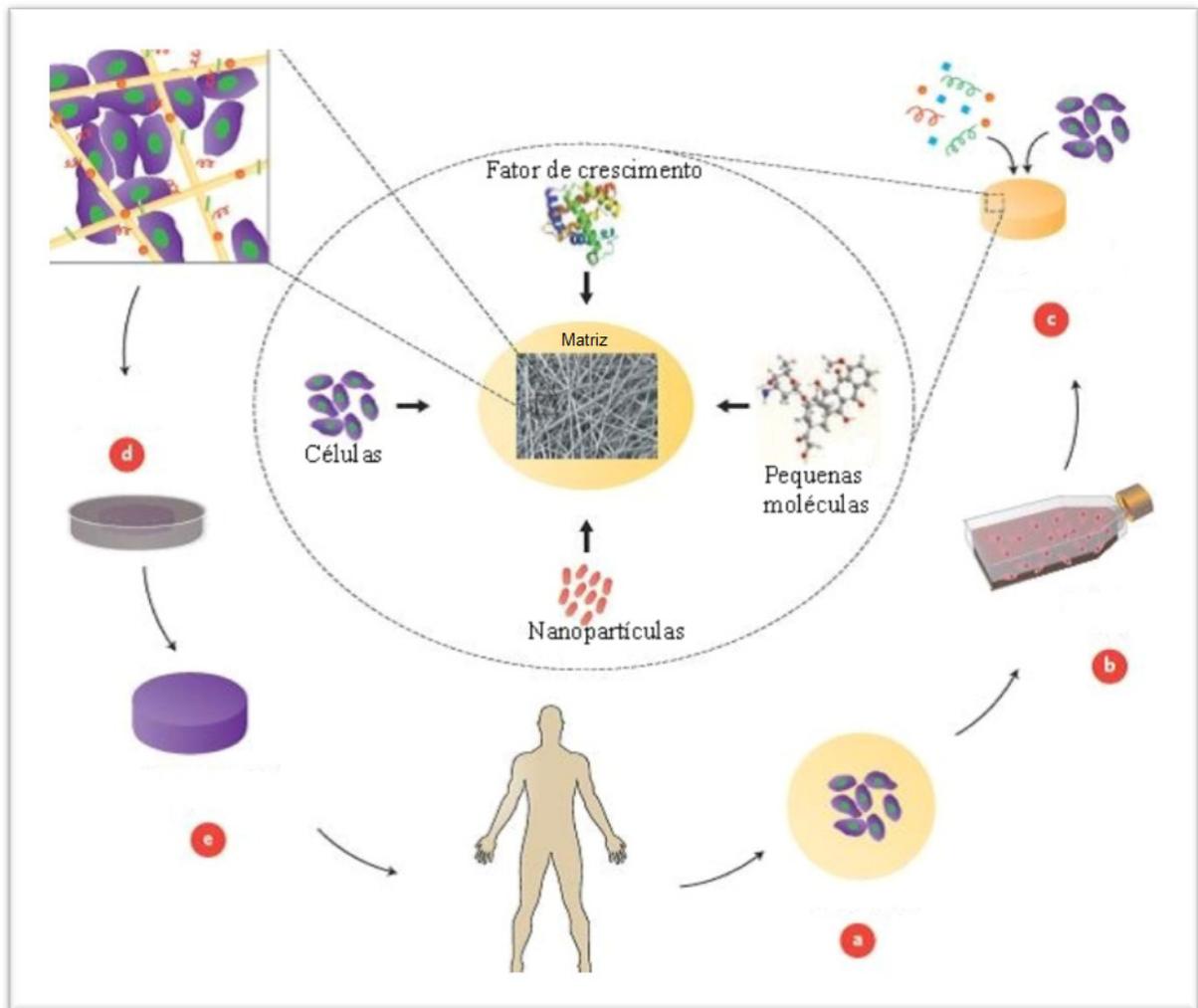


Figura 4.1. Exemplo da concepção de Engenharia Tecidual que envolve células e biomateriais na forma de arcabouços. Em a) Isolamento das células, b) Expansão em 2D; c) Cultura em arcabouço poroso 3D, d) Organização tecidual, e) Implantação do tecido engenheirado. Fonte: DVIR (2010).

No entanto, para muitos pacientes com falência de órgãos, a biópsia do tecido pode não fornecer um número suficiente de células para a expansão, prejudicando, conseqüentemente, o transplante.

Neste contexto, o uso de células-tronco vem suprir esta necessidade, visto que células-tronco são fundamentais, não somente para coordenar a formação dos órgãos, desde a fase embrionária até o indivíduo adulto, mas também desempenham um papel fundamental na regeneração e reparo dos tecidos. Estas

células têm como características principais a capacidade de auto-renovação e diferenciação em múltiplas linhagens celulares (BAKSH, 2004).

Segundo Fuchs *et al.* (2000) existem dois tipos principais de células-tronco, classificadas de acordo com o tecido de origem: (I) as células-tronco embrionárias, derivadas da camada interna de células do blastocisto; e (II) as células-tronco adultas, que podem ser divididas em hematopoiéticas, derivadas da medula óssea e do sangue do cordão umbilical, e células-tronco mesenquimais, localizadas na medula óssea, tecido adiposo, neural, muscular entre outros.

Do ponto de vista terapêutico, isto é, sua aplicação na regeneração de tecidos lesionados ou na Engenharia Tecidual, as diferentes células-tronco apresentam vantagens e desvantagens. Devido às dificuldades práticas de obtenção de células-tronco embrionárias, e considerando os aspectos éticos e legais, inúmeros pesquisadores têm realizado seus estudos com células-tronco mesenquimais adultas, principalmente as derivadas do estroma da medula óssea (LEMOS, 2008).

As células-tronco mesenquimais são consideradas uma população de células multipotentes, presentes na medula óssea e em muitos outros tecidos adultos (MOMIN, 2010). Possuem a capacidade de se autorenovar e de se diferenciar em linhagens celulares específicas de diversos tecidos, tais como: ósseo, adiposo, cartilaginoso e muscular (TAO, 2009).

As células-tronco tanto, *in vivo* como *in vitro*, comportam-se em resposta aos sinais biológicos que recebem a partir do microambiente circundante. Em resposta a estes estímulos, as células podem secretar diversos fatores para modular o microambiente e ativar células progenitoras (HOMBACH-KLONISCH, 2008, LE BLANC, 2008).

Na Engenharia Tecidual óssea, o arcabouço ideal deve mimetizar a morfologia estrutural da matriz extracelular, apresentar porosidade adequada, área superficial suficiente, bem como superfície química que estimule a adesão, a proliferação e a diferenciação celular (GUAN, 2008). Células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (CTM) são ótimas candidatas para Engenharia Tecidual óssea, pois elas são capazes de se diferenciar em linhagens mesodérmicas

incluindo osteoblastos, condrócitos, adipócitos, tanto *in vitro* como *in vivo* (LONG, 2001; LIU, 2013).

A diferenciação das células-tronco é regulada por fatores físicos e químicos do seu microambiente extracelular, sendo que a complexa interação célula-substrato e célula-célula ativam vias específicas que regulam a diferenciação celular (PHILLIPS, 2010; LIU, 2013, FRICAIN, 2013). Além de estímulos bioquímicos, diversas propriedades físicas dos materiais sintéticos estão correlacionadas com a diferenciação das CTM, incluindo micro-padrões de adesão que ditam a forma da célula, bem como a rigidez e nanotopografia do substrato (LI, 2013). Entre essas propriedades físicas, a rigidez apresenta grande destaque. Estudos recentes com queratinócitos e CTM mostram que as células não só sentem a rigidez de um polímero, como respondem ao *feed-back* mecânico fornecido pelas proteínas ancoradas à rede polimérica (LI, 2013)

Desta forma, a Engenharia Tecidual busca a construção de arcabouços que mimetizem a função do microambiente celular, promovendo um ambiente celular favorável. O arcabouço serviria como um suporte mecânico-funcional, para proporcionar as condições ideais para a organização de um novo tecido.

4.2. MATRIZ EXTRACELULAR

As células estão conectadas através de uma rede conhecida como matriz extracelular (MEC), que é composta por uma rede complexa de macromoléculas extracelulares (ALBERTS, 2004). Ela fornece um ambiente organizado no qual as células podem mover-se e interagir uma com as outras de forma ordenada (Figura 4.2).

Muitos dos processos celulares envolvem a interação entre a MEC e as células, pois a MEC não somente mantém as células conectadas nos tecidos, como também guia seus movimentos durante a cicatrização de feridas e o desenvolvimento embriogênico. Além disso, transmitem sinais deste microambiente às células, mantendo um papel chave e essencial na sobrevivência, na proliferação e na migração das células em seu contato (VAKONAKIS, 2007).

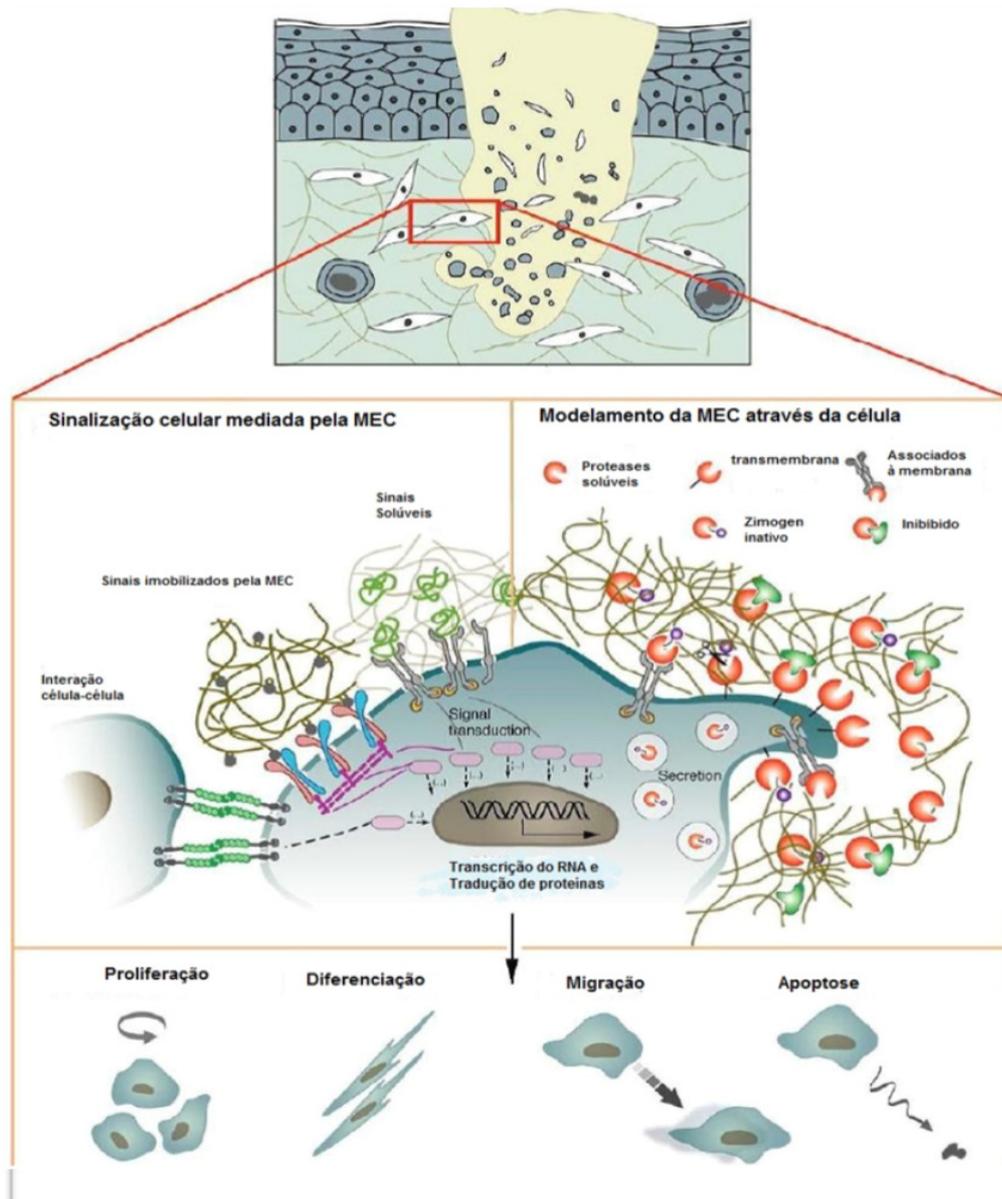


Figura 4.2. Meio circundante que regulam as atividades celulares através da matriz extracelular (adaptado de ALBERTS, 2004).

Igualmente, a MEC pode modular a dinâmica do tecido através de sua capacidade de ligar-se e armazenar fatores de crescimento solúveis que, então, são apresentados para as células presentes no local que são estimuladas a uma resposta celular específica.

As integrinas são os principais receptores usados pelas células para ligarem-se à MEC, que quando ativadas pela matriz atuam como transdutores de sinais ativando diversas vias de sinalização intracelular (DEMALI, 2003). Estudos

demonstram que a MEC influencia profundamente no programa celular de crescimento, diferenciação e apoptose.

A promoção ou supressão do crescimento pela MEC está associada igualmente à estimulação ou inibição dos mediadores chaves, responsáveis pelo ciclo celular, incluindo genes de respostas primárias (BOUDREAU, 1999, LIM, 2007) e vias de transdução de sinal intracelular tais como *FAK*, *MAPK* e *Rho* entre outras (HILL, 1995; FODOR, 2003; LIM, 2007).

A adesão focal no contato MEC-célula atua na tensão do citoesqueleto aumentando a atividade da sinalização celular. As moléculas mediadoras nas adesões focais permitem o acoplamento do GTP-RhoA com a proteína quinase associada à Rho (ROCK) e, assim, aumenta a atividade quinase da ROCK (BHADRIRAJU, 2007). Além disso, a atividade da ROCK e a tensão associada do citoesqueleto regulam o comprometimento das CTMs com fenótipo osteogênico (WANG, 2012).

A organização da matriz extracelular primária produzida pelas células está relacionada à resposta das propriedades mecânicas efetivas do substrato, o qual modula um papel ativo na tradução de sinais ambientais físicos em sinais bioquímicos que, em última instância, regulam a diferenciação de células-tronco (LI, 2013).

Curran *et al.* (2006) fabricaram superfícies modificadas com silano para controlar a adesão e diferenciação das CTMs *in vitro* e avaliaram o uso de tais técnicas para controlar o comportamento das células, tanto em condições basais quanto em condições estimuladas. Uma variedade de superfícies com grupos metila (-CH₃), amino (-NH₂), silano (-SH), hidroxila (-OH) e carboxila (-COOH) foi produzida e cultivada em contato com CTM humana, em conjunto com um grupo controle, por períodos de tempo de até 28 dias em meio basal, condrogênico e osteogênico. Avaliando a adesão celular, a expressão gênica e protéica, demonstraram que mudanças na energia de superfície e na superfície química afetam a adesão celular, e subsequentemente as vias de diferenciação. Os resultados confirmaram que as alterações na adesão focal e da produção de matriz

extracelular podem afetar a capacidade e a eficiência de diferenciação das CTMs, na presença ou na ausência de estímulos biológicos.

No tecido ósseo, estudos indicam que elementos da via de sinalização mediada pela integrina incluem quinase de adesão focal *FAK*, *MAPK/ERK* e o fator de transcrição osteogênico *Run2/Cbfa1* (LU, 2010), que é o principal gene de controle da diferenciação de osteoblastos (LIAN, 2003).

4.3. TECIDO ÓSSEO

O osso é um tecido dinâmico que é submetido a um processo de remodelagem contínua ao longo da vida (PASCAUD, 2012). Ele é formado por um tecido conectivo especializado composto por uma matriz extracelular mineralizada, sendo os seus principais constituintes a proteína colágeno tipo I e hidroxapatita (GRIFFITH, 2002).

O osso é particularmente um material complexo em multiescala, organizado hierarquicamente para proporcionar o máximo desempenho com uma quantidade mínima de material. Na escala nanométrica, o osso é composto por fibras de colágeno com diâmetro típico entre 50 a 500 nm, cristais de apatita (± 50 nm) e água. Em escala micrométrica (1-10 μm), os arranjos das fibras colágenas reforçadas com cristais formam lamelas. Estas últimas são empacotadas e organizadas em diferentes orientações para formar estruturas cilíndricas chamadas de trabéculas, organizadas em microescala. Na mesoescala, a rede complexa e muito organizada das trabéculas forma o osso esponjoso. A escala macro representa o osso como um todo, o qual é constituído por ambos os ossos esponjosos (trabecular ou esponjoso) e dos ossos cortical (compacto). (BONZANI, 2006; GODA, 2013). A Figura 4.3 mostra a estrutura hierárquica típica de um osso em diversas escalas.

A formação óssea exige uma interação complexa entre populações celulares distintas e compartimentos de tecido para auxiliar nas funções estruturais e metabólicas do esqueleto.

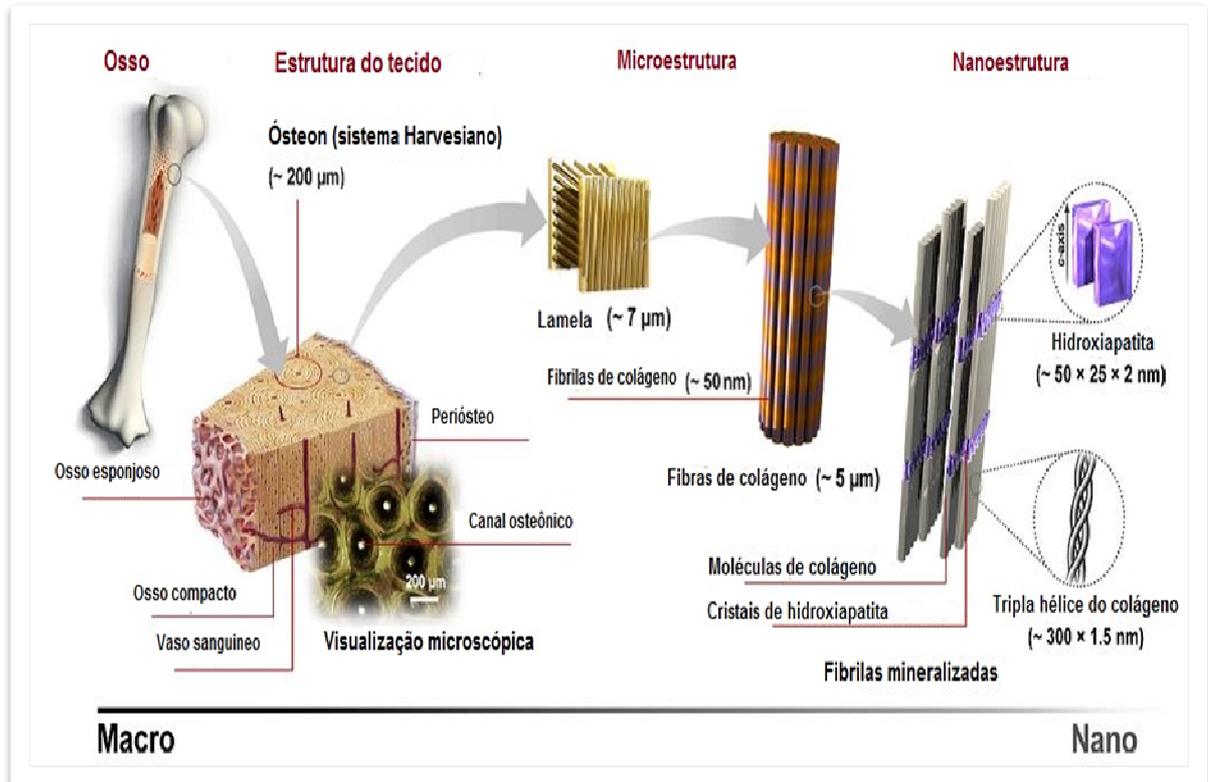


Figura. 4.3. Estrutura do osso humano: da macroestrutura à nanoestrutura (adaptado de SADAT-SHOJAI, 2013).

As principais células que estão envolvidas no desenvolvimento das estruturas ósseas e medeiam funções especializadas do esqueleto nos mamíferos são as células-tronco mesenquimais, recrutadas para o desenvolvimento e expansão do tecido esquelético, condrócitos células que formam o modelo para o desenvolvimento do osso endocondral e crescimento dos ossos longos, osteoblastos os quais sintetizam a matriz óssea, osteócitos que estão presentes em toda a matriz óssea mineralizada e auxiliam na manutenção da estrutura óssea, e os osteoclastos que são responsáveis pela reabsorção de tecido calcificado (ANSELME, 2000, KATAGIRI, 2002, FRANZ-ODENDAAL, 2006).

A interação dinâmica entre as células ósseas e a matriz extracelular desencadeia uma série de vias de sinalização intracelular que regulam o crescimento e diferenciação celular. A diferenciação de osteoblastos e osteoclastos exige diversos eventos associados à expressão gênica que iniciam a proliferação e

sequencialmente a expressão de genes associados à formação e reabsorção óssea (ANSELME, 2000).

4.4. BIOMATERIAIS NA ENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA

Os biomateriais podem ser classificados, segundo a sua composição química, como metais, cerâmicas, polímeros sintéticos ou naturais e compósitos. Materiais utilizados na fabricação de arcabouços para Engenharia Tecidual são normalmente selecionados para proporcionar uma estrutura temporária, exibindo uma adequada propriedade mecânica e biológica ao novo tecido formado. Também devem apresentar uma capacidade sinérgica de degradação e biorreabsorção do próprio material em relação ao crescimento do novo tecido, bem como ter a capacidade de ser fixado cirurgicamente com parafusos ou fio de sutura (WIESMANN, 2004).

A topologia do material e a sua hidrofobicidade/hidrofilicidade influenciam nas características de adesão, proliferação celular e resposta imune através dos mecanismos celulares de sinalização (SCHWARTZ, 2002).

Arcabouços utilizados na regeneração do tecido ósseo devem manter resistência mecânica adequada sobre as fases críticas do processo de cicatrização de tecidos. Também devem ser osteocondutor, propriedade relacionada com adesão, diferenciação e proliferação celular que estão intimamente relacionadas com as propriedades do material.

Os biomateriais baseados em fosfatos de cálcio vêm sendo objeto de muitos estudos no reparo de perdas ósseas. Um vasto número de artigos relacionados a estes biomateriais podem ser encontrados na literatura. A Tabela 4.1 apresenta alguns tipos de fosfatos de cálcio utilizado como biomateriais.

Entre os biomateriais baseados em fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita sintética (HA) tem seu uso difundido na clínica médica e odontológica, como biomaterial compósito/ou não em formas de pó, grânulos, blocos densos ou porosos, pois apresentam uma semelhança com o componente inorgânico da matriz extracelular óssea, elevada biocompatibilidade e osteocondutividade (FERRAZ, 2004).

Tabela 4.1. Exemplos de biomateriais a base de fosfato de cálcio.

Composto	Formula química	Ca:P	Autor	Produto
Hidrogenofosfato de cálcio (DCP)*	$\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,0	YU, 2009	Biobon®
Fosfato octacalcio (OCP)*	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,33	SUZUKI, 2006	—
α/β -Fosfato tricalcio (TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	BRUNNER, 2007	Vitoss®/OSferion
Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67	WONG, 2012	Bio-Oss®/Boneceram

*Utilizado como cimento em conjunto com outra fase

A família dos minerais apatitas tem a fórmula geral $\text{A}_{10}(\text{BO}_4)_6\text{X}_2$. Na HA, ou mais especificamente hidroxiapatita de cálcio, $\text{A} = \text{Ca}$, $\text{B} = \text{P}$ e $\text{X} = \text{OH}$. A estrutura da hidroxiapatita, como apresentada na Figura 4.4, pertence ao sistema hexagonal com grupo espacial $P6_3/m$, com dimensões de célula unitária de $a = 0,943$ nm e $c = 0,688$ nm. As HAs sintéticas são semelhantes aos cristais de hidroxiapatita da parte mineral dos dentes e dos ossos, sendo o principal componente inorgânico do osso natural, representando até cerca de 70% em peso de osso cortical e nos dentes responsável por 97% em peso do esmalte dentário (POINERN, 2013 *Apud* LANDI, 1993).

A hidroxiapatita possui dois sítios de ligação diferentes em sua superfície que proporciona um local de ligação múltipla a proteínas, a saber, os sítios C e P relacionados aos íons cálcio e íons fosfato, respectivamente. Os locais C são ricos em carga positiva a qual pode ligar-se a grupos de proteínas ácidas, logo os sítios P proporcionam cargas negativas e podem ligar-se a grupos básicos das proteínas (VICTOR, 2011).

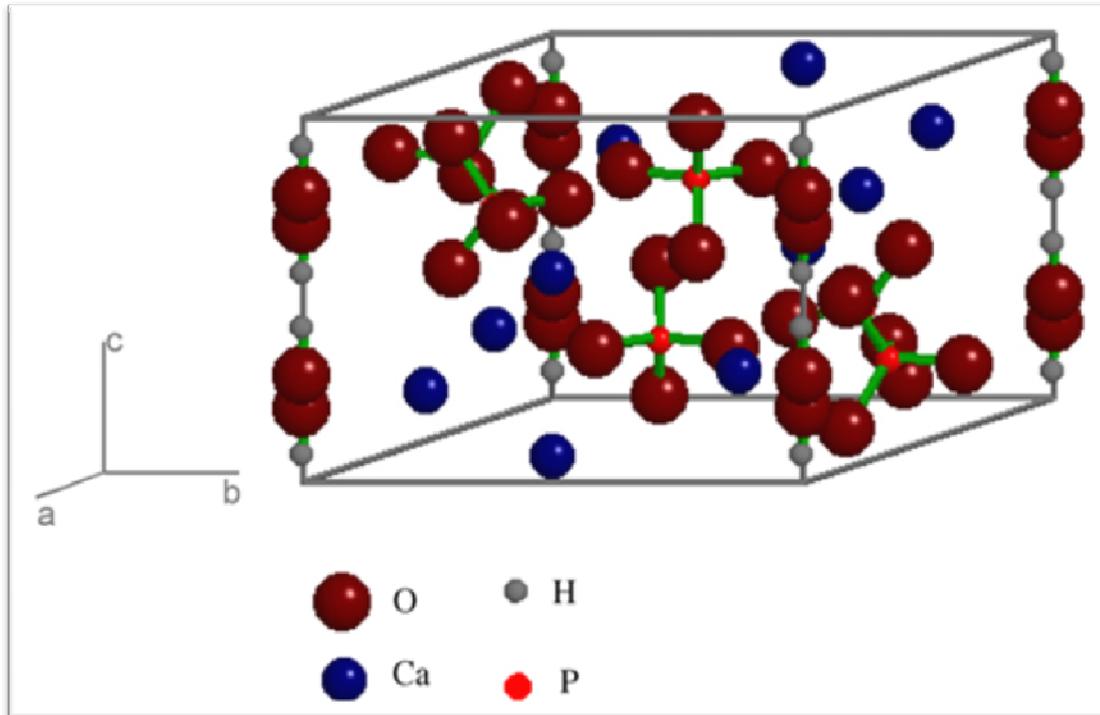


Figura. 4.4. Célula unitária da hidroxiapatita no grupo espacial $P6_3/m$ (MOSTAFA, 2007).

Outra vantagem significativa da utilização de HA, como um componente de um material compósito é que a sua estrutura complexa proporciona uma boa matriz de absorção para outras moléculas biológicas (POINER, 2013).

Chang *et al.* (2002) avaliaram a ligação do colágeno com a hidroxiapatita sintética através da análise de espectroscopia de fotoelétrons excitada por raios X (XPS). Seus achados indicaram que o Ca^{2+} da HA forma uma ligação covalente com os grupamentos carboxílicos das moléculas do colágeno.

Devido à complexidade do osso e suas características mecânicas, busca-se novos materiais para regeneração óssea. Os compósitos resultantes da adição de fases bioativas inorgânicas, tais como hidroxiapatita, na forma de partículas em polímeros biodegradáveis, são ótimos candidatos para utilização como arcabouços na Engenharia Tecidual óssea. Diversas técnicas têm sido aplicadas para a produção destes arcabouços, tais como lixiviação de sal, molde de espuma, impressão 3D e eletrofiliação (ERISKEN, 2008).

O elevado potencial regenerativo destes materiais se dá através da combinação sinérgica da matriz orgânica e da fase mineral, cujas propriedades osteogênicas são conferidas pelas estruturas químicas e topológicas específicas, bem como pelo confinamento físico imposto pela própria matriz orgânica (PANSERI, 2013).

A escolha de poliésteres na fabricação de biomateriais é, em grande parte, devido ao fato deles serem encontrados na forma de biopolímeros naturais e sofrerem degradados hidrolítica ou enzimática. Uma vez degradados, os produtos da sua degradação são metabolizados pelas células e excretados na forma de água ou gás carbônico (CHA, 1990; KIM, 1998; BARRET, 2009).

Um grupo promissor desses biopolímeros é a família dos polihidroxicanoatos (PHAs), biopoliésteres produzidos por muitos microrganismos como polímero de armazenamento intracelular (ISHII, 2007). Os PHAs, além de serem biocompatíveis, apresentam as mesmas propriedades mecânicas de termoplásticos tradicionais (GALEGO, 2000).

Como os PHAs apresentam um baixo grau de toxicidade e elevada resistência mecânica, há um grande interesse em estudar-los como biomateriais para aplicações na Engenharia Tecidual (LI, 2008). Uma classe destes polímeros é o poli [(R)-3-hidroxi-butirato] (PHB), um típico biopoliéster natural produzido por muitos microrganismos, os quais podem acumular cerca de 90% do seu peso celular seco de PHB (WU, 2010; ARIFFIN, 2008). A Figura 4.5 apresenta a fórmula estrutural do PHB.

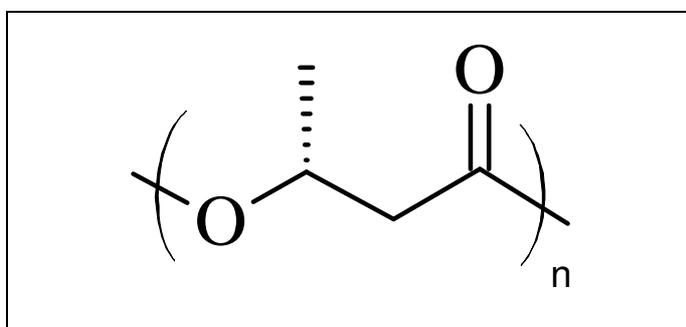


Figura 4.5. Estrutura da molécula de PHB.

No organismo humano, pode ser encontrada naturalmente uma quantidade relativamente grande das mesmas unidades monoméricas precursoras do PHB e seus produtos de degradação, na forma de ácido 3-hidroxibutírico e ácido cotrônico. Ambas fazem parte dos metabolitos comum em todos os seres vivos mais elevados, sendo mais uma evidência para a não toxicidade de implantes à base de PHB (FREIER, 2002; QU, 2005; YU, 2005).

Doyle *et al.* (1991) demonstraram que materiais compostos à base de PHB/HA produzem uma resposta favorável e consistente da adaptação do tecido ósseo, com nenhuma evidência de resposta inflamatória crônica quando implantados em coelhos após um período de até 12 meses. O osso foi rapidamente formado perto do material e, subsequentemente, tornou-se altamente organizado, com até 80% da superfície do implante situado justaposto ao novo osso formado. Além disso, os materiais não mostraram evidência conclusiva de colapso na estrutura do biomaterial durante o período de implantação.

Luklinska *et al.* (1997) estudaram a interface do compósito de PHB/HA e osso quando implantado *in vivo* em coelhos. Verificaram que após um mês do implante, ocorreu aposição óssea ao longo de todo o comprimento da interface do implante. Três meses após o implante, o osso encontrado formou uma estrutura interligada sobre as partículas de hidróxiapatite expostas na interface, seguida pela formação de osso denso após seis meses de implante.

Wang *et al.* (2005) mostraram que a presença de partículas de HAp na superfície do biomaterial contribui na adesão de osteoblastos. Além disso, a presença de hidróxiapatita na matriz do PHB favoreceu um aumento na resistência do compósito junto com a sua bioatividade.

Shishatskaya *et al.* (2006) investigaram a influência do conteúdo de HA em compósitos baseados em polihidroxibutirato em células mesenquimais de medula óssea de rato (rCTM). Os arcabouços de PHB contendo 0% a 50% (w/w) de HA foram cultivadas com as rCTM após a sua expansão em meio osteogênico. Após dez dias de cultura sobre os arcabouços, as células foram quantificadas e foi encontrado um maior número de células nos materiais contendo 10% e 20% de HA, quando comparados com os compósitos contendo 30%, 40% ou 50% de HA.

Observando a atividade de fosfatase alcalina, a mesma tendência foi constatada, confirmando uma maior função bioativa dos compósitos.

Em outros estudos, o PHB também apresentou um bom grau de biocompatibilidade com várias linhagens celulares (FREIER, 2002; ZHAO, 2003; XU, 2010). Em adição à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, relatos indicam que o PHB apresenta propriedades piezoelétricas, o que pode eventualmente desempenhar um papel vital para estimular o crescimento e regeneração óssea (KNOWLES, 1991).

4.5. COMPÓSITOS ELETROFIADOS NA REGENERAÇÃO ÓSSEA

Na última década, a utilização de fibras poliméricas eletrofiadas tem atraído atenção da comunidade científica na fabricação de biomateriais (ZHANG, 2005; GUERRINI, 2006), por apresentar-se como um material com excelentes propriedades para construção de arcabouços para a Engenharia Tecidual (BOUDRIOT, 2006). Concorreu para isso, um grande esforço na intenção de mimetizar as características naturais de matriz extracelular para facilitar a adesão, a proliferação, a diferenciação celular e a gênese de um novo tecido (MA, 2008).

O equipamento básico para a eletrofiação, também conhecida como *electrospinning*, é constituído por uma seringa que contém a solução de um polímero condutor, uma bomba de infusão, dois eletrodos e uma fonte de alta tensão que pode variar de 5 a 60 kV. A Figura 4.6 apresenta esquematicamente um equipamento utilizado na fabricação de fibras eletrofiadas.

As fibras são formadas a partir do estiramento da gota do polímero na ponta da agulha. Quando se aplica uma alta tensão na extremidade da agulha, induz-se uma carga na gota polimérica. Uma vez que as cargas no interior da gota atingem um valor crítico, um jato da solução surge a partir da gota (cone de Taylor) em decorrência do equilíbrio entre as forças eletroestáticas da superfície carregada e a tensão superficial da solução (YARIN, 2001).

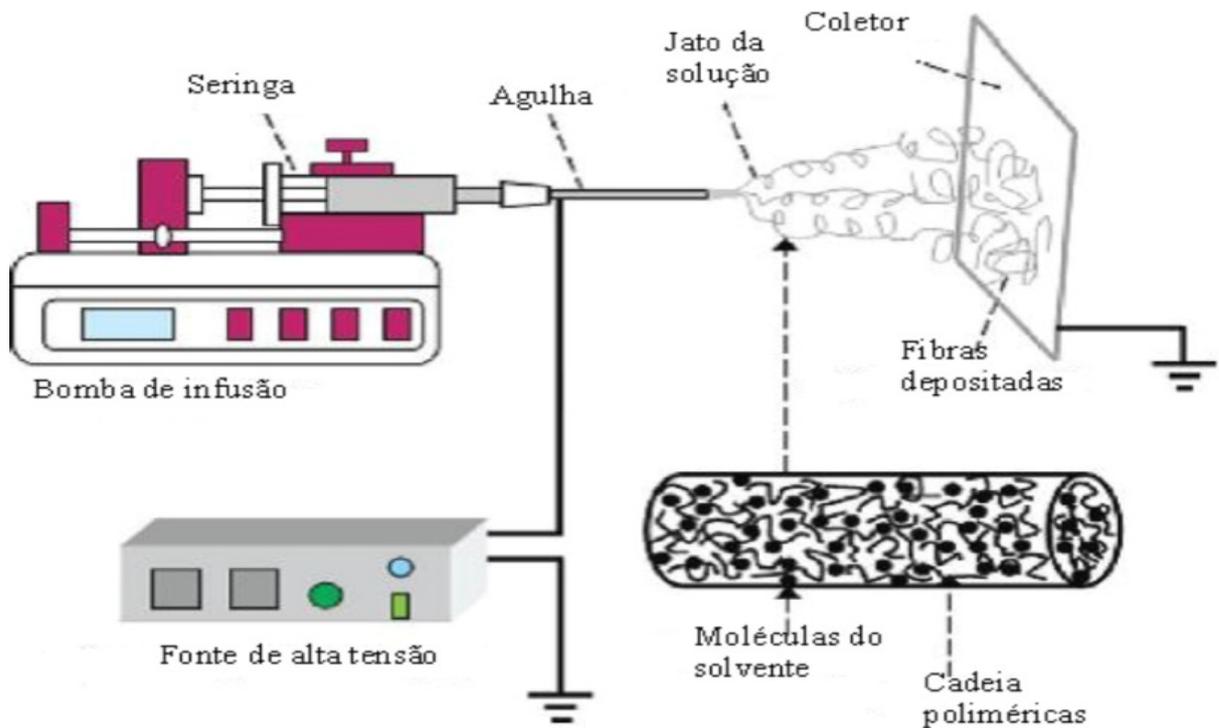


Figura 4.6. Desenho esquemático do equipamento de eletrospinning (adaptado de LIN, 2010).

O jato carregado eletricamente e as cargas experimentadas nas fibras causam um dobramento destas, de tal forma que cada vez que a fibra de polímero é extrudado, o seu diâmetro é reduzido (LIANG, 2007). A fibra então é depositada sobre uma superfície metálica aterrada. Tal processo produz fibras de ordem submicrométrica a qual se assemelha a matriz extracelular natural.

Um equipamento de *eletrospinning* pode ser usado para formar fibras e esferas dependendo dos parâmetros aplicados no processo de eletrospinning, tais como a distância entre a fonte e o coletor, viscosidade da solução, tensão aplicada, entre outros.

A possibilidade de produzir compósitos eletrofiados abre uma nova oportunidade para a fabricação de materiais nanoestruturados para Engenharia Tecidual óssea. A Nanotecnologia é uma ferramenta poderosa na Ciência dos Materiais, sendo potencialmente capaz de incorporar biomimetismo em nanoescala. Superfícies nano-funcionalizadas apresentam propriedades biológicas promissoras,

que quando aplicadas em biomateriais podem melhorar significativamente a aplicação clínica destes (LIU, 2010).

Os nanomateriais oferecem uma maneira de mimetizar a arquitetura natural da matriz extracelular que consiste em fibras com diâmetros entre o micrômetro e o nanômetro, a qual pode fornecer uma grande área superficial em relação ao volume, aumentando assim a área de contato, facilitando as interações entre as células e o material (ASHAMMAKHI, 2009).

Ngiam *et. al* (2009) desenvolveram um arcabouço eletrofiado a partir de PLGA e blendas de PLGA/Colágeno com nanopartículas de hidroxiapatita (nHA) na superfície do material através da técnica de biomineralização. Neste estudo, avaliaram a proliferação e a expressão de genes relacionados à mineralização da matriz mineral com células de osteoblastos. Os resultados indicaram que os arcabouços contendo as nHA influenciam fortemente a adesão e a proliferação das células.

Teng *et al.* (2008) fabricaram compósitos de colágeno/HA eletrofiados. As fibras produzidas a partir de um precursor sol possuíam um diâmetro médio de cerca de 60 nm. O arcabouço apresentou uma morfologia uniforme e contínua, com o alinhamento orientado dos nanocristais de HA e morfologia de agulha ao longo do interior das fibras. A composição da fase do compósito foi confirmada pelas análises de DRX. Essa técnica mostrou-se eficiente na produção de nanopartículas uniformes ao longo das nanofibras.

Prabhakaran e Ramakrishna (2009) produziram fibras eletrofiadas de PLLA, PLLA/HA e PLLA/colágeno/HA (PLLA/col/HA). Avaliaram o potencial da utilização destes arcabouços na regeneração de tecido ósseo. No estudo, o PLLA foi misturado com o colágeno e HA, e eletrofiados para produzir biocompósitos. A avaliação *in vitro* mostrou que os materiais são biocompatíveis, osteocondutores e que estes apresentaram propriedades mecânicas suficientes para a o uso na Engenharia Tecidual óssea.

Paşcu *et al.* (2013) fabricaram nanocompósitos de membranas eletrofiadas nHA, fibras de seda e PHBV, sendo que as nHA foram incorporadas dentro da matriz das fibras. Os arcabouços fabricados preencheram os requisitos para a

Engenharia Tecidual óssea, incluindo a estabilidade física, perfil de degradação adequada e compatibilidade com células ósseas.

Guan *et al* (2008) avaliaram a proliferação e diferenciação das células-tronco da medula óssea em arcabouços fabricados por *gas-jet/electrospinning* baseados em PHB e nHA. Os resultados mostraram que os arcabouços possuíam topografia semelhante da matriz extracelular, e nos estudos *in vitro*, os arcabouços apresentaram resultados positivos na adesão, proliferação e diferenciação das CTMs.

As características nanotopográficas de arcabouços eletrofiados e a inclusão de nanopartículas de HA na matriz ou superfície destes biomateriais podem influenciar profundamente no controle estrutural e organizacional da matriz extracelular produzida pelas células alojadas nestes arcabouços. Ainda, podem influenciar a adsorção de proteínas, tais como colágeno I, laminina, fibronectina e integrinas, que são necessárias para a osteodiferenciação e produção de uma matriz mineralizada (DALBY, 2007).

4.6. BIOCOMPATIBILIDADE

A biocompatibilidade pode ser definida como a habilidade de um biomaterial, prótese, ou equipamento médico de desempenhar uma resposta apropriada no hospedeiro em uma aplicação específica, envolvendo a aceitação de um implante pelo tecido circundante e pelo organismo como um todo (ANDERSON, 2001).

Vale lembrar que o sucesso do biomaterial no organismo não depende só de fatores como propriedade do material e o contexto em que o material é usado, mas também, outros fatores, incluindo a técnica cirúrgica e a condição de saúde do paciente (BOUILLAGUET, 2006).

Todavia, a avaliação da biocompatibilidade do implante, inclui a determinação da resposta imune em relação a composição do biomaterial, ao tipo de tecido, e em última instância, a combinação do biomaterial e do tecido em relação ao tempo de exposição do implante (BABENSEE, 1998). Estes fatores estão intimamente relacionados com o comportamento celular em contato com o biomaterial e,

particularmente, a adesão celular com a sua superfície (SERRANO, 2004). Conseqüentemente as características do material, tais como hidrofobicidade, energia de superfície, porosidade, carga e composição química, são de fundamental importância para a resposta do tecido em contato com o biomaterial (DEWEZ, 1998; KHORASANI, 2006; FURTH, 2007).

A reprodutibilidade em termos químicos, físicos e propriedades biológicas são fatores determinantes no desenvolvimento de novos materiais para aplicações biomédicas (ZADRAHALA, 1999), seguido da tolerância, adesão e proliferação celular e subseqüentemente formação do novo tecido. Sendo assim, o material não deve provocar uma resposta inflamatória crônica, não pode ser imunogênico ou citotóxico (ANDERSON, 2001).

5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Neste capítulo, estão citados os materiais utilizados e a metodologia adotada no desenvolvimento deste trabalho. A Figura 5.1 apresenta um fluxograma representativo do procedimento experimental adotado neste trabalho.

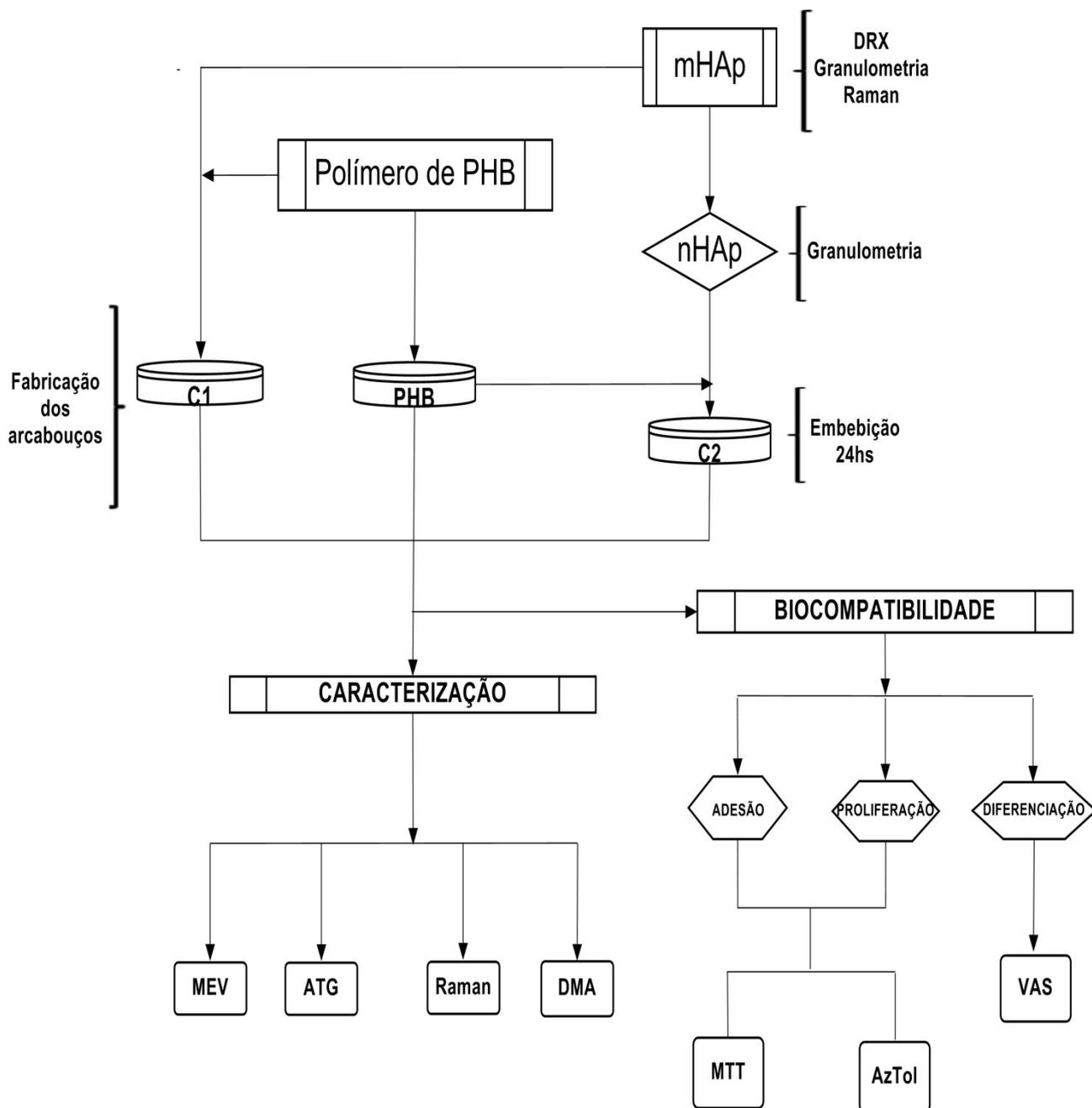


Figura 5.1. Fluxograma da fabricação, caracterização e avaliação da biocompatibilidade dos arcabouços.

5.1. MATERIAIS

Os materiais utilizados neste estudo foram todos de grau analítico e estão listados na Tabela 5.1, sendo informado ao lado o fornecedor.

Tabela 5.1. Materiais utilizados.

Materiais	Fornecedor
Hidroxiapatita (HAp) sintética grau médico <i>FlowMaster™ powders 20.15.8/ F3</i>	F.J Brodmann & Co
Poli[hidroxibutirato] (PHB $M_w=2,3 \times 10^5$)	Sigma-Aldrich®.
Alizarina (ALS)	Sigma-Aldrich®.
MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)	Sigma-Aldrich®.
Histopaque-1077	Sigma-Aldrich
Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)	LifeTechnologies™.
Tampão fosfato de Dulbecco DPBS	LifeTechnologies™.
Soro fetal bovino (SFB)	LifeTechnologies™.
Tripsina-0,25 EDTA	LifeTechnologies™.
Antibióticos	LifeTechnologies™.
Anti-CD3	BD Pharmigen
Anti-CD45	BD Pharmigen
Anti-CD49b	BD Pharmigen
Anti-CD90	BD Pharmigen
Dimetilformamida (DMF)	Sigma-Aldrich®.
Dimetil sulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich®.
Clorofórmio	Synth
Acetona	Synth
Álcool isopropílico	Synth

5.2. MÉTODOS

5.2.1. CARACTERIZAÇÃO DA HIDROXIAPATITA

5.2.1.1 Difração de Raios X

A cristalinidade da hidroxiapatita foi investigada por difração de raios X, em um difratômetro Philips, modelo X`Pert MPD empregando uma tensão de 40kV e corrente no tubo de 40 mA, com radiação de Cu-K α . O intervalo angular utilizado foi de 15 a 65°, com passos de 0,05° e períodos de 5s. A ficha utilizada para a identificação foi a 09-0432 do *Joint Committee on Powder Diffraction Standards – JCPDS*.

A fração da fase cristalina (X_c) da hidroxiapatita foi avaliada pela Equação 5.1:

$$X_c = 100 \cdot \frac{I_{300} - V_{112/300}}{I_{300}}, (\%) \quad (\text{Equação 5.1})$$

Onde I_{300} é a intensidade do pico de difração no plano (3 0 0) e $V_{112/300}$ a intensidade do espaço vazio entre os picos de difração nos planos (1 1 2) e (3 0 0) da hidroxiapatita (BOUYER, 2000).

O tamanho de cristalito D da hidroxiapatita foi calculado com base na equação de Scherrer (BOUYER, 2000):

$$D = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos(\theta)}, (nm) \quad (\text{Equação 5.2})$$

Onde K = constante dependente da forma dos cristalitos, $0,8 < K < 1,1$, $K = 0,94$ para a largura total do pico a meia altura (*Full width at half maximum* - FWHM) de cristais esféricos com simetria cúbica e λ é o comprimento de onda da radiação monocromática (Cu-K $\alpha = 1,5405$ Å). O valor de β é definido como a FWHM de maior intensidade. Este valor é a diferença entre dois valores de 2θ , em radianos, sendo o θ o ângulo de Bragg, em graus.

5.2.1.2. Análise granulométrica

A análise de distribuição de tamanho de partículas da hidroxiapatita foi realizada com o equipamento CILAS 1180 por difração a laser. As partículas foram dispersas em água utilizando ultra-som por 60 segundos.

5.2.2. FABRICAÇÃO DOS ARCABOUÇOS

5.2.2.1. Otimização da técnica de eletrofiação

A fim de fabricar arcabouços que tivessem uma distribuição homogênea das fibras, bem como a não formação de contas do polímero ao longo da matriz eletrofiada, o processo de eletrofiação foi otimizado. Foram ajustadas a concentração da solução do polímero e a vazão utilizada para produção das fibras. Após, foram ajustadas a concentração de HAp na solução do polímero e vazão utilizada para o estiramento das fibras

Em relação à distância utilizada entre a ponta da agulha e o coletor, neste trabalho foi escolhido mantê-la constante em 140 mm, uma vez que este parâmetro não influencia significativamente na morfologia das fibras. Esta distância também permite que o solvente seja evaporado, evitando a formação de contas ao longo das fibras (JALILI, 2005). A aplicação de uma tensão mínima induz as cargas necessárias na solução e, juntamente com campo elétrico, inicia a formação das fibras pelo processo de eletrofiação (BHARDWAJ, 2010). Foi escolhido manter a tensão aplicada como 15 kV. Assim, a razão entre tensão e distância, dita a intensidade do campo elétrico, manteve-se constante a 1,07 kV/cm.

Para a confecção das membranas de PHB, primeiramente foi ajustada a concentração do polímero de PHB a 0,5 mg/mL em clorofórmio. Para uma melhor solubilização do polímero este foi mantido em refluxo à temperatura de 70°C por 4 horas. Após, foi adicionado o DMF e mantido por agitação por 30 minutos, seguido de 15 minutos em banho de ultra-som. Posteriormente foi avaliada a influência da vazão na morfologia das fibras. Para tanto, foi avaliada as seguintes vazões no processo de eletrofiação: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 e 3,5 mL/h.

Para a confecção de arcabouços compósitos de HAp foram empregadas duas técnicas, sendo estas: (I) adicionar HAp na solução do polímero de PHB e (II) embeber a membrana de PHB em uma solução de HAp. Para ambas as técnicas, a solubilização do polímero foi idêntica a utilizada na fabricação da membrana de PHB. A seguir estão descritas as duas metodologias empregadas.

Técnica – I: Após a solubilização do PHB foi adicionado HAp à solução e está colocada em banho de ultra-som por 30 minutos. Posteriormente seguiu-se com a eletrofição da membrana. Nesta técnica, foram avaliadas a melhor concentração de HAp na solução polimérica, bem como, a vazão no processo de eletrofição. Foram avaliadas três concentrações de HAp, a saber, 0,5; 0,2 e 0,1 mg/mL e três vazões no processo de eletrofição: 3,0; 3,5 e 4,0 mL/h.

Técnica – II: Para a confecção deste arcabouço foram preparadas três soluções de HAp em álcool etílico nas seguintes concentrações: 0,5; 0,2 e 0,1 mg/mL e deixado por 30 minutos em banho de ultrassom. Também foi preparada uma solução 0,5 mg/mL, mesmas condições acima descritas. No entanto, esta permaneceu em repouso por 24 horas e após foi retirado o sobrenadante para ser utilizada na próxima etapa. Após o preparo das soluções contendo HAp a membrana de PHB, permaneceu embebido nesta soluções por 24 horas e, em seguida, foi lavado por três vezes em água deionizada e uma vez em álcool para a retirada de excesso de HAp e secas a temperatura ambiente.

5.2.2.2. Processo de eletrofição

Os arcabouços selecionados para a avaliação de biocompatibilidade foram fabricados e nomeados de acordo com a Tabela 5.2, utilizando a proporção de 10:2 mL (v/v) de clorofórmio e dimetilformamida, respectivamente.

O sistema utilizado no processo de eletrofição foi composto por:

- i) Fonte de alta tensão;
- ii) Conjunto de seringa plástica e capilar: foram utilizadas seringas plásticas com capacidade de 5mL (Walmur). Agulhas hipodérmicas de aço inox com diâmetro interno de 1,2 mm e ponta romba serviram como capilar a partir do qual o

fluido foi submetido ao campo elétrico. Durante o processo de eletrofiação, o capilar foi conectado diretamente à fonte de alta tensão;

iii) Coletor: o coletor constitui-se de um cilindro de alumínio de 100 mm de diâmetro. O coletor foi revestido com papel alumínio comum para facilitar a remoção das fibras formadas. As fibras foram coletadas no modo estático, ou seja, sem a rotação do cilindro coletor;

iv) Bomba de infusão: para manter constante o fluxo de material ejetado pelo capilar.

Tabela 5.2. Parâmetros de eletrofiação utilizados para a produção dos arcabouços.

Amostra	Distância(cm)	Tensão (kV)	Fluxo (mL/h)	Conc. da solução (mg/mL)	
				PHB	HAp
PHB			3,5		—
C1	14	15	3,0	41,6	9,1
C2			3,5		0,5*

* utilizado somente o sobre-nadante da solução.

5.2.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ARCABOUÇOS

Os arcabouços selecionados para a avaliação da biocompatibilidade foram caracterizados quanto a sua morfologia, comportamento térmico e viscoelástico, área superficial específica e a presença dos grupos funcionais característico da hidroxiapatita e do poli(hidroxibutirato).

5.2.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a obtenção das imagens e caracterização morfológica dos arcabouços selecionados, foi utilizado o equipamento JEOL modelo JSM-6060. Para as análises de espectroscopia elétrons secundários dispersos (EDS, em inglês), utilizou-se o

equipamento JEOL modelo JSM-5800 com tensão de 10 kV. As amostras foram recobertas com carbono e ouro.

5.2.3.2. Medidas de diâmetros das fibras e estruturas

Para obtenção da distribuição do tamanho das fibras e das estruturas, as membranas foram divididas em quatro quadrantes e foram obtidas quatro imagens a partir deles. Após, com o uso do *software ImageJ* foram feitas quarenta contagens para cada imagem. As medidas de diâmetro das fibras/microestruturas foram obtidas a partir de imagens com aumento de 1.500x e para as nanoestruturas, imagens com aumento entre 35.000 - 70.000x.

5.2.3.2. Espectroscopia Raman

Para investigar a presença da hidroxiapatita, foi realizada a análise de espectroscopia Raman, com o equipamento modelo Renishaw inVia Spectrometer, na faixa de 400-1200 cm^{-1} , utilizando laser de 532 nm de comprimento de onda. Para cada registro, o número de acumulações a cada varredura foi de cinco, e o tempo de exposição foi de 10 segundos.

5.2.3.3. Área superficial específica pelo método Brunauer-Emmet-Teller (BET)

As análises de área superficial específica foram realizadas com o equipamento *Quantachrome Nova® Surface Area Analyser*. As amostras foram previamente preparadas em vácuo a temperatura de 60°C por 24 horas para a remoção de umidade.

5.2.3.4. Tamanho de poros pelo método Barret, Joyner-Halenda (BJH)

As análises de tamanho de poros foram realizadas com o equipamento *Quantachrome Nova® Surface Area Analyser*. As amostras foram previamente preparadas em vácuo a temperatura de 60°C por 24 horas para a remoção de umidade.

5.2.3.5 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (ATG) foi utilizada para verificar o teor de HAp, bem como, a sua influência da estabilidade térmica nos arcabouços compósito. As análises foram realizadas com o equipamento TGA/SDTA 851e Mettler-Toledo, utilizando uma taxa de aquecimento de 10°C/min. As análises foram realizadas na faixa de temperatura de 30°C a 1000°C em atmosfera de Ar sintético com fluxo de 40mL/min.

5.2.3.5. Análise dinâmico-mecânica

As propriedades viscoelásticas dos arcabouços foram caracterizadas através da análise dinâmico-mecânica (DMA) utilizando o equipamento TA Instruments modelo 2980. O tipo de ensaio aplicado foi de tração (*dual cantilever*), utilizando os corpos de prova com dimensões de $\pm 20 \times 7 \times 0,05$ mm. As análises foram realizadas na faixa em amplitude de 0,1% e frequência de 1 Hz, à temperatura de 30°C a 120°C sob taxa de aquecimento de 2°C/min.

5.2.4. AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da PUCRS sob o número 185/10.

Todos os procedimentos adotados durante as técnicas envolvendo os animais estão de acordo com o que preconiza o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), cumprindo as prerrogativas da Constituição do Estado, Lei nº 11.915, artigo 82, inciso IV, de 21 de maio de 2003.

5.2.4.1. Isolamento das Células de Medula Óssea

Para a obtenção das células de medula óssea, foram utilizados ratos *Wistar* machos, anestesiados com Ketamina/Clorpromazina (8:2 v/v) conforme o peso do animal, e sacrificados com guilhotina. As células da medula óssea foram obtidas das diáfises do fêmur, onde foram injetados 10 mL de meio DMEM sem soro. A suspensão da medula foi centrifugada a 400 g e ressuspensa em 5 mL de meio

DMEM, para a separação por gradiente de densidade usando Histopaque-1077. Para tanto, a suspensão da medula em meio DMEM foi transferida para um tubo cônico de 15 mL, contendo 5 mL de Histopaque-1077 e centrifugadas a 400 g, durante 30 minutos. A camada de células mononucleares foi coletada na interface Histopaque-DMEM e lavada com 10 mL de DPBS, após foi centrifugada a 1.500 rpm, por 3 minutos, sendo repetida essa etapa duas vezes.

Em seguida, as células foram ressuspensas com 1 mL de meio DMEM e foram realizadas contagem e avaliação da viabilidade pelo método de exclusão com Azul de Tripán em câmara de Neubauer.

5.2.4.2. Caracterização da população celular por citometria de fluxo

A fração mononuclear proveniente da medula óssea foi caracterizada com os anticorpos CD3, CD45, CD49b e CD90 exclusivos para ratos, conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), na concentração de um 1:10 em PBS

A suspensão das células foi incubada com os anticorpos a 5° C no escuro por 15 minutos. Após, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas com 1 mL de paraformaldeído 4% (em PBS). As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems). Os dados obtidos correspondem a, pelo menos, 50.000 eventos, sendo analisados no programa WinMDI 2.8.

5.2.4.3. Cultivo celular

A fração mononuclear foi colocada em cultura em meio DMEM suplementado com L-glutamina, 10% de SFB, 100 UI/mL de penicilina, 100 UI/mL de estreptomicina e 100 µg/mL de gentamicina, com densidade de $0,1 \times 10^7$ células em garrafas de cultura de 75cm². Logo em seguida, foram incubadas em estufa umidificada com 5% de CO₂ a 37° C por 72 horas. Então, as células não aderentes foram removidas através da troca do meio.

Posteriormente, quando as células em cultivo alcançaram confluência de aproximadamente 80%, foi feito o repique com Tripsina-0,25 EDTA 1x. O meio de cultura foi removido, e as células mesenquimais permaneceram aderidas à garrafa de cultura. Após quatro passagens, as células foram utilizadas para as avaliações nos arcabouços.

5.2.4.4. Avaliação da citotoxicidade

Para avaliar a citotoxicidade dos arcabouços, foi utilizado o método da redução do sal de formazan (MTT), conforme a norma ISO 10993/5. Para tanto, os arcabouços foram imersos no meio de cultura (DMEM), sendo o solvente de extração. Os extratos permaneceram durante os períodos de 3, 7 e 14 dias em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ em agitação. A proporção da área da superfície da amostra para o volume de meio foi de 3 cm² /mL, de acordo com a essa norma.

A técnica tem como princípio a determinação da habilidade de células vivas em reduzir brometo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2il-tetrazólico formando cristais insolúveis de formazan de coloração violeta. Os sais de formazan foram solubilizados em DMSO e as densidade óticas, dependente da concentração do sal de formazan, foram mensuradas a 570nm, com o espectrofotômetro de microplaca (BioRad). A porcentagem de células viáveis foi calculada em relação ao grupo controle que não recebeu os extratos dos polímeros.

5.2.4.5. Avaliação da proliferação celular

Os arcabouços foram confeccionados em formato de disco com diâmetro de 5,0 mm e colocados em placas de cultura de 96 poços. Sobre os discos (n=3), foram semeadas 0,5x10⁴ células, nos períodos de 3, 7 e 14 dias, com meio DMEM suplementado, porém sem meio de indução osteogênico. A cada três dias, as células foram lavadas com DPBS e trocados os meios. A proliferação celular foi mensurada através da técnica de MTT, comparando as absorbâncias entre os períodos avaliados.

5.2.4.6 Mineralização dos arcabouços

O método de cultivo foi o mesmo empregado para a avaliação da proliferação celular, como descrito no item 5.3.5

Para avaliar a mineralização dos arcabouços, foi utilizada a técnica de coloração com a solução de Vermelho de Alizarina S (VAS) [4,1mM/pH 4,1], que é um corante antraquinona utilizado para corar depósitos de cálcio. O corante forma um complexo com cálcio durante o processo de quelação resultando em birrefringência. Esta é uma técnica amplamente utilizada para avaliar a diferenciação óssea de célula-tronco.

No entanto, para quantificar a mineralização entre os períodos, a VAS foi extraída utilizando 10% de ácido acético em DMSO, e medido no espectrofotômetro de microplaca (BioRad), com comprimento de onda de 504 nm. Foi preparado um branco em paralelo para cada período e a densidade óptica, dependente da concentração do soluto (VAS), observada nos grupos PHB, C1 e C2 subtraída da densidade óptica do branco. Também foi feito um controle positivo, utilizando um fragmento de 5,0 mm da tíbia do rato doador das células da medula óssea. Deste modo, foi possível comparar os valores da densidade óptica em relação a uma matriz óssea mineralizada.

5.2-5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos foram expressos em média \pm desvio padrão. Para a comparação dos grupos, foram utilizadas análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para comparações pareadas. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Toda a análise estatística foi realizada com auxílio do *software* estatístico GraphPad Prism6.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. TESTES PRELIMINARES

6.1.1 CRISTALINIDADE DA HAp

A Figura 6.1a apresenta o difratograma obtido da hidroxiapatita utilizada neste trabalho. Através da comparação, foi possível confirmar a estrutura hexagonal pertencente ao grupo espacial $P6_3/m$ e as dimensões de célula unitária de $a=b=0,942$ e $c=0,688$ nm corresponde a HAp. Do mesmo modo, não foi constatada outra fase presente neste material. Através dos cálculos de cristalinidade e tamanho de cristalito, foram encontrados uma cristalinidade de 97% e tamanho de cristalito de 56,7 nm.

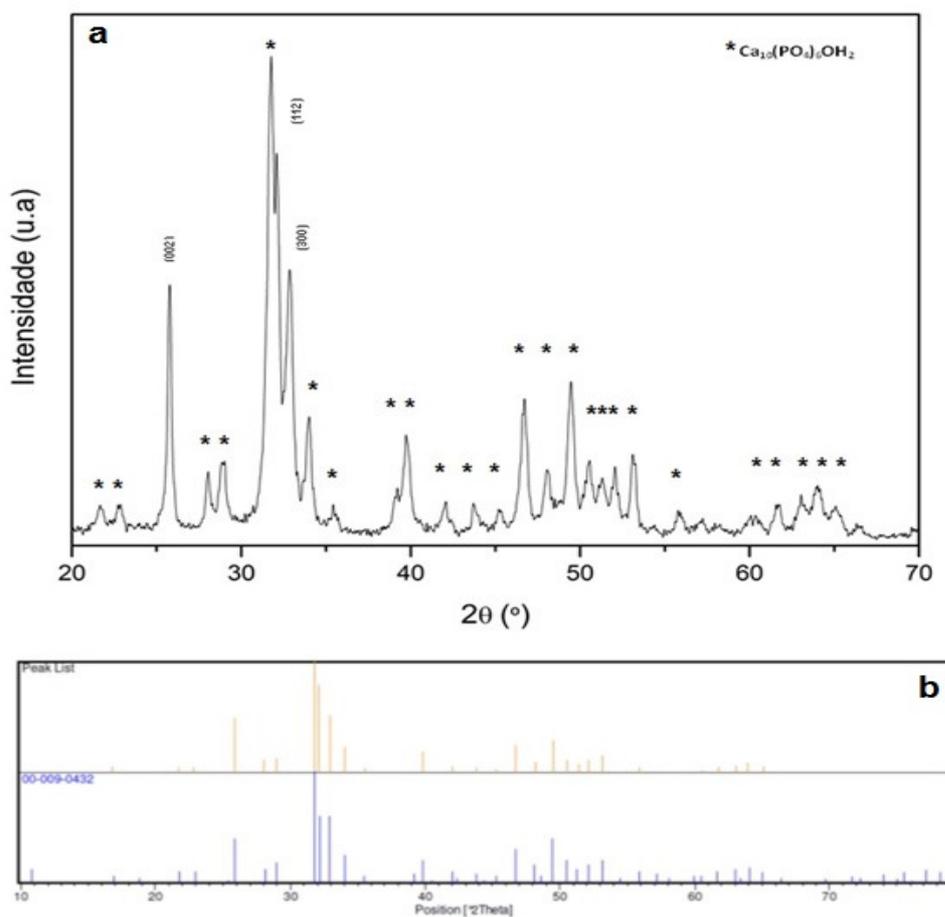


Figura 6.1. a) Difratograma da hidroxiapatita, b) comparação da hidroxiapatita utilizada com a ficha 09-0432 da JPCDS.

6.1.2 GRANULOMETRIA DA HAp

A distribuição do tamanho expressa em histogramas das partículas do pó de hidroxiapatita, bem como da fração do sobrenadante da solução de HAp utilizada para obtenção de fibras nanoestruturadas, são apresentadas respectivamente na Figura 6.2a e na Figura 6.2b. Ambas podem ser consideradas monomodais e com estreita distribuição de tamanho de partículas.

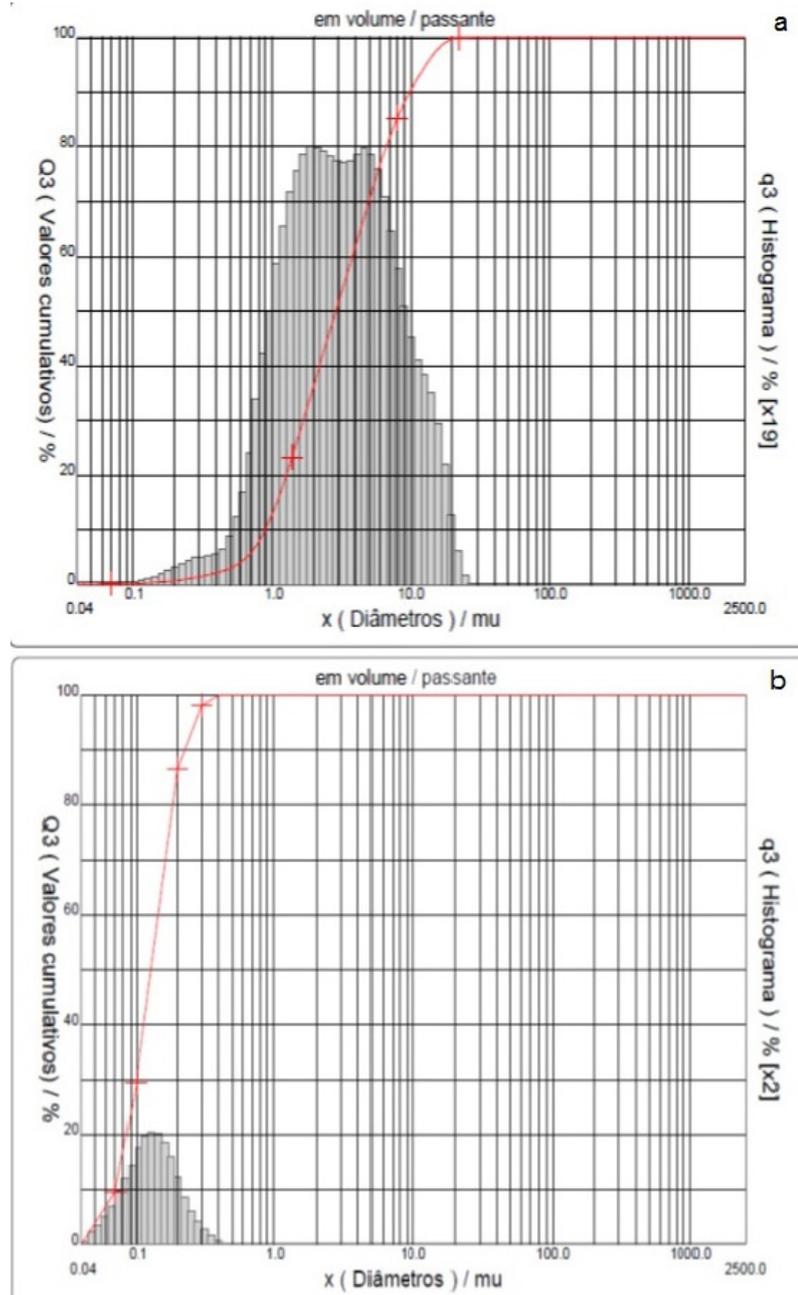


Figura 6.2. Distribuição de tamanho das partículas de HA utilizadas: a) na fabricação dos arcabouços microestruturados; e b) sobrenadante em solução para obtenção de fibras nanoestruturadas.

A Tabela 6.1 apresenta os valores correspondentes aos menores diâmetros a 10%, 50% e 90% e o diâmetro médio das partículas analisadas. Os resultados indicam que a HAp utilizada apresenta tamanho médio de partículas de ordem micrométrica (mHA) e nanométrica (nHA), no caso da fração do sobrenadante da solução de HAp, utilizada para obtenção de fibras nanoestruturadas C2. Isso está em concordância com a proposta deste trabalho de produzir arcabouços micro/nanoestruturados a partir da incorporação da HAp nas matrizes eletrofiadas de PHB.

Tabela 6.1 Tamanho médio das partículas de hidroxiapatita.

Amostras	D_{10} (μm)	D_{50} (μm)	D_{90} (μm)	$D_{\text{médio}}$ (μm)
mHA	0,89	2,89	9,83	4,26
nHA	0,07	0,13	0,23	0,14

Diversos estudos sobre sínteses de HAp mostram que a rota para obtenção e o processo de sinterização, bem como os percussores utilizados para a formação da HA, influenciam nas fases do produto final da HA (CATROS, 2010). Em se tratando de biomateriais, estas fases presentes podem influenciar na absorção da HA pelo organismo e tem fundamental importância quanto ao tempo de degradação do arcabouço utilizado para a regeneração tecidual. No entanto, a absorção da HAp também está relacionada à sua cristalinidade, a sua forma e a sua porosidade (GROVER, 2003; HORNEZ, 2007).

A HAp utilizada neste trabalho apresentou uma importância na inclusão de uma fase mineral nos arcabouços proporcionando um ambiente correspondente ao encontrado na matriz extracelular óssea. No entanto, o principal papel da HAp foi fornecer sítios específicos para as células-tronco ligarem-se aos arcabouços. Desta forma, avaliar a sua contribuição na interação células-material.

6.1.3. SELEÇÃO DOS ARCABOUÇOS

Os arcabouços que não foram selecionados são apresentados ao final deste trabalho no anexo A. Os critérios utilizados para a seleção de cada arcabouço foram:

Arcabouço de PHB: As membranas foram selecionadas, primeiramente, utilizando microscopia óptica sendo excluídas as membranas que continham contas ao longo das fibras (vazão 0,5 e 1,0 mL). Após, foi empregada a técnica de MEV para uma melhor caracterização morfológica das fibras e, desta forma, selecionar a membrana para a avaliação de biocompatibilidade

Arcabouço C1: A escolha da concentração foi baseada na homogeneidade da solução, ou seja, a não precipitação de HAp, uma vez que esta precipitação poderia influenciar no processo de eletrofiliação. A vazão foi escolhida através de critérios morfológicos, através da caracterização por MEV, na qual a distribuição de HAp apresentava-se mais homogênea ao longo das fibras.

Arcabouço C2: Após a visualização das membranas por MEV foi selecionada a membrana que apresentava nanopartículas de HAp precipitada ao longo das fibras.

6.2. CARACTERIZAÇÃO DOS ARCABOUÇOS

6.2.1. MORFOLOGIA DOS ARCABOUÇOS

Foram fabricados arcabouços utilizando a técnica de eletrofiliação para serem avaliados na etapa de biocompatibilidade. Os arcabouços deveriam mimetizar tanto quanto possível uma matriz extracelular óssea, apresentando adesão e permitindo a proliferação e diferenciação de células mesenquimais de rato nos arcabouços.

A escolha dos arcabouços foi realizada através de critérios morfológicos das estruturas das fibras. A Figura 6.3 apresenta o aspecto macroscópico dos arcabouços eletrofiados.

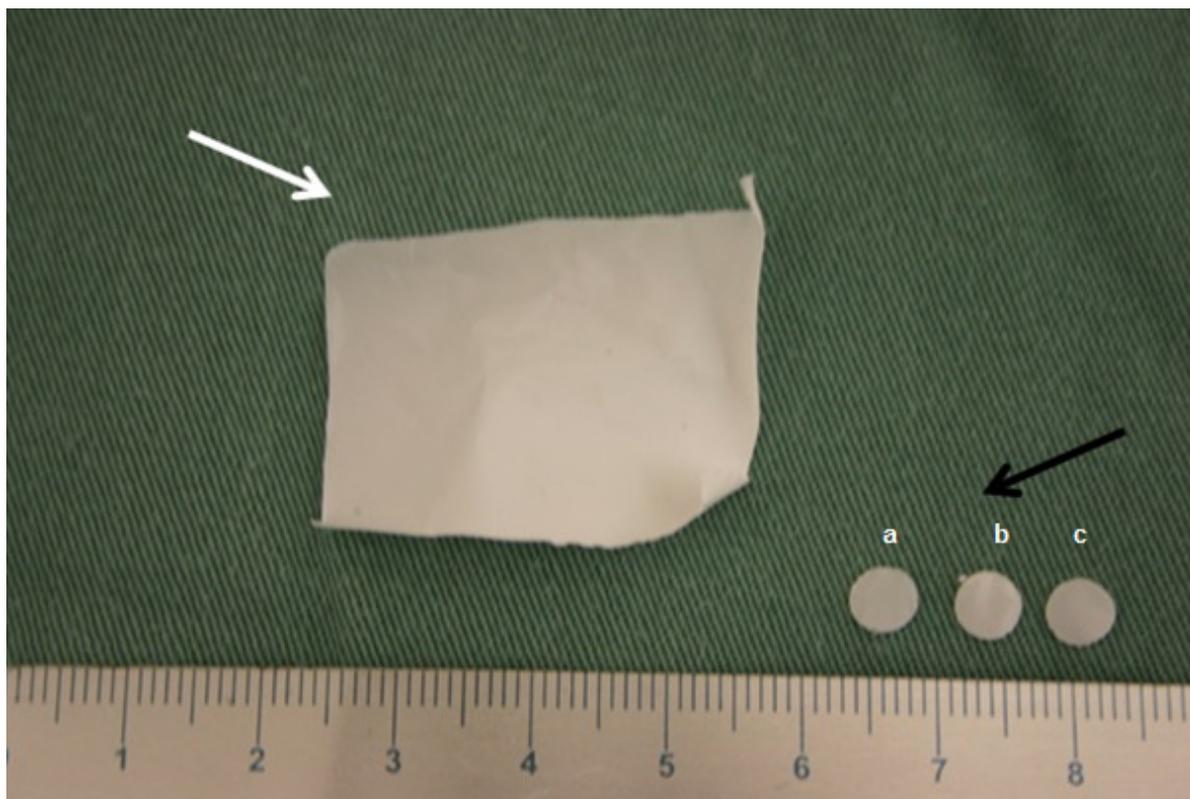


Figura 6.3. Imagem dos arcabouços. A seta branca indica uma fração da membrana eletrofiadas. A seta preta indica os arcabouços utilizados nas respectivas avaliações: (a) PHB, (b) C1 e (c) C2.

Foram selecionados três tipos de arcabouços, sendo dois deles compósitos. O primeiro, somente apresentando matriz orgânica, fibras de PHB, já os outros dois, compósitos deste polímero com a presença de hidroxiapatita. Nestes compósitos, são apresentadas duas morfologias básicas, uma microestruturada com contas de HAp dispersas na matriz orgânica, e a outra nanoestruturada no qual os cristais de HAp estão revestindo a matriz orgânica.

As Figura 6.4, Figura 6.5 e Figura 6.6 apresentam imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos arcabouços eletrofiados selecionados, correspondendo respectivamente ao arcabouço com fibras de PHB e dos compósitos C1 e C2.

Indistintamente, os arcabouços formados por fibras de PHB apresentam poros interconectados em uma estrutura 3D, e estão orientadas aleatoriamente. Junto às imagens das fibras em cada figura, está o gráfico de histogramas correspondente à determinação do tamanho médio obtido pela análise de imagem pelo *software*

ImageJ. Assim, os resultados indicaram um diâmetro médio das fibras de PHB de $0,552 \pm 0,152 \mu\text{m}$. As fibras dos compósitos C1 (Figura 6.4) e C2 (Figura 6.5) apresentaram respectivamente tamanhos médios de $0,627 \pm 0,190 \mu\text{m}$ e $0,668 \pm 0,134 \mu\text{m}$. Também pode-se observar que todos os arcabouços apresentam estruturas nanométricas ao longo das fibras.

Em se tratando do arcabouço C1, observou-se que ocorre a dispersão da HAp ao longo da membrana com formato de esfera de HAp. Além do mais, estas estruturas de ordem micrométrica apresentam um tamanho médio de $5,58 \pm 2,05 \mu\text{m}$. O arcabouço C1 também apresenta ao longo de suas fibras nHAp incorporadas, observado na imagem com maior aumento (Figura 6.5.c). Este maior aumento permitiu uma estimativa do tamanho das partículas sobre as fibras, atingindo um diâmetro médio da ordem de 64nm. No entanto, a maior parte da HAp está dispersa na matriz em formas de mHAp.

Em relação ao arcabouço C2, as nanoestruturas apresentam um diâmetro maior, cerca de 40 nm, se comparadas com a membrana de PHB. Este aumento está relacionado com a adsorção de nHAp na superfície da membrana eletrofiadas (Figura 6.6.c).

Para melhor comparação entre os diâmetros das fibras e suas estruturas a Figura 6.6 apresenta gráficos em forma de boxe com as médias e medianas referentes aos arcabouços.

Comparando a morfologia dos arcabouços de PHB e C1, pode-se notar que a adição da HAp na solução de *electrospinning* muda significativamente a estrutura dos arcabouços, no tocante à quantidade de fibras por volume em toda a extensão da matriz eletrofiadas, e conseqüentemente, proporcionou um aumento no tamanho dos poros entre as fibras.

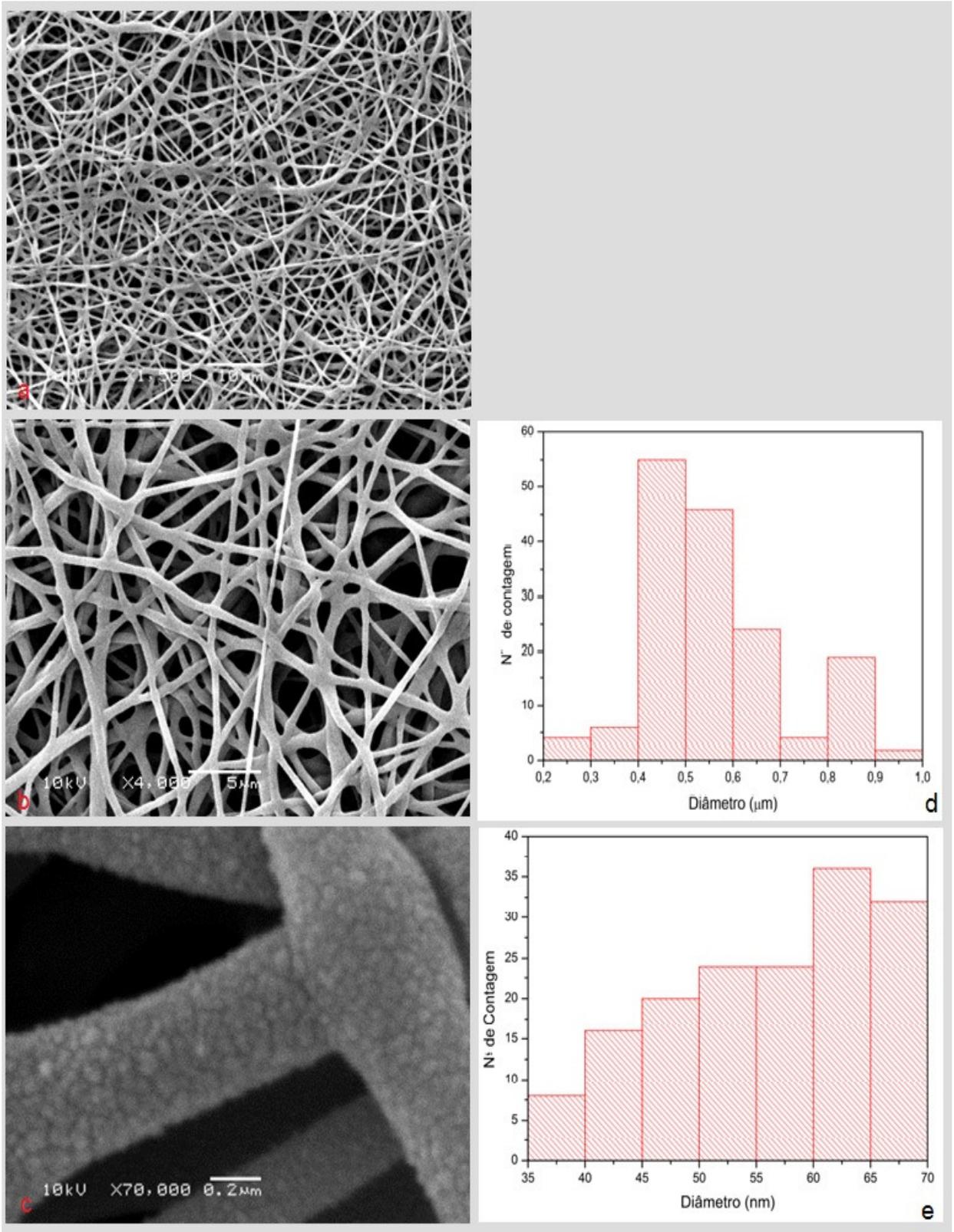


Figura 6.4. Imagens obtidas por microscopia eletrônica da fibra C1. a-b) morfologia das fibras c) disposição da nanotextura ao longo das fibras, d) Espectro de EDS do arcabouço-e-f) distribuição do diâmetro das fibras e das nanoestruturas (e)

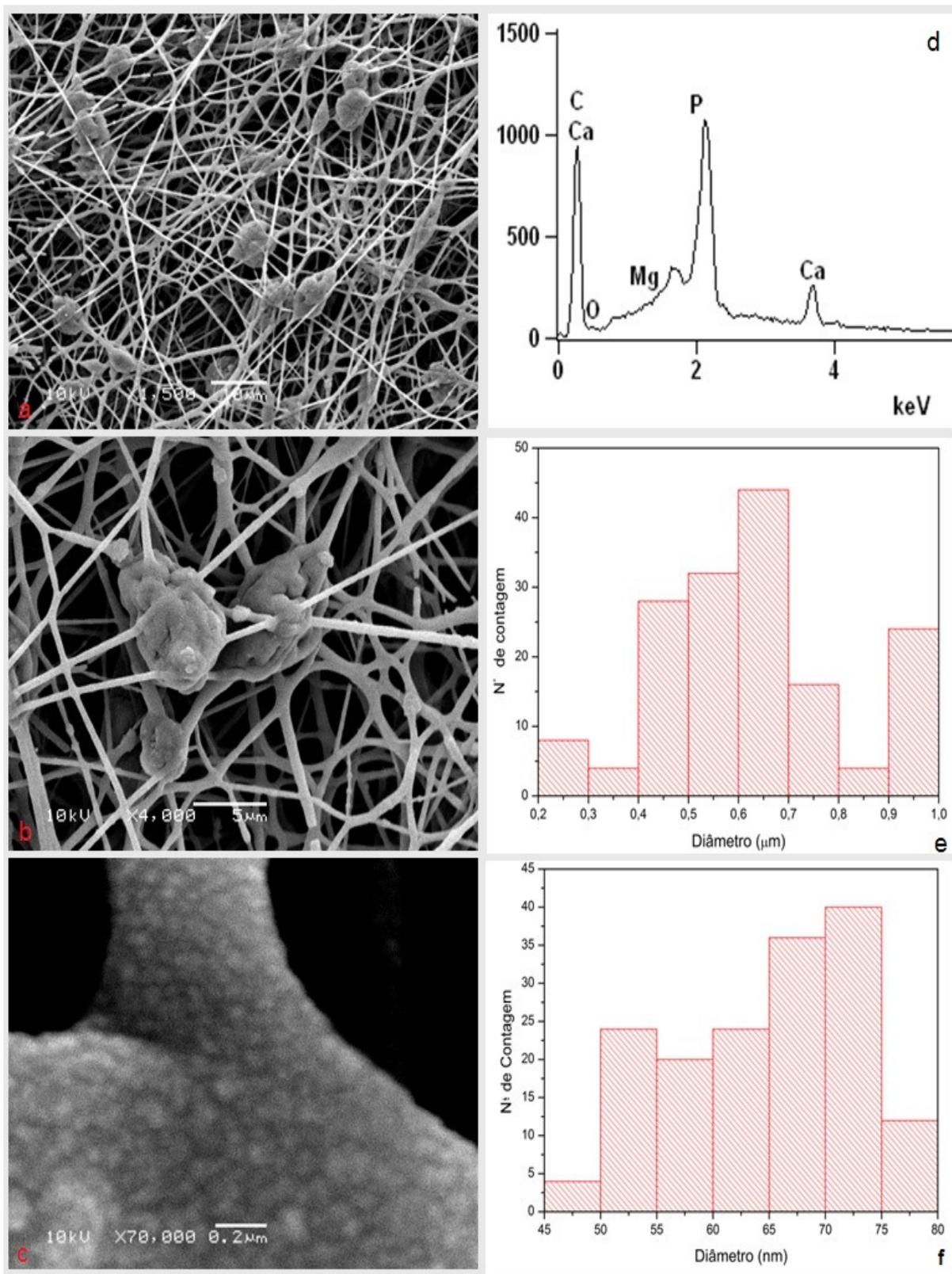


Figura 6.5. Imagens obtidas por microscopia eletrônica da fibra C1. a-b) morfologia das fibras c) disposição da nanotextura ao longo das fibras d) Espectro de EDS do arcabouço-e-f) distribuição do diâmetro das fibras e das nanoestruturas (e)

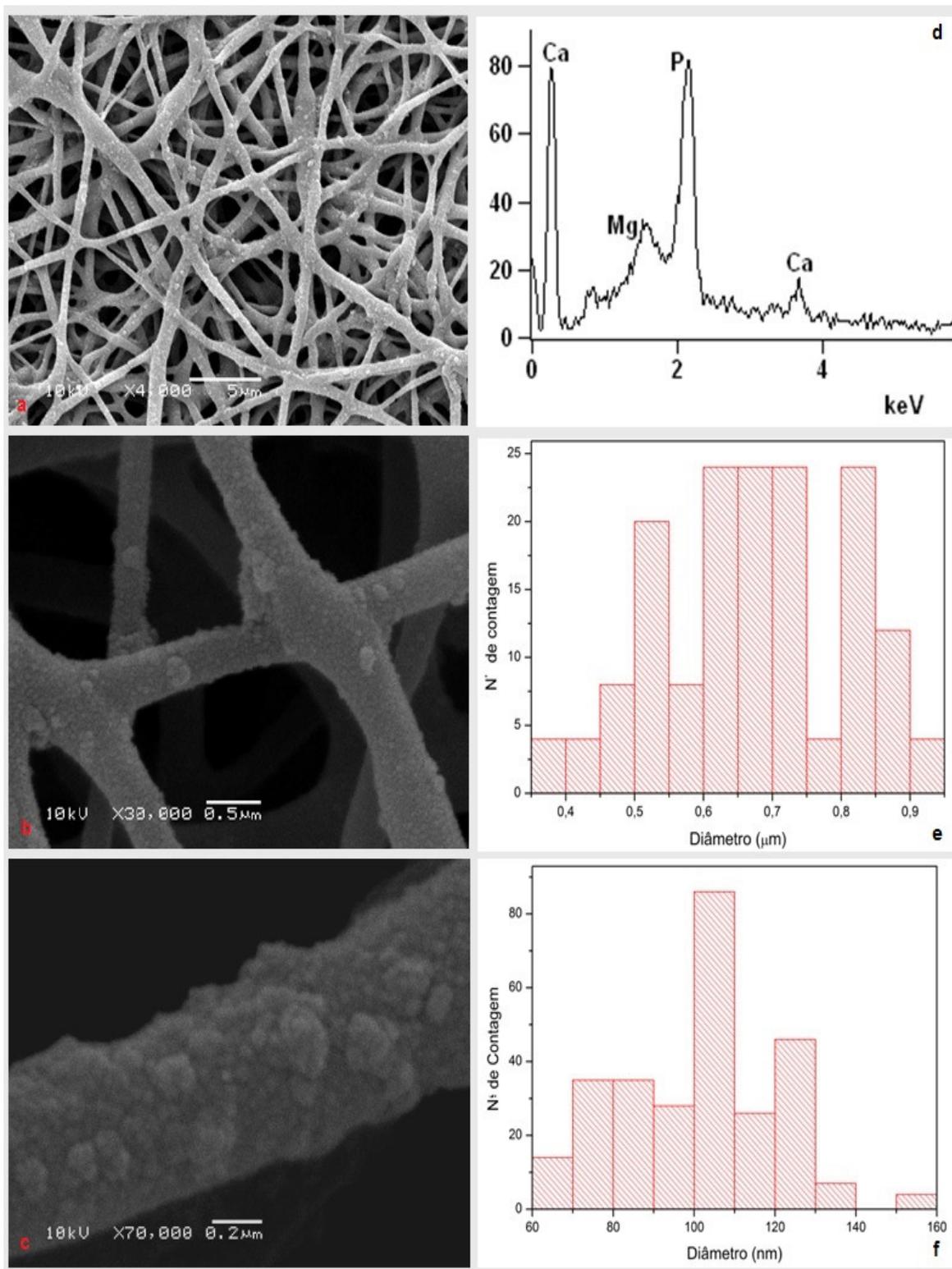


Figura 6.6. Imagens obtidas por microscopia eletrônica da fibra C2. a-b) morfologia das fibras c) disposição da nanoestrutura ao longo das fibras d) Espectro de EDS do arcabouço-e-f) distribuição do diâmetro das fibras e das nanoestruturas (e)

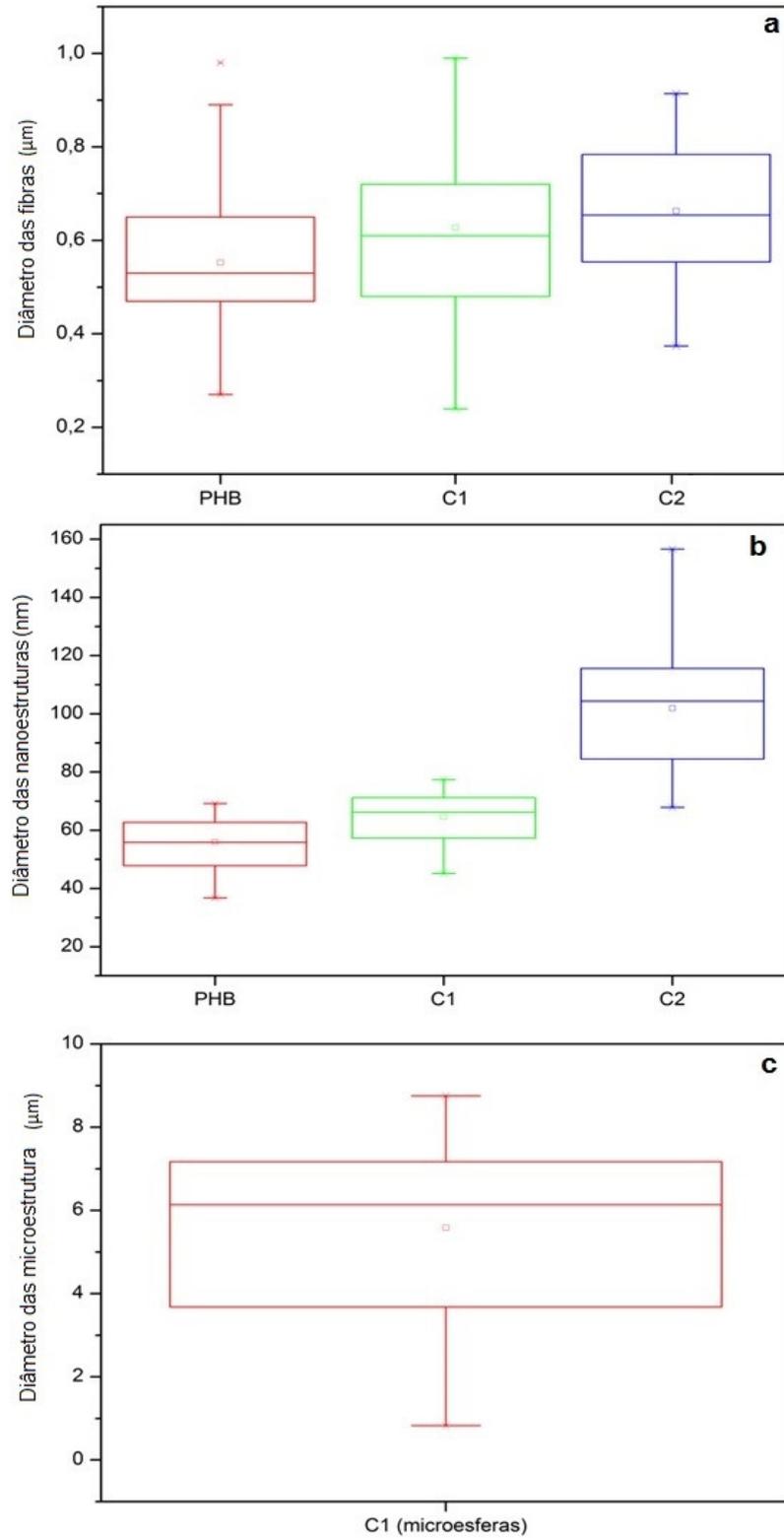


Figura 6.7. Distribuição dos diâmetros das micro e nanoestruturas das fibras de PHB, C1 e C2: a) diâmetro das fibras, b) diâmetro das nanoestruturas e c) diâmetro da microestrutura do C1. Os quadrados dentro dos boxes são referentes à média e a linha referente à mediana

A presença de HAp ao longo da superfície das fibras foi confirmada pela análise de EDS (Figura 6.5d e Figura 6.6d). A hidroxiapatita apresentou razão molar de Ca/P de 1,67. Também pela análise de EDS, pode-se notar o aparecimento de magnésio, < 2,0 % o qual pode ser encontrado nas HAp sintéticos ou naturais, devido a substituição do átomo de Ca^{+2} pelo átomo de Mg^{+2} .

Segundo Megelski (2010), uma maneira de formar na superfície das fibras eletrofiadas nanoestruturas, é através da utilização de solventes com diferentes pontos de ebulição e constante dielétricas. Durante o evento da evaporação do solvente, a solução torna-se termodinamicamente instável, levando a separação de fases: uma fase rica em polímero e uma fase deficiente de polímero.

O clorofórmio é um dos poucos solventes que solubiliza o PHB, seu ponto de ebulição e contante dielétrica são baixos, o que leva à rápida cristalização do PHB no processo de eletrofiação (CORREIA, 2013). Em contra-partida, a dimetilformamida (DMF) é um solvente dipolar aprótico, que tem a constante dielétrica e o ponto de ebulição elevados.

No processo de eletrofiação, a pressão de vapor do solvente desempenha um papel crítico na determinação da taxa de evaporação e no tempo de secagem. A volatilidade do solvente influencia o processo de separação de fases e a cristalização, desempenhando um papel significativo na formação das nanoestruturas. Estruturas de nanoporos e nanotextura na superfície das fibras foram relatadas devido a esse processo de separação de fases (BOGNITZKI, 2001; WANG, 2009; BHARDWAJ, 2010).

Nos experimentos realizados, a adição de DMF na solução polimérica provavelmente reduziu sua pressão de vapor. Conseqüentemente, diminuiu a evaporação do solvente a partir dos jatos, permitindo que os jatos permanecessem carregados e estirados como fibras. Desta maneira, a rápida evaporação do clorofórmio induziu a separação de fases, e o colapso resultante da pressão ambiente e repulsão elétrica reduzida permitiu a formação das nanoestruturas das fibras.

Lin *et al.* (2010) apresentou uma abordagem direta para a fabricação de nanoporos via *electrospinning* em fibras de polímero de poliestireno (PS), fibras com micro e nanoporos, tanto no núcleo, quanto sobre as superfícies, bem como estruturas rugosas na superfície das fibras. As estruturas foram produzidas variando as composições dos solventes e as concentrações das soluções de PS. O estudo relatou que a utilização de solvente altamente volátil no processo de eletrofição favoreceu a produção de nanoestrutura nas fibras.

A importância da mineralização dispersa nas superfícies reside no fato de que as estruturas que contêm cálcio podem expor maior número de sítios de ligação, em virtude da sua maior área superficial para adsorção de biomoléculas (BARBIERI, 2013).

Chae *et al.* (2009) obtiveram fibras eletrofiadas de alginato com HA amorfo. A nucleação da HA foi induzida pela ligação entre os grupos COO^- do alginato e o Ca^{2+} proveniente da HA. Em seu trabalho, observaram que ocorreu uma maior adesão e proliferação de osteoblastos de rato nos compósitos HA/alginato quando comparados aos arcabouços de alginato puro.

A dissociação dos grupos $-\text{COOH}$ e $-\text{OH}$, presentes nos poliésteres PLGA/PLA, forma cargas negativas as quais servem de sítios de nucleação de íons de cálcio na superfície do arcabouço (CHEN, 2005; NGIAM, 2009). Conseqüentemente, como a estrutura do PHB é similar a destes poliésteres, apresentando ambos os grupos, pode-se esperar que sejam formados sítios de nucleação do íon cálcio, tornando possível o recobrimento uniforme da HAp sobre a superfície das fibras que formam o arcabouço.

A incorporação de características nanotopográficas ao projetar a arquitetura da superfície do arcabouço, a fim de mimetizar a nanoestrutura do osso natural, é uma área de intensa investigação na Engenharia Tecidual óssea (STEVENS, 2005; BERRY, 2006). A rugosidade da superfície aumenta a reatividade para o estabelecimento da ligação mediada pelas integrinas, intensificando a proliferação e a diferenciação celular (YUAN, 1999; SIMON, 2003).

6.2.2. ÁREA SUPERFICIAL ESPECÍFICA E TAMANHO DE MESOPOROS

A Tabela 6.2 apresenta os diâmetros dos poros e a área superficial específica dos arcabouços investigados. Nota-se que todos os arcabouços apresentam poros que podem ser classificados como mesoporos (poros com diâmetro entre 2 e 50nm). Para os arcabouços compósitos PHB+HA, o volume total e diâmetro médio dos mesoporos foram afetados pela presença da HA, independente desta ser micro ou nanométrica. De fato, para arcabouços de fibras PHB+HAp, C1 e C2 a área superficial aumentou mais de 200% e quase 100% respectivamente, em relação a área do arcabouço PHB sem HAp. O aumento foi bastante significativo também quanto ao volume dos mesoporos e tamanho médio dos mesoporos.

Tabela 6.2. Área superficial e volume e tamanho dos mesoporos.

Amostras	Área superficial específica S_{BET} (m²/g)	Volume dos mesoporos (cm³/g)	Diâmetro dos mesoporos (nm)
PHB	2,5	0,015	4,4
C1	7,1	0,047	12,3
C2	4,9	0,048	12,5

Os mesoporos encontrados no arcabouço PHB pode ser relacionado aos vazios encontrados entre as nanoestruturas na superfície das fibras que desta forma contribuiu para a formação dos mesoporos.

Deve-se salientar que o fato de as membranas apresentarem mesoporos potencializa seu uso como adsorbentes de fármacos e moléculas de interesse específico, direcionando a regeneração e modulando a resposta imune do biomaterial.

6.2.3. ANÁLISE DE FASES POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

A técnica de espectroscopia Raman foi utilizada para investigar a incorporação da HA na matriz dos compósitos. O espectro da hidroxiapatita é observado na Figura 6.8, apresentando as bandas referentes aos grupos fosfatos de acordo com o encontrado na literatura (CUKROWSKI, 2007).

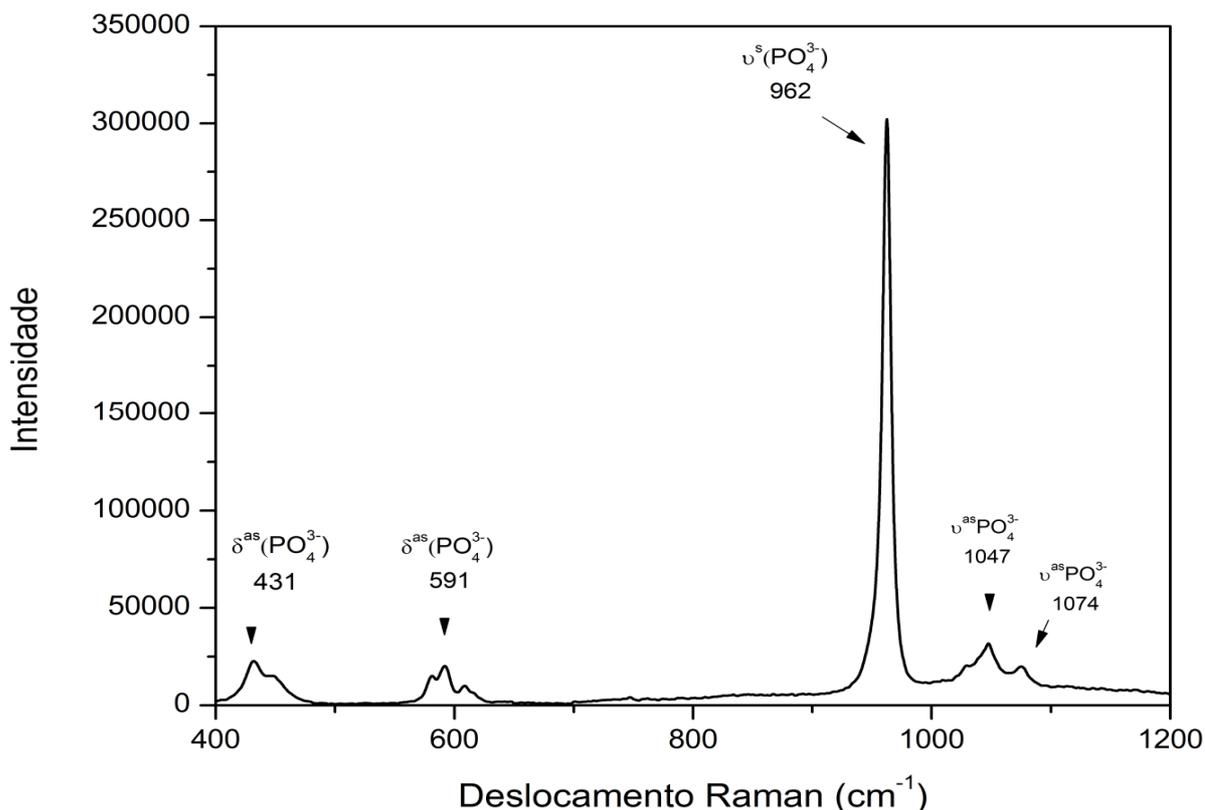


Figura 6.8. Espectro Raman da hidroxiapatita apresentando as bandas referentes aos grupos fosfatos. δ: deformação, ν: estiramento, s: simétrico, as: assimétrico.

A Figura 6.9 apresenta um espectro Raman dos arcabouços C1 e C2, incluindo para efeito de comparação o espectro do arcabouço PHB. A fração orgânica dos arcabouços está representada pelas bandas características do polímero PHB nas regiões de 433 cm⁻¹, 599 cm⁻¹, 840cm⁻¹ e 1058cm⁻¹. As bandas referentes à HAp são a banda 430 cm⁻¹, referente a deformação assimétrica do PO₄ da hidroxiapatita e a da região entre 550-600 cm⁻¹, que se sobrepõe às bandas

referentes à deformação dos grupo -CCO- e -C-CH₃, respectivamente, do polímero PHB (FURUKAWA, 2006).

No espectro do arcabouço C2, os picos referentes à HAp encontram-se com uma menor intensidade quando comparados aos picos de HAp do arcabouço C1. Isso se deve provavelmente pela menor concentração de HAp no arcabouço C2.

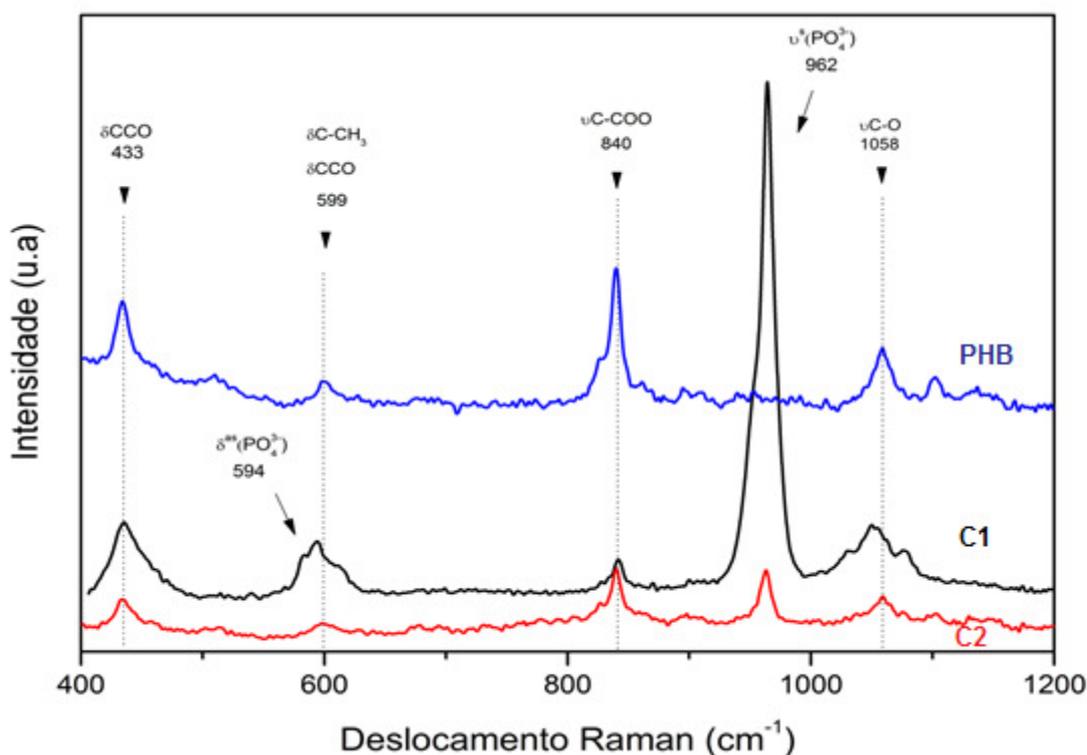


Figura 6.9. Espectro Raman dos arcabouços demonstrando as bandas referentes aos grupos da hidroxiapatita e do polímero PHB. δ: deformação, ν: estiramento, s: simétrico, as: assimétrico.

6.2.4. TEOR DE HIDROXIAPATITA NOS ARCABOUÇOS

A Figura 6.10 apresenta a curva de perda de massas dos arcabouços quando submetidos a análise termogravimétrica em atmosfera de ar sintético. Pelos dados da análise termogravimétrica, foi possível calcular o teor de HA efetivamente presente nos arcabouços C1 e C2. A Tabela 6.3 apresenta os valores de massa remanescente, inicial e final de decomposição do polímero. Os valores encontrados foram aproximadamente 35% e 11%, respectivamente. Esses valores já

têm descontados a massa remanescente de 5% acima de 300°C, provavelmente cinzas, do polímero PHB.

Também pode-se notar que a incorporação da hidroxiapatita no arcabouço C1 e C2 quando comparado ao arcabouço PHB contribuiu para o aumento da temperatura de degradação de ambos os arcabouços.

Pode se observar que nenhum arcabouço teve perda de massa significativa até a temperatura de 200°C, o que é um indicativo de que o solvente utilizado na fabricação das fibras foi praticamente evaporado em sua totalidade durante o processo de *eletrospinning*.

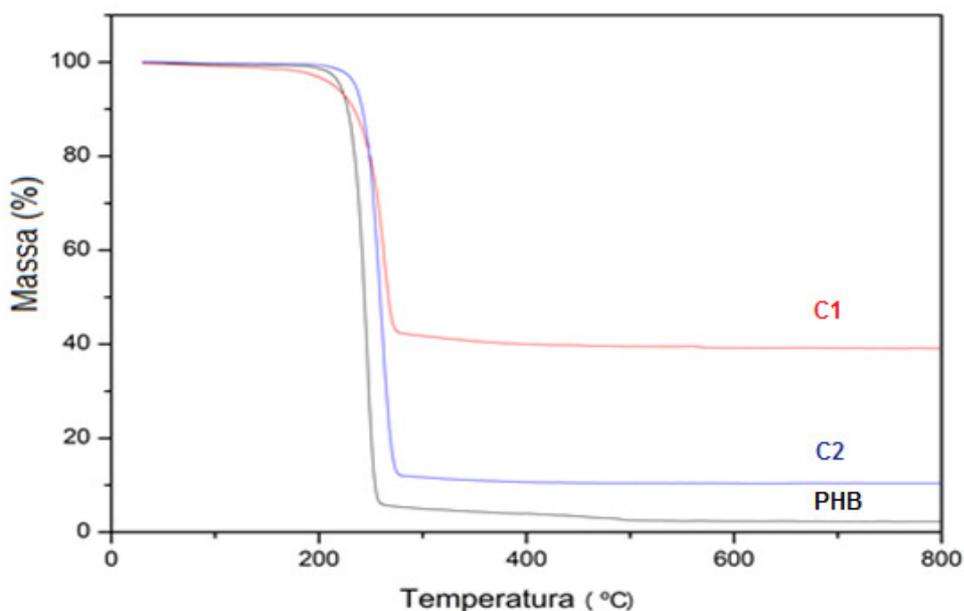


Figura 6.10. Curva ATG de perda de massa em relação à temperatura dos arcabouços em atmosfera de ar sintético.

Tabela 6.3. Temperatura de degradação dos arcabouços

Arcabouço	$T_{inicial}$ (°C)	T_{final} (°C)	Massa remanescente (%)
PHB	235	252	5
C1	246	270	40
C2	243	268	11

6.2.5. CARACTERÍSTICAS VISCOELÁSTICA DOS ARCABOUÇOS

As curvas das análises DMA dos arcabouços PHB, C1 e C2 são apresentadas respectivamente nas Figura 6.11, Figura 6.12 e Figura 6.13. Os módulos de armazenamento encontrados para os arcabouços foram: 424, 26 e 28 MPa para o PHB, C1 e C2, respectivamente.

Os resultados indicam que incorporação de HAp nos arcabouços contribuiu para a diminuição da propriedade viscoelástica do polímero PHB, representada pela diminuição dos módulos de armazenamento e de perda dos arcabouços. De fato, o arcabouço PHB apresentou um módulo de armazenamento muito maior, mais de dez vezes, quando comparado com os módulos de armazenamento dos compósitos C1 e C2.

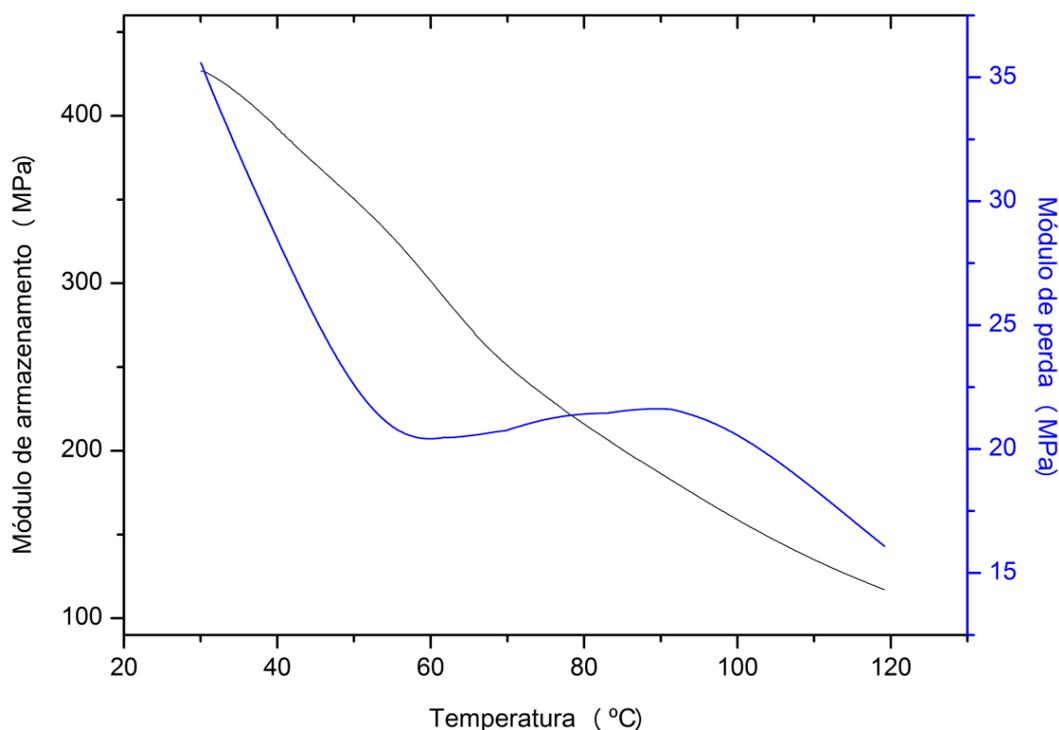


Figura 6.11. Curva da análise dinâmico-mecânica do arcabouço PHB: módulo de armazenamento e módulo de perda em função da temperatura.

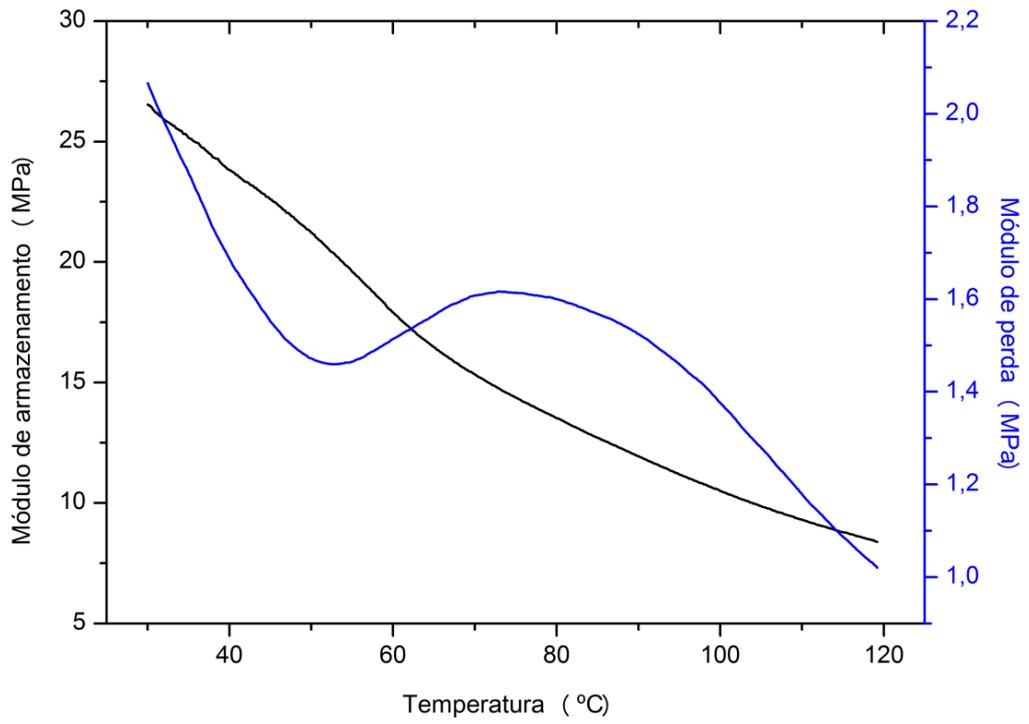


Figura 6.12. Curva da análise dinâmico-mecânica do arcabouço C1: módulo de armazenamento e módulo de perda em função da temperatura.

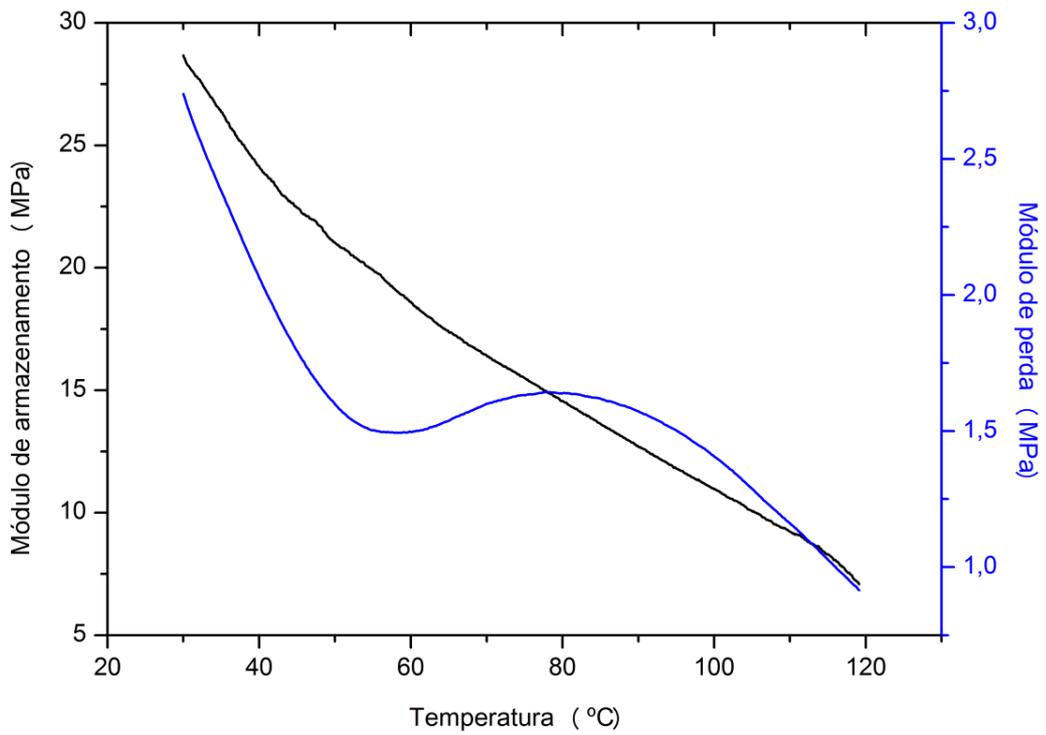


Figura 6.13. Curva da análise dinâmico-mecânica do arcabouço C2: módulo de armazenamento e módulo de perda em função da temperatura.

A diminuição dos módulos de armazenamento e de perda nos arcabouços C1 e C2 pode estar relacionada com o efeito plastificante da HAp quando incorporada nos materiais. Também, pode-se inferir que através deste efeito, como mostrado na Figura 6.14, ocorreu uma interação dos grupos carbonila do PHB com o Ca^{2+} da HAp, como observado por outros autores que avaliaram as interações intermoleculares entre os grupos carbonila de poliéster e o Ca^{2+} da HAp (CHEN, 2005; NGIAM, 2009)

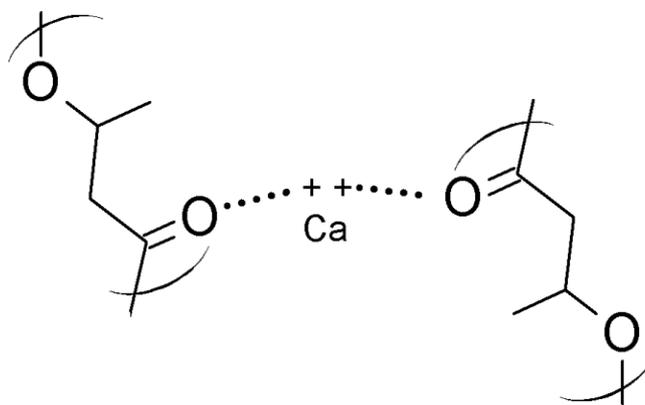


Figura 6.14. Intereção do íon cálcio com os grupos carbonilas do PHB.

6.3 FENOTIPAGEM DA POPULAÇÃO DAS CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA

A caracterização fenotípica das células mononucleares da medula óssea utilizadas foi realizada por citometria de fluxo e indicou que 6,55% das células apresentam marcador CD45, CD3 1,77%. O CD49b estava presente em 4,82% das células e o CD90 estava presente em 23,55% das células. Os resultados estão expressos em forma de histograma e estão apresentados na Figura 6.15.

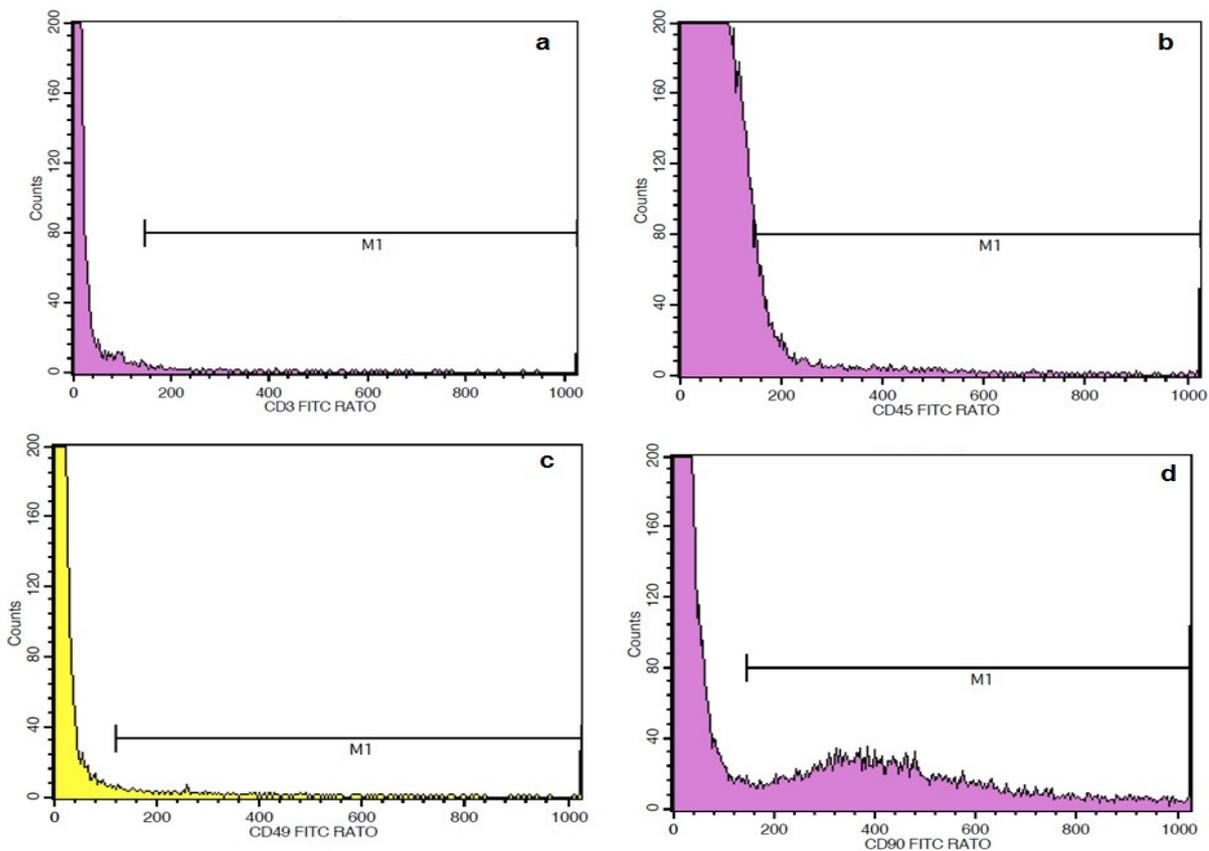


Figura 6.15. Histograma apresentando a caracterização imunofenotípica das células-tronco. Em a) CD3; b) CD45; c) CD49b e d) CD90.

6.4. INTERAÇÃO CÉLULA-MATERIAL

6.4.1. CITOTOXICIDADE

O ensaio colorimétrico de viabilidade celular utilizando sal de tetrazólio é baseado na capacidade das células viáveis reduzirem o sal de tetrazólio em compostos formazan, produzindo uma coloração violeta que pode ser quantificada em espectrofotômetro. O valor da densidade óptica está diretamente relacionado ao número de células viáveis. Desta maneira, torna-se útil para avaliar a citotoxicidade.

Os dados da viabilidade celular nos períodos de 3, 7 e 14 dias são apresentados na Figura 6.16. Os resultados da citotoxicidade dos arcabouços após 3, 7 e 14 dias indicou que todos os arcabouços apresentaram viabilidade celular maior que 79%, sendo esta a apresentada pelo arcabouço de PHB após 3 dias

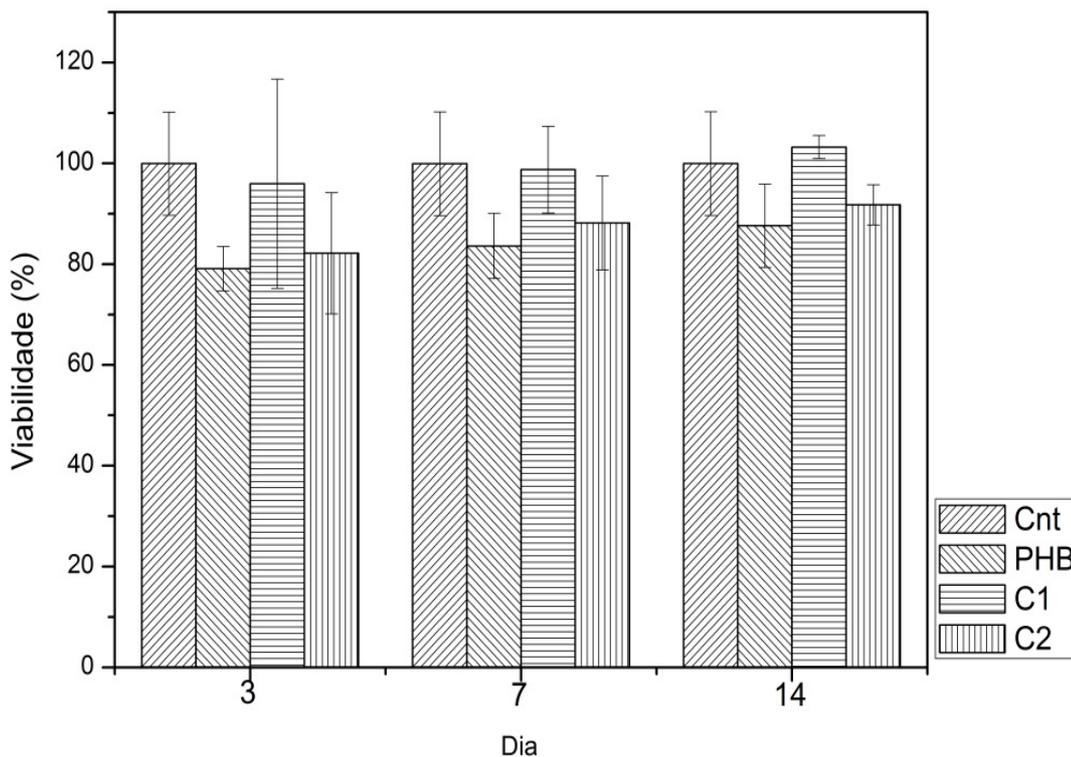


Figura 6.16. Avaliação da citotoxicidade dos arcabouços.

Segundo a norma ISO 10993-5, para avaliação *in vitro* de dispositivos médicos, compostos que apresentam viabilidade celular > 80% são considerados de pouca ou nenhuma citotoxicidade, sendo bons candidatos para uso médico. Conforme a Tabela 6.4 da norma ISO 10993-5, todos os materiais apresentam uma leve citotoxicidade.

Tabela 6.4. Classificação de citotoxicidade segundo a norma ISO 1099-5.

	Viabilidade celular (%)*
Citotoxicidade	Faixa
Não -citotóxico	> 90
Levemente citotóxico	80 a 89
Moderadamente citotóxico	50 a 79
Severamente citotóxico	< 50

* porcentagem em relação ao controle

De maneira geral, todos os materiais implantados geram uma resposta imunológica, quer seja pelo material, quer seja pelo processo cirúrgico. Dependendo desta resposta, o implante terá sucesso em sua função ou pode ser rejeitado ou encapsulado. Apesar dos arcabouços investigados apresentarem uma resposta citotóxica leve, esta pode trazer benefícios no processo de cicatrização e remodelamento do tecido na área implantada. Estudos recentes, mostram que além das células-tronco serem atraídas aos locais de injúria tecidual, por intermédio de quimiocinas, elas também podem modular a resposta inflamatória no local (DAZZI, 2006; SCHEIBE, 2012).

A análise *in vitro* da viabilidade celular é o primeiro passo para avaliar a biocompatibilidade de um biomaterial. No entanto, outras características dos biomateriais também são importantes quando se avalia o sucesso destes quando implantados. Um aspecto muito importante é a adesão celular.

6.4.2. ADESÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR

A importância da adesão está relacionada à finalidade para qual se pretende utilizar o biomaterial. Aqui, sua importância é significativa, pois se trata de arcabouços utilizados em Engenharia Tecidual, onde se visa a regeneração e o remodelamento de tecidos duros ou moles. Isto se difere de dispositivos utilizados em contato com o tecido sanguíneo, onde a adesão celular pode levar ao acúmulo de plaquetas e células responsáveis pela coagulação, e deste modo inviabilizar a utilização do biomaterial.

Assim, nos arcabouços a adesão celular é um importante parâmetro pelo qual superfícies podem ser avaliadas para determinar a adequação para o uso proposto como biomateriais na Engenharia Tecidual. A capacidade da célula em aderir e proliferar-se sobre a superfície do material é a primeira fase de interação célula-material (EL-AMIN, 2003).

Desta forma, foi analisada a adesão e proliferação de células-tronco mesenquimais de rato nos arcabouços micro e nanoestruturados e seus compósitos. Para tanto, foram avaliados três períodos: 3, 7 e 14 dias, após esses períodos, as células foram fixadas e coradas com Azul de Toluidina e visualizadas em

microscópio óptico para observar a adesão das células, bem como sua morfologia, que foram comparadas ao grupo controle - células cultivadas sobre a placa de cultura. Igualmente, foi avaliada a proliferação das células nos períodos citados através da comparação entre os grupos e períodos. A proliferação foi avaliada utilizando o ensaio de MTT nas células aderidas nos arcabouços, permitindo determinar a taxa de proliferação das células aderidas quando comparada ao grupo controle.

A Figura 6.17 apresenta um gráfico de proliferação dos arcabouços nos períodos de tempo investigados. Como a adesão e a proliferação são características que estão intimamente interligadas na interação célula-material, elas serão discutidas em conjunto, para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos.

Observa-se que em todos os períodos as células proliferam, mostrando excelente atividade celular. Quando comparado à proliferação entre os dias para cada grupo, foi encontrada uma diferença estatística no grupo controle no dia três, quando comparado aos dias sete e quatorze. Ao contrário do grupo PHB, que apresentou uma diferença significativa na proliferação nos dias três e sete quando comparado ao dia quatorze. Ambos os compostos mostraram somente diferença estatística no dia três comparado ao dia quatorze.

No entanto, quando os grupos foram comparados entre eles em cada período, observa-se uma diferença na proliferação do grupo PHB no dia três em relação aos grupos controle no dia sete e para ambos os arcabouços e grupo controle no dia quatorze. Nos demais períodos, e grupos, não foram encontradas diferenças significativas.

Observando o gráfico da proliferação, nota-se que o grupo PHB apresenta baixa proliferação nos períodos de três a sete dias. Essas curvas podem ser explicadas pelas características da célula e da interação desta com a superfície do arcabouço PHB. Também encontra-se uma diminuição na proliferação do grupo controle entre os dias sete e quatorze.

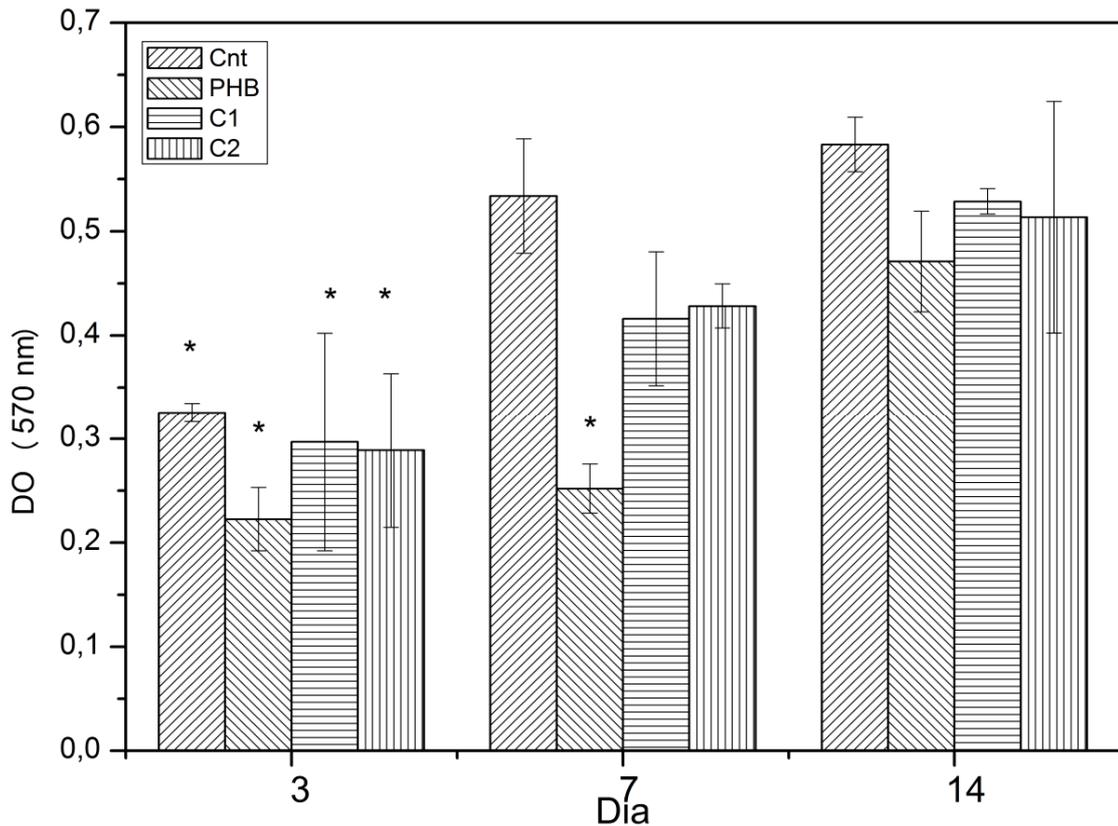


Figura 6.17. Taxa de proliferação celular, densidade óptica em função do tempo de cultivo (* $p < 0,05$; $n=3$).

Em se tratando do grupo controle, a diminuição da proliferação pode ser atribuída à alta densidade celular encontrada no dia sete, que se observa melhor na microfotografia das células coradas do controle no dia sete. Esta alta densidade pode ter contribuído para a diminuição da proliferação das células na superfície do poço na placa de cultura, na qual se pode notar uma confluência das células. Deste modo, a falta de espaço para as células crescerem pode ter acarretado a diminuição da atividade mitótica.

A atividade mitótica é um mecanismo encontrado nas células eucarióticas que ajuda a manter o equilíbrio nos tecidos, permitindo o crescimento organizado, evitando o crescimento descontrolado e o surgimento de neoplasias. Um dos fatores que desencadeia o mecanismo é a inibição da proliferação celular por contato entre as células, quando estas se encontram em alta densidade.

Logo, para o grupo PHB, a superfície deste polímero pode ter contribuído para a diminuição da adesão celular. Devido provavelmente à hifrofobicidade do

PHB, houve uma menor adesão das células e, conseqüentemente uma menor taxa na proliferação nos períodos iniciais. No entanto, observa-se que as células proliferam até o dia 14. Estudos mostram que o balanço entre grupos hidrofílicos e hidrofóbicos contribui para uma melhor adesão celular (OLMEDILLA, 2006).

Deste modo, com a adição de HAp nos arcabouços C1 e C2 houve uma diminuição da hidrofobicidade do polímero PHB, devido à contribuição da hidrofobicidade da HAp, contribuindo para uma melhor adesão das células. No entanto, a proliferação celular permanece discreta nos grupos C1 e C2, ao longo dos períodos, porém é constante. Essa singular proliferação das células sobre os arcabouços C1 e C2 pode estar ligada ao comprometimento das CTMs em linhagem osteoprogenitora.

Até o terceiro dia de cultura, ambos os grupos apresentaram praticamente a mesma densidade celular e não produziram uma matriz mineralizada, como será visto no item 6.3.3. Após o terceiro dia, inicia-se a formação da matriz mineralizada nos arcabouços C1 e C2 e há uma diminuição na taxa de proliferação celular, quando comparada ao controle.

A diminuição na taxa de proliferação pode estar associada à perda do caráter de auto-renovação, característica das células-tronco, levando a uma diminuição na cinética da divisão das células aderidas nos compósitos. O mesmo não é observado no arcabouço PHB, pois as células, depois do dia sete, apresentam uma taxa de proliferação elevada.

As Figura 6.18, Figura 6.19 e Figura 6.20 apresentam imagens obtidas por microscopia ótica das células aderidas nos arcabouços e no grupo controle nos períodos estudados.

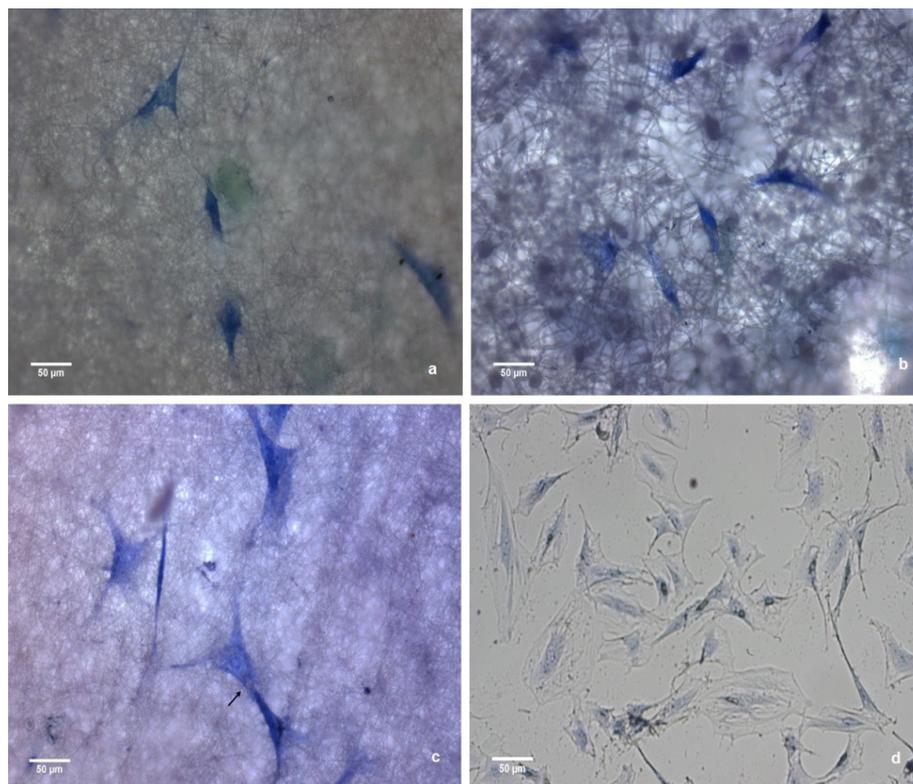


Figura 6.18. Cultura no dia 3 mostrando as células tronco-mesenquimais aderidas nos arcabouços a) PHB; b) C1; c) C2 e d) controle. As células estão coradas com Azul de Toluidina.

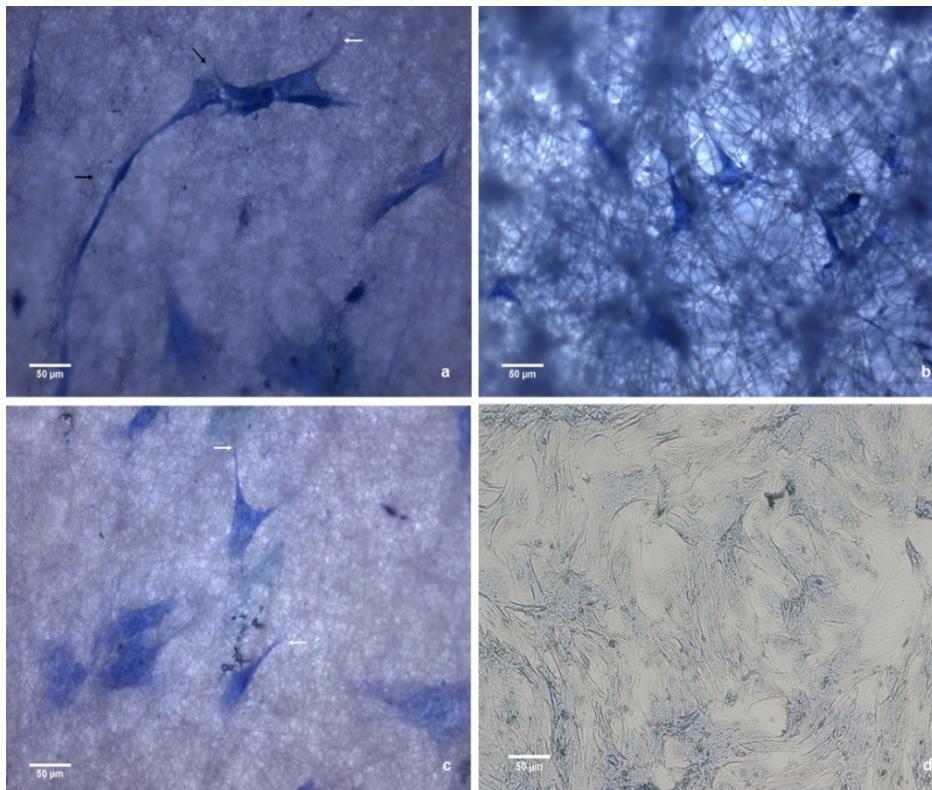


Figura 6.19. Cultura no dia 7 mostrando as células tronco-mesenquimais aderidas nos arcabouços a) PHB; b) C1; c) C2 e d) controle. As células estão coradas com Azul de Toluidina.

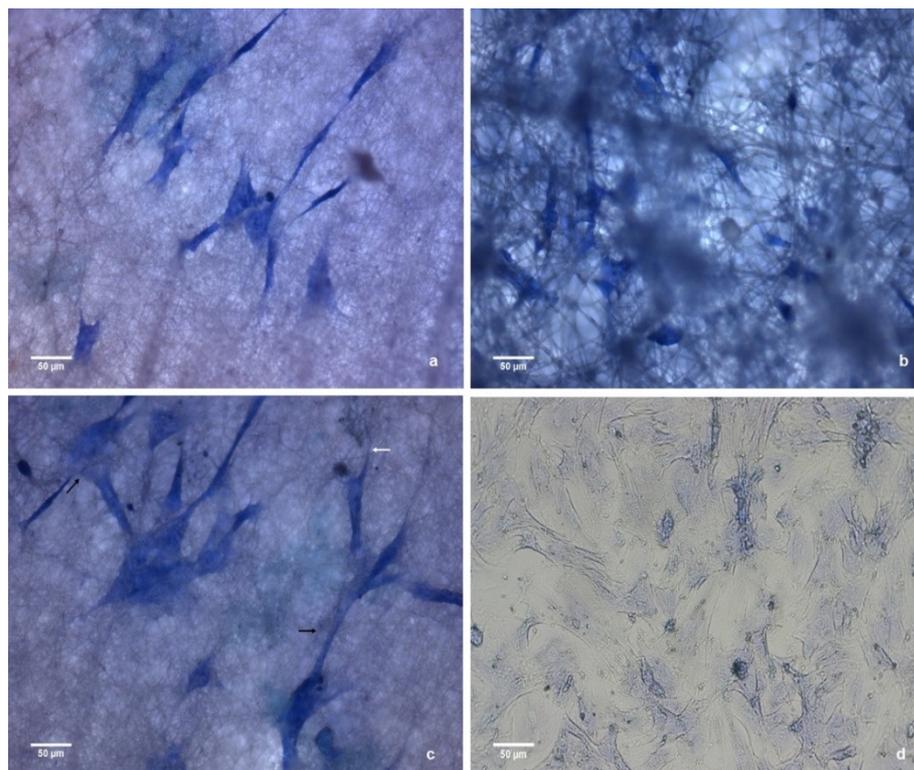


Figura 6.20. Cultura no dia 14 mostrando as células tronco-mesenquimais aderidas nos arcabouços a) PHB; b) C1; c) C2 e d) controle. As células estão coradas com Azul de Toluidina.

Constata-se que as células nos arcabouços apresentam morfologia similar a do grupo controle, apresentam características de células aderidas, morfologia estrelada. Também, é vista a interação entre célula-célula, e que elas estão espalhadas sob a superfície dos arcabouços, isso devido aos prolongamentos citoplasmáticos que estão indicados com setas pretas. Observa-se, principalmente no arcabouço C1, que as células estão no interior da matriz. Como foi visto pelas imagens do MEV, as mHAp dispersas na matriz eletrofiadas diminuem o número de fibras, formando um maior espaço entre elas, e conseqüentemente, há um aumento nos tamanho de poros entre as fibras. Essa estrutura estratificada permite que as células se infiltrem na matriz do arcabouço. Nota-se ainda, a ancoragem das células pontualmente ao longo das fibras indicado pelas setas brancas.

Resultados semelhantes obtiveram Ito *et al.* (2005) ao fabricaram membranas eletrofiadas de poli (3- hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) e produziram um compósito com hidroxiapatita pela técnica de imersão em fluido corporal simulado. Avaliaram a biocompatibilidade comparando as membranas produzidas e o filme de PHBV de superfície lisa. Observaram que a hidrofobicidade das fibras eletrofiadas

diminuíram após a deposição de HAp, e houve um aumento na área superficial específica no composto de HAp e a membrana eletrofiada. Conseqüentemente, ocorreu um aumento na adesão celular, embora a adesão celular não fosse significativamente afetada pela combinação com HAp.

6.4.3. MINERALIZAÇÃO DOS ARCABOUÇOS

A Figura 6.21 apresenta os gráficos com os valores de densidade óptica dos arcabouços investigados em função de tempo, comparados à densidade óptica do osso cortical, utilizado como controle positivo de uma matriz mineralizada.

A produção da matriz mineralizada é um indicador de diferenciação das células óssea, e a alizarina é utilizada para a confirmação da mineralização através indicação da coloração vermelha (BIRMINGHAM, 2012; KYLLÖNEN, 2013; UDDIN, 2013), devido a sua complexação com o cálcio encontrado da HA quando observado em microscopia ótica.

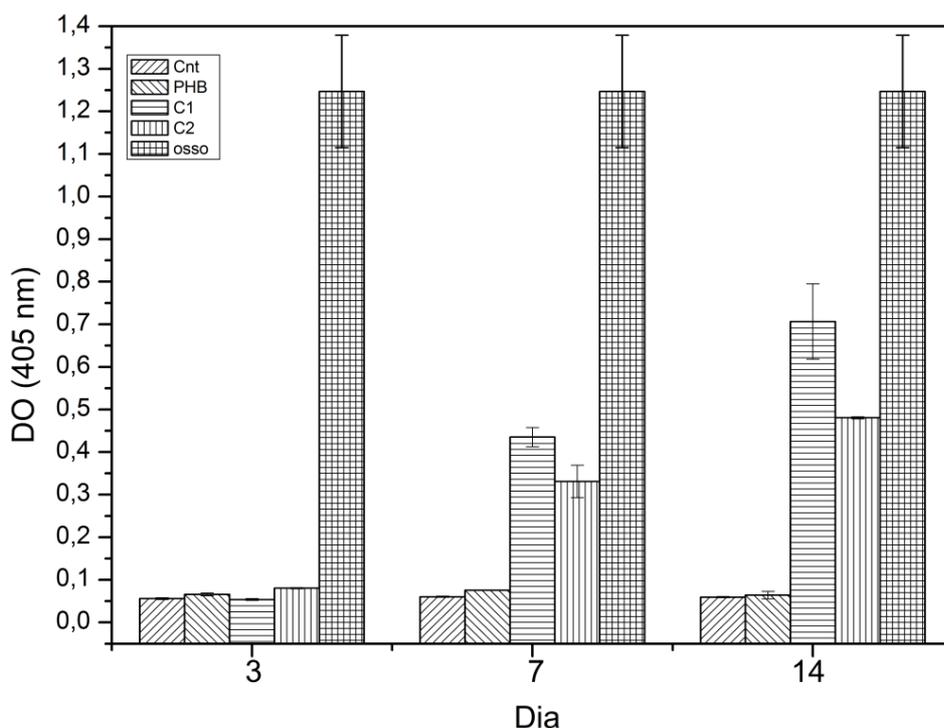


Figura 6.21. Valores de densidade óptica de ALS nos arcabouços investigados em função de tempo, comparados à densidade óptica do osso cortical (n=3, p< 0,05).

Como os arcabouços compósitos apresentam em sua matriz HAp ficaria difícil analisar o quanto as células contribuíram, ou se realmente contribuíram, para a mineralização. Desta forma, a alizarina foi extraída em meio ácido com DMSO. Para não ter a interferência da contribuição da HAp dos arcabouços e conseqüentemente, um falso positivo da mineralização da matriz.

Observa-se na Figura 6.21 que todos os arcabouços e o controle (células mesenquimais) apresentam diferença significativa quando comparada ao controle positivo (osso cortical). No entanto, os grupos C1 e C2 apresentam a partir do dia sete um aumento na mineralização, indicando que as células estão produzindo uma matriz mineralizada sobre os arcabouços. Comparando o grupo controle e o arcabouço PHB, em todos os períodos as células mantêm um nível basal, que não é um indicativo de produção baixa da matriz mineralizada e sim devido ao cálcio encontrado nas células devido ao seu metabolismo normal. A mesma Figura 6.20 permite comparar os grupos controle e os arcabouços, visualizando-se a formação da matriz mineralizada nos arcabouços C1 e C2.

No dia três, ambos os grupos apresentam um nível basal, sendo que no dia sete, pode-se observar a produção da matriz mineralizada nos arcabouços C1 e C2. Se tratando do arcabouço C1, quando comparado ao grupo controle no dia sete, foi encontrada uma diferença significativa na produção da matriz mineralizada. O mesmo não foi encontrado quando se comparou o arcabouço C1 ao arcabouço PHB e ao arcabouço C2 no mesmo período. No entanto, quando comparado no dia três, todos os grupos demonstraram diferença significativa, sendo observada também uma diferença significativa no dia 14 entre o grupo controle e o arcabouço PHB. No dia quatorze, o arcabouço C1 difere na produção da matriz mineralizada para ambos os grupos controle e PHB em todos os períodos, não sendo encontrada diferença estatística quando se compara os grupos C2 e C1 no dia sete.

O arcabouço C2 no dia 14 também apresenta uma diferença significativa quando comparado aos grupos controle e PHB nos períodos analisados. No entanto no dia três e sete, não foi encontrada uma diferença significativa quando o arcabouço C2 foi comparado ao grupo controle e ao PHB. Nos períodos dos dias

sete e quatorze, quando os arcabouços C1 e C2 são comparados, não foi encontrada uma diferença significativa. Para uma melhor visualização na Figura 6.22 é observada a diferença da mineralização entre os arcabouços nos períodos avaliados.

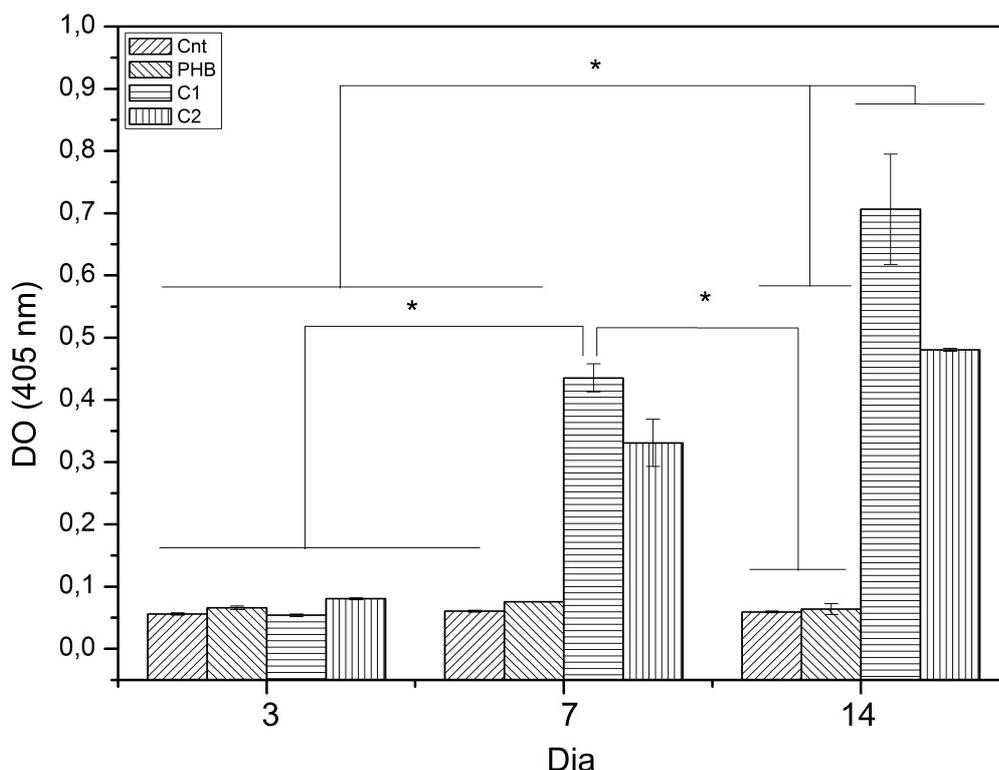


Figura 6.22. Valores de densidade óptica de ALS nos arcabouços investigados em função de tempo comparado entre os grupos (As barras corresponde as diferenças estatísticas entre os grupos).

É evidente que a influência do comportamento celular é muito complexa, e os mecanismos de resposta celular à mudança ambiental ainda não estão totalmente elucidados. Neste trabalho, não foi avaliada a expressão de marcadores gênicos e protéicos de diferenciação osteogênica. No entanto, foi possível demonstrar que ocorre a produção de uma matriz mineralizada.

Comparando os resultados obtidos e apresentados nesta Tese com os achados de Liu *et al.* (2013) o qual relataram que a composição e as características estruturais próximas à MEC óssea natural dos arcabouços, eletrofiados com nanopartículas de hidroxiapatita/quitosana, induziram a diferenciação osteogênica das CTM da medula óssea, tanto *in vitro* como *in vivo*. Esta diferenciação ocorreu

através da ativação da via de sinalização mediada pelas integrinas e BMP/Smad. Bem como, o trabalho de Wang *et al.* (2012) o qual mostraram que a adesão das CTMs à matriz extracelular afetam a forma da célula, a mecânica do citoesqueleto e a sinalização induzida mediada pela BMP na diferenciação osteogênica de CTMs. Torna-se evidente que a adição da HAp e a estrutura das fibras contribuíram à indução das CTMs, promovendo a mineralização dos arcabouços. Estes mecanismos de controle da adesão ressaltam a importância do microambiente na regulação da diferenciação de células-tronco. De fato, a elaboração de MEC durante a osteogênese é fundamental para o desenvolvimento ósseo.

Evidências encontradas na literatura, que estão de acordo com os achados deste trabalho o qual demonstram que o aumento da rugosidade na superfície polimérica (isto é, a maior faixa de irregularidades na altura) leva à diminuição da proliferação osteoblástica e aumento da diferenciação osteogênica (BARBIERI, 2013). Bem como, a existência de nHA na matriz polimérica pode acelerar a cinética de mineralização *in vitro* da matriz extracelular (FRICAIN, 2013).

Outras evidências, no que diz respeito à micro e nanoestruturas, à medida que estas estruturas aumentam a área superficial específica dos arcabouços, podem promover interações com fatores de crescimento, incluindo BMP. Consequentemente, desencadear a indução de células osteoprogenitoras indiferenciadas em linhagem osteogênica. Através do aumento na expressão de osteocalcina, um marcador específico de osso envolvido no controle de mineralização (FRICAIN, 2013).

Desta forma, existe um forte indício que as células-tronco mesenquimias comprometeram-se em uma linhagem osteogênica. No entanto, futuramente faz-se necessária a realização de um trabalho mais detalhado, para revelar os mecanismos da interação célula-material envolvidos no processo de mineralização e diferenciação ocorrida nos arcabouços estudados.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos experimentalmente neste trabalho é possível inferir as seguintes conclusões:

Foi possível a fabricação de arcabouços, através da técnica de eletrofição micro e nanoestruturados de PHB e hidroxiapatita. Estes apresentaram estruturas e tamanhos de fibras diferentes. Para o arcabouço de PHB: $0,55 \pm 0,15 \mu\text{m}$, C1 $0,62 \pm 0,19 \mu\text{m}$ e C2: $0,66 \pm 0,13 \mu\text{m}$.

Houve um aumento na área superficial dos arcabouços compósitos C1 e C2 de cerca de 200% e 100%, respectivamente, quando comparados ao arcabouço PHB, bem como um aumento de cerca de 200% nos diâmetros dos mesoporos de ambos compósitos quando comparado ao arcabouço PHB.

A incorporação de HAp nos arcabouços altera as propriedades viscoelásticas do polímero PHB de 424 MPa à 26 e 28 MPa nos arcabouços C1 e C2, respectivamente, com a diminuição dos módulos de armazenamento e de perda dos arcabouços.

Foi possível avaliar o teor de HAp nos arcabouços, sendo esta correspondente a 45 e 16 % do peso dos arcabouços C1 e C2, respectivamente. O que torna o arcabouço C2 mais interessante para a fabricação de compósitos para a utilização na regeneração óssea. Devido à menor quantidade de HAp utilizada na produção do arcabouço e pelo fato de produzir uma mineralização tão efetiva quanto a produzida pelo arcabouço C1.

Pela avaliação *in vitro*, observou-se que todos os arcabouços apresentaram elevada biocompatibilidade, cerca de 80%, e promoveram a adesão e proliferação das células-tronco mesenquimais de ratos. A presença de uma fase mineral de HAp nos arcabouços, favoreceu a produção de uma matriz mineralizada pelas células.

A deposição da matriz mineralizada e a atividade celular é um indicativo da diferenciação das células-tronco mesenquimais em linhagem osteogênica.

Os arcabouços compósitos apresentam características osteocondutoras e uma potencial osteo atividade, o que os torna ótimos candidatos para arcabouços utilizados na regeneração óssea a onde não se requer forças excessivas.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Através dos resultados obtidos neste trabalho, é sugerir os seguintes temas para trabalhos futuros:

- I. Avaliação da expressão gênica e de proteínas chaves na diferenciação óssea;
- II. Adsorção de nHA com diversas razões de Ca/P sobre as fibras eletrofiadas;
- III. Adsorção de fármacos revestidos com nHA sobre as superfícies dos arcabouços,
- IV. Avaliação *in vivo* da biocompatibilidade dos arcabouços,
- V. Avaliação da nanoestruturas das fibras pela técnica de Microscopia de força atômica.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. **Biologia Molecular da Célula** 4^a ed. Porto Alegre: Editora Artmed., 2004.

ALLEN LT, FOX EJ, BLUTE I, KELLY ZD, ROCHEV Y, KEENAN AK, DAWSON KA, GALLAGHER WM. Interaction of soft condensed materials with living cells: phenotype/transcriptome correlations for the hydrophobic effect. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 27: 6331-6, 2003.

ANSELME K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v.21(7):667-681, 2000.

ARIFFIN H, NISHIDA H, SHIRAI Y, E HASSAN MA. Determination of multiple thermal degradation mechanisms of poly(3-hydroxybutyrate). **Polymer Degradation and Stability**, v.93(8):1433-1437, 2008.

ASHAMMAKHI N, WIMPENNY I, NIKKOLA L, E YANG Y. Electrospinning: Methods and Development of Biodegradable Nanofibres for Drug Release. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.5(1):1-19, 2009.

BAKSH D, SONG L, E TUAN RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.8(3):301-316, 2004.

BAO CY, CHEN WC, WEIR MD, THEIN-HAN W, e XU HHK. Effects of electrospun submicron fibers in calcium phosphate cement scaffold on mechanical properties and osteogenic differentiation of umbilical cord stem cells. **Acta Biomaterialia**, v. 7(11):4037-4044, 2011.

BARBIERI D, YUAN H, LUO X, FARE S, GRIJPMAN DW, DE BRUIJN JD. Influence of polymer molecular weight in osteoinductive composites for bone tissue regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 9(12):9401–9413, 2013.

BARRETT DG e YOUSAF MN. Design and Applications of Biodegradable Polyester Tissue Scaffolds Based on Endogenous Monomers Found in Human Metabolism. **Molecules**, v.14, 4022-4050, 2009.

BERRY CC, DALBY MJ, OREFFO ROC, MCCLOY D, E AFFROSMAN S. The interaction of human bone marrow cells with nanotopographical features in three dimensional constructs. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.79A(2):431-439, 2006.

BHADRIRAJU K, YANG M, RUIZ SA, PIRONE D, TAN J, e CHEN CS. Activation of ROCK by RhoA is regulated by cell adhesion, shape, and cytoskeletal tension. **Experimental Cell Research**, v. 313(16):3616-3623, 2007.

- BHARDWAJ N, e KUNDU SC. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, v. 28(3):325-347, 2010.
- BIRMINGHAM E, NIEBUR GL, MCHUGH PE, SHAW G, BARRY FP, E MCNAMARA LM. Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Is Regulated by Osteocyte and Osteoblast Cells in a Simplified Bone Niche. **European Cells & Materials**, v.23:13-27, 2012.
- BOGNITZKI M, CZADO W, FRESE T, SCHAPER A, HELLWIG M, STEINHART M, GREINER A, e WENDORFF JH. **Nanostructured fibers via electrospinning. Advanced Materials**, v. 13(1):70+, 2001.
- BOISSEAU P, e LOUBATON B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. **Comptes Rendus Physique**, v. 12(7):620-636, 2011.
- BONZANI IC, GEORGE JH, AND STEVENS MM. 2006. Novel materials for bone and cartilage regeneration. *Current Opinion in Chemical Biology* 10(6):568-575.
- BOUDREAU J, AND JONES PL. Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. **Biochemical Journal**, v. 339:481-488, 1999.
- BOUYER E, GITZHOFER F, AND BOULOS MI. Morphological study of hydroxyapatite nanocrystal suspension. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, v. 11(8):523-531, 2000.
- BRETT PM, HARLE J, SALIH V, MIHOC R, OLSEN I, JONES FH, e TONETTI M. Roughness response genes in osteoblasts. **Bone**, v. 35(1):124-133, 2004.
- BRODBECK WG, SHIVE MS, COLTON E, NAKAYAMA Y, MATSUDA T, ANDERSON JM. Influence of biomaterial surface chemistry on the apoptosis of adherent cells. **Journal of Biomedical Materials Research**. v. 15: 661-8, 2001.
- BRUNNER TJ, GRASS RN, BOHNER M, AND STARK WJ. Effect of particle size, crystal phase and crystallinity on the reactivity of tricalcium phosphate cements for bone reconstruction. **Journal of Materials Chemistry**, v. 17(38):4072-4078, 2007.
- BRUNNER TJ, GRASS RN, BOHNER M, E Stark WJ. Effect of particle size, crystal phase and crystallinity on the reactivity of tricalcium phosphate cements for bone reconstruction. **Journal of Materials Chemistry**, v. 17(38):4072-4078, 2007.
- CARSON AE, AND BARKER TH. Emerging concepts in engineering extracellular matrix variants for directing cell phenotype. **Regenerative Medicine**, v. 4(4):593-600, 2009.
- CATROS S, GUILLEMOT F, LEBRAUD E, CHANSEAU C, PEREZ S, BAREILLE R, AMEDEE J, AND FRICAIN JC. Physico-chemical and biological properties of a nano-hydroxyapatite powder synthesized at room temperature. **IRBM** 31(4):226-233, 2010.
- CHANG MC, E TANAKA J. FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde. **Biomaterials**, v 23(24):4811-4818, 2002.

- CHA Y e PITT C.G. Biodegradability of polymer blends. **Biomaterials**, v.11, 108-112, 1990.
- CHEN Y, MAK AFT, LI JS, WANG M, e SHUM AWT. Formation of apatite on poly(alpha-hydroxy acid) in an accelerated biomimetic process. **Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials** 73B(1):68-76, 2005.
- CHEN Y, MAK AFT, LI JS, WANG M, SHUM, AWT. Formation of apatite on poly(alpha-hydroxy acid) in accelerated biomimetic process. **Journal of Biomedical Materials Research Part B**, v. 73B: 68-76, 2005.
- CHENG G, YOUSSEF BB, MARKENSCOFF P, ZYGOURAKIS K. Cell Population Dynamics Modulate the Rates of Tissue Growth Processes. **Biophysical Journal**. v. 90: 713-724, 2006.
- CORREIA DM, RIBEIRO CR, FERREIRA JCC, BOTELHO G, RIBELLES JLG, LANCEROS-MENDEZ S, SENCADAS V. Influence of Electrospinning Parameters on Poly(hydroxybutyrate) Electrospun Membranes Fiber Size and Distribution. **Polymer Engineering and Science**, v. 30, 2013.
- CUKROWSKI I, POPOVIC L, BARNARD W, PAUL SO, VAN ROOYEN PH, e LILES DC. Modeling and spectroscopic studies of bisphosphonate-bone interactions. The Raman, NMR and crystallographic investigations of Ca-HEDP complexes. **Bone**, v. 41(4):668-678, 2007.
- CURRAN JM, CHEN R, HUNT JA. The guidance of human mesenchymal stem cell differentiation in vitro by controlled modifications to the cell substrate. **Biomaterials**, v 27:4783-4793, 2006.
- DALBY MJ GADEGAARD J, TARE R, ANDAR A, RIEHLE MO, HERZYK P, WILKINSON, CDW e OREFFO ROC. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. **Nature Materials**, v. 6:997-1003, 2007.
- DAZZI F, LOPES L, e WENG L. Mesenchymal stromal cells: a key player in innate tolerance'? **Immunology**, v. 137(3):206-213, 2012.
- DEMALI, KA, WENNERBERG K, BURRIDGE K. Integrin Signaling to the actin cytoskeleton. **Current Opinion in Cell Biology**, v.15, p. 572-582, 2003.
- DETSCH R, UHL F, DEISINGER U, e ZIEGLER G. 3D-Cultivation of bone marrow stromal cells on hydroxyapatite scaffolds fabricated by dispense-plotting and negative mould technique. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 19(4):1491-1496, 2008.
- DOYLE C, TANNER ET, e BONFIELD W. In vitro and In vivo Evaluation of Polyhydroxybutyrate and of Polyhydroxybutyrate Reinforced with Hydroxyapatite. **Biomaterials**, v. 12(9):841-847, 1991.

EL-AMIN SF, LU HH, KHAN Y, BUREMS J, MITCHELL J, TUAN RS, e LAURENCIN CT. Extracellular matrix production by human osteoblasts cultured on biodegradable polymers applicable for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24(7):1213-1221, 2003.

ENGEL E, MICHIARDI A, NAVARRO M, LACROIX D, e PLANELL JA. Nanotechnology in regenerative medicine: the materials side. **Trends in Biotechnology**, v. 26(1):39-47, 2008.

ERISKEN C, KALYON DM, e WANG HJ. Functionally graded electrospun polycaprolactone and beta-tricalcium phosphate nanocomposites for tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 29(30):4065-4073, 2008.

FODOR WL. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: The potential to replace, repair and regenerate. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, 1-6, 2003.

FRANZ-ODENDAAL TA, HALL BK, e WITTEN PE. Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. **Developmental Dynamics**, v. 235(1):176-190, 2006.

FREIER T, KUNZE C, NISCHAN C, KRAMER S, STERNBERG K, SASS M, HOPT UT, e SCHMITZ KP. In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patch based on poly(3-hydroxybutyrate). **Biomaterials**, v. 23(13):2649-2657, 2002.

FRICAIN JC, SCHLAUBITZ S, LE VISAGE C, ARNAULT I, DERKAOUI SM, SIADOUS R, CATROS S, LALANDE C, BAREILLE R, RENARD M. A nano-hydroxyapatite-Pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 34(12):2947-2959, 2013.

FUCHS E, e SEGRE JA. Stem cells: A new lease on life. **Cell**, v. 100(1):143-155, 2000.

FURUKAWA T, SATO H, MURAKAMI R, ZHANG JM, NODA I, OCHIAI S, e OZAKI Y. Raman microspectroscopy study of structure, dispersibility, and crystallinity of poly (hydroxybutyrate)/poly(L-lactic acid) blends. **Polymer**, v. 47(9):3132-3140, 2006.

GALEGO N, ROZSA C, SANCHEZ R, FUNG J, VAZQUEZ A, e TOMAS JS. Characterization and application of poly(beta-hydroxyalkanoates) family as composite biomaterials. **Polymer Testing**, v. 19(5):485-492, 2000.

GENTLEMAN E, SWAIN RJ, EVANS ND, BOONRUNGSIMAN S, JELL G, BALL MD, SHEAN TAV, OYEN ML, PORTER A, e STEVENS MM. Comparative materials differences revealed in engineered bone as a function of cell-specific differentiation. **Nature Materials**, v. 8(9):763-770, 2009.

GODA I, RAHOUADJ R, e GANGHOFFER JF. Size dependent static and dynamic behavior of trabecular bone based on micromechanical models of the trabecular architecture. **International Journal of Engineering Science**, v. 72:53-77, 2013.

- GRIFFITH LG, e NAUGHTON G. Tissue engineering - Current challenges and expanding opportunities. **Science**, v. 295(5557):1009+, 2002.
- GROVER LM, KNOWLES JC, FLEMING GJP, e BARRALET JE. In vitro ageing of brushite calcium phosphate cement. **Biomaterials**, v. 24(23):4133-4141, 2003.
- GUAN D, CHEN Z, HUANG C, LIN, Y. Attachment, proliferation and differentiation of BMSCs on gas-jet/electrospun nHAP/PHB fibrous scaffolds, **Applied Surface Science**, v.255: 324–327, 2008.
- HAMIDOUCHE Z, FROMIGUE O, RINGE J, HAUPL T, VAUDIN P, PAGES JC, SROUJI S, LIVNE E, MARIE PJ. Priming integrin alpha5 promotes human mesenchymal stromal cell osteoblast differentiation and osteogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences. USA**, v. 106, 18587–18591, 2009.
- HILL CS, E TREISMAN R. Transcriptional Regulation by Extracellular Signals - Mechanisms and Specificity. **Cell**, v. 80(2):199-211, 1995.
- HOMBACH-KLONISCH S., PANIGRAHI S, RASHEDI I, SEIFERT A, ALBERTI E, POCAR P, KURPISZ M, SCHULZE-OSTHOFF K, MACKIEWICZ A E LOS M. Adult stem cells and their trans-differentiation potential--perspectives and therapeutic applications. **Journal of Molecular Medicine**, v. 86(12): 1301-1314, 2008.
- HORNEZ JC, CHAI F, MONCHAU F, BLANCHEMAIN N, DESCAMPS M, e HILDEBRAND HF. Biological and physico-chemical assessment of hydroxyapatite (HA) with different porosity. **Biomolecular Engineering**, v. 24(5):505-509, 2007.
- International Organization for Standardization. **ISO10993-5**. Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. Geneva., 1999.
- ISHII D, LEE B WK, KASUYAC KI, e IWATA T. Fine structure and enzymatic degradation of poly [(R)-3-hydroxybutyrate] and stereocomplexed poly(lactide) nanofibers. **Journal of Biotechnology**, v. 132(3):318-324, 2007.
- ITO Y, HASUDA H, KAMITAKAHARA M, OHTSUKI C, TANIHARA M, KANG IK, e KWON OH. A composite of hydroxyapatite with electrospun biodegradable nanofibers as a tissue engineering material. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100(1):43-49, 2005.
- JALILI R, HOSSEINI SA, e MORSHED M. The effects of operating parameters on the morphology of electrospun polyacrylonitrile nanofibres. **Iranian Polymer Journal**, v. 14(12):1074-1081, 2005.
- JIANG X, GITTENS SA, CHANG Q, ZHANG X, CHEN C, e ZHANG Z. The use of tissue-engineered bone with human bone morphogenetic protein-4-modified bone-marrow stromal cells in repairing mandibular defects in rabbits. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 35(12):1133-1139, 2006.

- KATAGIRI T, e TAKAHASHI N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. **Oral Diseases**, v. 8(3):147-159, 2002.
- KESELOWSKY BG, COLLARD DM, GARCIA AJ. Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. **Biomaterials**, v.25, 5947-,2004.
- KIM BS e MOONEY DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. **Trends in Biotchenology**, v.16, 224-230, 1998.
- KIM HW, KIM HE, e SALIH V. Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin-hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds. **Biomaterials**, v. 26(25):5221-5230, 2005.
- KIM KS, LEE JH, AHN HH, LEE JY, KHANG G, LEE B, LEE HB, e KIM MS. The osteogenic differentiation of rat muscle-derived stem cells in vivo within in situ-forming chitosan scaffolds. **Biomaterials**, v. 29(33):4420-4428, 2008.
- KNOWLES JC, MAHMUD FA, HASTINGS GW. Piezoelectric characteristics of polyhydroxybutyrate based composite. **Clinical Materials**, v.8:155-8, 1991.
- KYLLONEN L, HAIMI S, MANNERSTROM B, HUHTALA H, RAJALA KM, SKOTTMAN H, SANDOR GK, e MIETTINEN S. Effects of different serum conditions on osteogenic differentiation of human adipose stem cells in vitro. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 4. 2013
- LANGER R, VACANTI JP. Tissue engineering. **Science**. v. 14: 920-6, 1993.
- LE BLANC K, FRASSONI F, BALL L, FRANCO, ROELOFS LH, LEWIS I, LANINO E, SUNDBER B, BERNARDO ME, REMBERGER M, DINI G, EGELER RM, BACIGALUPO A, FIBBE W, RINGDÉ O. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. **The Lancet**, v. 371(9624): 1579-1586, 2008.
- LE MOS MARIANA ASSIS. **Indução da diferenciação de células derivadas de tecido adiposo em células da linhagem osteogênica**. 64. 2008. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) – PUCRS, Porto Alegre, 2008.
- LI BJ, MOSHFEGH C, LIN Z, ALBUSCHIES J, e VOGEL V. Mesenchymal Stem Cells Exploit Extracellular Matrix as Mechanotransducer. **Scientific Reports**, v.3-2013.
- LI XT, ZHANG Y, e CHEN GQ. Nanofibrous polyhydroxyalkanoate matrices as cell growth supporting materials. **Biomaterials**, v. 29(27):3720-3728, 2008.
- LIAN, JB., e STEIN GS. Runx2/Cbfa1: a multifunctional regulator of bone formation. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, 2677 – 2685, 2003.
- LIANG D, HSIAO BS, CHU B. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications **Advanced Drug Delivery Reviews**,v. 59:1392–412, 2007

LIAO SS, CUI FZ, e ZHU Y. Osteoblasts adherence and migration through three-dimensional porous mineralized collagen based composite: nHAC/PLA. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 19(2):117-130, 2004.

LIM JY, DREISS AD, ZHOU ZY, HANSEN JC, SIEDLECKI CA, HENGSTEBECK RW, CHENG J, WINOGRAD N, e DONAHUE HJ. The regulation of integrin-mediated osteoblast focal adhesion and focal adhesion kinase expression by nanoscale topography. **Biomaterials**, v. 28(10):1787-1797, 2007.

LIN J, DING B, YU J, e HSIEH Y. Direct Fabrication of Highly Nanoporous Polystyrene Fibers via Electrospinning, **Applied Materials & Interfaces**, v. 2:2, 521–528, 2010.

LIU HH, PENG HJ, WU Y, ZHANG C, CAI YZ, XU GW, LI Q, CHEN X, JI JF, ZHANG YZ. The promotion of bone regeneration by nanofibrous hydroxyapatite/chitosan scaffolds by effects on integrin-BMP/Smad signaling pathway in BMSCs. **Biomaterials**, v. 34(18):4404-4417, 2013.

LIU XY, CHU PK, e DING CX. Surface nano-functionalization of biomaterials. **Materials Science & Engineering R-Reports**, v. 70(3-6):275-302, 2010.

LONG, MW. Osteogenesis and Bone-Marrow-Derived Cells. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 27(3): 677–690, 2001.

LU ZF, DOULABI BZ, HUANG CL, BANK RA, e HELDER MN. beta 1 integrins regulate chondrogenesis and rock signaling in adipose stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 372(4):547-552, 2008.

LUKLINSKA ZB, e BONFIELD W. Morphology and ultrastructure of the interface between hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composite implant and bone. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 8(6):379-383, 1997.

MA PX. Biomimetic materials for tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60(2):184-198, 2008.

MEGELSKI S, STEPHENS JS, CHASE DB, e RABOLT JF. Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. **Macromolecules**, v.35(22):8456-8466, 2002.

MOMIN EN, MOHYELDIN A, ZAIDI HA, VELA G, e QUINONES-HINOJOSA A. Mesenchymal Stem Cells: New Approaches for the Treatment of Neurological Diseases. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 5(4):326-344, 2010.

MOSTAFA NY, e BROWN PW. Computer simulation of stoichiometric hydroxyapatite: Structure and substitutions. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 68(3):431-437, 2007.

MURATA M, HUANG BZ, SHIBATA T, IMAI S, NAGAI N, e ARISUE M. Bone augmentation by recombinant human BMP-2 and collagen on adult rat parietal bone. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 28(3):232-237, 1999.

NGIAM M, LIAO SS, PATIL AJ, CHENG ZY, CHAN CK, e RAMAKRISHNA S. The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering. **Bone**, v. 45(1):4-16, 2009.

NICHOLS JE, CORTIELLA J. Engineering of a Complex Organ. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v.5:723-730, 2008.

OLIVARES-NAVARRETE R, RAZ P, ZHAO G, CHEN J, WIELAND M, COCHRAN DL, CHAUDHRI RA, ORNOY A, BOYAN BD, e SCHWARTZ Z. Integrin alpha 2 beta 1 plays a critical role in osteoblast response to micron-scale surface structure and surface energy of titanium substrates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105(41):15767-15772, 2008.

OLMEDILLA MP, GARCIA-GIRALT N, PRADAS MM, RUIZ PB, RIBELLES JLG, PALOU EC, e GARCIA JCM. Response of human chondrocytes to a non-uniform distribution of hydrophilic domains on poly (ethyl acrylate-co-hydroxyethyl methacrylate) copolymers. **Biomaterials**, v. 27(7):1003-1012, 2006.

PANSERI S, RUSSO A, SARTORI M, GIAVARESI G, SANDRI M, FINI M, MALTARELLO MC, SHELYAKOVA T, ORTOLANI A e VISANI A. Modifying bone scaffold architecture in vivo with permanent magnets to facilitate fixation of magnetic scaffolds. **Bone**, v.56(2):432-439, 2013.

PASCAUD P, BAREILLE R, BOURGET C, AMEDEE J, REY C, e SARDA S. Interaction between a bisphosphonate, tiludronate and nanocrystalline apatite: in vitro viability and proliferation of HOP and HBMSC cells. **Biomedical Materials**, v. 7(5), 2012.

PAȘCU EI, STOKES J, MCGUINNESS GB. Electrospun composites of PHBV, silk fibroin and nano-hydroxyapatite for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 33,4905–4916, 2013.

PHILLIPS JE, PETRIE TA, CREIGHTON FP, GARCÍA, AJ. Human mesenchymal stem cell differentiation on self-assembled monolayers presenting different surface chemistries, **Acta Biomaterialia**, v. 6: 12–20, 2010.

POINERN GEJ, BRUNDAVANAM RK, FAWCETT D. Nanometre Scale Hydroxyapatite Ceramics for Bone Tissue Engineering. **American Journal of Biomedical Engineering**, v. 3(6), 148-168, 2013.

PRABHAKARAN MP, VENUGOPAL J, e RAMAKRISHNA S. Electrospun nanostructured scaffolds for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 5(8):2884-2893, 2009.

QU XH, WU Q, LIANG J, QU X, WANG SG, e CHEN GQ. Enhanced vascular-related cellular affinity on surface modified copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyhexanoate (PHBHHx). **Biomaterials**, v. 26(34):6991-7001, 2005.

- SADAT-SHOJAI M, KHORASANI MT, DINPANAH-KHOSHDARGI E, e JAMSHIDI A. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. **Acta Biomaterialia**, v. 9(8):7591-7621, 2013.
- SANTO VE, DUARTE ARC, POPA EG, GOMES ME, MANO JF, e REIS RL. Enhancement of osteogenic differentiation of human adipose derived stem cells by the controlled release of platelet lysates from hybrid scaffolds produced by supercritical fluid foaming. **Journal of Controlled Release**, v. 162(1):19-27, 2012.
- SCHEIBE F, LADHOFF J, HUCK J, GROHMANN M, BLAZEJ K, OERSAL A, BAEVA N, SEIFERT M, e PRILLER J. Immune effects of mesenchymal stromal cells in experimental stroke. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 32(8):1578-1588, 2012.
- SCHWARTZ MA, e GINSBERG MH. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. **Nature Cell Biology**, v. 4(4):E65-E68, 2002.
- SHAH AK, LAZATIN J, SINHA RK, LENNOX T, HICKOK NJ, e TUAN RS. Mechanism of BMP-2 stimulated adhesion of osteoblastic cells to titanium alloy. **Biology of the Cell**, v. 91(2):131-142, 1999.
- SHIN H, TEMENOFF JS, BOWDEN GC, ZYGOURAKIS K, FARACH-CARSON MC, YASZEMSKI MJ, e MIKOS AG. Osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells cultured on Arg-Gly-Asp modified hydrogels without dexamethasone and beta-glycerol phosphate. **Biomaterials**, v. 26(17):3645-3654, 2005.
- SHISHATSKAYA EI, KHLUSOV IA, e VOLOVA TG. A hybrid PHB-hydroxyapatite composite for biomedical application: production, in vitro and in vivo investigation. **Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition**, v. 17(5):481-498, 2006.
- SIMON JL, ROY TD, PARSONS JR, REKOW ED, THOMPSON VP, KEMNITZER J, e RICCI JL. Engineered cellular response to scaffold architecture in a rabbit trephine defect. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 66A(2):275-282, 2003.
- STEVENS MM, e GEORGE JH. Exploring and engineering the cell surface interface. **Science**, v. 310(5751):1135-1138, 2005.
- SUZUKI O, KAMAKURA S, KATAGIRI T, NAKAMURA M, ZHAO BH, HONDA Y, AND KAMIJO R. Bone formation enhanced by implanted octacalcium phosphate involving conversion into Ca-deficient hydroxyapatite. **Biomaterials**, v. 27(13):2671-2681, 2006.
- TAO XR, LI WL, SU J, JIN CX, WANG XM, LI JX, HU JK, XIANG ZH, LAU JTY, e HU YP. Clonal Mesenchymal Stem Cells Derived From Human Bone Marrow Can Differentiate Into Hepatocyte-Like Cells in Injured Livers of SCID Mice. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 108(3):693-704, 2009.

- TENG SH, LEE EJ, WANG P, e KIM HE. Collagen/hydroxyapatite composite nanofibers by electrospinning. **Materials Letters**, v. 62(17-18):3055-3058, 2008.
- UDDIN SMZ, e QIN YX. Enhancement of Osteogenic Differentiation and Proliferation in Human Mesenchymal Stem Cells by a Modified Low Intensity Ultrasound Stimulation under Simulated Microgravity. **Plos One**, v. 8(9), 2013.
- VAKONAKIS I, CAMPBELL ID. Extracellular matrix: from atomic resolution to ultrastructure. **Current Opinion in Cell Biology**, v.19, 578-583, 2007.
- VICTOR SP, e SHARMA CP. Development and evaluation of cyclodextrin complexed hydroxyapatite nanoparticles for preferential albumin adsorption. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 85(2):221-228, 2011.
- WANG LF, PAI CL, BOYCE MC e RUTLEDGE GC. "Wrinkled Surface Topologies of Electrospun Polymer Fibers". **Applied Physics Letters**, V. 94, 151916 , 2009.
- WANG YK, YU X, COHEN DM, WOZNIAK MA, YANG MT, GAO L, EYCKMANS J, e CHEN CS.. Bone Morphogenetic Protein-2-Induced Signaling and Osteogenesis Is Regulated by Cell Shape, RhoA/ROCK, and Cytoskeletal Tension. **Stem Cells and Development**, v. 21(7):1176-1186, 2012.
- WANG YW, WU QO, CHEN JC, e CHEN GQ. Evaluation of three-dimensional scaffolds made of blends of hydroxyapatite and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for bone reconstruction (vol 26, pg 899, 2005). **Biomaterials**, v. 26(22):4693-4693, 2005.
- WEBSTER TJ, SIEGEL RW, e BIZIOS R. Osteoblast adhesion on nanophase ceramics. **Biomaterials**, v. 20(13):1221-1227, 1999.
- WIESMANN HP, JOOS U, e MEYER U. Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering Part II. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 33(6):523-530, 2004.
- WONG RWK e RABIE ABM. Effect of Bio-Oss® Collagen and Collagen Matrix on Bone Formation. **The Open Biomedical Engineering Journal**,;v. 4: 71–76, 2010.
- WU LP, WANG L, WANG XJ, AND XU KT. Synthesis, characterizations and biocompatibility of novel biodegradable star block copolymers based on poly[(R)-3-hydroxybutyrate] and poly(epsilon-caprolactone). **Acta Biomaterialia**, v. 6(3):1079-1089, 2010.
- WU LP, WANG L, WANG XJ, e XU KT. Synthesis, characterizations and biocompatibility of novel biodegradable star block copolymers based on poly[(R)-3-hydroxybutyrate] and poly(epsilon-caprolactone). **Acta Biomaterialia**, v. 6(3):1079-1089, 2010.
- XIAN-YI XU, XIAO-TAO LI, SI-WU PENG, JIAN-FENG XIAO, CHAO LIU, GUO FANG, KEVIN C. CHEN, GUO-QIANG CHEN. The behaviour of neural stem cells on polyhydroxyalkanoate nanofiber scaffolds. **Biomaterials**, v.31, 14, 3967-3975, 2010.

YARIN AL, KOOMBHONGSE S, RENEKER DH. Bending instability in electrospinning of nanofibers. **Journal of Applied Physics**, v.9:3018–26, 2001.

YU J, PLACKETT D, e CHEN LXL. Kinetics and mechanism of the monomeric products from abiotic hydrolysis of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] under acidic and alkaline conditions. **Polymer Degradation and Stability**, v. 89(2):289-299, 2005.

YU T, YE JD, e WANG YJ. Synthesis and Property of a Novel Calcium Phosphate Cement. **Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials**, v. 90B(2):745-751, 2009.

YUAN HP, KURASHINA K, DE BRUIJN JD, LI YB, DE GROOT K, e ZHANG XD. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. **Biomaterials**, v. 20(19):1799-1806, 1999.

ZHAO K, DENG Y, CHEN JC, e CHEN GQ. Polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds with good mechanical properties and biocompatibility. **Biomaterials**, v. 24(6):1041-1045, 2003.

ANEXO A

Arcabouços eletrofiados de PHB

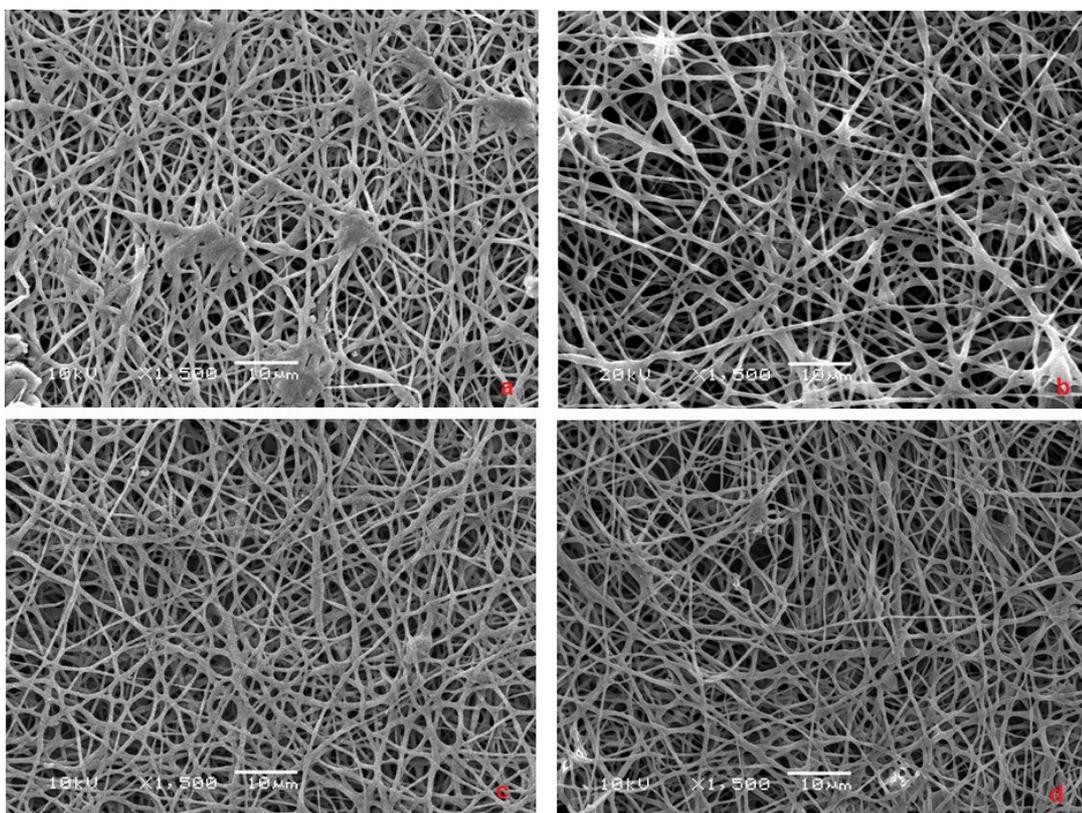


Figura A.1. Imagens obtidas do MEV das fibras de PHB com diferentes fluxo de infusão no processo de eletrofiação. Em a) 1,5 mL/h, b) 3,0 mL/h e c) 2,0 mL/h

Arcabouços eletrofiados de PHB/HA

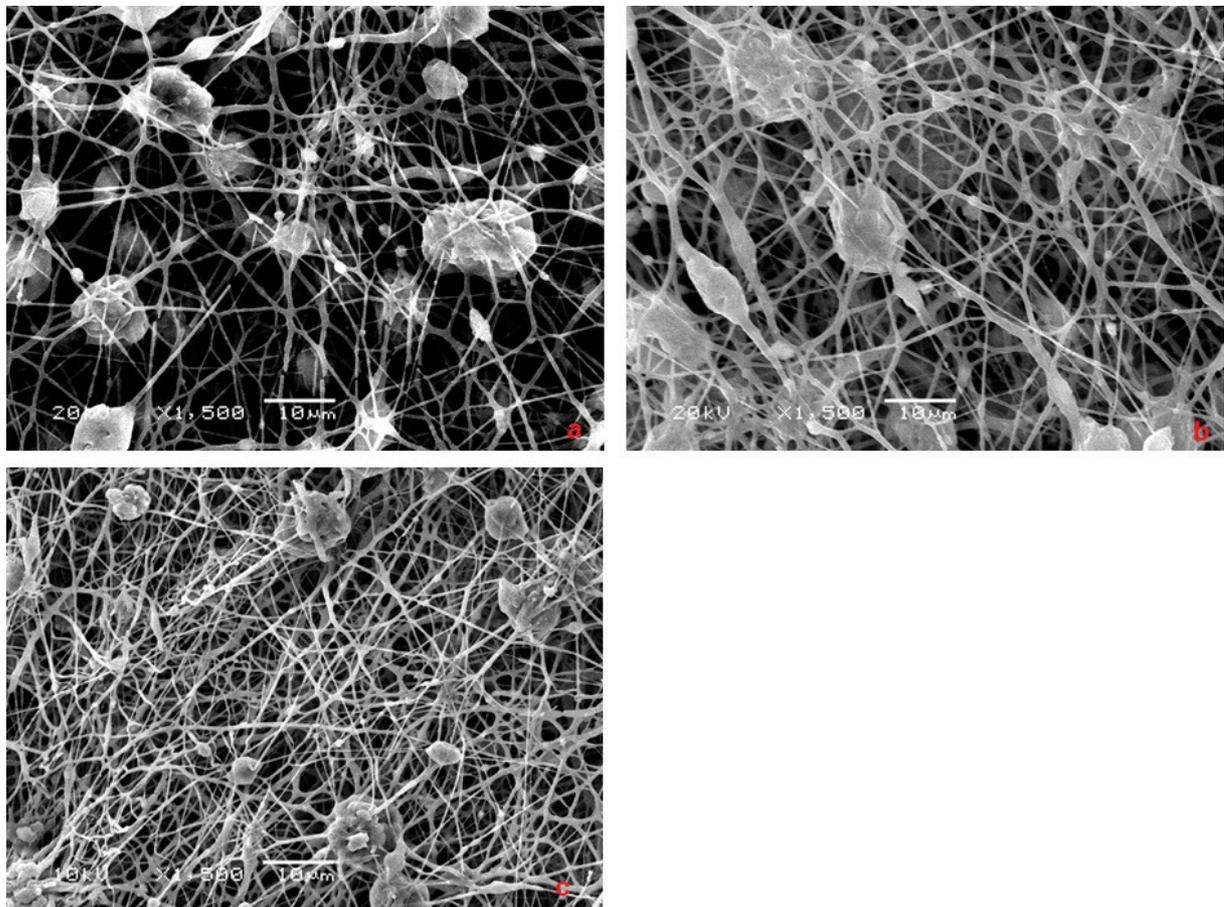


Figura A.2. Imagens obtidas do MEV das fibras de PHB/HA com diferentes fluxo de infusão no processo de eletrofiação. Em a) 3,5 mL/h, b) 4,0 mL/h e c) 2,0 mL/h.

Arcabouços eletrofiados: solução de HA

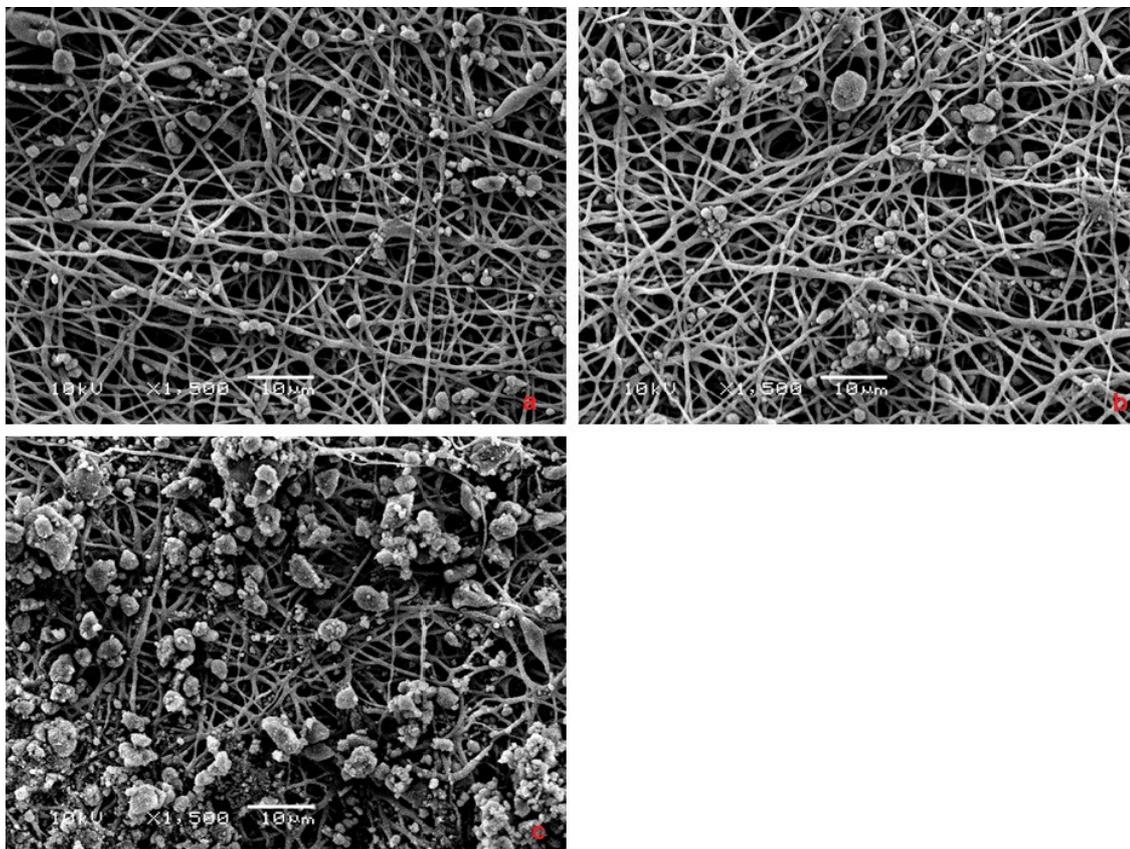


Figura A.3. Imagens obtidas do MEV das fibras de PHB em solução com diferentes concentrações de HA. Em a) 0,1 mg/mL, b) 0,2 mg/mL e c) 0,5 mg/ mL.

ANEXO B

Tabela estatística: Proliferação

2way ANOVA Tabular results						
1	Table Analyzed	Data 7				
2						
3	Two-way ANOVA	Ordinary				
4	Alpha	0.05				
5						
6	Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
7	Interaction	3.087	0.7801	ns	No	
8	Row Factor	54.91	< 0.0001	****	Yes	
9	Column Factor	18.70	0.0024	**	Yes	
10						
11	ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
12	Interaction	0.01703	6	0.002838	F (6, 24) = 0.5298	P = 0.7801
13	Row Factor	0.3029	2	0.1514	F (2, 24) = 28.28	P < 0.0001
14	Column Factor	0.1032	3	0.03439	F (3, 24) = 6.421	P = 0.0024
15	Residual	0.1285	24	0.005356		
16						
17	Number of missing values	0				

2way ANOVA Multiple comparisons					
1	Compare cell means regardless of rows and columns				
2					
3	Number of families	1			
4	Number of comparisons per family	66			
5	Alpha	0.05			
6					
7	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
8					
9	3:Cnt vs. 3:PHB	0.1037	-0.1118 to 0.3191	No	ns
10	3:Cnt vs. 3:C1	0.0580	-0.1575 to 0.2735	No	ns
11	3:Cnt vs. 3:C2	0.06633	-0.1491 to 0.2818	No	ns
12	3:Cnt vs. 7:Cnt	-0.1777	-0.3931 to 0.03779	No	ns
13	3:Cnt vs. 7:PHB	0.0580	-0.1575 to 0.2735	No	ns
14	3:Cnt vs. 7:C1	-0.06033	-0.2758 to 0.1551	No	ns
15	3:Cnt vs. 7:C2	-0.0720	-0.2875 to 0.1435	No	ns
16	3:Cnt vs. 14:Cnt	-0.2270	-0.4425 to -0.01155	Yes	*
17	3:Cnt vs. 14:PHB	-0.1123	-0.3278 to 0.1031	No	ns
18	3:Cnt vs. 14:C1	-0.1717	-0.3871 to 0.04379	No	ns
19	3:Cnt vs. 14:C2	-0.1590	-0.3745 to 0.05645	No	ns
20	3:PHB vs. 3:C1	-0.04567	-0.2611 to 0.1698	No	ns
21	3:PHB vs. 3:C2	-0.03733	-0.2528 to 0.1781	No	ns
22	3:PHB vs. 7:Cnt	-0.2813	-0.4968 to -0.06588	Yes	**
23	3:PHB vs. 7:PHB	-0.04567	-0.2611 to 0.1698	No	ns
24	3:PHB vs. 7:C1	-0.1640	-0.3795 to 0.05145	No	ns
25	3:PHB vs. 7:C2	-0.1757	-0.3911 to 0.03979	No	ns
26	3:PHB vs. 14:Cnt	-0.3307	-0.5461 to -0.1152	Yes	***
27	3:PHB vs. 14:PHB	-0.2160	-0.4315 to -0.0005454	Yes	*
28	3:PHB vs. 14:C1	-0.2753	-0.4908 to -0.05988	Yes	**
29	3:PHB vs. 14:C2	-0.2627	-0.4781 to -0.04721	Yes	**
30	3:C1 vs. 3:C2	0.008333	-0.2071 to 0.2238	No	ns
31	3:C1 vs. 7:Cnt	-0.2357	-0.4511 to -0.02021	Yes	*
32	3:C1 vs. 7:PHB	0.0	-0.2155 to 0.2155	No	ns
33	3:C1 vs. 7:C1	-0.1183	-0.3338 to 0.09712	No	ns
34	3:C1 vs. 7:C2	-0.1300	-0.3455 to 0.08545	No	ns
35	3:C1 vs. 14:Cnt	-0.2850	-0.5005 to -0.06955	Yes	**
36	3:C1 vs. 14:PHB	-0.1703	-0.3858 to 0.04512	No	ns
37	3:C1 vs. 14:C1	-0.2297	-0.4451 to -0.01421	Yes	*
38	3:C1 vs. 14:C2	-0.2170	-0.4325 to -0.001545	Yes	*
39	3:C2 vs. 7:Cnt	-0.2440	-0.4595 to -0.02855	Yes	*
40	3:C2 vs. 7:PHB	-0.008333	-0.2238 to 0.2071	No	ns
41	3:C2 vs. 7:C1	-0.1267	-0.3421 to 0.08879	No	ns
42	3:C2 vs. 7:C2	-0.1383	-0.3538 to 0.07712	No	ns
43	3:C2 vs. 14:Cnt	-0.2933	-0.5088 to -0.07788	Yes	**
44	3:C2 vs. 14:PHB	-0.1787	-0.3941 to 0.03679	No	ns
45	3:C2 vs. 14:C1	-0.2380	-0.4535 to -0.02255	Yes	*
46	3:C2 vs. 14:C2	-0.2253	-0.4408 to -0.009879	Yes	*
47	7:Cnt vs. 7:PHB	0.2357	0.02021 to 0.4511	Yes	*

2way ANOVA Multiple comparisons					
48	7:Cnt vs. 7:C1	0.1173	-0.09812 to 0.3328	No	ns
49	7:Cnt vs. 7:C2	0.1057	-0.1098 to 0.3211	No	ns
50	7:Cnt vs. 14:Cnt	-0.04933	-0.2648 to 0.1661	No	ns
51	7:Cnt vs. 14:PHB	0.06533	-0.1501 to 0.2808	No	ns
52	7:Cnt vs. 14:C1	0.006000	-0.2095 to 0.2215	No	ns
53	7:Cnt vs. 14:C2	0.01867	-0.1968 to 0.2341	No	ns
54	7:PHB vs. 7:C1	-0.1183	-0.3338 to 0.09712	No	ns
55	7:PHB vs. 7:C2	-0.1300	-0.3455 to 0.08545	No	ns
56	7:PHB vs. 14:Cnt	-0.2850	-0.5005 to -0.06955	Yes	**
57	7:PHB vs. 14:PHB	-0.1703	-0.3858 to 0.04512	No	ns
58	7:PHB vs. 14:C1	-0.2297	-0.4451 to -0.01421	Yes	*
59	7:PHB vs. 14:C2	-0.2170	-0.4325 to -0.001545	Yes	*
60	7:C1 vs. 7:C2	-0.01167	-0.2271 to 0.2038	No	ns
61	7:C1 vs. 14:Cnt	-0.1667	-0.3821 to 0.04879	No	ns
62	7:C1 vs. 14:PHB	-0.05200	-0.2675 to 0.1635	No	ns
63	7:C1 vs. 14:C1	-0.1113	-0.3268 to 0.1041	No	ns
64	7:C1 vs. 14:C2	-0.09867	-0.3141 to 0.1168	No	ns
65	7:C2 vs. 14:Cnt	-0.1550	-0.3705 to 0.06045	No	ns
66	7:C2 vs. 14:PHB	-0.04033	-0.2558 to 0.1751	No	ns
67	7:C2 vs. 14:C1	-0.09967	-0.3151 to 0.1158	No	ns
68	7:C2 vs. 14:C2	-0.0870	-0.3025 to 0.1285	No	ns
69	14:Cnt vs. 14:PHB	0.1147	-0.1008 to 0.3301	No	ns
70	14:Cnt vs. 14:C1	0.05533	-0.1601 to 0.2708	No	ns
71	14:Cnt vs. 14:C2	0.0680	-0.1475 to 0.2835	No	ns
72	14:PHB vs. 14:C1	-0.05933	-0.2748 to 0.1561	No	ns
73	14:PHB vs. 14:C2	-0.04667	-0.2621 to 0.1688	No	ns
74	14:C1 vs. 14:C2	0.01267	-0.2028 to 0.2281	No	ns
75					
76					
77	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.
78					
79	3:Cnt vs. 3:PHB	0.3557	0.2520	0.1037	0.05976
80	3:Cnt vs. 3:C1	0.3557	0.2977	0.0580	0.05976
81	3:Cnt vs. 3:C2	0.3557	0.2893	0.06633	0.05976
82	3:Cnt vs. 7:Cnt	0.3557	0.5333	-0.1777	0.05976
83	3:Cnt vs. 7:PHB	0.3557	0.2977	0.0580	0.05976
84	3:Cnt vs. 7:C1	0.3557	0.4160	-0.06033	0.05976
85	3:Cnt vs. 7:C2	0.3557	0.4277	-0.0720	0.05976
86	3:Cnt vs. 14:Cnt	0.3557	0.5827	-0.2270	0.05976
87	3:Cnt vs. 14:PHB	0.3557	0.4680	-0.1123	0.05976
88	3:Cnt vs. 14:C1	0.3557	0.5273	-0.1717	0.05976
89	3:Cnt vs. 14:C2	0.3557	0.5147	-0.1590	0.05976
90	3:PHB vs. 3:C1	0.2520	0.2977	-0.04567	0.05976
91	3:PHB vs. 3:C2	0.2520	0.2893	-0.03733	0.05976
92	3:PHB vs. 7:Cnt	0.2520	0.5333	-0.2813	0.05976
93	3:PHB vs. 7:PHB	0.2520	0.2977	-0.04567	0.05976
94	3:PHB vs. 7:C1	0.2520	0.4160	-0.1640	0.05976

2way ANOVA Multiple comparisons					
95	3:PHB vs. 7:C2	0.2520	0.4277	-0.1757	0.05976
96	3:PHB vs. 14:Cnt	0.2520	0.5827	-0.3307	0.05976
97	3:PHB vs. 14:PHB	0.2520	0.4680	-0.2160	0.05976
98	3:PHB vs. 14:C1	0.2520	0.5273	-0.2753	0.05976
99	3:PHB vs. 14:C2	0.2520	0.5147	-0.2627	0.05976
100	3:C1 vs. 3:C2	0.2977	0.2893	0.008333	0.05976
101	3:C1 vs. 7:Cnt	0.2977	0.5333	-0.2357	0.05976
102	3:C1 vs. 7:PHB	0.2977	0.2977	0.0	0.05976
103	3:C1 vs. 7:C1	0.2977	0.4160	-0.1183	0.05976
104	3:C1 vs. 7:C2	0.2977	0.4277	-0.1300	0.05976
105	3:C1 vs. 14:Cnt	0.2977	0.5827	-0.2850	0.05976
106	3:C1 vs. 14:PHB	0.2977	0.4680	-0.1703	0.05976
107	3:C1 vs. 14:C1	0.2977	0.5273	-0.2297	0.05976
108	3:C1 vs. 14:C2	0.2977	0.5147	-0.2170	0.05976
109	3:C2 vs. 7:Cnt	0.2893	0.5333	-0.2440	0.05976
110	3:C2 vs. 7:PHB	0.2893	0.2977	-0.008333	0.05976
111	3:C2 vs. 7:C1	0.2893	0.4160	-0.1267	0.05976
112	3:C2 vs. 7:C2	0.2893	0.4277	-0.1383	0.05976
113	3:C2 vs. 14:Cnt	0.2893	0.5827	-0.2933	0.05976
114	3:C2 vs. 14:PHB	0.2893	0.4680	-0.1787	0.05976
115	3:C2 vs. 14:C1	0.2893	0.5273	-0.2380	0.05976
116	3:C2 vs. 14:C2	0.2893	0.5147	-0.2253	0.05976
117	7:Cnt vs. 7:PHB	0.5333	0.2977	0.2357	0.05976
118	7:Cnt vs. 7:C1	0.5333	0.4160	0.1173	0.05976
119	7:Cnt vs. 7:C2	0.5333	0.4277	0.1057	0.05976
120	7:Cnt vs. 14:Cnt	0.5333	0.5827	-0.04933	0.05976
121	7:Cnt vs. 14:PHB	0.5333	0.4680	0.06533	0.05976
122	7:Cnt vs. 14:C1	0.5333	0.5273	0.006000	0.05976
123	7:Cnt vs. 14:C2	0.5333	0.5147	0.01867	0.05976
124	7:PHB vs. 7:C1	0.2977	0.4160	-0.1183	0.05976
125	7:PHB vs. 7:C2	0.2977	0.4277	-0.1300	0.05976
126	7:PHB vs. 14:Cnt	0.2977	0.5827	-0.2850	0.05976
127	7:PHB vs. 14:PHB	0.2977	0.4680	-0.1703	0.05976
128	7:PHB vs. 14:C1	0.2977	0.5273	-0.2297	0.05976
129	7:PHB vs. 14:C2	0.2977	0.5147	-0.2170	0.05976
130	7:C1 vs. 7:C2	0.4160	0.4277	-0.01167	0.05976
131	7:C1 vs. 14:Cnt	0.4160	0.5827	-0.1657	0.05976
132	7:C1 vs. 14:PHB	0.4160	0.4680	-0.05200	0.05976
133	7:C1 vs. 14:C1	0.4160	0.5273	-0.1113	0.05976
134	7:C1 vs. 14:C2	0.4160	0.5147	-0.09867	0.05976
135	7:C2 vs. 14:Cnt	0.4277	0.5827	-0.1550	0.05976
136	7:C2 vs. 14:PHB	0.4277	0.4680	-0.04033	0.05976
137	7:C2 vs. 14:C1	0.4277	0.5273	-0.09967	0.05976
138	7:C2 vs. 14:C2	0.4277	0.5147	-0.0870	0.05976
139	14:Cnt vs. 14:PHB	0.5827	0.4680	0.1147	0.05976
140	14:Cnt vs. 14:C1	0.5827	0.5273	0.05533	0.05976
141	14:Cnt vs. 14:C2	0.5827	0.5147	0.0680	0.05976

2way ANOVA Multiple comparisons					
142	14:PHB vs. 14:C1	0.4680	0.5273	-0.05933	0.05876
143	14:PHB vs. 14:C2	0.4680	0.5147	-0.04667	0.05876
144	14:C1 vs. 14:C2	0.5273	0.5147	0.01267	0.05876

Tabela estatística: Mineralização

2way ANOVA Tabular results						
1	Table Analyzed	ALScmp				
2						
3	Two-way ANOVA	Ordinary				
4	Alpha	0.05				
5						
6	Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
7	Interaction	5.709	0.0022	**	Yes	
8	Row Factor	3.511	0.0004	***	Yes	
9	Column Factor	88.85	< 0.0001	****	Yes	
10						
11	ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
12	Interaction	0.3674	8	0.04593	F (8, 15) = 5.555	P = 0.0022
13	Row Factor	0.2260	2	0.1130	F (2, 15) = 13.66	P = 0.0004
14	Column Factor	5.718	4	1.430	F (4, 15) = 172.9	P < 0.0001
15	Residual	0.1240	15	0.008269		
16						
17	Number of missing values	0				

2way ANOVA Multiple comparisons					
1	Compare cell means regardless of rows and columns				
2					
3	Number of families	1			
4	Number of comparisons per family	105			
5	Alpha	0.05			
6					
7	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
8					
9	3:Cnt vs. 3:PHB	-0.0100	-0.3732 to 0.3532	No	ns
10	3:Cnt vs. 3:C1	0.002000	-0.3612 to 0.3652	No	ns
11	3:Cnt vs. 3:C2	-0.0245	-0.3877 to 0.3387	No	ns
12	3:Cnt vs. 3:C+	-1.191	-1.554 to -0.8276	Yes	****
13	3:Cnt vs. 7:Cnt	-0.0045	-0.3677 to 0.3587	No	ns
14	3:Cnt vs. 7:PHB	-0.0195	-0.3827 to 0.3437	No	ns
15	3:Cnt vs. 7:C1	-0.3795	-0.7427 to -0.01625	Yes	*
16	3:Cnt vs. 7:C2	-0.2750	-0.6382 to 0.08825	No	ns
17	3:Cnt vs. 7:C+	-1.191	-1.554 to -0.8276	Yes	****
18	3:Cnt vs. 14:Cnt	-0.0035	-0.3667 to 0.3597	No	ns
19	3:Cnt vs. 14:PHB	-0.008000	-0.3712 to 0.3552	No	ns
20	3:Cnt vs. 14:C1	-0.6505	-1.014 to -0.2873	Yes	***
21	3:Cnt vs. 14:C2	-0.4245	-0.7877 to -0.06125	Yes	*
22	3:Cnt vs. 14:C+	-1.191	-1.554 to -0.8276	Yes	****
23	3:PHB vs. 3:C1	0.0120	-0.3512 to 0.3752	No	ns
24	3:PHB vs. 3:C2	-0.0145	-0.3777 to 0.3487	No	ns
25	3:PHB vs. 3:C+	-1.181	-1.544 to -0.8176	Yes	****
26	3:PHB vs. 7:Cnt	0.0055	-0.3577 to 0.3687	No	ns
27	3:PHB vs. 7:PHB	-0.009500	-0.3727 to 0.3537	No	ns
28	3:PHB vs. 7:C1	-0.3695	-0.7327 to -0.006250	Yes	*
29	3:PHB vs. 7:C2	-0.2650	-0.6282 to 0.09825	No	ns
30	3:PHB vs. 7:C+	-1.181	-1.544 to -0.8176	Yes	****
31	3:PHB vs. 14:Cnt	0.0065	-0.3567 to 0.3697	No	ns
32	3:PHB vs. 14:PHB	0.0020	-0.3612 to 0.3652	No	ns
33	3:PHB vs. 14:C1	-0.6405	-1.004 to -0.2773	Yes	***
34	3:PHB vs. 14:C2	-0.4145	-0.7777 to -0.05125	Yes	*
35	3:PHB vs. 14:C+	-1.181	-1.544 to -0.8176	Yes	****
36	3:C1 vs. 3:C2	-0.0265	-0.3897 to 0.3367	No	ns
37	3:C1 vs. 3:C+	-1.193	-1.556 to -0.8296	Yes	****
38	3:C1 vs. 7:Cnt	-0.006500	-0.3697 to 0.3567	No	ns
39	3:C1 vs. 7:PHB	-0.0215	-0.3847 to 0.3417	No	ns
40	3:C1 vs. 7:C1	-0.3815	-0.7447 to -0.01825	Yes	*
41	3:C1 vs. 7:C2	-0.2770	-0.6402 to 0.08625	No	ns
42	3:C1 vs. 7:C+	-1.193	-1.556 to -0.8296	Yes	****
43	3:C1 vs. 14:Cnt	-0.005500	-0.3687 to 0.3577	No	ns
44	3:C1 vs. 14:PHB	-0.01000	-0.3732 to 0.3532	No	ns
45	3:C1 vs. 14:C1	-0.6525	-1.016 to -0.2893	Yes	***
46	3:C1 vs. 14:C2	-0.4265	-0.7897 to -0.06325	Yes	*
47	3:C1 vs. 14:C+	-1.193	-1.556 to -0.8296	Yes	****

2way ANOVA Multiple comparisons					
48	3:C2 vs. 3:C+	-1.166	-1.530 to -0.8031	Yes	****
49	3:C2 vs. 7:Cnt	0.0200	-0.3432 to 0.3832	No	ns
50	3:C2 vs. 7:PHB	0.005000	-0.3582 to 0.3682	No	ns
51	3:C2 vs. 7:C1	-0.3550	-0.7182 to 0.008250	No	ns
52	3:C2 vs. 7:C2	-0.2505	-0.6137 to 0.1127	No	ns
53	3:C2 vs. 7:C+	-1.166	-1.530 to -0.8031	Yes	****
54	3:C2 vs. 14:Cnt	0.0210	-0.3422 to 0.3842	No	ns
55	3:C2 vs. 14:PHB	0.0165	-0.3467 to 0.3797	No	ns
56	3:C2 vs. 14:C1	-0.6260	-0.9892 to -0.2628	Yes	***
57	3:C2 vs. 14:C2	-0.4000	-0.7632 to -0.03675	Yes	*
58	3:C2 vs. 14:C+	-1.166	-1.530 to -0.8031	Yes	****
59	3:C+ vs. 7:Cnt	1.186	0.8231 to 1.550	Yes	****
60	3:C+ vs. 7:PHB	1.171	0.8081 to 1.535	Yes	****
61	3:C+ vs. 7:C1	0.8113	0.4481 to 1.175	Yes	****
62	3:C+ vs. 7:C2	0.9158	0.5526 to 1.279	Yes	****
63	3:C+ vs. 7:C+	0.0	-0.3632 to 0.3632	No	ns
64	3:C+ vs. 14:Cnt	1.187	0.8241 to 1.551	Yes	****
65	3:C+ vs. 14:PHB	1.183	0.8196 to 1.546	Yes	****
66	3:C+ vs. 14:C1	0.5403	0.1771 to 0.9036	Yes	**
67	3:C+ vs. 14:C2	0.7663	0.4031 to 1.130	Yes	****
68	3:C+ vs. 14:C+	0.0	-0.3632 to 0.3632	No	ns
69	7:Cnt vs. 7:PHB	-0.0150	-0.3782 to 0.3482	No	ns
70	7:Cnt vs. 7:C1	-0.3750	-0.7382 to -0.01175	Yes	*
71	7:Cnt vs. 7:C2	-0.2705	-0.6337 to 0.09275	No	ns
72	7:Cnt vs. 7:C+	-1.186	-1.550 to -0.8231	Yes	****
73	7:Cnt vs. 14:Cnt	0.0010	-0.3622 to 0.3642	No	ns
74	7:Cnt vs. 14:PHB	-0.0035	-0.3667 to 0.3597	No	ns
75	7:Cnt vs. 14:C1	-0.6460	-1.009 to -0.2828	Yes	***
76	7:Cnt vs. 14:C2	-0.4200	-0.7832 to -0.05675	Yes	*
77	7:Cnt vs. 14:C+	-1.186	-1.550 to -0.8231	Yes	****
78	7:PHB vs. 7:C1	-0.3600	-0.7232 to 0.003250	No	ns
79	7:PHB vs. 7:C2	-0.2555	-0.6187 to 0.1077	No	ns
80	7:PHB vs. 7:C+	-1.171	-1.535 to -0.8081	Yes	****
81	7:PHB vs. 14:Cnt	0.0160	-0.3472 to 0.3792	No	ns
82	7:PHB vs. 14:PHB	0.0115	-0.3517 to 0.3747	No	ns
83	7:PHB vs. 14:C1	-0.6310	-0.9942 to -0.2678	Yes	***
84	7:PHB vs. 14:C2	-0.4050	-0.7682 to -0.04175	Yes	*
85	7:PHB vs. 14:C+	-1.171	-1.535 to -0.8081	Yes	****
86	7:C1 vs. 7:C2	0.1045	-0.2587 to 0.4677	No	ns
87	7:C1 vs. 7:C+	-0.8113	-1.175 to -0.4481	Yes	****
88	7:C1 vs. 14:Cnt	0.3760	0.01275 to 0.7392	Yes	*
89	7:C1 vs. 14:PHB	0.3715	0.008250 to 0.7347	Yes	*
90	7:C1 vs. 14:C1	-0.2710	-0.6342 to 0.09225	No	ns
91	7:C1 vs. 14:C2	-0.0450	-0.4082 to 0.3182	No	ns
92	7:C1 vs. 14:C+	-0.8113	-1.175 to -0.4481	Yes	****
93	7:C2 vs. 7:C+	-0.9158	-1.279 to -0.5526	Yes	****
94	7:C2 vs. 14:Cnt	0.2715	-0.09175 to 0.6347	No	ns

2-way ANOVA Multiple comparisons					
95	7:C2 vs. 14:PHB	0.2670	-0.09625 to 0.6302	No	ns
96	7:C2 vs. 14:C1	-0.3755	-0.7387 to -0.01225	Yes	*
97	7:C2 vs. 14:C2	-0.1495	-0.5127 to 0.2137	No	ns
98	7:C2 vs. 14:C+	-0.9158	-1.279 to -0.5526	Yes	****
99	7:C+ vs. 14:Cnt	1.187	0.8241 to 1.551	Yes	****
100	7:C+ vs. 14:PHB	1.183	0.8196 to 1.546	Yes	****
101	7:C+ vs. 14:C1	0.5403	0.1771 to 0.9035	Yes	**
102	7:C+ vs. 14:C2	0.7663	0.4031 to 1.130	Yes	****
103	7:C+ vs. 14:C+	0.0	-0.3632 to 0.3632	No	ns
104	14:Cnt vs. 14:PHB	-0.0045	-0.3677 to 0.3587	No	ns
105	14:Cnt vs. 14:C1	-0.6470	-1.010 to -0.2838	Yes	***
106	14:Cnt vs. 14:C2	-0.4210	-0.7842 to -0.05775	Yes	*
107	14:Cnt vs. 14:C+	-1.187	-1.551 to -0.8241	Yes	****
108	14:PHB vs. 14:C1	-0.6425	-1.006 to -0.2793	Yes	***
109	14:PHB vs. 14:C2	-0.4165	-0.7797 to -0.05325	Yes	*
110	14:PHB vs. 14:C+	-1.183	-1.546 to -0.8196	Yes	****
111	14:C1 vs. 14:C2	0.2260	-0.1372 to 0.5892	No	ns
112	14:C1 vs. 14:C+	-0.5403	-0.9036 to -0.1771	Yes	**
113	14:C2 vs. 14:C+	-0.7663	-1.130 to -0.4031	Yes	****
114					
115					
116	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.
117					
118	3:Cnt vs. 3:PHB	0.0560	0.0560	-0.0100	0.09093
119	3:Cnt vs. 3:C1	0.0560	0.0540	0.002000	0.09093
120	3:Cnt vs. 3:C2	0.0560	0.08050	-0.0245	0.09093
121	3:Cnt vs. 3:C+	0.0560	1.247	-1.191	0.09093
122	3:Cnt vs. 7:Cnt	0.0560	0.0605	-0.0045	0.09093
123	3:Cnt vs. 7:PHB	0.0560	0.0755	-0.0195	0.09093
124	3:Cnt vs. 7:C1	0.0560	0.4355	-0.3795	0.09093
125	3:Cnt vs. 7:C2	0.0560	0.3310	-0.2750	0.09093
126	3:Cnt vs. 7:C+	0.0560	1.247	-1.191	0.09093
127	3:Cnt vs. 14:Cnt	0.0560	0.0595	-0.0035	0.09093
128	3:Cnt vs. 14:PHB	0.0560	0.0540	-0.008000	0.09093
129	3:Cnt vs. 14:C1	0.0560	0.7065	-0.6505	0.09093
130	3:Cnt vs. 14:C2	0.0560	0.4805	-0.4245	0.09093
131	3:Cnt vs. 14:C+	0.0560	1.247	-1.191	0.09093
132	3:PHB vs. 3:C1	0.0560	0.0540	0.0120	0.09093
133	3:PHB vs. 3:C2	0.0560	0.08050	-0.0145	0.09093
134	3:PHB vs. 3:C+	0.0560	1.247	-1.191	0.09093
135	3:PHB vs. 7:Cnt	0.0560	0.0605	0.0055	0.09093
136	3:PHB vs. 7:PHB	0.0560	0.0755	-0.009500	0.09093
137	3:PHB vs. 7:C1	0.0560	0.4355	-0.3695	0.09093
138	3:PHB vs. 7:C2	0.0560	0.3310	-0.2650	0.09093
139	3:PHB vs. 7:C+	0.0560	1.247	-1.191	0.09093
140	3:PHB vs. 14:Cnt	0.0560	0.0595	0.0065	0.09093
141	3:PHB vs. 14:PHB	0.0560	0.0540	0.0020	0.09093

2-way ANOVA Multiple comparisons					
142	3:PHB vs. 14:C1	0.0660	0.7065	-0.6405	0.09093
143	3:PHB vs. 14:C2	0.0660	0.4805	-0.4145	0.09093
144	3:PHB vs. 14:C+	0.0660	1.247	-1.181	0.09093
145	3:C1 vs. 3:C2	0.0540	0.08050	-0.0265	0.09093
146	3:C1 vs. 3:C+	0.0540	1.247	-1.193	0.09093
147	3:C1 vs. 7:Cnt	0.0540	0.0605	-0.006500	0.09093
148	3:C1 vs. 7:PHB	0.0540	0.0755	-0.0215	0.09093
149	3:C1 vs. 7:C1	0.0540	0.4355	-0.3815	0.09093
150	3:C1 vs. 7:C2	0.0540	0.3310	-0.2770	0.09093
151	3:C1 vs. 7:C+	0.0540	1.247	-1.193	0.09093
152	3:C1 vs. 14:Cnt	0.0540	0.0595	-0.005500	0.09093
153	3:C1 vs. 14:PHB	0.0540	0.0640	-0.01000	0.09093
154	3:C1 vs. 14:C1	0.0540	0.7065	-0.6525	0.09093
155	3:C1 vs. 14:C2	0.0540	0.4805	-0.4265	0.09093
156	3:C1 vs. 14:C+	0.0540	1.247	-1.193	0.09093
157	3:C2 vs. 3:C+	0.08050	1.247	-1.166	0.09093
158	3:C2 vs. 7:Cnt	0.08050	0.0605	0.0200	0.09093
159	3:C2 vs. 7:PHB	0.08050	0.0755	0.005000	0.09093
160	3:C2 vs. 7:C1	0.08050	0.4355	-0.3550	0.09093
161	3:C2 vs. 7:C2	0.08050	0.3310	-0.2505	0.09093
162	3:C2 vs. 7:C+	0.08050	1.247	-1.166	0.09093
163	3:C2 vs. 14:Cnt	0.08050	0.0595	0.0210	0.09093
164	3:C2 vs. 14:PHB	0.08050	0.0640	0.0165	0.09093
165	3:C2 vs. 14:C1	0.08050	0.7065	-0.6260	0.09093
166	3:C2 vs. 14:C2	0.08050	0.4805	-0.4000	0.09093
167	3:C2 vs. 14:C+	0.08050	1.247	-1.166	0.09093
168	3:C+ vs. 7:Cnt	1.247	0.0605	1.186	0.09093
169	3:C+ vs. 7:PHB	1.247	0.0755	1.171	0.09093
170	3:C+ vs. 7:C1	1.247	0.4355	0.8113	0.09093
171	3:C+ vs. 7:C2	1.247	0.3310	0.9158	0.09093
172	3:C+ vs. 7:C+	1.247	1.247	0.0	0.09093
173	3:C+ vs. 14:Cnt	1.247	0.0595	1.187	0.09093
174	3:C+ vs. 14:PHB	1.247	0.0640	1.183	0.09093
175	3:C+ vs. 14:C1	1.247	0.7065	0.5403	0.09093
176	3:C+ vs. 14:C2	1.247	0.4805	0.7663	0.09093
177	3:C+ vs. 14:C+	1.247	1.247	0.0	0.09093
178	7:Cnt vs. 7:PHB	0.0605	0.0755	-0.0150	0.09093
179	7:Cnt vs. 7:C1	0.0605	0.4355	-0.3750	0.09093
180	7:Cnt vs. 7:C2	0.0605	0.3310	-0.2705	0.09093
181	7:Cnt vs. 7:C+	0.0605	1.247	-1.186	0.09093
182	7:Cnt vs. 14:Cnt	0.0605	0.0595	0.0010	0.09093
183	7:Cnt vs. 14:PHB	0.0605	0.0640	-0.0035	0.09093
184	7:Cnt vs. 14:C1	0.0605	0.7065	-0.6460	0.09093
185	7:Cnt vs. 14:C2	0.0605	0.4805	-0.4200	0.09093
186	7:Cnt vs. 14:C+	0.0605	1.247	-1.186	0.09093
187	7:PHB vs. 7:C1	0.0755	0.4355	-0.3600	0.09093
188	7:PHB vs. 7:C2	0.0755	0.3310	-0.2555	0.09093