



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**

**CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA**

**E ENGENHARIA DE MATERIAIS**



**IMARALLY VITOR DE SOUZA RIBEIRO NASCIMENTO**

**DESENVOLVIMENTO DE COMPÓSITOS BIODEGRADÁVEIS A BASE DE  
PCL/BIOCERÂMICA PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA**

**CAMPINA GRANDE**  
Agosto/2018

IMARALLY VITOR DE SOUZA RIBEIRO NASCIMENTO

**DESENVOLVIMENTO DE COMPÓSITOS BIODEGRADÁVEIS A BASE DE  
PCL/BIOCERÂMICA PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook  
Orientador Externo: Prof. Dr. Miguel Ángel Rodríguez  
Colaborador: Dr. Raúl García Carrodegua  
Agência Financiadora: CAPES

CAMPINA GRANDE – PB  
2018

N244d Nascimento, Imarally Vitor de Souza Ribeiro.  
Desenvolvimento de compósitos biodegradáveis a base de PCL/Biocerâmica para regeneração óssea / Imarally Vitor de Souza Ribeiro Nascimento. - Campina Grande, 2018.  
111 f : il. color.

Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2018.  
"Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook, Prof. Dr. Miguel Ángel Rodríguez".  
Referências.

1. Compósitos. 2. Biomateriais. 3. Arcabouços. 4. Vancomicina. I. Fook, Marcus Vinicius Lia. II. Rodríguez, Miguel Ángel. III. Título.

CDU 620.1:616-7(043)

## **VITAE**

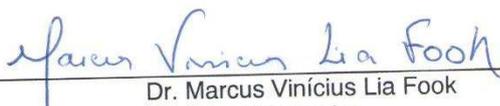
- Engenharia de Materiais UFCG (2012)
- Especialização em Engenharia de Segurança do Trabalho FIP (2014)
- Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais (2014)

IMARALLY VITOR DE SOUZA RIBEIRO NASCIMENTO

DESENVOLVIMENTO DE COMPÓSITOS BIODEGRADÁVEIS A BASE DE  
PCL/BIOCERÂMICA PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciência e Engenharia de  
Materiais como requisito parcial à  
obtenção do título de **Doutor em Ciência  
e Engenharia de Materiais**.

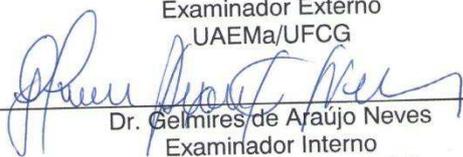
Aprovado em: 20/08/2018



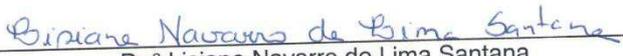
Dr. Marcus Vinícius Lia Fook  
Orientador  
PPG-CEMat/UFCG

  
Dr. Miguel Angel Rodriguez Barbero  
Orientador Externo  
ICV/CSIC

  
Dr. Rômulo Feitosa Navarro  
Examinador Externo  
UAEMa/UFCG

  
Dr. Gelmires de Araújo Neves  
Examinador Interno  
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG

  
Dr.ª Rita de Cássia Alves Leal  
Examinadora Externa  
CERTBIO/UFCG

  
Dr.ª Lisiane Navarro de Lima Santana  
Examinadora Interna  
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** primeiramente, que me deu o dom da sabedoria, a força e a coragem para que eu não desistisse nessa caminhada tão difícil.

Aos **meus pais, Iracema e Josemar**, primeiros incentivadores da minha educação e que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões.

Ao meu **esposo, Willams**, que está sempre ao meu lado em todas as batalhas e sempre me deu forças quando eu parecia fraquejar.

As minhas queridas **amigas-irmãs, Karol, Flávia, Tamy e Bianca**, que estão comigo desde sempre e para sempre, vocês fazem parte da minha vida.

Ao **Prof. Dr. Marcus Vinicus Lia Fook** manifesto o meu reconhecimento pela orientação, onde, paralelamente ao apoio científico, me transmitiu o exemplo de perseverança e competência. A ele devo a motivação para a investigação no campo dos biomateriais. Agradeço também as inúmeras oportunidades a mim concedidas.

Ao **Dr. Miguel Ángel Rodrigues** sou grata pela coorientação, pela amizade e estima com que me tem distinguido e honrado ao longo dos últimos 3 anos. Os seus conselhos, orientações, sugestões e críticas serviram como incentivo para o prosseguimento da minha carreira na investigação científica. Agradeço também o apoio incondicional na criação de condições para a realização do trabalho.

Agradeço ao **Dr. Raúl García Carrodéguas** pela base do projeto e pelos ensinamentos transmitidos. Agradeço também a amizade e por ter sido, junto com **Rosita**, nossa família, minha e de Willams, enquanto estivemos em Madrid.

A todos que fazem parte do **Laboratório CERTBIO**, que contribuíram com meu caminhar acadêmico em especial pela participação efetiva no trabalho a William, pelas análises de MEV e MO, Franci, pelas análises microbiológicas, Daniel e Silvia, pelas análises de adesão celular, a todos do laboratório de ensaios mecânicos, pelos ensaios de resistência à compressão.

Agradeço a **Cássia, Milena, Valéria e Flávia** que sempre estavam dispostas a dividir comigo os conhecimentos adquiridos ao longo dos anos na pesquisa. Agradeço também a **Paulinha e Seu Sérgio**, que nunca mediram esforços para ajudar no que precisasse, contêm sempre comigo.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, em especial a **André e Márcia** que estavam dispostos a ajudar, muito obrigada por todo tempo dedicado a todos os alunos do PPGCEMat.

Ao **Instituto de Cerámica y Vidrio de Madrid** e a todos os pesquisadores, funcionários e alunos, por terem me recebido com tanto carinho e por toda disponibilidade na realização de análises que foram fundamentais para esta tese.

A CAPES pela bolsa concedida.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado sanduíche concedida.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho consiste na obtenção de estruturas tridimensionais porosas de PCL e  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), wollastonita ( $\text{CaSiO}_3$ ) e bredigita ( $\text{Ca}_{14}\text{Mg}_2(\text{SiO}_4)_8$ ) para aplicação em regeneração óssea e liberação de fármaco. A fim de obter estruturas com melhores propriedades no que diz respeito à reabsorção, morfologia e composição química semelhante à fase mineral óssea, característica dos fosfatos. Além disso, proporcionar características bioativas, de biodegradação e osteoindução. As cerâmicas foram obtidas pela síntese de combustão em solução por este ser um método simples e eficaz na obtenção de materiais em nano-escala. Os materiais utilizados para obtenção das cerâmicas foram: nitrato de cálcio, nitrato de magnésio, sílica coloidal, fosfato de amônio dibásico, como fonte de cálcio, magnésio e fósforo, respectivamente. O ácido nítrico e os íons de nitrato foram utilizados como oxidantes. Já a ureia foi utilizada como combustível. Foi investigado o efeito do combustível e também a proporção de combustível e oxidante sobre a reação de combustão, bem como sobre a composição química dos pós obtidos. Após a síntese, os materiais foram caracterizados por difração de raios-x (DRX), microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) e superfície específica. Na síntese do fosfato de cálcio (TCP) foram obtidas as fases: beta fosfato de cálcio ( $\beta$ -  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) e da hidroxiapatita, utilizando três vezes a quantidade de combustível. Na síntese da wollastonita (W) foi obtida a fase de parawollastonita ( $\text{CaSiO}_3$ ), utilizando duas vezes a quantidade de combustível. Já na síntese de bredigita (BRE) foram obtidas as fases de bredigita ( $\text{Ca}_{14}\text{Mg}_2(\text{SiO}_4)_8$ ) e de silicato dicálcico ( $\gamma$ -  $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$ ) quando foi utilizado três vezes a quantidade de combustível. Todas as amostras apresentaram estrutura submicrônica com baixa superfície específica. *Scaffolds* compósitos de PCL/TCP/W e PCL/TCP/BRE foram produzidos pelo método de evaporação de solvente e lixiviação de partículas, utilizando o NaCl como agente porogênico, para obtenção de poros interconectados, na faixa de 100 à 500 micrômetros. Os *scaffolds* produzidos foram caracterizados por microscopia ótica (MO), microscopia eletrônica de varredura (MEV), resistência à compressão, bioatividade *in vitro*, adesão celular, liberação do fármaco e capacidade antimicrobiana. A composição com 70% (v/v) de carga inorgânica apresentou melhor uniformidade nos poros e melhor resistência à compressão. Esses *scaffolds* apresentaram resistência à compressão aceitável para materiais com elevada porosidade, além disso, apresentaram-se biodegradáveis *in vitro*, boa capacidade bioativa, e superfície adequada para adesão celular. Os *scaffolds* com o fármaco vancomicina apresentaram liberação lenta e uniforme do fármaco por um período de 2 meses e boa capacidade antimicrobiana, sugerindo a aplicação vantajosa desses dispositivos para a regeneração de tecidos ósseos.

**Palavras chaves:** Compósitos. Biomateriais. Arcabouços. Vancomicina

## ABSTRACT

The objective of this work is to obtain porous three-dimensional structures of PCL and  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), wollastonite (CaSiO<sub>3</sub>) and bredigite (Ca<sub>14</sub>Mg<sub>2</sub>(SiO<sub>4</sub>)<sub>8</sub>) for application in bone regeneration and drug. In order to obtain structures with better properties with respect to reabsorption, morphology and chemical composition similar to the bone mineral phase, characteristic of the phosphates. In addition, provide bioactive characteristics, biodegradation and osteoinduction. The ceramics were obtained by the synthesis of combustion in solution because this is a simple and efficient method to obtain nano-scale materials. The materials used to obtain the ceramics were: calcium nitrate, magnesium nitrate, colloidal silica, dibasic ammonium phosphate, as source of calcium, magnesium and phosphorus, respectively. Nitric acid and nitrate ions were used as oxidants. The urea was used as fuel. It was investigated the effect of the fuel and also the proportion of fuel and oxidant on the combustion reaction, as well as on the chemical composition of the obtained powders. After the synthesis, the materials were characterized by X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy with field emission (SEM-FEG) and specific surface. In the synthesis of calcium phosphate (TCP) the following phases were obtained: beta-calcium phosphate ( $\beta$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) and hydroxyapatite, using three times the amount of fuel. In the synthesis of wollastonite (W) the parawollastonite phase (CaSiO<sub>3</sub>) was obtained, using twice the amount of fuel. In the synthesis of bredigite (BRE) the bredigite (Ca<sub>14</sub>Mg<sub>2</sub>(SiO<sub>4</sub>)<sub>8</sub>) and dicalcium silicate ( $\gamma$ -Ca<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub>) phases were obtained when the amount of fuel was used three times. All samples had submicron structure with low specific surface area. Scaffolds composed of PCL/TCP/W and PCL/TCP/BRE were produced by the solvent evaporation and particle leaching method, using NaCl as a porogenic agent, to obtain interconnected pores in the range of 100 to 500 micrometers. The scaffolds produced were characterized by optical microscopy (OM), scanning electron microscopy (SEM), compressive strength, in vitro bioactivity, cell adhesion, drug release and antimicrobial capacity. The composition with 70% (v / v) of inorganic filler showed better pore uniformity and better compressive strength. These scaffolds presented acceptable compressive strength for materials with high porosity, in addition, they were biodegradable in vitro, good bioactive capacity, and adequate surface for cell adhesion. The scaffolds with the drug vancomycin showed slow and uniform release of the drug for a period of 2 months and good antimicrobial capacity, suggesting the advantageous application of these devices for the regeneration of bone tissues.

**Keywords:** Composites. Biomaterials. Scaffolds. Vancomycin

## PUBLICAÇÕES

- Trabalho aceito para publicação em Periódico:

NASCIMENTO, I.V.S.R.; CARRODEGUAS, R. G.; FOOK, M. V. L.; RODRIGUEZ, M. A. Synthesis of wollastonite powders by combustion method. Role of amount of fuel. **International Journal of Chemical Engineering.**

- Resumos Publicados em Anais de Eventos:

NASCIMENTO, I.V.S.R.; FOOK, M. V. L.; CARRODEGUAS, R. G.; RODRIGUEZ, M. A. . Preparación y caracterización de polvos nanoestructurados de  $\text{Ca}_7\text{MgSi}_4\text{O}_{16}$  obtenidos por el método de combustión. In: **LV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio**, 2016, Sevilla. Cerámica Y Vidrio 2016: Tradición, Modernidad y Retos para el futuro, 2016. (Apresentação Oral).

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organização estrutural hierárquica do osso, demonstrando sua arquitetura em várias escalas. Fonte: Adaptado. ....	16
Figura 2 - Representação esquemática de como atua a engenharia de tecidos. / ....	19
Figura 3 - Estrutura química do cloridrato de vancomicina - HCL. ....	24
Figura 4 - Diagrama de fases do sistema CaO-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> . ....	26
Figura 5 - Diagrama de fases CaO-SiO <sub>2</sub> . ....	28
Figura 6 - Diagrama de fases do sistema Ca <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub> -Mg <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub> . ....	29
Figura 7 - Etapas da síntese por combustão de solução.. ....	31
Figura 8 – Estrutura molecular da Policaprolactona.....	33
Figura 9 - Fluxograma experimental da pesquisa. ....	43
Figura 10 –TCP obtido pela síntese por combustão de solução. ....	53
Figura 11 - Perfil de temperatura do TCP obtido por combustão de solução. ....	53
Figura 12 - Difratoograma de Raios X das amostras obtidas por combustão de solução. ....	55
Figura 13 – Imagens obtidas por MEV-FEG do TCP obtidos por combustão de solução: (a) TCP1, (b) TCP2 e (c) TCP3. ....	56
Figura 14 - Wollastonita obtida por reação de combustão. ....	58
Figura 15 - Perfil de temperatura da Wollastonita obtida por combustão de solução. ....	58
Figura 16 - Difratoogramas de Raios X das amostras obtida por combustão de solução. ....	59
Figura 17 – Imagens obtidas por MEV-FEG da Wollastonita obtida por combustão de solução: (a) W1, (b) W2 e (c) W3. ....	61
Figura 18 - Bredigita obtida pela síntese por combustão de solução. ....	62
Figura 19 - Perfil de temperatura da bredigita obtida por combustão de solução. ....	63
Figura 20 - Difratoogramas de Raios X das amostras obtidas por combustão de solução. ....	64
Figura 21 - Diagrama de fases do sistema Ca <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub> – Ca <sub>3</sub> MgSiO <sub>2</sub> . (Gutt, 1965) ....	65
Figura 22 – Imagens obtidas por MEV-FEG da Bredigita obtida por combustão de solução: (a) BR1, (b) BR2 e (c) BR3. ....	66
Figura 23 - Curva de extração do agente porogênico. ....	67
Figura 24 - Imagens obtidas por microscopia ótica dos <i>scaffolds</i> preparados com diferentes composições: (a e b) 80(NaCl)-20(PCL), (c e d) 60(carga inorgânica)-40(PCL), (e e f) 70(carga inorgânica)-30(PCL) e (g e h) 80(carga inorgânica)-20(PCL). ....	69
Figura 25- Gráfico Tensão x Deformação dos <i>scaffolds</i> com carga inorgânica: (a) 50(carga inorgânica) -50(PCL); (b) 60(carga inorgânica) - 40(PCL); (c) 70(carga inorgânica) - 30(PCL); (d) 80(carga inorgânica) -20(PCL) e sem carga inorgânica (e) 80(NaCl) - 20(PCL). ....	72
Figura 26 - Imagem obtida por MEV do <i>scaffold</i> sem carga cerâmica. ....	74

Figura 27 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (figura maior) e microscopia ótica (figura menor no canto superior da imagem obtidas por MEV) dos <i>scaffolds</i> PCL/TCP/W (a e b) e PCL/TCP/BRE (c e d).....	75
Figura 28 - Gráfico Tensão x Deformação dos <i>scaffolds</i> PCL/TCP/W.....	76
Figura 29 - Gráfico Tensão x Deformação dos <i>scaffolds</i> PCL/TCP/BRE.....	77
Figura 30 - Superfície dos <i>scaffolds</i> de PCL/TCP/W antes da imersão em SBF. ....	79
Figura 31 - Superfície dos <i>scaffolds</i> de PCL/TCP/W após imersão em SBF: 5 dias (a, b); 7 dias (c,d), 14 dias (e, f); 21 dias (g,h).....	80
Figura 32 - Superfície dos <i>scaffolds</i> de PCL/TCP/W após imersão em SBF por 28 dias. ....	81
Figura 33 - Superfície dos <i>scaffolds</i> de PCL/TCP/BRE antes da imersão em SBF. .	81
Figura 34 - Superfície dos <i>scaffolds</i> de PCL/TCP/BRE após imersão em SBF: 5 dias (a, b); 7 dias (c, d); 15 dias (e, f); 21 dias (g, h).....	83
Figura 35 - Superfície dos <i>scaffolds</i> de PCL/TCP/BRE após imersão em SBF por 28 dias.....	84
Figura 36 - Imagens obtidas por MEV da superfície dos <i>scaffolds</i> após incubação com células L929 por 7 dias: (a e b) PCL/TCP/W e (c e d) PCL/TCP/BRE. ....	85
Figura 37 - Espectro FTIR das amostras. ....	87
Figura 38 - Perfil de liberação da vancomicina a partir dos <i>scaffolds</i> PCL-BRE-Vanco e PCL-W-TCP-Vanco. ....	89
Figura 39 - Atividade antimicrobiana da vancomicina (100µg/mL) frente à cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	91
Figura 40 - Atividade antimicrobiana dos <i>scaffolds</i> frente à cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 25923: (a) PCL-TCP-W; (b) PCL-TCP-W-Vanco; (c) PCL-TCP-BRE; (d) PCL-TCP-BRE-Vanco.....	92
Figura 41 - Gráfico do tamanho (mm) da Zona de inibição produzida pela vancomicina (controle) e pelo antibiótico liberado a partir dos <i>scaffolds</i> .....	93
Figura 42 - Quantificação da degradação das biocerâmicas presentes nos <i>scaffolds</i> após incubação em solução tampão Tris-HCl: (a) concentração iônica de Ca (mg/L), (b) concentração iônica de Si (mg/L) e (c) concentração iônica de Mg (mg/L).....	94
Figura 43- Mudanças de pH na solução tampão Tris-HCl após a imersão dos <i>scaffolds</i> por vários períodos de tempo.....	95

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados estruturais do $\alpha$ -TCP e seus polimorfos.....	25
Tabela 2 - Composição da solução inicial e a proporção de combustível/oxidante usando ureia como combustível para obtenção do TCP.....	37
Tabela 3 - Composição da solução inicial e a proporção de combustível/oxidante usando ureia como combustível para obtenção da Wollastonita.....	38
Tabela 4 - Composição da solução inicial e a proporção de combustível/oxidante usando ureia como combustível para obtenção da Bredigita. ....	38
Tabela 5 - Proporções das composições dos <i>scaffolds</i> obtidos na etapa 01. ....	40
Tabela 6 - Composição, em volume, dos <i>scaffolds</i> PCL/NaCl/TCP/W e PCL/NACl/TCP/BRE. ....	41
Tabela 7 - Composição, em volume, dos <i>scaffolds</i> PCL/NaCl/TCP/W/Vanco e PCL/NACl/TCP/BRE/Vanco. ....	41
Tabela 8 - Dados termodinâmicos padrão dos diferentes compostos.....	45
Tabela 9 - Reagentes utilizados para preparação do SBF.....	49
Tabela 10 - Modelos disponíveis no DDSolver para ajuste de dados de liberação de fármacos.....	51
Tabela 11 – Dados da $T_{ad}$ calculada e da temperatura verificada na síntese. ....	54
Tabela 12 – Superfície específica ( $S_{esp}$ ) e $d_{BET}$ das amostras obtidas por combustão de solução.....	57
Tabela 13 - Dados da $T_{ad}$ e da temperatura verificada na síntese. ....	59
Tabela 14 - Superfície específica ( $S_{esp}$ ) e $d_{BET}$ das amostras obtidas por combustão de solução.....	62
Tabela 15 - Dados da $T_{ad}$ , temperatura verificada na síntese e tempo de reação. ...	63
Tabela 16 - Superfície específica ( $S_{esp}$ ) e $d_{BET}$ das amostras obtidas por combustão de solução.....	67
Tabela 17 - Tamanho médio de poro dos <i>scaffolds</i> obtidos com diferentes proporções de carga inorgânica.....	71
Tabela 18 - Resistência à compressão (MPa) e Módulo de Elasticidade (MPa) dos <i>scaffolds</i> produzidos.....	73
Tabela 19 - Tamanho médio de poro dos <i>scaffolds</i> PCL/TCP/W e PCL/TCP/BRE...	76
Tabela 20 - Resistência à compressão (MPa) e Módulo de Elasticidade (MPa) dos <i>scaffolds</i> produzidos.....	77
Tabela 21 - Cinética de liberação da Vancomicina a partir dos <i>scaffolds</i> PCL-TCP-W-VANCO e PCL-TCP-BRE-VANCO.....	90

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1	Tecido Ósseo.....	15
2.2	Engenharia de tecidos .....	17
2.3	Matrizes Tridimensionais Porosas .....	19
2.4	Sistemas para liberação de fármaco.....	22
2.5	Vancomina .....	23
2.6	Biocerâmicas .....	25
2.6.1	Fosfatos tricálcico - TCP .....	25
2.6.2	Wollastonita - W.....	27
2.6.3	Bredigita - BRE .....	28
2.7	Síntese por combustão de solução.....	30
2.8	Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) .....	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	35
3.1	Materiais .....	35
3.1.1	Reagentes para a síntese por combustão em solução .....	35
3.1.2	Reagentes para a fabricação dos compósitos .....	35
3.2	Etapas de realização da pesquisa .....	35
3.2.1	Etapa I: Obtenção dos pós-cerâmicos por combustão .....	36
3.2.2	Etapa II: Obtenção dos scaffolds PCL/NaCl e PCL/NaCl/W .....	39
3.2.3	Etapa III: Obtenção dos scaffolds PCL/NaCl/TCP/W e PCL/NaCl/TCP/BRE ...	40
3.2.4	Etapa IV: Obtenção dos scaffolds PCL/NaCl/TCP/W/Vancomina e PCL/NaCl/TCP/BRE/Vancomina .....	41
3.3	Caracterização do material .....	41
3.3.1	Etapa I: Caracterização dos pós cerâmicos.....	44
3.3.2	Etapa II: Caracterização dos <i>scaffolds</i> de PCL/NaCl e PCL/NaCl/W.....	46
3.3.3	Etapa III: Caracterização dos <i>scaffolds</i> de PCL/TCP/W e PCL/TCP/BRE.....	48
3.3.4	Etapa IV: Caracterização dos <i>scaffolds</i> de PCL/TCP/W/Vancomina e PCL/TCP/BRE/Vancomina .....	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
4.1	Resultados da etapa I .....	53
4.1.1	Obtenção do TCP .....	53

4.1.2 Obtenção da Wollastonita .....	57
4.1.3 Obtenção da Bredigita .....	62
4.2 Resultados da etapa II .....	67
4.2.1 Extração do agente porogênico .....	67
4.2.2 Microscopia Ótica .....	68
4.2.3 Resistência à Compressão .....	71
4.3 Resultados da etapa III .....	74
4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura .....	74
4.3.2 Resistência à compressão .....	76
4.3.3 Bioatividade <i>In vitro</i> .....	78
4.3.4 Adesão celular <i>In vitro</i> .....	84
4.4 Resultados da Etapa IV .....	86
4.4.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) 86	
4.4.2 Liberação da Vancomicina.....	88
4.4.3 Cinética de Liberação .....	90
4.4.4 Atividade Antimicrobiana .....	91
4.4.5 Biodegradação.....	94
5 CONCLUSÕES .....	97
6 SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS .....	98
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

## 1 INTRODUÇÃO

O tratamento de fraturas, traumas e patologias que levam à perda de porções de tecido ósseo é um desafio importante nas cirurgias ortopédicas, crânio-maxilofacial e odontológica. A solução aplicada por um longo período de tempo para resolver este problema foi o uso de enxertos de osso autólogo, aquele no qual a parte a ser transplantada é retirada do próprio indivíduo, sendo um tipo de transplante que não causa reação de rejeição (Liu; Cao, 2011). No entanto, as quantidades requeridas de enxerto nem sempre estão disponíveis e para a sua coleta precisa-se de uma cirurgia prévia que às vezes pode causar incômodo e complicações ao paciente. Outra alternativa são os aloenxertos, neste caso, os tecidos ou órgãos são retirados de um indivíduo doador geneticamente diferente e implantados em outro da mesma espécie, esse tipo de enxerto pode apresentar rejeição e, para evitar esse problema, precisa de tratamento com drogas imunossupressoras. Uma terceira opção é a utilização dos xenoenxertos, que são os enxertos retirados de um indivíduo de outra espécie, mas esse também pode apresentar rejeição (Borenstein, 2008; Boyan et al., 2011).

Assim, surge a necessidade de produzir dispositivos para a regeneração e/ou substituição óssea e a Engenharia de Tecidos vem sendo estudada por fornecer uma fonte ilimitada desses dispositivos, denominados de *scaffolds*, que são estruturas tridimensionais com função de suporte temporários para adesão e proliferação celular, que irão, juntamente com enzimas e fatores de crescimento favorecer o processo de regeneração dos tecidos (Bellucci et al., 2010).

Para a fabricação destes *scaffolds* tem sido proposta uma grande variedade de materiais, principalmente polímeros, cerâmicos e compósitos (Boyan et al., 2011). Dentre eles, o ácido poliláctico (PLA), seus copolímeros como ácido poliglicólico (PLGA), e a policaprolactona (PCL), têm sido muito estudados, pois são biodegradáveis *in vivo*, seus produtos de degradação não são tóxicos e apresentam baixas temperaturas de transição vítrea, o que facilita seu processamento tecnológico (Borenstein, 2008; Goswami et al., 2013; Navarro et al., 2006). No entanto, para algumas aplicações nas quais é necessário que as propriedades mecânicas do *scaffold* se assemelhem às do osso, é preciso aumentar a tenacidade, resistência e módulo de Young dos materiais usados na sua fabricação. Para isso, é comum adicionar aos polímeros um material de reforço, geralmente fibras ou pós cerâmicos,

resultando em compósitos de matriz polimérica e carga cerâmica (Russias et al., 2006; Tanodekaew et al., 2013; Wang, 2003).

A carga cerâmica também deve ser reabsorvível e biocompatível com o tecido ósseo. Na literatura científica muitos estudos relatam o uso de diferentes cerâmicas de fosfatos e silicatos de cálcio na fabricação de materiais para regeneração óssea (Cao; Kuboyama, 2010; Nandakumar et al., 2013; Verheyen et al., 1992). Dentre as cerâmicas com estas características se destacam, por sua bioatividade e biodegradabilidade, o fosfato tricálcico (TCP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ),  $\alpha$ -metasilicato de cálcio (pseudowollastonita,  $\alpha\text{-CaSiO}_3$ ) e o orto-silicato de heptacálcio e magnésio (bredigita,  $\text{Ca}_7\text{Mg}(\text{SiO}_4)_4$ ) (Alves, 2005; Czechowska et al., 2014; Goswami et al., 2013; Nandakumar et al., 2013; Wu et al., 2007).

Várias são as técnicas para a obtenção de *scaffolds* compósitos (Hutmacher et al., 2008), dentre elas, a técnica de evaporação do solvente tem se destacado por ser uma técnica relativamente simples, que não necessita de equipamentos sofisticados, e é reprodutível. Consiste na dissolução de um polímero num solvente, com a adição e dispersão da carga cerâmica na solução do polímero, e finalmente, a colagem em um molde apropriado e secagem ou liofilização. Quando se requer porosidade, a técnica pode ser modificada mediante a adição de partículas do tamanho adequado de um agente porogênico lixiviável, insolúvel no solvente usado para dissolver o polímero, tal como, sal, glucose, etc., que depois da secagem é dissolvido e extraído do compósito (Thavornnyutikarn et al., 2014).

Os *scaffolds* além de serem utilizados para regeneração óssea podem ser carregados com fármacos que apresentam potencial para tratamento de infecções ósseas. A administração local do fármaco minimizam os efeitos colaterais e o risco de sobredosagem fornecendo concentração terapêutica apropriada para o tratamento (Du et al., 2017; Mouriño et al., 2013).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho consiste na obtenção de estruturas tridimensionais porosas de PCL e  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), wollastonita ( $\text{CaSiO}_3$ ) e bredigita ( $\text{Ca}_{14}\text{Mg}_2(\text{SiO}_4)_8$ ) para aplicação em regeneração óssea e liberação de fármaco. A fim de obter estruturas com melhores propriedades no que diz respeito à reabsorção, morfologia e composição química semelhante à fase mineral óssea, característica dos fosfatos. Além disso, proporcionar características bioativas, de biodegradação e osteoindução.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Tecido Ósseo

Os ossos que compõem o esqueleto apresentam funções importantes, são os principais elementos estruturais do corpo, protegendo os órgãos vitais e fornecendo uma estrutura rígida para a locomoção. Além disso, atuam como reservatório de cálcio e fósforo que são essenciais na hematopoiese (ou seja, produção de células sanguíneas na medula óssea) (Morgan; Bouxsein, 2008; Ralston, 2017).

O tecido ósseo é altamente diversificado, tanto estruturalmente como funcionalmente. Sua arquitetura varia entre macro, micro e nanoestrutura, com arranjo e orientação irregulares, porém otimizados, tornando o osso um material heterogêneo e anisotrópico e, conseqüentemente, apresentando diferentes propriedades mecânicas (Rho et al., 1998).

A macroestrutura do osso é dividida em osso cortical e osso esponjoso. O osso cortical, que compreende 80% da massa óssea, é denso com uma área superficial baixa e forma uma espécie de envelope em torno da cavidade da medula. Sua organização estrutural hierárquica é composta por ósteon em micro escala, fibras de colágeno em uma nano-escala e moléculas de colágeno em uma sub-nano-escala. O osso trabecular ou esponjoso, representa cerca de 20% da massa total do esqueleto tem uma densidade mais baixa e uma área de superfície maior do que o osso cortical (Ralston, 2017; Wu et al., 2014).

O osso é um compósito orgânico-inorgânico natural, composto por fibras de colágeno e nanocristais de uma fase apatítica, a hidroxiapatita (HA) com a fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , podendo conter outros íons adicionais, como o estrôncio, zinco, magnésio, carbonato e etc (Figura 1) (Nair et al., 2013; Wu et al., 2014).

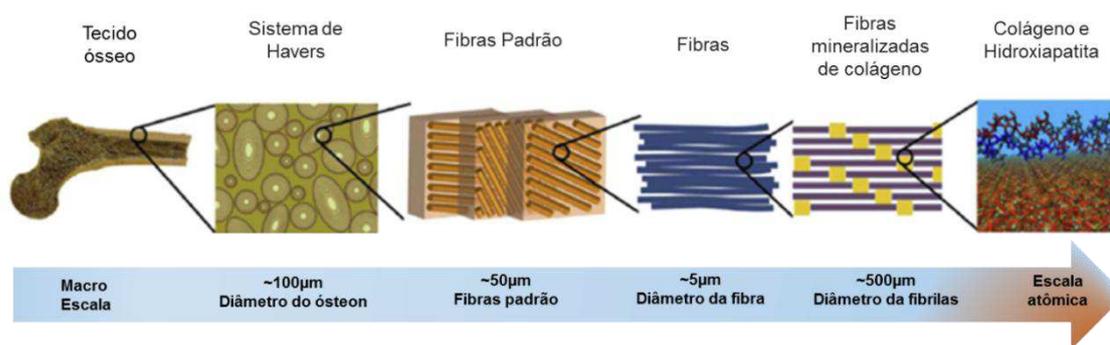


Figura 1 - Organização estrutural hierárquica do osso, demonstrando sua arquitetura em várias escalas. Fonte: Adaptado (Nair et al., 2013).

A modelagem óssea é o processo pelo qual o osso é formado por osteoblastos sem reabsorção óssea prévia. Este processo é vigoroso durante o crescimento e produz alterações no tamanho e forma do osso. Já o remodelamento ósseo ocorre ao longo da vida. O osso é primeiro reabsorvido por osteoclastos e depois formado no mesmo local por osteoblastos. O propósito da modelagem e da remodelação durante a vida adulta é simplesmente manter a resistência óssea por reparação de danos e/ou desgastes (Seeman, 2008). Através da remodelação, nossos ossos são capazes de auto reparar e de adaptar sua estrutura em resposta a mudanças nas demandas mecânicas, biológicas e bioquímicas (Morgan; Bouxsein, 2008).

Por várias razões, como tamanho do defeito ósseo, infecção e muitos outros, o osso ferido ou doente pode não ser capaz de se reparar por meio de fixação mecânica isoladamente. A importância da substituição ou regeneração do osso torna-se clara nos casos de doenças como a osteogênese imperfeita, osteoartrite, osteomelite e osteoporose, em que o desenvolvimento ou volume normal do osso são prejudicados e também em situações em que o osso é removido cirurgicamente por trauma ou infecção grave (Porter et al., 2009; Zhou et al., 2017).

O aumento de procedimentos de reconstrução em ortopedia, devido a traumas, tumor, deformidade, degeneração e envelhecimento da população, tem gerado não só avanços cirúrgicos, como também o desenvolvimento de novos implantes ósseos (Wu et al., 2014).

Na ortopedia a prática clínica moderna demonstrou que o autoenxerto exibe efeito terapêutico superior na união óssea. No entanto, estão em oferta limitada e estão associados a elevadas taxas de morbidade local do doador. Os aloenxertos estarão disponíveis em maiores quantidades mas, apresentam algumas

desvantagens como, o tempo de operação envolvido na colheita do osso autógeno. Os xenoenxertos, enxertos obtidos de outros mamíferos, também podem ocasionar forte rejeição e também a possibilidade de transmissão de vírus e outros agentes infecciosos (Borenstein, 2008; Boyan et al., 2011).

Neste contexto, a engenharia de tecidos e a medicina regenerativa emergiram como estratégias promissoras para a reconstituição óssea com a ambição de contornar as complicações associadas às técnicas tradicionais.

## **2.2 Engenharia de tecidos**

O campo da engenharia de tecidos surgiu na década de 1980 com o objetivo de auxiliar pacientes que sofriam com a perda de tecidos ou órgãos associado à escassez, cada vez maior, de doadores (Langer; Vacanti, 1993).

Este novo campo oferece potencial para resolver os problemas da escassez de doadores de órgãos necessários para manter a qualidade de vida de uma população em crescente envelhecimento. A engenharia de tecidos trata de evitar completamente o risco de reações imunológicas, tais como rejeições (hiperaguda e retardada), bem como infecções virais, utilizando células autólogas (Hench; Jones, 2005; Stock; Vacanti, 2001).

A engenharia de tecidos é um campo interdisciplinar que aplica os princípios e métodos de engenharia e ciências biológicas para entender como funcionam as relações estruturais e funcionais do tecido normal e doente para o desenvolvimento de substitutos a fim de restaurar, manter ou melhorar a função do tecido ou órgão danificado (Lavik; Langer, 2004). De acordo com Langer e Vacanti (1993), o desenvolvimento desses substitutos leva em conta três estratégias gerais: células ou substitutos celulares, fatores de crescimento e matrizes que irão fornecer suporte para a regeneração e/ou substituição tecidual.

Em alguns casos, o crescimento interno das células hospedeiras logo após a implantação do suporte tem sido bem sucedido na geração de novos tecidos, mas na maioria dos casos é necessária uma fonte celular que seja do próprio hospedeiro ou de um doador, que determina o tipo de tecido que será reconstituído. O tipo de célula é um item crítico para o sucesso de uma estrutura no campo da engenharia de tecidos. As células mais utilizadas são células estaminais adultas (células-tronco da medula

óssea, do tecido adiposo, do dente, do sangue periférico), células estaminais embrionárias, células tronco pluripotentes e células geneticamente modificadas (Roseti et al., 2017; Stock; Vacanti, 2001).

Uma vez que estas células são maduras e completamente diferenciadas, elas são geneticamente pré-programada quando inoculada no *scaffold*. As células-tronco apresentam vantagens por apresentar elevada capacidade de proliferação, auto-renovação e diferenciação em múltiplas linhagens, e são, portanto, considerada como uma das melhores fontes de células para engenharia de tecidos (Liu; Cao, 2011).

Outra possibilidade é o uso de *scaffolds* preparados com moléculas solúveis, tais como antibióticos, agentes quimioterapêuticos ou fatores de crescimento (ou seja, Proteínas Morfogenéticas Óssea - BMPs e Fator de Crescimento Vascular do Endotélio) que podem ser administrados no meio em que se encontram, exercendo seus efeitos terapêuticos/regenerativos (Roseti et al., 2017).

No que tange o tratamento de defeitos ósseos, os cientistas têm trabalhado com diferentes materiais para criar substitutos de enxertos ósseos que incluem três propriedades principais: osteoindução, osteocondução, e osteogenicidade aliados a uma estrutura tridimensional e porosa, com propriedade mecânica semelhante ao osso (Boyan et al., 2011; Manjubala et al., 2006).

Na Figura 2 pode-se observar uma representação esquemática de como atua a engenharia tecidual na regeneração óssea.

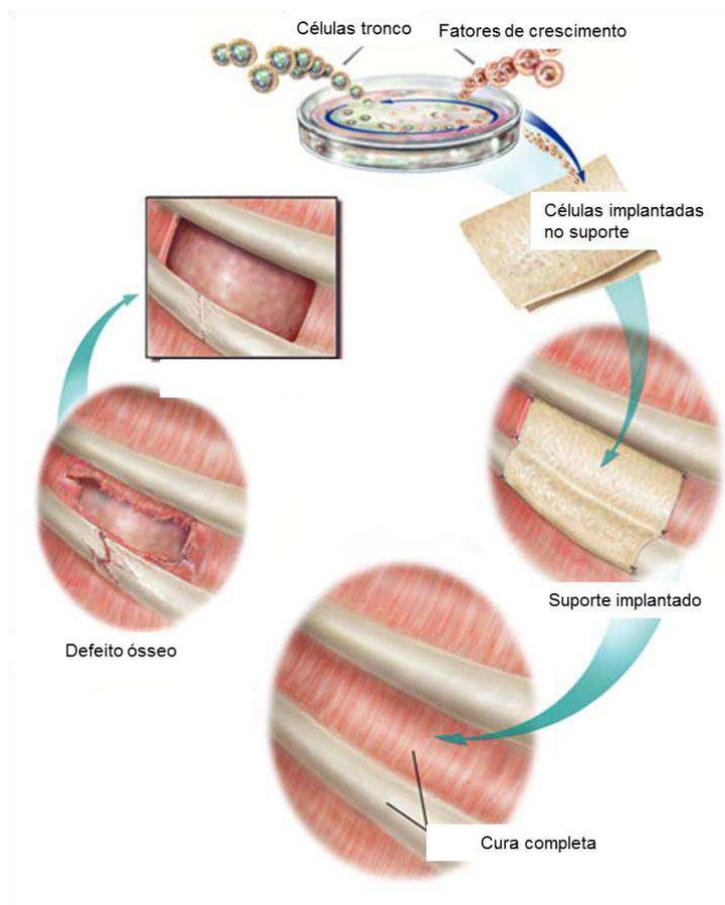


Figura 2 - Representação esquemática de como atua a engenharia de tecidos. Fonte: <http://kaherah.perubatan.org/category/artikel-karya/page/4/>

### 2.3 Matrizes Tridimensionais Porosas

Os avanços recentes na Engenharia de Tecido Ósseo levaram ao desenvolvimento de biomateriais que permitem imitar a estrutura 3D do osso, em termos de propriedades mecânicas, bem como características osteoindutivas, osteocondutoras e osteogênicas (Roseti et al., 2017; Yuan et al., 2015).

As matrizes 3D oferecem um meio para a administração de células e/ou fatores de crescimento para o local da lesão através de um modelo apropriado para a formação de um novo tecido. Estes devem apresentar estrutura tridimensional que dure apenas enquanto necessário para a substituição por um novo tecido (Dawson et al., 2011).

Uma estrutura 3D ideal deve apresentar algumas características, a fim de desempenhar as suas funções adequadamente. Em primeiro lugar, a matriz 3D deve

ser biocompatível, capaz de suportar a fixação celular, proliferação, produção da matriz, e até mesmo a diferenciação, além dos requisitos gerais para biomateriais (por exemplo, não tóxico, não carcinogênico e não causar inflamação) (Henkel et al., 2013; Liu; Cao, 2011).

Sua arquitetura é de importância crítica com a presença de poros interconectados e porosidade superior a 90%, de modo que, os suportes possam fornecer elevada área de superfície para a fixação das células, crescimento, produção e deposição de matriz, e para a nutrição, transporte de resíduos e neovascularização (Amini et al., 2012; Liu; Cao, 2011).

Outro fator importante para permitir a colonização adequada da célula é o tamanho médio dos poros. Vários estudos indicam que o tamanho de poro variando de 100 a 500  $\mu\text{m}$ , é considerado ideal para regeneração óssea e vascularização (Mehr et al., 2015; Zadpoor, 2015)

Estas estruturas devem apresentar propriedades mecânicas adequadas. O módulo de elasticidade, a resistência à tração, resistência à fratura, a fadiga e a porcentagem de alongamento, são consideradas cruciais na engenharia de tecido ósseo e devem ser moduladas ou adaptadas para que sejam equivalente as encontradas no local de implantação, minimizando, o risco de estresse, osteopenia relacionada ao implante e subsequente re-fratura (Roseti et al., 2017).

Além disso devem possuir taxa de degradação adequada, ou seja, após a formação do tecido, deve ser capaz de degradar completamente. Portanto, a taxa de degradação deve ser proporcional ao crescimento do tecido (Liu; Cao, 2011).

Outras propriedades como superfície apropriadas para a interação célula-*scaffold*; baixo custo, facilidade de fabricação e ser esterilizável também são características importantes que devem ser levadas em consideração ao se desenvolver uma matriz 3D (Liu; Cao, 2011).

Vários materiais com características diferentes têm sido investigados para o desenvolvimento de *scaffolds*, incluindo metais, como liga de magnésio, (Witte et al., 2007); cerâmicas, como os fosfatos de cálcio, silicatos de cálcio e biovidros (Kim et al., 2014; Kunjalukkal Padmanabhan et al., 2013); polímeros, como a quitosana, PCL, PLA (Cho et al., 2015; Jiang et al., 2015); e materiais compósitos como  $\alpha$ -TCP - quitosana, HA – PLA, dentre outros (Czechowska et al., 2014; Kothapalli; Shaw; Wei, 2005).

As principais desvantagens dos materiais metálicos é que eles não são biodegradáveis e são rígidos, podendo impedir o tecido hospedeiro de estimulação mecânica e, conseqüentemente, retardar a diferenciação e ativação de células osteoblásticas. Os materiais cerâmicos oferecem grande potencial em termos de biocompatibilidade, no entanto, a desvantagem que atinge esse grupo de materiais é a sua baixa resistência mecânica e fragilidade. Já os polímeros apresentam um grande potencial para a produção de *scaffolds*, pois eles são biocompatíveis, biodegradáveis e têm boa capacidade de processamento, porém podem apresentar desempenho mecânico inadequado (Lichte et al., 2011).

As matrizes 3D podem ainda ser produzidas a partir de materiais compósitos (polímero/cerâmica) de modo a imitar a composição estrutural do osso já que este é, de fato, um material compósito formado de uma mistura de cristais inorgânicos de HA e fibras de colágeno orgânicas (Nair et al., 2013).

Os materiais compósitos tem se destacado na regeneração óssea superando os resultados obtidos quando os seus componentes são usados separadamente. A incorporação de inclusões inorgânicas, como partículas biocerâmicas e de biovidro, parece afetar positivamente as propriedades mecânicas das matrizes (Rezwan et al., 2006; Wahl; Czernuszka, 2006).

A seleção do material para composição do *scaffold* deve ser feita considerando a composição química, a estrutura, propriedades mecânicas, biocompatibilidade e ausência de resposta imune. Além disso, os *scaffolds* podem ser úteis como matrizes para administração de fármacos terapêuticos e/ou fatores de crescimento (Mourino; Boccaccini, 2010; Rai et al., 2005; Romagnoli et al., 2013)

Embora os aspectos de design do *scaffold* possam influenciar a formação do tecido, a adição de fatores de crescimento ou fármacos terapêuticos, pode promover a resposta celular desejada necessária para acelerar a formação do tecido e/ou para tratar uma doença ou infecção local (Mouriño et al., 2013; Rai et al., 2016).

Vários estudos demonstram que matrizes tridimensionais bioativas podem ser potencialmente utilizados como sistemas de liberação de medicamentos relevantes para processos de reparação óssea (Mourino; Boccaccini, 2010; Rai et al., 2005).

## 2.4 Sistemas para liberação de fármaco

Os sistemas para liberação de fármaco tem como objetivo entregar o medicamento em um local específico, em tempo específico e com um determinado padrão de liberação (Stamatialis et al., 2008).

Muitas das propriedades farmacológicas dos fármacos convencionais podem ser melhoradas através do uso de sistemas de liberação de fármaco. As formas de liberação são cada vez mais específicas, os sistemas devem liberar o agente ativo a uma taxa correspondente à necessidade *in vivo* no tempo equivalente a duração do tratamento. A eficiência do tratamento é dependente da capacidade do sistema em tratar de forma seletiva e eficaz células e tecidos direcionados sem afetar outras partes saudáveis do corpo (Allen; Cullis, 2004; Bruschi, 2015).

Um sistema de liberação controlada ideal não deve ser sensível a fatores ambientais, como temperatura, para que possam ser usado com vários agentes ativos e diferentes doses, possuir a capacidade de aumentar ou manter a estabilidade física e química do agente ativo e deve garantir a máxima eficiência, segurança e confiabilidade (Bruschi, 2015; Zhao, 2011).

De acordo com Bruschi (2015) os sistemas terapêuticos para entrega de medicamentos podem ser classificados como passivos (pré-programados), ativos (programáveis ou controlados externamente) e auto programáveis.

Nos sistemas passivos a taxa de liberação é geralmente dependente do tempo (ordem zero) ou a uma taxa de declínio constante (primeira ordem) durante um determinado período de tempo. Esses sistemas podem controlar o fornecimento do fármaco e a dose otimizada (reduzida), administrada ao paciente, reduz o problema dos efeitos colaterais, aumentando a segurança e melhorando a terapia e a adesão do paciente. O sistema ativo é caracterizados por possuir um elemento capaz de receber e converter um sinal externo (por exemplo, elétrico, magnético, térmico ou ultra-sônico), controlando e modelando a liberação do fármaco no corpo. Já no sistema auto programável o elemento que controla a liberação é sensível ao ambiente biológico modulando a liberação do medicamento de acordo com a necessidade momentânea (Bruschi, 2015).

Para se determinar o tipo de liberação, ou de cinética de liberação, são utilizados modelos matemáticos já bastante estudados. Esses modelos agregam valor

para assegurar o design ideal das formulações e compreender o (s) mecanismo (s) de liberação a partir da verificação experimental. A maioria dos modelos existentes são baseados em equações de difusão pois, a difusão de drogas é função da estrutura através da qual a difusão ocorre, como por exemplo, explicar a difusão a partir da matriz polimérica (Peppas; Narasimhan, 2014).

No que tange a regeneração óssea, os medicamentos com administração local têm várias vantagens em comparação com a administração sistêmica, como minimizar os efeitos colaterais, o risco de superdosagem e melhorar a biodisponibilidade do medicamento com a concentração terapêutica apropriada efetivamente atingindo o local alvo (Mouriño et al., 2013). Para este fim, vários biomateriais, como polímeros biodegradáveis, não degradáveis e cerâmicos, foram investigados e utilizados de diferentes maneiras na liberação de antibióticos (Du et al., 2017), anti-inflamatórios (Tavakoli-Darestani et al., 2014), fatores osteogênicos, fatores angiogênicos e outros (Vo et al., 2012; Wang et al., 2011).

## 2.5 Vancomicina

A vancomicina (vanco) é um antibiótico glicopeptídico utilizado para o tratamento de infecções potencialmente fatais causadas por bactérias Gran-positivas, derivado do fungo *Amycolatopsis orientalis*, seu espectro antibacteriano inclui Streptococcus, Enterococcus e Staphylococcus e seu mecanismo de ação ocorre pela ativação de autolisinas da parede celular bacteriana (Papich, 2016; Rai et al., 2016).

Na Figura 3 podemos observar a estrutura química do Cloridrato de Vancomicina (Vancomicina – HCL).



## 2.6 Biocerâmicas

### 2.6.1 Fosfatos tricálcico - TCP

Os fosfatos tricálcicos ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) estão entre os compostos de fosfato de cálcio mais utilizados na fabricação de materiais implantáveis. Eles são encontrados em substitutos de osso, revestimentos cerâmicos, próteses metálicas, cimentos e materiais compósitos. Apresentam razão Ca/P de 1,5 e sua fórmula química é  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Dois tipos de fosfatos tricálcico são utilizados como biomateriais:  $\beta$ -TCP e  $\alpha$ -TCP que desempenham um papel importante em revestimentos de próteses metálicas e em cimentos ósseos. Na Tabela 1 encontram-se os dados estruturais dos polimorfos do TCP (Carrodeguas; De Aza, 2011).

Tabela 1 - Dados estruturais do  $\alpha$ -TCP e seus polimorfos

Propriedades	Polimorfos do $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$		
	$\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$\alpha$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$\alpha'$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
<b>Simetria</b>	Romboédrica	Monoclínica	Hexagonal
<b>Grupo espacial</b>	R3C	$P2_1/a$	$P6_3/mmc$
<b>a (nm)</b>	1.04352(2)	1.2859(2)	0.53507(8)
<b>b (nm)</b>	1.04352(2)	2.7354(2)	0.53507(8)
<b>c (nm)</b>	3.74029(5)	1.5222(3)	0.7684(1)
<b><math>\alpha</math>(°)</b>	90	90	90
<b><math>\beta</math>(°)</b>	90	126.35(1)	90
<b><math>\gamma</math>(°)</b>	120	90	120
<b>Z</b>	21	24	1
<b>V (nm<sup>3</sup>)</b>	3,5272(2)	4,31(6)	0,19052(8)
<b>V<sub>0</sub> (nm<sup>3</sup>)</b>	0,1680(2)	0,180(6)	0,19052(8)
<b>d (g/cm<sup>3</sup>)</b>	3,066	2,866	2,702

Fonte: Carrodeguas; De Aza, 2011.

Na Figura 4 é apresentado o diagrama de fases de equilíbrio do sistema CaO- $\text{P}_2\text{O}_5$  em ausência de água de acordo com Kreidler e Hummel, 1967.

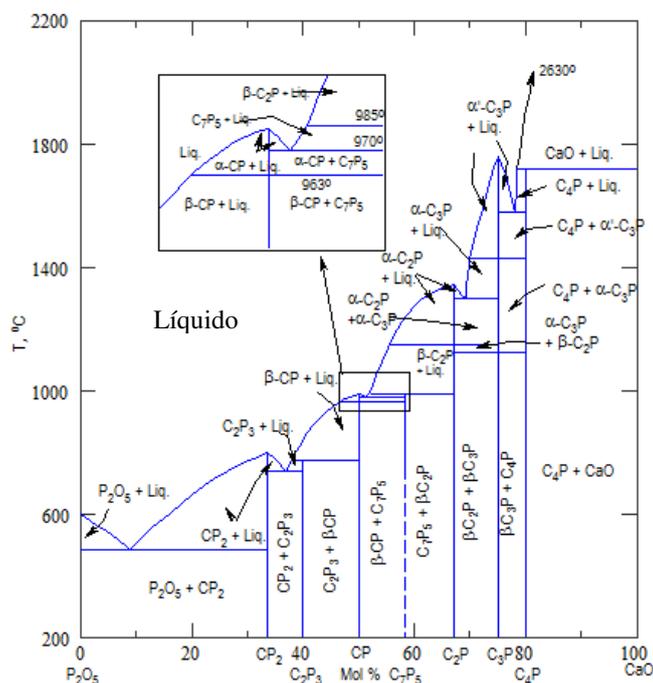


Figura 4 - Diagrama de fases do sistema CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Fonte: Kreidler; Hummel, 1967.

O  $\alpha$  e o  $\beta$ -TCP diferem consideravelmente na sua estrutura, densidade e solubilidade, estas características irão determinar suas propriedades biológicas e aplicações clínicas. O  $\beta$ -TCP ( $\beta$ -C<sub>3</sub>P, na Figura 4), por exemplo, é usado principalmente para a preparação de biocerâmicas biodegradáveis na forma de grânulos, blocos densos e macroporosos, enquanto o  $\alpha$ -TCP ( $\alpha$ -C<sub>3</sub>P na Figura 4), que apresenta menor taxa de degradação, é usado na preparação de cimentos de fosfato de cálcio, embora alguns grânulos e blocos de biocerâmica a base de  $\alpha$ -TCP possam ser encontrado no mercado. Ambos os materiais  $\beta$ - e  $\alpha$ -TCP são usados para a reparação óssea e aplicações de remodelação (Carrodegua; De Aza, 2011).

Do ponto de vista biológico, o  $\beta$ -TCP é osteocondutor e bioativo, tanto *in vitro* como *in vivo*. Além disso, estudos demonstram que pós de  $\beta$ -TCP podem servir como suporte para o crescimento de um novo osso (Ghosh et al., 2008; Nandi et al., 2008; Wiltfang et al., 2002).

O  $\beta$ -TCP pode ser obtido por diferentes processos. Dentre eles podemos destacar a síntese em estado sólido (Yashima et al., 2003), precipitação química (Descamps et al., 2007; Torres et al., 2015), combustão sol-gel e combustão de solução (Ghosh; Sarkar, 2016), entre outros.

Cada um desses métodos possuem vantagens e desvantagens. A síntese em estado sólido é um método simples que envolve matérias primas baratas, mas envolve altas temperaturas (Descamps et al., 2007). A precipitação química via úmida é também um processo simples, que envolve baixa temperatura e alto rendimento, sua desvantagem é a alteração da estequiometria devido a precipitação incompleta levando a produção de impurezas no material. O método de combustão de solução envolve uma mistura molecular homogênea e gera partículas em escala nanométrica, sem a necessidade de etapas posteriores de tratamentos térmicos, reduzindo o tempo de síntese, a grande desvantagem desse método é a agregação das partículas (Ghosh; Sarkar, 2016; Varma et al., 2016). Estes métodos de síntese levam a produtos com diferenças na morfologia, estrutura de cristal, estequiometria e densidade.

### **2.6.2 Wollastonita - W**

A wollastonita ( $\text{CaSiO}_3$ ) é uma cerâmica polimórfica e suas três formas podem ser encontrado naturalmente. Os polimorfos de baixa temperatura são: wollastonita triclínica e wollastonita monoclínica, também chamada de parawollastonita. O de alta temperatura é a ciclowollastonita ou pseudowollastonita, que cristaliza numa rede triclínica (Kotisis; Balog, 1989). A transformação isomórfica é reversível e ocorre à temperatura de  $\sim 1400$  K ( $\sim 1125$  °C). Na Figura 5 podemos observar o diagrama de fases do sistema CaO-SiO<sub>2</sub>.

As biocerâmicas de wollastonita vêm sendo muito pesquisadas como biomaterial para regeneração óssea, porque apresentam bioatividade e biocompatibilidade, além de ser bioabsorvíveis. Quando a wollastonita é imersa em fluido fisiológico simulado (SBF) ocorre uma troca iônica entre os íons  $\text{Ca}^{++}$  da rede cristalina da cerâmica e os íons  $\text{H}_3\text{O}^+$  do SBF. Esta reação transforma os cristais de wollastonita numa fase de sílica amorfa e aumenta a concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  uma vez que diminui a concentração de íons  $\text{H}_3\text{O}^+$  no meio, o que produz o incremento do pH e cria as condições apropriadas para a precipitação de apatita na superfície desta cerâmica (De Aza et al., 1994, 1997, 2000).

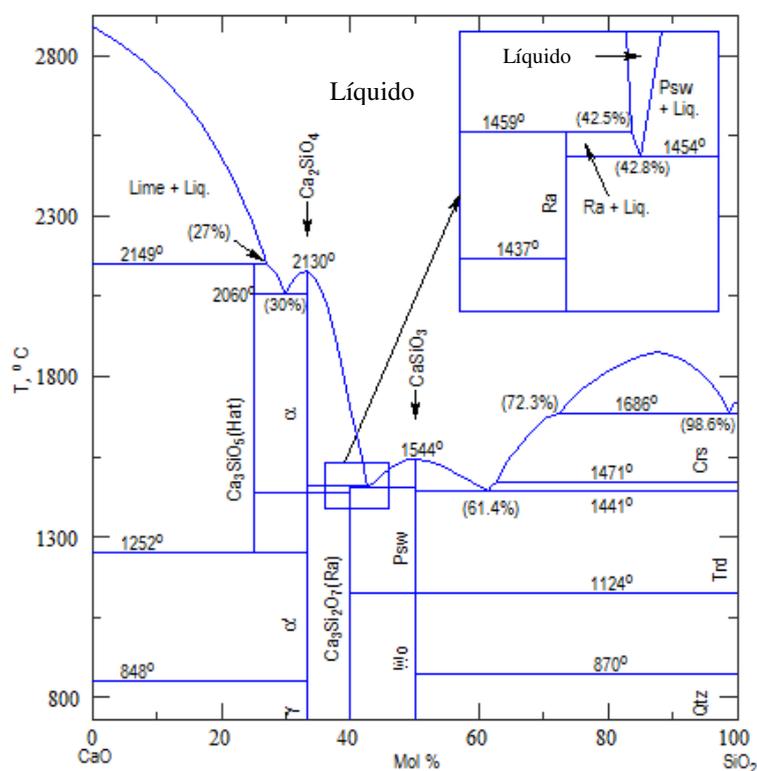


Figura 5 - Diagrama de fases CaO-SiO<sub>2</sub>. Fonte: Huang et al., 1995.

A wollastonita pode ser sintetizada através da reação no estado sólido (Abd Rashid et al., 2014), método de combustão sol-gel (Udduttula et al., 2013), combustão (Sreekanth Chakradhar et al., 2006), entre outros.

A obtenção por combustão de solução se torna uma rota sintética de baixa temperatura para preparar os pós de wollastonita com baixo tamanho de cristalito com melhores propriedades de sinterização. As temperaturas de transformação isomórfica de pós de wollastonita obtidos por combustão foram menores do que quando obtidas através do método da reação em estado sólido (Sreekanth Chakradhar et al., 2006).

### 2.6.3 Bredigita - BRE

A bredigita (Ca<sub>7</sub>MgSi<sub>4</sub>O<sub>16</sub>) tem sido estudada por apresentar bioatividade e biocompatibilidade (Wu et al., 2005; Huang; Chang, 2008). Em seus estudos Wu et al., (2005) observaram que a bredigita apresenta capacidade de formação de HA superficial quando imersa em fluido fisiológico artificial e que seus produtos de dissolução (Si e Ca) promoveram o crescimento de células. Os osteoblastos aderiram

à superfície da cerâmica de bredigita, e a proliferação foi evidente com o aumento do tempo de cultura. Sendo assim, os resultados indicam que esta cerâmica possui uma boa bioatividade *in vitro* e biocompatibilidade, e pode ser utilizados como materiais de reparação óssea. Além disso, apresentaram também resistência à flexão e modulo de Young semelhantes ao do osso cortical e melhor resistência à fratura em comparação com a HA sinterizada. Na Figura 6 podemos observar o diagrama de fases do sistema  $\text{Ca}_2\text{SiO}_4\text{-Mg}_2\text{SiO}_4$ .

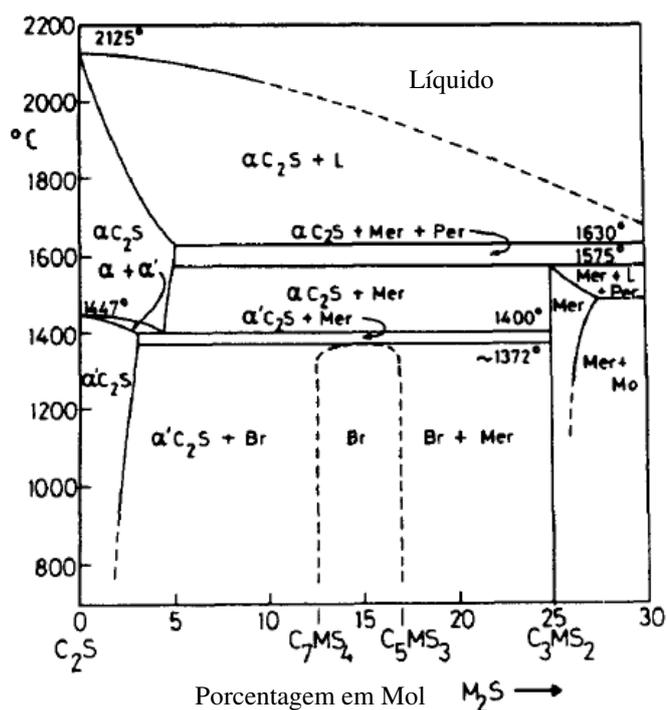


Figura 6 - Diagrama de fases do sistema  $\text{Ca}_2\text{SiO}_4\text{-Mg}_2\text{SiO}_4$ . Fonte: Moseley; Glasser, 1981.

O magnésio (Mg) é um elemento muito importante para corpo humano. Ele está intimamente associado com a mineralização dos tecidos e influencia indiretamente no metabolismo mineral (Althoff et al., 1982).

A bredigita encontrada naturalmente não é pura, mas sim associada com outros minerais. Portanto, bredigita pura foi produzida por várias técnicas de síntese, incluindo a ativação mecânica (Tavangarian; Emadi, 2011), o método de sol-gel (Wu et al., 2005) e o método de combustão (Huang; Chang, 2008).

A bredigita produzida por combustão de solução apresenta partículas em tamanho nanométrico na gama 234-463 nm e induz a formação de hidroxiapatita quando imersa em SBF, além disso também proporciona a proliferação de células estaminais mesenquimais de rato (Huang; Chang, 2008; Kouhi et al., 2016).

O mecanismo de formação de apatita na superfície da bredigita quando imersa em SBF parece estar relacionado à dissolução de íons Ca (II) da biocerâmica na fase inicial de imersão e a sua troca com íons H<sup>+</sup> levando à formação de silanol (Si-OH<sup>+</sup>) na camada superficial. Os íons de Ca são atraídas para a interface e são combinadas com os íons de fosfato negativos no fluido (Rahmati et al., 2018).

## **2.7 Síntese por combustão de solução**

As técnicas para preparação de materiais envolve não somente o fator econômico em si, mas também o interesse em trazer benefícios para o meio ambiente a fim de desenvolver novas técnicas que sejam sustentáveis. A eficiência também é considerada um fator importante neste quesito, a alta eficiência é necessária para um rendimento máximo, energia, tempo e desperdício mínimos. Em termos de eficiência, as metodologias de preparação de materiais inorgânicos apresentam suas vantagens e desvantagens (Deganello; Tyagi, 2018).

A síntese por combustão (CS) emergiu como uma técnica importante para a síntese e processamento de cerâmicas avançadas (estruturais e funcionais), catalisadores, compósitos, ligas, intermetálicos e nanomateriais. O processo de síntese por combustão é caracterizado por altas temperaturas, taxas de aquecimento rápidas e tempos de reação curtos (Kopp Alves et al., 2013; Patil et al., 1997, 2002).

Dependendo da natureza dos reagentes (sólidos, líquidos ou gasosos) e a exotermicidade da reação, a CS pode ser descrita como: síntese de alta temperatura de auto-propagação (SHS), síntese de combustão a baixa temperatura (LCS), síntese de combustão de solução (SCS), combustão por gel, combustão sol-gel, combustão por emulsão e combustão por volume (Patil et al., 2002).

A SCS possui três características que a distinguem das demais CS: seus componentes são inicialmente misturados em uma solução aquosa a nível molecular; o calor evolui devido a oxidação de componentes de combustíveis orgânicos e os produtos obtidos são principalmente óxidos metálicos com a geração de uma grande quantidade de subprodutos gasosos. Essa liberação elevada de gases leva a uma expansão significativa do produto sólido e uma rápida diminuição da temperatura após a reação, o que torna o produto sólido poroso e finamente disperso (Varma et al., 2016).

Na Figura 7 observa-se o processo da SCS que envolve as seguintes etapas: (i) preparação da solução aquosa do combustível com o oxidante; (ii) pré aquecimento da solução; (iii) processo de combustão; (iv) resfriamento (Nersisyan et al., 2017).

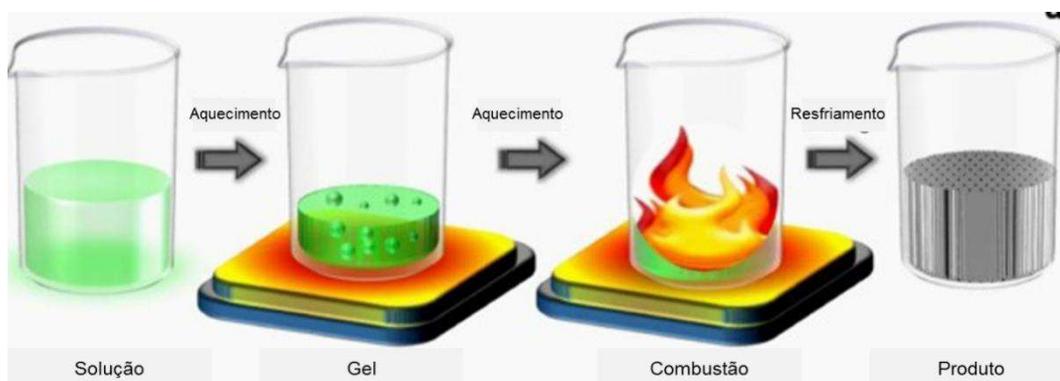


Figura 7 - Etapas da síntese por combustão de solução. Fonte: Adaptado de Nersisyan et al., (2017).

Vários são os parâmetros que influenciam a reação, como o tipo de combustível, a razão combustível/oxidante e a temperatura da fonte de calor. Os oxidantes típicos são nitratos metálicos hidratados, enquanto os combustíveis representam uma ampla gama de compostos, incluindo ureia, glicina, ácido cítrico, etc (Kopp Alves et al., 2013; Varma et al., 2016).

Sua característica principal é que o calor necessário para conduzir a reação é provido pela própria reação e não por uma fonte externa, no entanto, é necessário atingir uma temperatura de ignição para iniciar o processo (González-Cortés; Imbert, 2013).

As características do pós como a fase, a morfologia, o tamanho do cristalito, a área superficial e a natureza da aglomeração (forte ou fraca) são influenciadas pela entalpia e pela temperatura da chama, que por conseguinte, depende do tipo de combustível e da relação combustível/oxidante (Kopp Alves et al., 2013; Wen; Wu, 2014).

A síntese por combustão de solução vem recebendo considerável atenção, pois é uma técnica que permite a obtenção de pós homogêneos, finos, não aglomeradas, em escala nanométrica, sem decomposição intermediária e/ou etapas de calcinação (Mukasyan et al., 2007; Patil et al., 2002).

Vários estudos vem sendo desenvolvidos na obtenção de cerâmicas para utilização como biomateriais obtidas pela síntese por combustão de solução.

Ghosh et al. (2011) estudaram a influência do tipo e da quantidade de combustível (ureia e glicina), bem como a influência da temperatura inicial do forno na obtenção de HA. O estudo mostrou que o tipo de combustível, a relação combustível/oxidante e a temperatura inicial do forno influenciaram significativamente a temperatura de combustão e as características dos pós sintetizados. As investigações também mostraram que o aumento da temperatura inicial do forno teve efeitos adversos sobre as propriedades físicas dos pós-formados.

Aghayan e Rodríguez (2012) investigaram a influência do tipo e da quantidade de combustível sobre a possibilidade de formação de composto bifásico HA/TCP método de síntese por combustão de solução, neste estudo os combustíveis utilizados foram ureia e glicina. Uma série de reações de combustão foi realizada para estudar a influência da relação combustível/oxidante na relação das fases HA/TCP. Foi verificado que o tipo de combustível e sua quantidade influenciaram significativamente a composição da fase e a microestrutura dos pós sintetizados. A investigação também mostrou que a quantidade de  $\text{HNO}_3$  teve grande influência no produto final.

Udduttula et al. (2013) prepararam wollastonita nanocristalina pelo método de combustão sol-gel utilizando glicina como combustível. Os resultados demonstraram que as amostras apresentaram boa bioatividade *in vitro*.

## **2.8 Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL)**

O PCL é um poliéster alifático linear semicristalino, solúvel em uma gama de solventes orgânicos e altamente processável, possui baixo ponto de fusão (55-60 °C) e temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) de -60 °C e uma estabilidade térmica elevada, com temperaturas de decomposição de ~300 °C. A sua massa molecular pode variar de 3000 a 80000 g/mol. Sua estrutura molecular possui uma unidade de repetição com cinco grupos não-polares de metileno ( $\text{CH}_2$ ) e um único grupo éster relativamente polar (Figura 8) (Nair; Laurencin, 2007; Patlolla et al., 2010; Woodruff; Hutmacher, 2010).

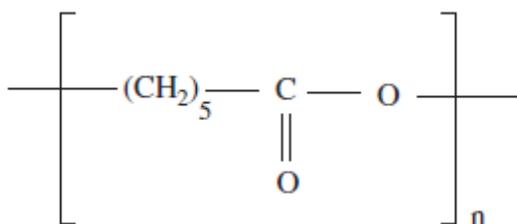


Figura 8 – Estrutura molecular da Policaprolactona. Fonte: (Patlolla et al., 2010).

É um polímero semicristalino, biocompatível, biodegradável e seus produtos de dissolução não causam toxicidade (Ciapetti et al., 2003; Kweon et al., 2003; Peña et al., 2006; Woodruff; Hutmacher, 2010).

O PCL tem sido utilizado em sistemas de liberação controlada de fármaco, suturas cirúrgicas, *scaffolds* para engenharia de tecido ósseo e outros implantes biodegradáveis de longa duração (Jiang et al., 2015; Mei et al., 2005; Rai et al., 2016).

Estudos sobre a biocompatibilidade, biodegradação e propriedades mecânicas, além de processamento, resultou na produção de vários dispositivos biomédicos de PCL aprovados pela FDA (Woodruff; Hutmacher, 2010). Os estudos relacionados ao PCL apontam que este polímero apresenta potencial para aplicação como implantes degradáveis, podendo ser manipulados físico, químico e biologicamente em combinação com outros polímeros, matérias cerâmicos e, compostos ativos (Jiang et al., 2015; Kim et al., 2004; Rai et al., 2016; Yeo et al., 2012).

De acordo com o estudo de Kweon et al. (2003), *scaffolds* obtidos a partir do polímero PCL mostraram-se biocompatíveis com osteoblastos humanos. Savarino et al., (2007) avaliaram *in vivo* os efeitos osteogênicos e angiogênicos de *scaffolds* de PCL com e sem a presença de células de medula óssea de coelhos e verificaram que os *scaffolds* na presença das células favoreceram fortemente a osteoindutividade, já o PCL sem células não favoreceu formação óssea.

No que diz respeito a sua biodegradação, o PCL pode ser degradado no meio ambiente por meio de bactérias e fungos, mas podem não ser biodegradado em animais e humanos devido à falta de enzimas adequadas. Isso não significa que não sejam reabsorvíveis. Neste caso, a degradação ocorre por meio de hidrólise e clivagem de suas ligações ésteres e, portanto, o processo leva muito mais tempo, de 2 a 4 anos, dependendo da massa molecular (Sabir et al., 2009; Vert, 2009; Woodruff; Hutmacher, 2010).

Chen et al., (2000) investigaram a degradação de micropartículas de PCL *in vitro* com e sem lipase. Além disso, também avaliaram a degradação do PCL na forma de filmes, em PBS a  $37\pm 1$  °C em pH 7.4. Nestas condições, foi verificado que ambas as amostras se degradaram e que a forma física delas não teve efeito significativo sobre a taxa de degradação, sugerindo uma degradação homogênea do polímero. Quando exposta a lipase, as micropartículas de PCL apresentaram uma degradação acelerada, com início em 3 semanas de exposição a enzima. Foi verificado que a cristalinidade do polímero teve um aumento após a degradação, evidenciando que a degradação de micropartículas de PCL ocorreu primeiro na área amorfa das micropartículas.

Chang et al., (2017) estudaram a biodegradação de filmes de PCL após implantação no estômago e no intestino de ratos. Os resultados indicaram que a degradação enzimática dos filmes de PCL no intestino ocorre via erosão superficial, enquanto que no estômago o mecanismo é consistente na erosão em massa. Verificou-se ainda que a perda de massa dos filmes no intestino foi superior a do estômago devido a presença da enzima lipase, que favoreceu a dissolução de produtos degradados no meio circundante e aumentou a taxa de degradação.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida na Universidade Federal de Campina Grande - UFCG no laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomaterias do Nordeste – CERTBIO em Campina Grande-PB e no Consejo Superior de Investigaciones Científicas - CSIC no Instituto de Cerámica Y Vidrio – ICV em Madri–Espanha.

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Reagentes para a síntese por combustão em solução

- Nitrato de Cálcio Tetrahidratado ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 99.0\%$ ), Sigma-Aldrich;
- Nitrato de Magnésio Hexahidratado ( $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 98.0\%$ ); Sigma-Aldrich;
- Sílica Coloidal ( $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ , 50w% suspensão em água), Sigma-Aldrich ;
- Fosfato de amônio dibásico ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , Vetec Química Fina;
- Ureia ( $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ ;  $\geq 98.0\%$ ), Sigma-Aldrich;
- Ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ , 70%), Sigma-Aldrich.

##### 3.1.2 Reagentes para a fabricação dos compósitos

- Policaprolactona (PM 80.000 g/mol, CAPATM 6800), Perstorp;
- Diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\geq 9,8\%$  estabilizado com Amileno), Panreac ApliChem;
- Cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ,  $\geq 99.5\%$ ), Panreac ApliChem;
- Hidroclorato de Vancomicina ( $\text{C}_{66}\text{H}_{75}\text{Cl}_2\text{N}_9\text{O}_{24} \cdot x\text{HCl}$ , 100 mg/mL em DMSO), Sigma-Aldrich.

#### 3.2 Etapas de realização da pesquisa

Este trabalho foi desenvolvido em 4 etapas. A etapa I consistiu na obtenção dos pós cerâmicos a partir do método de combustão. A etapa II consistiu na obtenção dos *scaffolds* PCL/NaCl e PCL/NaCl/W, já a etapa III consistiu na obtenção dos *scaffolds* de PCL/NaCl/TCP/W e PCL/NaCl/TCP/BRE e a etapa IV consistiu na

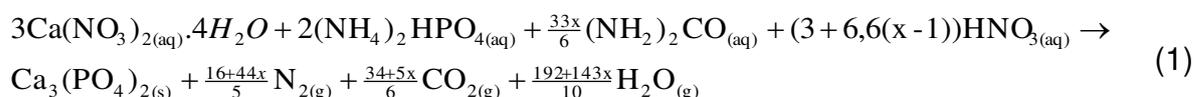
obtenção dos *scaffolds* PCL/NaCl/TCP/W e PCL/NaCl/TCP/BRE com o antibiótico vancomicina.

### 3.2.1 Etapa I: Obtenção dos pós-cerâmicos por combustão

De forma simplificada, a síntese por combustão de solução consiste na mistura de combustíveis e oxidantes. Neste estudo, diferentes quantidades de ureia (combustível) foram utilizadas para estudar a influência da relação combustível-oxidante na formação das fases desejadas.

#### 3.2.1.1 Síntese do Fosfato tricálcico (TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )

A equação utilizada para a preparação do TCP por combustão é descrita de acordo com a Equação 1:



onde, x representa a quantidade de combustível utilizada para obtenção da fase desejada. Quando x=1 a equação é dita estequiométrica, ou seja, a quantidade de combustível (reduzidor) utilizada é necessária para neutralizar a quantidade de oxidante fornecida pelas matérias primas (nitratos). Quando x=2 ou 3, aumenta-se a quantidade de energia do sistema mediante a adição de um excesso de combustível.

Na Tabela 2 encontram-se os valores, em mol, utilizados para a obtenção de 5g do TCP.

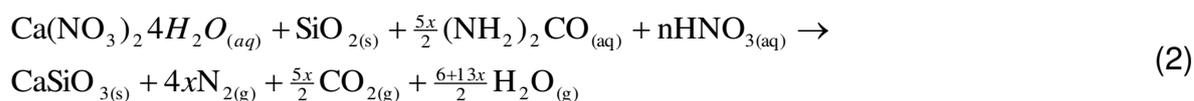
Cada reagente foi adicionado e dissolvido em 50 mL de água deionizada em cápsula de porcelana com capacidade de 115 mL. A solução foi parcialmente seca sob agitação magnética durante 40 min a 80°C, em seguida foi levada a um forno pré-aquecido a 600°C durante cerca de 10 min, período no qual ocorreu a síntese. Ao final, o produto foi retirado do forno e resfriado a temperatura ambiente.

Tabela 2 - Composição da solução inicial e a proporção de combustível/oxidante usando ureia como combustível para obtenção do TCP.

Amostra	Valor de x na equação	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O (mol)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (mol)	(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO (mol)	HNO <sub>3</sub> (mol)
TCP1	1	0,05	0,03	0,08	0,05
TCP2	2	0,05	0,03	0,2	0,15
TCP3	3	0,05	0,03	0,27	0,26

### 3.2.1.2 Síntese da Wollastonita (W, CaSiO<sub>3</sub>)

A equação utilizada para a preparação do CaSiO<sub>3</sub> por combustão é descrita de acordo com a Equação 2:



onde, x representa a quantidade de combustível utilizada para obtenção da fase desejada. O valores de x utilizados foram 1, 2 e 3 seguindo o mesmo princípio já descrito anteriormente para obtenção do TCP.

Na Tabela 3 encontram-se os valores, em mol, utilizados para a obtenção de 5g da Wollastonita.

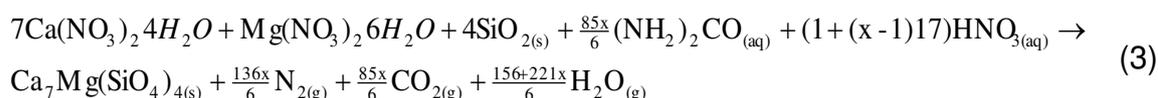
Inicialmente o SiO<sub>2</sub> foi dissolvido em 50 mL água deionizada, em cápsula de porcelana com capacidade de 115 mL, com adição de HNO<sub>3</sub> para conseguir uma melhor dissolução. Em seguida, os demais reagentes foram adicionados. A solução foi parcialmente seca sob agitação magnética durante 40 min a 80°C, em seguida foi levada a um forno pré-aquecido a 600°C durante cerca de 10 min, período no qual ocorreu a síntese. Ao final, o produto foi retirado do forno e resfriado a temperatura ambiente.

Tabela 3 - Composição da solução inicial e a proporção de combustível/oxidante usando ureia como combustível para obtenção da Wollastonita.

Amostra	Valor de x na equação	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O (mol)	SiO <sub>2</sub> (mol)	(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO (mol)	HNO <sub>3</sub> (mol)
W1	1	0,04	0,04	0,1	0,04
W2	2	0,04	0,04	0,2	0,17
W3	3	0,04	0,04	0,3	0,30

### 3.2.1.3 Síntese da Bredigita (BRE, Ca<sub>7</sub>MgSi<sub>4</sub>O<sub>16</sub>)

A equação utilizada para a preparação do Ca<sub>7</sub>MgSi<sub>4</sub>O<sub>16</sub> por combustão é descrita de acordo com a Equação 3:



onde, x representa a quantidade de combustível utilizada para obtenção da fase desejada. Assim como descrito anteriormente, os valores de x utilizados foram determinados seguindo-se o mesmo princípio já descrito para obtenção do TCP.

Nesta síntese seguiu-se o mesmo procedimento metodológico descrito para obtenção da wollastonita.

Na Tabela 4 encontram-se os valores, em mol, utilizados para a obtenção de 5g de Bredigita.

Tabela 4 - Composição da solução inicial e a proporção de combustível/oxidante usando ureia como combustível para obtenção da Bredigita.

Amostra	Valor de x na equação	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O (mol)	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (mol)	SiO <sub>2</sub> (mol)	(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO (mol)	HNO <sub>3</sub> (mol)
BRE1	1	0,05	0,007	0,03	0,1	0,007
BRE2	2	0,05	0,007	0,03	0,2	0,145
BRE3	3	0,05	0,007	0,03	0,3	0,276

### 3.2.2 Etapa II: Obtenção dos scaffolds PCL/NaCl e PCL/NaCl/W

Os *scaffolds* foram preparados pelo método de evaporação do solvente seguido de lixiviação de partícula para obtenção de uma estrutura porosa. Os procedimentos foram realizados com base nas pesquisas de Kothapalli et al., (2005).

Para utilização do NaCl, o mesmo passou por um processo de separação granulométrica a fim de obter partículas com tamanho entre 100 e 500 micrômetros para favorecer a produção de poros no *scaffold* que proporcione a regeneração óssea (Mehr et al., 2015; Zadpoor, 2015).

Primeiramente, foram preparados *scaffolds* de PCL/NaCl e de PCL/NaCl/W. A produção dos *scaffolds* com a cerâmica wollastonita foi realizada com o intuito de evitar o desperdício das cerâmicas obtidas na etapa I.

Para preparação dos *scaffolds* PCL/NaCl, o polímero foi inicialmente dissolvido em diclorometano, sob agitação magnética a temperatura ambiente ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ), em seguida o NaCl foi acrescentado. A proporção PCL/NaCl foi de 40/60 % e 20/80 % (v/v), a fim de obter porosidade comparável com a do osso humano, tendo em vista que o osso esponjoso apresenta um percentual de porosidade de 50-90% (Bose et al., 2013). As duas concentrações de agente porogênico (60 e 80 %) foram escolhidas para avaliar qual delas apresentaria melhor percolação das partículas de NaCl e, conseqüentemente, melhor estrutura porosa.

As dispersões foram deixadas sob agitação magnética em capela de exaustão para evaporação do solvente, por aproximadamente 4h, a fim de obter uma pasta que posteriormente foi moldada em molde de teflon para obtenção dos *scaffolds*.

Para obtenção das dispersões de PCL/NaCl/W, o NaCl foi adicionado ao diclorometano sob agitação magnética a temperatura ambiente ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ) por 30 minutos. Em seguida, a wollastonita foi adicionada a mistura, que ficou sob agitação magnética por 1h a temperatura ambiente ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ). Posteriormente as soluções foram colocadas em banhos de ultrassom por 30min, para uma melhor homogeneização das partículas. Em seguida, o PCL foi adicionado às dispersões até a completa dissolução do polímero e seguiu-se o mesmo procedimento já descrito anteriormente. Os *scaffolds*, ainda no molde, foram deixados na capela de exaustão por 24h para completa evaporação do solvente.

Nesta pesquisa, buscou-se a obtenção de *scaffolds* de PCL/NaCl e PCL/NaCl/Wollastonita com diferentes proporções (em volume), como podemos observar na Tabela 5 abaixo:

Tabela 5 - Proporções das composições dos *scaffolds* obtidos na etapa 01.

Composição (%vol.)	Conteúdo de NaCl	Conteúdo de Wollastonita	Conteúdo de Polímero
	(%peso)	(%peso)	(%peso)
80(NaCl)-20(PCL)	88,4	-	11,6
50(carga inorgânica <sup>1</sup> )-50(PCL)	50,4	16,3	33,3
60(carga inorgânica <sup>1</sup> )-40(PCL)	56,7	18,3	25
70(carga inorgânica <sup>1</sup> )-30(PCL)	62,3%	20,1%	17,6%
80(carga inorgânica <sup>1</sup> )-20(PCL)	67,2	21,8	11,0

Legenda: <sup>1</sup>carga inorgânica: wollastonita+NaCl.

### 3.2.3 Etapa III: Obtenção dos *scaffolds* PCL/NaCl/TCP/W e PCL/NaCl/TCP/BRE

Nesta etapa foram obtidos *scaffolds* compósitos PCL/NaCl/TCP/W e PCL/NaCl/TCP/BRE, a proporção de TCP/BRE e TCP/W foi determinada em 60-40%, em volume, respectivamente.

A composição 60-40% foi escolhida com base em estudos encontrados na literatura sobre o desenvolvimento de cerâmicas Bioeutéticas (psW -  $\alpha$ -TCP), os estudos mostraram que essas cerâmicas tem a propriedade de reestruturar sua morfologia durante a exposição ao fluido corporal simulado (SBF) ou saliva da parótida humana, pela dissolução da fase psW e subsequente transformação pseudomórfica de  $\alpha$ -TCP em HA (De Aza et al., 2007, 1997, 1997, 1998).

A bredigita (BRE) foi utilizada como fonte de Ca, Mg e Si, a wollastonita (W) foi utilizada como fonte de Ca e Si, já o TCP foi utilizado como fonte de Ca e P.

A metodologia para obtenção desses *scaffolds* seguiu a mesma metodologia de obtenção dos *scaffolds* PCL/NaCl/W descrita na etapa II.

As proporções em volume dos componentes dos *scaffolds* pode ser observada na Tabela 6 abaixo:

Tabela 6 - Composição, em volume, dos *scaffolds* PCL/NaCl/TCP/W e PCL/NaCl/TCP/BRE.

Scaffold (70 (carga inorgânica)-30(PCL))	Conteúdo de NaCl	Conteúdo de TCP	Conteúdo de BRE	Conteúdo de W	Conteúdo de PCL
	(%peso)	(%peso)	(%peso)	(%peso)	(%peso)
PCL/NaCl/TCP/W	61,6	9,0	-	12,0	17,4
PCL/NaCl/TCP/BRE	60,3	8,8	13,9	-	17,0

### 3.2.4 Etapa IV: Obtenção dos *scaffolds* PCL/NaCl/TCP/W/Vancomicina e PCL/NaCl/TCP/BRE/Vancomicina

Nesta etapa foram obtidos *scaffolds* compósitos PCL/NaCl/TCP/W/Vancomicina e PCL/NaCl/TCP/BRE/Vancomicina. A metodologia para obtenção desses *scaffolds* seguiu a mesma metodologia de obtenção dos *scaffolds* PCL/NaCl/W descrita na etapa II. A adição da vancomicina se deu após a completa dissolução do polímero.

Para sistemas de liberação controlada de fármacos, estudos encontrados na literatura recomendam o uso de 5–10% em peso de vancomicina (Cabrejos-Azama et al., 2016; Lian et al., 2013). Assim, em nosso estudo foi admitido o percentual 5% em peso da vancomicina, relacionada a quantidade de polímero.

As proporções em peso dos componentes dos *scaffolds* pode ser observada na Tabela 7 abaixo:

Tabela 7 - Composição, em volume, dos *scaffolds* PCL/NaCl/TCP/W/Vanco e PCL/NaCl/TCP/BRE/Vanco.

Scaffold (70 (carga inorgânica)-30(PCL))	Conteúdo					
	NaCl (%peso)	TCP (%peso)	BRE (%peso)	W (%peso)	PCL (%peso)	Vancomicina (%peso)
PCL/NaCl/TC P/W/Vanco	61,6	8,9	-	11,9	16,6	0,9
PCL/NaCl/TC P/BRE/Vanco	60,3	8,8	13,9	-	16,2	0,8

### 3.3 Caracterização do material

Foram estabelecidas quatro etapas de caracterização. A primeira etapa consistiu na caracterização dos pós cerâmicos, a segunda etapa abordou a caracterização dos *scaffolds* PCL/NaCl e PCL/NaCl/W, na terceira etapa foi realizada

a caracterização dos *scaffolds* PCL/NaCl/TCP/W e PCL/NaCl/TCP/BRE. A quarta etapa de caracterização foi referente aos *scaffolds* produzidos com a vancomicina. A Figura 9 apresenta o fluxograma experimental deste trabalho.

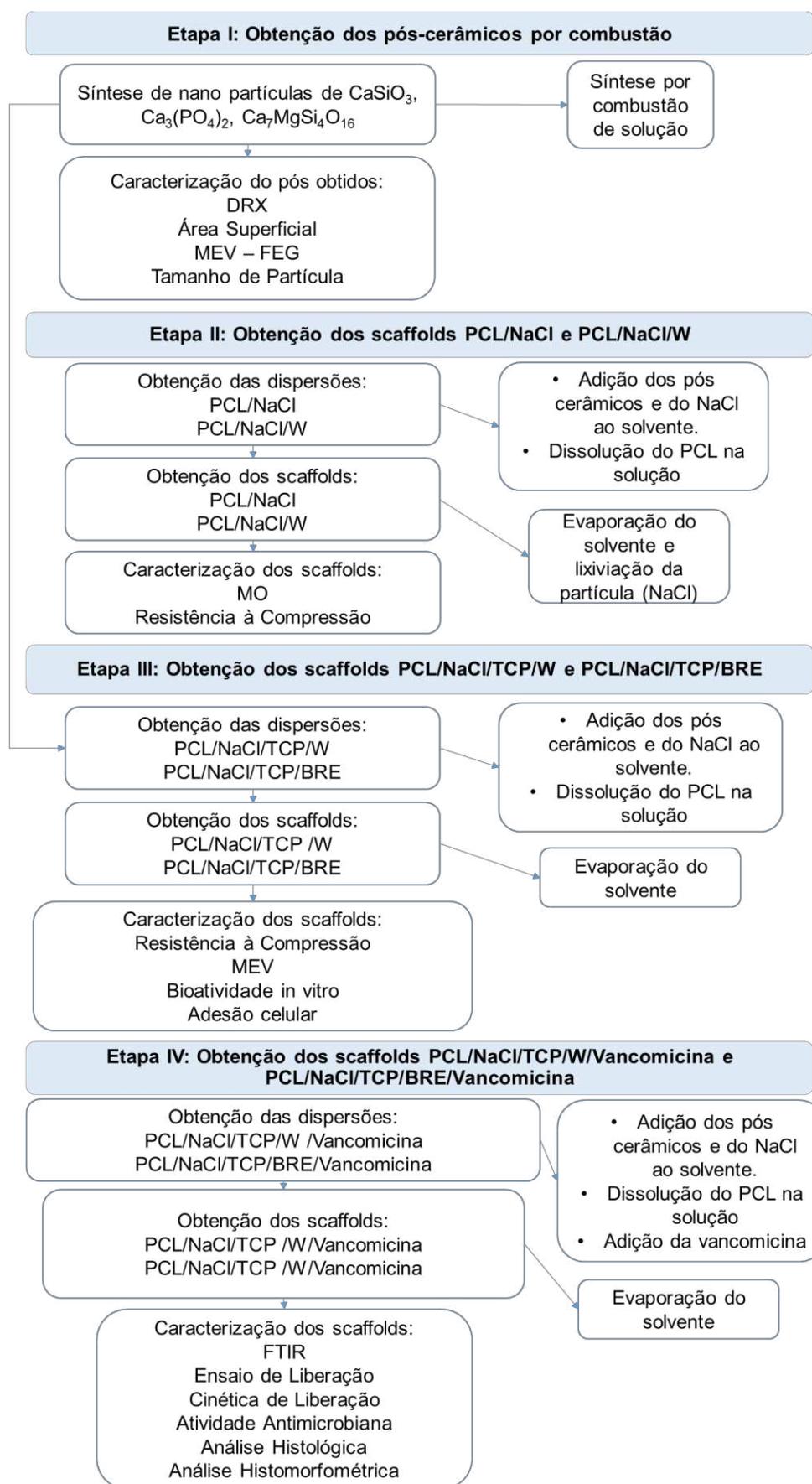


Figura 9 - Fluxograma experimental da pesquisa.

### 3.3.1 Etapa I: Caracterização dos pós cerâmicos

#### 3.3.1.1 Cálculo da temperatura adiabática

A síntese de combustão envolve a reação de constituintes elementares para formar a fase do produto pretendido. O processo é exotérmico, no qual temperaturas elevadas são geradas especificamente devido à entalpia de formação dos produtos. Muitos fatores podem influenciar na síntese por combustão e um deles é a temperatura de combustão ( $T_c$ ), que é a temperatura máxima atingida durante a reação. Esta temperatura pode ser prevista teoricamente através da análise termodinâmica da entalpia de formação ( $\Delta H_f$ ) e da capacidade calorífica ( $C_p$ ). Neste caso, a temperatura máxima prevista teoricamente é denominada de temperatura adiabática ( $T_{ad}$ ) (Morsi, 2012). Sendo assim, torna-se importante o cálculo desta temperatura para termos uma noção da temperatura de combustão de cada material a ser obtido.

Portanto, a entalpia da combustão ( $\Delta H$ ) foi calculada com base na Equação 5 abaixo:

$$\Delta H = \left( \sum n\Delta H_p \right) - \left( \sum n\Delta H_r \right) \quad (5)$$

onde  $\Delta H_r$  e  $\Delta H_p$  são as entalpias de formação dos reagentes e produtos, respectivamente, e  $n$  é o número estequiométrico. Em condições ideais, a  $T_{ad}$  da combustão pode ser deduzida a partir da Equação 6:

$$Q = -\Delta H = \int_{T_0}^{T_{ad}} \left( \sum nC_p \right) dT \quad (6)$$

onde que  $Q$  é o calor absorvido pelos produtos sob condição adiabática,  $C_p$  é a capacidade de calor dos produtos que foi considerado constante em função da temperatura e  $T_0$  é a temperatura de ignição da reação, ou seja, a temperatura de ignição do combustível.

Os dados termodinâmicos dos reagentes e produtos utilizados para calcular a  $\Delta H$  e  $T_{ad}$  das reações de combustão das cerâmicas a serem obtidas estão listados na Tabela 8 (Dean, 1999).

Tabela 8 - Dados termodinâmicos padrão dos diferentes compostos.

Composto	$\Delta H$ (kJ/mol)	$C_p$ (J/mol.K)
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-2613,28	-
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	-2132,33	149,4
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-1566,91	-
SiO <sub>2</sub>	-903,49	43,975
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	-333,51	92,79
Ca <sub>7</sub> MgSi <sub>4</sub> O <sub>16</sub>	-2310,188	163,21
CaSiO <sub>3</sub>	-1628,4	86,448
CO <sub>2</sub>	-393,51	37,1
H <sub>2</sub> O	-241,82	35,59
N <sub>2</sub>	0	29,124

Fonte: Dean, 1999.

### 3.3.1.2 Perfil de temperatura

A temperatura máxima da reação de combustão das amostras foi medida a partir do conceito de radiação térmica. A uma dada temperatura, as superfícies emitem energia em uma ampla faixa de comprimentos de onda, e a quantidade de energia emitida em cada comprimento de onda depende, ao mesmo tempo, da temperatura e das características da superfície emissora.

Os perfis de temperatura das amostras foram detectados por um pirômetro digital de duas cores (IGAR 12-LO, pirômetros de IMPAC, Canadá) de alta precisão com fibra óptica para medição de temperatura sem contato, com uma faixa de temperatura entre 300-2200°C e tempo de resposta = 2 ms usando o software (InfraWin 5).

### 3.3.1.3 Difração de Raios X (DRX)

A técnica de difração de Raios X foi empregada para identificação das fases formadas.

As análises de DRX foram realizadas utilizando um difratômetro Bruker (D8, Bruker, Alemanha). As condições de trabalho da fonte foram 40kv e 40mA, com radiação CuK $\alpha$  ( $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ ). Para a aquisição dos difratogramas os dados foram coletados na modalidade de passos em um intervalo de ângulo Bragg ( $\theta$ ), varrendo ângulos ( $2\theta$ ) entre 10-60°, com passo de 0,02° e tempo de acumulação de 2 segundos.

### 3.3.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG)

A Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo possibilita a análise da morfologia das partículas. Neste microscópio a emissão do feixe de elétrons se produz colocando o filamento em um gradiente de potencial elétrico, de forma que se possa conseguir imagens mais nítidas, menos distorcidas eletricamente e com melhor resolução. O MEV-FEG utilizado foi um (FE-SEM, S-4700, Hitachi) com resolução de 1.5 nm a 15 kV, que permite a variação na voltagem de aceleração de 0.5 a 30kV.

### 3.3.1.5 Superfície Específica ( $S_{BET}$ )

As medidas da superfície específica dos materiais em pó foram realizadas com um equipamento Monosorb Surface Area MS-13 (Quantachrome Instruments, Flórida, EUA). Seu funcionamento se baseia na determinação da quantidade de nitrogênio absorvido/dessorvido pela superfície do sólido, mediante a variação da condutividade térmica do gás durante o processo. Uma vez conhecida a quantidade de nitrogênio absorvido e dessorvido se calcula a superfície específica aplicando o modelo Brunauer, Emmett e Teller (BET). O diâmetro de partícula equivalente ( $d_{BET}$ ) foi calculado com base na área de superfície específica  $S_{esp}$  de acordo com a Equação 7:

$$d_{BET} = \frac{6}{S_{BET} \rho} \quad (7)$$

onde  $d_{BET}$  é o diâmetro de partícula equivalente,  $S_{esp}$  é a superfície específica e  $\rho$  é a densidade teórica do material.

## 3.3.2 Etapa II: Caracterização dos *scaffolds* de PCL/NaCl e PCL/NaCl/W

### 3.3.2.1 Extração do NaCl

A percolação das partículas de NaCl é importante para a formação de poros interconectados. Portanto, a fração volumétrica do agente porogênico deve ser

suficiente para proporcionar maior contato entre as partículas. Neste sentido, surgiu a necessidade do estudo da lixiviação das partículas de cloreto de sódio.

O estudo da extração do NaCl foi realizado imergindo os *scaffolds* em água deionizada sob agitação magnética constante a temperatura ambiente (25 °C) por diferentes períodos de tempo (1, 5, 24, 48, 72 horas). A cada período de tempo retirou-se o excesso de água com auxílio de papel absorvente e pesou-se. Após 72 horas de imersão os *scaffolds* foram colocados em estufa a 36 °C e pesados novamente a fim de obter o peso seco das amostras.

### 3.3.2.2 Microscopia Ótica (MO)

A técnica por microscopia ótica, foi utilizada para avaliar a morfologia dos *scaffolds*, em um Microscópio Óptico Hirox de reflexão e transmissão com acessórios 2D e variação de 50X-400X, acoplado a uma estação de análise de imagens.

### 3.3.2.3 Resistência à Compressão

Os *scaffolds* foram analisados através dos testes de compressão, obtendo o limite máximo de resistência e o percentual de deformação máxima. Os ensaios foram realizados no equipamento de ensaio universal INSTRON 4443. As matrizes cilíndricas (n=5) com dimensões de 6 mm de diâmetro e 7 mm de altura foram submetidas ao ensaio, utilizando uma célula de carga de 500 N, com velocidade de ensaio de 2 mm/min. As amostras foram ensaiadas após a extração do agente porogênico.

De acordo com a norma ASTM D1621-16, a resistência à compressão é determinada como a força na qual a deformação atinge 10%. O módulo de compressão (E) foi calculado como a inclinação da porção linear inicial da curva tensão-deformação. Foram realizadas cinco medidas replicadas para cada tipo de amostra.

A norma ASTM D1621-16, fornece um método para descartar a primeira zona da curva, que é considerada como uma zona de "acomodação", por um método tangente, que permite calcular o verdadeiro "ponto zero" da tensão e o módulo

elástico. Todas as curvas foram ajustadas com este método antes do cálculo do módulo.

### **3.3.3 Etapa III: Caracterização dos *scaffolds* de PCL/TCP/W e PCL/TCP/BRE**

#### **3.3.3.1 Resistência à Compressão**

Nesta etapa os *scaffolds* PCL/TCP/W e PCL/TCP/BRE foram analisados através do testes de compressão utilizando a mesma metodologia já descrita na etapa anterior.

#### **3.3.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A caracterização por MEV foi realizada em um Microscópio Eletrônico de Varredura HITACHI TM-1000 com aumento de até 10000 X, empregando voltagens de aceleração de 15 KV. O MEV foi utilizado para identificar a morfologia da superfície e da estrutura formada o tamanho, a forma e a distribuição dos poros. As análises foram realizadas da superfície de fratura e, quando necessário, receberam recobrimento metálico com ouro utilizando o equipamento: Sanyu Electron, modelo Quick Coater SC-701. Os tamanhos dos poros foram obtidos utilizando o *software ImageJ* e a média foi realizada a partir de 24 medições.

#### **3.3.3.3 Adesão Celular**

Para o ensaio de adesão celular as amostras foram esterilizadas com luz Ultra Violeta (UV) por aproximadamente 1h. Em seguida, as células da linhagem fibroblásticas L929 foram plaqueadas diretamente sobre os *scaffolds*, a densidade celular inicial foi de  $1 \times 10^5$  células/poço utilizando o meio de cultura RPMI 1640 (Gibco™). Após 7 dias de cultivo, a adesão celular foi avaliada pela observação da superfície das amostras por MEV. Para melhor visualização das células na superfície do material as amostras receberam recobrimento metálico com ouro utilizando os equipamentos: BIORAD SC-500 *Sputter coater* e Quick Coater SC-701 Sanyu Electron.

As amostras eram cilíndricas com 6 mm de diâmetro e 5 mm de altura e o ensaio foi realizado em triplicata.

### 3.3.3.4 Ensaio de Bioatividade *in vitro*

A capacidade de ligação entre o tecido ósseo e um material específico pode ser avaliada examinando-se a habilidade de formação de apatita na superfície deste material, a partir da imersão controlada em Fluido Fisiológico Artificial (SBF), de concentrações iônicas semelhantes às do plasma sanguíneo humano (Kokubo; Takadama, 2006). Este ensaio foi realizado com base na norma ISO 23317: 2007: “Implants for surgery – *In vitro* evaluation for apatite-forming ability of implant materials”.

A preparação do SBF, se deu da seguinte maneira: em 700 mL de água deionizada sob agitação magnética a  $36,5 \pm 0,1$  °C, utilizando um recipiente de polietileno, foram dissolvidos os reagentes listados na Tabela 9, na ordem em que se encontram. Os reagentes são adicionados cautelosamente, após a completa dissolução do anterior. O controle de pH é realizado a partir da adição do TRIS, pelo qual se ajusta ao valor final de 7,4. Em seguida, a solução é ajustada ao volume final de 1000 mL pela adição das águas de lavagem e água deionizada, e conservada a 5-10 °C.

Tabela 9 - Reagentes utilizados para preparação do SBF.

ORDEM	REAGENTE	QUANTIDADE	PUREZA	FORNECEDOR
1	Cloreto de Sódio (NaCl)	8,035 g	99,5 %	P.A. Nuclear
2	Bicarbonato de Sódio (NaHCO <sub>3</sub> )	0,355 g	99,5 %	P.A. Nuclear
3	Cloreto de Potássio (KCl)	0,255 g	99,5 %	P.A. Nuclear
4	Fosfato de Potássio Dibásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0,176 g	99,0 %	P.A. Nuclear
5	Cloreto de Magnésio Hexahidratado (MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)	0,311 g	98,0 %	P.A. Vetec
6	Ácido Clorídrico (HCl; 1M)	39 mL	-	P.A. Isofar
7	Cloreto de Cálcio Dihidratado (CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)	0,387 g	95,0 %	P.A. Nuclear
8	Sulfato de Sódio (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0,072 g	99,0 %	P.A. Nuclear
9	TRIS (Hidroximetil) Aminometano	6,118 g	99,0 %	P.A. Nuclear
10	Ácido Clorídrico (HCl; 1M)	0 a 5 mL	-	P.A. Isofar

As amostras foram imersas em SBF utilizando recipientes de polietileno tampados. O volume (V<sub>s</sub>) de SBF utilizado foi calculado em função da área superficial

aparente ( $S_a$ ) da amostra, de acordo com a Equação 8, e estas posicionadas com a superfície plana perpendicular ao fundo do recipiente. Os *scaffolds* foram armazenados a 37 °C, e avaliadas a 7, 14, 21 e 28 dias. Ao final, as matrizes foram secas em dessecador. A avaliação dos resultados foi realizada a partir da análise da superfície do material por MEV. Para melhor visualização desta superfície as amostras receberam recobrimento metálico com ouro utilizando os equipamentos: BIORAD SC-500 *Sputter coater* e Quick Coater SC-701 Sanyu Electron.

$$V_s = \frac{S_a}{10} \quad (8)$$

### 3.3.4 Etapa IV: Caracterização dos *scaffolds* de PCL/TCP/W/Vancomicina e PCL/TCP/BRE/Vancomicina

#### 3.3.4.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras foram submetidas a técnica de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em temperatura ambiente, o equipamento utilizado foi o Spectrum 400 da Perkin Elmer. A técnica FTIR foi realizada principalmente para identificar interações químicas entre os compósito e a vancomicina a partir da identificação de bandas características dos grupos funcionais deste fármaco presente nos *scaffolds*, utilizando a faixa de varredura de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 3.3.4.2 Ensaio de Liberação

Para o ensaio de liberação, os *scaffolds* com aproximadamente 0,160 g cada, foram imersos em 50 mL de SBF, decorridos os intervalos de tempo pré-determinados, alíquotas da solução (10 mL) foram retiradas, e uma nova solução foi repostada.

A liberação de vancomicina foi monitorada medindo a absorvância do meio de eluição a 280 nm utilizando um espectrofotômetro UV-VIS da Perkin-Elmer, modelo Lambda 35, empregando-se uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1,0 cm, de acordo com a curva de calibração ( $\text{Abs}=4,988 (C) + 0,076$ , C: mg / mL, R = 0,9985) com o valor de 280 nm de vancomicina como padrão. A concentração do fármaco foi

determinada a partir da média de três leituras de absorvância através da curva de calibração correspondente. A curva de calibração foi obtida a partir de 10 soluções contendo vancomicina nas concentrações variando de 0,018 a 0,09 mg / ml.

### 3.3.4.3 Cinética de Liberação

A cinética de liberação do fármaco e os mecanismos foram investigados a partir dos modelos matemáticos (Tabela 10) de Ordem Zero, Primeira Ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas, com o auxílio do *Excel*, e do suplemento *DDSolver*. Este suplemento está disponível gratuitamente e é capaz de executar a maioria das técnicas existentes para comparar dados de liberação de fármacos, incluindo análise exploratória de dados (Zhang et al., 2010).

Tabela 10 - Modelos disponíveis no *DDSolver* para ajuste de dados de liberação de fármacos.

<b>Modelo Matemático</b>	<b>Equação</b>
Ordem zero	$F = K_0.t$
Primeira Ordem	$F = 100.(1 - e^{-k_1t})$
Higuchi	$F = k_H . t^{0,5}$
Korsmeyer-Peppas	$F = kP.t^n$

### 3.3.4.4 Biodegradação

A degradabilidade dos *scaffolds* foi avaliada medindo-se a concentração dos íons Ca, Mg e Si das amostras em solução tampão Tris-HCl. A solução tampão Tris-HCl 0,05M foi preparada dissolvendo Tris (hidroximetil) aminometano em água destilada e em seguida foi tamponada para pH 7,4 a 37 °C com HCl a 1M. As amostras foram imersas na solução tampão Tris-HCl por diferentes períodos (7, 14, 21 e 28 dias) a 37 °C. O volume ( $V_s$ ) de Tris-HCl utilizado foi calculado em função da área superficial aparente da amostra, de acordo com a Equação 8, já descrita anteriormente. Após os períodos de imersão, as amostras foram removidas da solução tampão Tris-HCl e o líquido extraído foi analisado por Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP – OES). Três amostras de cada grupo foram testadas para obter uma degradabilidade média. O líquido extraído a cada período de tempo

foi analisado. Além disso, também foram avaliadas as mudanças no pH das soluções de imersão usando um medidor de pH tipo eletrólito.

#### 3.3.4.5 Atividade Antimicrobiana

A atividade antibiótica dos scaffolds contra *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* -linhagem ATCC 25923) foi avaliada por ensaios de zona de inibição. Este ensaio da zona de inibição foi realizado utilizando o método do teste de Kirby Bauer. Resumidamente, as bactérias *S. aureus* foram uniformemente distribuídas na superfície da placa de ágar para incubação bacteriana. Todas as amostras (PCL/TCP/W, PCL/TCP/BRE, PCL/TCP/W/Vanco e PCL/TCP/BRE/Vanco) foram esterilizadas e colocadas no centro das placas de ágar e incubadas a 37 °C. As zonas de inibição que se formam ao redor dos cilindros foram medidas por compassos de calibre a cada 24 h por um período de 96 h.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Resultados da etapa I

#### 4.1.1 Obtenção do TCP

A partir do método de combustão de solução foi obtido com êxito um material com aspecto físico de um sólido volumoso de coloração branca e fácil desagregação, conforme apresentado na Figura 10.

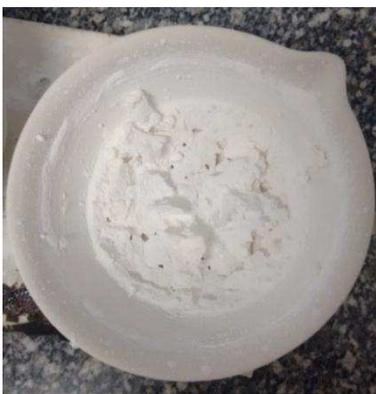


Figura 10 –TCP obtido pela síntese por combustão de solução.

O perfil de temperatura obtido pelo pirômetro nesta síntese é observado na Figura 11.

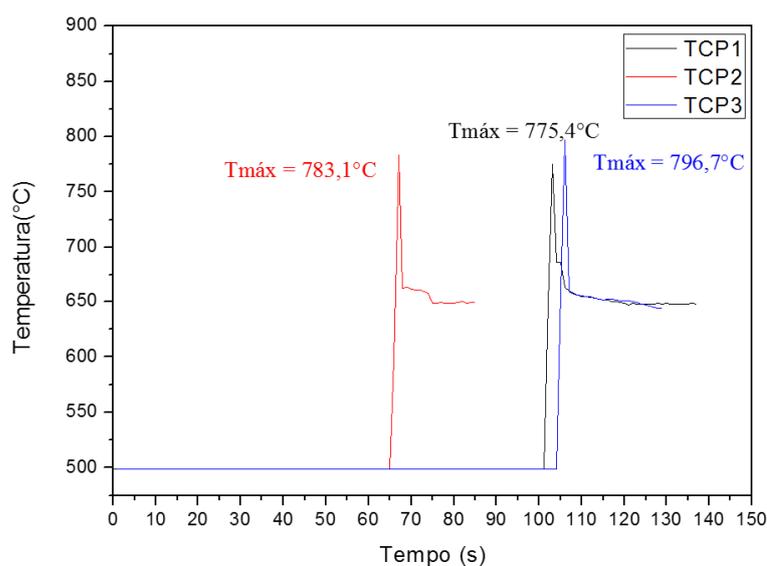


Figura 11 - Perfil de temperatura do TCP obtido por combustão de solução.

É possível observar que todos os perfis apresentaram temperatura inicial de 500 °C embora o forno estivesse a 600 °C. Esta diferença de temperatura está

relacionada ao fato de que a amostra se encontrava a uma temperatura menor que a temperatura mínima que o pirômetro consegue registrar, que é de 500 °C.

Além disso, essa etapa é caracterizada pela evaporação de água livre ainda restante na amostra. Após se manter constante durante alguns segundos, percebe-se um aumento repentino da temperatura, atingindo um valor máximo ( $T_{\text{máx}}$ ), seguido de um resfriamento rápido.

Percebe-se que a síntese ocorreu em um curto período de tempo seguida de uma queda acentuada na temperatura, comportamento típico da síntese por combustão (González-Cortés; Imbert, 2013; Mansurov et al., 2016).

A medida da entalpia de combustão, a temperatura adiabática calculada ( $T_{\text{ad}}$  calculada) e a temperatura de combustão verificada ( $T_{\text{máx}}$ ), bem como o tempo de reação das sínteses estão descritas na Tabela 11.

Tabela 11 – Dados da  $T_{\text{ad}}$  calculada e da temperatura verificada na síntese.

<b>Cerâmica</b>	<b><math>T_{\text{ad}}</math> calculada (°C)</b>	<b>T de combustão verificada (<math>T_{\text{máx}}</math>)(°C)</b>	<b>Tempo de reação (s)</b>	<b>Tempo para atingir a <math>T_{\text{máx}}</math> (s)</b>
<b>TCP1</b>	~2271	~775	137	102
<b>TCP2</b>	~2318	~783	85	67
<b>TCP3</b>	~2560	~796	129	106

Observa-se que a temperatura calculada é muito maior que a temperatura verificada, esta diferença está associada ao tamanho da área analisada pelo pirômetro, que é de aproximadamente 2 mm, já que, o equipamento fornece um valor médio da área analisada que é muito maior que a superfície de frente de combustão, que é da ordem de micrômetro. Além disso, as perdas de calor, causadas pela grande geração de gases e combustão incompleta também podem ocasionar essa diferença de temperatura.

Podemos observar também que a temperatura de combustão verificada aumenta com o aumento da quantidade de ureia. Com o aumento da quantidade de combustível há a necessidade do aumento da quantidade de oxidante, que neste caso foi realizada com a adição do  $\text{HNO}_3$ , isto fez com que houvesse a completa oxidação da ureia e liberasse mais energia ao sistema, proporcionando maiores temperaturas de combustão. Resultados semelhantes foram encontrados por Aghayan e Rodríguez (2012).

A Figura 12 apresenta os padrões de difração de raios X dos pós obtidos.

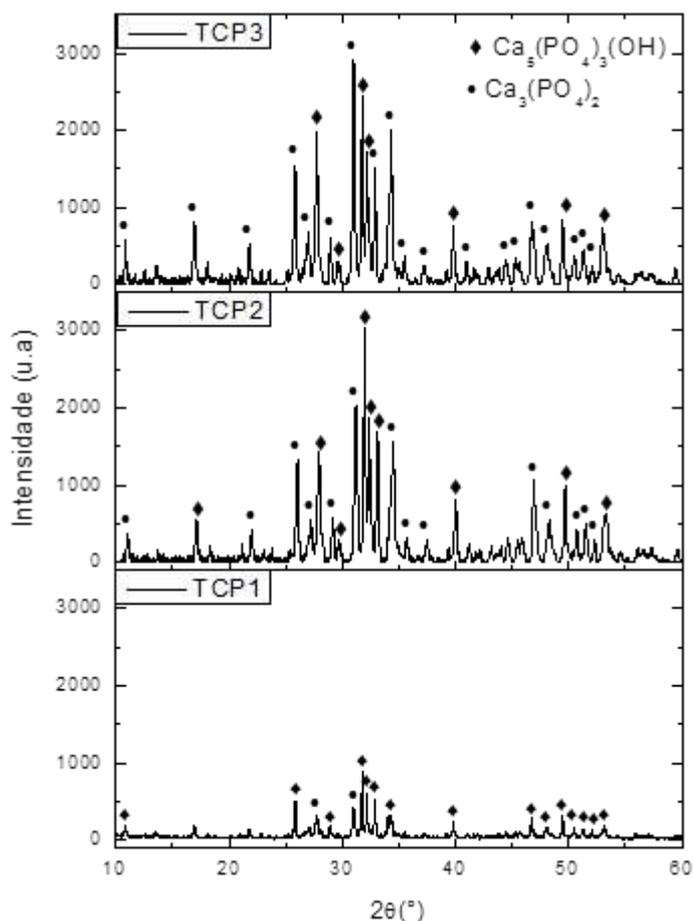


Figura 12 - Difratoograma de Raios X das amostras obtidas por combustão de solução.

A partir dos resultados obtidos por DRX das amostras TCP1, TCP2 e TCP3, foi identificada a presença de duas fases cristalinas, correspondente ao  $\beta$ -TCP (whitlockite) ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ; JCPDS 00-009-0169) e a hidroxiapatita ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})_2$ ; JCPDS 00-009-0432). Como pode ser observado, a HA foi obtida como fase dominante quando a síntese foi realizada com a quantidade estequiométrica de combustível/oxidante ( $x = 1$ , TCP1). E uma pequena quantidade de  $\beta$ -TCP foi formada como fase secundária. A quantidade de  $\beta$ -TCP torna-se considerável a medida que a relação combustível/oxidante aumenta, ou seja, quando  $x = 3$  (TCP3). Uma vez que a quantidade de energia do sistema também aumenta, ocorre a transformação de HA em  $\beta$ -TCP.

A partir dos resultados apresentado, foi escolhido o pó cerâmico obtido com o triplo de combustível, a amostra TCP3, para a obtenção dos *scaffolds* desenvolvido na etapa III, pois apresentou a fase de  $\beta$ -TCP desejada.

Estudos mostram que a síntese por combustão de solução dos fosfatos de cálcio utilizando ureia como combustível resulta na obtenção do  $\alpha$ -pirofosfato de cálcio ( $\alpha$ - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ), hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$  e carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) e que após tratamento térmico por 4h a  $1220\text{ }^\circ\text{C}$  a fase de  $\alpha$ -TCP é obtida (Volkmer et al., 2013).

Aghayan e Rodríguez, (2012) estudaram a influência do tipo e da quantidade de combustível na formação de compostos bifásicos HA/TCP por meio da síntese por combustão de solução utilizando ureia e glicina como combustível e verificaram que a fase  $\alpha$ -TCP foi produzida usando glicina como combustível, já a fase  $\beta$ -TCP prevalece quando a ureia é utilizada.

Sugere-se que a quantidade de combustível utilizada para a obtenção do TCP tem forte influência sobre a fase obtida, em nosso estudo, o excesso de ureia utilizada favoreceu a formação a fase  $\beta$ -TCP.

A morfologia dos pós obtidos foi analisada por MEV-FEG e estão evidenciadas na Figura 13.

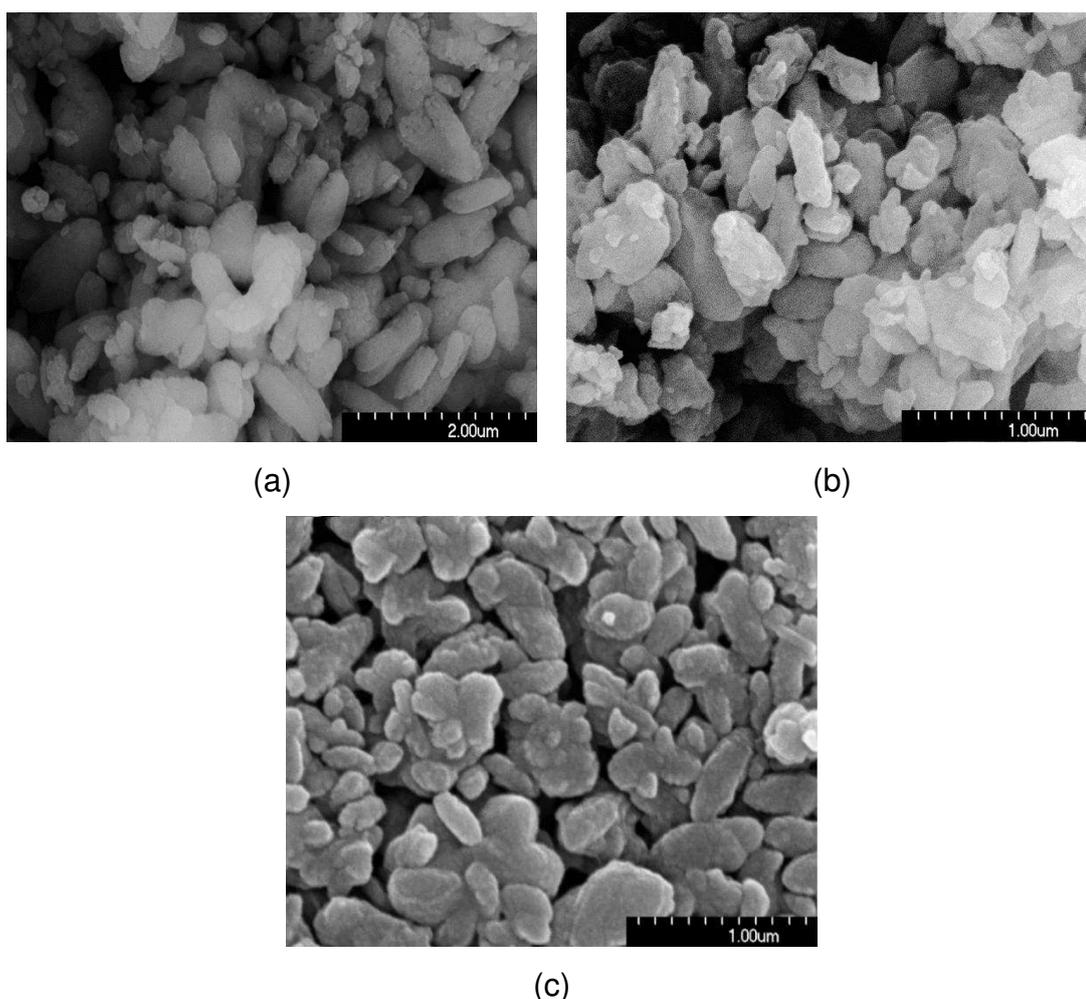


Figura 13 – Imagens obtidas por MEV-FEG do TCP obtidos por combustão de solução: (a) TCP1, (b) TCP2 e (c) TCP3.

Analisando as imagens obtidas por MEV-FEG observa-se uma morfologia típica dos produtos obtidos na síntese por combustão de solução, aspecto também apresentado por Aghayan e Rodríguez (2012), com morfologia do tipo nodular e estrutura submicrônica, além da presença de poros entre as partícula. Esta morfologia é atribuída ao grande volume de gases gerados durante a reação de combustão.

Estudos mostram que a obtenção de estruturas porosas está associada a elevada produção de gases e o curto período de reação que impedem a aglomeração das partículas (Mukasyan et al., 2015; Varma et al., 2016).

Na Tabela 12 encontram-se os dados de diâmetro de partícula equivalente ( $d_{BET}$ ) calculados a partir da área superficial específica ( $S_{esp}$ ).

Tabela 12 – Superfície específica ( $S_{esp}$ ) e  $d_{BET}$  das amostras obtidas por combustão de solução.

<b>Amostra</b>	<b><math>S_{esp}</math> (m<sup>2</sup>/g)</b>	<b><math>d_{BET}</math> (nm)</b>
<b>TCP1</b>	5,8	350
<b>TCP2</b>	9,2	213
<b>TCP3</b>	11,6	169

Observa-se que quando a quantidade de combustível aumenta a superfície específica do material também aumenta e, conseqüentemente, os valores do  $d_{BET}$  diminuiram. O aumento da quantidade de combustível eleva o volume de gases liberados obtendo partículas mais finas. Este resultado indica que o material obtido apresenta partículas em escala nanométrica, confirmando os resultados observados no MEV-FEG que indicaram um material estruturado submicrônicamente.

#### **4.1.2 Obtenção da Wollastonita**

A partir do método de combustão de solução foi obtido com êxito um material com aspecto físico de um sólido volumoso de coloração branca e fácil desagregação, conforme apresentado na Figura 14.



Figura 14 - Wollastonita obtida por reação de combustão.

O perfil de temperatura obtido desta síntese é observado na Figura 15.

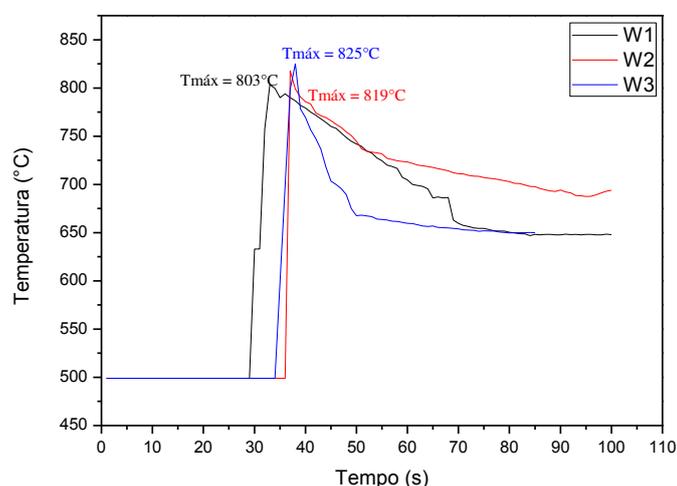


Figura 15 - Perfil de temperatura da Wollastonita obtida por combustão de solução.

Analisando a Figura 15 observamos o mesmo comportamento obtido na obtenção do  $\beta$ -TCP, ou seja, um perfil de temperatura típico da síntese por combustão que corresponde a um rápido aquecimento, seguido de um pico intenso de temperatura ( $T_{máx}$ ) e, posteriormente o resfriamento lento.

A medida da entalpia de combustão, a temperatura adiabática calculada ( $T_{ad}$  calculada) e a temperatura de combustão verificada ( $T_{máx}$ ), bem como o tempo de reação das sínteses estão descritas na Tabela 13.

Tabela 13 - Dados da  $T_{ad}$  e da temperatura verificada na síntese.

Cerâmica	$T_{ad}$ calculada (°C)	T de combustão verificada ( $T_{máx}$ )(°C)	Tempo de reação (s)	Tempo para atingir a $T_{máx}$ (s)
W1	~1939	803	100	35
W2	~2495	819	99	37
W3	~2728	825	85	38

Analisando os dados da  $T_{ad}$  calculada e da  $T_{máx}$  verificada, observa-se o mesmo comportamento descrito nos resultados de obtenção do  $\beta$ -TCP. Além disso, é perceptível que o oxidante utilizado na reação ( $HNO_3$ ) proporcionou um nível de oxidação maior para a ureia, fazendo com que mais energia fosse liberada durante o processo atingindo maiores temperaturas de combustão.

A Figura 16 apresenta os padrões de difração de raios X dos pós obtidos por combustão de solução.

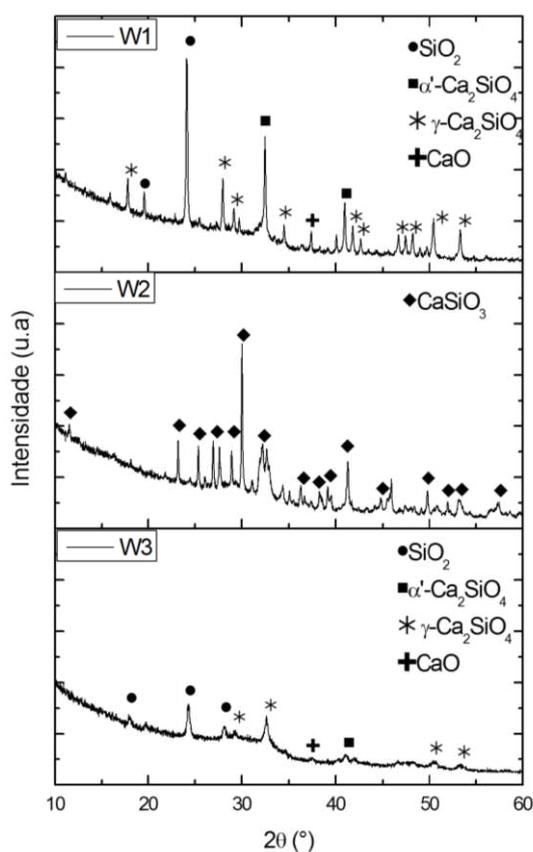


Figura 16 - Difratoformas de Raios X das amostras obtida por combustão de solução.

A partir dos resultados obtidos por DRX das amostras W1, W2 e W3, foi identificada a presença de diferentes fases cristalinas a medida que a quantidade de combustível foi aumentada.

Pode-se observar que quando  $x = 1$  (amostra W1) a amostra apresentou pouca cristalinidade e as fases formadas foram  $\alpha'$ -Ca<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub> (arquivo JCPDS nº 00-036-0642),  $\gamma$ -Ca<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub> (arquivo JCPDS nº 00-049-1672), CaO (arquivo JCPDS nº 01-075-0264) e SiO<sub>2</sub> (arquivo JCPDS nº 01-082-1564), provavelmente, os materiais de partida utilizados não reagiram como esperado e, portanto, não formaram a fase desejada.

Quando a quantidade de ureia foi aumentada,  $x = 2$  (amostra W2), observou-se a formação da fase cristalina de wollastonite - 2M (arquivo JCPDS nº 00-027-0088) indicando que a temperatura alcançada foi suficiente para obter a fase desejada sem a necessidade de uma fase de calcinação subsequente. Em trabalhos descritos na literatura esta fase foi obtida após uma etapa posterior de calcinação (Huang; Chang, 2009; Lakshmi et al., 2013).

O aumento adicional da quantidade de ureia,  $x = 3$  (amostra W3), favorece o desaparecimento da fase de wollastonite 2M. As fases presentes são:  $\alpha'$ -Ca<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub> (arquivo JCPDS nº 00-036-0642),  $\gamma$ -Ca<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub> (arquivo JCPDS nº 00-049-1672), CaO (arquivo JCPDS nº 01-075-0264) e SiO<sub>2</sub> (arquivo JCPDS nº 01-082-1564). A maior temperatura de combustão proporcionada pela grande quantidade de combustível, provavelmente excedeu a temperatura de obtenção da wollastonita, que atingiu o ponto eutético favorecendo a passagem da fase sólida diretamente para a fase líquida. Como pode ser visto no diagrama de fase (Figura 5), a uma determinada temperatura ( $T = 1544$  ° C), esta fase tem um ponto de fusão congruente. A passagem direta para a fase líquida pode ter levado à dissociação do CaSiO<sub>3</sub>, e o resfriamento rápido observado no perfil de temperatura (Figura 15) favoreceu a formação de fases distintas do sistema.

A partir dos resultados obtidos, foi escolhido o pó cerâmico obtido com o dobro de combustível, a amostra W2, para a produção dos *scaffolds* da etapa II, pois apresentou a fase de wollastonita desejada.

A morfologia dos pós obtidos analisadas por MEV-FEG e estão evidenciadas na Figura 17.

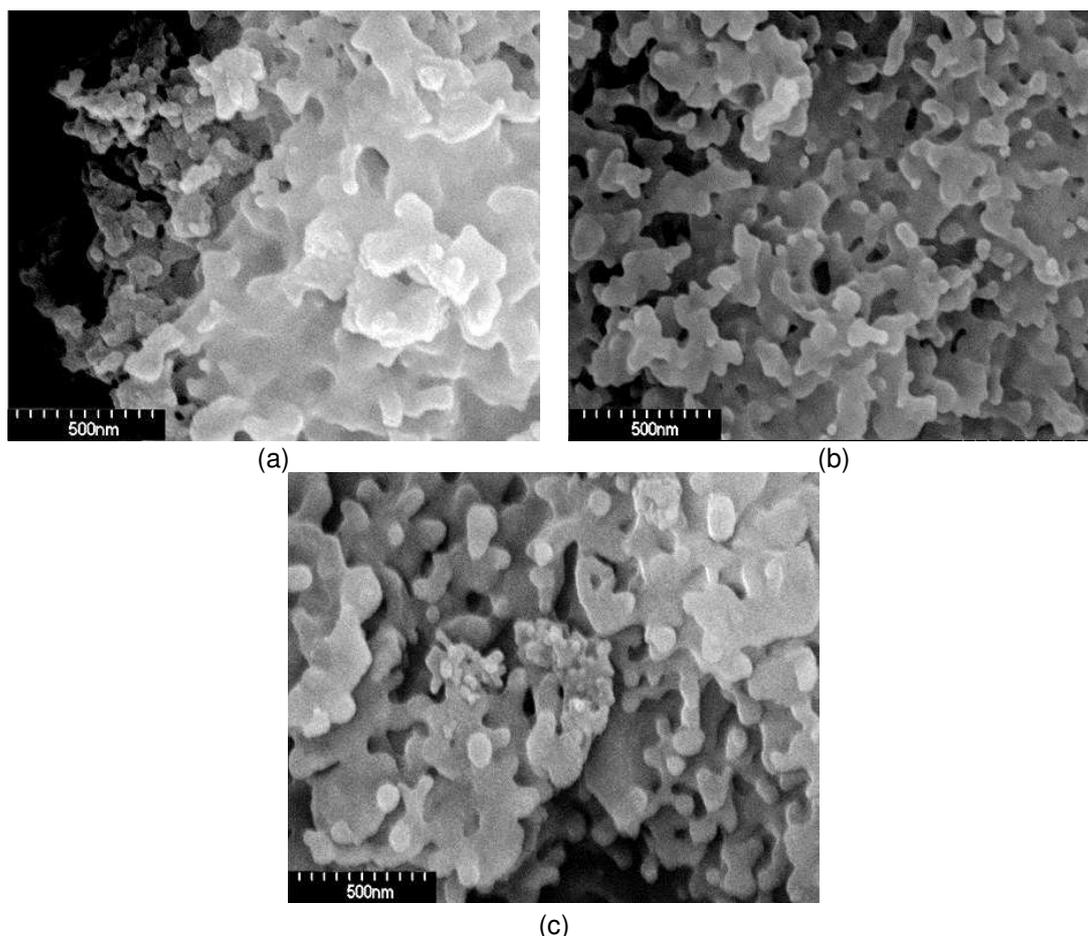


Figura 17 – Imagens obtidas por MEV-FEG da Wollastonita obtida por combustão de solução: (a) W1, (b) W2 e (c) W3.

Analisando as micrografias observa-se a formação de aglomerados e estes consistem em partículas menores, da ordem de nanômetros. Também foi observado a formação de vazios ou poros, em maior quantidade na amostra W2, que estão associados a liberação de gases durante o processo de combustão. Como já mencionado anteriormente, estudos mostram que a obtenção de estruturas porosas está associada a elevada produção de gases (Mukasyan et al., 2015; Varma et al., 2016).

Na Tabela 14 encontram-se os dados de diâmetro de partícula equivalente ( $d_{BET}$ ) calculados a partir da superfície específica ( $S_{esp}$ ).

Tabela 14 - Superfície específica ( $S_{\text{esp}}$ ) e  $d_{\text{BET}}$  das amostras obtidas por combustão de solução.

<b>Amostra</b>	<b><math>S_{\text{esp}}</math> (<math>\text{m}^2/\text{g}</math>)</b>	<b><math>d_{\text{BET}}</math> (nm)</b>
<b>W1</b>	15,7	130
<b>W2</b>	7,2	280
<b>W3</b>	15,6	130

Os resultados do  $d_{\text{BET}}$  confirmam que as partículas estão estruturadas submicrônicamente.

No âmbito deste estudo, quando  $x = 1$  (amostra W1), a relativa baixa temperatura da chama inibiu o crescimento das partículas e o pó gerado apresentou maior área superficial. À medida que a quantidade de combustível aumenta,  $x = 2$  (amostra W2), a temperatura da energia liberada pela reação de combustão aumenta, proporcionando a diminuição da área de superfície devido ao aumento da partícula.

Quando  $x = 3$  (amostra W3), a área superficial específica do pó aumenta. É provavelmente devido à maior energia envolvida na reação quando uma quantidade de combustível é adicionada. Com o aumento na quantidade de combustível, a quantidade de gases aumentará levando a obtenção de partículas menores

#### 4.1.3 Obtenção da Bredigita

A partir do método de combustão de solução foi obtido, com êxito, um material com aspecto físico de um sólido volumoso com coloração branca e fácil desagregação, conforme apresentado na Figura 18.

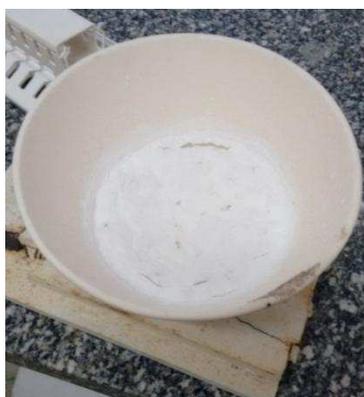


Figura 18 - Bredigita obtida pela síntese por combustão de solução.

O perfil de temperatura desta síntese é mostrado na Figura 19.

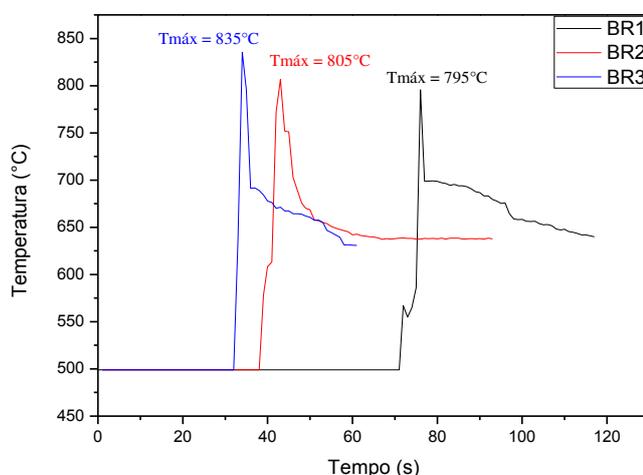


Figura 19 - Perfil de temperatura da bredigita obtida por combustão de solução.

Analisando os perfis de temperatura observa-se o mesmo comportamento relatado na obtenção do TCP, com o perfil de temperatura típico de síntese por combustão.

A medida da entalpia de combustão, a temperatura adiabática calculada ( $T_{ad}$ ) e a temperatura de combustão verificada ( $T_{máx}$ ), bem como o tempo de reação das sínteses estão descritas na Tabela 15.

Tabela 15 - Dados da  $T_{ad}$ , temperatura verificada na síntese e tempo de reação.

<b>Cerâmica</b>	<b><math>T_{ad}</math> calculada (°C)</b>	<b>T de combustão verificada (<math>T_{máx}</math>)(°C)</b>	<b>Tempo de reação (s)</b>	<b>Tempo para atingir a <math>T_{máx}</math> (s)</b>
<b>BR1</b>	~1403	~795	117	76
<b>BR2</b>	~1796	~805	93	43
<b>BR3</b>	~1811	~835	61	34

Os dados apresentados na Tabela 15 referentes a  $T_{ad}$  calculada e a  $T_{máx}$  verificada evidenciam o mesmo comportamento descrito nos resultados de obtenção do  $\beta$ -TCP. Além disso, quando a quantidade de combustível aumenta, o tempo de reação diminui e a temperatura de combustão se eleva. Essas observações são esperadas em um sistema de reação exotérmica em que a quantidade relativa de reagentes afeta a energia liberada durante a reação (Varma et al., 2016).

A Figura 20 apresenta os padrões de difração de raios X dos pós obtidos por combustão de solução.

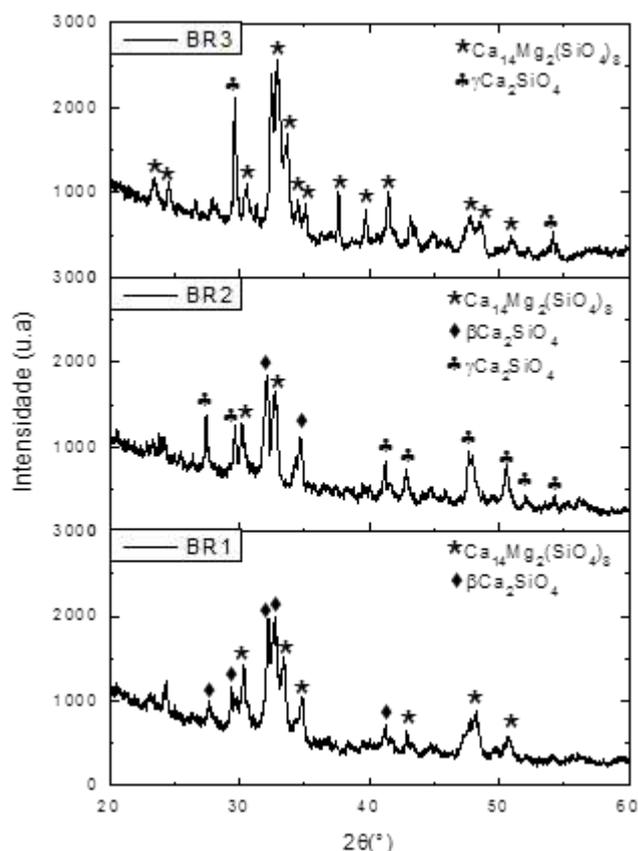


Figura 20 - Difratoformas de Raios X das amostras obtidas por combustão de solução.

A partir dos resultados obtidos por DRX das amostras BR1, BR2 e BR3, foi identificada a presença de diferentes fases cristalinas a medida que a quantidade de combustível foi aumentada.

Pode-se observar que quando  $x = 1$  (amostra BR1) a amostra apresentou duas fases cristalinas:  $\beta$ - $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$  (arquivo JCPDS nº 00-033-0302) e  $\text{Ca}_{14}\text{Mg}_2(\text{SiO}_4)_8$  (arquivo JCPDS nº 00-036-0399). Quando a quantidade de ureia foi aumentada,  $x = 2$  (amostra BR2), a amostra apresentou 3 fases distintas:  $\beta$ - $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$  (arquivo JCPDS nº 00-033-0302),  $\gamma$ - $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$  (arquivo JCPDS nº 00-049-1672) e  $\text{Ca}_{14}\text{Mg}_2(\text{SiO}_4)_8$  (arquivo JCPDS nº 00-036-0399). O aumento adicional da quantidade de ureia,  $x = 3$  (amostra BR3) favorece a formação da fase  $\text{Ca}_{14}\text{Mg}_2(\text{SiO}_4)_8$  (arquivo JCPDS nº 00-036-0399) e de  $\gamma$ - $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$  (arquivo JCPDS nº 00-049-1672).

A medida que a quantidade de ureia é aumentada, favorecendo o aumento da temperatura de combustão, a fase  $\beta$ - $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$  se transforma em  $\gamma$ - $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$ , ambas são fases de baixa temperatura (600-800°C). A fase  $\text{Ca}_{14}\text{Mg}_2(\text{SiO}_4)_8$  é encontrada em

todas as sínteses, mas à medida que a temperatura de síntese aumenta a presença desta fase também aumenta, indicando que a maior quantidade de ureia favorece a formação da fase desejada.

A partir dos resultados apresentados, foi escolhido o pó cerâmico obtido com o triplo de combustível, a amostra BR3, para a produção dos *scaffolds* da etapa III, pois foi a que apresentou a fase de bredigita desejada.

Na Figura 21 podemos observar o diagrama de fase do sistema  $\text{Ca}_2\text{SiO}_4 - \text{Ca}_3\text{MgSi}_2\text{O}_8$ . Neste diagrama é possível observar a formação de  $\gamma\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$  e  $\text{Ca}_{14}\text{Mg}_2(\text{SiO}_4)_8$  (representado pela letra “T”) numa faixa de temperatura que varia de 200 a 1000°C.

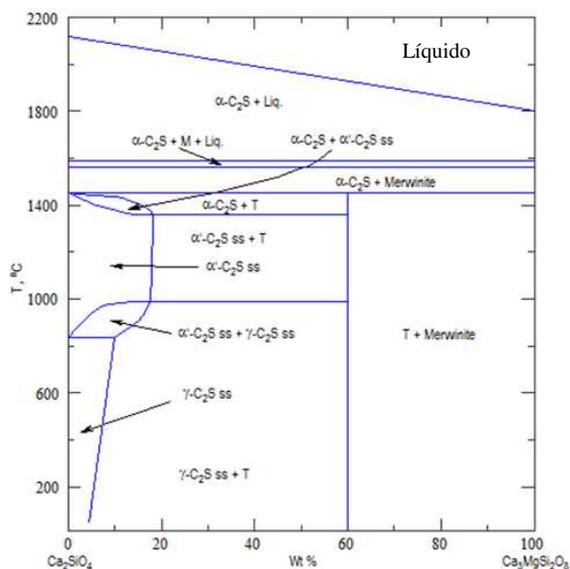


Figura 21 - Diagrama de fases do sistema  $\text{Ca}_2\text{SiO}_4 - \text{Ca}_3\text{MgSi}_2\text{O}_8$ . (Gutt, 1965)

A morfologia dos pós obtidos analisadas por MEV-FEG estão evidenciadas na Figura 22.

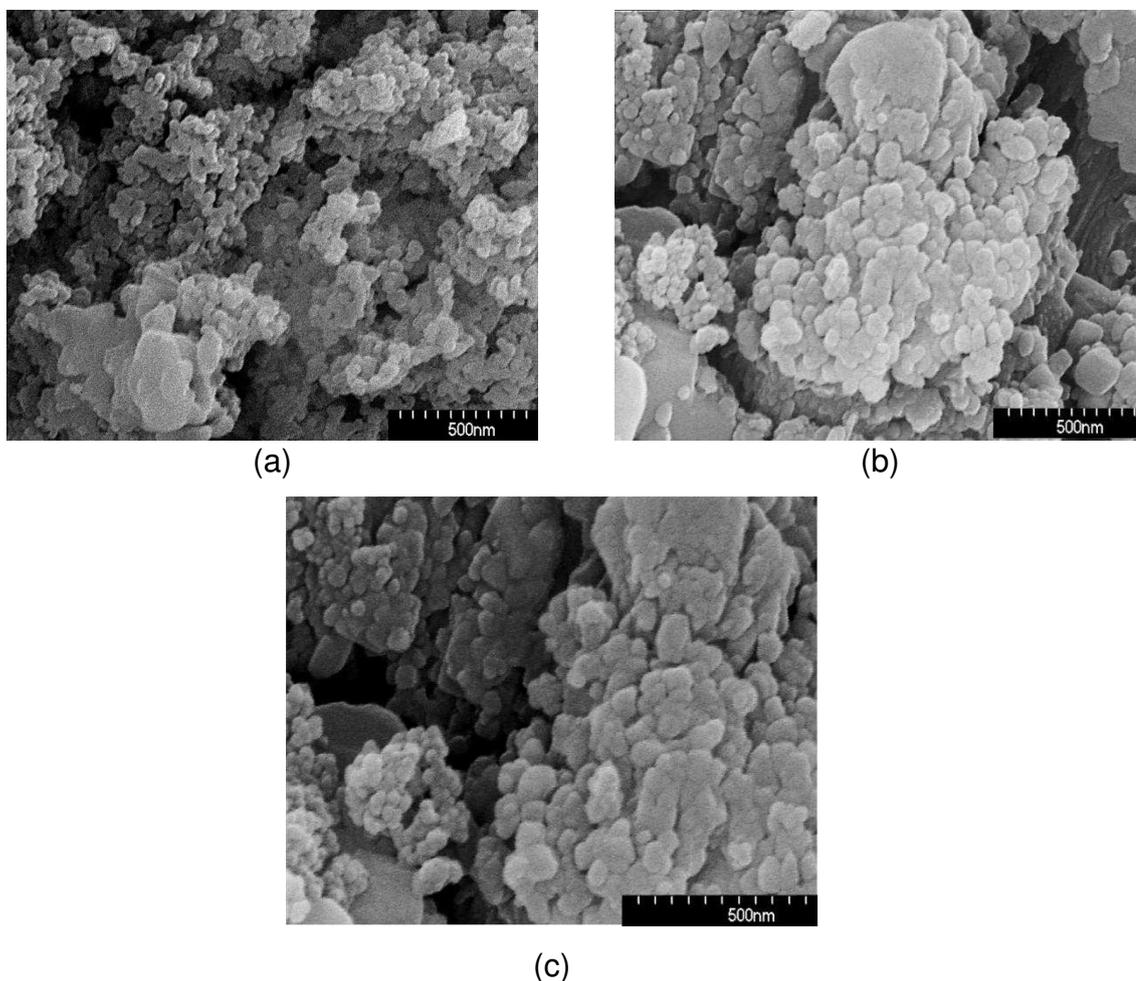


Figura 22 – Imagens obtidas por MEV-FEG da Bredigita obtida por combustão de solução: (a) BR1, (b) BR2 e (c) BR3.

A observação das imagens obtidas por MEV-FEG mostra que todas as amostras exibem partículas nodulares e aglomeradas. Como já foi observado nos resultados do perfil de temperatura, a maior quantidade de combustível leva a maior temperatura de combustão, conseqüentemente, essa maior temperatura leva a uma maior sinterização das partículas, por este motivo é possível verificar que as amostras obtidas com o dobro e com o triplo de combustível (Figura 22 (b) e (c)) apresentaram aglomerados maiores. Já quando a quantidade estequiométrica de combustível foi utilizada (Figura 22 (a)) não é possível perceber a formação de grandes aglomerados.

Na Tabela 16 encontram-se os dados de diâmetro de partícula equivalente ( $d_{BET}$ ) calculados a partir da área superficial específica ( $S_{esp}$ ).

Tabela 16 - Superfície específica ( $S_{esp}$ ) e  $dBET$  das amostras obtidas por combustão de solução.

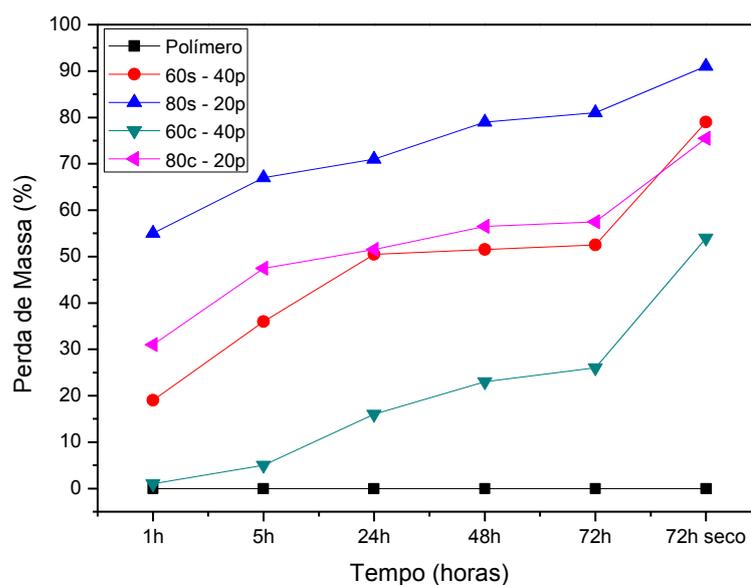
Amostra	$S_{esp}$ ( $m^2/g$ )	$dBET$ (nm)
BR1	4,9	362
BR2	5,9	299
BR3	7,4	239

Observa-se que com o aumento da quantidade de combustível a superfície específica do material aumenta e, conseqüentemente, os valores do  $dBET$  diminuíram. O aumento do combustível aumenta o volume de gases liberados que evita o crescimento excessivo das partícula. Este resultado indica que o material obtido apresenta partículas estruturadas submicrônicamente, confirmando os resultados observados no MEV-FEG que indicaram um material estruturado submicrônicamente.

## 4.2 Resultados da etapa II

### 4.2.1 Extração do agente porogênico

Na Figura 23 encontra-se a curva da relação entre a perda de massa do *scaffold* e o tempo em que os mesmo ficaram imersos em água para a avaliação da eficiência de extração do agente porogênico.



Legenda: s= sal; c= carga inorgânica (sal+cerâmica) e p= polímero

Figura 23 - Curva de extração do agente porogênico.

Foi verificado que a percolação do NaCl foi mais evidente nas amostras que continham 80% (volume) do agente porogênico. Neste caso, percebe-se que a perda de peso (peso seco), após 72h de imersão em água deionizada, foi de 90% para as amostras que continham apenas polímero e NaCl, e de 75% para as amostras que continham carga inorgânica e PCL, pois apresentavam maior quantidade de NaCl, em volume, e, conseqüentemente, a percolação das partículas foi maior.

A percolação do NaCl mais evidente nessas amostras assegura a formação de poros interconectados, e conseqüentemente, possibilita a proliferação celular no interior do *scaffold*.

#### **4.2.2 Microscopia Ótica**

As imagens da parte interna dos *scaffolds* obtidas por microscopia ótica são mostradas na Figura 24. Neste ensaio os resultados das amostras 50(carga inorgânica) - 50(PCL) não foram apresentadas, tendo em vista que as mesmas apresentaram defeitos internos (bolhas), dificultando a análise por esta técnica.

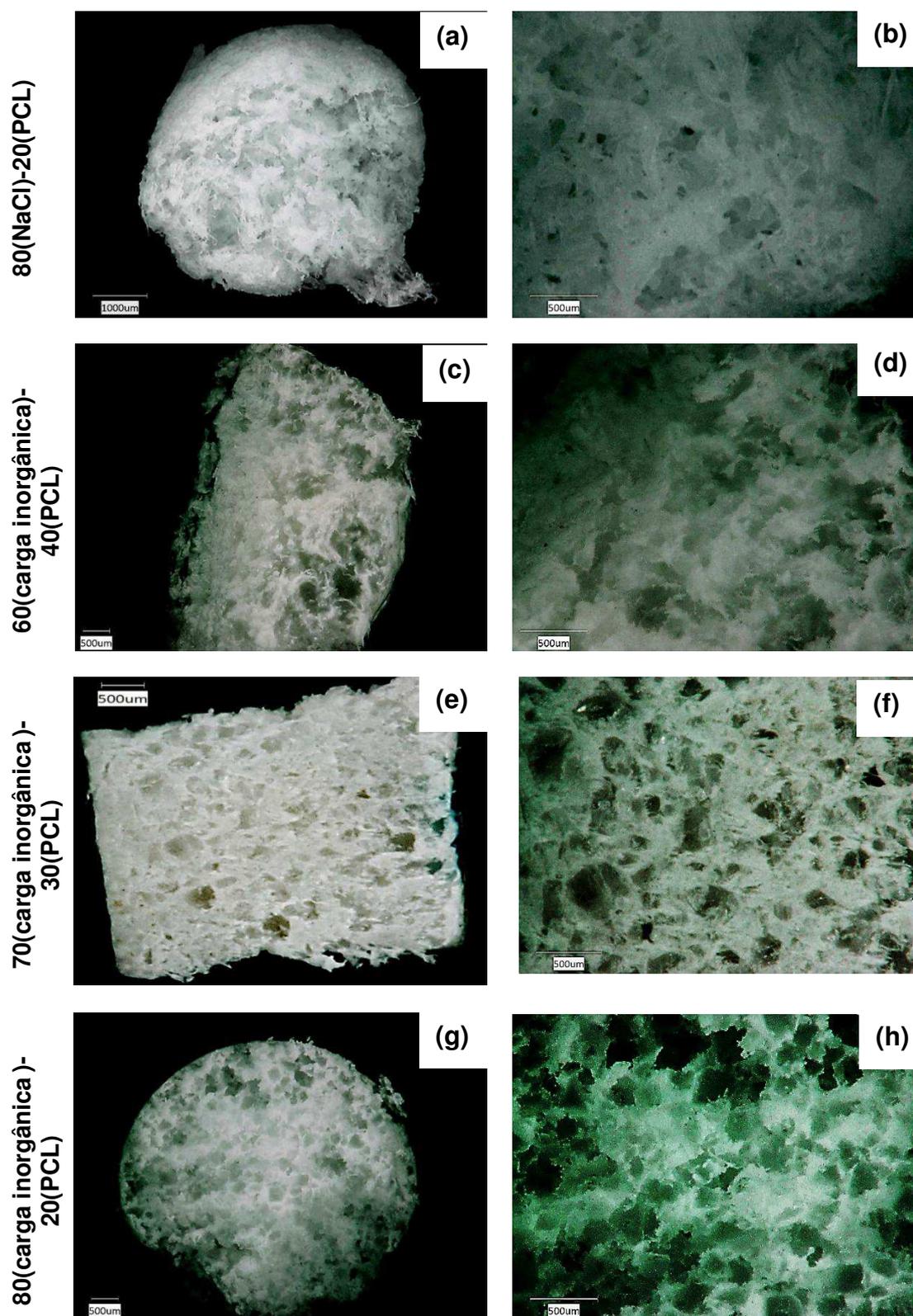


Figura 24 - Imagens obtidas por microscopia ótica dos *scaffolds* preparados com diferentes composições: (a e b) 80(NaCl)-20(PCL), (c e d) 60(carga inorgânica)-40(PCL), (e e f) 70(carga inorgânica)-30(PCL) e (g e h) 80(carga inorgânica)-20(PCL).

A partir das imagens podemos observar a presença de poros em todas as composições. Para as amostras que continham apenas PCL e NaCl observa-se uma maior quantidade de poros. Estes *scaffolds* apresentaram uma estrutura uniforme, integrada e esponjosa.

Os *scaffolds* obtidos com cerâmica, NaCl e PCL apresentaram diferentes morfologias com o aumento da quantidade de carga inorgânica. Observa-se que os *scaffolds* 60(carga inorgânica) - 40(PCL) (Figura 24 d) apresentaram uma estrutura pouco uniforme, íntegra mas com falhas parciais. Já os *scaffolds* com 70 e 80% de carga inorgânica (Figura 24 f e h) apresentaram uma estrutura mais uniforme e íntegra. Verifica-se, em todos os casos, que, com o aumento da carga a espessura da parede, definida como a distância entre os poros vizinhos, diminui.

Pode-se observar que a estrutura é naturalmente mais porosa quando a quantidade de carga inorgânica aumenta, pois a quantidade do agente porogênico também é aumentada. Além disso, o aumento da quantidade de partículas de NaCl resultou em uma maior interconectividade e poros mais definidos, esses apresentaram forma cúbica semelhante à geometria das partículas de NaCl. Resultados semelhantes foram encontrados por Wu et al. (2012).

Chuenjittakuntaworn et al. (2010) prepararam *scaffolds* de PCL/hidroxiapatita pelo método de evaporação de solvente e lixiviação de partículas usando sacarose como agente porogênico e verificaram que a interconectividade dos poros aumentou com o aumento da quantidade de sacarose. Taherkhani e Moztafzadeh (2016) prepararam *scaffolds* de PCL e amido pelo método de evaporação de solvente e lixiviação de partícula utilizando NaCl como agente porogênico em diferentes proporções e verificaram a formação de poros uniformes, constataram também que o aumento da quantidade do agente porogênico levou a um aumento na porosidade do material e que a espessura da parede diminuiu.

As estruturas bem interconectadas, como as apresentadas por estes *scaffolds*, são de grande valor na engenharia de tecidos, pois permitem a migração de células e boa difusão de nutrientes, esse fato representa uma condição básica para a regeneração tecidual (Zeltinger et al., 2001).

O tamanho dos poros verificado por microscopia ótica estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Tamanho médio de poro dos *scaffolds* obtidos com diferentes proporções de carga inorgânica.

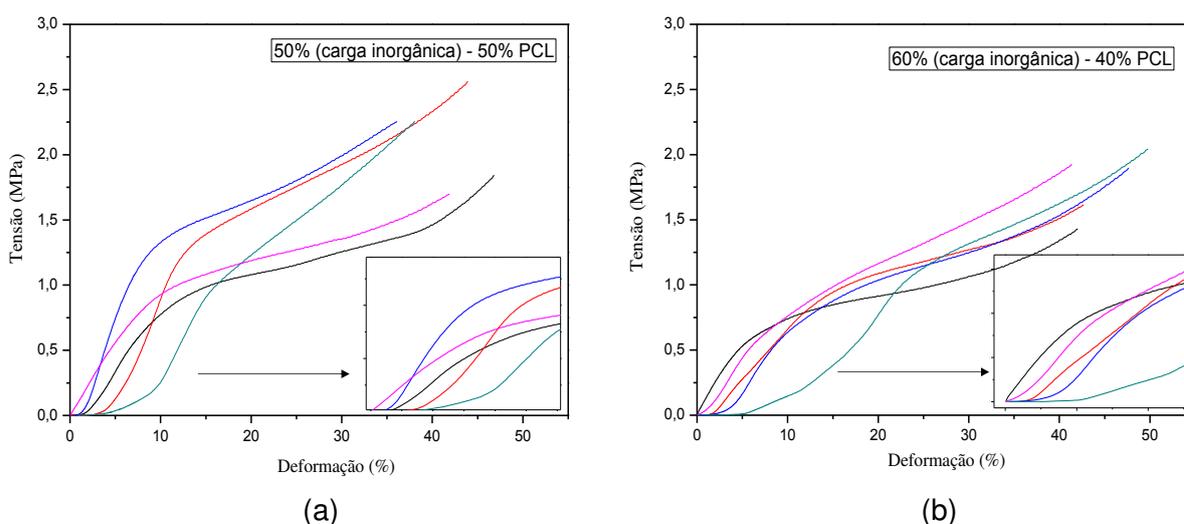
<i>Scaffold</i>		80(NaCl)- 20(PCL)	60(carga inorgânica <sup>1</sup> ) - 40(PCL)	70(carga inorgânica <sup>1</sup> ) - 30(PCL)	80(carga inorgânica <sup>1</sup> ) - 20(PCL)
Tamanho de poro (µm)	Min	25	114	84	132
	Máx	413	452	434	564

Legenda: <sup>1</sup>carga inorgânica = carga cerâmica + agente porogênico.

Os resultados demonstraram que os *scaffolds* com carga inorgânica apresentaram poros com tamanho na faixa de 84 a 564 µm, já os *scaffolds* obtidos apenas com o polímero (PCL) e o agente porogênico (NaCl) apresentaram poros na faixa de 25 a 413 µm, evidenciando que os poros não foram formados apenas com a lixiviação NaCl, mas também devido a evaporação do solvente. Resultados semelhantes foram encontrados por Taherkhani; Moztaezadeh (2016).

#### 4.2.3 Resistência à Compressão

Na Figura 25 observa-se os gráficos Tensão x Deformação dos *scaffolds* preparados com diferentes proporções de carga inorgânica e dos *scaffolds* preparados sem carga inorgânica. As curvas representam cada amostra analisada, já que, neste ensaio foram ensaiadas 5 amostras de cada grupo.



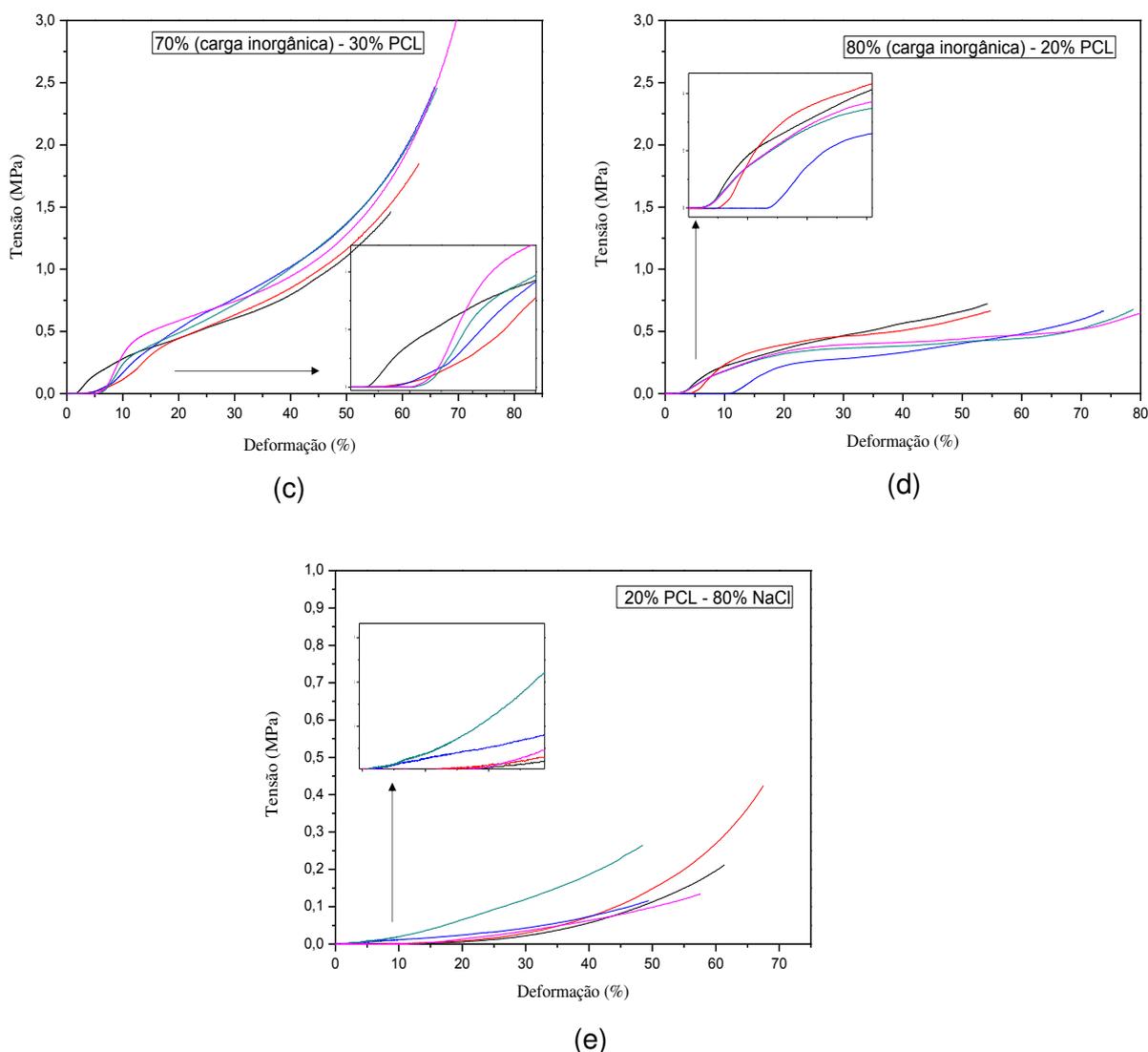


Figura 25- Gráfico Tensão x Deformação dos *scaffolds* com carga inorgânica: (a) 50(carga inorgânica) -50(PCL); (b) 60(carga inorgânica) - 40(PCL); (c) 70(carga inorgânica) - 30(PCL); (d) 80(carga inorgânica) -20(PCL) e sem carga inorgânica (e) 80(NaCl) - 20(PCL).

As curvas tensão-deformação dos *scaffolds* exibem características qualitativas semelhantes à das espumas poliméricas. A primeira zona da curva corresponde à adaptação da superfície do material à placa de compressão, devido a superfície da amostra não ser exatamente plana.

A forma da curva varia com a quantidade de poros e a composição. Na fase inicial de compressão, observa-se uma região elástica, onde a tensão é diretamente proporcional à deformação do material, a partir desta região podemos observar que a curva tem um crescimento contínuo devido à deformação plástica, onde as células do material sofrem flambagem seguida de colapso, e por fim, a densificação do material,

onde as células são praticamente rompidas. O ponto de tensão máxima é pouco aparente em todas as amostras, pois nenhum *scaffold* apresenta fratura frágil.

Para a composição 70(carga inorgânica) - 30(PCL) o regime de plástico não está associado a um platô plano, a tensão aumenta exponencialmente em grandes deformações. Nesta região, à medida que a força aumenta, os poros começam a entrar em colapso. Esta região corresponde a uma absorção de alta energia, onde os espaços ocupados pelos poros são preenchidos pelo material está sendo compactado (Correlo et al., 2009). Já para a composição 80(carga inorgânica) - 20(PCL) a curva é quase horizontal em todos os pontos, ou seja, a tensão não muda em grandes deformações.

Os resultados de resistência à compressão e módulo de elasticidades dos *scaffolds* sem e com carga inorgânica estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Resistência à compressão (MPa) e Módulo de Elasticidade (MPa) dos *scaffolds* produzidos.

<b>Amostra</b>	<b>Resistência à Compressão (MPa)</b>	<b>Módulo de Elasticidade (MPa)</b>
<b>80(NaCl)-20(PCL)</b>	0,013 ± 0,002	0,0013 ± 0,0003
<b>50(carga inorgânica<sup>1</sup>) - 50(PCL)</b>	1,15 ± 0,2	0,12 ± 0,04
<b>60(carga inorgânica<sup>1</sup>) - 40(PCL)</b>	0,77 ± 0,04	0,09 ± 0,01
<b>70(carga inorgânica<sup>1</sup>) - 30(PCL)</b>	0,42 ± 0,08	0,07 ± 0,01
<b>80(carga inorgânica<sup>1</sup>) - 20(PCL)</b>	0,26 ± 0,04	0,030 ± 0,009

Legenda: <sup>1</sup>carga inorgânica = carga cerâmica + agente porogênico.

Os *scaffolds* obtidos sem carga cerâmica apresentaram resistência à compressão e módulo de elasticidade muito baixos, pois estes apresentavam muitos poros e apresentavam características de uma espuma. Quando a carga cerâmica foi incorporada, observou-se um aumento desses valores, indicando que os *scaffolds* compósitos possuíam maior resistência mecânica que àqueles sem a carga cerâmica.

Dentre os *scaffolds* com carga inorgânica observa-se que a medida que o conteúdo desta carga é aumentado, a resistência à compressão e o módulo de elasticidade diminuem. Isso por que o aumento da carga inorgânica implica em um aumento da quantidade de poros, e quanto maior a porosidade menor é a resistência mecânica. Comportamento semelhante foi encontrado por Wei et al., (2009a).

Os valores de resistência à compressão e módulo de elasticidade estão abaixo do esperado para o osso trabecular humano. Mas, como já dito anteriormente, não é obrigatório que esses dispositivos forneçam equivalência mecânica ao tecido ósseo saudável, tendo em vista irão exercer função momentânea de substituição óssea, ou seja, até a regeneração óssea.

- **Condição estabelecida**

Nesta etapa foi escolhida a composição de 70(carga inorgânica) - 30(PCL) para a produção dos *scaffolds* com as cerâmicas obtidas na Etapa I. Essa composição foi escolhida levando em consideração as amostras que apresentaram melhor uniformidade dos poros, maior quantidade de carga cerâmica, melhor resistência à compressão e módulo de elasticidade.

### 4.3 Resultados da etapa III

A partir dos resultados obtidos na etapa II e o estabelecimento da proporção de carga inorgânica-polímero a ser utilizada, foram preparados os *scaffolds* contendo as cerâmicas obtidas na etapa I.

#### 4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

A Figura 26 apresenta a imagem obtida por MEV do *scaffold* obtido apenas com PCL e NaCl. Esta imagem é apresentada com a finalidade de se obter uma comparação com as imagens obtidas com a carga cerâmica.

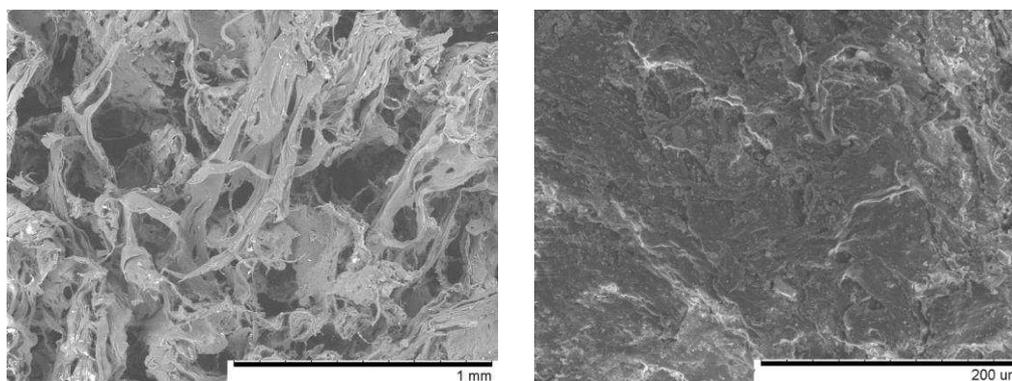


Figura 26 - Imagem obtida por MEV do *scaffold* sem carga cerâmica.

Na Figura 27 podemos observar as imagens obtidas por MEV e MO dos *scaffolds* de PCL/TCP/W.

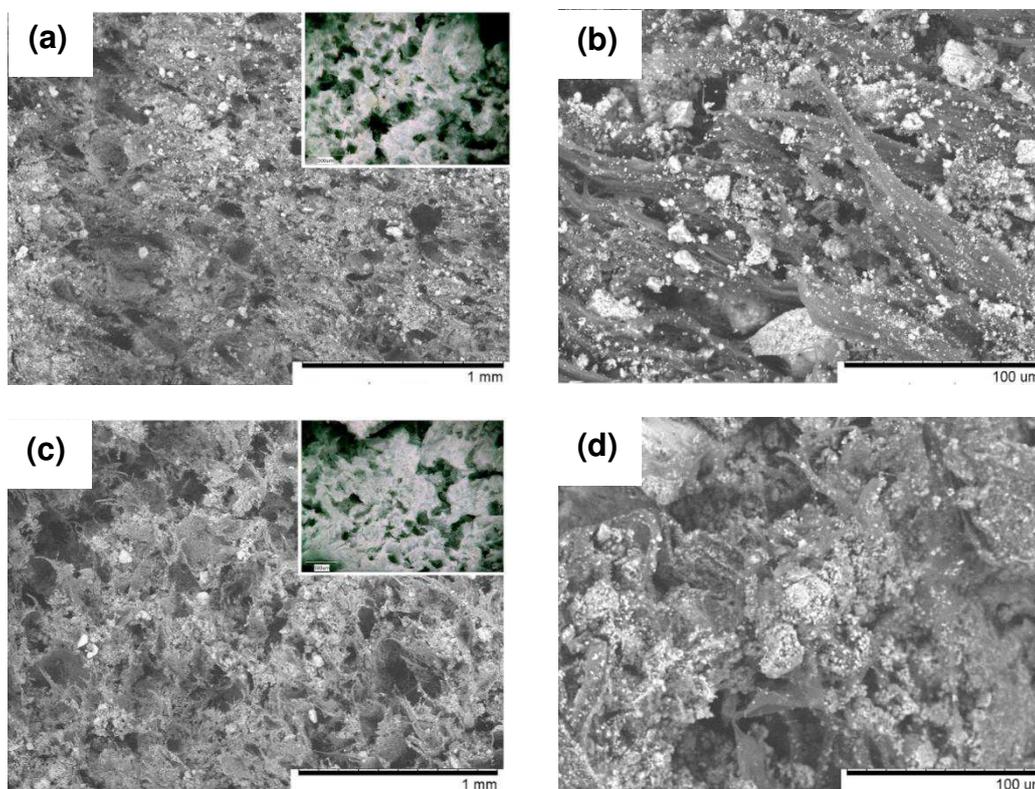


Figura 27 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (figura maior) e microscopia ótica (figura menor no canto superior da imagem obtidas por MEV) dos *scaffolds* PCL/TCP/W (a e b) e PCL/TCP/BRE (c e d).

A partir da análise das imagens (Figura 27), podemos verificar que os *scaffolds* apresentam uma morfologia porosa, com poros interligados. Os *scaffolds* obtidos sem a carga cerâmica (Figura 26) apresentam uma superfície pouco rugosa, já os *scaffolds* com carga cerâmica (Figura 27) apresentam uma superfície rugosa, devido a presença da carga cerâmica. Podemos verificar também que, nos *scaffolds* com carga cerâmica, as partículas foram incorporadas na matriz polimérica, com a presença de aglomerados. Resultados semelhantes foram encontrados por Diba et al., (2012) e por Wang et al., (2010) quando incorporaram partículas cerâmicas em matrizes poliméricas de PCL.

A partir das imagens obtidos por MO foram realizadas medições do tamanho dos poros, este resultado se encontra na Tabela 19. Como pode ser observado, os tamanhos dos poros estão na faixa de 106 à 564 μm.

Tabela 19 - Tamanho médio de poro dos *scaffolds* PCL/TCP/W e PCL/TCP/BRE.

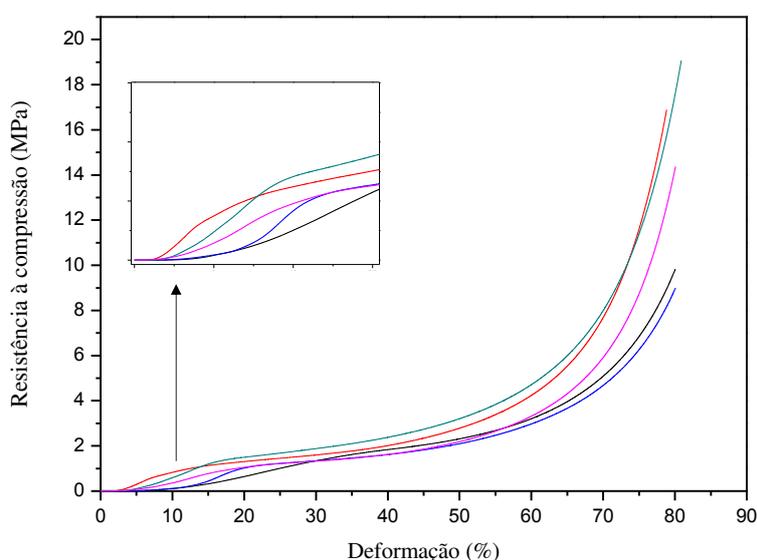
		PCL/TCP/W	PCL/TCP/BRE
Tamanho de poro ( $\mu\text{m}$ )	Min	114	106
	Máx	564	408

Analisando os dados da Tabela 19 observa-se que os poros obtidos na produção dos *scaffolds* PCL/TCP/W e PCL/TCP/BRE encontram-se dentro da faixa pré-determinada quando da adição do NaCl.

Como já mencionado anteriormente, as estruturas porosas com poros interconectados, como as apresentadas por estes *scaffolds*, permitem a migração de células e a boa difusão de nutrientes, e conseqüentemente, favorecem a regeneração tecidual.

#### 4.3.2 Resistência à compressão

Nas Figura 28 e Figura 29 tem-se os gráficos Tensão x Deformação dos *scaffolds* PCL/TCP/W e PCL/TCP/BRE, respectivamente. As curvas representam as 5 (cinco) amostras ensaiadas.

Figura 28 - Gráfico Tensão x Deformação dos *scaffolds* PCL/TCP/W.

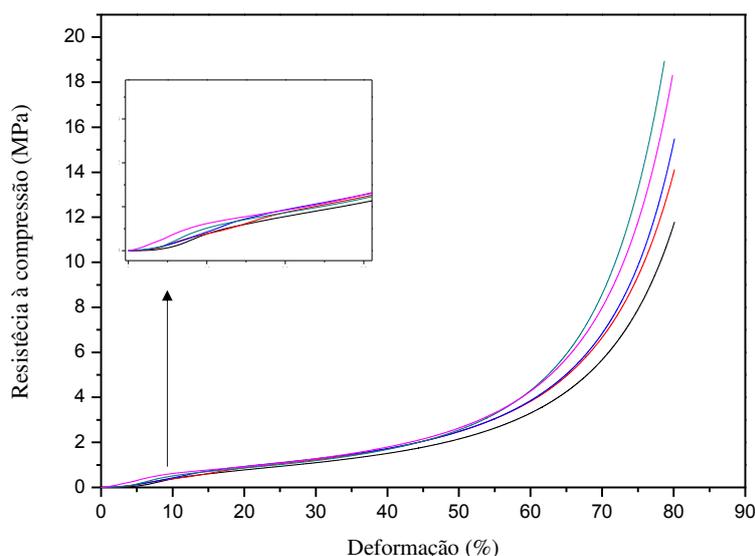


Figura 29 - Gráfico Tensão x Deformação dos *scaffolds* PCL/TCP/BRE.

As curvas tensão-deformação dos *scaffolds* exibem um comportamento análogo ao apresentado pelo *scaffolds* de composição 70(carga inorgânica) - 30(PCL), obtidos na etapa II, este resultado já era esperado tendo em vista que a proporção de carga inorgânica e polímero era a mesma, ou seja, na fase inicial de compressão, observa-se uma região elástica, a partir desta região podemos observar que a curva tem um crescimento contínuo devido à deformação plástica e densificação do material. O ponto de tensão máxima é pouco aparente em todas as amostras, pois nenhum *scaffold* fratura.

Observa-se também que os *scaffolds* PCL/TCP/BRE apresentam curvas idênticas para as diferentes amostras. Já os *scaffolds* PCL/TCP/W apresentam um comportamento um pouco diferente entre as amostras. Este fato indica que as amostras que continham a bredigita e  $\beta$ -TCP apresentaram melhor reprodutibilidade quando comparadas com as amostras que continham a wollastonita e  $\beta$ -TCP.

Os resultados de resistência à compressão e módulo de elasticidades estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 - Resistência à compressão (MPa) e Módulo de Elasticidade (MPa) dos *scaffolds* produzidos.

Amostra	Resistência à Compressão (MPa)	Módulo de Elasticidade (MPa)
PCL/TCP/W	$0,86 \pm 0,08$	$0,054 \pm 0,01$
PCL/TCP /BRE	$0,62 \pm 0,04$	$0,063 \pm 0,01$

Observa-se que o  $\beta$ -TCP favoreceu o aumento da resistência à compressão dos *scaffolds* quando comparados com os *scaffolds* produzidos apenas com a wollastonita obtidos na etapa anterior de experimentação. Além disso, verifica-se que a resistência à compressão dos *scaffolds* produzidos com wollastonita e  $\beta$ -TCP foi superior àqueles obtidos com bredigita e  $\beta$ -TCP. Sugerindo-se que a incorporação de uma segunda fase cerâmica proporcionou o aumento da resistência à compressão.

Como já explicado anteriormente, esses dispositivos devem apresentar rigidez e força suficientes para, pelo menos, suportar e transmitir forças no local do tecido hospedeiro.

É importante ressaltar que a carga inorgânica no *scaffold* além de proporcionar porosidade adequada para regeneração óssea, por parte dos poros produzidos pelo agente porogênico, também irá proporcionar maior bioatividade e aumento da taxa de biodegradação do material, por parte das cargas cerâmicas, que são características importantes no desenvolvimento de materiais para regeneração óssea.

#### **4.3.3 Bioatividade *In vitro***

Os *scaffolds* produzidos nesta etapa foram submetidos à avaliação da bioatividade *in vitro*, pela imersão controlada em SBF. A superfície das amostras de PCL/TCP/W e PCL/TCP/BRE avaliadas a 5, 7, 14, 21 e 28 dias, foi analisada por MEV, e as imagens obtidas estão ilustradas nas Figuras 31, 32, 34 e 35.

Nas Figuras 30 e 33 estão ilustradas as imagens da superfície dos *scaffolds* de PCL/TCP/W e PCL/TCP/BRE, respectivamente, que não foram imersos em SBF.

As amostras de PCL/NaCl não foram estudadas nesta etapa pois este polímero não apresenta capacidade bioativa de acordo com vários estudos descritos na literatura (Diba et al., 2012; Sampaio, 2016; Wei et al., 2009b).

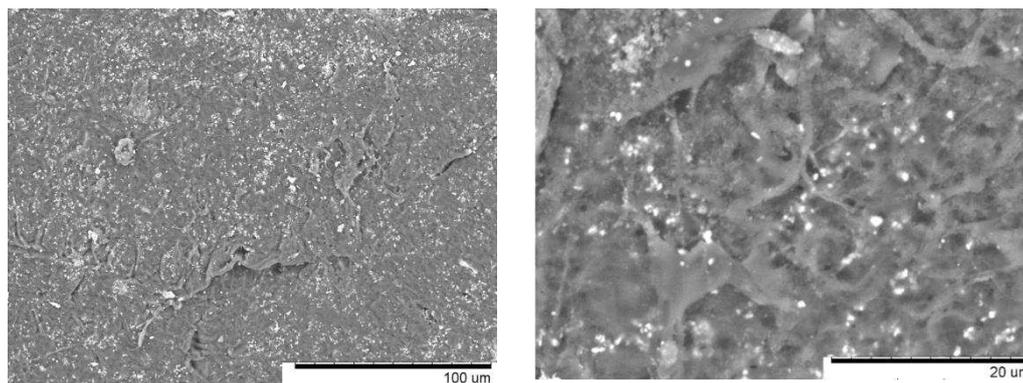
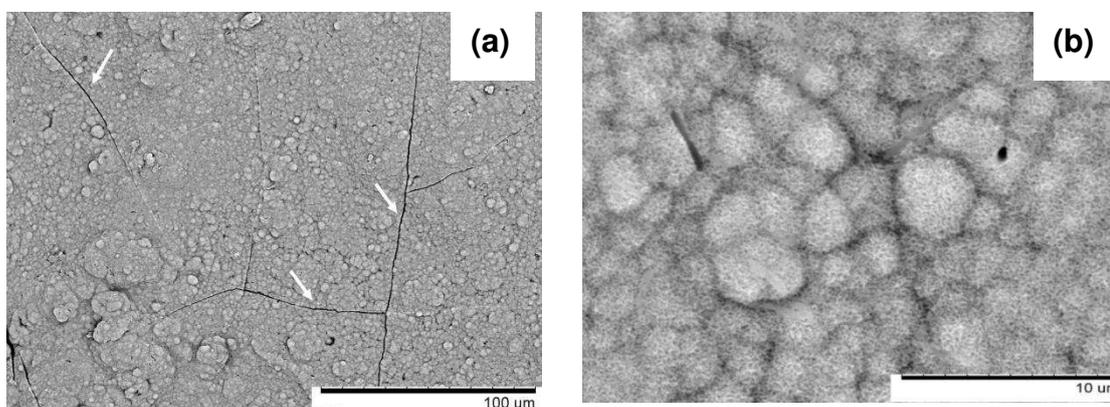


Figura 30 - Superfície dos scaffolds de PCL/TCP/W antes da imersão em SBF.

A partir da análise das imagens obtidas por MEV dos *scaffolds* PCL/TCP/W podemos observar a presença das partículas cerâmicas dispersas na matriz polimérica. Observa-se também que a superfície do material analisado é rugosa, essa característica pode ser atribuída ao método de obtenção destes *scaffolds*, a evaporação do solvente pode ter proporcionado esse tipo de superfície ao material. Resultados semelhantes foram encontrados por Wei et al. (2009b). Além disso, superfícies rugosas também são efetivas para adesão celular e proliferação celular (Deng et al., 2015; Magallanes-Perdomo et al., 2010).



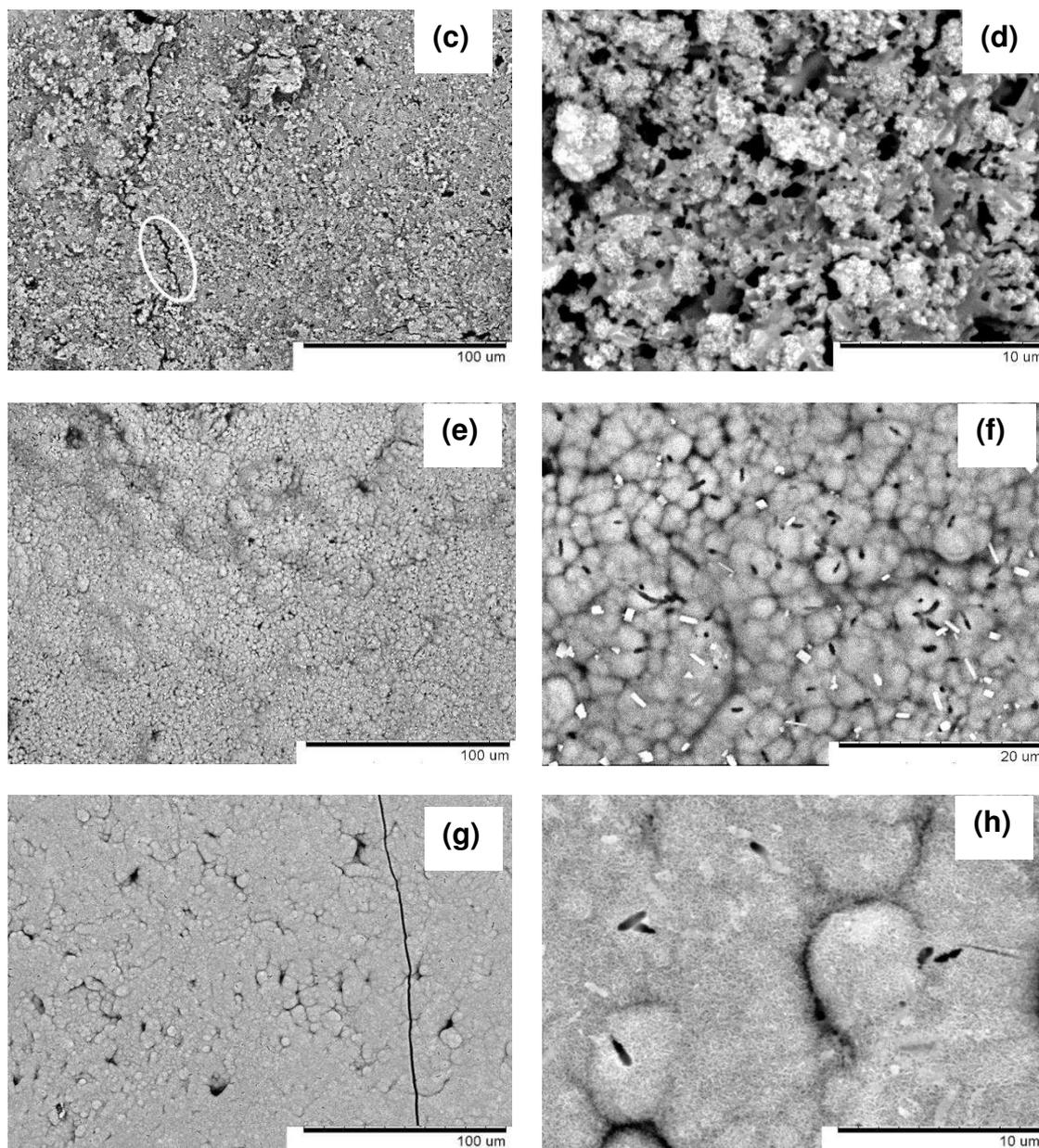


Figura 31 - Superfície dos scaffolds de PCL/TCP/W após imersão em SBF: 5 dias (a, b); 7 dias (c,d), 14 dias (e, f); 21 dias (g,h).

Ao analisar as imagens obtidas por MEV dos *scaffolds* de PCL/TCP/W imersos em SBF verificou-se que após 5 dias (Figura 31 a e b) a superfície do material já apresenta uma mudança significativa. É observada uma camada com a presença de pequenas fissuras ao longo de toda a superfície analisada, características da formação da HA na superfície do material (Figura 31 a). Observando mais detalhadamente a superfície das amostras (Figura 31 b) é possível observar grânulos esféricos que caracterizam a formação da HA. O crescimento dessa camada aumenta com o decorrer dos dias de imersão. Resultados semelhantes foram encontrados por Wei et al., (2009a, 2009b).

Na Figura 32 podemos observar a imagem da superfície do *scaffolds* de PCL/TCP/W após a imersão em SBF por 28 dias.

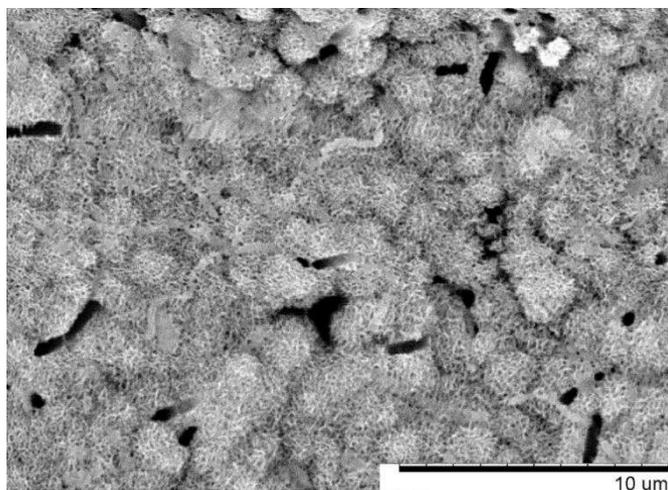


Figura 32 - Superfície dos *scaffolds* de PCL/TCP/W após imersão em SBF por 28 dias.

Observa-se que a camada formada após 28 dias (Figura 32) exhibe, de forma mais evidente, nas partículas de hidroxiapatita, cristais de fosfato de cálcio em escala nanométrica e na forma de agulha. Caridade et al., (2012) observaram a bioatividade de membranas de poli(d,l-ácido lático)/Bioglass<sup>®</sup> e verificaram comportamento semelhante a este após imersão das membranas em SBF por 21 dias.

Na Figura 33 observa-se as imagens da superfície dos *scaffolds* PCL/TCP/BRE antes da imersão em SBF.

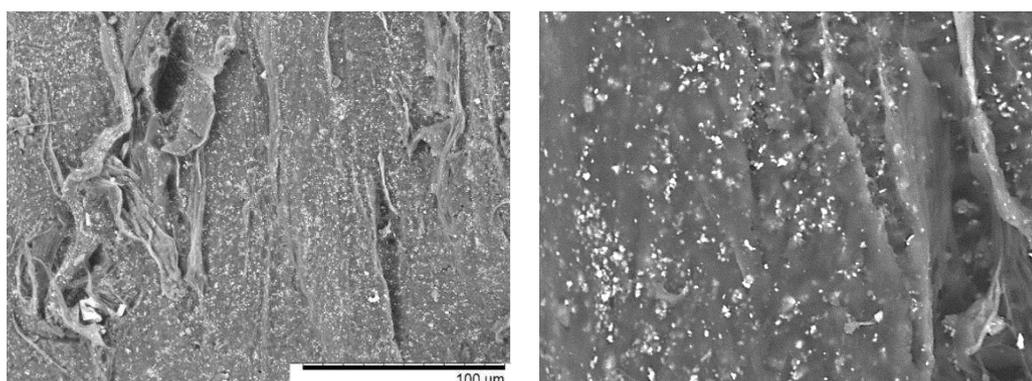
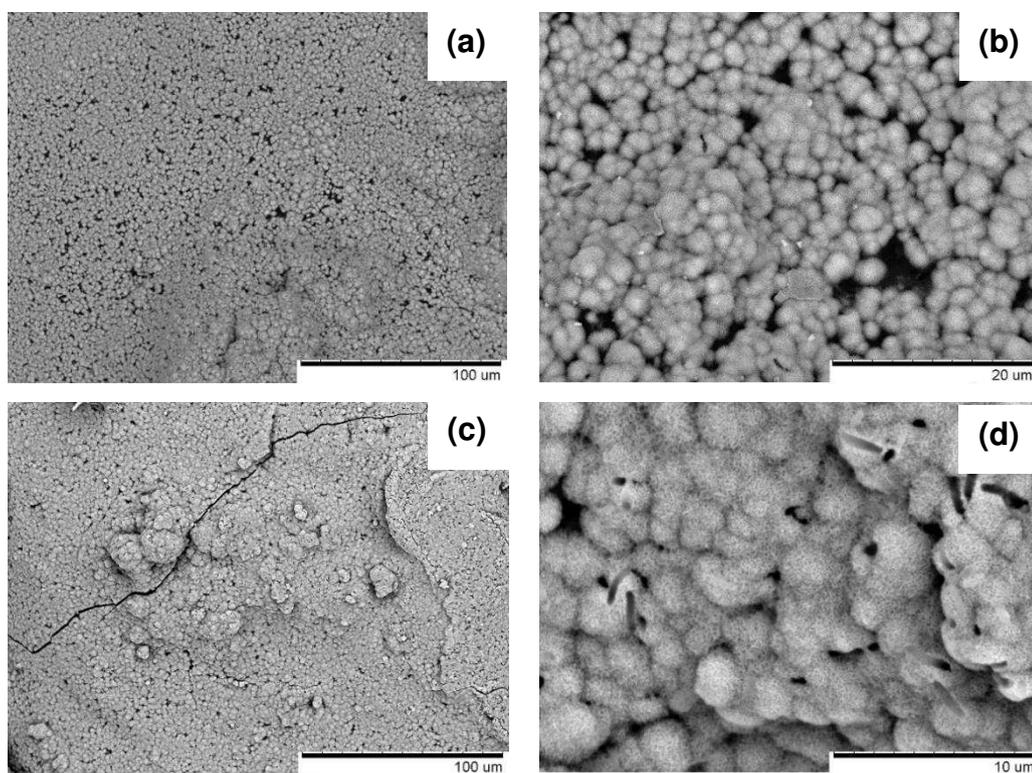


Figura 33 - Superfície dos *scaffolds* de PCL/TCP/BRE antes da imersão em SBF.

A partir da análise das imagens obtidas por MEV dos *scaffolds* PCL/TCP/BRE podemos observar a presença das partículas cerâmica dispersas na matriz polimérica. Observa-se também que o material analisado apresenta superfície rugosa.

Na Figura 34 observa-se as imagens da superfície dos *scaffolds* PCL/TCP/BRE após a imersão em SBF.



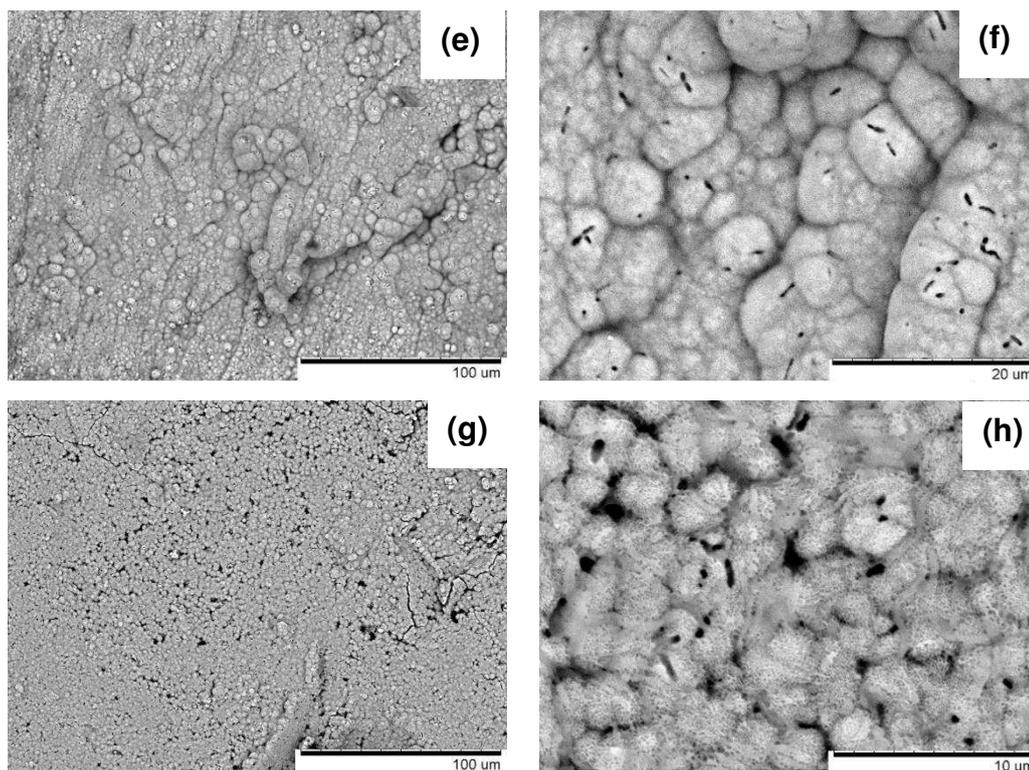


Figura 34 - Superfície dos scaffolds de PCL/TCP/BRE após imersão em SBF: 5 dias (a, b); 7 dias (c, d); 15 dias (e, f); 21 dias (g, h).

Ao analisar as imagens obtidas por MEV dos *scaffolds* de PCL/TCP/BRE imersos em SBF verificou-se que após de 5 dias (Figura 34 a e b) de imersão a superfície do material já apresenta uma mudança significativa. É observado uma camada formada por pequenos grânulos esféricos, com pequenos espaços entre eles, que caracterizam a formação da HA. Após 7 (Figura 34 b e c) dias de imersão observa-se um aumento da camada e já não é perceptível os espaços entre os grânulos. A medida que aumenta os dias de imersão (Figura 34 e, f, g e h), percebe-se um aumento dos grânulos e uma maior densificação entre eles. O mesmo comportamento foi observado nos scaffolds de PCL/TCP/W.

Na Figura 35 podemos observar a imagem da superfície do *scaffolds* de PCL/TCP/W após a imersão em SBF por 28 dias.

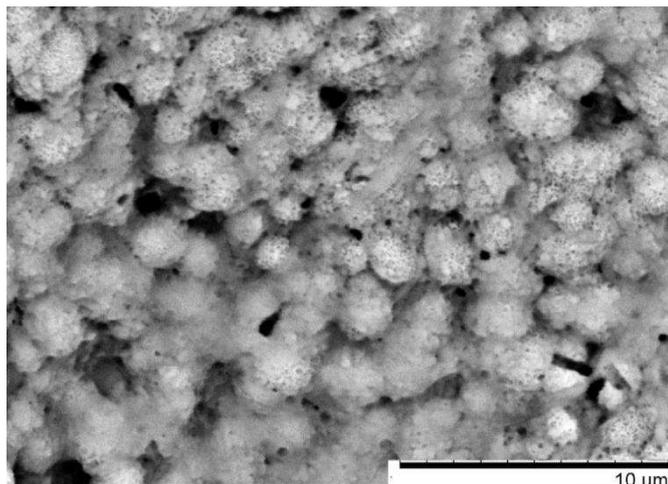


Figura 35 - Superfície dos *scaffolds* de PCL/TCP/BRE após imersão em SBF por 28 dias.

Assim como para os *scaffolds* de PCL/TCP/W imersos por 28 dias em SBF (Figura 32), os *scaffolds* de PCL/TCP/BRE após o mesmo tempo de imersão apresentaram cristais de fosfato de cálcio em escala nanométrica, nas partículas de hidroxiapatita.

Kokubo et al., (1993) sugeriu que a dissolução de íons de silício pode fornecer locais favoráveis para a nucleação da apatita nas superfícies de vitrocerâmicas. Wu et al., (2005) estudaram a bioatividade *in vitro* da cerâmica bredigita e verificaram que esta cerâmica é bioativa, em seus estudos sugeriram que o mecanismo de formação de apatita na cerâmica de bredigita pode ser semelhante ao da cerâmica bioativa baseada em CaO-SiO<sub>2</sub>.

Kouhi et al., (2016) investigaram a bioatividade *in vitro* de nanopartículas compósitas de hidroxiapatita/bredigita e verificaram que estas apresentaram um comportamento bioativo melhorado, com uma taxa de formação de apatita mais rápida que as nanopartículas de hidroxiapatita pura.

Esses resultados evidenciam que ambas as composições dos *scaffolds* são bioativas e apresentam potencial para aplicação como biomaterial.

#### 4.3.4 Adesão celular *In vitro*

A morfologia dos *scaffolds* de PCL/TCP/W (Figura 36 a e b) e PCL/TCP/BRE (Figura 36 c e d) foi analisada por MEV após o ensaio de adesão celular *in vitro* as imagens obtidas de diferentes regiões do material estão apresentadas abaixo.

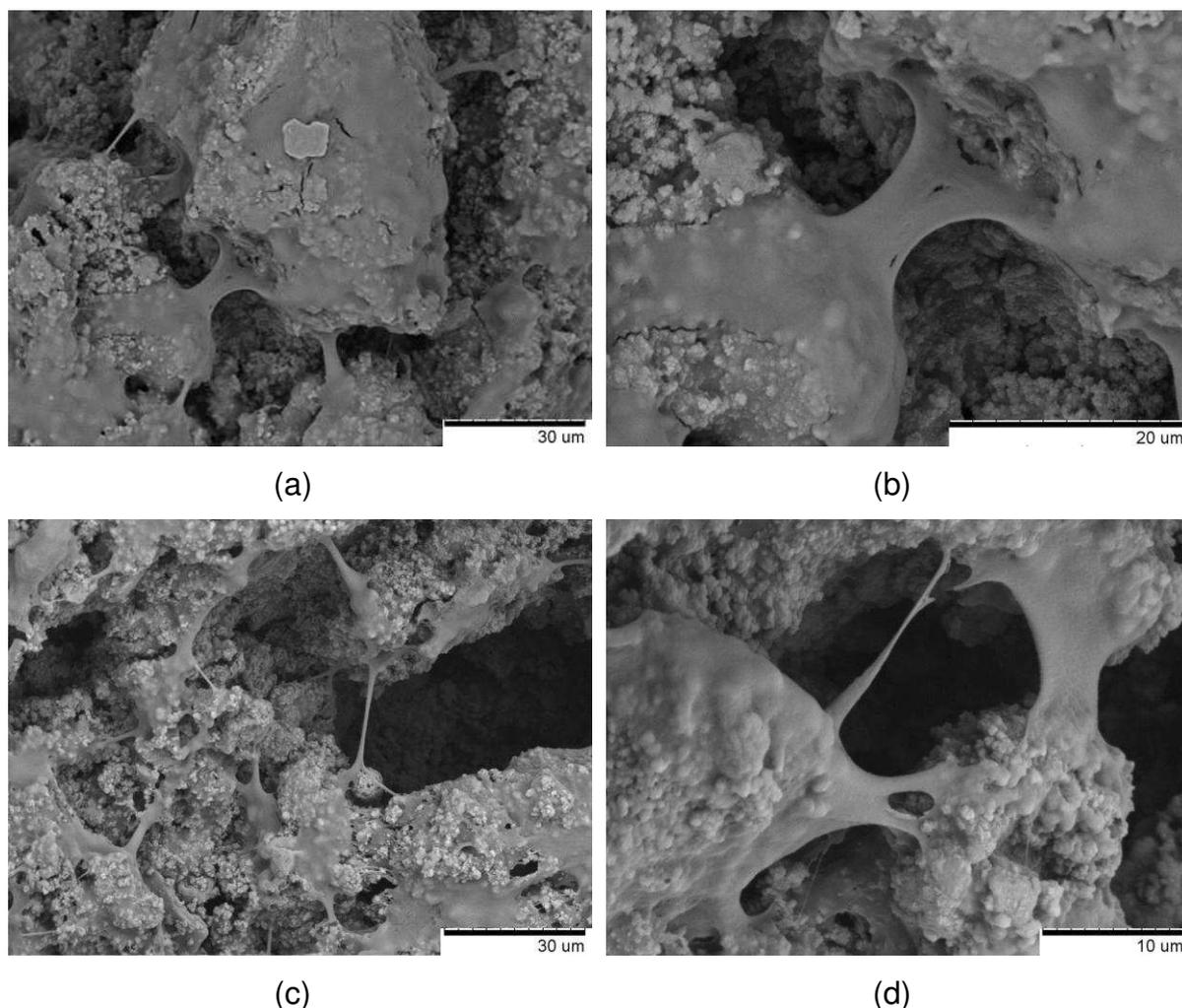


Figura 36 - Imagens obtidas por MEV da superfície dos scaffolds após incubação com células L929 por 7 dias: (a e b) PCL/TCP/W e (c e d) PCL/TCP/BRE.

Analisando as imagens obtidas por MEV, observa-se que, após 7 dias de cultivo celular, as células se apresentaram aderidas aos compostos. Além da adesão, também foi observado que as células apresentaram prolongamentos celulares, característicos de seu desenvolvimento e viabilidade. Observa-se que a superfície rugosa e a presença de poros facilitaram a adesão e proliferação das células. Este resultado é semelhante para os dois materiais.

A adesão celular nos *scaffolds* contendo apenas o PCL não foi realizada pois estudos encontrados na literatura afirmam que a sua característica hidrofóbica reflete em uma fraca adesão celular (Cho et al., 2015; Shor et al., 2007; Wang et al., 2010).

Estudos mostram que a morfologia de superfície do material, a presença de poros e produtos iônicos oriundos dos componentes do material são importantes na

resposta biológica das células, na fixação e proliferação celular (Deng et al., 2015; Guo et al., 2009; Magallanes-Perdomo et al., 2010).

A superfície rugosa leva a uma maior área superficial, esta pode oferecer mais sítios que irão promover a ligação de proteína adesiva, que é um pré-requisito essencial para a adesão celular (Deng et al., 2015).

Além disso, a presença de íons como Ca, Si e Mg, característicos das biocerâmicas estudadas, desempenham um papel importante na proliferação e até diferenciação celular (Wu et al., 2007).

A adesão celular inicial é considerada responsável pelas funções celulares e eventual integração tecidual, já a proliferação celular está intimamente correlacionada com a quantidade de nova formação óssea (Zhao et al., 2013).

Um dos fatores importante na engenharia de tecidos ósseos é a interação do biomaterial com as células, este deve permitir a rápida proliferação celular. A relação do biomaterial com as células e, particularmente, às células aderidas à sua superfície é o que define a biocompatibilidade (Gong et al., 2006).

#### **4.4 Resultados da Etapa IV**

##### **4.4.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)**

Para investigar a interação intermolecular entre o fármaco e a matriz polimérica foi realizado a análise por FTIR do PCL puro, da vancomicina (Vanco), dos pós cerâmicos de  $\text{CaSiO}_3$  (W),  $\beta\text{-Ca}_3\text{PO}_4$  (TCP) e  $\text{Ca}_7\text{Mg}(\text{SiO}_4)_4$  (BRE), e dos compósitos com e sem o fármaco. Os espectros encontram-se na Figura 37.

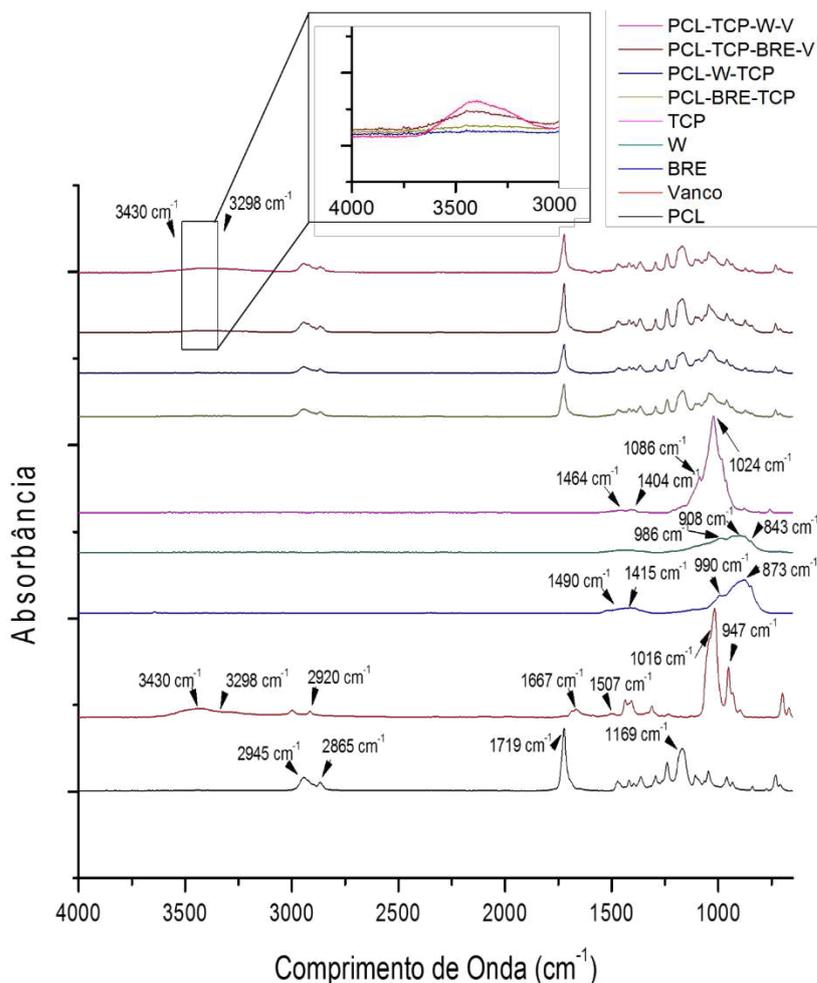


Figura 37 - Espectro FTIR das amostras.

No espectro do PCL puro são exibidos bandas características a  $2945\text{ cm}^{-1}$  e  $2865\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao alongamento assimétricos e simétricos do grupo  $\text{CH}_2$ , respectivamente, o pico em  $1719\text{ cm}^{-1}$  corresponde a vibração de alongamento da ligação carboxílica ( $-\text{C}=\text{O}$ ) e o pico em  $1169\text{ cm}^{-1}$  corresponde a vibração de alongamento da ligação éter ( $\text{O}-\text{C}-\text{O}$ ) (Chang et al., 2014; Türkkan et al., 2017). O espectro da vancomicina apresenta banda larga em  $3430\text{ cm}^{-1}$  e  $3298\text{ cm}^{-1}$  correspondente a vibração de alongamento da ligação amina ( $-\text{N}-\text{H}$ ) e da ligação  $\text{OH}$  do grupo fenólico, respectivamente. A banda em  $1667\text{ cm}^{-1}$  corresponde a vibração de alongamento da ligação  $-\text{C}=\text{O}$  da amida primária. A banda em  $1507\text{ cm}^{-1}$  corresponde a vibração da ligação  $\text{C}=\text{C}$  do anel aromático (Upho et al., 2015; Yu et al., 2016).

O espectro do pó cerâmico de  $\text{Ca}_7\text{Mg}(\text{SiO}_4)_4$  apresenta bandas características desta cerâmica, uma banda larga na faixa que compreende os valores  $870\text{ cm}^{-1}$  e  $990$

$\text{cm}^{-1}$ , com a presença de duas bandas correspondentes a vibração do alongamento da ligação  $\text{SiO}_4$  (Kouhi et al., 2016; Rahmati et al., 2018). O pós cerâmico de  $\text{CaSiO}_3$  apresentam bandas características dessa cerâmica na região de  $843 \text{ cm}^{-1}$ ,  $908 \text{ cm}^{-1}$  e  $986 \text{ cm}^{-1}$ , devido a vibração da ligação de O-Si-O (Sreekanth Chakradhar et al., 2006). Os pós cerâmicos de  $\text{Ca}_3\text{PO}_4$  apresenta uma banda muito forte entre  $1024$  e  $1086 \text{ cm}^{-1}$  correspondente a vibração de alongamento assimétrico da ligação P-O do grupo  $\text{PO}_4^{3-}$ . Bandas fracas entre  $1400$  e  $1600 \text{ cm}^{-1}$  e em  $873 \text{ cm}^{-1}$  são atribuídos a vibrações de alongamento assimétrico e de flexão fora do plano do grupo carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), respectivamente, que é devido a presença da hidroxiapatita formada, a presença desta fase também foi observada no DRX (Gibson et al., 2000; Manoj et al., 2015).

Os espectros dos scaffolds com e sem o fármaco são bastante semelhantes, sem a presença significativa das bandas características da vancomicina e apresentam todas as bandas características do PCL, apenas na região entre  $3430$  e  $3298 \text{ cm}^{-1}$ , do espectro dos scaffolds com o fármaco, é possível observar a presença de uma banda larga e fraca indicando a presença do fármaco na matriz polimérica. Nenhum deslocamento na posição das bandas indica a ausência de interação entre o polímero e o fármaco. Este resultado indica que a incorporação da vancomicina na matriz polimérica não provoca alterações detectáveis na sua estrutura molecular, mas que pode ser identificada. Resultados semelhantes foram encontrados por Yousry et al., (2017), Yu et al., (2016) e Zhou et al., (2011).

#### **4.4.2 Liberação da Vancomicina**

A porcentagem de vancomicina liberada a partir dos *scaffolds* foi normalizada para a quantidade total de vancomicina incorporada nos compósitos. Os dados acumulados são apresentados na Figura 38.

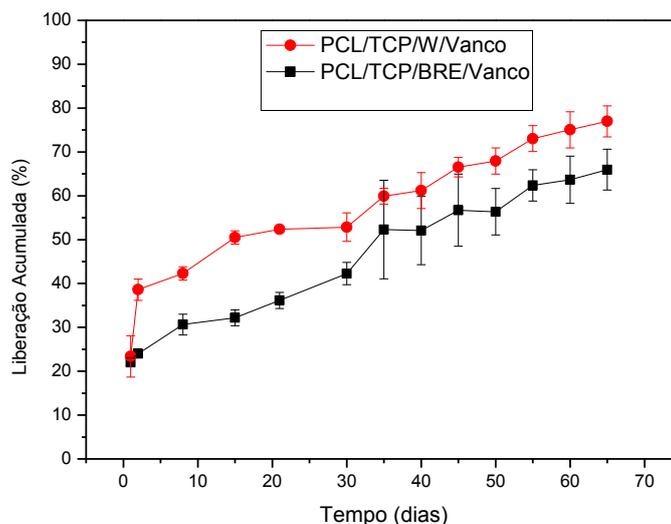


Figura 38 - Perfil de liberação da vancomicina a partir dos scaffolds PCL-BRE-Vanco e PCL-W-TCP-Vanco.

Observa-se que a liberação do fármaco se deu em duas fases, a primeira caracterizada por uma liberação explosiva seguida por uma liberação lenta e contínua. Durante as primeiras 24 h a liberação correspondeu a 22% e 23% de liberação para os *scaffolds* PCL/TCP/W/Vanco e PCL/TCP/BRE/Vanco, respectivamente. Esta liberação inicial explosiva pode estar correlacionado com a presença dos poros que facilitam a saída do fármaco da matriz polimérica para o exterior, além disso, também pode estar relacionada com a presença de fármaco na superfície do *scaffold* que proporciona este tipo de liberação (Upho et al., 2015; Zhou et al., 2011).

Após 65 dias de experimento, 77% e 66% da droga foi liberada dos *scaffolds* PCL/TCP/W/Vanco e PCL/TCP/BRE/Vanco, respectivamente. Esta segunda fase caracterizada pela liberação lenta e contínua, típica de compósitos com base em PCL, provavelmente, representa a dissolução da droga no interior da matriz polimérica e a difusão para o exterior da estrutura porosa. A análise por FTIR indica que a vancomicina não forma uma ligação forte com o polímero, como por exemplo uma ligação covalente, e portanto não dificulta a liberação da droga (Upho et al., 2015; Zhou et al., 2011).

Estudos afirmam que a presença da vancomicina reduz os esferulitos do polímero PCL, presumidamente, devido à forte interação entre eles e que este fato provoca a liberação lenta do fármaco a partir desta matriz polimérica. Além disso, o

PCL apresenta uma estrutura que criam uma espécie de labirinto, tornando a liberação da droga lenta (Makarov et al., 2014; Rai et al., 2016; Upho et al., 2015).

Este tipo de liberação é adequado para um sistema de liberação controlada de fármacos *in vivo*, pois promove uma maior permanência da droga no indivíduo.

Observa-se também que os scaffolds que continham wollastonita em sua composição apresentam uma quantidade maior de fármaco liberada no mesmo intervalo de tempo, isto pode ser explicado pois o scaffolds que continham wollastonita em sua composição continham um pouco mais de fármaco que aqueles obtidos com a bredigita.

#### 4.4.3 Cinética de Liberação

Para entender a cinética de liberação da vancomicina a partir dos *scaffolds* PCL/TCP/W/Vanco e PCL/TCP/BRE/Vanco, quatro diferentes modelos cinéticos (ordem zero, de primeira ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas modelos) foram estudados.

A Tabela 21 evidencia os valores dos parâmetros mais utilizados para identificar o modelos de liberação, são eles: Coeficiente de Correlação Linear ( $r^2$ ), critério de Informação de Akaike (AIC) e Critério de Seleção de Modelos (MSC). Para fins de comparação e de determinação do melhor modelo, o  $r^2$  e o MSC devem apresentar o maior valor, já o AIC deve apresentar valor mais baixo (Zhang et al., 2010).

Tabela 21 - Cinética de liberação da Vancomicina a partir dos scaffolds PCL-TCP-W-VANCO e PCL-TCP-BRE-VANCO.

MODELO MATEMÁTICO	AMOSTRAS					
	PCL/TCP/W/Vanco			PCL/TCP/BRE/Vanco		
	$r^2$	MSC	AIC	$r^2$	MSC	AIC
<b>Ordem Zero</b>	0,97	3,43	58,62	0,98	3,97	50,97
<b>Primeira Ordem</b>	0,96	3,07	63,31	0,97	3,56	56,35
<b>Higuchi</b>	0,96	3,25	60,97	0,96	3,09	62,41
<b>Korsmeyer-Peppas</b>	0,87	1,89	78,57	0,88	1,89	77,97

Analisando os resultados evidenciados na Tabela 21 observa-se que ambos os *scaffolds* apresentaram uma cinética de liberação de ordem zero, este tipo de cinética é caracterizada pela dissolução do fármaco, neste caso, o dispositivo carreador da droga não desagrega e a liberação é lenta. Considera-se que uma mesma quantidade de fármaco é liberada por unidade de tempo, sendo assim, estes dispositivos tornam-se ideais para liberação de fármacos quando se deseja uma ação farmacológica prolongada e dose constante (Costa; Sousa Lobo, 2001).

#### 4.4.4 Atividade Antimicrobiana

A Figura 39 representa a análise macroscópica da atividade antimicrobiana da vancomicina frente à cepa *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923. A concentração de 100 µg/mL foi utilizada como controle.

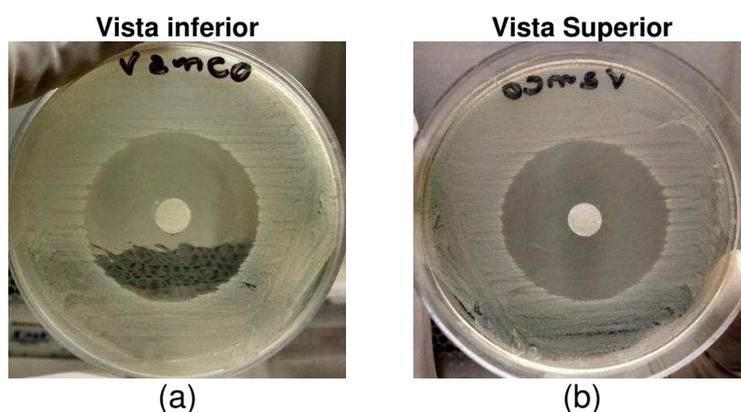


Figura 39 - Atividade antimicrobiana da vancomicina (100µg/mL) frente à cepa de *S. aureus* ATCC 25923.

Observa-se a formação do halo de inibição, conforme esperado, tanto em vista que já se é comprovado a ação antimicrobiana da vancomicina frente à cepa *S. aureus* (Cabrejos-Azama et al., 2016; Rybak, 2006).

A Figura 40 representa a análise macroscópica das placas de petri com os *scaffolds* PCL-TCP-W, PCL-TPC-BRE, PCL-TCP-W-Vanco e PCL-TPC-BRE-Vanco, inoculados com a cepa *S. aureus* ATCC 25923.

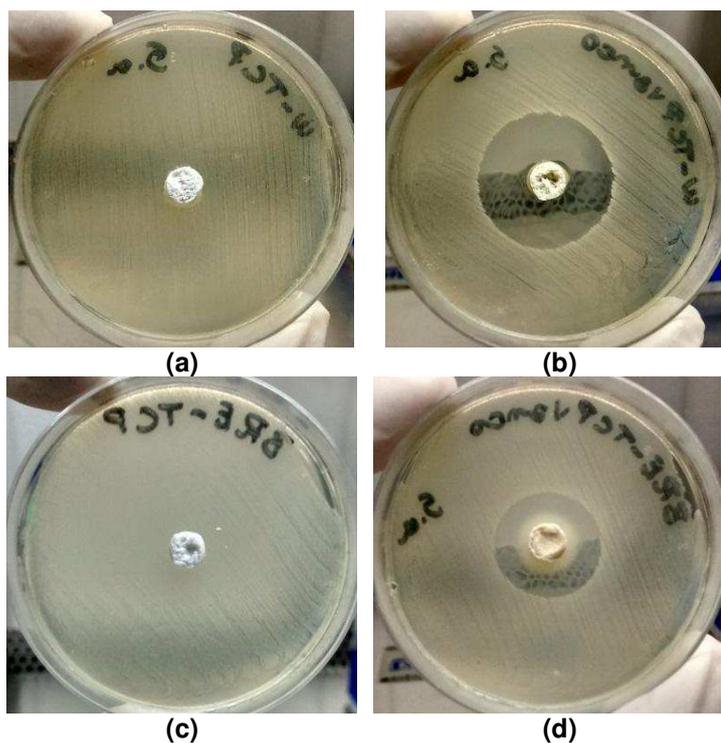


Figura 40 - Atividade antimicrobiana dos *scaffolds* frente à cepa de *S. aureus* ATCC 25923: (a) PCL-TCP-W; (b) PCL-TCP-W-Vanco; (c) PCL-TCP-BRE; (d) PCL-TCP-BRE-Vanco.

Observando as Figuras 42 (a), (b), (c) e (d) percebe-se que os *scaffolds* que continham vancomicina em sua composição apresentaram halos típicos de inibição produzidos pela liberação do antibiótico, já os *scaffolds* sem vancomicina não apresentaram atividade antimicrobiana, o que sugere que a atividade antimicrobiana dos *scaffolds* com fármaco é atribuída à vancomicina.

A Figura 41 representa o tamanho da zona de inibição, em milímetro (mm), produzida pela vancomicina (controle) e por esta liberada a partir dos *scaffolds*.

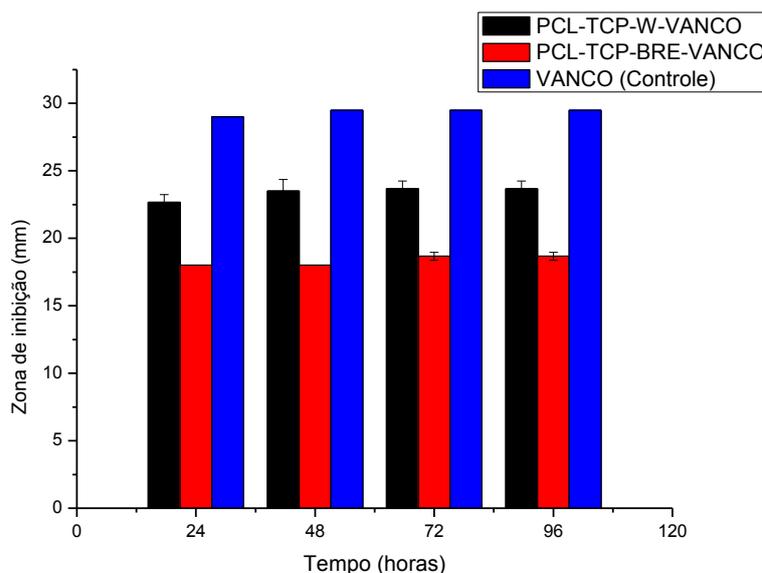


Figura 41 - Gráfico do tamanho (mm) da Zona de inibição produzida pela vancomicina (controle) e pelo antibiótico liberado a partir dos scaffolds.

Observa-se que em 24h de inoculação os *scaffolds* PCL-TCP-W- VANCO e PCL-TCP-BRE-VANCO, que apresentaram uma liberação de 22 e 23%, respectivamente, nesse intervalo de tempo, apresentaram halos com diâmetro de  $22,6 \pm 0,57$  e  $18 \pm 0,01$  mm, consideráveis para a inibição da *S. aureus* quando comparados com o controle, que apresentou halo de inibição de  $29 \pm 0,01$  mm. Ao final do experimento, após 96h de ensaio, esses scaffolds apresentaram diâmetro da zona de inibição de  $23,6 \pm 0,57$  mm (PCL-TCP-W- VANCO ) e  $18,6 \pm 0,28$  mm (PCL-TCP-BRE-VANCO), halos típicos de inibição da bactéria *S. aureus* (Lian et al., 2013).

Os *scaffolds* com wollastonita em sua composição apresentaram um halo maior que aqueles que continham a bredigita, avaliando o mesmo período de tempo, pois, como observado no teste de liberação, confirmando assim os resultado obtidos neste ensaio. A rápida eluição da droga proporciona uma alta concentração da droga no local e, conseqüentemente, uma maior erradicação do patógeno.

A dimensão da zona de inibição é proporcional, primeiramente, a taxa de difusão do fármaco através do compósito e em seguida do ágar. Além de estar diretamente ligado à capacidade antibacteriana do fármaco. Sendo assim, é possível estimar que ambas as composições dos *scaffolds* permitiu a liberação do fármaco em uma concentração eficaz para inibição do crescimento bacteriano.

#### 4.4.5 Biodegradação

Na Figura 42 observa-se a quantificação da degradação das biocerâmicas presentes nos *scaffolds* após incubação em solução tampão de Tris-HCl.

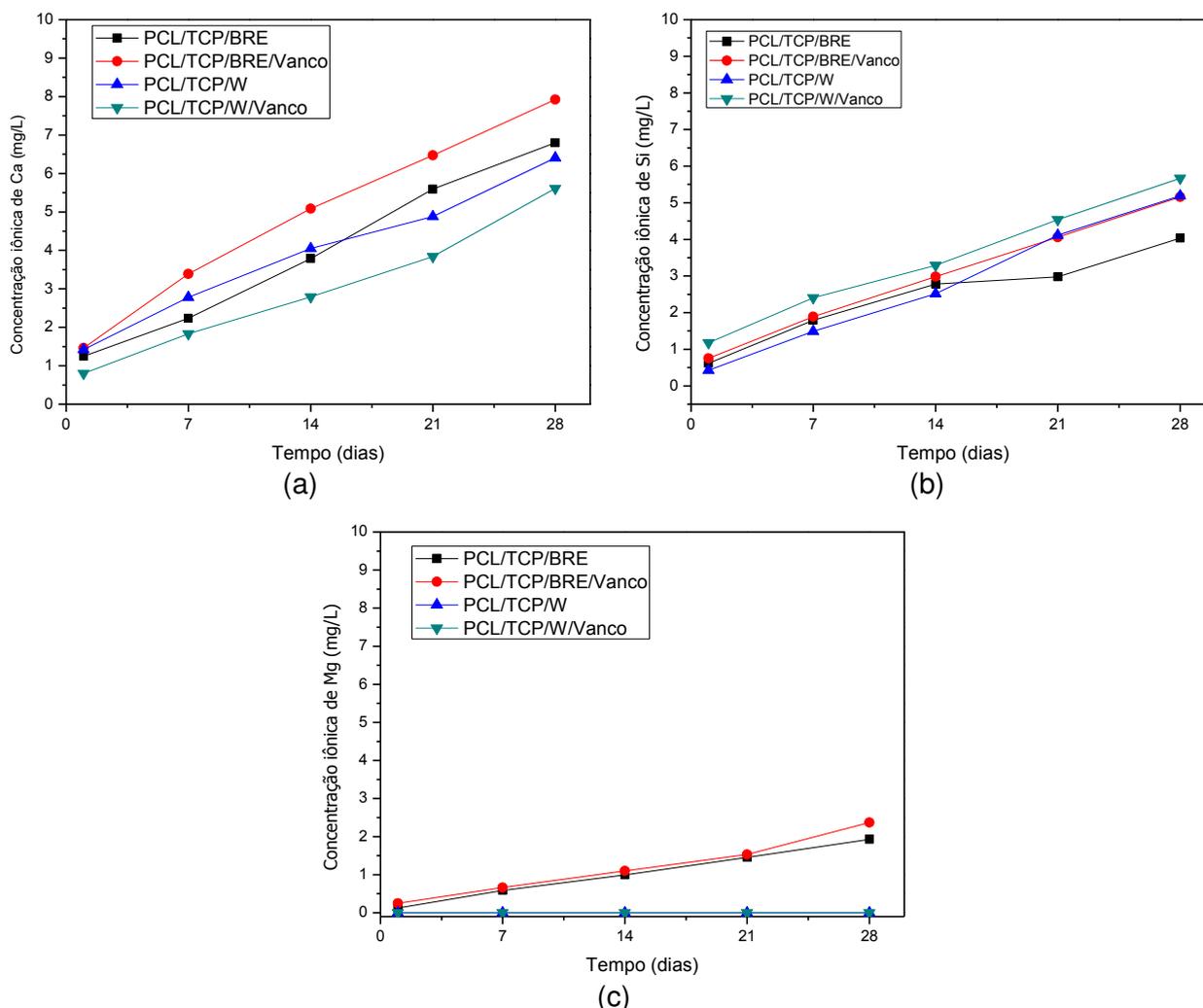


Figura 42 - Quantificação da degradação das biocerâmicas presentes nos *scaffolds* após incubação em solução tampão Tris-HCl: (a) concentração iônica de Ca (mg/L), (b) concentração iônica de Si (mg/L) e (c) concentração iônica de Mg (mg/L).

Ao analisar os resultados observa-se que todas as composições, PCL/TCP/BRE, PCL/TCP/BRE/Vanco, PCL/TCP/W e PCL/TCP/W/Vanco liberaram Ca (Figura 42 a) gradualmente durante todo o experimento. Observa-se também que as concentrações de Si (Figura 42 b) apresentam o mesmo comportamento dos íons de Ca, ou seja, aumentam com o tempo. As quantidades de Mg dissolvidas foram muito baixas quando comparadas as de Ca e Si, para os *scaffolds* que continham a bredigita ( $\text{Ca}_7\text{MgSi}_4\text{O}_{16}$ ) em sua composição, e, obviamente, foram nulas para aquelas que não continham o Mg em sua composição, naturalmente porque a bredigita contém muito

mais Ca e Si que Mg. Este comportamento de degradação está de acordo com estudos anteriores (Huang et al., 2017; Ni; Chang, 2009; Solonenko et al., 2018).

A concentração de íons de Ca é maior que a de íons de Si, estes dados são consistentes com a composição química das biocerâmicas, o mesmo ocorre com o Mg. A maior quantidade de Ca também é explicada pois ele é advindo tanto da wollastonita e da bredigita como do fosfato de cálcio. Além da composição química, o tipo de ligação dos íons também influenciam na degradação das biocerâmicas, o íons de Ca estão ligados aos tetraedros de sílica por ligações iônicas já os íons de Si formam uma ligação covalente com o O, sendo assim, como a ligação iônica é mais fraca que a ligação covalente os íons de Ca são dissolvidos mais rapidamente que os de Si (Huang et al., 2017).

Com relação ao Mg sugere-se, também, que este não foi facilmente removido da estrutura quando comparado ao Ca e ao Si pois a energia de ligação do Mg-O é maior que a da ligação Ca-O devido ao seu menor raio atômico (Huang et al., 2017; Rahmati et al., 2018).

Esses resultados mostram que os *scaffolds* que apresentavam a bredigita em sua composição são degradados mais rapidamente que aqueles que continham a wollastonita. Estudos mostram que a concentração de íons de Ca liberadas a partir de cerâmicas de silicato tricálcico ( $\text{Ca}_3\text{SiO}_5$ ) e bredigita ( $\text{Ca}_7\text{MgSi}_4\text{O}_{16}$ ) foram maiores em comparação a wollastonita ( $\text{CaSiO}_3$ ) e akremanita ( $\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$ ) (Ni; Chang, 2009; Wu; Chang, 2007).

A Figura 43 mostra as mudanças de pH da solução tampão Tris-HCl após 28 dias de imersão dos *scaffolds*.

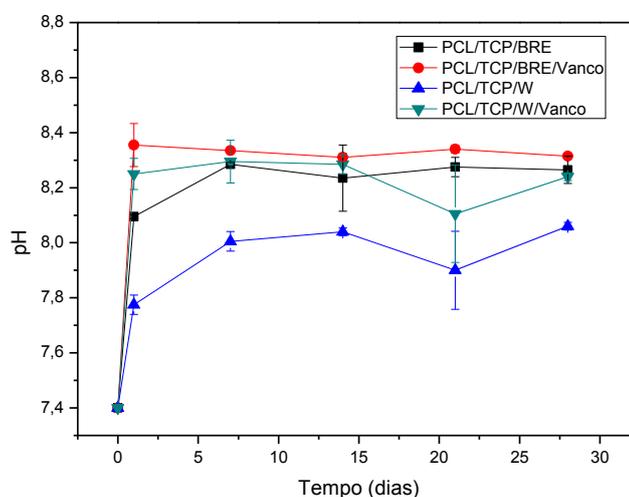


Figura 43- Mudanças de pH na solução tampão Tris-HCl após a imersão dos *scaffolds* por vários períodos de tempo.

Analisando a Figura 43 observa-se que o pH da solução tampão Tris-HCl aumentou após 1 dia de imersão e, com o aumentando do tempo de imersão para 28 dias, permaneceu quase inalterado, para todas as amostras. Este fato ocorre pois a troca iônica é tão elevada que excede o tamponamento da solução Tris-HCl. Neste caso, a alteração do pH foi maior para as amostras que continham a bredigita em sua composição e corrobora os dados observados na quantificação da liberação de íons, em que as amostras que continham essa biocerâmica apresentaram uma maior liberação do íon de Ca. O aumento de pH das soluções de imersão que continham a bredigita foram mais significativos devido ao maior consumo de íons  $H^+$  que resultou no aumento da dissolução dos íons Ca e Mg (Huang et al., 2017; Rahmati et al., 2018).

## 5 CONCLUSÕES

A partir dos objetivos propostos nesta pesquisa, conclui-se o método de evaporação de solvente foi efetivo e reprodutível na obtenção dos *scaffolds* compósitos de matriz polimérica baseada em PCL.

A incorporação de uma segunda fase percolada de NaCl e sua posterior lixiviação proporcionou a formação de estruturas tridimensionais porosas, com poros interconectados e na faixa de 100 a 500  $\mu\text{m}$ .

Os *scaffolds* apresentaram aceitável resistência à compressão (6-9  $\text{Kg}/\text{cm}^2$ ), para materiais com elevada porosidade.

O método de combustão de solução é viável, obtendo-se as fases cerâmicas de wollastonita, bredigita e beta fosfato tricálcico, com elevada superfície específica e estrutura submicrônica. Sem a necessidade de etapas posteriores de calcinação.

Os *scaffolds* compósitos apresentaram capacidade bioativa e biocompatível adequadas para aplicação como biomaterial.

Os ensaios de liberação do fármaco mostraram uma liberação lenta e uniforme da vancomicina durante 2 meses a partir dos compósitos PCL-W-TCP-Vanco e PCL-BRE-TCP-Vanco com a capacidade antibacteriana eficaz.

A degradação da biocerâmica bredigita contida nos *scaffolds* foi mais rápida que da biocerâmica wollastonita.

## 6 SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS

Para que os *scaffolds* desenvolvidos nesta tese possam vir a atender os requisitos necessários para a efetiva aplicação como biomaterial para regeneração do tecido ósseo, tem-se como perspectiva o aperfeiçoamento do material e do processo de produção no que diz respeito:

- Avaliar a influência de silicatos em diferentes níveis de oxidação do silício (Si);
- Avaliar a eficiência do processo de evaporação de solvente;
- Validação do método de liberação;
- Estudos *in vivo* com diferentes tempos de permanência do material no animal.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD RASHID, R.; SHAMSUDIN, R.; ABDUL HAMID, M. A.; JALAR, A. Low temperature production of wollastonite from limestone and silica sand through solid-state reaction. **Journal of Asian Ceramic Societies**, v. 2, n. 1, p. 77–81, 20 mar. 2014.

AGHAYAN, M. A.; RODRÍGUEZ, M. A. Influence of fuels and combustion aids on solution combustion synthesis of bi-phasic calcium phosphates (BCP). **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 8, p. 2464–2468, dez. 2012.

ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Drug delivery systems: entering the mainstream. **Science (New York, N.Y.)**, v. 303, n. 5665, p. 1818–1822, 2004.

ALTHOFF, J.; QUINT, P.; KREFTING, E.-R.; HOHLING, H. J. Morphological Studies on the Epiphyseal Growth Plate Combined with Biochemical and X-Ray Microprobe Analyses. **Histochemistry**, v. 74, p. 541–552, 1982.

ALVES, H. L. R. **Cimento ósseo de fosfato tricálcico: Síntese e influencia de aditivos na sua injetabilidade**. [s.l.: s.n.].

AMINI, A. R.; LAURENCIN, C. T.; NUKAVARAPU, S. P. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. **Critical Reviews™ in Biomedical Engineering**, v. 40, n. 5, p. 363–408, 2012.

BELLUCCI, D.; CANNILLO, V.; SOLA, A. Shell Scaffolds: A new approach towards high strength bioceramic scaffolds for bone regeneration. **Materials Letters**, v. 64, n. 2, p. 203–206, 2010.

BORENSTEIN, J. T. 2.15 - Tissue Engineering. **Comprehensive Microsystems**, p. 541–583, 2008.

BOSE, S.; VAHABZADEH, S.; BANDYOPADHYAY, A. **Bone tissue engineering using 3D printing** *Materials Today*, 2013.

BOYAN, B. D.; BAKER, M. I.; LEE, C. S. D.; RAINES, A. L.; GREENWALD, A. S.; OLIVARES-NAVARRETE, R.; SCHWARTZ, Z. **Bone Tissue Grafting and Tissue Engineering Concepts**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2011.

BRUSCHI, M. L. **Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems**. [s.l.] Elsevier, 2015.

CABREJOS-AZAMA, J.; ALKHRAISAT, M. H.; RUEDA, C.; TORRES, J.; PINTADO, C.; BLANCO, L.; LÓPEZ-CABARCOS, E. Magnesium substitution in brushite cements: Efficacy of a new biomaterial loaded with vancomycin for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections. **Materials Science and Engineering C**, v. 61, p. 72–78, 2016.

CAO, H.; KUBOYAMA, N. **A biodegradable porous composite scaffold of PGA/beta-TCP for bone tissue engineering**. *Bone*, 2010.

CARIDADE, S. G.; MERINO, E. G.; MARTINS, G. V.; LUZ, G. M.; ALVES, N. M.; MANO, J. F. Membranes of poly(dl-lactic acid)/Bioglass® with asymmetric bioactivity for biomedical applications. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 27, n. 5, p. 429–440, 2012.

CARRODEGUAS, R. G.; DE AZA, S.  $\alpha$ -Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 10, p. 3536–3546, out. 2011.

CHANG, H. M.; HUANG, C. C.; PARASURAMAN, V. R.; JHU, J. J.; TSAI, C. Y.; CHAO, H. Y.; LEE, Y. L.; TSAI, H. C. In vivo degradation of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) films in Gastro Intestinal (GI) tract. **Materials Today Communications**, v. 11, p. 18–25, 2017.

CHANG, H. M.; PRASANNAN, A.; TSAI, H. C.; JHU, J. J. Ex vivo evaluation of biodegradable poly( $\epsilon$ -caprolactone) films in digestive fluids. **Applied Surface Science**, v. 313, p. 828–833, 2014.

CHEN, D. R.; BEI, J. Z.; WANG, S. G. Polycaprolactone microparticles and their biodegradation. **Polymer Degradation and Stability**, v. 67, n. 3, p. 455–459, 2000.

CHO, S. J.; JUNG, S. M.; KANG, M.; SHIN, H. S.; YOUK, J. H. Preparation of hydrophilic PCL nanofiber scaffolds via electrospinning of PCL/PVP-b-PCL block copolymers for enhanced cell biocompatibility. **Polymer**, v. 69, p. 95–102, jul. 2015.

CHUENJITKUNTAWORN, B.; INRUNG, W.; DAMRONGSRI, D.; MEKAAPIRUK, K.; SUPAPHOL, P.; PAVASANT, P. Polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffolds: Preparation, characterization, and in vitro and in vivo biological responses of human primary bone cells. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 94, n. 1, p. 241–251, 2010.

CIAPETTI, G.; AMBROSIO, L.; SAVARINO, L.; GRANCHI, D.; CENNI, E.; BALDINI, N.; PAGANI, S.; GUIZZARDI, S.; CAUSA, F.; GIUNTI, A. **Osteoblast growth and function in porous poly  $\epsilon$ -caprolactone matrices for bone repair: A preliminary study** **Biomaterials**, 2003.

CORRELO, V. M.; BOESEL, L. F.; PINHO, E.; COSTA-PINTO, A. R.; ALVES DA SILVA, M. L.; BHATTACHARYA, M.; MANO, J. F.; NEVES, N. M.; REIS, R. L. Melt-based compression-molded scaffolds from chitosan-polyester blends and composites: Morphology and mechanical properties. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 91, n. 2, p. 489–504, 2009.

COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. **Modeling and comparison of dissolution profiles** **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2001.

CZECHOWSKA, J.; ZIMA, A.; PASZKIEWICZ, Z.; LIS, J.; ŚLÓWARCZYK, A. Physicochemical properties and biomimetic behaviour of  $\alpha$ -TCP-chitosan based materials. **Ceramics International**, v. 40, n. 4, p. 5523–5532, maio 2014.

DAWSON, J. I.; KANCZLER, J.; AARVOLD, A.; SMITH, J.; OREFFO, R. O. C. Tissue Engineering. In: **Comprehensive Biotechnology**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2011. v. 1p. 275–290.

DE AZA, A. H.; VELÁSQUEZ, P.; ALEMANY, M. I.; PENA, P.; DE AZA, P. N. In Situ

bone-like apatite formation from a bioeutectic® ceramic in SBF dynamic flow. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 90, n. 4, p. 1200–1207, 2007.

DE AZA, P. N.; GUITIÁN, F.; DE AZA, S. Bioactivity of wollastonite ceramics: In vitro evaluation. **Scripta Metallurgica et Materialia**, v. 31, n. 8, p. 1001–1005, out. 1994.

DE AZA, P. N.; GUITIÁN, F.; DE AZA, S. Bioeutectic: A new ceramic material for human bone replacement. **Biomaterials**, v. 18, n. 19, p. 1285–1291, 1997.

DE AZA, P. N.; GUITIÁN, F.; DE AZA, S. A new bioactive material which transforms in situ into hydroxyapatite. **Acta Materialia**, v. 46, n. 7, p. 2541–2549, 1998.

DE AZA, P. N.; LUKLINSKA, Z. B.; ANSEAU, M. R.; HECTOR, M.; GUITIÁN, F.; DE AZA, S. Reactivity of a wollastonite-tricalcium phosphate Bioeutectic® ceramic in human parotid saliva. **Biomaterials**, v. 21, n. 17, p. 1735–1741, 2000.

DEAN, J. A. **Lange's Handbook of Chemistry**. 15th. ed. [s.l: s.n.].

DEGANELLO, F.; TYAGI, A. K. **Solution combustion synthesis, energy and environment: Best parameters for better materials** *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 2018.

DENG, Y.; LIU, X.; XU, A.; WANG, L.; LUO, Z.; ZHENG, Y.; DENG, F.; WEI, J.; TANG, Z.; WEI, S. Effect of surface roughness on osteogenesis in vitro and osseointegration in vivo of carbon fiber-reinforced polyetheretherketone– Nanohydroxyapatite composite. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 1425–1447, 2015.

DESCAMPS, M.; HORNEZ, J. C.; LERICHE, A. Effects of powder stoichiometry on the sintering of  $\beta$ -tricalcium phosphate. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 27, n. 6, p. 2401–2406, 2007.

DIBA, M.; KHARAZIHA, M.; FATHI, M. H.; GHOLIPOURMALEKABADI, M.; SAMADIKUCHAKSARAEI, A. Preparation and characterization of polycaprolactone/forsterite nanocomposite porous scaffolds designed for bone tissue regeneration. **Composites Science and Technology**, v. 72, n. 6, p. 716–723, 2012.

DU, L.; YANG, S.; LI, W.; LI, H.; FENG, S.; ZENG, R.; YU, B.; XIAO, L.; NIE, H. Y.; TU, M. Scaffold composed of porous vancomycin-loaded poly(lactide-co-glycolide) microspheres: A controlled-release drug delivery system with shape-memory effect. **Materials Science and Engineering C**, v. 78, p. 1172–1178, 2017.

GHOSH, R.; SARKAR, R. Synthesis and characterization of sintered beta-tricalcium phosphate: A comparative study on the effect of preparation route. **Materials Science and Engineering C**, v. 67, p. 345–352, 2016.

GHOSH, S. K.; NANDI, S. K.; KUNDU, B.; DATTA, S.; DE, D. K.; ROY, S. K.; BASU, D. In vivo response of porous hydroxyapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate prepared by aqueous solution combustion method and comparison with bioglass scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 86, n. 1, p. 217–227, 2008.

GHOSH, S. K.; ROY, S. K.; KUNDU, B.; DATTA, S.; BASU, D. Synthesis of nano-sized

hydroxyapatite powders through solution combustion route under different reaction conditions. **Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology**, v. 176, n. 1, p. 14–21, 2011.

GIBSON, I. R.; REHMAN, I.; BEST, S. M.; BONFIELD, W. Characterization of the transformation from calcium-deficient apatite to  $\beta$ -tricalcium phosphate. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 11, n. 12, p. 799–804, 2000.

GONG, S.; WANG, H.; SUN, Q.; XUE, S. T.; WANG, J. Y. Mechanical properties and in vitro biocompatibility of porous zein scaffolds. **Biomaterials**, v. 27, n. 20, p. 3793–3799, 2006.

GONZÁLEZ-CORTÉS, S. L.; IMBERT, F. E. Fundamentals, properties and applications of solid catalysts prepared by solution combustion synthesis (SCS). **Applied Catalysis A: General**, v. 452, p. 117–131, fev. 2013.

GOSWAMI, J.; BHATNAGAR, N.; MOHANTY, S.; GHOSH, A. K. Processing and characterization of poly(lactic acid) based bioactive composites for biomedical scaffold application. **Express Polymer Letters**, v. 7, n. 9, p. 767–777, 2013.

GUO, H.; SU, J.; WEI, J.; KONG, H.; LIU, C. Biocompatibility and osteogenicity of degradable Ca-deficient hydroxyapatite scaffolds from calcium phosphate cement for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 1, p. 268–278, 2009.

HENCH, L. L.; JONES, J. R. Clinical applications of tissue engineering. In: **Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering**. [s.l.: s.n.]. p. 241–248.

HENKEL, J.; WOODRUFF, M. A.; EPARI, D. R.; STECK, R.; GLATT, V.; DICKINSON, I. C.; CHOONG, P. F. M.; SCHUETZ, M. A.; HUTMACHER, D. W. Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions — A 21st Century Perspective. **Bone Research**, v. 1, n. 3, p. 216–248, 2013.

HUANG, M.; ZHANG, M.; YAO, D.; CHEN, X.; PU, X.; LIAO, X.; HUANG, Z.; YIN, G. Dissolution behavior of CaO-MgO-SiO<sub>2</sub>-based bioceramic powders in simulated physiological environments. **Ceramics International**, v. 43, n. 13, p. 9583–9592, 2017.

HUANG, W.; HILLERT, M.; WANG, X. Thermodynamic assessment of the CaO-MgO-SiO<sub>2</sub> system. **Metallurgical and Materials Transactions A**, v. 26, n. 9, p. 2293–2310, set. 1995.

HUANG, X.-H.; CHANG, J. Synthesis of nanocrystalline wollastonite powders by citrate–nitrate gel combustion method. **Materials Chemistry and Physics**, v. 115, n. 1, p. 1–4, maio 2009.

HUANG, X. H.; CHANG, J. Preparation of nanocrystalline bredigite powders with apatite-forming ability by a simple combustion method. **Materials Research Bulletin**, v. 43, n. 6, p. 1615–1620, 2008.

HUTMACHER, D.; WOODFIELD, T.; DALTON, P.; LEWIS, J. Scaffold design and fabrication. **Tissue Engineering**, p. 403–454, 2008.

ISO 23317: 2007. **Implants for surgery —In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials** Geneva International Organization for Standardization, 2007.

JIANG, W.; LI, L.; ZHANG, D.; HUANG, S.; JING, Z.; WU, Y.; ZHAO, Z.; ZHAO, L.; ZHOU, S. Incorporation of aligned PCL-PEG nanofibers into porous chitosan scaffolds improved the orientation of collagen fibers in regenerated periodontium. **Acta biomaterialia**, 15 jul. 2015.

KANKILIC, B.; BILGIC, E.; KORKUSUZ, P.; KORKUSUZ, F. **Vancomycin containing PLLA/TCP controls experimental osteomyelitis in vivo** *Journal of orthopaedic surgery and research*, 2014.

KIM, D. H.; KIM, K. L.; CHUN, H. H.; KIM, T. W.; PARK, H. C.; YOON, S. Y. In vitro biodegradable and mechanical performance of biphasic calcium phosphate porous scaffolds with unidirectional macro-pore structure. **Ceramics International**, v. 40, n. 6, p. 8293–8300, 2014.

KIM, H. W.; KNOWLES, J. C.; KIM, H. E. Hydroxyapatite/poly( $\epsilon$ -caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. **Biomaterials**, v. 25, n. 7–8, p. 1279–1287, 2004.

KOKUBO, T.; KUSHITANI, H.; OHTSUKI, C.; SAKKA, S.; YAMAMURO, T. Effects of ions dissolved from bioactive glass-ceramic on surface apatite formation. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 4, n. 1, p. 1–4, 1993.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. **How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?** *Biomaterials*, 2006.

KOPP ALVES, A.; BERGMANN, C. P.; BERUTTI, F. A. Combustion Synthesis. In: **Novel Synthesis and Characterization of Nanostructured Materials**. [s.l.: s.n.]. p. 92.

KOTHAPALLI, C. R.; SHAW, M. T.; WEI, M. Biodegradable HA-PLA 3-D porous scaffolds: Effect of nano-sized filler content on scaffold properties. **Acta Biomaterialia**, v. 1, n. 6, p. 653–662, 2005.

KOUHI, M.; SHAMANIAN, M.; FATHI, M.; SAMADIKUCHAKSARAEI, A.; MEHDIPOUR, A. Synthesis, Characterization, In Vitro Bioactivity and Biocompatibility Evaluation of Hydroxyapatite/Bredigite (Ca<sub>7</sub>MgSi<sub>4</sub>O<sub>16</sub>) Composite Nanoparticles. **Jom**, v. 68, n. 4, p. 1061–1070, 2016.

KREIDLER, E. R.; HUMMEL, F. A. Phase relationships in the system SrO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and the influence of water vapor on the formation of Sr<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>9</sub>. **Inorganic Chemistry**, v. 6, n. 5, p. 884–891, 1967.

KUNJALUKKAL PADMANABHAN, S.; GERVASO, F.; CARROZZO, M.; SCALERA, F.; SANNINO, A.; LICCIULLI, A. Wollastonite/hydroxyapatite scaffolds with improved mechanical, bioactive and biodegradable properties for bone tissue engineering. **Ceramics International**, v. 39, n. 1, p. 619–627, jan. 2013.

KWEON, H. Y.; YOO, M. K.; PARK, I. K.; KIM, T. H.; LEE, H. C.; LEE, H. S.; OH, J. S.;

AKAIKE, T.; CHO, C. S. A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, n. 5, p. 801–808, 2003.

LAKSHMI, R.; VELMURUGAN, V.; SASIKUMAR, S. Preparation and Phase Evolution of Wollastonite by Sol-Gel Combustion Method Using Sucrose as the Fuel. **Combustion Science and Technology**, v. 185, n. 12, p. 1777–1785, 2013.

LANGER, R.; VACANTI, J. Tissue engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920–926, 14 maio 1993.

LAVIK, E.; LANGER, R. Tissue engineering: current state and perspectives. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 65, n. 1, p. 1–8, 2004.

LIAN, X.; LIU, H.; WANG, X.; XU, S.; CUI, F.; BAI, X. Antibacterial and biocompatible properties of vancomycin-loaded nano-hydroxyapatite/collagen/poly (lactic acid) bone substitute. **Progress in Natural Science: Materials International**, v. 23, n. 6, p. 549–556, 2013.

LICHTE, P.; PAPE, H. C.; PUFE, T.; KOBBE, P.; FISCHER, H. Scaffolds for bone healing: Concepts, materials and evidence. **Injury**, v. 42, n. 6, p. 569–573, 2011.

LIU, W.; CAO, Y. **Tissue-Engineering Technology for Tissue Repair and Regeneration**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2011. v. 1

MAGALLANES-PERDOMO, M.; DE AZA, A. H.; MATEUS, A. Y.; TEIXEIRA, S.; MONTEIRO, F. J.; DE AZA, S.; PENA, P. In vitro study of the proliferation and growth of human bone marrow cells on apatite-wollastonite-2M glass ceramics. **Acta biomaterialia**, v. 6, n. 6, p. 2254–63, jun. 2010.

MAKAROV, C.; COHEN, V.; RAZ-PASTEUR, A.; GOTMAN, I. In vitro elution of vancomycin from biodegradable osteoconductive calcium phosphate-polycaprolactone composite beads for treatment of osteomyelitis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, p. 49–56, 2014.

MANJUBALA, I.; SCHELER, S.; BOSSERT, J.; JANDT, K. D. Mineralisation of chitosan scaffolds with nano-apatite formation by double diffusion technique. **Acta Biomaterialia**, v. 2, n. 1, p. 75–84, 2006.

MANOJ, M.; MANGALARAJ, D.; PONPANDIAN, N.; VISWANATHAN, C. Core-shell hydroxyapatite/Mg nanostructures: Surfactant free facile synthesis, characterization and their in vitro cell viability studies against leukaemia cancer cells (K562). **RSC Advances**, v. 5, n. 60, p. 48705–48711, 2015.

MANSUROV, Z. A.; MOFA, N. N.; SADYKOV, B. S.; SABAIEV, Z. Z.; BAKKARA, A. E. Mechanochemical Treatment, Structural Peculiarities, Properties, and Reactivity of SHS Systems Based on Natural Materials. 4. Production of SHS Ceramics Based on Mechanoactivated Materials. **Journal of Engineering Physics and Thermophysics**, v. 89, n. 1, p. 230–237, 18 jan. 2016.

MEHR, N. G.; LI, X.; CHEN, G.; FAVIS, B. D.; HOEMANN, C. D. Pore size and LbL chitosan coating influence mesenchymal stem cell in vitro fibrosis and biomineralization in 3D porous poly(epsilon-caprolactone) scaffolds. **Journal of**

**Biomedical Materials Research - Part A**, v. 103, n. 7, p. 2449–2459, 2015.

MEI, N.; CHEN, G.; ZHOU, P.; CHEN, X.; SHAO, Z.-Z.; PAN, L.-F.; WU, C.-G. Biocompatibility of Poly(epsilon-caprolactone) scaffold modified by chitosan--the fibroblasts proliferation in vitro. **Journal of biomaterials applications**, v. 19, n. 4, p. 323–339, 2005.

MORGAN, E. F.; BOUXSEIN, M. L. Chapter 2 – Biomechanics of Bone and Age-Related Fractures. In: **Principles of Bone Biology**. [s.l.: s.n.]. p. 29–51.

MORSI, K. The diversity of combustion synthesis processing: A review. **Journal of Materials Science**, v. 47, n. 1, p. 68–92, 2012.

MOSELEY, D.; GLASSER, F. P. IDENTITY, COMPOSITION AND STABILITY OF BREDIGITE AND PHASE T. **CEMENT and CONCRETE RESEARCH**, v. 11, p. 559–565, 1981.

MOURINO, V.; BOCCACCINI, A. R. Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 7, n. 43, p. 209–227, 2010.

MOURIÑO, V.; CATTALINI, J. P.; ROETHER, J. A.; DUBEY, P.; ROY, I.; BOCCACCINI, A. R. Composite polymer-bioceramic scaffolds with drug delivery capability for bone tissue engineering. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 10, p. 1353–1365, 1 out. 2013.

MUKASYAN, A. S.; EPSTEIN, P.; DINKA, P. Solution combustion synthesis of nanomaterials. **Proceedings of the Combustion Institute**, v. 31 II, p. 1789–1795, 2007.

MUKASYAN, A. S.; ROGACHEV, A. S.; ARUNA, S. T. Combustion synthesis in nanostructured reactive systems. **Advanced Powder Technology**, v. 26, n. 3, p. 954–976, 2015.

NAIR, A. K.; GAUTIERI, A.; CHANG, S.-W.; BUEHLER, M. J. Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone. **Nature Communications**, v. 4, p. 1724, 2013.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. **Biodegradable polymers as biomaterials** *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 2007.

NANDAKUMAR, A.; CRUZ, C.; MENTINK, A.; TAHMASEBI BIRGANI, Z.; MORONI, L.; VAN BLITTERSWIJK, C.; HABIBOVIC, P. Monolithic and assembled polymer-ceramic composites for bone regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 3, p. 5708–5717, 2013.

NANDI, S. K.; GHOSH, S. K.; KUNDU, B.; DE, D. K.; BASU, D. Evaluation of new porous  $\beta$ -tri-calcium phosphate ceramic as bone substitute in goat model. **Small Ruminant Research**, v. 75, n. 2, p. 144–153, 2008.

NAVARRO, M.; APARICIO, C.; CHARLES-HARRIS, M.; GINEBRA, M. P.; ENGEL, E.; PLANELL, J. A. Development of a biodegradable composite scaffold for bone tissue engineering: Physicochemical, topographical, mechanical, degradation, and biological

properties. **Advances in Polymer Science**, v. 200, n. 1, p. 209–231, 2006.

NERSISYAN, H. H.; LEE, J. H.; DING, J. R.; KIM, K. S.; MANUKYAN, K. V.; MUKASYAN, A. S. **Combustion synthesis of zero-, one-, two- and three-dimensional nanostructures: Current trends and future perspectives** *Progress in Energy and Combustion Science*, 2017.

NI, S.; CHANG, J. In vitro degradation, bioactivity, and cytocompatibility of calcium silicate, dimagnesium silicate, and tricalcium phosphate bioceramics. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 24, n. 2, p. 139–158, 2009.

PAPICH, M. G. Gabapentin. In: **Saunders Handbook of Veterinary Drugs**. 4. ed. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 349–350.

PATIL, K.; ARUNA, S. T.; EKAMBARAM, S. Combustion synthesis. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 2, n. 2, p. 158–165, 1997.

PATIL, K. C.; ARUNA, S. T.; MIMANI, T. Combustion synthesis: An update. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 6, n. 6, p. 507–512, 2002.

PATLOLLA, A.; COLLINS, G.; LIVINGSTON ARINZEH, T. Solvent-dependent properties of electrospun fibrous composites for bone tissue regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 1, p. 90–101, 2010.

PEÑA, J.; CORRALES, T.; IZQUIERDO-BARBA, I.; DOADRIO, A. L.; VALLET-REGÍ, M. Long term degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) films in biologically related fluids. **Polymer Degradation and Stability**, v. 91, n. 7, p. 1424–1432, 2006.

PEPPAS, N. A.; NARASIMHAN, B. Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 75–81, 2014.

PORTER, J. R.; RUCKH, T. T.; POPAT, K. C. Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 6, p. 1539–1560, 1 nov. 2009.

RAHMATI, M.; FATHI, M.; AHMADIAN, M. Preparation and structural characterization of bioactive bredigite ( $\text{Ca}_7\text{MgSi}_4\text{O}_{16}$ ) nanopowder. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 732, p. 9–15, jan. 2018.

RAI, A.; SENAPATI, S.; SARAF, S. K.; MAITI, P. Biodegradable poly( $\epsilon$ -caprolactone) as a controlled drug delivery vehicle of vancomycin for the treatment of MRSA infection. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, n. 30, 2016.

RAI, B.; TEOH, S. H.; HO, K. H. An in vitro evaluation of PCL-TCP composites as delivery systems for platelet-rich plasma. **Journal of Controlled Release**, v. 107, n. 2, p. 330–342, 2005.

RALSTON, S. H. Bone structure and metabolism. **Medicine**, v. 45, n. 9, p. 560–564, set. 2017.

REZWAN, K.; CHEN, Q. Z.; BLAKER, J. J.; BOCCACCINI, A. R. Biodegradable and

bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 18, p. 3413–3431, 2006.

RHO, J. Y.; KUHN-SPEARING, L.; ZIOUPOS, P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. **Medical Engineering and Physics**, v. 20, n. 2, p. 92–102, 1998.

ROMAGNOLI, C.; D'ASTA, F.; BRANDI, M. L. Drug delivery using composite scaffolds in the context of bone tissue engineering. **Clinical cases in mineral and bone metabolism: the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases**, v. 10, n. 3, p. 155–161, 2013.

ROSETI, L.; PARISI, V.; PETRETTA, M.; CAVALLO, C.; DESANDO, G.; BARTOLOTTI, I.; GRIGOLO, B. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. **Materials Science and Engineering: C**, v. 78, p. 1246–1262, 2017.

RUSSIAS, J.; SAIZ, E.; NALLA, R. K.; GRYN, K.; RITCHIE, R. O.; TOMSIA, A. P. Fabrication and mechanical properties of PLA/HA composites: A study of in vitro degradation. **Materials Science and Engineering: C**, v. 26, n. 8, p. 1289–1295, 2006.

RYBAK, M. J. The Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Vancomycin. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. Supplement 1, p. S35–S39, 2006.

SABIR, M. I.; XU, X.; LI, L. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. **Journal of Materials Science**, v. 44, n. 21, p. 5713–5724, 2009.

SAMPAIO, G. Y. H. **PRODUÇÃO DE MATRIZES TRIDIMENSIONAIS POROSAS DE POLICAPROLACTONA-NANOHIPOXIAPATITA**. [s.l.] Universidade Federal de Campina Grande, 2016.

SAVARINO, L.; BALDINI, N.; GRECO, M.; CAPITANI, O.; PINNA, S.; VALENTINI, S.; LOMBARDO, B.; ESPOSITO, M. T.; PASTORE, L.; AMBROSIO, L.; BATTISTA, S.; CAUSA, F.; ZEPPELELLI, S.; GUARINO, V.; NETTI, P. A. The performance of poly- $\epsilon$ -caprolactone scaffolds in a rabbit femur model with and without autologous stromal cells and BMP4. **Biomaterials**, v. 28, n. 20, p. 3101–3109, 2007.

SEEMAN, E. Chapter 1 - Modeling and Remodeling: The Cellular Machinery Responsible for the Gain and Loss of Bone's Material and Structural Strength A2 - Bilezikian, John P. In: RAISZ, L. G.; MARTIN, T. J. B. T.-P. OF B. B. (THIRD E. (Eds.). **Principles of Bone Biology**. San Diego: Academic Press, 2008. p. 1–28.

SHOR, L.; GÜÇERİ, S.; WEN, X.; GANDHI, M.; SUN, W. Fabrication of three-dimensional polycaprolactone/hydroxyapatite tissue scaffolds and osteoblast-scaffold interactions in vitro. **Biomaterials**, v. 28, n. 35, p. 5291–5297, 2007.

SOLOMONENKO, A. P.; BLESMAN, A. I.; POLONYANKIN, D. A. Preparation and in vitro apatite-forming ability of hydroxyapatite and  $\beta$ -wollastonite composite materials. **Ceramics International**, 30 jun. 2018.

SREEKANTH CHAKRADHAR, R. P.; NAGABHUSHANA, B. M.; CHANDRAPPA, G.

T.; RAMESH, K. P.; RAO, J. L. Solution combustion derived nanocrystalline macroporous wollastonite ceramics. **Materials Chemistry and Physics**, v. 95, n. 1, p. 169–175, jan. 2006.

STAMATIALIS, D. F.; PAPENBURG, B. J.; GIRONÉS, M.; SAIFUL, S.; BETTAHALLI, S. N. M.; SCHMITMEIER, S.; WESSLING, M. **Medical applications of membranes: Drug delivery, artificial organs and tissue engineering** *Journal of Membrane Science*, 2008.

STOCK, U. A; VACANTI, J. P. TISSUE ENGINEERING : Current State and Prospects. **Annual Review of Medicine**, v. 52, n. 1, p. 443–451, 2001.

TAHERKHANI, S.; MOZTARZADEH, F. Fabrication of a poly( $\epsilon$ -caprolactone)/starch nanocomposite scaffold with a solvent-casting/salt-leaching technique for bone tissue engineering applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 23, p. n/a-n/a, 15 jun. 2016.

TANODEKAEW, S.; CHANNASANON, S.; KAEWKONG, P.; UPPANAN, P. PLA-HA scaffolds: Preparation and bioactivity. **Procedia Engineering**, v. 59, p. 144–149, 2013.

TAVAKOLI-DARESTANI, R.; MANAFI-RASI, A.; KAMRANI-RAD, A. Dexamethasone-loaded hydroxyapatite enhances bone regeneration in rat calvarial defects. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 1, p. 423–428, 2014.

TAVANGARIAN, F.; EMADI, R. Mechanism of nanostructure bredigite formation by mechanical activation with thermal treatment. **Materials Letters**, v. 65, n. 15–16, p. 2354–2356, 2011.

THAVORNYUTIKARN, B.; CHANTARAPANICH, N.; SITTHISERIPRATIP, K.; THOUAS, G. A.; CHEN, Q. **Bone tissue engineering scaffolding: computer-aided scaffolding techniques**. [s.l: s.n.]. v. 3

TORRES, P. M. C.; GOUVEIA, S.; OLHERO, S.; KAUSHAL, A.; FERREIRA, J. M. F. Injectability of calcium phosphate pastes: Effects of particle size and state of aggregation of  $\beta$ -tricalcium phosphate powders. **Acta Biomaterialia**, v. 21, p. 204–216, 2015.

TÜRKKAN, S.; PAZARÇEVIREN, A. E.; KESKIN, D.; MACHIN, N. E.; DUYGULU, Ö.; TEZCANER, A. Nanosized CaP-silk fibroin-PCL-PEG-PCL/PCL based bilayer membranes for guided bone regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 80, p. 484–493, 2017.

UDDUTTULA, A.; KOPPALA, S.; SWAMIAPPAN, S. Sol-Gel Combustion Synthesis of Nanocrystalline Wollastonite by Using Glycine as a Fuel and Its in vitro Bioactivity Studies. **Transactions of the Indian Ceramic Society**, v. 72, n. 4, p. 257–260, dez. 2013.

UPHO, N.; TANGTRAKULWANICH, B.; PRIPATNANONT, P.; THITIWONGSAWET, P.; INGVIIYA, N. Development of Novel PHBV/PCL and BCP Composite for Musculoskeletal Infection: an In Vitro Vancomycin Release and Anti-MRSA Effect. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, v. 10, n. 3, p. 211–221, 2015.

VARMA, A.; MUKASYAN, A.; ROGACHEV, A.; MANUKYAN, K. V. Solution Combustion Synthesis of Nanoscale Materials. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 23, p. 14493–14586, 2016.

VERHEYEN, C. C.; DE WIJN, J. R.; VAN BLITTERSWIJK, C. A.; DE GROOT, K. Evaluation of hydroxylapatite/poly(L-lactide) composites: mechanical behavior. **Journal of biomedical materials research**, v. 26, n. 10, p. 1277–1296, 1992.

VERT, M. Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: Beliefs and facts. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 2, p. 437–446, 2009.

VO, T. N.; KASPER, F. K.; MIKOS, A. G. Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 12, p. 1292–1309, 2012.

VOLKMER, T. M.; LENGELER, F.; BARREIRO, O.; SOUSA, V. C.; DOS SANTOS, L. A. Novel method for the obtainment of nanostructured calcium phosphate cements: Synthesis, mechanical strength and cytotoxicity. **Powder Technology**, v. 235, p. 599–605, 2013.

WAHL, D. A.; CZERNUSZKA, J. T. **Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair** *European Cells and Materials*, 2006.

WANG, M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2133–2151, 2003.

WANG, Y.; LIU, L.; GUO, S. Characterization of biodegradable and cytocompatible nano-hydroxyapatite/polycaprolactone porous scaffolds in degradation in vitro. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 2, p. 207–213, 2010.

WANG, Y.; WANG, X.; LI, H.; XUE, D.; SHI, Z.; QI, Y.; MA, Q.; PAN, Z. Assessing the character of the rhBMP-2- and vancomycin-loaded calcium sulphate composites in vitro and in vivo. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 131, n. 7, p. 991–1001, 2011.

WEI, J.; CHEN, F.; SHIN, J. W.; HONG, H.; DAI, C.; SU, J.; LIU, C. Preparation and characterization of bioactive mesoporous wollastonite - Polycaprolactone composite scaffold. **Biomaterials**, v. 30, n. 6, p. 1080–1088, 2009a.

WEI, J.; HEO, S. J.; LIU, C.; KIM, D. H.; KIM, S. E.; HYUN, Y. T.; SHIN, J.-W.; SHIN, J.-W. Preparation and characterization of bioactive calcium silicate and poly(epsilon-caprolactone) nanocomposite for bone tissue regeneration. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 90, n. 3, p. 702–12, 2009b.

WEN, W.; WU, J.-M. Nanomaterials via solution combustion synthesis: a step nearer to controllability. **RSC Adv.**, v. 4, n. 101, p. 58090–58100, 2014.

WILTFANG, J.; MERTEN, H. A.; SCHLEGEL, K. A.; SCHULTZE-MOSGAU, S.; KLOSS, F. R.; RUPPRECHT, S.; KESSLER, P. Degradation characteristics of  $\alpha$  and  $\beta$  tri-calcium-phosphate (TCP) in minipigs. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 63, n. 2, p. 115–121, 2002.

WITTE, F.; ULRICH, H.; PALM, C.; WILLBOLD, E. Biodegradable magnesium scaffolds: Part II: Peri-implant bone remodeling. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 81, n. 3, p. 757–765, 2007.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 10, p. 1217–1256, out. 2010.

WU, C.; CHANG, J. Degradation, bioactivity, and cytocompatibility of diopside, akermanite, and bredigite ceramics. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 83, n. 1, p. 153–160, 2007.

WU, C.; CHANG, J.; ZHAI, W.; NI, S. A novel bioactive porous bredigite ( $\text{Ca}_7\text{MgSi}_4\text{O}_{16}$ ) scaffold with biomimetic apatite layer for bone tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 5, p. 857–864, 14 maio 2007.

WU, C. T.; CHANG, J. A.; WANG, J. Y.; NI, S. Y.; ZHAI, W. Y. Preparation and characteristics of a calcium magnesium silicate (bredigite) bioactive ceramic. **Biomaterials**, v. 26, n. 16, p. 2925–2931, 2005.

WU, F.; LIU, C.; O'NEILL, B.; WEI, J.; YUNG, N. Fabrication and properties of porous scaffold of magnesium phosphate/polycaprolactone biocomposite for bone tissue engineering. **Applied Surface Science**, v. 258, n. 19, p. 7589–7595, 2012.

WU, S.; LIU, X.; YEUNG, K. W. K.; LIU, C.; YANG, X. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 80, p. 1–36, 2014.

XU, L.; SUN, R.; ZHANG, L.-F.; YANG, D.-J.; TAN, Y.-F.; XIONG, C.-D. Studies on poly(D, L-lactic acid)/wollastonite composites as a biomaterial. **Iranian Polymer Journal (English Edition)**, v. 17, n. 6, p. 407–418, 2008.

YASHIMA, M.; SAKAI, A.; KAMIYAMA, T.; HOSHIKAWA, A. Crystal structure analysis of  $\beta$ -tricalcium phosphate  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  by neutron powder diffraction. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 175, n. 2, p. 272–277, 2003.

YEO, M.; JUNG, W.-K.; KIM, G. Fabrication, characterisation and biological activity of phlorotannin-conjugated PCL/beta-TCP composite scaffolds for bone tissue regeneration. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 8, p. 3568–3577, 2012.

YOUSRY, C.; ELKHESHEN, S. A.; EL-LAITHY, H. M.; ESSAM, T.; FAHMY, R. H. Studying the influence of formulation and process variables on Vancomycin-loaded polymeric nanoparticles as potential carrier for enhanced ophthalmic delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, p. 142–154, 2017.

YU, H.; JIA, Y.; YAO, C. An Investigation on the Structure-Activity Differences of Electrospun Polyester/Polycarbonate Nanofibers. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 7, p. 6837–6846, 2016.

YUAN, N.; REZZADEH, K. S.; LEE, J. C. Biomimetic Scaffolds for Osteogenesis. **Receptors & Clinical Investigation**, p. 1–6, 2015.

ZADPOOR, A. A. Bone tissue regeneration: the role of scaffold geometry. **Biomater. Sci.**, v. 3, n. 2, p. 231–245, 2015.

ZELTINGER, J.; SHERWOOD, J. K.; GRAHAM, D. A.; MÜELLER, R.; GRIFFITH, L. G. Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition. **Tissue engineering**, v. 7, n. 5, p. 557–72, 2001.

ZHANG, Y.; HUO, M.; ZHOU, J.; ZOU, A.; LI, W.; YAO, C.; XIE, S. DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. **The AAPS Journal**, v. 12, n. 3, p. 263–271, 2010.

ZHAO, X. Bioactive materials in drug delivery systems. **Bioactive Materials in Medicine: Design and Applications**, p. 247–265, 2011.

ZHAO, Y.; WONG, H. M.; WANG, W.; LI, P.; XU, Z.; CHONG, E. Y. W.; YAN, C. H.; YEUNG, K. W. K.; CHU, P. K. Cytocompatibility, osseointegration, and bioactivity of three-dimensional porous and nanostructured network on polyetheretherketone. **Biomaterials**, v. 34, n. 37, p. 9264–9277, 2013.

ZHOU, J.; FANG, T. L.; WEN, J.; SHAO, Z.; DONG, J. Silk coating on poly( $\epsilon$ -caprolactone) microspheres for the delayed release of vancomycin. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 2, p. 99–107, 2011.

ZHOU, X.; ZHANG, N.; MANKOCI, S.; SAHAI, N. **Silicates in orthopedics and bone tissue engineering materials** *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 2017.