



IMPLANTES DE BLENDA DE POLICAPROLACTONA E NAFION® EM TÍBIA DE RATOS

IMPLANTS OF POLYCAPROLACTONE AND NAFION® BLENDS IN TIBIA OF RATS

Pedro Paulo BARROS¹
Silvana Navarro CASSU²
Rita Aparecida ZOPPI³
Norair Salviano dos REIS¹
Paula Lourenço DOTTO⁴
Renata Escudeiro MARÃO⁴
Patrícia Gonçalves CAPARROZ⁵

RESUMO

Objetivo

Blenas biodegradáveis e bioabsorvíveis de policaprolactona e NAFION® foram utilizadas como materiais de implantes. A policaprolactona possui alta cristalinidade, o que garante um processo de degradação relativamente lento quando implantada em sistemas biológicos. A utilização do NAFION® teve por finalidade a avaliação da influência de um polímero condutor iônico sobre a taxa de deposição de células que constituem o tecido ósseo e, portanto, sua restauração.

¹ Faculdade de Ciências Biológicas, Centro de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica de Campinas. Av. John Boyd Dunlop, s/n, Prédio Administrativo, Jardim Ipaussurama, 13059-900, Campinas, SP, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: P.P. BARROS. E-mail: <barrosp@puc-campinas.edu.br>.

² Divisão de Química, Instituto de Aeronáutica e Espaço, Centro Técnico Aeroespacial. São José dos Campos, SP, Brasil.

³ Laboratório de Pesquisas, Faculdade de Química, Centro de Ciências Exatas, Ambientais e Tecnológicas, Pontifícia Universidade de Campinas. Campinas, SP, Brasil.

⁴ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica de Campinas. Campinas, SP, Brasil.

⁵ Faculdade de Ciências Médicas, Centro de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica de Campinas. Campinas, SP, Brasil.

Métodos

Foram realizados testes *in vivo* com blendas, em ratos, contendo 90% e 70% em massa de policaprolactona como materiais de implantes em fraturas ósseas em ratos.

Resultados

Nos implantes dos corpos de prova na composição 70/30 policaprolactona/NAFION®, foi observada ao final de 32 semanas, a presença de osso neoformado dentro do polímero, atuando, assim, como estrutura de suporte temporário. Entretanto, nos implantes realizados com a blenda contendo 90% de policaprolactona não se observou a presença de osso neoformado no interior do polímero.

Conclusão

A blenda na composição 90/10 policaprolactona/NAFION®, não favorece a migração e o crescimento celular.

Termos de indexação: implantes absorvíveis; materiais biocompatíveis; policaprolactona; ratos.

ABSTRACT

Objective

Biodegradable and bioreabsorbable blends of polycaprolactone and NAFION® were tested as implant materials. Polycaprolactone presents high crystallinity, which ensures a relatively slow degradation process when it is implanted in biological systems. The purpose of using NAFION® was the evaluation of the influence of an ionic conductive polymer on bone tissue cell deposition rate therefore, bone defect repair.

Methods

In vivo studies were carried out in rats with polycaprolactone/ NAFION® blends containing 90% and 70% of polycaprolactone as materials for bone defects repair.

Results

After 32 weeks, the formation of new bone inside of the implant of polycaprolactone /NAFION® 70/30 blends was observed, showing that these polymer blends act as a temporary support structure for bone regeneration. In the implant of polycaprolactone /NAFION® 90/10 blends this behavior was not observed.

Conclusion

This blend composition of polycaprolactone/NAFION® 90/10 is not suitable to allow cell growth.

Indexing terms: *absorbable implants; biocompatible materials; polycaprolactone, rats.*

INTRODUÇÃO

Na ocorrência de fraturas comuns, quando ossos longos, como a tíbia, são lesados, ocorre lesão de tecidos moles associados, vasos sanguíneos, destruição da matriz óssea, do endóstio e do

perióstio, junto ao local do osso fraturado. Nesses casos, o procedimento para se restabelecer as funções consta da aproximação e da imobilização das extremidades ósseas.

O perióstio e o endóstio junto à área fraturada respondem com intensa proliferação,

formando um tecido muito rico em células que constituem um colar em torno da fratura e que penetra entre as extremidades ósseas rompidas do local. Surge, portanto, um tecido ósseo imaturo que pode ter início por ossificação endocondral ou por ossificação intramembranosa, formando um calo ósseo que se une provisoriamente às extremidades do osso fraturado. A remodelação do calo ósseo ocorre à medida que o osso volta gradualmente às suas atividades^{1,2}. Em geral, são necessárias de seis a oito semanas para o desenvolvimento de novo tecido ósseo³.

Em fraturas de ossos compactos nos quais ocorre perda substancial de tecido ósseo, os procedimentos habituais de aproximação das extremidades não são utilizados. Como recurso de reconstituição da peça óssea, podem ser utilizados auto-enxertos ósseos. Nesses casos, o enxerto ósseo é fixado na sua nova posição e somente as células osteogênicas do perióstio, endóstio e osteócitos próximos às superfícies banhadas pelo líquido tissular possuem condições favoráveis de sobrevivência.

Diante desse quadro, as células da camada osteogênica provenientes do perióstio, do endóstio e da medula do osso hospedeiro se proliferam e migram em direção ao auto-enxerto, formando novas trabéculas ósseas, que, após algum tempo, aumentam em comprimento e em espessura e vão se depositando sobre o enxerto. Dessa forma, o novo tecido ósseo é formado e o enxerto é lentamente reabsorvido. Portanto, nesses casos os enxertos atuam como estrutura de suporte provisório e temporário e também permitem a migração de células osteogênicas que darão origem a novo tecido ósseo no local³.

Em situações nas quais não há possibilidade para realizar o auto-enxerto, o auxílio para o reparo de fraturas ósseas pode ser obtido com a utilização de materiais sintéticos biocompatíveis.

Os materiais híbridos organo-inorgânicos biorreabsorvíveis preparados pelo processo sol-gel têm-se mostrado adequados para o desenvolvimento de dispositivos temporários usados em osteossíntese; a fase orgânica é reabsorvida e a fase inorgânica pode atuar como suporte ou mesmo facilitar a formação de tecido ósseo. O processo sol-gel é

caracterizado pela ocorrência de duas reações, uma de hidrólise e outra de condensação. O material orgânico, em geral um polímero, entra na fase de condensação e é incorporado à rede tridimensional formada por um óxido metálico ou um óxido de silício⁴.

Neste trabalho, testou-se a utilização de blends de PCL e NAFION® obtidas pelo processo sol-gel na presença do 3-aminopropiltriétoxissilano (3-APTEOS). As blends foram utilizadas como material de reposição óssea em fraturas com perda óssea em tíbias de rato. Esse sistema polimérico tem sido investigado também quanto às suas propriedades físico-químicas. Em um trabalho prévio, as blends foram caracterizadas por testes de solubilidade, análise termogravimétrica e calorimetria diferencial de varredura⁵.

A policaprolactona (PCL) foi escolhida por apresentar alta flexibilidade e cristalinidade, que garantem um processo de degradação relativamente lento quando implantada em sistemas biológicos. Esse polímero pode conter grupos terminais hidroxílicos ou vinílicos dependendo do mecanismo de polimerização, sendo ambos reativos frente a alcoxisilanos, podendo ser incorporado à rede de sílica⁶⁻⁹.

A utilização do NAFION® teve por finalidade a avaliação da influência de um polímero condutor iônico sobre a taxa de deposição de células que constituem o tecido ósseo e, portanto, a restituição do mesmo. O NAFION® é um ionômero com uma cadeia polimérica similar ao Teflon®, possuindo o ácido sulfônico como grupo terminal, o que permite a sua incorporação à rede de silício^{10,11}. A condutividade iônica de materiais híbridos organo-inorgânicos à base de NAFION® obtidos pelo processo sol-gel também foi investigada¹².

Outros tipos de sistemas bioabsorvíveis à base de poli(L-ácido láctico) têm sido objeto de estudo, visando serem utilizados como suporte para a cultura de células¹³ e em implantes em defeitos produzidos na tíbia de ratos¹⁴.

MÉTODOS

As blends PCL/NAFION® contendo 10,0% e 30,0% de NAFION® e 2,5% em massa de 3-APTEOS

foram preparadas em solução pelo processo sol-gel. A policaprolactona (PCL) com massa molar (Mw) de 80 000g/mol, o NAFION®, 5,0% (m/v) em solvente contendo álcoois alifáticos e cerca de 20,0% de água de equivalente grama 1100, e o 3-aminopropil trietóxissilano (3-APTEOS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich e utilizados como recebidos.

Num procedimento de preparação típico, as blendas foram obtidas a partir da mistura da solução de NAFION®, e uma solução de PCL a 5% (m/v) em tetrahidrofurano (THF) previamente destilado. O 3-APTEOS foi parcialmente hidrolisado em solução de THF antes de ser adicionado às blendas. Utilizou-se meio mol de água para cada mol de 3-APTEOS agitando-se a solução durante 30 minutos. Após esse período adicionou-se a PCL e o NAFION®, agitando-se por três horas. As misturas foram então colocadas em placas de Teflon® tampadas e permaneceram em repouso durante 24 horas. Depois desse período as tampas foram retiradas e as placas contendo as blendas ainda líquidas foram deixadas em um recipiente contendo atmosfera saturada por solvente durante 24 horas. Após essa etapa as amostras foram secas ao ar por 48 horas e em seguida em estufa a vácuo por 8 horas a 30°C. Foram preparadas também blendas contendo 10% e 20% em massa de NAFION® e 10% do 3-APTEOS.

As blendas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM). As amostras foram fraturadas em nitrogênio líquido. A superfície de fratura foi metalizada com ouro, e posteriormente analisada em um microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM T-300.

A condutividade iônica das blendas de PCL/NAFION® foi medida utilizando-se a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica. Medidas de impedância eletroquímica foram feitas a 25°C, umidade de 50%, com os filmes prensados entre dois eletrodos de aço inoxidável (diâmetro igual a 1cm) e fixados em uma cela rosqueável construída em Nylon. As medidas foram feitas usando-se um potenciostato/galvanostato com analisador de resposta de frequência PGSTAT 20 Autolab Eco Chemie, interfaceado a um microcomputador. A faixa de frequência analisada foi de 10^{-1} a 10^4 Hz,

com potencial aplicado de 0V e amplitude de 0,010V. A espessura das amostras variou de 0,5 a 0,75mm.

Ensaio de citotoxicidade foram realizados para as blendas PCL/NAFION® contendo 10% de 3-APTEOS e 10% e 20% em NAFION®, preparando-se uma suspensão celular de NCTC – clone L929 da ATCC-CCL1, de $2,5 \times 10^5$ células/mL. Distribuíram-se 200µL dessa solução em cada poço (5×10^4 células/poço), os quais continham os controles positivo e negativo, e as amostras a serem testadas (triplicatas), com dimensões de 1 x 1 x 0,005cm. As amostras foram previamente esterilizadas em luz UV por duas horas. A microplaca foi colocada em incubadora úmida contendo 5% de CO₂, a 37°C durante 24 horas, visando à ocorrência de adesão das células.

Após a adesão das células na placa, o meio de cultura foi desprezado e 200µL de cada diluição foram colocados em contato com as células aderidas em cada poço, em triplicata. A placa foi mantida em estufa úmida a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂ por 24 horas. Decorrido esse período os meios foram trocados por meios de cultura-uso contendo 50µg do corante vermelho neutro/ml e incubados por três horas. Após captação do corante a placa foi lavada com uma solução de CaCl₂ em formaldeído e em seguida cada poço recebeu 200µL da solução de ácido acético em etanol. A placa foi agitada por 10min e levada para um leitor de ELISA em 540nm e filtro de referência de 630nm.

Foram utilizados 20 ratos albinos (*Rattus norvegicus*), machos, adultos, da linhagem *Wistar*, não isogênicos, pesando 270 ± 10 gramas, provenientes do biotério do *Campus II* da Pontifícia Universidade Católica de Campinas, adaptados ao biotério do Laboratório Experimental de Fisiologia da Faculdade de Ciências Biológicas por um período de 15 dias antes do início do experimento, mantidos em ambiente controlado claro-escuro por período de doze horas cada e ventilação adequada, recebendo água e ração *ad libitum*. Os ratos foram divididos em quatro grupos experimentais de cinco animais cada um, assim estabelecidos em função do tempo de permanência dos corpos de prova implantados nas tíbias das patas direita e esquerda. Os materiais implantados permaneceram 4, 8, 16 e 32 semanas.

Depois de pesados, os animais foram submetidos à anestesia geral por solução de Cloridrato de Xilasina a 2% e Ketamina administrado por via intramuscular na dose de 1,5ml/kg de peso corporal. Posteriormente foram colocados em placa de contenção na posição de cúbito dorsal e tiveram as patas traseiras tricotomizadas. Após assepsia do local, realizada com solução à 1% de PVPI adquirida do laboratório farmacêutico Rioquímica, foi feita, com auxílio de uma tesoura de ponta fina, uma incisão na pele de aproximadamente 1cm, paralelamente ao longo do eixo da tíbia. Com o auxílio de um bisturi o tecido muscular foi seccionado até a exposição do periósteo. Com o uso de um minimotor de baixa rotação e uma broca com 3mm de diâmetro, foi produzida uma cavidade no terço superior da tíbia de modo a permitir a introdução do corpo de prova. Esse procedimento foi realizado nas duas patas traseiras de cada animal.

Na pata traseira direita foi implantado o corpo de prova 90/10 PCL/NAFION® 2,5% m/v de 3-APTEOS e na pata traseira esquerda o corpo 70/30 PCL/NAFION® 2,5% m/v de 3-APTEOS. Posteriormente o tecido muscular e a pele foram suturados com fio absorvível e sobre os cortes foi aplicada a mesma solução anti-séptica. Nas primeiras 48 horas após a cirurgia, os animais receberam doses orais de analgésico dipirona. Os animais foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia com solução de Hidrato de Cloral a 10,0% na dose de 400mg/kg de peso corporal, imediatamente após 4, 8, 16 e 32 semanas dos implantes.

Foram removidos espécimes do tecido contendo os corpos de prova e em seguida fixados por imersão em solução de formol tamponado a 10% por 48 horas e posteriormente descalcificados em EDTA. Finalizado o tempo de descalcificação, os espécimes foram submetidos ao processamento histológico para a obtenção de cortes de 5µm de espessura. De cada espécime, foram obtidas 10 lâminas, das quais 5 foram coradas com hematoxilina-eosina e 5 foram coradas pelo método de Masson. As lâminas histológicas foram examinadas ao microscópio de luz para obtenção dos resultados¹⁵.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A morfologia das blendas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura. Na Figura 1-A é mostrada a fotomicrografia obtida para a blenda 90/10, onde pode se observar duas morfologias distintas: uma região mais porosa e uma mais compacta, contendo poros menores. Essa diferença de porosidade deve estar associada ao efeito de evaporação do solvente. A evaporação do THF na superfície deve ocorrer rapidamente, formando-se um filme denso, ou pouco poroso, o qual impede a evaporação subsequente do solvente restante, assim, a pressão de vapor do solvente deve causar o desprendimento do filme da placa de Teflon®, com o surgimento de poros maiores na parte inferior do filme. A blenda contendo 70% de NAFION® apresenta poros de tamanho mais homogêneo ao longo da espessura do filme. Isto pode estar associado a maior quantidade do solvente presente no NAFION®, uma mistura de 20% de água e álcoois alifáticos. O THF deve se misturar ao solvente do NAFION®, que possui menor pressão de vapor que o THF, causando uma evaporação mais lenta e uniforme do solvente ao longo da espessura do filme, tornando sua porosidade mais homogênea.

O primeiro ensaio biológico realizado com esse material foi o teste de citotoxicidade. Para a realização desses ensaios foram escolhidas blendas contendo 10,0% em massa de 3-APTEOS, e 10,0% e 20,0% em massa de NAFION®, pois já se sabe que tanto a PCL como o NAFION® são materiais biocompatíveis, porém a introdução de um aminossilano poderia afetar essa propriedade. As blendas apresentaram um comportamento próximo ao exibido pelo controle negativo, o que indicou que esse material não apresenta citotoxicidade de acordo com o teste realizado. Esse resultado garante que blendas obtidas com menores teores do aminossilano, como a blenda utilizada neste trabalho (contendo 2,5% de aminossilano), também não apresentem citotoxicidade.

As lâminas histológicas mostraram-se qualitativamente semelhantes dentro do mesmo grupo experimental. Os cortes dos tecidos ósseos foram corados em HE e Masson, no entanto, são

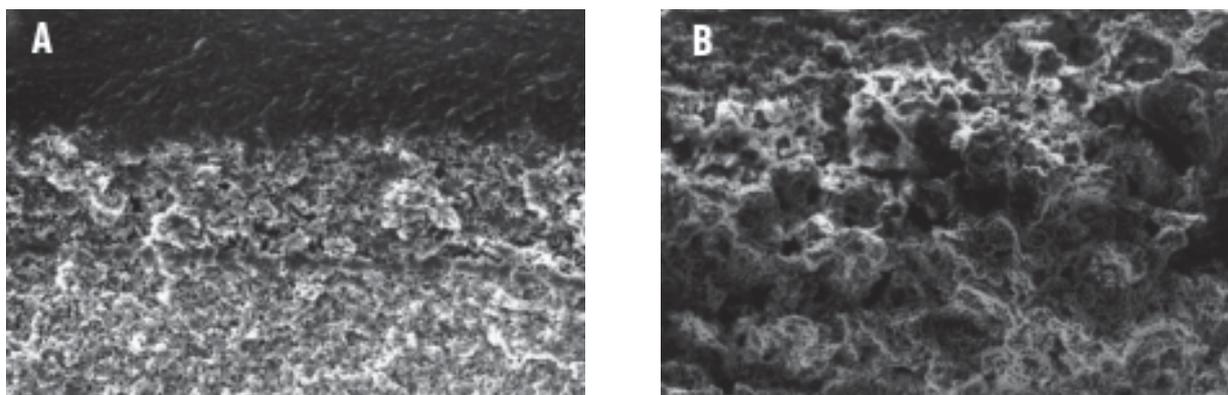


Figura 1. Fotomicrografias obtidas por SEM para as blendas de PCL/NAFION[®] contendo 2,5% de 3-APTEOS e diferentes teores de NAFION[®]: A) 90,0% (x200), B) 70,0% (x100).

apresentadas as fotomicrografias obtidas em Masson, que permitem a visualização dos componentes do infiltrado celular e colágeno no interior do implante.

Na Figura 2 são mostradas as fotomicrografias dos implantes de PCL/NAFION[®] 70/30 obtidas em diferentes períodos de tempo.

Observou-se a proliferação do periósteo sobre o infiltrado linfoistiocitário, vasos neoformados e colágeno não organizado, sendo o implante invadido por macrófagos e colágeno, envolvido por fina cápsula de natureza fibrilar até a semana 4 (Figura 2-A).

Na semana 8, o polímero apresentou-se circunscrito por tecido ósseo trabecular com pouco osteóide em seu interior (Figura 2-B). Na semana 16 observou-se o aumento do osteóide e osso neoformado dentro do polímero (Figura 2-C) e aspectos que aparecem evoluídos até a semana 32 (Figura 2-D).

Pelos resultados (Figura 2) observa-se que a blanda PCL/NAFION[®] 70/30 proporcionou a proliferação celular no interior do implante, facilitando a neoformação óssea e mostrando que esse material atua como estrutura de suporte temporário.

O comportamento celular nos implantes ósseos realizados com a blanda contendo 90% da PCL é mostrado na Figura 3.

Observou-se que o polímero foi envolvido por fina e descontínua camada de tecido ósseo trabecular,

e os osteoblastos margeando as trabéculas até a semana 4 (Figura 3-A).

Na semana 8, o polímero apresentou-se circunscrito por camada de tecido fibroso derivado do endósteo e por tecido ósseo secundário, além de células linfoistiocitárias em seu interior que posteriormente se reduzem até a semana 32 (Figura 3-B).

Esses resultados mostram que a blanda PCL/NAFION[®] 90/10 não proporcionou a proliferação de células ósseas em seu interior, permanecendo circunscrita por tecido ósseo.

Em um trabalho prévio envolvendo ensaios de cultura de células de osteoblastos humanos nas blendas de PCL/NAFION[®], também foi verificado que as células crescem de maneira diferente dependendo da composição da blanda. Nas blendas 90/10, foi encontrado um número maior de células, distribuídas como camadas confluentes e semiconfluentes, enquanto que nas blendas 70/30, as células foram observadas principalmente nos poros¹⁶.

A diferença no crescimento celular nas blendas PCL/NAFION[®] pode estar relacionada a dois fatores principais: a diferença na porosidade das blendas 90/10 e 70/30 (Figura 1), e a variação na condutividade iônica desses materiais. Como esperado, o aumento no teor de NAFION[®] nas blendas causa um aumento em sua condutividade iônica. No caso das blendas contendo 10,0% e 30,0% em NAFION[®] (2,5% de 3-APTEOS) a condutividade passa de aproximadamente $1,5 \times 10^{-12}$ S/cm

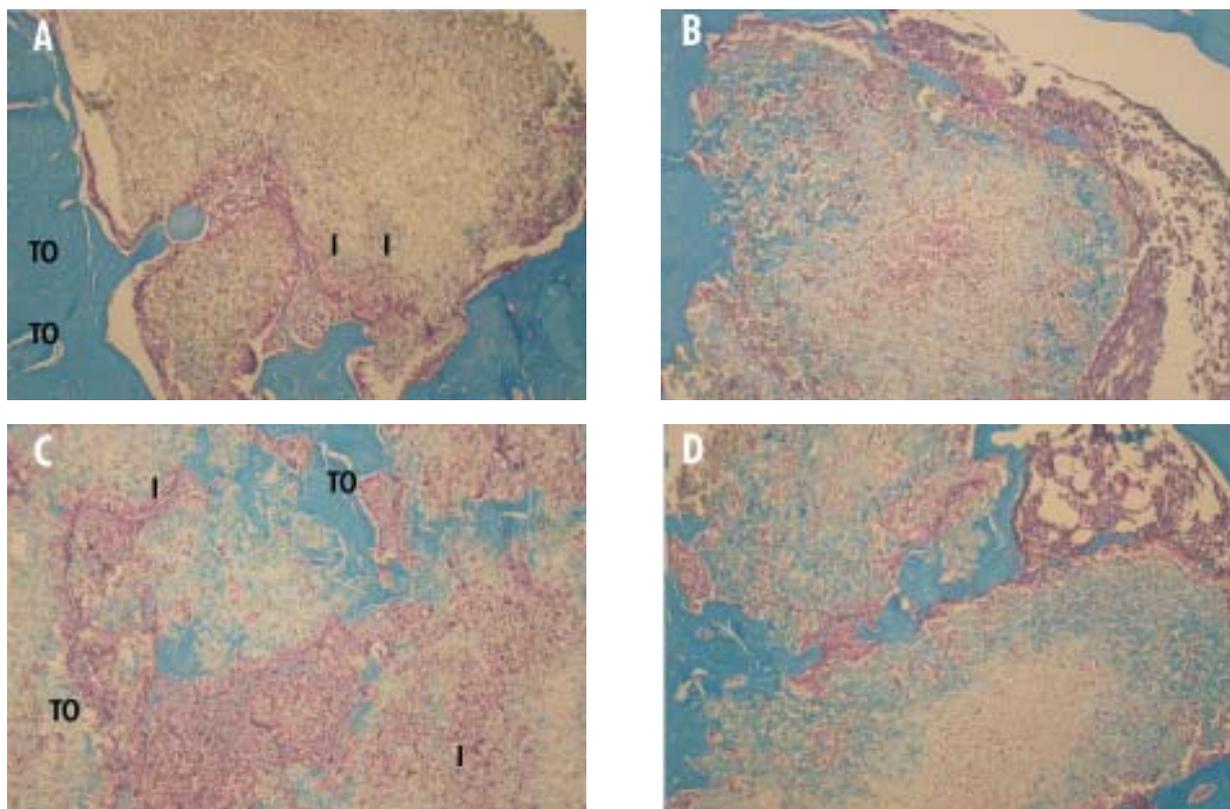


Figura 2. Fotomicrografia do implante de PCL/NAFION® 70/30 após: (A) 04, (B) 8, (C) 16 e (D) 32 semanas. Notas: I: implante; TO: tecido ósseo. Corado com Masson (100X).

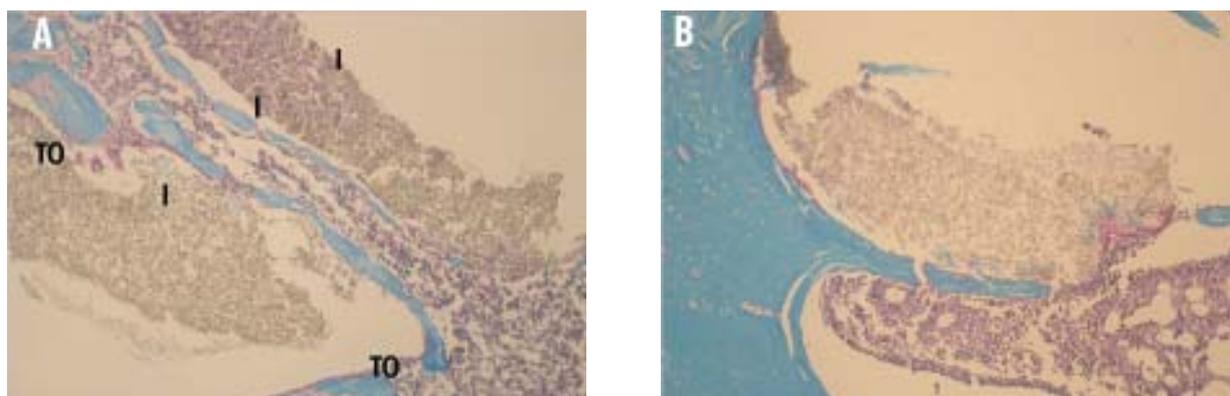


Figura 3. Microfotografia do implante de PCL/NAFION® 90/10 após: (A) 04 e (B) 32 semanas. Notas: I: implante; TO: tecido ósseo. Corado com Masson (100X).

para 3×10^{-9} S/cm. Apesar de a ordem de grandeza da condutividade ser pequena, com o aumento do

teor de NAFION® a condutividade aumenta aproximadamente 2 mil vezes.

Não foram encontrados na literatura estudos relativos à utilização de blendas de PCL/NAFION® em implantes ósseos até o presente momento.

CONCLUSÃO

A utilização da blenda PCL/ NAFION® como implante em fraturas com perda óssea foi realizada com sucesso em ratos, não se observando reações inflamatórias crônicas no período de testes. A composição das blendas mostrou-se essencial no desenvolvimento de tecido ósseo; nas concentrações testadas, a blenda na composição PCL/NAFION® 70/30 mostrou-se a mais adequada, atuando como suporte temporário e facilitando a neoformação óssea. No entanto, por serem materiais sintéticos, sua utilização em implantes ortopédicos em humanos dependerá de testes adicionais para a confirmação desses resultados.

AGRADECIMENTOS

À Sizie Ota Rogero pela realização dos ensaios de citotoxicidade (IPEN/Instituto Adolfo Lutz).

Ao senhor José Alves Correia pela confecção das lâminas histológicas (CCV-PUC-Campinas).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro (Processos 00/04150-7 e 95/9506-4).

REFERÊNCIAS

1. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. 9a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p.111-28.
2. Udupa KN, Prasad GC. Chemical and histochemical studies on the organic constituents in fracture repair in rats. *J Bone Joint Surg Br.* 1963; 45:770-9.
3. Ham AW. Histologia. 3a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1967. p.361-425.
4. Tian D, Blacher S, Jerome R. Biodegradable and biocompatible inorganic-organic hybrid materials: 4. Effect of acid content and water content on the incorporation of aliphatic polyesters into silica by the sol-gel process. *Polymer.* 1999; 40(4):951-7.
5. Cassu SN, Zoppi RA, Felisberti MI. Thermal stability of polycaprolactone/Nafion blends prepared in the presence of 3-aminopropyltriethoxysilane. *J Appl Polymer Science.* 2004; 92(6):3701-9.
6. Tian D, Dubois PH, Jerome R. Biodegradable and biocompatible inorganic-organic hybrid materials: 1. Synthesis and characterization. *J Pol Sci Part A - Polym Chem.* 1997; 35(11):2295-309.
7. Tian D, Blacher S, Dubois PH, Jerome R. Biodegradable and biocompatible inorganic-organic hybrid materials: 2. Dynamic mechanical properties, structure and morphology. *Polymer.* 1998; 39(4):855-64.
8. Marra KG, Szem JW, Kumta PN, DiMilla PA, Weiss LE. *In vitro* analysis of biodegradable polymer blend/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res.* 1999; 47(3): 324-35.
9. Dunn AS, Campbell PG, Marra KG. The influence of polymer blend composition on the degradation of polymer/hydroxyapatite biomaterials. *J Mat Sci Med.* 2001; 12(8):673-7.
10. Stefanithis ID, Mauritz KA. Microstructural evolution of a silicon-oxide phase in a perfluorosulfonic acid ionomer by an insitu sol-gel reaction: 3. Thermal-analysis studies. *Macromolecules.* 1990; 23(8): 2397-402.
11. Gresio AJ, Moore RB, Mauritz KA. Chemical modification of a Nafion sulfonyl fluoride precursor via in situ sol-gel reactions. *Polymer.* 1997; 38(6): 1345-56.
12. Zoppi RA, Nunes SP. Electrochemical impedance studies of hybrids of perfluorosulfonic acid ionomer and silicon oxide by sol-gel reaction from solution. *J Electr Chemistry.* 1998; 445(1):39-45.
13. Zoppi RA, Contant S, Duek EAR, Marques FR, Wada MLF, Nunes SP. Porous poly(L-lactide) films obtained by immersion precipitation process: morphology, phase separation and culture of VERO cells. *Polymer.* 1999; 40:3275-89.
14. Zoppi RA, Duek EAR, Coraça DC, Barros PP. Preparation and characterization of poly(L-lactic acid) and poly(ethylene oxide) blends. *Mat Res.* 2001; 4(2): 117-25.
15. ASTM F 981-93. Standard practice for assessment of compatibility of biomaterials for surgical implants with respect to effect of materials on muscle and bone. *Ann Book ASTM Standards.* 1993; 13(1):1-5.
16. Crevelaro MA, Joazeiro PP, Cassu SN, Zoppi RA, Felisberti MI, Santos Jr AR. Evaluation of human osteoblastic cells cultured on poly(caprolactone/Nafion) blends. *Ac Microsc, Supplement B.* 2003; 12:355-6.

Recebido em: 12/8/2005

Versão final reapresentada em: 26/5/2006

Aprovado em: 31/5/2006