

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

Dissertação de Mestrado

**Síntese e caracterização de *scaffolds* do compósito vidro bioativo/policaprolactona
obtidos por processo *freeze-casting***

Autor: Diogo Maia Moreira dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Henrique Martins Nunes

Coorientador: Prof. Dr. Manuel Houmard

Março/2019

Diogo Maia Moreira dos Santos

Síntese e caracterização de *scaffolds* do compósito vidro bioativo/policaprolactona obtidos por processo *freeze-casting*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas.

Área de Concentração: Biomateriais.

Orientador: Prof. Eduardo Henrique Martins Nunes

Coorientador: Prof. Manuel Houmard

Belo Horizonte
Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Engenharia
2019

S237s	<p>Santos, Diogo Maia Moreira dos. Síntese e caracterização de <i>scaffolds</i> do compósito vidro bioativo/policaprolactona obtidos por processo <i>freeze-casting</i> [recurso eletrônico] / Diogo Maia Moreira dos Santos. - 2019. 1 recurso online (xvi,106 f.: il., color.) : pdf.</p> <p>Orientador: Eduardo Henrique Martins Nunes. Coorientador: Manuel Houmard.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.</p> <p>Bibliografia: f. 93-106. Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.</p> <p>1. Materiais - Teses. 2. Ciência dos materiais - Teses. 3. Biomateriais - Teses. 4. Materiais compostos - Teses. I. Nunes, Eduardo Henrique Martins. II. Houmard, Manuel. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 620(043)</p>
-------	---

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu orientador e amigo Professor Eduardo, que me deu a oportunidade de trabalhar com ele durante esses anos de projeto de mestrado. Pessoa sem a qual nada disso seria possível, que me ensinou que não basta ter todo o conhecimento técnico para ser um bom pesquisador. Para tanto, é necessária muita humildade para poder crescer cada vez mais e quem sabe um dia entender os cinco pilares da engenharia...

Agradeço, de coração, à Professora Marivalda por me acolher durante o processo de seleção e posteriormente no seu laboratório. Me deixa muito feliz lembrar que você depositou confiança em mim e teve o carinho de me aconselhar durante todo o processo.

Ao professor Manuel, que entre muitos apontamentos minuciosos, me ajudou a engrandecer este trabalho. Sua experiência foi um norte e deu rápido andamento ao trabalho. Agradeço, também, por tornar o trabalho muito mais leve com o looping infinito da música da UEFA.

“O trabalho de pós-graduação é um trabalho solitário” (MARTINS, T. 2018)

Entendo quando essa autora me disse essa frase, parte deste trabalho só pode e deve ser feito por nós mesmos. Entretanto eu tenho muito a agradecer a todos do LabBio: Talita, Breno, Andreia, Sandhra, Layla, Priscilla, Ingrid, Agda e Cheisy, tem um pouco de vocês espalhado neste trabalho, assim como amostras desta última pessoa citada estão espalhadas no laboratório. De verdade, tenho muito a agradecer a todos vocês pela companhia, pelas valiosas dicas, e por todos os momentos de diversão dentro e fora da UFMG.

Agradeço aos meus amigos do peito, por me darem apoio integral desde quando nos entendemos por gente. Mateus, Thiago, Felipe, Victor&César, João Pedro, Lucas; todos vocês sempre foram, e sempre serão parte de mim e de tudo que eu faço. Aos meus amigos Rafael e Gustavo, que partilharam comigo um grande pedaço dessa caminhada e me ensinaram que eu posso ser hoje muito mais do que era ontem (ainda espero o meu diploma, talkey!?).

Agradeço o suporte financeiro da JHS Biomateriais, CAPES (PROEX) CNPq, FAPEMIG e PRPq-UFMG (05/2016). Agradeço também ao LAMPAC (Prof. Túlio Matencio, Welerson Lima e Renata Martins), ao INCT-Acqua (Ilda Batista) pelo grande apoio a este estudo. Cida que me ajudou diversas vezes e torceu pelo meu sucesso. Patrícia Azevedo, Samuel Lima e André, Leonardo Mayer e Prof. Dagoberto Brandão.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. ROTEIRO DA TESE	4
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS.....	6
2.1. OBJETIVO GERAL	6
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
CAPÍTULO 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1. TECIDO ÓSSEO.....	8
3.1.1. Modelos de reparaco óssea	10
3.2. VIDRO BIOATIVO.....	13
3.2.1. Métodos de produção.....	15
3.2.2. Bioatividade.....	17
3.3. POLICAPROLACTONA	18
3.3.1. Síntese	19
3.3.2. Propriedades Mecânicas e Químicas.....	19
3.3.3. Biocompatibilidade	21
3.4. COMPÓSITOS VB/PCL.....	23
3.5. PROCESSO FREEZE-CASTING	25
3.5.1. Efeito da velocidade de resfriamento	26
3.5.2. Efeito do solvente utilizado.....	27
3.5.3. Aditivos.....	30
CAPÍTULO 4. SÍNTESE DE VIDRO BIOATIVO 58S E SINTERIZACO	32

4.1. INTRODUÇÃO	32
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.2.1. Síntese de Vidro Bioativo 58S	32
4.2.2. Caracterizações	33
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.3.1. Caracterização Física das Partículas de VB	35
4.3.2. Efeito da Sinterização Sobre as Partículas de VB.....	37
4.3.3. Avaliação da bioatividade e biocompatibilidade antes e após sinterização	40
4.4. CONCLUSÃO	45
CAPÍTULO 5. FREEZE-CASTING E IMPREGNAÇÃO DE PCL POR SOLUÇÃO DE ACETONA	46
5.1. INTRODUÇÃO.....	46
5.2. MATERIAIS E MÉTODOS	46
5.2.1. Produção de <i>scaffolds</i> e impregnação de PCL por solução.....	46
5.2.2. Caracterizações	49
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.3.1. - Efeito da Carga de Sólidos.....	52
5.3.2. - Infiltração de PCL na Amostra VB20.....	56
5.3.3. - Ensaios de Biocompatibilidade e Bioatividade	60
5.4. CONCLUSÃO	65
CAPÍTULO 6. FREEZE-CASTING E IMPREGNAÇÃO DE PCL POR IMERSÃO EM POLÍMERO FUNDIDO	67
6.1. INTRODUÇÃO.....	67
6.2. MATERIAIS E MÉTODOS	67
6.2.1. Produção de <i>scaffolds</i> e impregnação de PCL em banho fundido.....	67

6.2.2. Caracterizações	68
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
6.3.1. Análise da Infiltração de PCL na Amostra VB20M	68
6.3.2. - Avaliação de Biocompatibilidade e Bioatividade	71
6.4. CONCLUSÃO	75
CAPÍTULO 7. PREPARAÇÃO DE SCAFFOLDS COMPÓSITOS SEM ETAPA DE SINTERIZAÇÃO	76
7.1. INTRODUÇÃO	76
7.2. MATERIAIS E MÉTODOS	76
7.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
7.3.1. - Avaliação de Biocompatibilidade e Bioatividade	81
7.4. CONCLUSÃO	84
CAPÍTULO 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
8.1. COMPARAÇÃO ENTRE AS ROTAS DESENVOLVIDAS	85
8.1.1. Propriedades Mecânicas	85
8.1.2. Tamanho e volume de poros	86
8.1.3. Biocompatibilidade	87
8.1.4. Bioatividade	89
8.2. CONCLUSÕES FINAIS	90
8.3. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	92
8.4. CONTRIBUIÇÕES PARA A LITERATURA	93
CAPÍTULO 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Fluxograma das etapas seguidas nesse projeto de pesquisa.....	5
Figura 3.1: Esquema representativo de matriz, canalículos e lamelas.	9
Figura 3.2: Representação da parede da diáfise de ossos longos..	10
Figura 3.3: Processo de ossificação intramembranoso.....	11
Figura 3.4: Processo de ossificação endocondral.....	12
Figura 3.5: Etapas da reparação óssea..	13
Figura 3.6: Processo de formação de VB pelo método sol-gel.	16
Figura 3.7: Formação de camada de HA após implante em tecido ósseo.	18
Figura 3.8: Reação de polimerização via radicais livres para obtenção do PCL.	19
Figura 3.9: Transesterificações pelo método “Ring opening” ou Abertura de anel.....	19
Figura 3.10: Comportamento mecânico de polímero semicristalino durante esforço de tração	20
Figura 3.11: Componentes do tecido ósseo em diferentes escalas evidenciando a comungação entre colágeno e HAC	24
Figura 3.12: Corte histológico de tecido conjuntivo com implantes de PLA e PLA/VB (indicado como PLA/G5).....	25
Figura 3.13: Esquema das etapas envolvidas no processo <i>freeze-casting</i>	26
Figura 3.14: Efeito da taxa de resfriamento sobre a estrutura de poros de material obtido por processo <i>freeze-casting</i>	27
Figura 3.15: Micrografias típicas de amostras preparadas via processo <i>freeze-casting</i>	28
Figura 3.16: Micrografias de MEV de <i>scaffolds</i> de alumina produzidos utilizando diferentes taxas de resfriamento e mistura de naftaleno e cânfora...29	29
Figura 3.17: Forças consideradas na Teoria DLVO.	30
Figura 3.18: Representação da estrutura do ácido cítrico.....	31
Figura 4.1: Processo de síntese sol-gel das partículas de VB.....	33
Figura 4.2: Distribuições de tamanho de partícula obtidas para o VB antes e após sua moagem.....	36

Figura 4.3: Isoterma de adsorção de N ₂ obtida para o VB após moagem.	37
Figura 4.4: Isoterma de adsorção de N ₂ obtida para o VB sinterizado a 1250 °C por 2 h.	37
Figura 4.5: Micrografias de MEV de partículas de VB antes	38
Figura 4.6: Padrões de DRX para amostras de VB sinterizadas e não sinterizadas.	39
Figura 4.7: Espectros de FTIR do VB antes e após sua sinterização.	40
Figura 4.8 Padrão de DRX do VB58S não sinterizado imerso em SBF	41
Figura 4.9 Espectros de FTIR do VB não sinterizado imerso em SBF	42
Figura 4.10 Padrão de DRX de amostras de VB58S sinterizadas e imersas em SBF.	43
Figura 4.11 Espectro de FTIR de VB58S sinterizado imerso em SBF	43
Figura 4.12 MEV de amostras sinterizadas e não sinterizadas, imersas em SBF.	44
Figura 5.1: Metodologia empregada na fabricação de <i>scaffolds</i> através da rota de infiltração da solução de PCL em acetona.	48
Figura 5.2: Porosidades total, aberta e fechada obtidas para <i>scaffolds</i> sinterizados a 1250 °C por 2 h.	52
Figura 5.3: Imagens de micro-CT obtidas para <i>scaffolds</i> preparados com diferentes teores de VB.	54
Figura 5.4: Distribuições de tamanho de poros estimadas por micro-CT para <i>scaffolds</i> preparados com diferentes cargas de VB.	54
Figura 5.5: Micrografias de MEV obtidas para <i>scaffolds</i> obtidos utilizando diferentes teores de VB.	55
Figura 5.6: Resistência à compressão em temperatura ambiente para <i>scaffolds</i> de VB obtidos com diferentes cargas de sólidos.	55
Figura 5.7: Influência do teor de PCL infiltrado sobre a porosidade dos <i>scaffolds</i> produzidos.	57
Figura 5.8: Micrografias de MEV da superfície de fratura de <i>scaffolds</i> de VB contendo diferentes teores de PCL.	57
Figura 5.9: Curvas tensão × deformação obtidas para <i>scaffolds</i> infiltrados com PCL.	58

Figura 5.10: Resistência à compressão calculada para os materiais cujas curvas tensão × deformação são apresentadas na Figura 5.19.....	59
Figura 5.11 – Imagem de <i>scaffolds</i> produzidos VB20-PCL12.....	60
Figura 5.12: Resultados obtidos a partir do ensaio LIVE/DEAD®.....	61
Figura 5.13: Resultados obtidos a partir do ensaio de viabilidade celular por MTT.....	62
Figura 5.14 Padrão de DRX de amostras de VB impregnadas.....	63
Figura 5.15 – Espectro de FTIR da amostra VB com infiltração de solução Acetona/PCL, imersa em SBF.....	64
Figura 5.16: Micrografias de MEV e espectros de EDS obtidos para VB20 e VB-PCL12 após 14 dias de imersão em SBF.....	65
Figura 6.1: Metodologia empregada na fabricação de <i>scaffolds</i> compósitos através da infiltração do VB em banho de PCL fundido.....	68
Figura 6.2 - Reconstrução da microtomografia da amostra VB20M evidenciando a espessa capa de polímero que se formou na superfície da amostra.....	69
Figura 6.3 - MEV da amostra de VB20M em diversas ampliações.....	70
Figura 6.4 - Resultado LIVE/DEAD e de MTT para as amostras VB20 e VB20-PCL12.....	72
Figura 6.5 – Padrão DRX de amostras de VB20M em SBF.....	73
Figura 6.6 – Espectro de amostras VB20M em SBF.....	74
Figura 6.7 - MEV das amostras VB20M após 14 dias de imersão em SBF.....	74
Figura 7.1: Esquema da metodologia utilizada na fabricação de <i>scaffolds</i> compósitos sem etapa de sinterização.....	77
Figura 7.2 – Fotografia da amostra VB10-PCL10 evidenciando sua ductilidade.....	78
Figura 7.3 Reconstrução da microtomografia da amostra VB10-PCL10.....	78
Figura 7.4 – MEV da região interna de uma amostra.....	79
Figura 7.5 Gráfico de tensão - deformação de uma das amostras de VB10-PCL10.....	80
Figura 7.6 - (a) Resultado LIVE/DEAD para VB20 e VB10-PCL10.....	81
Figura 7.7 Padrão de DRX de amostras VB10-PCL10.....	82

Figura 7.8 Espectro de FTIR de amostras VB10-PCL10	83
Figura 7.9 - MEV das amostras VB10-PCL10 após 14 dias de imersão em SBF com e sua análise de EDS	83
Figura 8.1 – Principais materiais utilizados na engenharia de tecidos, tecido ósseo e seus valores de resistência e módulo de Young	86
Figura 8.2 – Resultado de ensaio de MTT em células SAOS de forma comparativa entre todas as amostras deste trabalho.....	87
Figura 8.3 - Resultados obtidos a partir do ensaio LIVE/DEAD® ..	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Valores de tamanho de partícula inferidos para o VB antes e após sua moagem em moinho de bolas por até 12 h.	36
Tabela 5.1: Amostras obtidas pela rota de infiltração de solução acetona/PCL em <i>scaffolds</i> de VB sinterizados.	48
Tabela 8.1 – Propriedades mecânicas das amostras finais	85
Tabela 8.2 – Porosidades das amostras por método de Arquimedes e micro-CT	87

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

DMSO	Sulfóxido de dimetilo
DRX	Difração de raios X
EDS	Espectroscopia de raios X por dispersão em energia
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
HA	Hidroxiapatita
HAC	Hidroxiapatita carbonatada
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Micro-CT	Microtomografia de raios X
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium)
NBO	Oxigênio não ligante (non-binding Oxygen)
PBS	Tampão fosfato-salino
PCL	Policaprolactona
PGA	Poli ácido glicólico
PLA	Poli ácido láctico
PLGA	Poli ácido láctico glicólico
PTFE	Politetrafluoretileno ou Teflon®
PVA	Poli ácido vinílico
SAOS	Células de osteosarcoma humano imortalizadas
SBF	Fluido corporal simulado (<i>simulated body fluid</i>)
TCP	Fosfato tricálcico
TEOS	Tetraetilortossilicato
TEP	Trietilfosfato
T _g	Temperatura de transição vítrea
T _m	Temperatura de fusão
VB	Vidro bioativo
VERO	Células de rim de macaco verde (<i>verda reno</i>)

RESUMO

As propriedades mecânicas apresentadas pelo osso humano estão associadas, em grande parte, à combinação da hidroxiapatita carbonatada (componente rígido) e fibras colágenas (componente elástico). Dessa forma, um material projetado para desempenhar essas funções também deve possuir a mesma combinação de propriedades. Para tanto se utiliza elementos combinados como o vidro bioativo (VB) que possui módulo de Young e resistência à compressão da mesma ordem de grandeza que a hidroxiapatita (HA), e polímeros que possuem características semelhantes às aquelas exibidas pelas fibras colágenas. Entretanto, um fino controle da estrutura de poros desses materiais ainda é um fator limitante. Nesse contexto, o processo *freeze-casting* (moldagem por congelamento) surge como uma alternativa promissora para fabricação desses materiais, visto que se trata de método simples, barato e ambientalmente amigável. Esse trabalho envolve a obtenção de *scaffolds* compósitos de VB/PCL (policaprolactona) por processo *freeze-casting*. Foram testadas diferentes rotas para fabricação desses compósitos. Os materiais preparados foram caracterizados por técnicas como espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier, ensaios de adsorção de N₂, microscopia eletrônica de varredura, microtomografia de raios X, ensaios de Arquimedes e testes de compressão. A bioatividade dessas amostras foi avaliada por meio de ensaios de viabilidade celular com MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium], LIVE/DEAD[®]. Seu comportamento para formação de HA foi avaliado após imersão dos *scaffolds* em solução fisiológica simulada (SBF). Foi observado que a inserção de PCL na estrutura dos *scaffolds* de VB aumentou de maneira substancial a estabilidade mecânica desses materiais em termos de resistência à compressão e tenacidade. Testes biológicos demonstraram que *scaffolds* contendo PCL não interferem significativamente na formação de células de osteosarcoma humano imortalizadas (SAOS). Além disso, foi constatado o crescimento de camada de HA sobre a superfície desses materiais após imersão em SBF a partir do primeiro dia. Os resultados apresentados nesse estudo indicam que os materiais produzidos são candidatos promissores para aplicação em engenharia de tecidos ósseos.

PALAVRAS-CHAVE: biomateriais, materiais compósitos, vidro bioativo, policaprolactona, *freeze-casting*.

ABSTRACT

The mechanical properties presented by human bone are largely associated with the combination of carbonated hydroxyapatite (rigid component) and collagen fibers (elastic component). In this way, a material designed to perform these functions should also display the same combination of properties. Aiming to reach this behavior, in this work we used elements such as bioactive glass (BG) which has Young's modulus and compressive strength similar to that exhibited by hydroxyapatite, and polymers showing properties analogous to collagen fibers. However, fine control over the pore structure of these materials is not an easy task. In this context, the freeze-casting process emerges as a promising alternative for the manufacture of materials with hierarchical pore structures, because it is a simple, cheap and environmentally friendly method. In this work composite scaffolds of BG / PCL (polycaprolactone) were prepared by the freeze-casting process. Different routes for the manufacture of these composites were tested. The materials prepared were examined by Fourier transform infrared spectroscopy, He picnometry, N₂ adsorption, laser granulometry, scanning electron microscopy, X-ray microtomography, Archimedes test, and compression tests. The toxicity of these samples was evaluated by MTT [3- (4,5-dimethylthiazol-2yl) -2,5-diphenyltetrazolium)] and LIVE / DEAD® assays. Moreover, their biocompatibility was evaluated after soaking in Kokubo's simulated body fluid (SBF) at 37 °C for up to 14 days. It was observed that the incorporation of PCL into the BG scaffolds increased by up to 350% the mechanical stability of these materials in terms of compressive strength and fracture toughness. Biological tests have demonstrated that PCL-containing scaffolds did not significantly interfere in the formation of immortalized human osteosarcoma (SAOS) cells. Besides, the growth of the hydroxyapatite layer on the surface of these materials after immersion in SBF was observed in the first soaking day. The results presented in this study indicate that the materials produced are promising candidates for application in bone tissue engineering.

KEYWORDS: biomaterials, composite materials, bioactive glass, polycaprolactone, freeze-casting.

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

Desde os tempos mais primórdios, o homem vem utilizando materiais para substituir, reparar ou potencializar funções, tecidos ou órgãos de forma a aumentar a longevidade ou melhorar sua qualidade de vida. Por exemplo, existem evidências da utilização de próteses rudimentares desde o ano 600 a.C. em múmias. É bem estabelecido que com o aumento da longevidade da população, o desempenho da estrutura óssea decai devido ao aumento da desmineralização e porosidade dos ossos. A partir desse cenário surgem problemas associados a fraturas sofridas a partir de impactos que podem se tornar crônicos com a dificuldade de reparação. Isso torna fundamental a utilização de próteses e implantes para reparo das regiões danificadas. [1].

Em uma fase inicial, o uso de materiais para substituição e reparo de regiões danificadas no corpo humano não considerava o fator biocompatibilidade, priorizando somente sua função mecânica. Como resultado, haviam muitos problemas de ordem imunológica quando esses implantes eram utilizados. A partir de então, houve um maior cuidado a respeito da aceitação biológica de enxertos e implantes. Assim, a procura por melhores substitutos levou ao desenvolvimento de tecnologias sintéticas, que mimetizam estruturas orgânicas [2].

Nos últimos anos tem-se buscado uma boa relação entre as respostas biológicas do sistema orgânico hospedeiro e as funções estruturais desempenhadas pelos biomateriais nele contido. Dessa forma, o equilíbrio biocompatibilidade / biofuncionalidade é essencial para novas aplicações de materiais. O grande desafio é substituir por meio de dispositivos sintéticos os tecidos vivos cujas propriedades são resultado de milhões de anos de evolução. O controle da interface biomaterial-tecido vivo é muito importante, uma vez que existe uma grande diferença entre as propriedades físicas desses componentes. Como exemplo é possível citar a substituição de dentes em humanos; nessa situação tem-se um contato entre uma estrutura rígida que possui uma resistência à flexão da ordem de 100-140 MPa e um tecido gengival bastante macio [3].

Embora sejam grandes as dificuldades enfrentadas, as funções obtidas até então são diversas. Existem biomateriais protéticos que têm a função de substituir porções do corpo ou órgão. Existem também materiais com funções diagnósticas para a determinação de anomalias e terapêuticas para otimizar a cicatrização e o tratamento. Vale citar ainda aqueles com funções de armazenamento que apresentam uma liberação controlada de fármacos [4].

Dentre as grandes classes de materiais, próteses metálicas possuem em geral uma expressiva resistência mecânica, razão pela qual foram inicialmente utilizadas em substituição ao osso. Todavia, devido à sua elevada dureza, quando em contato com tecidos moles podem gerar esforços mecânicos que acarretam na lesão das células, além de induzir uma resposta imunológica intensa quando formam debris, fragmentos que se destacam do implante [5]. Materiais cerâmicos contornam esses problemas de biocompatibilidade, mas possuem resistência à tração inferior àquela exibida por metais. Considerando que sistemas humanos apresentam esforços mecânicos em diversas direções, a aplicação das cerâmicas se torna bastante limitada do ponto de vista mecânico [6].

Polímeros como o poliácido láctico (PLA), poliácido glicólico (PGA), poliácido láctico glicólico (PLGA), poliácido vinílico (PVA) e policaprolactona (PCL) têm se mostrado promissores para o desempenho de funções mecânicas devido à possibilidade de alteração de suas propriedades durante o processamento [7,8]. Assim como os materiais cerâmicos, vários polímeros possuem uma expressiva compatibilidade biológica [9]. Para promover uma sinergia entre seus componentes, materiais compósitos surgem como alternativa em aplicações biomédicas. Elementos de reparação óssea formulados a partir de cerâmicas bioativas e polímeros biodegradáveis, por exemplo, garantem boa osteointegração e resistência mecânica ao sistema que o contém [10].

As propriedades mecânicas apresentadas pelo osso estão associadas, em grande parte, à combinação da hidroxiapatita carbonatada (HAC – componente rígido) e fibras colágenas (componente elástico). Dessa forma, um material projetado para desempenhar funções similares também deve possuir a mesma combinação de propriedades e, para tanto, se

utiliza elementos combinados como o vidro bioativo (VB) e polímeros [3]. Uma das cerâmicas mais estudadas para aplicações biomédicas são os vidros ou vitrocerâmicas bioativas, que são capazes de interagir fortemente com tecidos vivos. Esses materiais são projetados para que existam reações controladas em sua superfície, o que garante uma significativa propriedade osteoindutora [3]. O vidro bioativo 58S com composição molar 60% SiO₂, 36% CaO e 4% P₂O₅, já possui rota de fabricação bem estabelecida e características como área superficial específica, biocompatibilidade e temperaturas de cristalização já determinadas, sendo portanto um forte candidato para preparação de compósito com aplicações para tecido ósseo [11]. Polímeros utilizados na área da saúde, mais especificamente em implantes, devem apresentar características como biocompatibilidade e bio-reabsorção. A policaprolactona (PCL) é bastante biodegradável e favorece um rápido crescimento celular [12]. Além disso, sua característica semicristalina e disponibilidade em diversos graus de pureza propiciam um controle sobre as propriedades mecânicas em processos de fabricação de compósitos.

Dentre os processos de fabricação de compósitos para terapias regenerativas utilizados nas últimas décadas, o método de *freeze-casting* se mostra bastante promissor por permitir um fino controle sobre a estrutura de poros dos materiais preparados. Essas são características essenciais para o sucesso de um implante ósseo. Além disso, se trata de método relativamente simples, barato e que gera poucos resíduos e impactos ambientais [13]. Na rota tradicional, esse processo se baseia na solidificação do solvente presente em uma suspensão e no aprisionamento das partículas entre os cristais formados. Em uma etapa posterior de sublimação o solvente é removido do sistema, dando origem a poros com grande ordenação [14]. O corpo verde obtido pode ser tratado termicamente de modo a adquirir maior resistência mecânica ou mesmo permitir a formação de novas fases [15]. Como a estrutura de poros obtida é uma réplica direta da estrutura do solvente solidificado, é possível modificar a morfologia dos poros formados alterando o solvente presente na suspensão cerâmica. Outro fator que possui grande influência sobre a porosidade dos materiais obtidos é a taxa de resfriamento da suspensão. É sabido que para elevadas taxas de resfriamento a nucleação dos cristais de solvente é favorecida frente o seu crescimento, originando materiais com uma estrutura desordenada de poros pequenos. Todavia, baixas taxas de resfriamento produzem amostras com grandes poros ordenados

[16]. Até onde sabemos, não existe nenhum relato na literatura de estudos envolvendo a obtenção de *scaffolds* VB/PCL pelo uso do processo *freeze-casting*. Isso reforça a originalidade e contribuição científica desse trabalho.

1.1. ROTEIRO DA DISSERTAÇÃO

Nesse trabalho foram produzidos *scaffolds* do compósito VB/PCL a partir do processo *freeze-casting*. As amostras de VB58S foram obtidas por meio do processo sol-gel, seguindo metodologia similar àquela descrita por Pereira *et al.* [17]. Os materiais obtidos foram mantidos em moinho de bolas por até 12 h para homogeneização de seu tamanho de partícula e a seguir, caracterizados por técnicas como difração de raios X (DRX), espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), granulometria a laser e ensaios de adsorção de N₂. Subsequentemente, *scaffolds* de VB/PCL foram preparados por três rotas:

- Na primeira delas, foram inicialmente preparados *scaffolds* de VB58S por *freeze-casting* empregando-se uma mistura hipoeutética de naftaleno (40 %p) – cânfora (60 %p). Após etapa de sinterização a 1250 °C, o PCL (Aldrich/97%/Mw = 80.000 g/mol) foi infiltrado nos materiais após sua dissolução prévia em acetona.

- Na segunda rota, após a sinterização do *scaffold* de VB58S, o PCL foi inserido após sua fusão ao ar a 220 °C.

- Na terceira rota, os elementos cerâmicos e poliméricos foram processados conjuntamente, utilizando canfeno como meio refrigerante e não havendo etapa de sinterização. Como será discutido ao longo do texto, a ausência de sinterização preveniu o colapso da estrutura de poros do VB58S, além da sua cristalização.

Por fim os materiais preparados foram examinados por ensaios de Arquimedes, microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) e microtomografia de raios X (micro-CT). A resistência à compressão uniaxial em temperatura ambiente desses *scaffolds* também foi avaliada, bem como sua

bioatividade por comportamento em solução fisiológica simulada (SBF) e biocompatibilidade por MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium)] e LIVE/DEAD®. A Figura 1.1 retrata de forma simplificada as etapas realizadas neste projeto. As amostras destacadas foram aquelas consideradas ideais para utilização nos experimentos e processos subsequentes.

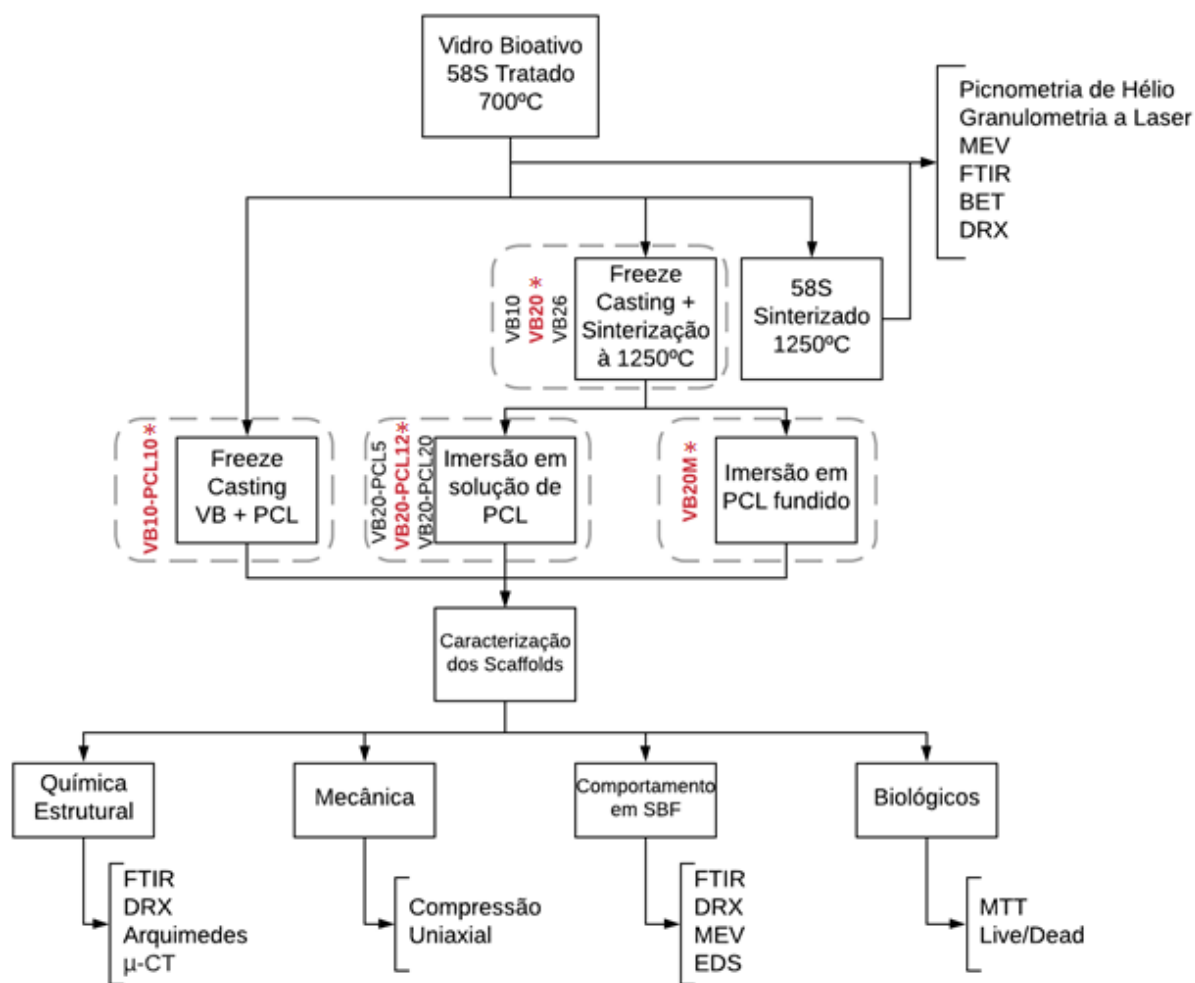


Figura 1.1 Fluxograma das etapas seguidas nesse projeto de pesquisa.

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Produzir *scaffolds* compósitos de VB/PCL com estrutura de poros controlada a partir do processo *freeze-casting*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar partículas mesoporosas de VB58S pelo método sol-gel.
- Caracterizar as partículas de VB58S preparadas por meio das técnicas como difração de raios X (DRX), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), granulometria a laser e ensaios de adsorção de N₂.
- Produzir *scaffolds* compósitos VB/PCL a partir do processo *freeze-casting*, utilizando canfeno ou mistura hipoeutética naftaleno-cânfora como meio refrigerante.
- Avaliar a estrutura de poros dos compósitos preparados por meio de técnicas como microscopia eletrônica de varredura (MEV), microtomografia de raios X (micro-CT) e ensaios de Arquimedes.
- Medir a resistência mecânica dos *scaffolds* produzidos à temperatura ambiente por ensaio de compressão uniaxial.
- Verificar a biocompatibilidade dos materiais produzidos por ensaios de LIVE/DEAD[®] e MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) utilizando células de osteosarcoma humano imortalizadas (SAOS).
- Verificar a bioatividade pela formação da camada de hidroxiapatita (HA) após imersão dos *scaffolds* em fluido corporal simulado (SBF).

- Comparar as diferentes estruturas obtidas no que tange suas potenciais aplicações.

CAPÍTULO 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. TECIDO ÓSSEO

O aumento da longevidade da população mundial, aliado a maiores taxas de obesidade e sedentarismo, faz com que o tecido ósseo sofra processos degenerativos ou traumas. Esse cenário faz com que intervenções médicas se tornem mais necessárias e recorrentes [1]. Especialistas afirmam que o número de fraturas e diagnósticos de doenças ósseas a cada ano deve ultrapassar 5 milhões até 2050 [18], de forma que esses quadros mobilizem ainda mais recursos econômicos em escala mundial.

Além do aumento na demanda, as terapias regenerativas que envolvem o uso de enxertos possuem outros desafios. Elas podem estar associadas ao volume de material disponível para autoenxertos (procedimento no qual o tecido provém do próprio paciente) e à relação oferta/procura em transplantes de indivíduos diferentes da mesma espécie no caso de aloenxertos. Quando esses enxertos ocorrem entre indivíduos de espécies diferentes (xenoenxertos), é imprescindível que haja compatibilidade mecânica e biológica entre eles [19]. Por essas razões, as pesquisas nas áreas de biomateriais e engenharia de tecidos atuam no aprimoramento das respostas biológicas sobre os implantes, garantindo assim uma terapia regenerativa de sucesso [20].

A atuação e o desempenho de biomateriais para implantes ósseos estão intimamente associados às características do esqueleto, que desempenha não somente funções de sustentação. O tecido ósseo é o principal constituinte do esqueleto e possui diversas funções como suporte para tecidos moles, proteção de órgãos vitais, preservação da medula produtora de células do sangue e atuação como sistema de alavancas juntamente com os músculos, garantindo assim o movimento do indivíduo. É responsável também pelo balanço de cálcio, fosfato e outros íons, além de absorver parte de toxinas e metais pesados, diminuindo seus efeitos no organismo [21]. O tecido ósseo é uma especialização do conjuntivo formado por células e matriz óssea, que ocupa o lugar do material extracelular aquoso encontrado em tecidos menos rígidos.

A matriz calcificada do osso não permite a difusão de substâncias como nos outros tecidos, sendo essa função realizada por canalículos presentes em lamelas, conforme exemplificado na Figura 3.1 [22]. Essas estruturas são preenchidas por projeções dos osteócitos (células confinadas em lacunas), que são células osteoblásticas que após secretarem a matriz orgânica, foram isoladas por mineralização. Principalmente devido a essa dificuldade no fluxo de nutrientes e ao fato que os fatores da matriz extracelular associados à proliferação celular aumentarem quando há maior contato entre as células, é desejável que biomateriais apresentem expressiva concentração e conectividade de poros [23]. Existem ainda células gigantes e multinucleadas denominadas osteoclastos que executam a reabsorção da matriz óssea, participando do processo de remodelação óssea [22].

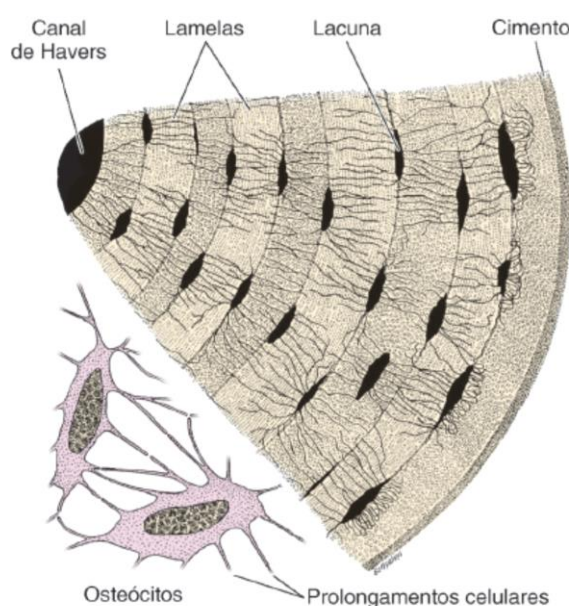


Figura 3.1: Esquema representativo de matriz, canalículos e lamelas. Fonte:[22].

A porção inorgânica da matriz possui grande fração de íons fosfato e cálcio que formam cristais que, segundo estudos baseados em ensaios de DRX, apresentam a estrutura da HAC ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Esses cristais são circundados por água na porção superficial, formando uma camada de hidratação que facilita a troca de íons entre o cristal e o líquido intersticial. A região orgânica é formada principalmente por colágeno tipo I, possuindo também uma pequena porção de proteoglicanos e glicoproteínas. É relatado que a

associação de fibras e os cristais de HAC garante rigidez e flexibilidade ao tecido ósseo [22,24].

Do ponto de vista histológico, os ossos podem ser divididos em imaturos (primários) ou maduros (secundários ou lamelares). Ambos possuem a mesma composição, mas o imaturo é o primeiro a surgir. Ele possui fibras colágenas sem orientação e com menor mineralização uma vez que está em processo de desenvolvimento, além de apresentar maior fração de osteócitos. Com a maturação do osso, o primário é substituído pelo secundário que é organizado em lamelas concêntricas devido à orientação das fibras (Figura 3.2) [22,25].

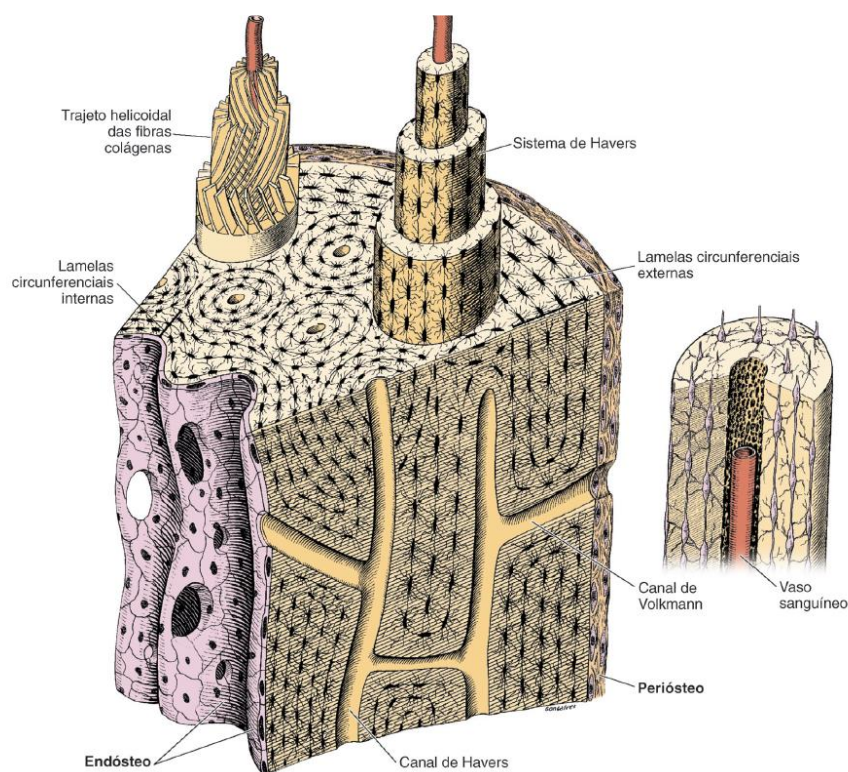


Figura 3.2: Representação da parede da diáfise de ossos longos. Fonte:[22].

3.1.1. MODELOS DE REPARAÇÃO ÓSSEA

Existem dois tipos de formação do tecido ósseo, denominados intramembranoso e endocondral. A ossificação intramembranosa se inicia nas membranas do tecido conjuntivo, onde células mesenquimais se diferenciam em osteoblastos e secretam a

matriz não mineralizada. Em seguida ocorre mineralização e o englobamento dos osteócitos em diversos pontos, garantindo um aspecto esponjoso ao osso. Esses locais de menor densidade são importantes para o crescimento de vasos sanguíneos que darão origem à medula. Esse processo está demonstrado na Figura 3.3.

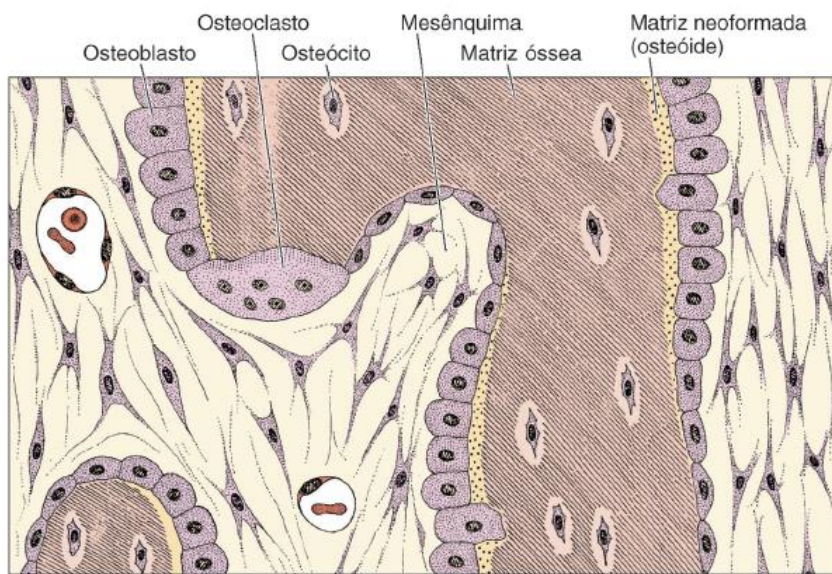


Figura 3.3: Processo de ossificação intramembranosa. Fonte:[22].

A ossificação endocondral ocorre a partir de um molde de cartilagem hialina com formato semelhante ao osso final, produzida pelos condrócitos. Essas células promovem a hipertrofia e a redução da matriz cartilaginosa, enquanto ocorre sua mineralização. Durante esse processo acontece a morte dessas células por apoptose. Em seguida as regiões onde haviam condrócitos são colonizadas por células osteogênicas e capilares sanguíneos, que depositam matriz óssea no restante de cartilagem. O processo de ossificação endocondral é demonstrado na Figura 3.4. À medida que o osso amadurece, assim como quando são danificados, surgem centros de ossificação primários e secundários. São regiões de sucessivos depósitos de matriz óssea, facilmente identificados em exames de imagem devido à mineralização diferenciada entre eles.

O crescimento e a reparação do osso ocorrem por absorção e deposição da matriz em diferentes velocidades e regiões, guiadas por fatores químicos e físicos. Esforços de compressão tendem a aumentar a atividade osteoclástica, decompondo a matriz. Em

contrapartida, esforços de tração promovem o crescimento por atividade osteoblástica. Como o osso é um órgão dinâmico que está em constante atividade, esses processos de deposição e absorção nunca cessam, mas apresentam alterações em suas velocidades. Isso faz com que muitas doenças possam surgir em decorrência dessa variação natural que pode ser estimulada pelas atividades e estilo de vida do indivíduo [26].

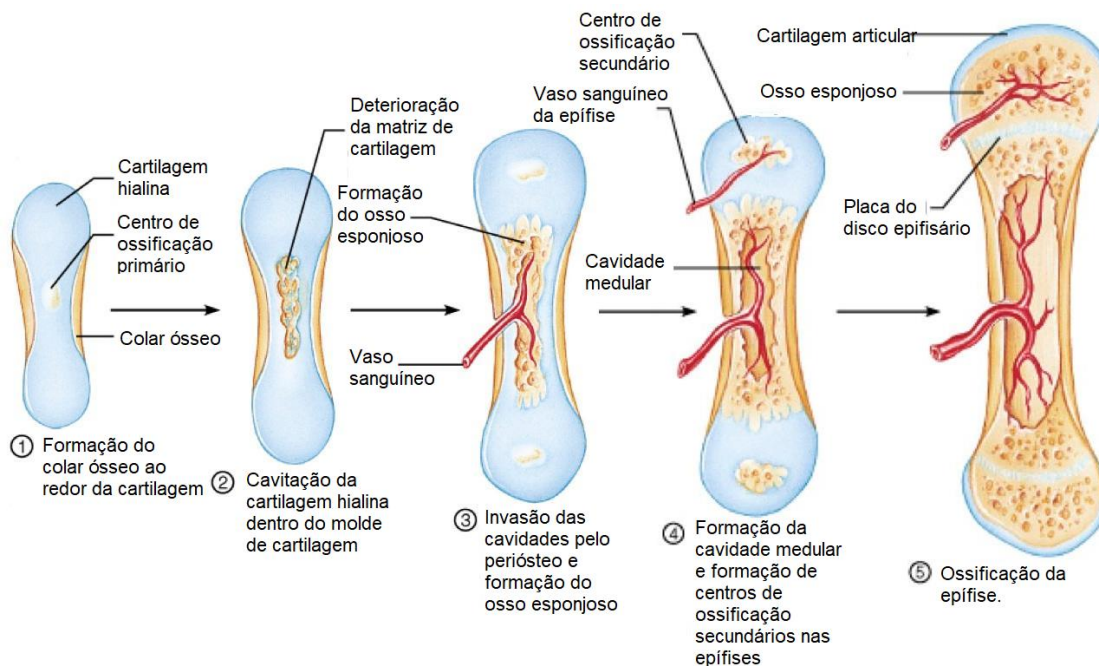


Figura 3.4: Processo de ossificação endocondral. Fonte: Adaptado [27].

Em casos de lesões com fratura óssea, os tecidos ósseos próximos a ela iniciam uma intensa proliferação a fim de gerar células osteoprogenitoras que penetram entre as extremidades rompidas. Nessa região ocorre tanto a ossificação endocondral quanto a intramembranosa, havendo reparação do osso e a formação de calo ósseo (Figura 3.5) [28]. O retorno às atividades normais gera esforços de compressão e tração devido ao movimento e tensões exercidas pelos músculos, o que gera o modelamento do calo formado. A deposição de matriz e mineralização formam o osso secundário.

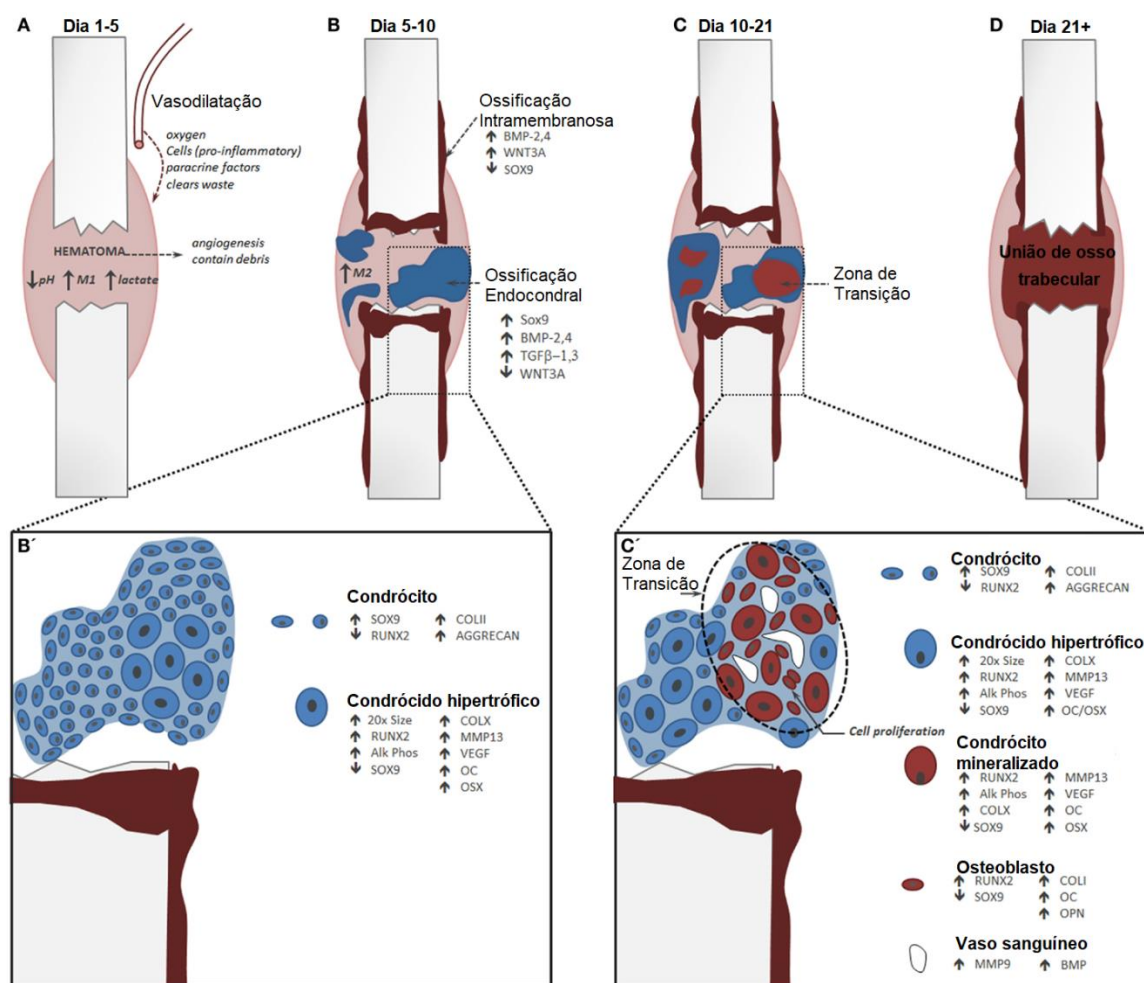


Figura 3.5: Etapas da reparação óssea. Fonte: Adaptado [29].

3.2. VIDRO BIOATIVO

Materiais cerâmicos pertencem a uma classe de materiais inorgânicos e não metálicos com ligações mistas iônicas-covalentes, como vidros e vitrocerâmicas. Devido ao carácter das ligações, geralmente exibem elevada dureza, alta temperatura de fusão e expressivas estabilidades mecânica e química [3]. Para a aplicação de materiais cerâmicos na área biomédica, há o requisito de alta pureza e controle granulométrico, usualmente obtidos a partir do beneficiamento das matérias-primas empregadas em sua produção [30]. Uma das cerâmicas mais estudadas para aplicações biomédicas são os vidros ou vitrocerâmicas bioativas, que são capazes de interagir fortemente com tecidos vivos. Esses materiais são projetados para que existam reações controladas em sua superfície, garantindo uma expressiva capacidade osteoindutora.

O VB foi inicialmente obtido por Hench e colaboradores no início da década de 1970 [31]. O material apresentava composição molar 45 % SiO₂, 24,5 % CaO, 6 % P₂O₅ e 24,5 % Na₂O. Nesse sistema o Na₂O atua como um óxido modificador de rede, promovendo a redução do ponto de fusão da mistura. Esse material, denominado vidro 45S foi patenteado como Bioglass[®], sendo considerado uma referência no campo dos biomateriais [32]. Na época do desenvolvimento do VB45S5 os pesquisadores observaram que esse material poderia permitir o desenvolvimento de ligações interfaciais entre o implante e os tecidos adjacentes. Desde então, o VB tem sido amplamente utilizado na reparação e regeneração de tecidos ósseos danificados [33,34].

Desde a descoberta do VB por Hench *et al.* [31], novas composições e processos de fabricação vêm sendo estudados para atender a demandas cada vez mais específicas. Dessa forma, variações de VB como o VB58S com composição molar 60% SiO₂, 36% CaO e 4% P₂O₅ e o VB77S com composição 80% SiO₂, 16% CaO, 4% P₂O₅ e muitos outros surgiram ao longo do tempo [35,36]. O expressivo teor de CaO no VB e sua razão CaO/P₂O₅ o tornam altamente reativo em meios aquosos, promovendo ligações estáveis com o osso e com o tecido cartilaginoso [37]. No início do período pós-implante e as reações superficiais rápidas *in vivo* levam a rápida dissolução iônica e à formação de camada de hidroxiapatita carbonatada (HAC). A liberação de íons solúveis de Si, Ca e P pode ativar a expressão gênica e estimular a proliferação de osteoblastos para rápida formação óssea [38].

Geralmente, vidros ricos em Na₂O como o vidro bioativo 45S5 possuem uma baixa temperatura de transição vítrea (T_g). Todavia, esses vidros são bastante propensos à cristalização durante o processamento térmico devido à janela estreita entre sua T_g e a temperatura de início de cristalização [39]. Os VB livres de Na₂O geralmente apresentam elevadas T_g, sendo que essa temperatura varia de acordo com o teor de silício nesses materiais. Por exemplo, o valor de T_g do vidro bioativo 58S sintetizado pelo método sol-gel convencional é de até 785 °C. É bem estabelecido que a cristalização do VB diminui sua bioatividade, uma vez que a mobilidade de íons e a reatividade do material ficam mais

limitadas [40,41]. No entanto, vários trabalhos relatam o uso de vitrocerâmicas para aplicações de suporte de carga em engenharia de tecidos ósseos [42–44].

Vidros com maiores teores de Si podem ser submetidos a tratamentos térmicos em temperaturas mais elevadas sem cristalizar totalmente do que aqueles que possuem óxidos modificadores. É bem estabelecido que a redução da relação área superficial/volume do material é a força motriz para a sinterização de materiais cerâmicos. De fato, a superfície de um material é considerada um defeito superficial, sendo uma região de alta energia. Dessa maneira, durante a sinterização ocorre a aproximação de partículas, levando à formação de pescoço entre elas e à contração volumétrica do material. Ao fim do processo há expressiva redução de sua área superficial específica, fazendo com que o sistema alcance uma condição de menor energia livre [45]. Essa redução da área superficial também acarreta na diminuição da bioatividade do vidro.

Recentemente muitos trabalhos vêm incorporando fármacos e íons como magnésio e cobalto em estruturas cerâmicas. O objetivo dessa proposta é a melhoria geral da bioatividade ou o tratamento específico de casos clínicos, seja prevenindo que o osso seja reabsorvido por atividade osteoclástica [46,47] ou favorecendo a formação de vasos sanguíneos [48,49].

3.2.1. MÉTODOS DE PRODUÇÃO

A fabricação de materiais cerâmicos pode envolver a fusão da mistura cerâmica inicial e a sua conformação viscosa. Ainda, pode-se modelar a peça por aplicação de pressão a um particulado, seguido de secagem e tratamento térmico para eliminação da porosidade residual. Por fim, pode haver a realização de uma etapa de acabamento superficial por processo mecânico ou químico [6]. Enquanto materiais obtidos por fusão geralmente apresentam estrutura amorfa, aqueles preparados por sinterização exibem estrutura cristalina.

A obtenção do VB segue diferentes metodologias, sendo possível preparar esse material a partir da rota convencional de fusão e têmpera. A rota tradicional de fusão ocorre pela

mistura dos óxidos SiO_2 , CaO e P_2O_5 em temperaturas superiores a $1300\text{ }^\circ\text{C}$ quando não são adicionados óxidos fundentes [50]. De forma geral, são obtidas partículas grosseiras com inclusões de impurezas. Outras metodologias podem ser utilizadas na fabricação de materiais vítreos, valendo destacar o processo sol-gel. Esse método se baseia na mistura de um precursor inorgânico com uma solução de um solvente, água e agente catalizador ácido ou básico. Ela se inicia com uma suspensão coloidal (sol), composta por partículas nanométricas dispersas em um meio líquido. Através da subsequente formação de ligações cruzadas, o sol fluido pode se transformar em um gel rígido [51,52]. Utilizando esse processo é possível obter materiais cerâmicos homogêneos e com um fino controle de propriedades como transparência óptica, porosidade e resistências térmica, química e mecânica [53]. A Figura 3.6 exibe esquema das etapas envolvidas na preparação de VB pelo método sol-gel.

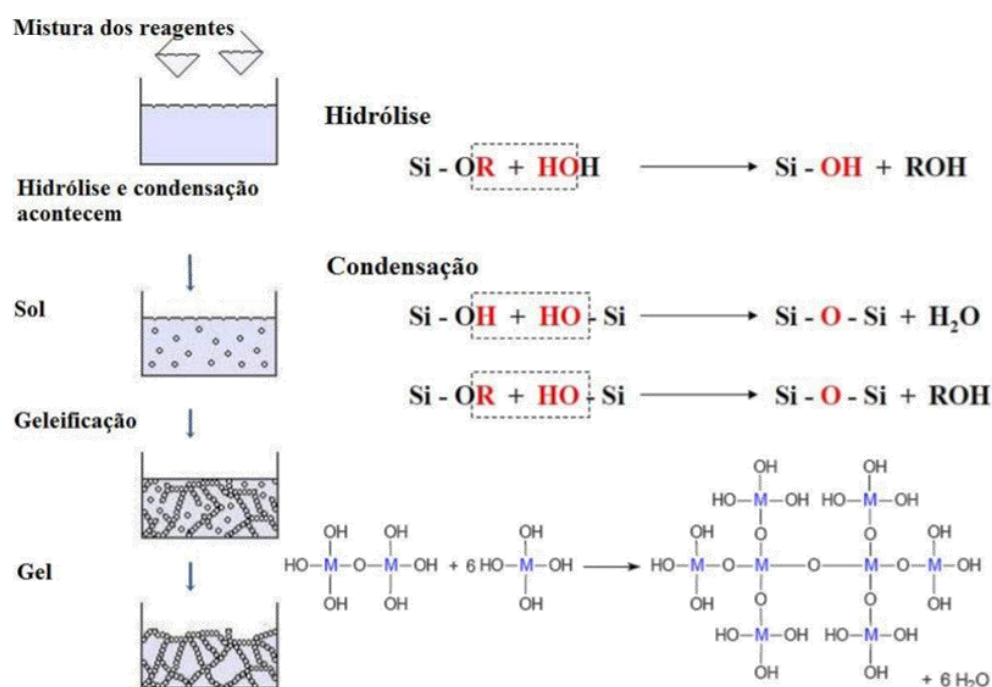


Figura 3.6: Processo de formação de VB pelo método sol-gel. Fonte adaptada: [52]

O método sol-gel já foi amplamente estudado para síntese de estruturas de vidros bioativos. Entretanto, o controle da estrutura de poros dos materiais preparados na escala dos macroporos (poros maiores que 50 nm) não é tão refinada quanto a observada em

outras técnicas. Neste trabalho, o compósito VB/PCL será obtido por meio do processo *freeze-casting* [54].

3.2.2. BIOATIVIDADE

Ao entrar em contato com fluidos corporais, uma série de reações químicas ocorre com o VB, desde o implante até a consolidação da sua interface. Inicialmente, há formação de grupos silanol (Si-OH). Essa etapa ocorre pela troca dos modificadores de rede do vidro com os íons H^+ do meio. Em seguida, a sílica da rede é perdida e transforma-se em sílica solúvel. Na sequência, ocorre a condensação e formação de uma nova camada de sílica pura que acarreta na migração de $(PO_4)_3^-$ e Ca^{2+} , uma vez que a concentração desses elementos é baixa na nova camada formada. Dessa forma o fosfato de cálcio é depositado na superfície e finaliza sua cinética química absorvendo íons $(CO_3)^{2-}$ e OH^- , dando origem a uma camada de HAC [43,55]. Essas etapas induzem diversos eventos celulares, a ação de macrófagos e a geração da matriz óssea cristalizada, culminando no crescimento do osso [3].

A Figura 3.7 exibe um corte de um implante de VB em tecido ósseo, no qual é observado da esquerda para a direita o VB, a camada rica em silício, a camada de HAC e o osso [17,30].

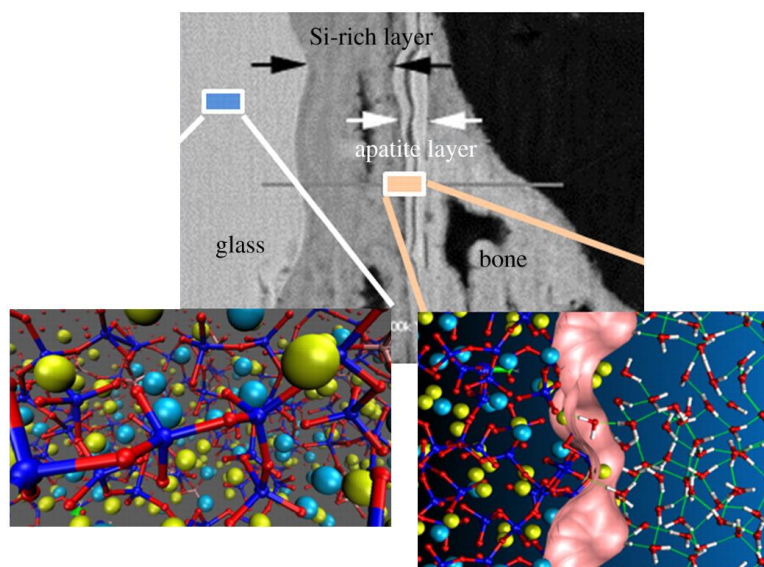


Figura 3.7: Estrutura uniforme que segrega e forma uma nova camada de HAC (em rosa) após implante em tecido ósseo. Fonte: Adaptado [30]

3.3. POLICAPROLACTONA (PCL)

Materiais poliméricos são macromoléculas carbônicas produzidas através da união de vários meros, formando longas cadeias de elevada massa molar. Propriedades como resistência mecânica, plasticidade e ponto de fusão dependem largamente do grau de polimerização do material produzido, da cristalinidade e interação entre cadeias adjacentes, possibilitando diversas aplicações [56]. Podendo ser de origem natural, como a quitosana, látex e algina ou sintéticos como o poliuretano (PU), polietileno (PE) e politereftalato de etileno (PET), polímeros de ambas as origens têm aplicações em engenharia de tecidos. Apesar de serem muito empregados, em alguns casos os polímeros naturais dão lugar aos sintéticos devido à sua variabilidade entre os lotes de produtos. Como sua produção depende de vários fatores, nem sempre a uniformidade necessária para desenvolvimento de pesquisas é mantida [7,57].

Materiais poliméricos vêm sendo cada vez mais empregados em sistemas biológicos devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade. Assim, a expectativa é que esses implantes possam ser inseridos no paciente sem a necessidade de outro procedimento cirúrgico para a retirada do material [58]. Além das propriedades citadas, é essencial que os polímeros utilizados apresentem superfície compatível com a adesão e proliferação

celular, e que suas propriedades mecânicas sejam adequadas ao sistema no qual será introduzido [59]. Dentre os polímeros aplicados nas áreas biomédicas, o PCL se destaca.

3.3.1. SÍNTESE

A síntese do PCL ocorre através da abertura do anel de polimerização da ϵ -caprolactona com auxílio de um catalizador como o octanato de estanho (Figura 3.8) [10]. A abertura do anel com a utilização de catalizadores metálicos ocorre com transesterificação inter- e intramolecular, conforme mostrado na Figura 3.9 [58].

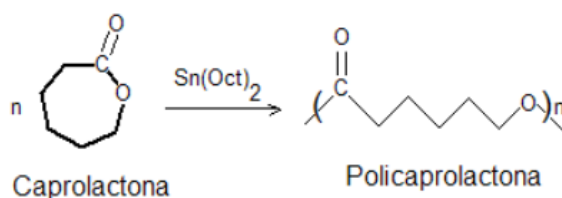


Figura 3.8: Reação de polimerização via radicais livres para obtenção do PCL.

Fonte adaptada: [58]

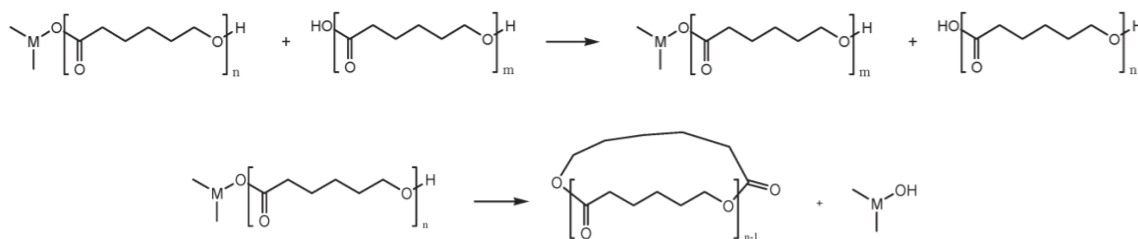


Figura 3.9: Transesterificações pelo método “Ring opening” ou Abertura de anel .

Fonte:[58]

3.3.2. PROPRIEDADES MECÂNICAS E QUÍMICAS

O PCL é um poliéster alifático composto por unidades de repetição de hexanoato, que apresenta baixa temperatura de fusão (entre 55 e 60 °C) e cristalinidade próxima a 50 % [60]. Essa característica semicristalina confere a esse polímero interessante comportamento mecânico, uma vez que possui maior resistência à tração em relação a muitos polímeros amorfos e maior ductilidade que muitos polímeros cristalinos. Na Figura 3.10 é exemplificado o processo de estiramento de polímero semicristalino e a influência da temperatura no seu comportamento mecânico. Inicialmente as cadeias da fase amorfa se alongam até que porções emaranhadas (*entanglements*) sejam estiradas. Somente após essa etapa a fase cristalina começa a sofrer efeito de tração [57,61]. Observa-se também que a elevação da temperatura pode aumentar o limite de ruptura do material de forma pronunciada, uma vez que pode levar o material a ultrapassar a temperatura de transição vítrea.

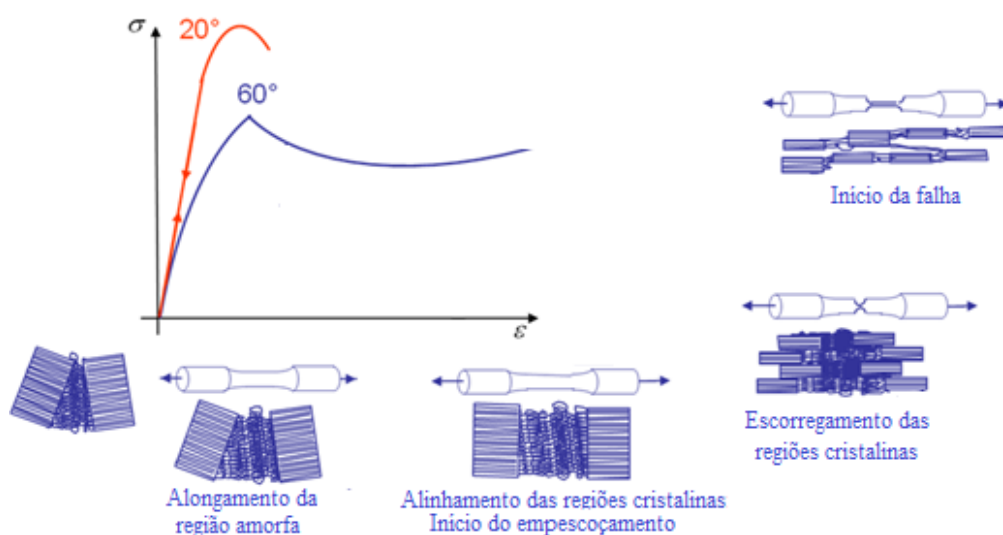


Figura 3.10: Comportamento mecânico de polímero semicristalino durante esforço de tração. Fonte adaptada [61].

A T_g é uma das propriedades mais relevantes na aplicação de polímeros, uma vez que várias características físico-químicas desses materiais estão associadas a ela. Para temperaturas abaixo da T_g , o polímero apresenta grande rigidez e dureza, dificultando seu processamento. Em temperaturas entre sua T_g e temperatura de fusão (T_m), o polímero apresenta aspecto borrachoso. Para temperaturas acima da T_m , o material se comporta como um fluido viscoso. Alguns polímeros apresentam mais de uma T_g , na qual grupos laterais apresentam certa mobilidade. Em geral, a região de utilização dos

polímeros é aquela entre T_g e T_m , pois nessa faixa de temperatura eles apresentam propriedades ótimas de tenacidade e são indicados para a produção de materiais híbridos, no caso do PCL, a T_g é $-60\text{ }^\circ\text{C}$ e a T_m entre 59 e $60\text{ }^\circ\text{C}$ [62,63]. Todavia, a mistura de polímeros com outros materiais pode afetar sua T_g e grau de cristalinidade, pois esses fatores dependem das interações entre as cadeias poliméricas e o material de adição, além do empacotamento da estrutura [63]. No caso de co-polímeros ou blendas, a Equação de Fox (Eq. 1) permite estimar o valor de T_g :

$$\frac{1}{T_g} = \frac{w_1}{T_{g1}} + \frac{w_2}{T_{g2}}, \quad (\text{Eq. 1})$$

onde w_1 é o percentual de massa do polímero 1 e T_{g1} o valor da temperatura de transição vítrea do polímero 1 quando puro. As variáveis w_2 e T_{g2} são relativas ao segundo polímero presente no sistema [63].

O PCL pode ser misturado com outros polímeros para melhorar sua resistência mecânica, capacidade de coloração e adesão. Dessa maneira, ele é usado em combinação com polímeros como propionato de celulose, butirato de acetato de celulose e ácido polilático para manipular a taxa de liberação de fármacos [8]. Devido à sua eletronegatividade e polaridade, o PCL é solúvel em clorofórmio, diclorometano, tetracloreto, benzeno, tolueno, ciclohexanona e 2-nitropropano à temperatura ambiente. Possui baixa solubilidade em acetona, 2-butanona, acetato de etila, dimetilformamida e acetonitrila e é insolúvel em álcool, éter de petróleo e éter dietílico [62]. Elevando-se a temperatura, é possível solubilizar o PCL em substâncias como acetona e acetato de etila.

3.3.3. BIOCOMPATIBILIDADE

Devido ao fato de que o PCL degrada mais lentamente do que o poliglicolídeo (PGA), poli D, L-lactídeo (PDLA) e seus copolímeros, esse material foi originalmente usado em dispositivos de liberação de fármacos que permanecem ativos por mais de 1 ano e em materiais de sutura de degradação lenta como o Maxon® e Capronor [10]. É um poliéster

aprovado pela FDA, tornando-o adequado tanto para aplicações de engenharia de tecidos [8].

O PCL é bem conhecido pela sua degradação controlada e por isso é utilizado em suturas absorvíveis, implantes subdermais para liberação de fármacos e diversas peças ortopédicas e de reconstrução [7,8,64]. O processo de bioabsorção se baseia no rompimento das ligações ésteres por hidrólise, gerando oligômeros que são transformados em CO_2 e H_2O [12]. Esse processo demora até 24 meses para ser completamente metabolizado para massas moleculares altas como 80.000. Porém, o polímero apresenta uma perda significativa em suas propriedades mecânicas após 12 meses (Figura 3.11) [59].

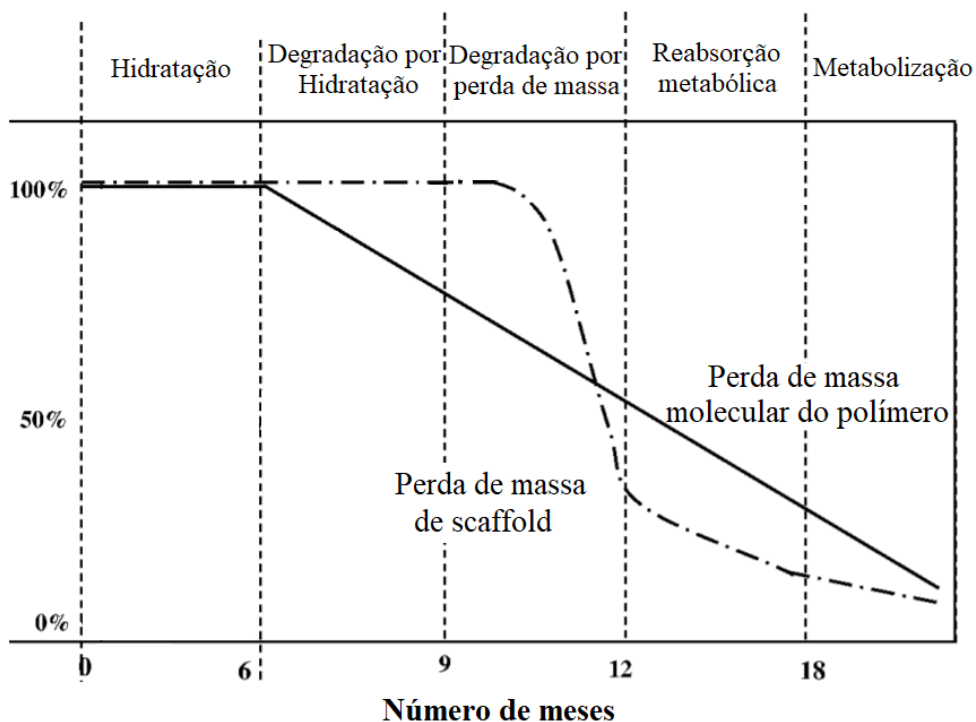


Figura 3.1: Etapas de degradação de PCL com peso molecular médio igual a 80.000 em função do tempo. Fonte adaptada: [59]

Devido à sua alta resistência mecânica quando associado a grades de alta massa molecular, esse polímero se destaca em aplicações nas quais as cargas envolvidas são expressivas como em próteses de joelho, tíbia e crânio [65–67]. Em função das diversas aplicações em condições fisiológicas já reportadas na literatura, esse polímero foi utilizado como fase de reforço dos *scaffolds* de VB produzidos neste trabalho.

3.4. COMPÓSITOS VB/PCL

Materiais produzidos pela associação de dois ou mais componentes que, em conjunto são responsáveis pelas propriedades finais da peça, são denominados compósitos. Geralmente possuem uma maior porção denominada matriz, que circunda o material em menor proporção, intitulado reforço [11]. A preparação de um compósito envolve várias etapas, iniciando pela escolha dos materiais que os comporão de forma que o material final seja economicamente viável, além de apresentar propriedades biológicas e mecânicas adequadas. O próximo passo é a determinação da afinidade entre as fases, pois quanto maior a molhabilidade entre elas, mais aderidos os materiais estarão. É realizado em seguida o cálculo da razão entre as fases, uma vez que as propriedades finais do material estão associadas ao volume de cada fase. Deve-se considerar também a forma do reforço e da matriz, que são determinados a partir da forma de aplicação. Por fim, é definido o tipo de processamento que será empregado na preparação da peça final [55]. A distribuição da fase de reforço pode ser orientada ou não, podendo ser concentrada em pequenas áreas ou distribuída uniformemente pela matriz. Híbridos de VB/PCL têm seus componentes dispersos de forma a garantir a homogeneidade da estrutura [68].

Exemplos naturais de compósitos são: ossos derivados de colágeno (fibras de elevada resistência e tenacidade) e apatita (resistente, rígida e frágil); a madeira, que é um conjunto de fibras de celulose e hemicelulose resistentes e flexíveis, envolvidas por lignina que é mais rígida; conchas compostas de cristais de carbonato de cálcio (calcita e aragonita) ligados por moléculas orgânicas (proteínas). Em se tratando de compósitos artificiais, a engenharia de tecidos é interdisciplinar e requer cada vez mais a atenção de outras áreas do conhecimento como a ciência de materiais, biologia celular e biotecnologia [69]. Devido à sua boa relação custo-benefício, alta tenacidade e processabilidade a partir de sua temperatura relativamente baixa Tg e temperatura de fusão, o PCL tem atraído recentemente muito interesse como biomaterial. Entretanto, não existem polímeros puros que possam efetivamente se ligar ao osso *in vivo*. Dessa maneira, a associação desse polímero com o VB é uma estratégia promissora no campo da regeneração óssea.

O osso apresenta propriedades mecânicas que advêm da combinação entre a HAC e fibras colágenas. Enquanto a HAC provém rigidez ao osso, as fibras colágenas fornecem elasticidade a ele (Figura 3.12). Dessa forma, um material que procura desempenhar parte dessa função deve possuir uma combinação similar de propriedade. Para tanto se utiliza materiais combinados como o VB que desempenha a mesma função mecânica e química da HAC, e o PCL que possui características semelhantes àquelas das fibras colágenas [3,70,71].

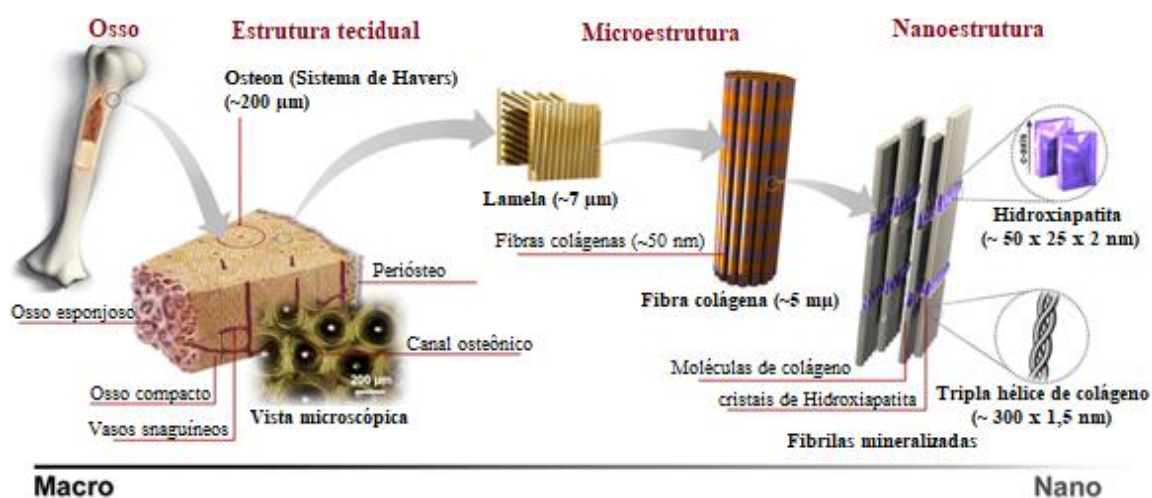


Figura 3.11: Componentes do tecido ósseo em diferentes escalas evidenciando a conjugação entre colágeno e HAC. Fonte adaptada: [70]

Para satisfazer os requisitos de resistência mecânica, nesse estudo foi escolhido utilizar o PCL como parte orgânica do sistema, de forma que a fragilidade do VB seja minimizada pela presença do polímero, além de garantir adesão de células e sua proliferação [11,69]. A Figura 3.12 representa um tecido conjuntivo no qual foram implantados materiais de PLA (região tracejada de preto) e PLA/VB (porção entre a seta azul). É notável o maior crescimento de células e fibras colágenas no implante com VB, indicando maior capacidade regenerativa deste material. Estes resultados corroboram para a produção de compósitos, visto que é improvável que um só desses elementos pudesse gerar resposta semelhante.

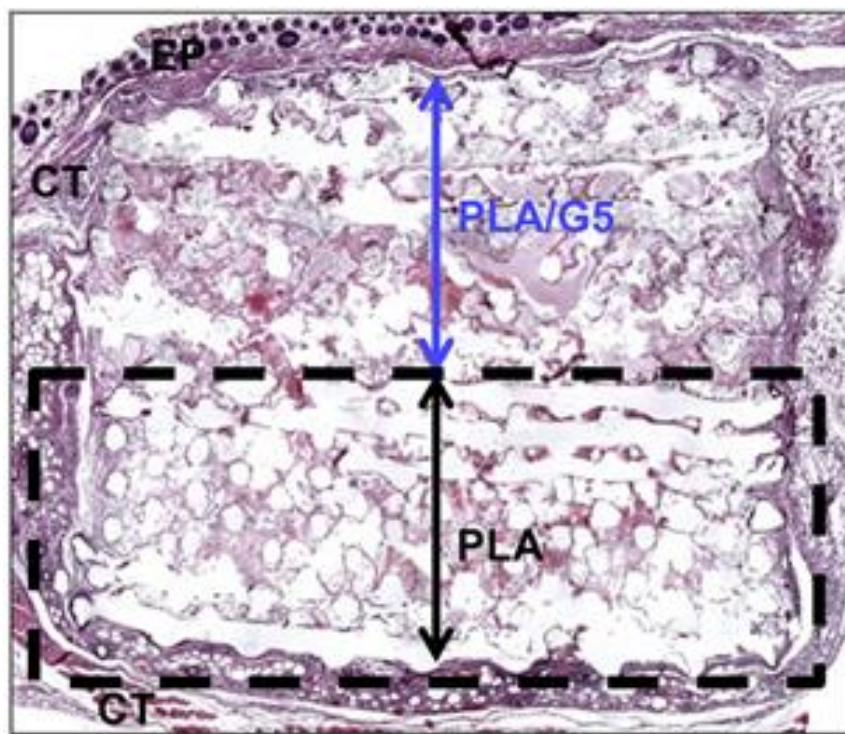


Figura 3.12: Corte histológico de tecido conjuntivo com implantes de PLA e PLA/VB (indicado como PLA/G5). Na imagem é mostrado o tecido conjuntivo (CT) o tecido epitelial (EP) que circunda a região do implante. Fontes [34,72].

3.5. PROCESSO FREEZE-CASTING

Durante o processamento de biomateriais, deve-se considerar a estrutura de poros dos materiais obtidos uma vez que ela desempenha papel fundamental na interação destes com tecidos vivos. As rotas tradicionais de fabricação de cerâmicas e compósitos muitas das vezes não permitem se ter um fino controle sobre essa variável [11]. Nesse contexto, a técnica de *freeze-casting* ou moldagem por congelamento é um processo atrativo para a obtenção de biomateriais, uma vez que possibilita o preparo de materiais com estruturas de poros pré-definidas. Além disso, é uma técnica que gera poucos resíduos, de baixo custo e fácil implementação em larga escala. Esse processo requer uma carga cerâmica que definirá a natureza da peça e um solvente que atuará no congelamento e movimentação de partículas, além de aditivos para controle da dispersão. A utilização de outros funcionalizantes como íons, fármacos e polímeros é opcional, podendo ser incorporados no início do processo [73].

A técnica de *freeze-casting* consiste basicamente na preparação de uma suspensão coloidal que é em seguida vertida em um molde, na sublimação do solvente e na sinterização do material obtido. A Figura 3.13 apresenta esquema das etapas envolvidas no processo. Nesta técnica as partículas da barbotina são repelidas pela frente de solidificação, ficando aprisionadas entre os cristais do solvente e durante a retirada desses cristais, poros de elevada ordenação são formados.

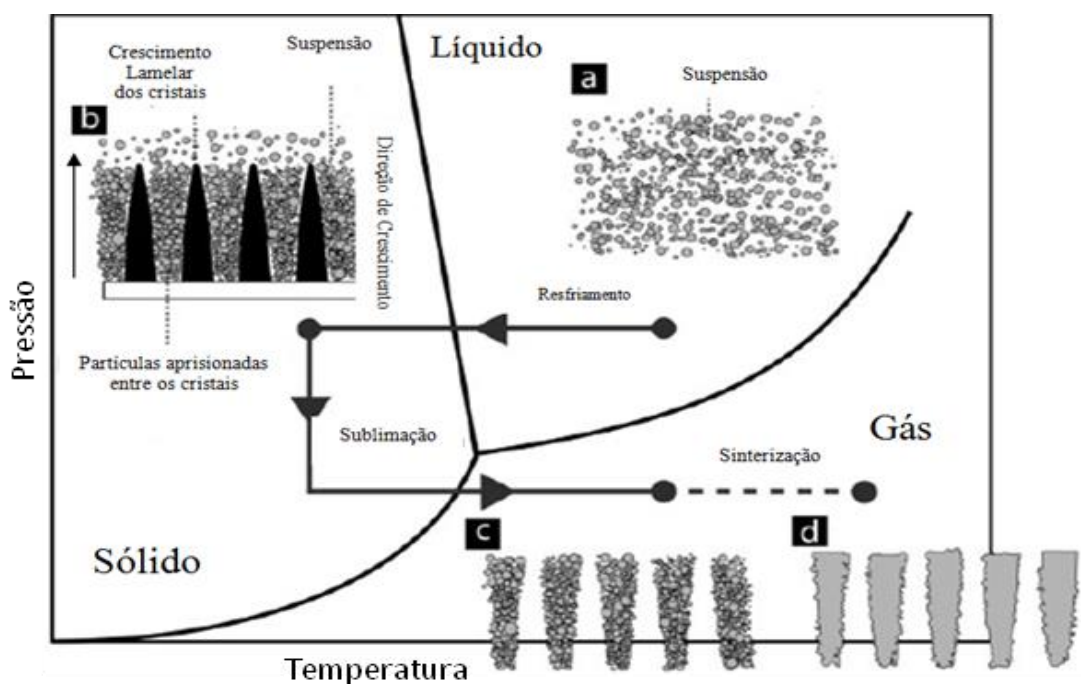


Figura 3.13: Esquema das etapas envolvidas no processo *freeze-casting*.

- (a) Preparação da massa cerâmica; (b) Solidificação do solvente;
(c) Sublimação; (d) Sinterização. Fonte:[14].

3.5.1. EFEITO DA VELOCIDADE DE RESFRIAMENTO

Em função da taxa de congelamento da barbotina, o processo *freeze-casting* pode apresentar três tipos distintos de interação entre a frente de resfriamento e as partículas dispersas na solução. Para taxas de congelamento muito baixas, pode ocorrer o crescimento planar da frente de resfriamento (Figura 3.14a). Isso se deve em grande parte ao movimento Browniano apresentado pelas partículas, o que previne seu aprisionamento. Assim, o material final não apresentará macroporos em sua estrutura.

Para taxas de resfriamento moderadas, há uma expressiva interação entre as partículas e a frente de congelamento, acarretando no aprisionamento das partículas entre os cristais de solvente formados. O material final apresentará estrutura de poros com elevado ordenamento (Figura 3.14b). Para elevadas taxas de resfriamento, não há tempo suficiente para haver o aprisionamento das partículas entre os cristais do solvente, dando origem a materiais com estruturas de poros desordenadas (Figura 3.14c) [16,74,75]. Portanto, a taxa de resfriamento empregada tem efeito direto sobre a estrutura de poros do material obtido.

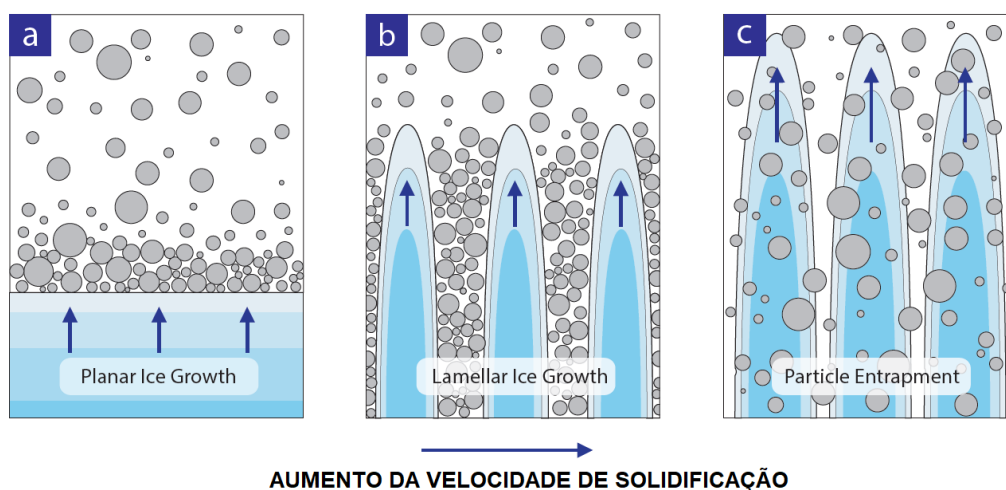


Figura 3.14: Efeito da taxa de resfriamento sobre a estrutura de poros de material obtido por processo *freeze-casting*. (a), (b) e (c) se referem, respectivamente, a baixa, moderada e elevada taxas de resfriamento. Fonte:[76]

3.5.2. EFEITO DO SOLVENTE UTILIZADO

Materiais de diferentes naturezas têm sido obtidos por esse método visando as mais variadas aplicações, uma vez que a fase sólida e/ou cristalina de cada material possui planos de crescimento diferentes, possibilitando a construção de várias diferentes morfologias de poros [16,74,77,78]. A flexibilidade dessa técnica permite a escolha de vários solventes, inclusive misturas binárias para controle do tamanho e da morfologia dos poros obtidos [13,78]. A Figura 3.15 exhibe micrografias típicas de materiais preparados através dessa metodologia.

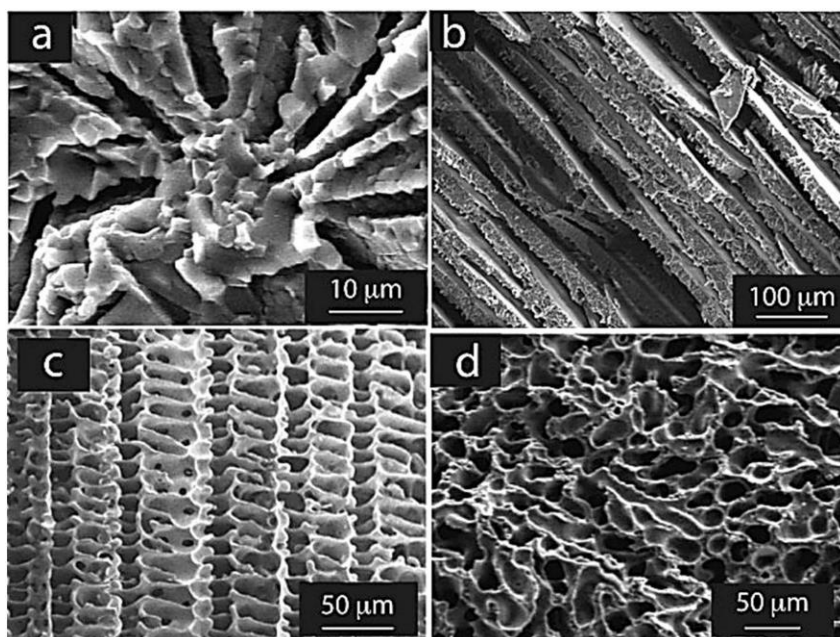


Figura 3.15: Micrografias típicas de amostras preparadas via processo *freeze-casting*. Em (a) alumina porosa com solvente de naftaleno-cânfora hipereutética, (b) alumina com água como solvente, (c) carbeto de silício e policarbosilano e em (d) alumina com canfeno. Fonte:[14].

Uma etapa crítica no processamento dos híbridos VB/PCL é a sublimação do solvente, pois nela ocorre a retração do material. Esse estágio tem efeito direto sobre a forma, distribuição de tamanho e interconectividade dos poros. A osteointegração e osteoindução dependem fortemente da sublimação, já que o tamanho de poro ideal está entre 100 e 300 μm . Nessa faixa de tamanho ocorre a proliferação de capilares para suprir as necessidades metabólicas das células. Além disso, esse é o tamanho ideal para acomodação celular do tecido ósseo [26,79].

A água dá origem a poros lamelares, enquanto álcool, canfeno e t-butanol formam a canais dendríticos e prismáticos [82]. Foi recentemente relatado que misturas de naftaleno-cânfora (Naph-Camp) podem dar origem a materiais com morfologias de poros ajustáveis [81]. Tais misturas geralmente apresentam baixa viscosidade, o que permite preparar suspensões com grandes cargas de sólido. Misturas Naph-Camp também experimentam retração após congelamento, dando origem a corpos verdes com grandes resistências mecânicas. Além disso, a temperatura de fusão e a pressão de vapor do Naph-Camp

permitem seu congelamento e sublimação em temperaturas e pressões próximas às ambientes [83].

A Figura 3.16 exibe micrografias de MEV de *scaffolds* de alumina preparados utilizando diferentes taxas de resfriamento e soluções Naph-Camp com diferentes composições [80]. Nota-se que a solução hipoeutética resfriada ao ar foi aquela que originou materiais com maiores tamanhos de poros (entre 60 e 120 μm). Como discutido anteriormente, estima-se que poros superiores a 100 μm são os mais apropriados para o crescimento celular [26,79].

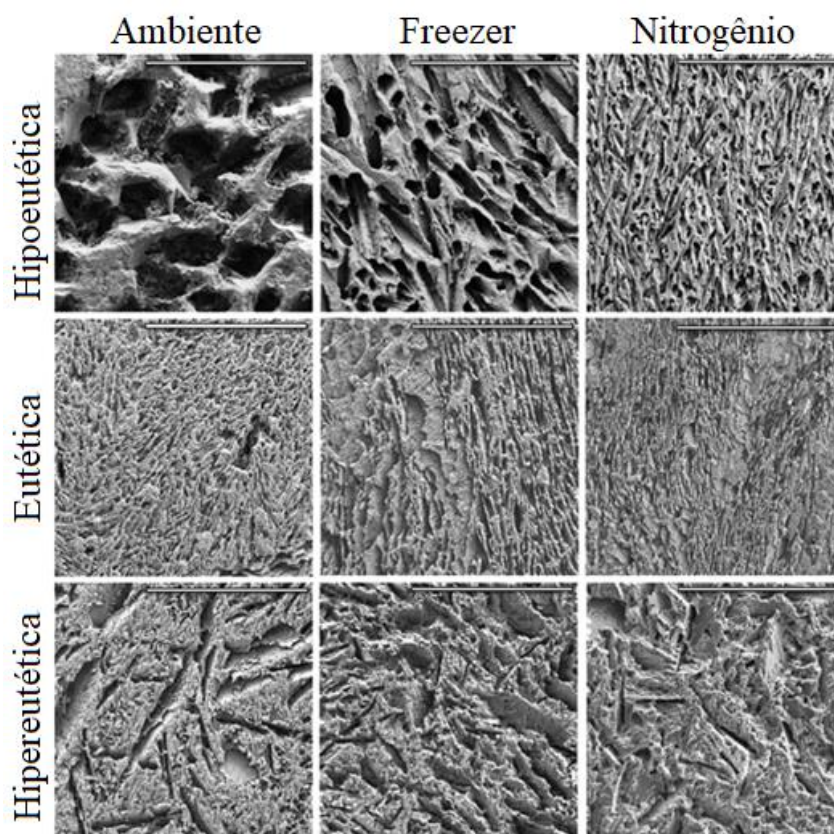


Figura 3.16: Micrografias de MEV de *scaffolds* de alumina produzidos utilizando diferentes taxas de resfriamento e misturas Naph-Camp. As imagens exibidas da esquerda para a direita representam suspensões resfriadas ao ar, em freezer doméstico e nitrogênio líquido, respectivamente. As barras de escala mostradas nessas imagens representam 500 μm . Fonte adaptada: [80].

3.5.3. ADITIVOS

A formação de poros de tamanhos ideais para o crescimento celular (entre 100 e 300 μm) exige um resfriamento lento do sistema quando o processo *freeze-casting* é utilizado. Nessas condições, é importante que as partículas que constituirão o *scaffold* não decantem ou aglomerem durante a preparação da barbotina. Para estabilizar as suspensões e garantir a homogeneidade da estrutura do material preparado, diferentes aditivos podem ser misturados à suspensão. Eles podem ter função de surfactante, coagulante, ligante, plastificante, lubrificante, antiespumante ou defloculante [81,82].

O Texaphor[®] é uma mistura de componentes aniônicos tensoativos que promovem a dispersão das partículas e as mantêm em suspensão devido à presença de cargas elétricas em suas superfícies. Segundo teoria proposta por Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek (DLVO), quando a força de repulsão eletrostática supera a de atração de van der Waals, as partículas se mantêm separadas e dispersas na suspensão. Caso contrário, ocorre a agregação das partículas e a posterior decantação das mesmas [83]. A Figura 3.17 exhibe esquema das forças consideradas na denominada Teoria DLVO [84].

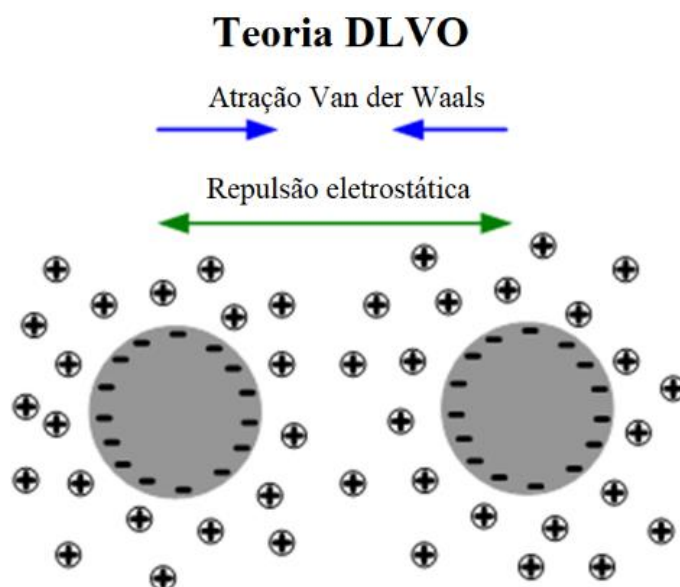


Figura 3.17: Forças consideradas na Teoria DLVO. Fonte adaptada: [84]

O ácido cítrico também pode ser utilizado como um agente anticoagulante em suspensões cerâmicas, fornecendo cargas superficiais às partículas dispersas no meio [85]. Esse ácido orgânico que está presente na maioria das frutas, especialmente nas cítricas, possui três grupos carboxila ($-\text{COOH}$) que liberam um íon H^+ quando em solução. Esses íons liberados alteram o pH do meio e fornecem cargas superficiais às partículas, evitando assim sua agregação. A Figura 3.18 exibe a estrutura do ácido cítrico [86,87].

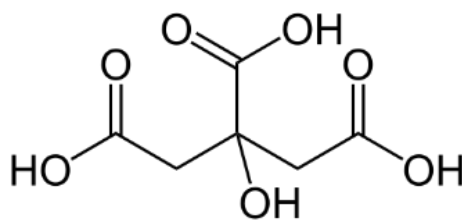


Figura 3.18: Representação da estrutura do ácido cítrico. Fonte [69].

CAPÍTULO 4. SÍNTESE DE VIDRO BIOATIVO 58S E SINTERIZAÇÃO

4.1. INTRODUÇÃO

Neste capítulo será abordada a síntese sol-gel do Vidro Bioativo 58S e sua caracterização antes e após a sinterização ao ar a 1250 °C por 2 h.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. SÍNTESE DE VIDRO BIOATIVO 58S

O VB sintetizado nesse trabalho foi o 58S cuja composição molar é 60% SiO₂, 36% CaO e 4% P₂O₅. Tetraetilortosilicato (TEOS / Aldrich / 98%), trietilfosfato (TEP / Aldrich / ≥ 99,8%), nitrato de cálcio tetra hidratado (Ca(NO₃)₂·4H₂O / Vetec / ≥ 98,0%), ácido nítrico (HNO₃ / Aldrich / 70%) e água deionizada MilliQ® foram utilizados como materiais de partida.

Foi adotada metodologia similar à proposta por Pereira *et al.* [88]. Nesse processo, H₂O e HNO₃ foram inicialmente misturados sob agitação à temperatura ambiente. O pH dessa solução foi mantido próximo a 2. TEOS foi então adicionado, sendo o sistema agitado por mais 60 min. A relação molar TEOS:H₂O foi fixada em 12:1. TEP e Ca(NO₃)₂·4H₂O foram vertidos na solução, sendo o nitrato de cálcio adicionado 60 min após o TEP. A solução obtida foi então mantida sob agitação à temperatura ambiente por 60 min. Após esse período, a solução sol-gel preparada foi vertida em moldes de politetrafluoretileno (PTFE – Teflon®) e envelhecida ao ar a 60 °C por 72 h. As amostras produzidas foram trituradas em almofariz de ágata e secas ao ar a 60 °C por 24 h, aumentando-se 10 °C por dia até o patamar de 120 °C. O particulado obtido foi então tratado termicamente ao ar a 700 °C por 2 h utilizando uma taxa de aquecimento de 1 °C/min. Por fim, os materiais preparados foram mantidos em moinho de bolas por até 12 h para homogeneização do

seu tamanho de partícula. O processo de síntese das partículas de VB está representado na Figura 4.1.

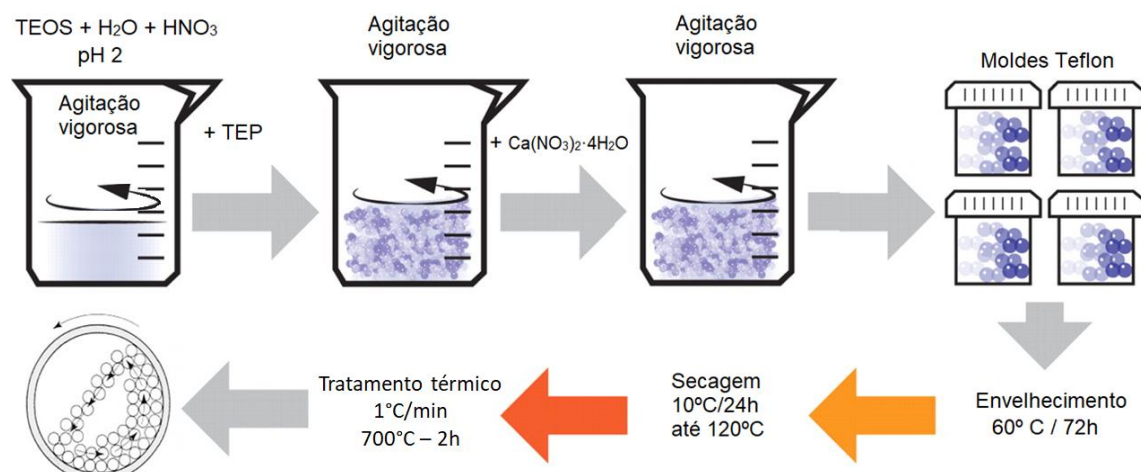


Figura 4.1: Processo de síntese sol-gel das partículas de VB.

4.2.2. CARACTERIZAÇÕES

4.2.2.1. Picnometria de He

A densidade real dos materiais investigados foi estimada através da picnometria de gás hélio, em equipamento Quantachrome modelo MVP-1. Esta técnica se baseia na medida da queda de pressão resultante da expansão de um gás, a partir de câmara de volume conhecido que contém a amostra de interesse. Aplicando-se o Princípio de Arquimedes e a Lei de Boyle, sabendo a massa, é possível mensurar o volume real do material e então estimar a sua densidade. O hélio é o gás comumente utilizado neste método, pois além de ser inerte e possuir moléculas de pequeno diâmetro, se comporta como um gás ideal. As amostras analisadas foram previamente maceradas e secas ao ar a 100°C por uma noite. Em seguida, os materiais foram pesados e transferidos para o compartimento de amostras do equipamento. Foram registradas as pressões na câmara de medida antes e após a expansão do gás. Utilizando estes valores, a densidade real dos materiais foi calculada.

4.2.2.2. DRX

Os testes foram realizados em difratômetro Philips-Panalytical PW 1710 a 40 kV e 30 mA. Os difratogramas foram obtidos utilizando passo de $0,06^\circ$ (2θ) e radiação $\text{CuK}\alpha$. A base de dados do JCPDS (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*) foi utilizada como referência nessas análises.

4.2.2.3. FTIR

Os ensaios de FTIR foram realizados em espectrômetro Bruker Alpha, equipado com acessório de refletância total atenuada (ATR) e cristal de diamante. Os espectros foram obtidos entre 4000 e 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 128 varreduras.

4.2.2.4. Granulometria a laser

Os testes foram conduzidos em granulômetro a laser Cilas, modelo 1064. Os materiais analisados foram dispersos em água e examinados sem adição de agente dispersante. Esses ensaios monitoraram a distribuição de tamanho de partícula das amostras de VB produzidas antes e depois de etapa de moagem.

4.2.2.5. Adsorção de N_2

Os ensaios foram conduzidos em equipamento Quantachrome Nova 1200e, utilizando amostras degaseificadas sob vácuo a 120°C por até 12 h. A área superficial específica dos materiais analisados foi inferida por meio do método de Brunauer-Emmett-Teller (BET). O tamanho médio de poros (\bar{d} – nm) foi calculado através da Equação (3):

$$\bar{d} = \frac{4V_{\text{mes}}}{A_{\text{esp}}}, \quad (\text{Eq. 3})$$

onde V_{mes} representa o volume específico de mesoporos (cm^3/g) e A_{esp} a área superficial específica (m^2/g) avaliada pelo método BET.

4.2.2.6. MEV e EDS

Os ensaios de MEV foram conduzidos em microscópio Jeol JSM-6360LV utilizando tensão de aceleração de 20 kV. Ensaio de EDS foram realizados em sistema Thermo Noran Quest acoplado ao microscópio eletrônico. As amostras utilizadas foram previamente recobertas com camada de ouro com espessura aproximada de 10 nm.

4.2.2.7. Comportamento em SBF

O SBF foi inicialmente preparado seguindo procedimento sugerido por Kokubo e Takadama [89]. É bem estabelecido que o SBF simula o plasma do sangue humano no que se refere à concentração de íons. A formação de camada de HA após a imersão de um material em SBF é uma importante referência para avaliação de sua bioatividade. Os materiais testados foram mantidos imersos em SBF por até 14 dias a 37 °C, sendo a concentração de VB na solução mantida em 1,5 mg/mL [89,90]. Após 1, 3, 7 e 14 dias, as amostras foram caracterizadas por FTIR, MEV, EDS e DRX.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DAS PARTÍCULAS DE VB

A Figura 4.2 apresenta as distribuições de tamanho de partícula obtidas para o VB antes e após sua moagem. Nota-se que a moagem por 12 h das partículas preparadas resultou em um substancial deslocamento de sua distribuição na direção de partículas menores. De fato, os tamanhos médios de partícula inferidos para o VB antes e após sua moagem foram 220 e 18 μm , respectivamente (Tabela 4.1). É bem estabelecido na literatura que o tamanho de partícula do material de partida possui grande efeito sobre a estrutura de poros de *scaffolds* produzidos por processo *freeze-casting*. Segundo Deville [14,16,73], a presença de grandes partículas ou mesmo aglomerados de partículas possui efeito deletério à homogeneidade e propriedades finais do material preparado. Dessa forma, a etapa de moagem se faz necessário nesse estudo.

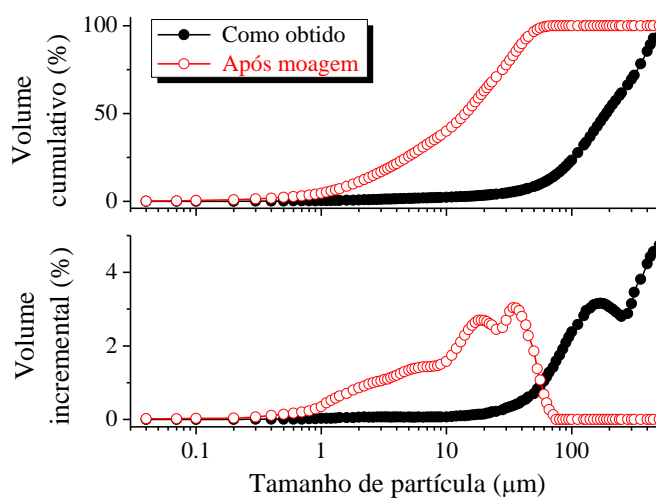


Figura 4.2: Distribuições de tamanho de partícula obtidas para o VB antes e após sua moagem.

Tabela 4.1: Valores de tamanho de partícula inferidos para o VB antes e após sua moagem em moinho de bolas por até 12 h.

Amostra	d_{10} (μm)	d_{50} (μm)	d_{90} (μm)	$d_{\text{médio}}$ (μm)
Como obtido	57	188	430	219
Após moagem	2	14	40	18

A Figura 4.3 exibe a isoterma de adsorção de N_2 obtida para o VB após moagem. Segundo classificação da IUPAC [91], trata-se de isoterma do tipo IV com loop de histerese H2. Esse tipo de isoterma é observada para materiais mesoporosos, onde a histerese está relacionada à condensação capilar de N_2 em mesoporos. A área superficial específica, volume específico de poros e tamanho médio de poros obtidos para esse material foram $282 \text{ m}^2/\text{g}$, $0,45 \text{ cm}^3/\text{g}$ e $6,4 \text{ nm}$, respectivamente. Esses valores são compatíveis com aqueles reportados por Sepulveda *et al.* [92] para amostras sol-gel de VB 58S.

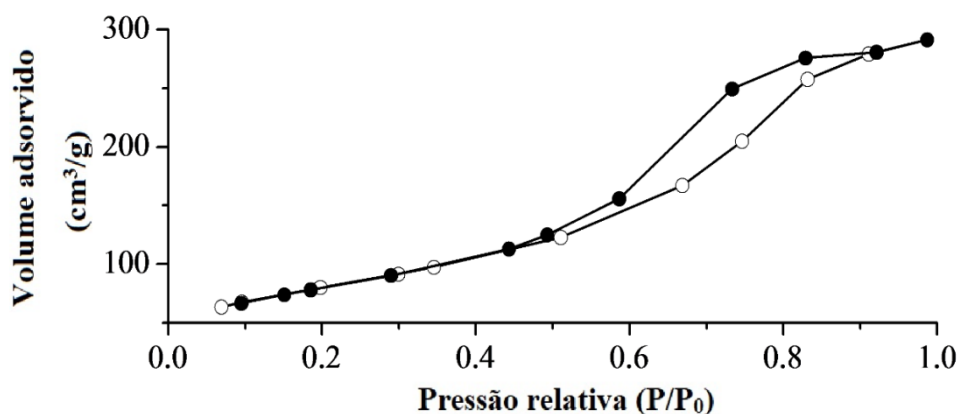


Figura 4.3: Isoterma de adsorção de N_2 obtida para o VB após moagem. Os símbolos abertos e fechados correspondem, respectivamente, aos ramos da adsorção e dessorção.

4.3.2. EFEITO DA SINTERIZAÇÃO SOBRE AS PARTÍCULAS DE VB

Como descrito no item 4.1, os *scaffolds* de VB obtidos por processo *freeze-casting* foram sinterizados a $1250\text{ }^\circ\text{C}$ por 2 h. Dessa forma, é importante avaliar as mudanças estruturais induzidas no VB durante esse tratamento térmico. A Figura 4.4 apresenta isoterma de adsorção de N_2 obtida para o VB após sua sinterização. Trata-se de isoterma do tipo III, tipicamente observada para materiais macroporosos [91]. Os valores de área superficial específica, volume específico de poros e tamanho médio de poros avaliados para esse material foram $0,6\text{ m}^2/\text{g}$, $8 \times 10^{-4}\text{ cm}^3/\text{g}$ e $4,8\text{ nm}$, respectivamente. Comparando com os valores obtidos para o material antes da etapa de sinterização ($282\text{ m}^2/\text{g}$, $0,45\text{ cm}^3/\text{g}$ e $6,4\text{ nm}$), fica claro que o tratamento promoveu sua densificação parcial.

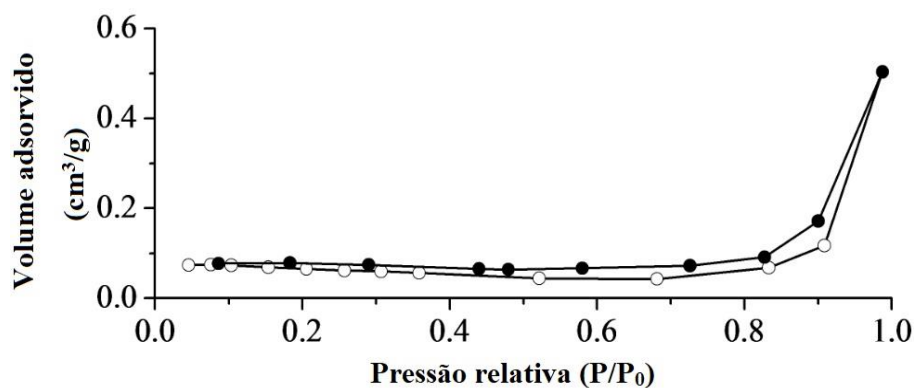


Figura 4.4: Isoterma de adsorção de N_2 obtida para o VB sinterizado a $1250\text{ }^\circ\text{C}$ por 2 h.

A Figura 4.5 exibe micrografias de MEV de partículas de VB antes e após sua sinterização. Nota-se que as partículas de VB antes da sinterização apresentavam morfologia irregular, com bordas facetadas. Todavia, após o tratamento térmico se observa partículas mais arredondadas, com a formação de pescoço entre elas. Esse efeito é um indício da ocorrência da sinterização do material.

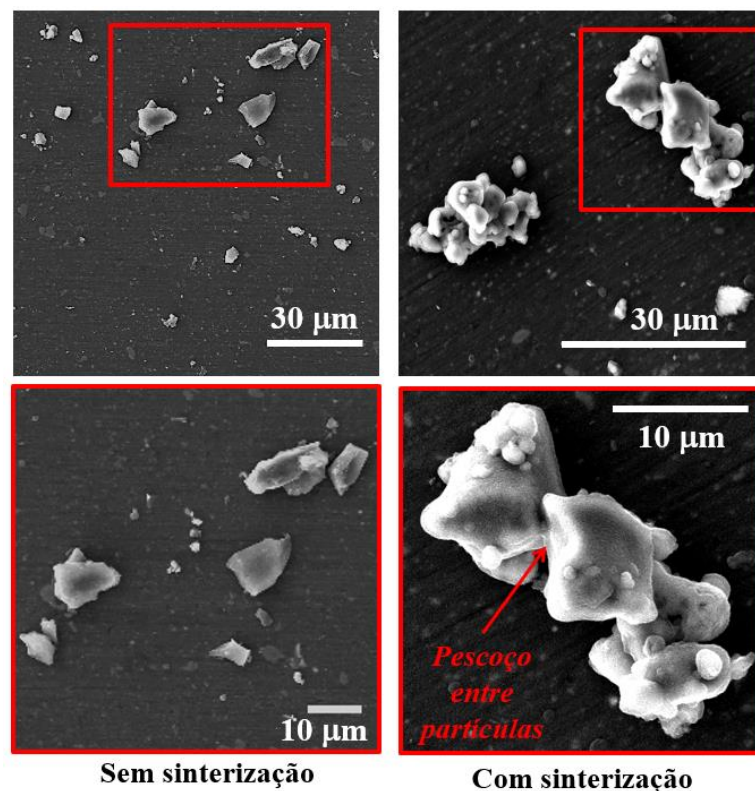


Figura 4.5: Micrografias de MEV de partículas de VB antes (esquerda) e após (direita) sua sinterização.

Os padrões de DRX obtidos para o VB nas condições como preparado e sinterizado são apresentados na Figura 4.6. Nenhum pico de difração foi observado para o VB antes da sinterização, revelando a presença de estrutura amorfa. Por outro lado, picos de difração bem definidos são observados para o VB após sinterização a 1250 °C. Dentre as fases encontradas, a cristobalita alfa (α -SiO₂) e metasilicato de cálcio (CaSiO₃ - wollastonita e pseudowollastonita) foram as principais fases cristalinas observadas. Fosfato tricálcico alfa e beta (α e β -TCP) também foram detectados em menores proporções.

Testes preliminares revelaram que amostras tratadas termicamente em temperaturas inferiores a 1250 °C exibiram baixa estabilidade mecânica, fragmentando-se durante o manuseio. Dessa forma, apesar da cristalização do 58S, a etapa de sinterização a 1250 °C por 2h se fez necessária para o aumento da resistência mecânica dos *scaffolds* preparados.

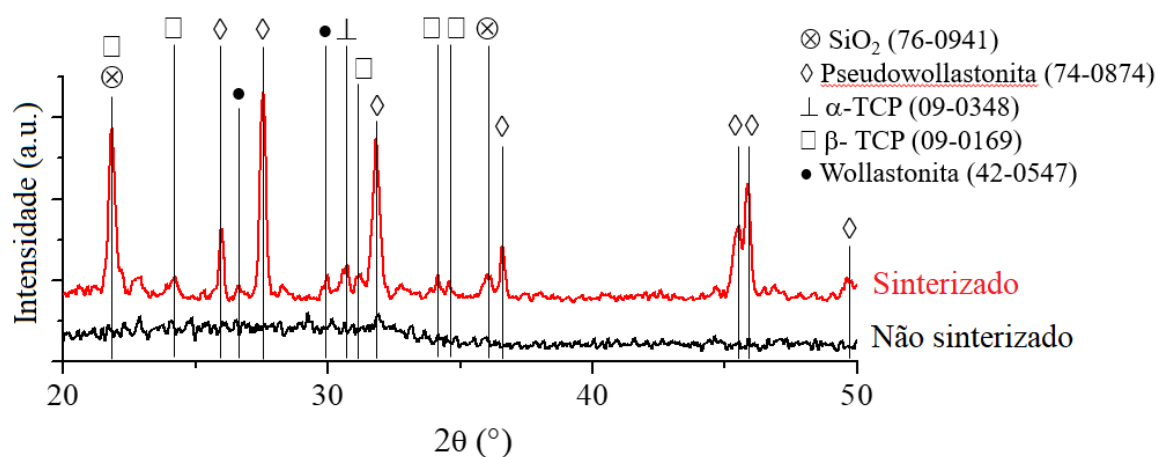


Figura 4.6: Padrões de DRX para amostras de VB sinterizadas e não sinterizadas.

A Figura 4.7 apresenta os espectros de FTIR do VB antes e após sua sinterização. O material não sinterizado exibiu fortes bandas de absorção centradas em torno de 460 e 1030 cm^{-1} , as quais são atribuídas a ligações Si–O–Si [93,94]. A banda próxima a 936 cm^{-1} pode estar relacionada ao oxigênio não-ligante em ligações Si–O–Ca [95], enquanto aquela em 1200 cm^{-1} é devida a ligações Si–O–Si [96]. Bandas adicionais são observadas no espectro de FTIR do VB após sinterização. As bandas em 560 e 600 cm^{-1} são atribuídas ao modo de vibração angular de ligações P–O, estando relacionadas à presença de TCP [95]. As bandas de absorção em 710, 915 e 980 cm^{-1} podem estar relacionadas às ligações da pseudowollastonita, enquanto aquelas em 790 e 1060 cm^{-1} podem ser devidas à wollastonita [97]. O pico em 420 cm^{-1} é atribuído ao modo de vibração angular de ligações P–O–P [98].

As bandas de absorção adicionais observadas no espectro de FTIR do VB após sua sinterização revelam a formação de wollastonita, pseudowollastonita e TCP, o que está de acordo com a DRX (Figura 4.6). Essas evidências, juntamente com o DRX corroboram para o fato que a sinterização do VB 58S a 1250 °C por 2 h acarretou na formação de fases cristalinas em sua estrutura.

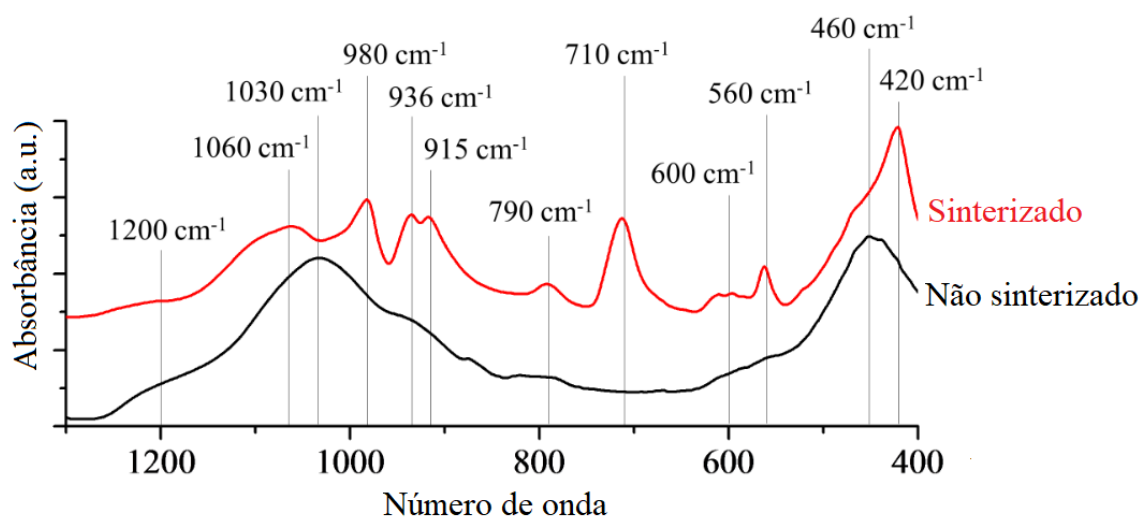


Figura 4.7: Espectros de FTIR do VB antes e após sua sinterização.

4.3.3. AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE E BIOCAMPATIBILIDADE ANTES E APÓS SINTERIZAÇÃO

A Figura 4.8 mostra o padrão de DRX do VB58S não sinterizado e para amostras submersas em SBF por 1, 3, 7 e 14 dias. Nela é possível verificar o surgimento de picos de SiO_2 cristalino e estruturas compostas por cálcio, decorrentes da difusão existente no processo. Foram também observados sinais associados à HA logo no primeiro dia de imersão em SBF [99]. O pico em torno de $2\theta = 30^\circ$ em 7 dias pode ser devido à ausência de etapa de lavagem da amostra após imersão em SBF.

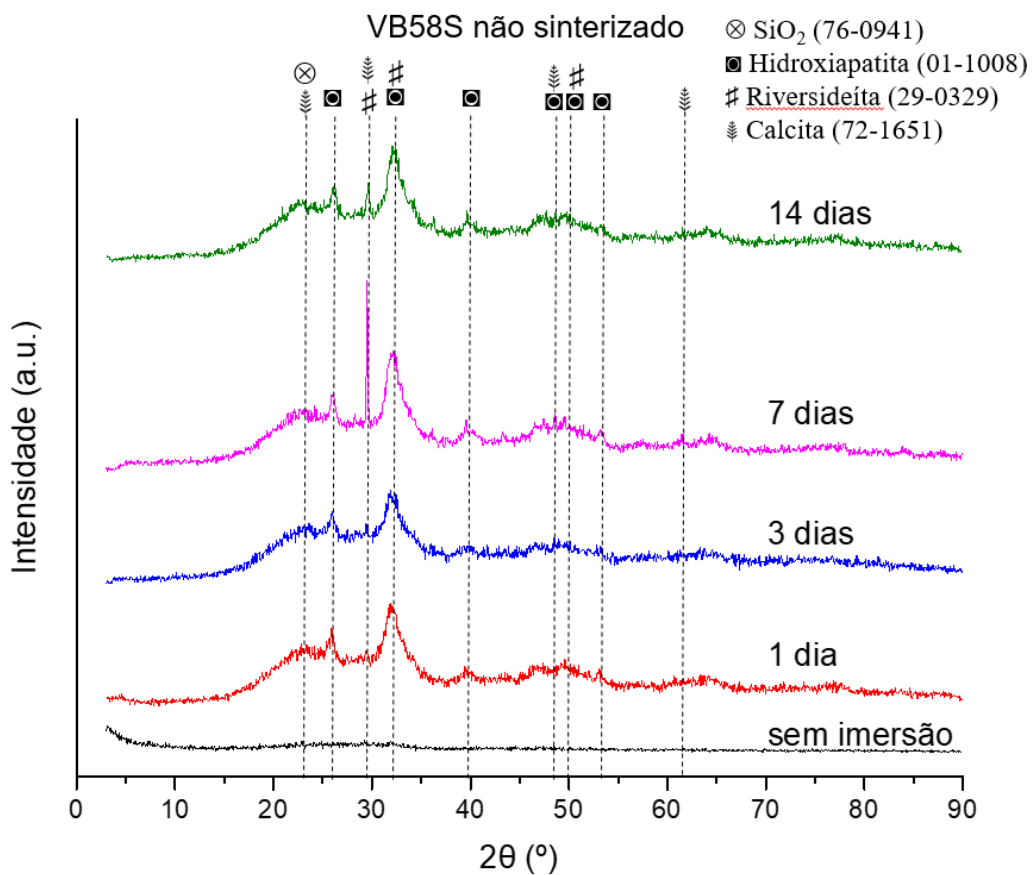


Figura 4.8 Padrão de DRX do VB58S não sinterizado imerso em SBF

Nos espectros de FTIR do VB58S não sinterizado (Figura 4.9), a pequena banda de P-O amorfo nas regiões de $960\text{-}970\text{ cm}^{-1}$ e 600 cm^{-1} estão relacionadas com estruturas de fosfato de cálcio [100]. A diminuição na intensidade da banda em 920 cm^{-1} de oxigênio não ligante (NBO) está relacionada com a liberação de íons Ca^{2+} , também importante na formação de HA.

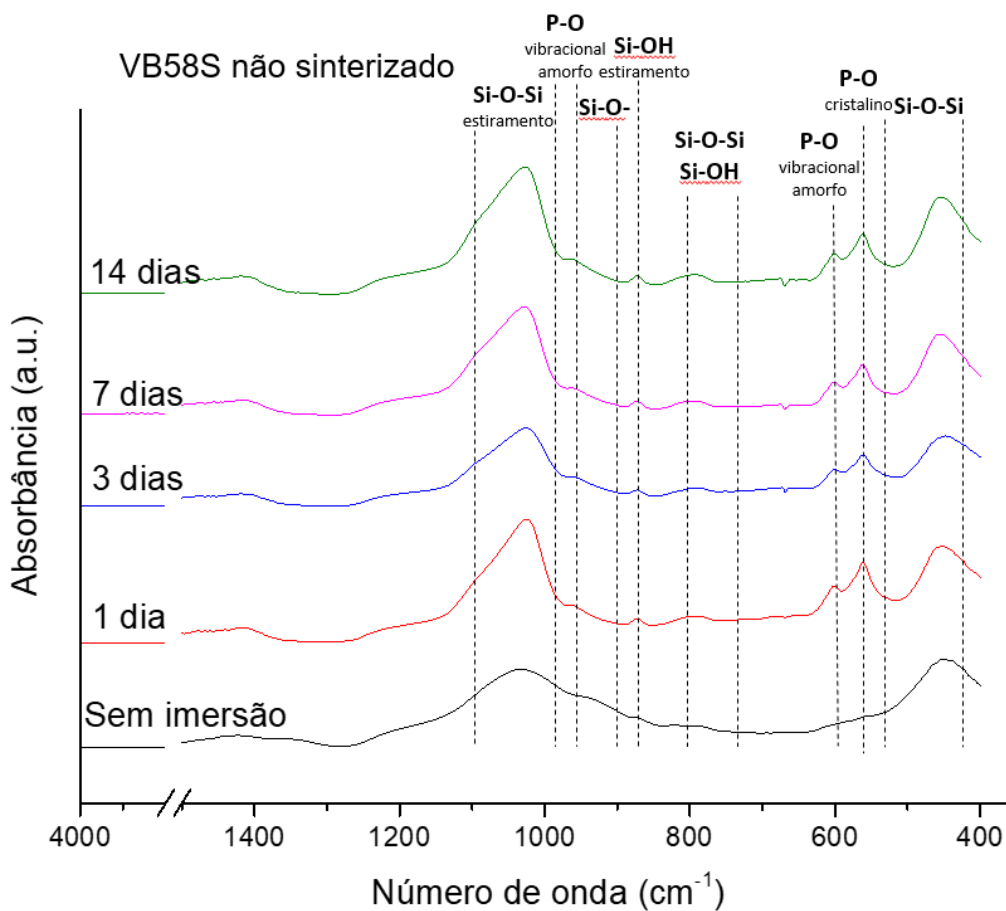


Figura 4.9 Espectros de FTIR do VB não sinterizado imerso em SBF

De forma análoga ao VB58S não sinterizado, a amostra submetida ao tratamento térmico a 1250 °C apresentou a intensificação de picos relacionados à formação de HA desde o primeiro dia, mas somente de forma pronunciada no sétimo dia (Figura 4.10). Como há sobreposição do pico de HA e TCP, o pico 2θ em 47° é fundamental para confirmar a formação de HA.

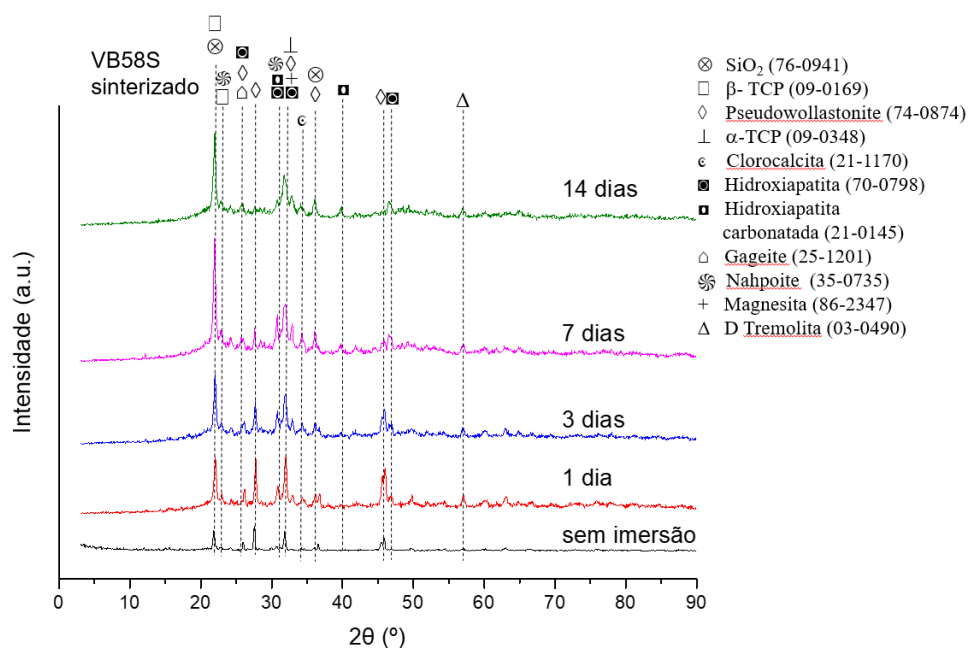


Figura 4.10 Padrão de DRX de amostras de VB58S sinterizadas e imersas em SBF

Pela Figura 4.11, é possível observar a diminuição da banda de NBO que tem associação direta com a concentração de Ca²⁺ na superfície do vidro e formação da camada de HA. Além disso, a intensificação da banda dupla de P-O entre 500 e 600 cm⁻¹ indica a formação de estruturas cristalinas contendo fósforo [101].

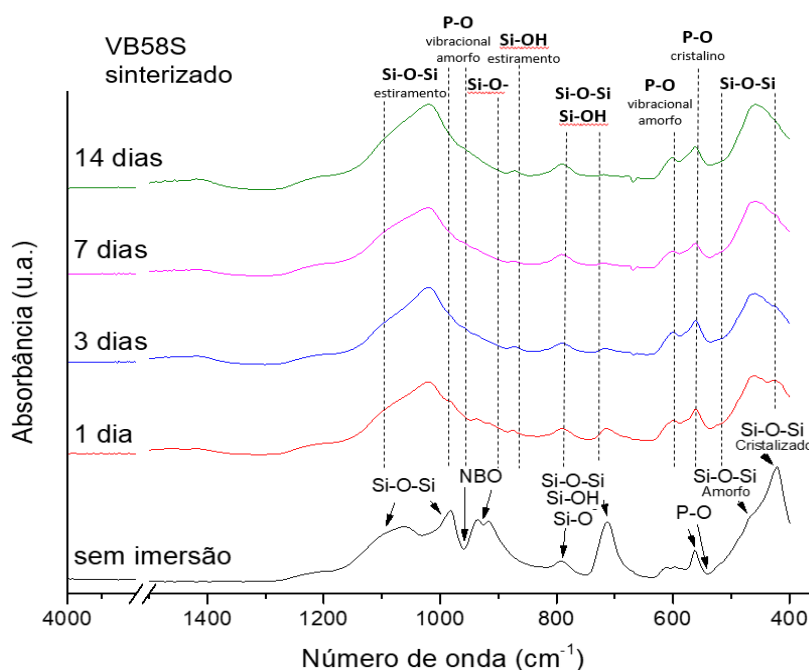


Figura 4.11 Espectros de FTIR de VB58S sinterizado imerso em SBF por diferentes intervalos de tempo.

A partir dos resultados de DRX e FTIR, sugere-se que houve a formação de camadas de HA em ambas amostras (não sinterizada e sinterizada). Todavia, a formação dessa camada é mais evidente para a amostra não sinterizada. Para o surgimento desta camada há a formação de ligações SiOH por liberação de grupos $\text{Si}(\text{OH})_4$ e quebra de ligações Si-O-Si, seguida da adsorção de Ca, PO_4 e CO_3 da solução de SBF [102]. A sinterização e a consequente cristalização do VB também alterou seu comportamento quando submerso em SBF, provavelmente devido à diminuição da área superficial das partículas e cinética química [43].

A HA encontrada em amostras de 14 dias possui aspecto nodular e relação Ca/P compatível com essas estruturas, que varia entre 1,57 e 1,87 [103]. A Figura 5.11 mostra a superfície do VB58S com e sem tratamento térmico de sinterização após 2 semanas de imersão em SBF.

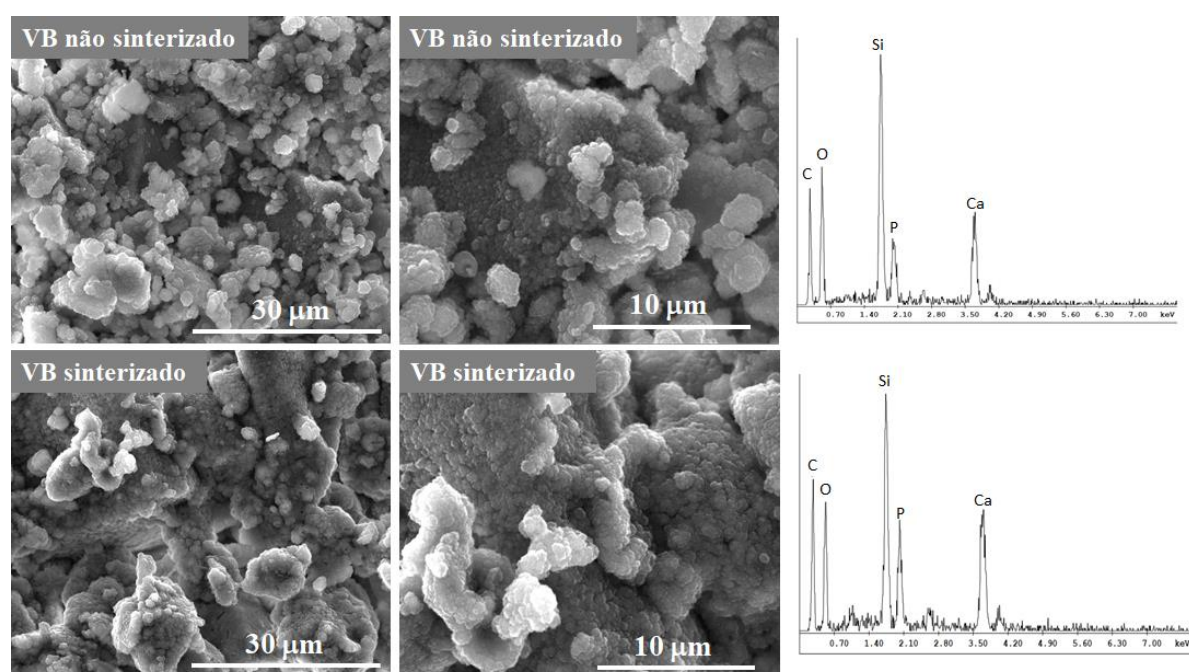


Figura 4.12 MEV de amostras sinterizadas e não sinterizadas, imersas em SBF, e em aumentos diferentes, evidenciando HA com textura nodular e EDS com a proporção dos elementos químicos encontrados na superfície.

4.4. CONCLUSÃO

A rota sol-gel empregada, além de garantir um alto rendimento em massa de VB, também está de acordo com o esperado e já observado na literatura para parâmetros como área superficial específica ($282 \text{ m}^2/\text{g}$), volume específico de poros ($0,45 \text{ cm}^3/\text{g}$) e tamanho médio de poros ($6,4 \text{ nm}$) [92]. A moagem do VB por 12 h em moinho de bolas foi eficaz, uma vez que reduziu o tamanho médio das partículas de $219 \text{ }\mu\text{m}$ para $18 \text{ }\mu\text{m}$. A sinterização reduziu os parâmetros citados acima para $0,6 \text{ m}^2/\text{g}$, $8 \times 10^{-4} \text{ cm}^3/\text{g}$ e $4,8 \text{ nm}$, dando origem a várias fases cristalinas no material como wollastonita e pseudowollastonita. Apesar disso, a bioatividade do material continuou satisfatória e houve início da formação da camada de HA logo nas primeiras 24 h, ainda que discretamente quando comparada com o VB não sinterizado.

CAPÍTULO 5. FREEZE-CASTING E IMPREGNAÇÃO DE PCL POR SOLUÇÃO DE ACETONA

5.1. INTRODUÇÃO

Neste capítulo, será abordada a produção de *scaffolds* a partir de partículas cerâmicas de VB58S e a subsequente impregnação desses materiais com PCL por meio da preparação de solução desse polímero em acetona.

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. PRODUÇÃO DE *SCAFFOLDS* E IMPREGNAÇÃO DE PCL POR SOLUÇÃO

Scaffolds de VB foram inicialmente obtidos utilizando solução hipoeutética de Naph (40 %p) e Camp (60 %p). Além disso, optou-se pela realização do resfriamento ao ar das suspensões cerâmicas obtidas, o que permite uma lenta taxa de resfriamento do sistema.

Para produção dos *scaffolds* de VB, Texaphor 963® (Cognis, Southampton Hampshire, Reino Unido) foi inicialmente adicionado a 70 °C à mistura hipoeutética de Naph e Camp. Essa temperatura foi escolhida por estar acima do ponto de fusão da mistura e ainda garantir uma segurança para que seja manuseada e não solidificar mesmo ao perder pouco calor. As partículas de VB previamente preparadas foram então adicionadas à solução e a suspensão foi agitada por 3 h. Em seguida, o sistema foi mantido em ultrassom durante 15 min para quebra dos aglomerados de partículas. A carga de VB nas suspensões obtidas variou entre 10 e 26 % vol., enquanto a concentração de Texaphor foi fixada em 1% em peso da fração de VB. O plano inicial era fabricar suspensões com cargas sólidas na faixa de 10-30 % vol. No entanto, não foi possível preparar amostras com cargas sólidas acima de 26 % vol. devido à alta viscosidade da suspensão obtida e à alta área superficial específica do VB.

As suspensões preparadas foram então vertidas em moldes de PTFE cilíndricos (10 mm de diâmetro e 30 mm de altura) e resfriados à temperatura ambiente. Após a solidificação das amostras, elas foram removidas dos moldes e mantidas em condições ambientes por até 15 dias para permitir a sublimação da mistura Naph-Camp. Os corpos verdes obtidos foram inicialmente tratados termicamente ao ar a 400 °C por uma hora a uma taxa de 2 °C/min. A temperatura do forno foi então aumentada para 1250 °C por 2 horas sob a mesma taxa de aquecimento.

Para infiltração, o PCL (Aldrich / 97% / $M_w = 80.000$ g/mol) foi inicialmente diluído em acetona (Aldrich) sob agitação à temperatura ambiente por até 8 h. A concentração de PCL nas soluções preparadas variou entre 50-200 g/L. Em seguida, os *scaffolds* sinterizados foram imersos nas soluções de PCL e mantidos sob baixa pressão (160 mm Hg) por 5 min para permitir a infiltração do polímero nos materiais. As amostras foram então removidas das soluções de PCL e secas ao ar a 60 °C durante a noite [104,105]. A Figura 5.1 esquematiza o processo de obtenção desses *scaffolds*.

O percentual de volume de PCL incorporado nos *scaffolds* (V_{PCL}) foi avaliado através da Equação (2):

$$V_{PCL} = \left(\frac{m_1 - m_0}{\rho_{PCL} \cdot \phi \cdot V} \right) \times 100\%, \quad \text{Eq. (2)}$$

onde m_0 representa a massa inicial do *scaffold* (g), m_1 sua massa após impregnação com PCL e evaporação da acetona (g), ρ_{PCL} a densidade do PCL (1,145 g/cm³), ϕ a porosidade total avaliada para o *scaffold* nos Ensaio de Arquimedes e V o volume da amostra calculado a partir de suas dimensões (cm³) [104]. A Tabela 5.1 apresenta as amostras preparadas por meio dessa rota.

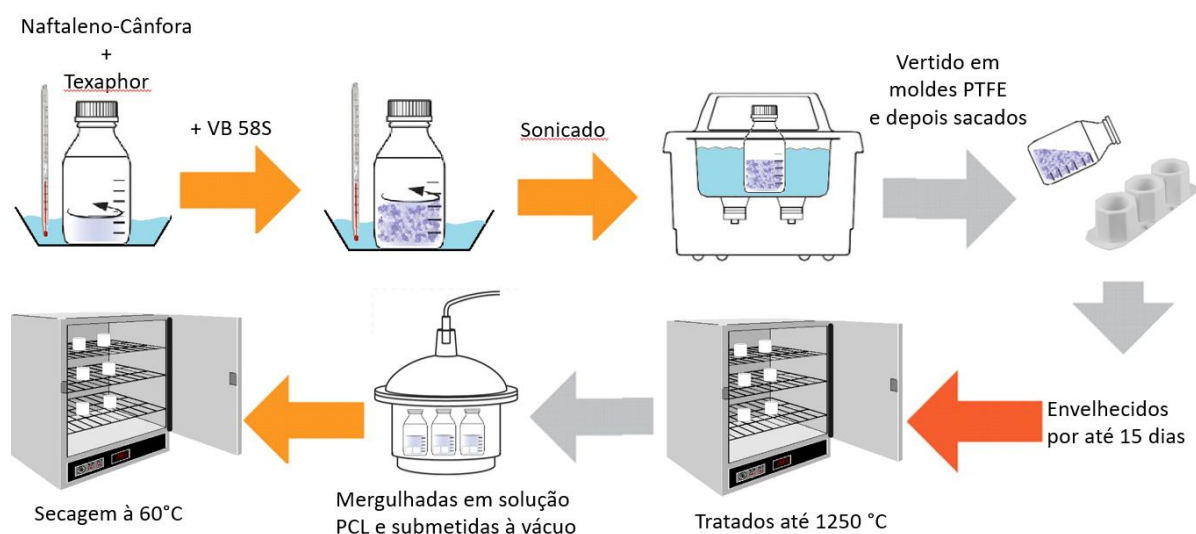


Figura 5.1: Metodologia empregada na fabricação de *scaffolds* através da rota de infiltração da solução de PCL em acetona.

Tabela 5.1: Amostras obtidas pela rota de infiltração de solução acetona/PCL em *scaffolds* de VB sinterizados. *Teor de VB presente na suspensão de partida utilizada no processo *freeze-casting*. **Concentração de PCL na solução de acetona utilizada na etapa de infiltração.

Amostra	Concentração		Observação
	58S* (%vol)	PCL** (massa/volume)	
VB10	10	0	Amostras sem PCL
VB20	20	0	
VB26	26	0	
VB20-PCL5	20	5	<i>Scaffolds</i> contendo PCL
VB20-PCL12	20	12,5	
VB20-PCL20	20	20	

5.2.2. CARACTERIZAÇÕES

As caracterizações dos *scaffolds* por DRX, FTIR, MEV e EDS e o comportamento em SBF foram executadas de forma idêntica às aquelas descritas do capítulo anterior.

5.2.2.1. Ensaios de Arquimedes

Os ensaios de Arquimedes foram realizados em balança Marte AD330 para determinar as frações de poros abertos e fechados presentes nos *scaffolds* produzidos. Para tal, o material foi previamente pesado (M_{Seco}), sendo em seguida imerso em água. Para garantir que todos os poros do material fossem preenchidos com água, o sistema foi submetido a vácuo (160 mm Hg) por até 10 min. Em seguida, foram mensuradas as massas do material submerso em água (M_{Submerso}) e após sua retirada do líquido ($M_{\text{Úmido}}$). A partir desses valores e da densidade verdadeira (ρ) mensurada por picnometria de He, foi possível estimar as frações de poros abertos (P_{Aberta}) e fechados (P_{Fechada}) presentes na amostra examinada utilizando as Equações 4 a 7:

$$P_{\text{Aberta}}(\%) = \left(\frac{M_{\text{Úmido}} - M_{\text{Seco}}}{M_{\text{Úmido}} - M_{\text{Submerso}}} \right) \times 100, \quad (\text{Eq. 4})$$

$$P_{\text{Total}}(\%) = \left(\frac{\rho - B}{\rho} \right) \times 100\%, \quad (\text{Eq. 5})$$

$$B = \left(\frac{M_{\text{Seco}}}{M_{\text{Úmido}} - M_{\text{Submerso}}} \right) \times \rho_{\text{água}}, \quad (\text{Eq. 6})$$

$$P_{\text{Fechada}} = P_{\text{Total}} - P_{\text{Aberta}}, \quad (\text{Eq. 7})$$

onde P_{Total} representa a porosidade total do material.

5.2.2.2. *Micro-CT*

A análise de micro-CT foi realizada em equipamento SkyScan 1174 com tensão de 50 kV, corrente de 800 μ A, filtro de alumínio (0,25 mm) e tamanho de pixel de 10 μ m. As amostras foram fixadas em suporte e rotacionadas 180°, com imagens adquiridas a cada 0,7°. A reconstrução 2D das seções transversais das amostras foi realizada utilizando o software NRecon. Para análise quantitativa da distribuição de tamanho de poros foi utilizado o software CTAnalyzer. A visualização volumétrica dos materiais analisados foi realizada no software CTVol.

5.2.2.3. *Resistência à compressão uniaxial*

A resistência à compressão em temperatura ambiente dos *scaffolds* produzidos foi avaliada em máquina universal de teste Shimadzu AGS-X a uma velocidade de deslocamento de 0,01 mm/s. A carga foi aplicada perpendicularmente ao eixo central dos *scaffolds*, sendo os testes conduzidos conforme descrito na norma NBR 5739. O módulo de Weibull foi calculado para cada amostra analisada com base em sua resistência máxima à compressão [106].

5.2.2.4. *Testes de viabilidade celular*

A citotoxicidade dos *scaffolds* preparados foi avaliada utilizando células de osteosarcoma humano imortalizadas (SAOS, ATCC® HTB-85) por ensaios de MTT e LIVE/DEAD®. As células SAOS foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ, Universidade Federal do Rio de Janeiro). Os *scaffolds* examinados foram inicialmente irradiados com luz ultravioleta por 60 min em cada lado. As células SAOS foram cultivadas a 37 °C em atmosfera de 5 % CO₂ por 72 h em meio Eagle Dulbecco modificado (DMEM) suprido com soro fetal bovino (10 % vol), sulfato de estreptomicina (10 mg/mL), penicilina G sódica (10 unidades/mL) e anfotericina B (0,025 mg/mL) fornecidos pela Gibco BRL (EUA). Para os testes de MMT, as amostras foram preparadas como recomendado na norma ISO 10993-5. Populações de células foram inicialmente sincronizadas em meio livre de soro bovino por 24 h. A seguir, 3×10⁵ células/poço foram

semeadas sobre amostras desenvolvidas em placas de 24 poços. As células SAOS foram utilizadas em experimentos de passagem 48.

Controles de células e DMEM com 10% de SFB foram utilizados como referência. Como controle positivo foi utilizado Triton X-100 (1 %vol em tampão fosfato salino / Gibco BRL, EUA) e como controle negativo lascas estéreis de tubos de polipropileno (1 mg/mL, Eppendorf, Alemanha). Após 72 h, o meio foi aspirado e substituído por 210 µL de meio de cultura com soro. Foram adicionados a cada poço 170 µL de reagente MTT (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich) e incubou-se durante 4 h em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Após esse período, 80 µl de solução de isopropanol/ácido clorídrico (4 %vol) foram colocadas em cada poço. Em seguida, 100 µL foram removidos de cada poço e transferidos para uma placa de 96 poços para quantificar a absorbância (Abs) em espectrofotômetro Bio-Rad I-Mark com filtro de 595 nm. Os valores obtidos foram expressos como porcentagem de células viáveis de acordo com a Equação 8:

$$\text{Viabilidade Celular(\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{Amostras}}}{\text{Abs}_{\text{Controle}}} \times 100, \quad (\text{Eq. 8})$$

onde $\text{Abs}_{\text{Amostras}}$ e $\text{Abs}_{\text{Controle}}$ representam as absorbâncias mensuradas para as amostras e para o grupo controle, respectivamente. A análise estatística foi realizada em *software* Prism (Software GraphPad, San Diego, EUA), considerando como nível de significância $P < 0,05$. Os experimentos foram realizados com $n = 6$ e análise de variância simples (One way ANOVA).

Para os ensaios de LIVE/DEAD[®], células SAOS foram sincronizadas em meio sem soro durante 24 h. Após este período, foram semeadas (3×10^5 células/poço) sobre as amostras desenvolvidas em placas de 24 poços. Após 72 h o meio foi aspirado e as células lavadas 3 vezes com PBS (Gibco BRL, Nova Iorque, EUA) e tratadas por 30 minutos com o kit *LIVE/DEAD viability/cytotoxicity* (Life Technologies do Brasil Ltda/ São Paulo) de acordo com as especificações do fabricante. Imagens foram obtidas com microscópio óptico Leica DMIL-LED e a fluorescência capturada separadamente para calceína ($530,0 \pm 12,5$ nm) e iodeto de propídeo (645 ± 20 nm).

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. EFEITO DA CARGA DE SÓLIDOS

Dentre as muitas variáveis do processo de *freeze-casting*, o teor de carga sólida é determinante na resistência mecânica do *scaffold* preparado. Por esse motivo, neste trabalho foram produzidas amostras com teores de VB entre 10 e 26 %vol. Como mencionado anteriormente, não foi possível ultrapassar o teor de 26 %vol devido à elevada viscosidade da suspensão preparada e elevada área superficial das partículas.

A Figura 5.2 exibe as porosidades total, aberta e fechada para *scaffolds* preparados usando diferentes cargas de VB. Esses valores foram calculados após a realização de ensaios de Arquimedes. É observado que quanto maior a fração de partículas de VB, menor é a porosidade total do *scaffold* preparado. VB10, VB20 e VB26 apresentaram, respectivamente, porosidades totais iguais a $79,0 \pm 3,5$, $64,4 \pm 1,5$ e $59,2 \pm 1,0$ %.

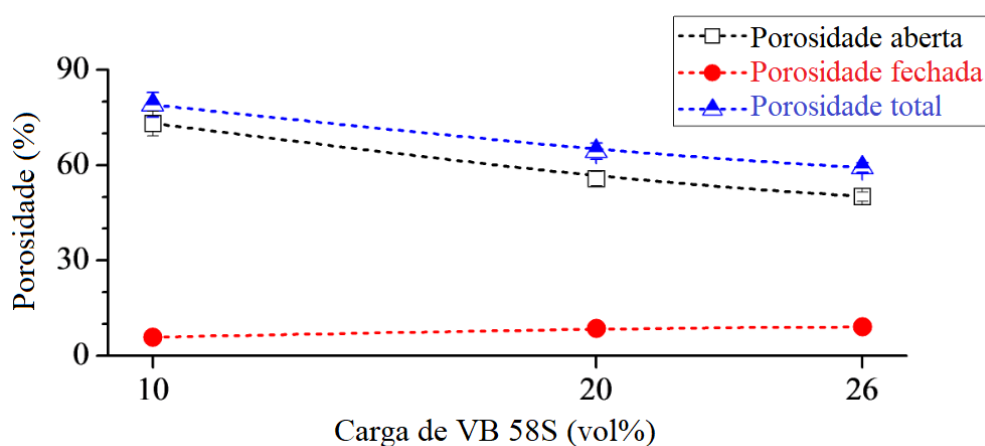


Figura 5.2: Porosidades total, aberta e fechada obtidas para *scaffolds* sinterizados a 1250 °C por 2 h. O teor de VB nas suspensões que deram origem a esses materiais variou entre 10 e 26 %vol.

Como a rede de poros em amostras obtidas por meio do processo *freeze-casting* é uma réplica direta da estrutura do solvente, é plausível admitir que quanto maior o teor de

sólidos na suspensão de partida, menor é a porosidade do material final [14,107]. Este comportamento está de acordo com a tendência observada pelas retas calculadas na Figura 5.2. Também é notável a concentração expressiva de poros abertos nos *scaffolds* aqui preparados (acima de 60%). Este é um importante resultado, pois *scaffolds* com expressivas concentrações de poros abertos são essenciais na regeneração de tecidos danificados e na colonização de células [50].

A Figura 5.3 exhibe imagens de micro-CT obtidas para VB10, VB20 e VB26. Observa-se que a amostra VB26 apresentou uma estrutura fina de poros, enquanto a VB10 exibiu grandes poros em sua estrutura. A amostra VB20 demonstrou comportamento intermediário em termos de porosidade, no qual poros em forma de bastão são observados em sua estrutura. A Figura 5.4 apresenta as distribuições de tamanho de poros avaliadas para esses materiais. Observa-se que quanto maior a carga sólida na suspensão de partida, mais fina é a estrutura de poros do material obtido. VB26, VB20 e VB10 exibiram tamanhos médios de poros em torno de 45, 72 e 120 μm , respectivamente.

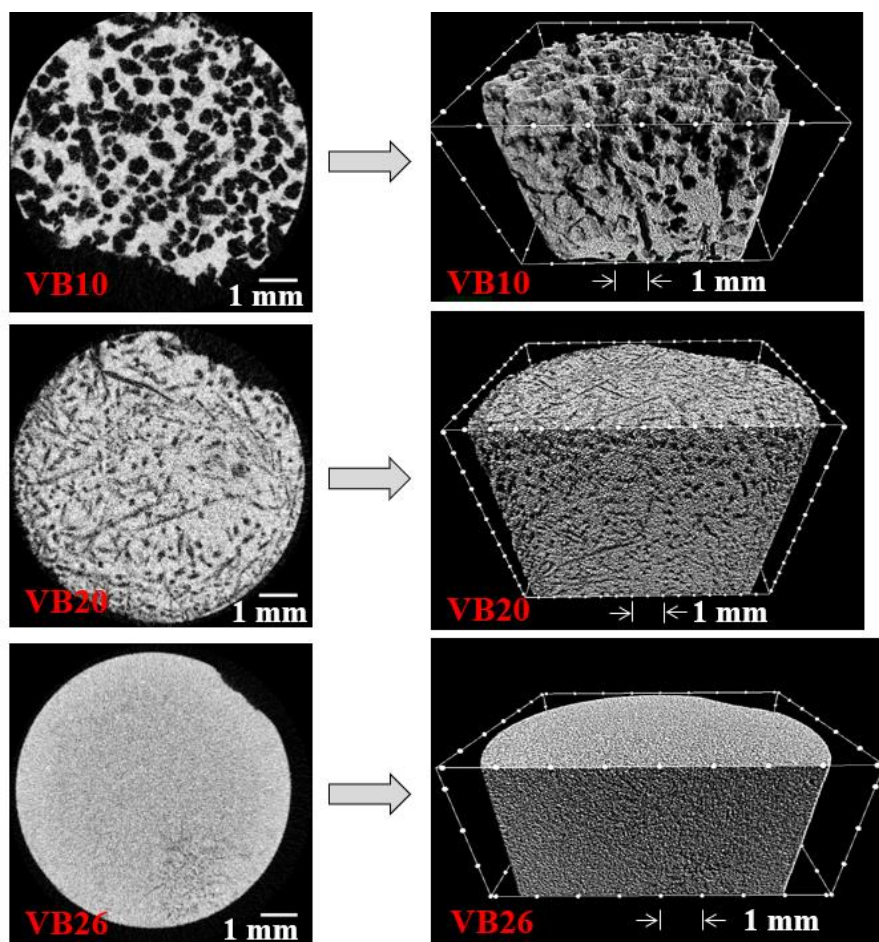


Figura 5.3: Imagens de micro-CT obtidas para *scaffolds* preparados com diferentes teores de VB. As regiões escuras são poros enquanto as claras representam a fase sólida.

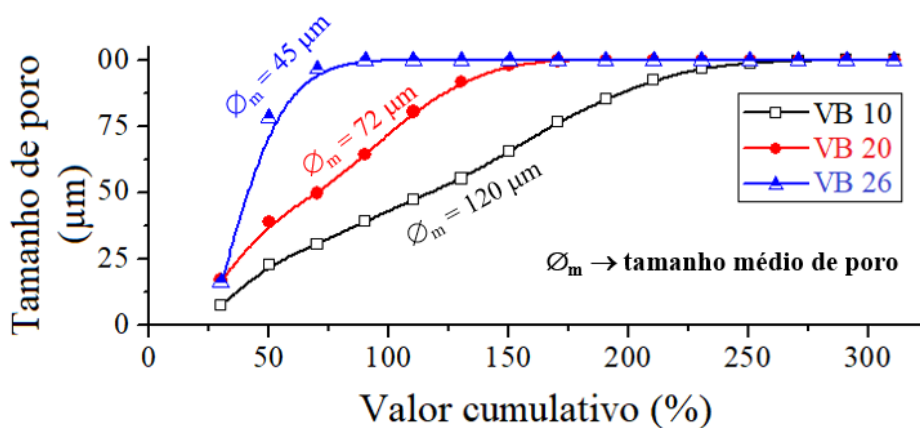


Figura 5.4: Distribuições de tamanho de poros estimadas por micro-CT para *scaffolds* preparados com diferentes cargas de VB.

Este comportamento também é observado na Figura 5.5 onde são exibidas micrografias de MEV dessas amostras. Poros grandes exibindo tamanhos de até 250 e 150 μm foram observados respectivamente para VB10 e VB20, enquanto VB26 exibiu poros inferiores a 80 μm .

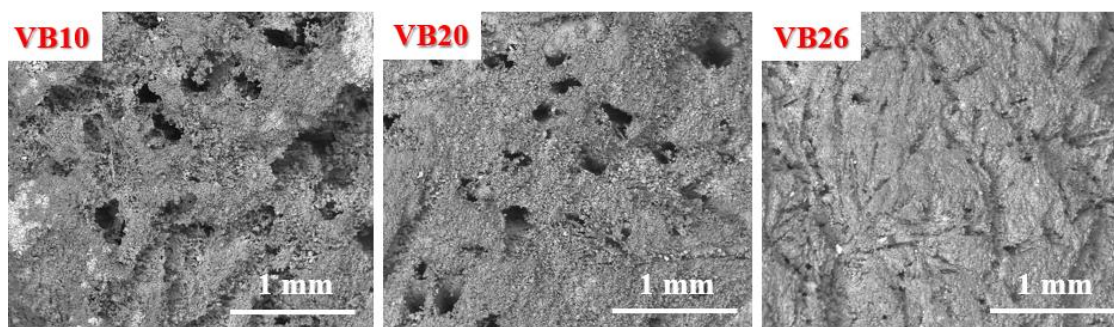


Figura 5.5: Micrografias de MEV obtidas para *scaffolds* obtidos utilizando diferentes teores de VB.

As resistências à compressão dos *scaffolds* VB10, VB20 e VB26 são mostradas na Figura 5.6. Nota-se que quanto maior a porosidade da amostra, menor é sua resistência mecânica. Neste trabalho, VB10, VB20 e VB26 exibiram resistências à compressão iguais a $0,15 \pm 0,04$, $1,52 \pm 0,30$ e $4,10 \pm 0,65$ MPa, respectivamente. Além de aumentar a resistência mecânica dos *scaffolds* preparados, o aumento da carga sólida também diminuiu a variação de resistência.

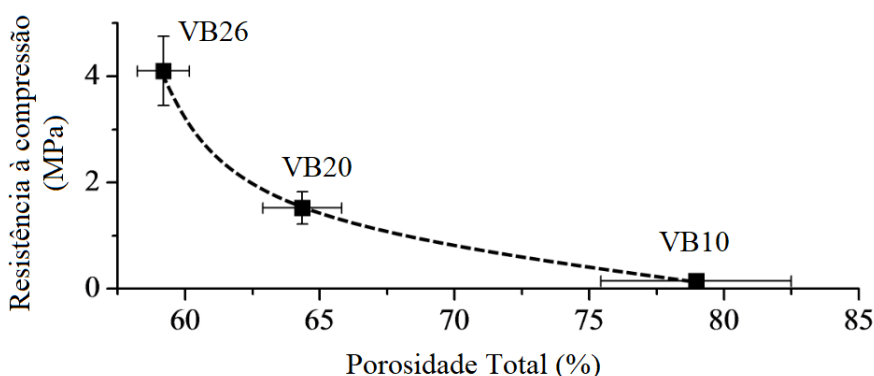


Figura 5.6: Resistência à compressão em temperatura ambiente para *scaffolds* de VB obtidos com diferentes cargas de sólidos.

O módulo de Weibull avaliado para VB10, VB20 e VB26 foi 3,3, 4,9 e 5,9, respectivamente. É relatado na literatura que quanto maior o módulo de Weibull, menor a variabilidade da resistência mecânica dentro de um grupo de amostras [108]. O aumento do módulo de Weibull é um ganho expressivo quando se considera processos industriais, pois se tem maior segurança na produção e aplicação de peças já que a homogeneidade de resistência entre amostras minimiza a ocorrência de falhas para tensões abaixo do valor esperado.

Com base nos resultados descritos até aqui, decidiu-se utilizar o VB20 como ideal para infiltração de PCL. Esta amostra apresentou porosidade total em torno de 64,4% e tamanho médio de poros de 72 μm . Além disso, exibiu significativa resistência mecânica (cerca de 1,5 MPa), o que permite sua aplicação em engenharia de tecidos ósseos [39]. Mesmo a amostra VB26 exibindo força mecânica expressiva (em torno de 4 MPa) ela não foi escolhida por apresentar uma fina estrutura de poros, como mostrado nas Figuras 5.3 a 5.15. Essa porosidade fina poderia diminuir a bioatividade do *scaffold*, pois é provável que dificulte o crescimento interno do tecido, o transporte de nutrientes e a angiogênese. No outro extremo, a amostra VB10 exibiu grande porosidade (~ 79%), mas uma baixa resistência à compressão (~ 0,15 MPa). Esta baixa estabilidade mecânica limita seu uso para aplicações em engenharia de tecido ósseo.

5.3.2. INFILTRAÇÃO DE PCL NA AMOSTRA VB20

Observou-se que as soluções de acetona apresentando concentrações de PCL de 5 (VB20-PCL5), 12,5 (VB20-PCL12) e 20% (peso/volume) (VB20-PCL20) deram origem a amostras com cargas de polímero iguais a $3,4 \pm 0,4$, $14,1 \pm 1,0$ e $29,0 \pm 2,3$ %vol, respectivamente. Esses valores foram obtidos a partir da Equação (2). A Figura 5.7 exhibe a porosidade dos *scaffolds* de VB em função da carga de PCL neles infiltrada. Observa-se que quanto maior a concentração de PCL, menor é a porosidade do *scaffold*. Isso se deve à penetração do polímero na porosidade aberta do material, resultando na diminuição da sua porosidade total.

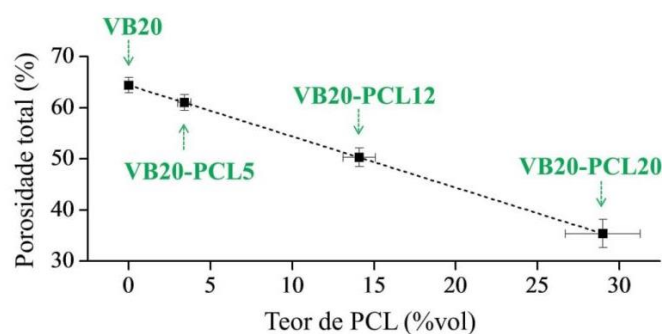


Figura 5.7: Influência do teor de PCL infiltrado sobre a porosidade dos *scaffolds* produzidos. BG20-PCL5, BG20-PCL12 e BG20-PCL20 se referem a *scaffolds* de BG20 infiltrados com soluções de acetona contendo concentrações de PCL em torno de 5, 12,5 e 20 % (peso/volume), respectivamente.

A Figura 5.8 mostra micrografias de MEV da superfície da fratura desses *scaffolds*. Fibras de PCL conectando partículas VB são notadas nestas imagens, revelando que o polímero foi infiltrado com sucesso na estrutura das amostras.

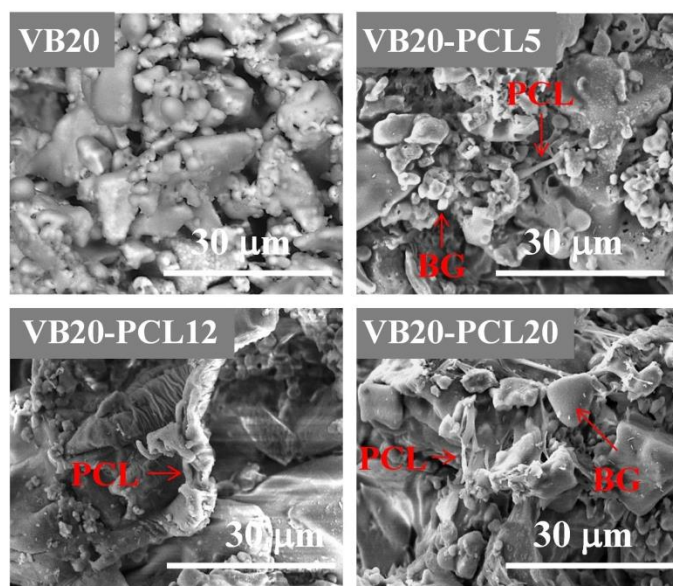


Figura 5.8: Micrografias de MEV da superfície de fratura de *scaffolds* de VB contendo diferentes teores de PCL.

As curvas de tensão × deformação obtidas para os *scaffolds* infiltrados com PCL são exibidas na Figura 5.9, enquanto a Figura 5.10 apresenta as resistências à compressão

calculadas. Os valores obtidos para o *scaffold* sem o polímero são também mostrados para fins comparativos. Observa-se que a adição de PCL aumentou a estabilidade mecânica do VB20. Esse comportamento é mais pronunciado para VB20-PCL12 e VB20-PCL20, onde o teor de PCL incorporado ao material é maior. Nenhum efeito de aumento da resistência à compressão foi observado para VB20-PCL5, devido à pequena concentração de PCL neste material ($3,4 \pm 0,4$ vol%). No entanto, embora VB20 e VB20-PCL5 apresentassem resistências à compressão semelhantes, o último exibiu uma maior tenacidade à fratura.

A tenacidade está associada à área sob a curva de tensão \times deformação e se refere à energia absorvida pelo material durante sua fratura. Para fins de comparação, avaliou-se a área sob as curvas tensão \times deformação mostradas na Figura 5.9 considerando-se uma deformação de até 0,15. VB20, VB20-PCL5, VB20-PCL12 e VB20-PCL20 apresentaram valores em torno de $0,8 \times 10^5$, 1×10^5 , $2,7 \times 10^5$ e $3,8 \times 10^5$ J/m³, respectivamente.

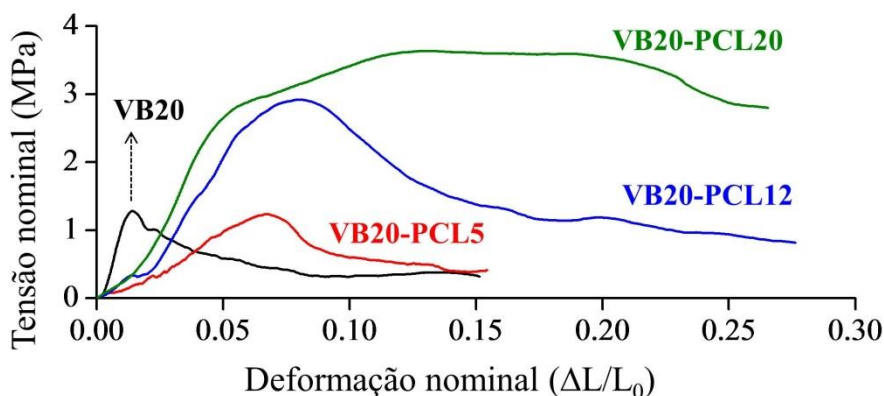


Figura 5.9: Curvas tensão \times deformação obtidas para *scaffolds* infiltrados com PCL. A curva referente ao material sem polímero (VB20) é também exibida para fins comparativos.

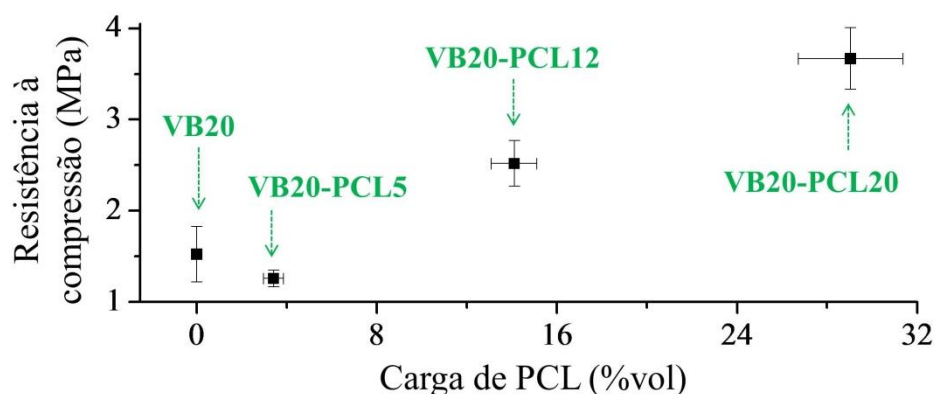


Figura 5.10: Resistência à compressão calculada para os materiais cujas curvas tensão \times deformação são apresentadas na Figura 5.19.

Os resultados obtidos reforçam quantitativamente o aumento da tenacidade à fratura dos *scaffolds* de VB à medida que uma maior quantidade de PCL é impregnada no *scaffold*. VB20-PCL12 e VB20-PCL20 exibiram um notável efeito de fortalecimento em termos de resistência à compressão e tenacidade à fratura. Nota-se que este comportamento é mais evidente quanto maior o carregamento de PCL no *scaffold*.

A forma mais suave das curvas de tensão \times deformação obtidas para amostras infiltradas por PCL também indica que o compósito manteve alguma resistência mecânica significativa, mesmo após múltiplos eventos de fratura. Segundo Martínez-Vázquez *et al.* [105], a incorporação de polímeros em estruturas cerâmicas acarreta na transferência de carga da fase cerâmica para a fase polimérica, o que melhora a resistência mecânica do *scaffold*. Além disso, o polímero pode preencher defeitos pré-existentes da estrutura, unindo as partículas cerâmicas e aumentando a tensão necessária para propagação das trincas geradas. A ligação de partículas de VB por fibras PCL é observada na Figura 5.8. Além de melhorar a resistência à compressão e a tenacidade à fratura da amostra VB20, a incorporação de PCL também aumentou seu módulo de Weibull de 4,9 para aproximadamente 9,7.

A amostra VB20-PCL12 foi utilizada nos ensaios de biocompatibilidade por se tratar de material que apresentou expressiva porosidade total ($55,32 \pm 2,46\%$) e resistência à compressão (cerca de 2,5 MPa), além de boa tenacidade à fratura. O *scaffold* VB20

também foi analisado para efeitos de comparação e a Figura 5.11 é representativa dessa amostra.

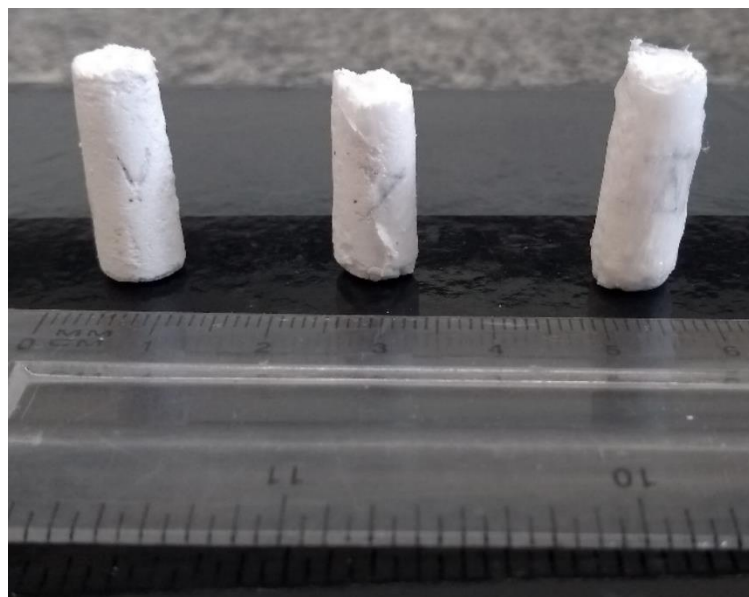


Figura 5.11 – Imagem de *scaffolds* produzidos VB20-PCL12 utilizados para ensaio de compressão uniaxial

5.3.3. ENSAIOS DE BIOCOMPATIBILIDADE E BIOATIVIDADE

Neste estudo avaliou-se a toxicidade dos *scaffolds* produzidos em células SAOS e a capacidade das amostras em produzirem camada de HAP quando imersas em SBF. Células SAOS, desde sua primeira descrição em 1975, têm sido amplamente utilizadas como modelo experimental para osteoblastos. Isso se justifica, pois sua caracterização e documentação são amplamente conhecidas e sua cultura é de fácil manuseio e proliferação. Além disso, sua capacidade em gerar matriz mineralizada quando estimulada torna esse tipo celular um modelo experimental atrativo para o estudo de tecidos mineralizados [109].

A Figura 5.12 mostra imagens obtidas a partir do ensaio LIVE/DEAD®. Trata-se de um teste de viabilidade celular fluorescente de duas cores baseado na determinação simultânea de células vivas (luminescência verde) e mortas (luminescência vermelha). Observa-se que VB20 e VB20-PCL12 apresentaram comportamento semelhante ao grupo

controle em termos de fluorescência verde (células vivas). No entanto, algumas células mortas, em vermelho, foram encontradas para VB20 e VB20-PCL12, possivelmente devido ao sufocamento mecânico de células pelos *scaffolds*.

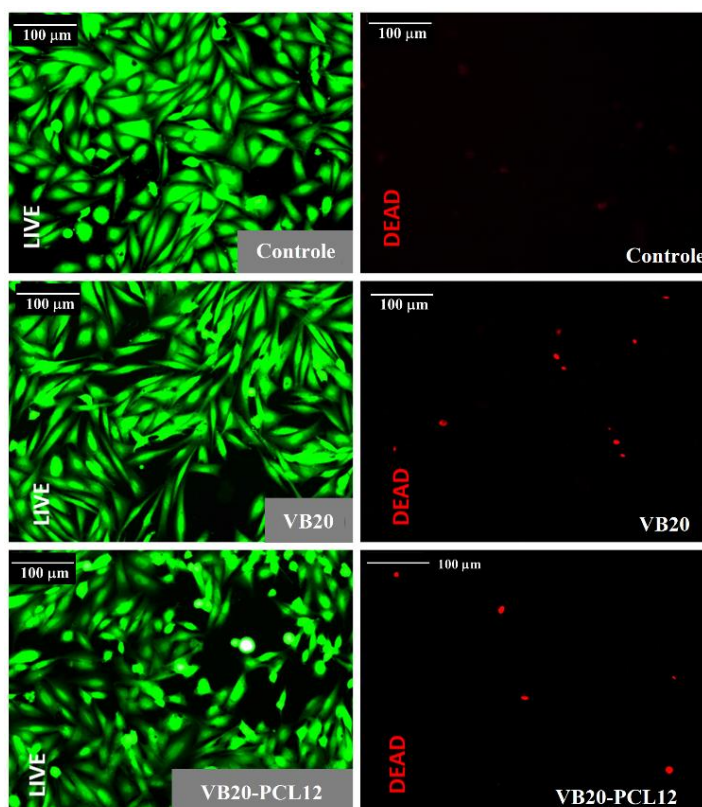


Figura 5.12: Resultados obtidos a partir do ensaio LIVE/DEAD®. As luminescências verde e vermelha correspondem a células vivas e mortas, respectivamente. As barras de escala mostradas nessas imagens representam 100 µm.

A Figura 5.13 apresenta os resultados obtidos a partir do ensaio MTT. *Scaffolds* VB20 exibiram, estatisticamente, maior viabilidade celular do que o grupo controle, enquanto VB20-PCL12 mostrou um comportamento similar ao controle. Ambos VB20 e VB20PCL12 exibiram viabilidade celular acima de 70%, o que revela que eles não interferiram negativamente na produção de células SAOS.

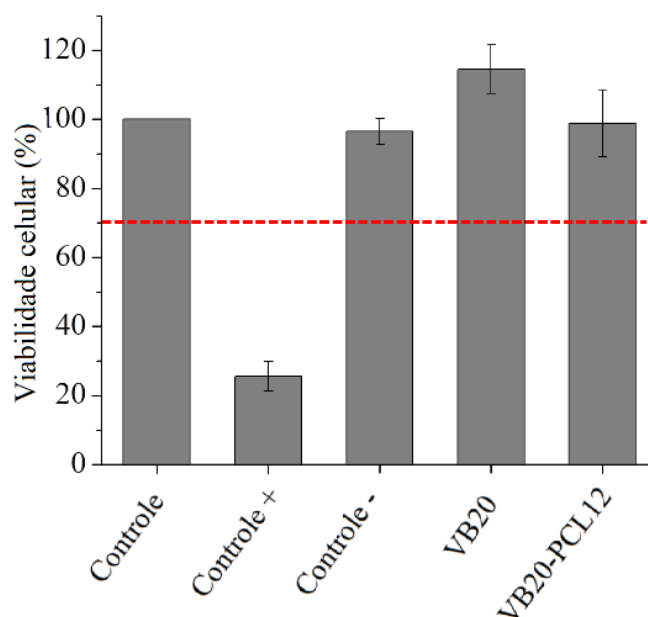


Figura 5.13: Resultados obtidos a partir do ensaio de viabilidade celular por MTT. A linha tracejada exibida na Figura corresponde a uma viabilidade celular de 70%, utilizada como referência nesses testes.

A menor viabilidade celular exibida pela VB20-PCL12 quando comparada à VB20 pode estar relacionada à presença de PCL. Como representado na Figura 5.7, a infiltração de PCL no *scaffold* VB20 diminuiu a sua porosidade. É relatado na literatura que a resposta biológica de um *scaffold* de VB está fortemente relacionada à sua porosidade [110]. Assim, a diminuição da porosidade observada quando o PCL foi infiltrado nos poros do *scaffold* VB20 pode explicar a menor viabilidade celular exibida pelo VB20-PCL12.

Além disso, deve-se considerar a diminuição significativa na área superficial específica (280 versus 0,6 m²/g), volume de poros (0,45 versus 8×10⁻⁴ cm³/g) e tamanho médio dos poros (6,4 versus 4,8 nm) do VB quando foi sinterizado a 1250 °C. A pequena porosidade apresentada após a sinterização pode ser o fator responsável pela resposta biológica exibida por VB20 e VB20-PCL12. Tem sido relatado que quanto maior a porosidade do VB, maior é a sua bioatividade [111].

Além de fatores como porosidade e área superficial, a composição química e estrutura do material são fundamentais na formação da camada de HA responsável por grande parte

da bioatividade do material. Na Figura 5.14 é mostrado o padrão de DRX da amostra VB20-PCL12 em contato com a solução de SBF em diversos tempos. Observa-se picos de HA e HAC respectivamente em 26° e 47° somente após 7 dias. Esse resultado condiz com o fato de parte da superfície do *scaffold* estar recoberta com PCL, que impede o contato direto com a solução de SBF em instantes iniciais.

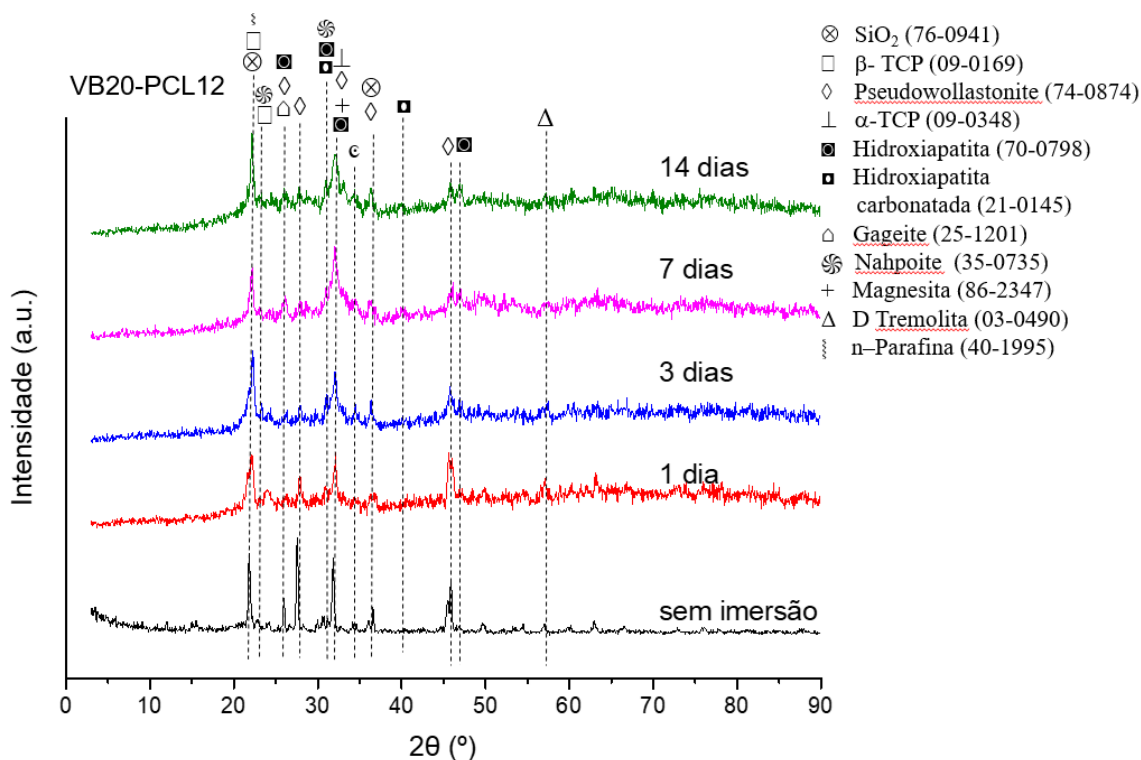


Figura 5.14 Padrão de DRX de amostras de VB impregnadas com PCL e imersas em SBF

No espectro de FTIR (Figura 5.15), observa-se que após a infiltração, a intensidade das bandas de C-H e C=O foram reduzidas devido à interação das carbonilas do PCL com grupos silanol do VB [54]. As bandas de formação de P-O e diminuição de NBO corroboram com o DRX em relação à formação de HA entre o terceiro e sétimo dia.

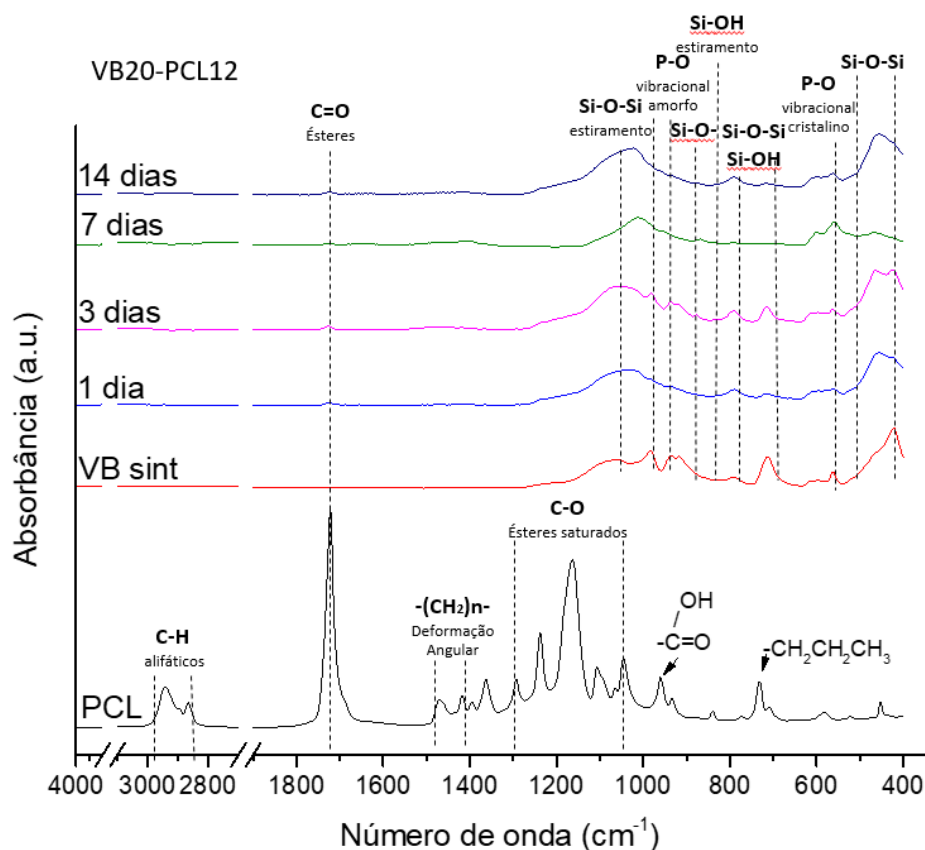


Figura 5.15 – Espectro de FTIR da amostra VB com infiltração de solução Acetona/PCL, imersa em SBF

A Figura 5.16 exibe micrografias de MEV e espectros de EDS obtidos para VB20 antes e após sinterização como também VB-PCL12 após 14 dias de imersão em SBF. Micrografias e espectros associados ao VB20 antes da sua imersão em SBF são também mostrados para fins comparativos. Nódulos são notados em micrografias relativas a materiais imersos em SBF, estruturas comumente observadas para a HAP [100]. Os espectros de EDS apresentados na Figura 5.16 revelam uma presença significativa de fósforo e cálcio nestas estruturas, sugerindo também que tais nódulos são formados por HAP. De fato, observa-se que a relação Ca/P é diferente para a amostra VB20 antes e após sua imersão em SBF, o que novamente pode indicar a formação de HAP. Os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular e de imersão em SBF revelam que os *scaffolds* VB20 e VB-PCL12 exibem comportamento biocompatível.

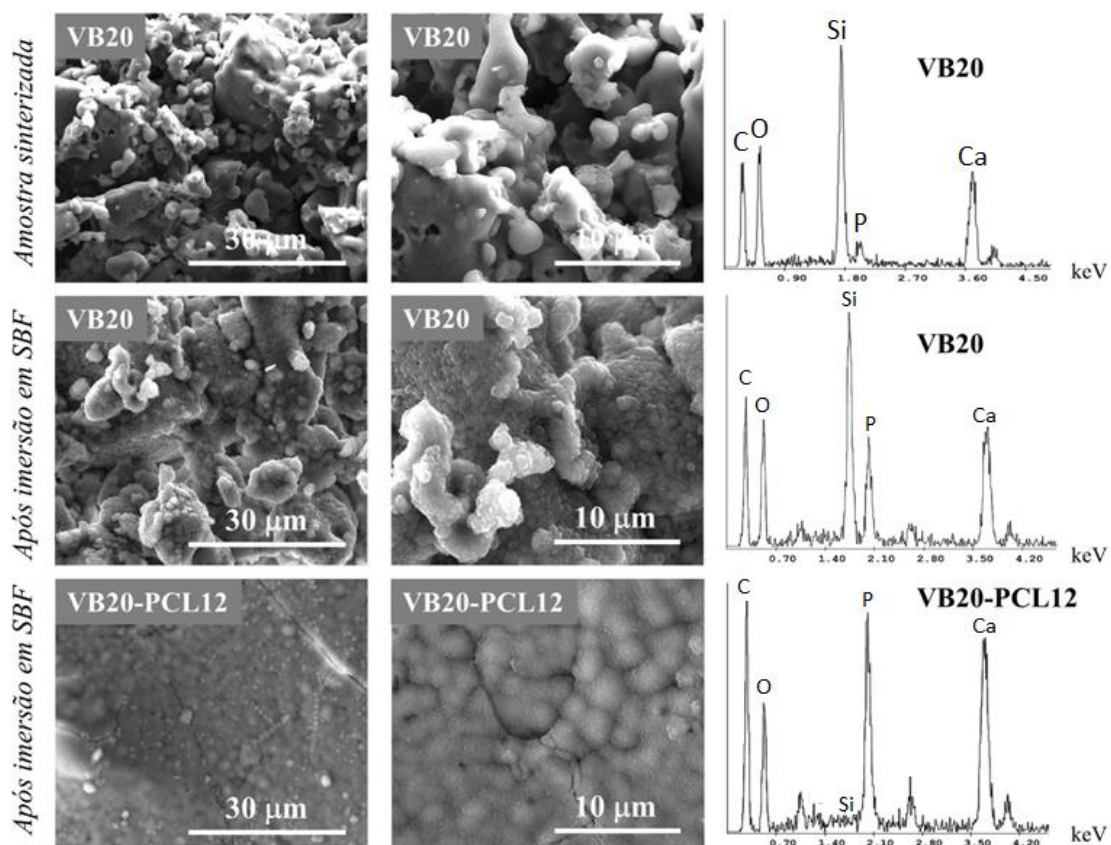


Figura 5.16: Micrografias de MEV e espectros de EDS obtidos para VB20 e VB-PCL12 após 14 dias de imersão em SBF. Micrografias e espectros associados ao VB20 antes da sua imersão em SBF são também mostrados para fins comparativos.

5.4. CONCLUSÃO

O aumento da carga cerâmica da suspensão é diretamente proporcional ao volume de poros do *scaffold* mas ainda assim, em todas as soluções utilizadas (10, 20 e 26% de volume de VB), o valor de porosidade aberta era próximo ao da porosidade total (76,65, 61,25, 56,4% de porosidade total/aberta, respectivamente). Dessa forma garante-se que o processo freeze casting é eficiente em criar poros abertos e interconectados. O aumento do volume de partículas cerâmicas influencia na resistência mecânica e na distribuição do tamanho médio de poros e. Quanto menor for o volume cerâmico utilizado, menor a resistência e maior o tamanho médio dos poros, mas não existe uma correlação matemática de primeiro grau entre essas variáveis. O aumento da carga cerâmica também aumenta o módulo de Weibull. As amostras VB10, VB20 e VB26 apresentaram respectivamente 3,3, 4,9 e 5,9 de módulo. A amostra VB20 apresentou valor

intermediário de resistência à compressão, tamanho de poros e volume de poros, sendo à escolhida e mais indicada para o processo de impregnação.

Houve uma relação direta entre o aumento da concentração de PCL na solução de acetona e a quantidade de polímero infiltrada no *scaffold*: VB20-PCL5, VB20-PCL12 e VB20-PCL20 apresentaram respectivamente 3,4, 14,1 e 29,0% em volume de PCL infiltrado. Pelo mesmo princípio, a porosidade total das amostras decaiu de forma linear. Em relação ao *scaffold* sem polímero (VB20), a infiltração de PCL não foi significativamente diferente para a concentração de 50g/L, entretanto houve aumento discreto da tenacidade (de $0,8 \times 10^5$ para $1,0 \times 10^5$ J/m³). A resistência a compressão aumentou 500% quando a concentração da solução foi de 125 g/L e sua tenacidade foi $2,70 \times 10^5$ J/m³. Nessa concentração de PCL, seu módulo de Weibull foi elevado de 4,9 para 9,7. O ganho em resistência à compressão foi de 700% quando a concentração de 200g/L foi utilizada e sua tenacidade foi de $3,80 \times 10^5$ J/m³. Como o ganho não foi tão pronunciado mas a porosidade foi comprometida, a amostra VB20-PCL12 foi escolhida como mais indicada para aplicações biomédicas.

Apesar da diferença estatística em viabilidade celular mitocondrial no ensaio LIVE/DEAD, as amostras antes e após a infiltração foram iguais ou superiores ao grupo controle, indicando que o processo de adição de PCL não é biologicamente incompatível. O PCL recobre parcialmente as partículas de VB e por isso, sua bioatividade cai em relação ao vidro puro. A formação da camada de HA passa de 24 h para 7 dias.

CAPÍTULO 6. FREEZE-CASTING E IMPREGNAÇÃO DE PCL POR IMERSÃO EM POLÍMERO FUNDIDO

6.1. INTRODUÇÃO

Partindo das amostras de *scaffolds* sinterizados denominadas VB20 e caracterizadas nos capítulos anteriores, foi testada uma rota na qual o polímero era fundido antes da etapa de impregnação da amostra. Após resfriamento, a amostra denominada VB20M (M do inglês *meltd*), apresentou uma espessa camada de PCL que recobria toda sua superfície, impossibilitando análises de porosidade por Arquimedes. Entretanto, essas amostras foram examinadas por micro-CT para avaliação da porosidade interna, visto que um grande volume de PCL penetrou nos poros da estrutura conforme será mostrado a seguir.

6.2. MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1. PRODUÇÃO DE *SCAFFOLDS* E IMPREGNAÇÃO DE PCL EM BANHO FUNDIDO

Semelhante à rota descrita capítulo anterior, este processo se diferencia somente nas etapas posteriores à sinterização dos *scaffolds* de VB. Após a preparação desses materiais, os *scaffolds* foram acondicionados em cadinho de porcelana contendo o PCL. Esse conjunto foi então aquecido ao ar a 200 °C por 2 h, resultando na fusão do polímero. Segundo Eqtesadi *et al.* [112], essa temperatura permite a obtenção de banho com expressiva fluidez, sem prejuízos à cristalinidade do polímero. A seguir, os *scaffolds* foram retirados do banho polimérico e resfriados ao ar. A Figura 6.1 apresenta esquema dessa metodologia.

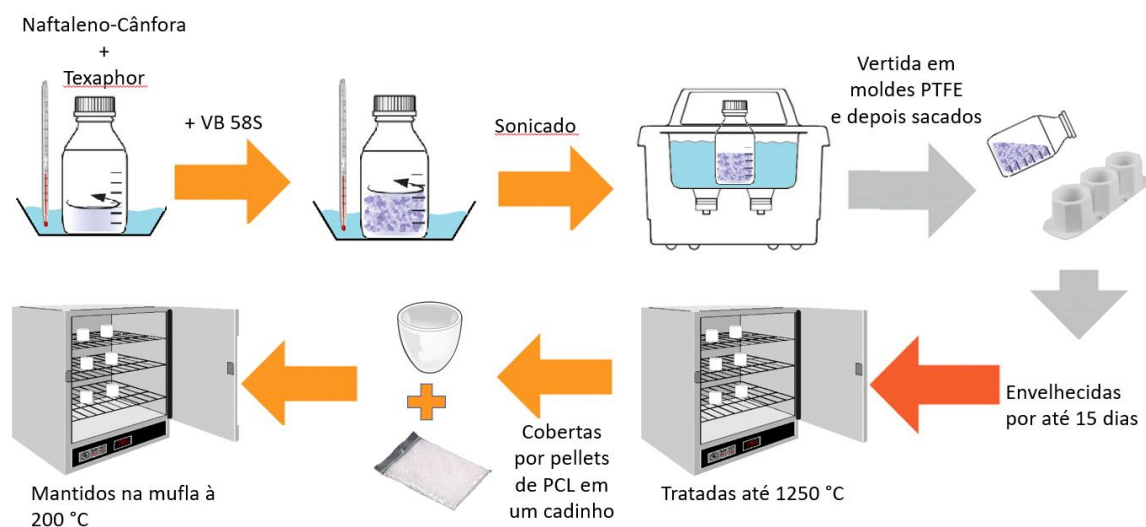


Figura 6.1: Metodologia empregada na fabricação de *scaffolds* compostos através da infiltração do VB em banho de PCL fundido.

6.2.2. CARACTERIZAÇÕES

As caracterizações dos *scaffolds* por DRX, FTIR, MEV e EDS, comportamento em SBF, testes de viabilidade celular, micro-CT e resistência à compressão foram executadas da mesma maneira como descrita no capítulo anterior. O ensaio de Arquimedes não foi possível uma vez que toda a superfície do material foi recoberta por PCL.

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1. ANÁLISE DA INFILTRAÇÃO DE PCL NA AMOSTRA VB20M

Foi observado por micro-CT que a amostra examinada apresentou 9%, 25% e 34% de porosidade aberta, fechada e total. Isso indica que o efeito de capilaridade em poros pequenos como os da amostra (diâmetro médio de 72 μm) é suficientemente forte para vencer a resistência devido à viscosidade. Na Figura 6.2 é mostrada a reconstrução da amostra com PCL e fase cerâmica.

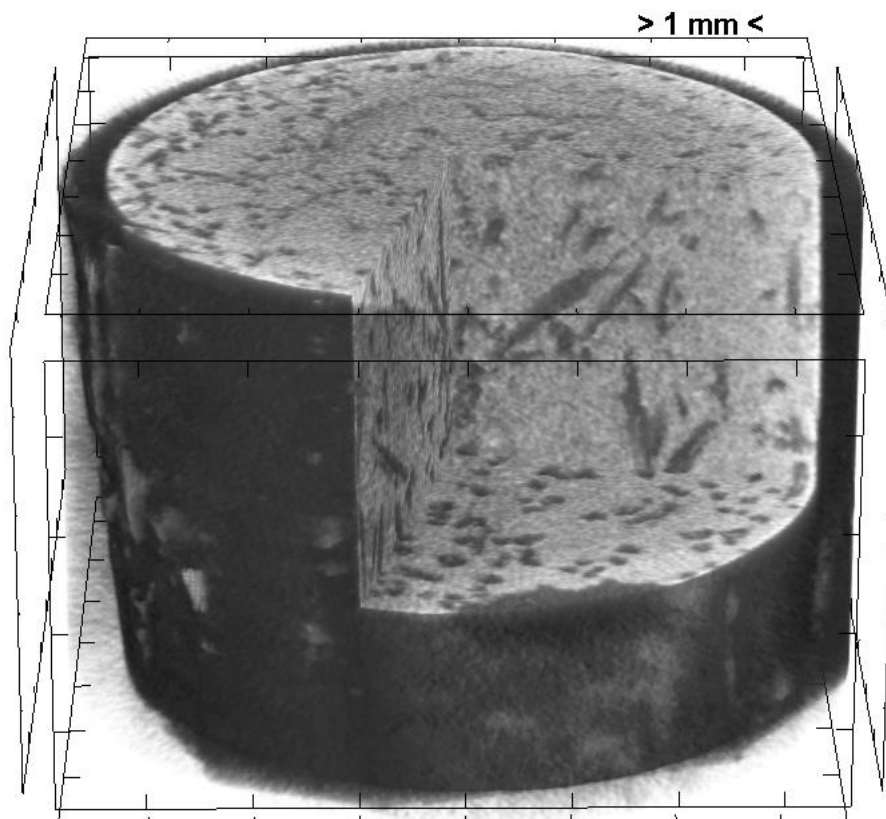


Figura 6.2 - Reconstrução da microtomografia da amostra VB20M evidenciando a espessa capa de polímero que se formou na superfície da amostra

A maior quantidade de PCL infiltrada em relação às outras rotas é devido à associação de dois fatores: o primeiro é o reduzido diâmetro de poros, que gera uma maior capilaridade e promove uma maior força motriz para a entrada do polímero na estrutura; o segundo fator é a alta porosidade interconectada do *scaffold*, que possibilita que o PCL alcance não somente a superfície da estrutura.

Conforme dito anteriormente, as amostras VB20M foram recobertas por uma espessa camada de PCL que pode ser observada nas micrografias da Figura 6.3. Do lado esquerdo da Figura temos a região externa do *scaffold*, completamente recoberta e não exibindo nenhum poro. Do lado direito, ampliações crescentes da região interna da amostra, evidenciando que o polímero conseguiu penetrar profundamente no *scaffold*. Especialmente na maior ampliação, é visível que o polímero não recobre completamente

as partículas de VB, o que garante uma bioatividade maior para aplicações em tecidos ósseos.

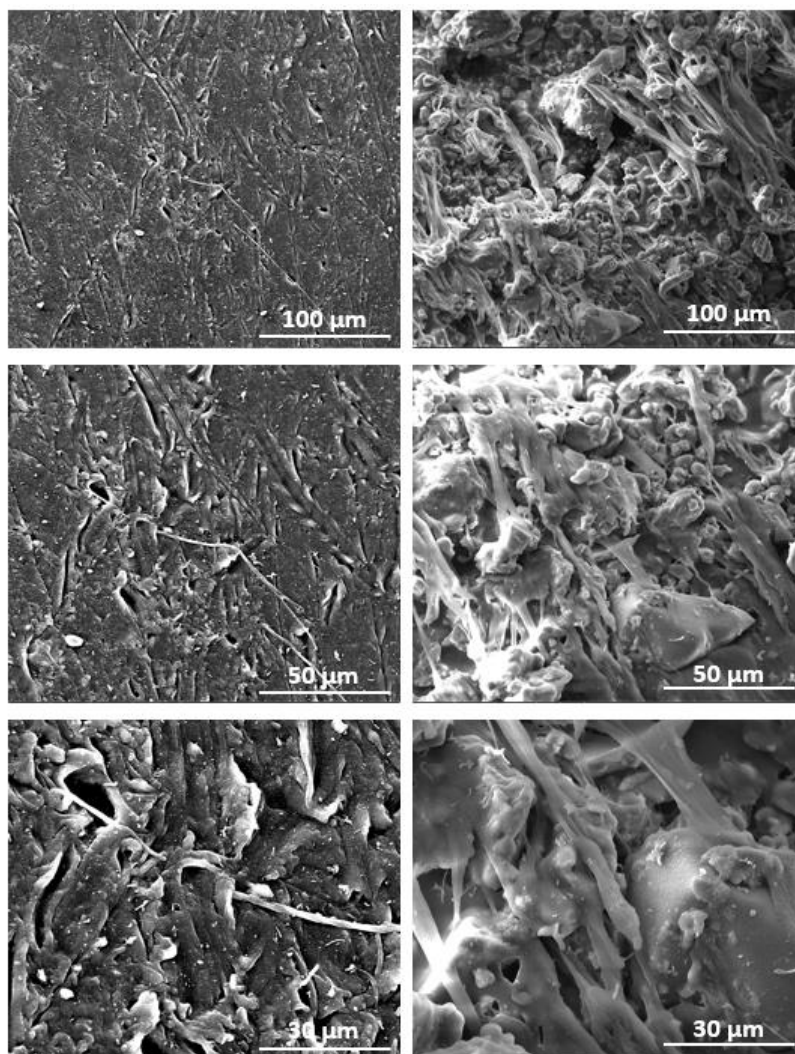


Figura 6.3 - MEV da amostra de VB20M em diversas ampliações. Do lado esquerdo tem-se a superfície externa do *scaffold* e do lado direito a superfície de fratura interna.

O efeito de reforço gerado no banho de PCL fundido pôde ser observado no aumento da resistência mecânica das amostras. Comparativamente com o VB20 sem polímero, o ganho tanto de tenacidade como tensão máxima foram pronunciados, sendo esta última de $6,9 \pm 3,4$ MPa. Isso se deve ao fato da grande quantidade de polímero infiltrada que reforça o material em toda sua extensão e promove o deslizamento de cadeias amorfas, além de servir como uma rede interligando as partículas cerâmicas e evitando a total ruptura.

6.3.2. AVALIAÇÃO DE BIOCOMPATIBILIDADE E BIOATIVIDADE

O resultado do ensaio de LIVE/DEAD e MTT são exibidos na Figura 6.4a e 6.4b, respectivamente. As amostras VB20 e VB20M apresentaram o mesmo comportamento para células viáveis (em verde) em relação ao grupo controle. O comportamento das duas se manteve semelhante para a fluorescência em vermelho, indicando poucas mortes celulares em relação ao grupo controle.

Quanto ao ensaio de MTT, o resultado de ambas foi estatisticamente superior quando comparado ao grupo controle. Esse fato corrobora para a suposição de que os elementos existentes nas duas formulações auxiliam no crescimento celular, uma vez que pequenas alterações de íons no meio extracelular podem ocasionar no crescimento e/ou diferenciação de células bem como mudança de metabolismo (o que pode ser o resultado do aumento de mitocôndrias viáveis) [34].

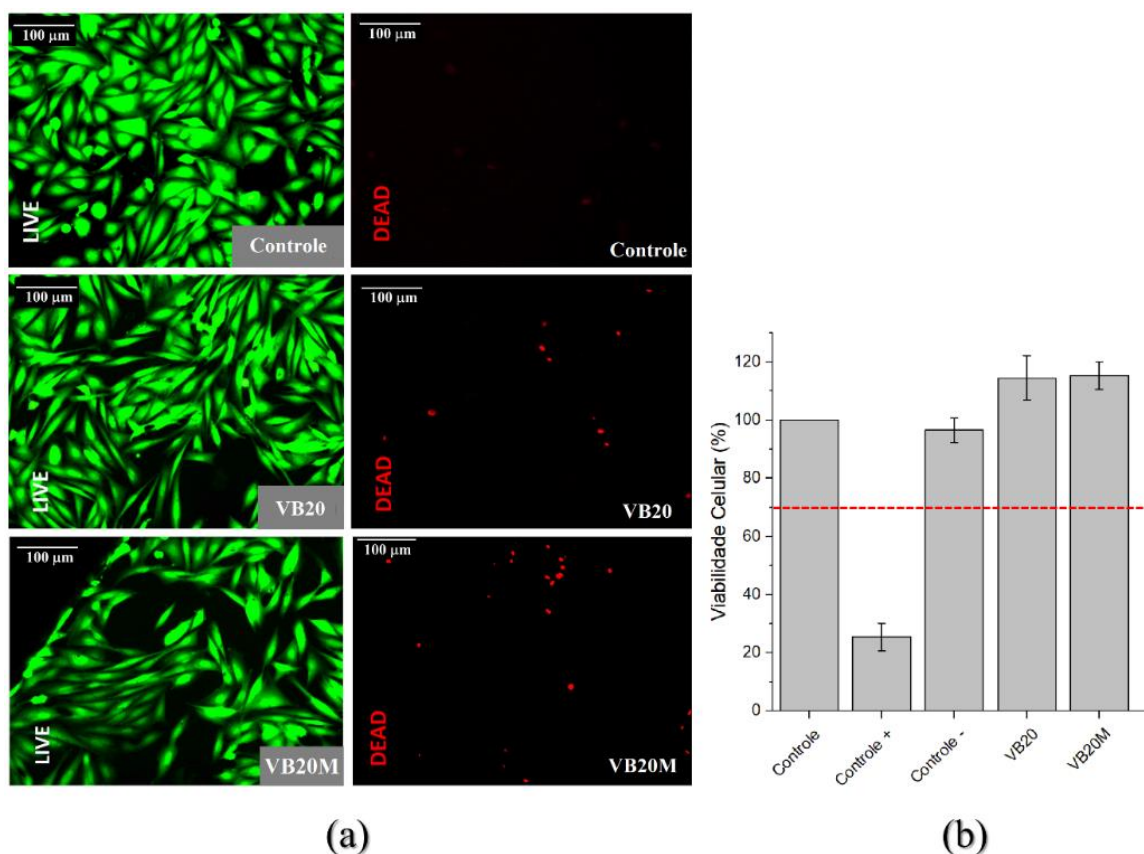


Figura 6.4 - (a) Resultado LIVE/DEAD e (b) em análise de MTT para as amostras VB20 e VB20-PCL12.

Em relação à bioatividade, as amostras VB20M que foram recobertas em banho de PCL fundido apresentaram a menor velocidade para a formação da camada de HA. O padrão de DRX (Figura 6.5) evidencia fracos picos somente entre 7 e 14 dias de imersão, enquanto no FTIR a banda de ligações P–O associada à HA só aparece após 14 dias (Figura 6.6). As fases adicionais observadas se devem ao fato de esses materiais não terem sido lavados antes das caracterizações e a formação de sais precipitados na superfície da amostra analisada.

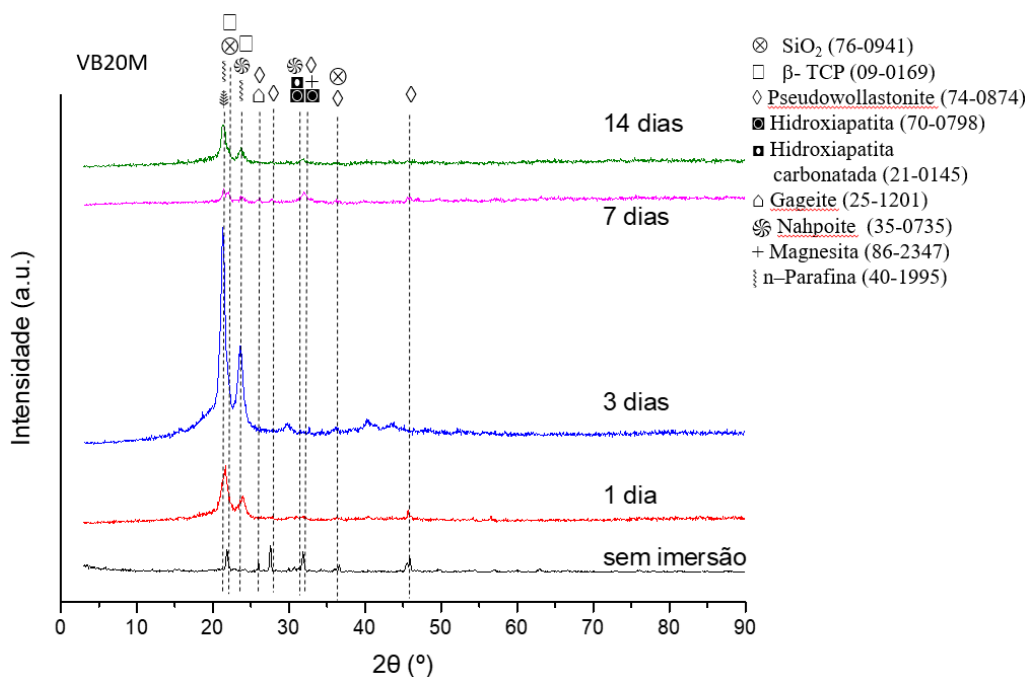


Figura 6.5 – Padrão DRX de amostras de VB20M em SBF

Os picos de DRX fortes observados em torno de 21° e 23° são atribuídos, respectivamente, aos planos cristalinos (110) e (200) do PCL [115]. Esse pico se deve ao fato de a amostra não ter sido triturada devido à elevada resistência do polímero utilizado e o DRX ter analisado a superfície com maior quantidade de polímero.

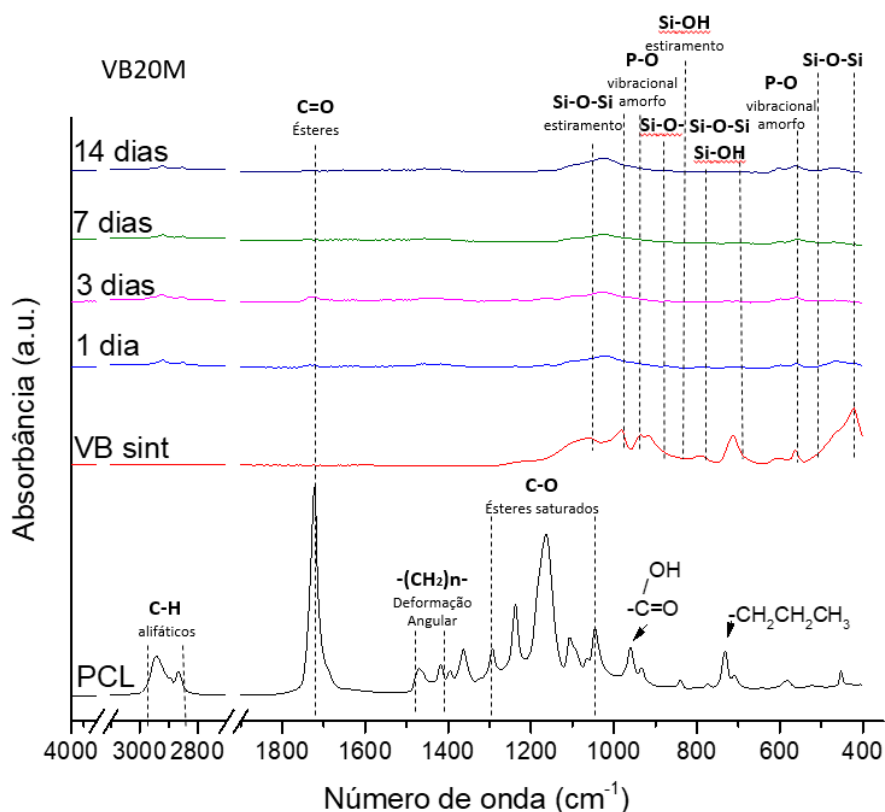


Figura 6.6 – Espectro de amostras VB20M em SBF

A amostra VB20M mostrou a formação de HA quando imersas por 14 dias. A micrografia apresentada na Figura 6.7 exibe aumentos distintos com a formação de estruturas nodulares, características de HA após imersão em SBF [100], que recobrem grande parte da superfície. Juntamente na MEV, foi feita uma análise de EDS sobre uma das estruturas recobertas e picos de fósforo e cálcio foram encontrados em proporções maiores que a formulação original, corroborando para o fato de que essa estrutura é formada por hidroxiapatita. Picos de sódio e cloro foram detectados uma vez que esses elementos fazem parte da solução de SBF e formaram cristais na superfície.

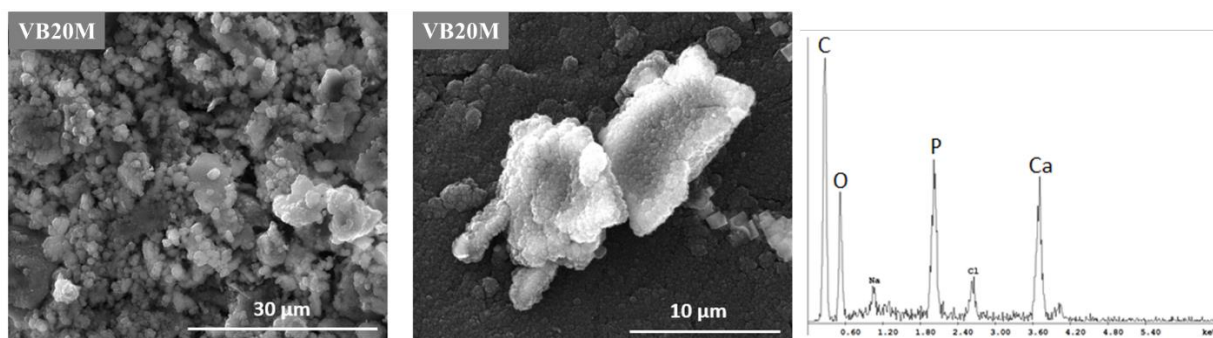


Figura 6.7 - MEV das amostras VB20M após 14 dias de imersão em SBF

6.4. CONCLUSÃO

A porosidade total e aberta do *scaffold* VB20 foi reduzida de 61,25% para 28,55% enquanto a porosidade fechada aumentou de 6,3% para 8,9%. Além disso, uma espessa camada de PCL recobriu toda a superfície externa da amostra, impossibilitando a utilização da técnica de Arquimedes para mensurar a porosidade. Pelo MEV, observou-se que não há superfície de vidro exposta, reduzindo muito a cinética da bioatividade do vidro. Entretanto, essa mesma camada promoveu um ganho de resistência mecânica de $1,5 \pm 0,3$ para $7,0 \pm 3,4$ MPa. Ainda, foi observado que internamente as partículas cerâmicas não foram totalmente recobertas pelo polímero, o que gera a exposição do VB58S e possibilita certa atividade do material. A amostra VB20M se mostrou biocompatível e com maior viabilidade celular mitocondrial que o grupo controle, estatisticamente semelhante a amostra VB20. Isso se deve ao fato de que a amostra utilizada para esses ensaios possuía um volume da parte interna do *scaffold*. Entretanto, a formação da camada de HA se mostrou lenta quando comparada às outras amostras preparadas nesse estudo, sendo identificada apenas aos 14 dias de imersão em SBF.

CAPÍTULO 7. PREPARAÇÃO DE *SCAFFOLDS* COMPÓSITOS SEM ETAPA DE SINTERIZAÇÃO

7.1. INTRODUÇÃO

Diferentemente das rotas de infiltração de PCL por solução de acetona ou fusão, este processo resulta em compósitos nos quais o polímero reforça o material não somente em sua porosidade aberta. Além disso, a não utilização de tratamentos térmicos a 1250 °C evita a cristalização e densificação parcial do VB, o que não compromete sua bioatividade e representa uma economia em termos de energia e tempo.

7.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta rota o PCL foi inicialmente dissolvido em acetona, na proporção 1:3 a 50 °C em recipiente fechado por até 2 h. Após esse período o recipiente foi mantido semiaberto sob agitação, permitindo assim a evaporação parcial do solvente e o aumento da viscosidade da solução. Paralelamente em outro recipiente fechado, canfeno (Aldrich / 95%) foi liquefeito a 70 °C. A seguir, canfeno, ácido cítrico (Aldrich / $\geq 99,5\%$) e VB foram adicionados à solução acetona-PCL sob agitação a 50 °C, sendo o recipiente fechado novamente em seguida. O sistema foi agitado por 1 h para promover sua homogeneização. A fração de VB adicionada foi fixada em 10 % vol, enquanto o teor de ácido cítrico foi mantido em 1 % p da concentração de VB. Após esse período, a solução preparada foi vertida em moldes de PTFE e mantida à temperatura ambiente até sua completa solidificação. A etapa de sublimação do canfeno foi realizada mantendo os materiais produzidos à temperatura ambiente por até 10 dias (Figura 7.1). Por fim, as amostras foram secas ao ar a 60 °C por até 12 h.

A escolha da acetona como solvente para o PCL se deu por sua alta capacidade de dissolver esse polímero a 50 °C e sua alta pressão de vapor, o que facilita a retirada dessa substância após desmoldar o *scaffold* produzido. O ácido cítrico foi escolhido nessa rota por se mostrar eficiente na dispersão das partículas de VB e pela sua alta compatibilidade

biológica, uma vez que não há tratamento térmico nesta rota para garantir a eliminação desse aditivo.

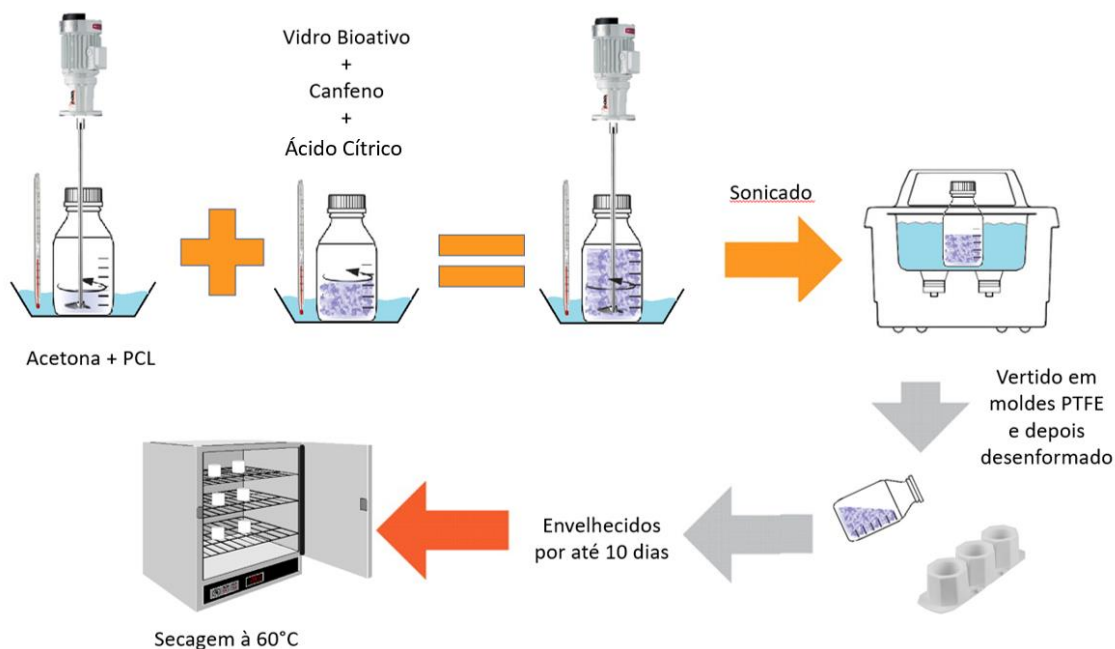


Figura 7.1: Esquema da metodologia utilizada na fabricação de *scaffolds* compósitos sem etapa de sinterização.

7.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A diferença na rota de síntese das amostras, denominadas VB10-PCL10 deste ponto do trabalho em diante, resultou em um *scaffold* com uma estrutura diferente daquela encontrada nas duas outras rotas. Além de ser uma amostra bastante flexível com recuperação elástica visível (Figura 7.2), observa-se na reconstrução da amostra por micro-CT a distribuição uniforme da PCL na extensão da amostra, Figura 7.3. Tais amostras apresentaram porosidades aberta, fechada e total iguais a 55%, 12% e 67%; valores similares àqueles obtidos em ensaios de Arquimedes: 54%, 18% e 72%.



Figura 7.2 – Fotografia da amostra VB10-PCL10 evidenciando sua ductilidade.

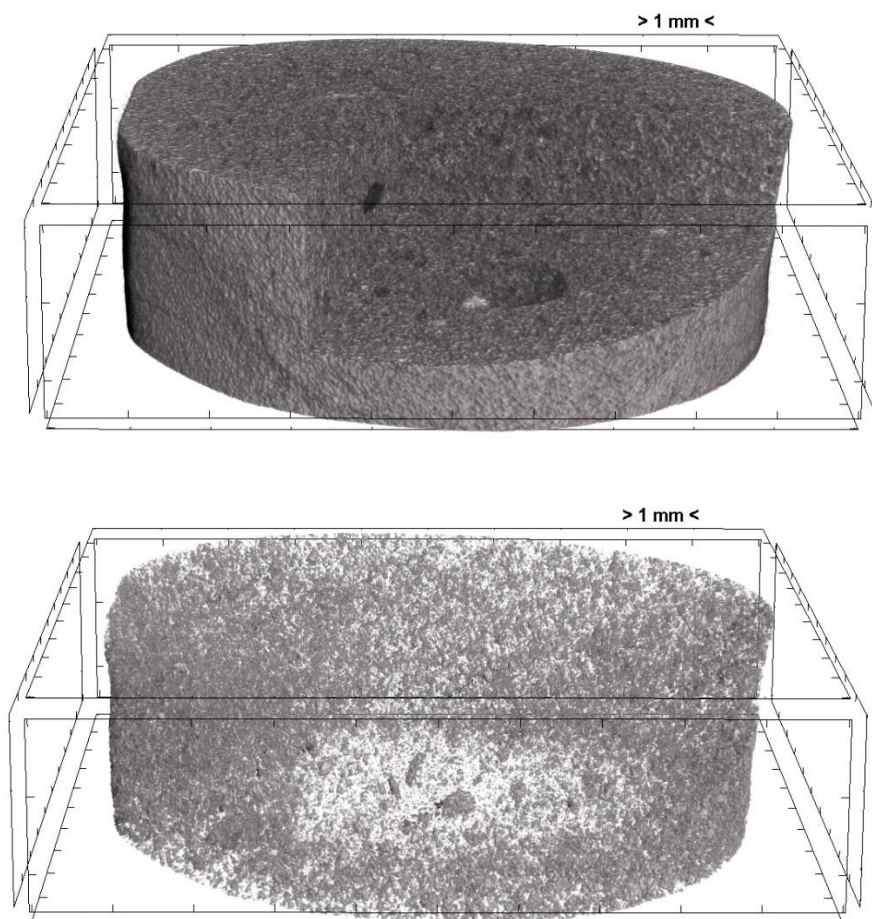


Figura 7.3 Reconstrução por micro-CT da amostra VB10-PCL10 mostrando a atenuação de feixe de energia que está associada à adistribuição das fases. Na imagem superior é possível observar as duas fases e na inferior somente uma fração da parte cerâmica

A micrografia da amostra VB10-PCL10 (Figura 7.4) exibe a fratura interna com uma distribuição mais uniforme do polímero sobre as partículas de VB. A melhor adesão do PCL na superfície cerâmica e o não recobrimento total das partículas são ideais em situações nas quais se espera uma distribuição mais homogênea entre amostras produzidas, melhores propriedades mecânicas e maior interação com o tecido subjacente ao implante.

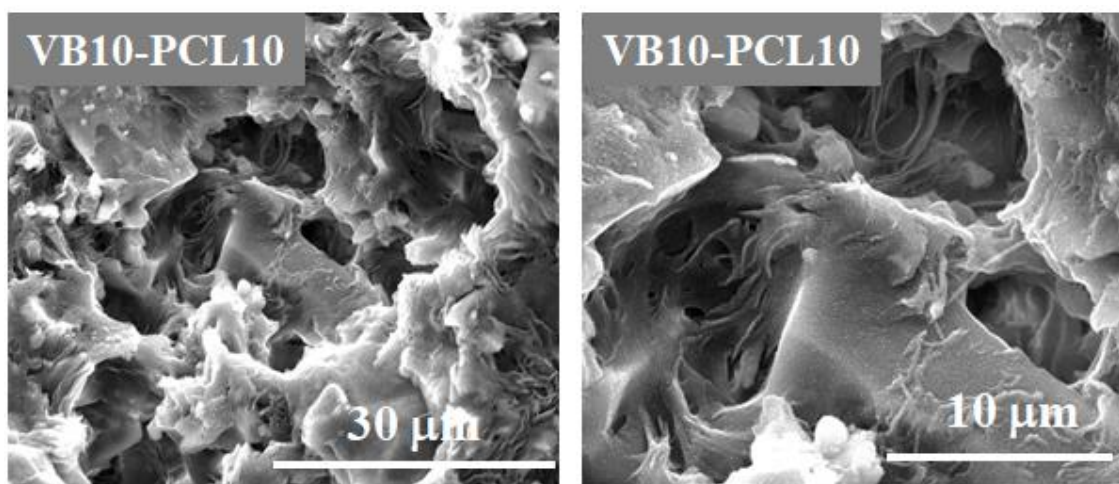


Figura 7.4 – MEV da região interna de uma amostra VB10-PCL10, fraturada com nitrogênio líquido, em duas ampliações.

A tensão máxima dos *scaffolds* VB10-PCL10 foram as maiores desse projeto, atingindo valores de até $7,75 \pm 1,42$ MPa, entretanto os gráficos de tensão x deformação não apresentaram comportamento similar às outras amostras e se assemelharam à um elastômero, Figura 7.5. Três diferentes regimes são observados: um regime elástico linear associado à compressão da amostra, um platô de estresse caracterizado por uma variação do regime elástico linear e relacionado ao colapso de macroporos, e uma região final de densificação atribuída ao colapso total de poros em todo o *scaffold* [55].

Devido ao comportamento diferente em relação às outras amostras, preferiu-se avaliar seu desempenho mecânico a partir da medida de seu módulo de Young. Os valores obtidos ($46,69 \pm 9,74$ MPa) estão bem acima dos já reportados para compósitos BG / PCL [55].

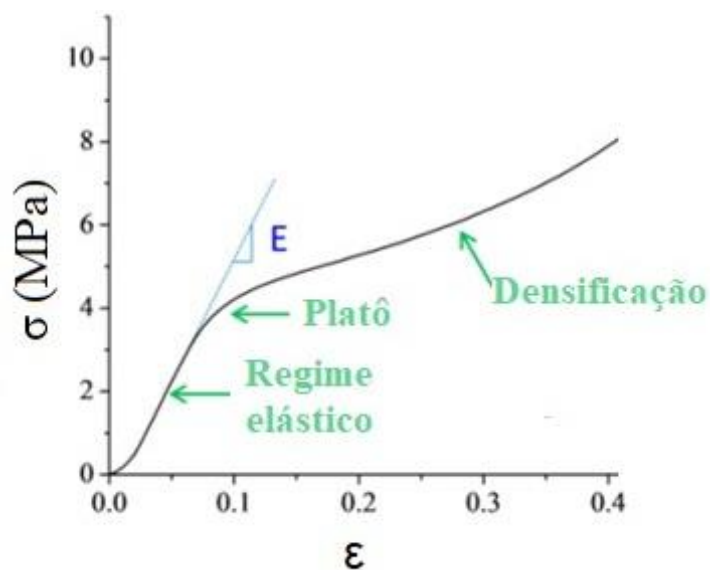


Figura 7.5 Gráfico de tensão - deformação de uma das amostras de VB10-PCL10.

O PCL evitou a falha frágil da amostra VB10-PCL10 provavelmente porque as fibras de polímero preenchem defeitos pré-existent na estrutura do *scaffold*. Tem sido relatado que sólidos elastoméricos mostram um comportamento mecânico similar, o que sugere que o CS poderia ser usado em aplicações de carga cíclica [113].

Embora o módulo de Young medido para esses *scaffolds* esteja abaixo daqueles comumente relatados para o osso humano, isso pode não ser uma grande preocupação porque o local do implante recupera progressivamente suas propriedades mecânicas à medida que o novo osso cresce e o enxerto ósseo é substituído. Propriedades mecânicas dos híbridos baseados em PCL podem ser melhoradas tanto pela mistura de PCL com polímeros mais rígidos quanto pela promoção da formação de ligações covalentes entre a rede de sílica e as cadeias de PCL [114,115]. Também podemos aumentar o volume de partículas de VB usadas. O aumentando a carga sólida na suspensão assegura que menos falhas e porosidade podem ser encontradas no *scaffold* e maiores são as propriedades mecânicas.

7.3.1. AVALIAÇÃO DE BIOCOMPATIBILIDADE E BIOATIVIDADE

No ensaio de LIVE/DEAD, as amostras VB10-PCL10 apresentaram semelhante crescimento positivo de células em comparação com o grupo controle e VB20, adicionalmente, foi o que apresentou comportamento mais próximo do controle em relação à baixa quantidade de células inviáveis (Figura 7.6a).

Essa alta biocompatibilidade foi reforçada ao analisar o ensaio de MTT (Figura 7.6b), no qual essa amostra resultou na maior diferença positiva em relação ao grupo controle. Esse desempenho pode ser explicado pela não sinterização das partículas de VB, permitindo que as fases amorfas tenham maior cinética química quando comparado às fases cristalinas das outras rotas. Além disso, esta amostra apresenta partículas de VB de grande área superficial ($282 \text{ m}^2/\text{g}$), o que favoreceu o crescimento de células SAOS.

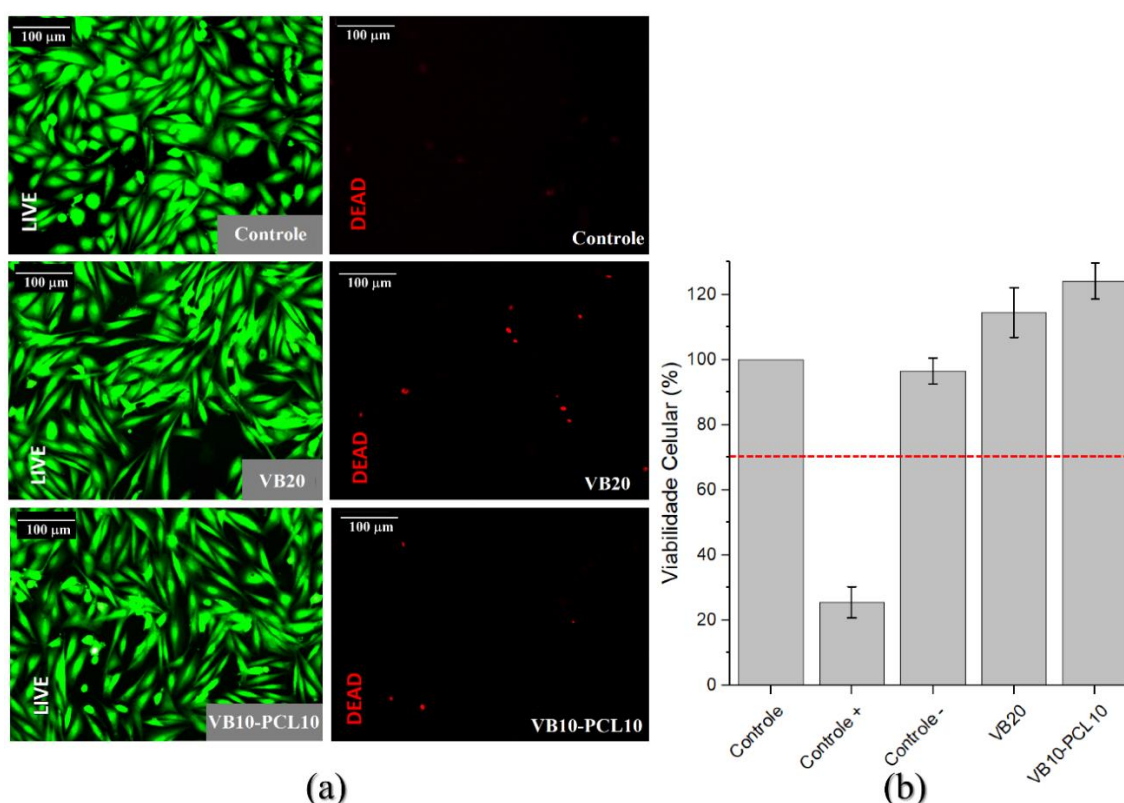


Figura 7.6 - (a) Resultado LIVE/DEAD para VB20 e VB10-PCL10 e em (b) a análise de MTT para as mesmas amostras

Em relação à bioatividade e à formação da camada de HA, o padrão de DRX (Figura 7.7) exibiu já nas primeiras 24h picos referentes à HA e HAC em torno 32° e 50°.

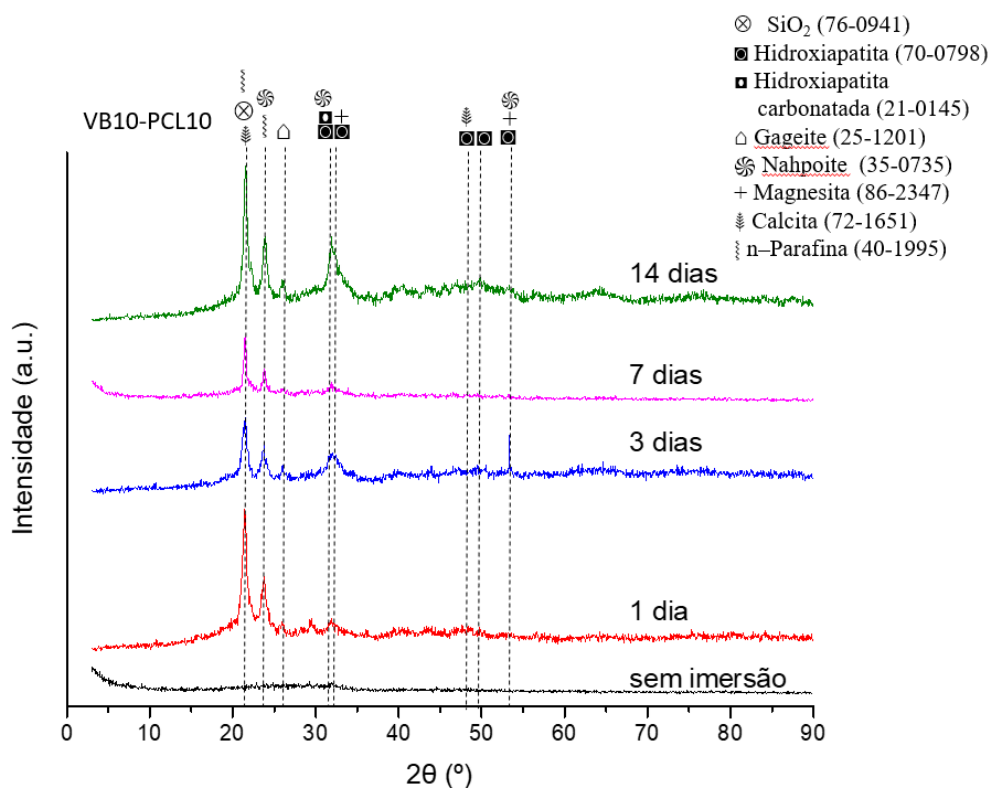


Figura 7.7 Padrão de DRX de amostras VB10-PCL10

No espectro de FTIR (Figura 7.8), as bandas associadas à formação desta camada apareceram pronunciadas desde o primeiro dia. Além disso, o fato de haver uma maior proporção de polímero entre a fase cerâmica e polimérica faz com que as bandas de C-O e C=O sejam ainda presentes após imersão em SBF.

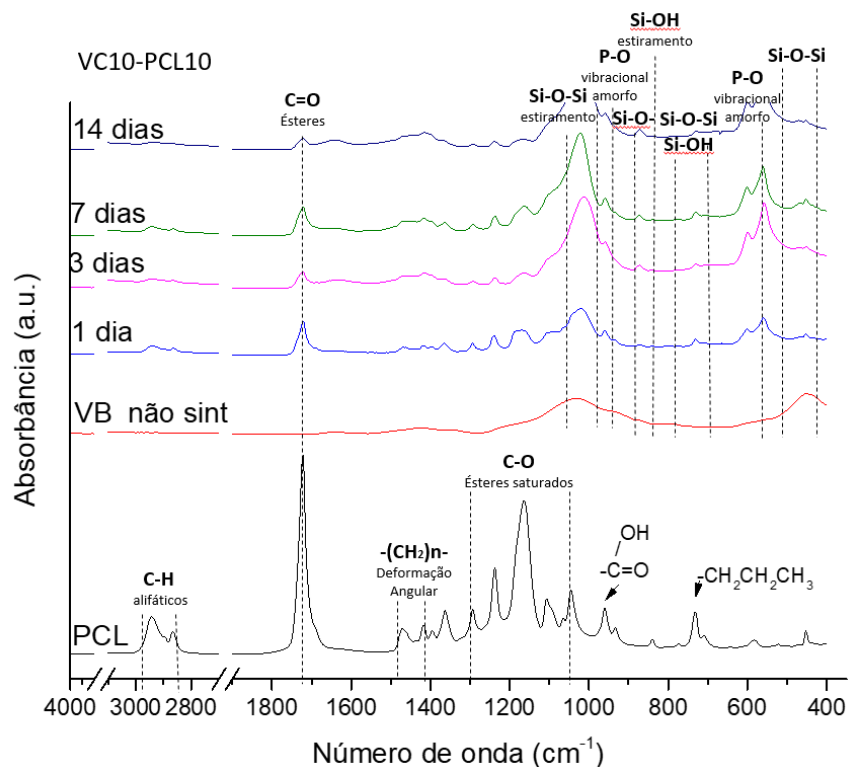


Figura 7.8 Espectro de FTIR de amostras VB10-PCL10

Pela análise feita por MEV (Figura 7.9), observa-se que a amostra foi completamente recoberta por HA, inclusive a superfície das fibras poliméricas. A ausência da etapa de sinterização e a elevada área superficial de VB possivelmente permitiram a formação dessa camada após o primeiro dia imerso em SBF devido à migração de íons e deposição de cristais sobre a superfície. Nas análises de EDS os picos de fósforo e cálcio estão acima da quantidade da formulação original relativas à HA.

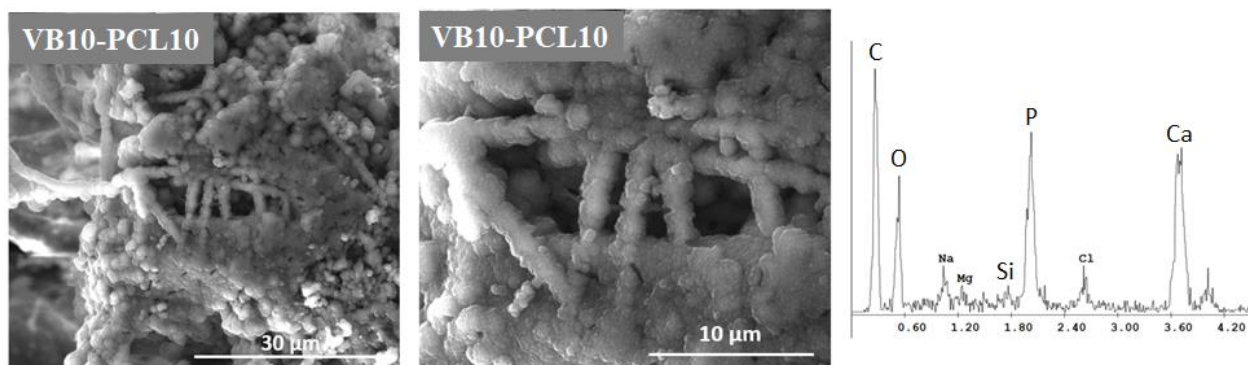


Figura 7.9 - MEV das amostras VB10-PCL10 após 14 dias de imersão em SBF com e sua análise de EDS

7.4. CONCLUSÃO

A amostra VB10-PCL10 apresentou porosidades semelhantes quando comparadas pelo ensaio de Arquimedes (55%, 12% e 67% de porosidade aberta, fechada e total) e micro-CT (54%, 18% e 72%). A mistura eficaz e processamento por *freeze-casting* desenvolvido culminou em uma boa distribuição de fases e interação entre elas, de forma que o valor de tensão máxima foi de $7,75 \pm 1,42$ MPa e módulo de Young $46,69 \pm 9,74$ MPa, superiores àqueles encontrados na literatura para compósitos de VB/PCL. Sua biocompatibilidade avaliada por LIVE/DEAD e MTT foi satisfatória e a viabilidade celular mitocondrial superior ao grupo controle e ao VB20. A bioatividade é semelhante àquela do VB quando avaliamos que houve formação da camada de HA já nas primeiras 24 h.

CAPÍTULO 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

8.1. COMPARAÇÃO ENTRE AS ROTAS DESENVOLVIDAS

8.1.1. PROPRIEDADES MECÂNICAS

De maneira geral, as amostras exibiram ganho de resistência à compressão após os tratamentos térmicos e processamentos realizados. A amostra VB20-PCL12 exibiu resistência à compressão de 2,5 MPa, tenacidade à fratura no valor de $2,7 \times 10^5$ J/m³ e módulo de Weibull de 9,7, enquanto a amostra VB20M com PCL impregnado por fusão exibiu resistência à compressão de $6,99 \pm 3,43$ MPa. Isso implica que a impregnação do PCL por fusão acarreta em resistência mecânica superior. Todavia, gera uma maior variabilidade (módulo de Weibull em torno de 1,7), indesejada em processos de fabricações nos quais a confiabilidade do material deve ser garantida. As amostras sem sinterização a 1250 °C, VB10-PCL-10, alcançaram tensão máxima de $7,75 \pm 1,42$ MPa, módulo de Young $46,69 \pm 9,74$ MPa e uma grande capacidade de recuperação elástica. A Tabela 8.1 apresenta as propriedades mecânica de algumas amostras preparadas nesse estudo.

Tabela 8.1 – Propriedades mecânicas das amostras finais

Amostra	Resistência à compressão (Mpa)	Tenacidade (J/m ³)	Weibull	Módulo de Young (Mpa)
VB20-PCL12	2,5	$2,7 \times 10^5$	9,7	Não mensurado
VB20M	$6,99 \pm 3,43$	$1,44 \times 10^5$	1,49	$65,09 \pm 17,26$
VB10-PCL10	$7,75 \pm 1,42$	$1,05 \times 10^5$	12,77	$46,69 \pm 9,74$

Apesar de ter alcançado a maior resistência à compressão, não se pode dizer que a amostra VB10-PCL10 é a de melhor propriedades mecânicas, pois cada demanda requer características diferentes. Para aplicações em tecido ósseo, a Figura 8.1 mostra os valores de resistência à compressão e de módulo de Young requeridos [39].

Tabela 8.2 – Porosidades das amostras por Método de Arquimedes (#) e Micro-CT (*)

Amostra	Porosidade Fechada (vol. %)	Porosidade Aberta (vol. %)	Porosidade Total (vol. %)
VB20-PCL12	14,00	41,32	55,32 [#]
VB20M	8,9 [*]	25,05 [*]	31,77 [*]
VB10-PCL10	15,25 ^{#*}	54,49 ^{#*}	69,74 ^{#*}

Na amostra VB20-PCL12 a impregnação foi menos eficiente que pelo método da fusão, VB20M, uma vez que todas as porosidades foram reduzidas, explicada pela maior infiltração do polímero na estrutura. A amostra sem sinterização a 1250 °C não partiu das amostras VB20 como as duas citadas acima, e sua porosidade foi a mais elevada de todas, sendo a mais indicada para processos nos quais o ancoramento e crescimento celular é priorizado.

8.1.3. BIOCAMPATIBILIDADE

O ensaio de biocompatibilidade por MTT, mostrou todas as amostras produzidas não apresentam citotoxicidade em células SAOS e que houve diferença estatística positiva entre o grupo controle com as amostras VB20M e VB10-PCL10 mas não houve diferença estatística entre estas duas últimas.

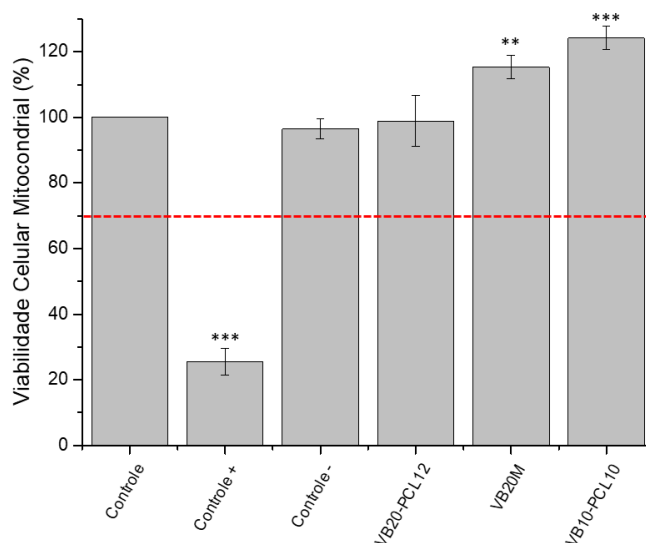


Figura 8.2 – Resultado de ensaio de MTT em células SAOS de forma comparativa entre todas as amostras deste trabalho.

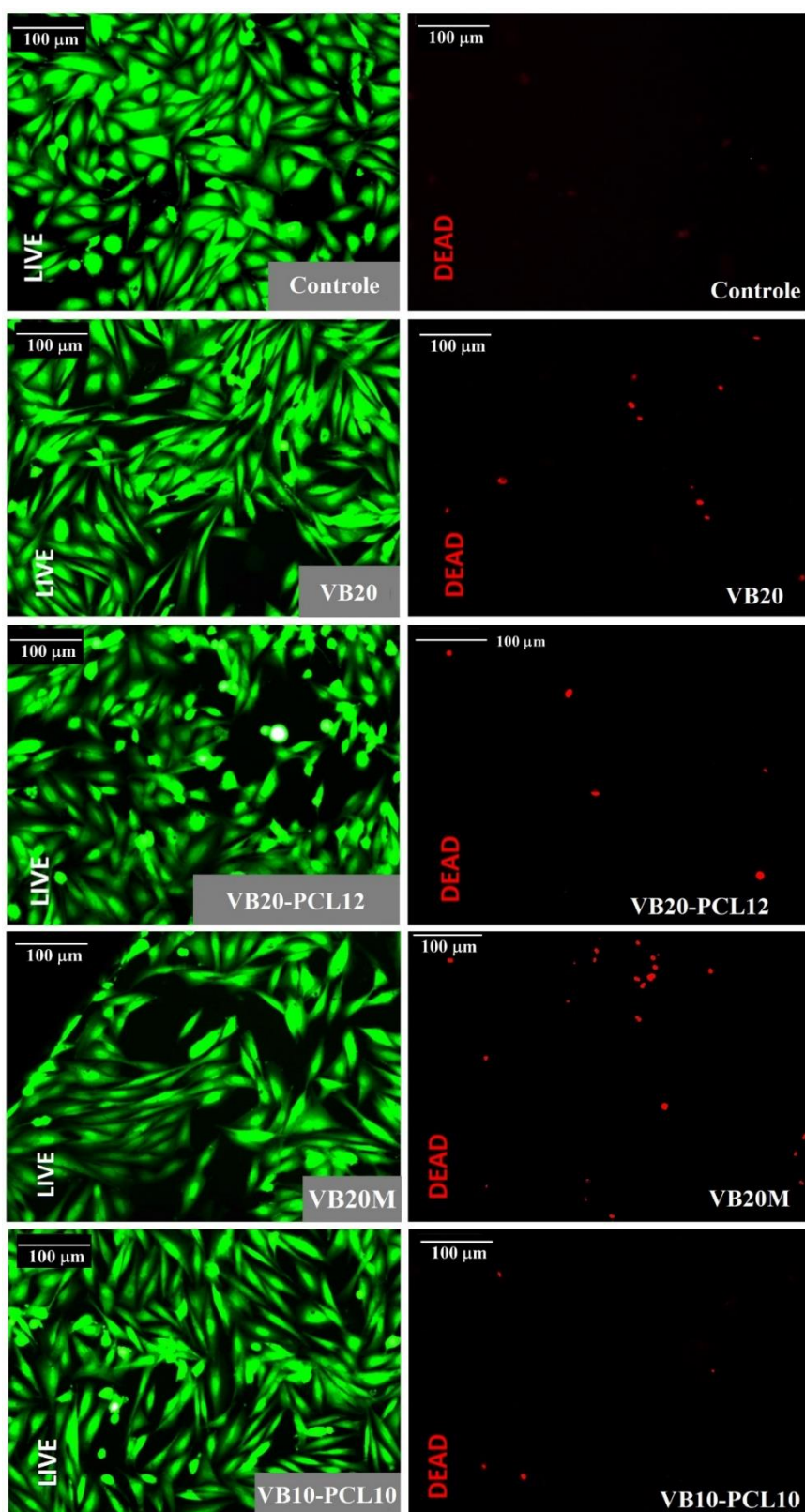


Figura 8.3 - Resultados obtidos a partir do ensaio LIVE/DEAD[®]. As luminescências verde e vermelha correspondem a células vivas e mortas, respectivamente, para todas as amostras deste trabalho.

Para o ensaio de LIVE/DEAD, observa-se que as células vivas, em verde, seguem o padrão do controle, bem como as células mortas, em vermelho. Qualitativamente, somente a amostra VB20M se mostrou um pouco inferior ao controle, provavelmente devido ao recobrimento quase total do VB por PCL na superfície.

8.1.4. BIOATIVIDADE

A bioatividade dos materiais foram bastante diferentes: a amostra sem sinterização (VB10-PCL10) foi capaz de dar início à formação da cama de HA nas primeiras 24h, evidenciadas por DRX, EDS e FTIR; a amostra VB20-PCL12, como foi submetida a etapa de sinterização e teve sua bioatividade reduzida, mostrou-se mais lenta no processo de formação dessa camada; por último, na amostra VB20M que além de sinterizada foi a mais recoberta pelo polímero, a camada de HA somente foi observada após 14 dias de imersão em SBF. Dessa forma, esses materiais teriam ordem decrescente de aplicação em situações nas quais a rápida ligação do material com o osso fosse requerida.

8.2. CONCLUSÕES FINAIS

Observou-se que a sinterização do vidro bioativo a 1250 °C por 2 h diminuiu tanto sua área superficial específica de 280 m²/g para 0,6 m²/g, bem como o volume de poros de 0,45 para 8×10⁻⁴ cm³/g além do tamanho médio de poros 6,4 versus 4,8 nm; mas nem sua biocompatibilidade nem sua bioatividade avaliada pelo comportamento em SBF foram insatisfatórias. O tratamento térmico de sinterização também levou à cristalização deste material. α-cristobalita, metassilicato de cálcio (wolastonita e pseudowollastonita), alfa e beta fosfato tricálcico foram observados no vidro sinterizado.

Os *scaffolds* cerâmicos fabricados via *freeze-casting* utilizando mistura Naph-Cânfora exibiram uma estrutura macroporosa altamente interconectada e aberta. Apesar do aumento da carga de VB na suspensão inicial das amostras VB10, VB20 e VB26 resultar em amostras com menores porosidades, 79,0 ± 3,5, 64,4 ± 1,5 e 59,2 ± 1,0 %, respectivamente, estas apresentam maiores resistências à compressão com valores de 0,15 ± 0,04, 1,52 ± 0,30 e 4,10 ± 0,65 MPa. O módulo de Weibull avaliado para VB10, VB20 e VB26 foi 3,3, 4,9 e 5,9, respectivamente.

A infiltração de PCL por solução de acetona nos *scaffolds* aumentou sua estabilidade mecânica em termos de resistência à compressão e tenacidade e esse reforço foi mais acentuado na rota de infiltração por fusão porque esse comportamento é mais evidente quanto maior o carregamento do PCL. As fibras de PCL que ligam as partículas de VB foram notadas nas micrografias de MEV e sugerem que a PCL pode preencher defeitos pré-existentes na estrutura do *scaffold*, unindo partículas de cerâmica e aumentando a tensão necessária para propagar rachaduras, por isso a melhor uniformidade das amostras híbridas e melhor coesão entre as fases garantiu boa resistência mecânica.

A estrutura de poros gerada pelo canfeno foi mais interessante que a mistura Naph-Camp, do ponto de vista biológico, devido ao tamanho dos poros e sua distribuição. Entretanto, a porosidade geral diminuiu, podendo ser pelo diferente processamento ou meio refrigerante.

Testes de citotoxicidade revelaram que os *scaffolds* infiltrados por PCL não interferiram negativamente na proliferação das células SAOS e que amostras sinterizadas resultam em menores percentuais de viabilidade celular. Houve crescimento de HA na superfície de todas as amostras, infiltradas por PCL ou não, após a imersão em SBF por 14 dias. Os resultados descritos neste trabalho sugerem que os *scaffolds* compósitos aqui preparados são candidatos promissores para aplicações de regeneração e suporte de tecido ósseo.

Cada rota citada apresenta características que às tornam mais adequadas às aplicações diferentes. A rota de sinterização e impregnação de polímero por solução de acetona possui uma resistência mecânica baixa e altos valores de porosidade, sendo adequada para situações de preenchimento sem grandes solicitações mecânicas. A rota com sinterização e impregnação por banho de PCL fundido apresentou resistência mecânica intermediária mas uma biocompatibilidade menos favorável devido à sua baixa porosidade. Porém, são materiais mais indicados em situações nas quais o implante possui menor necessidade de interação com tecidos vivos. Por último a rota sem sinterização dos *scaffolds* apresentou um comportamento similar à de um elastômero e potencial aplicação em situações onde esforços cíclicos estão presentes.

8.3. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Variar a taxa de resfriamento para todas as rotas (diminuir o gradiente de resfriamento), com o intuito de gerar poros com dimensões maiores.
- Aprimorar o processo de impregnação via banho em polímero fundido, a fim de evitar o bloqueio dos poros abertos do *scaffold*.
- Testar outros polímeros biodegradáveis e/ou biocompatíveis como PLA, PLGA e PVA para avaliar o quanto as características intrínsecas desses polímeros afetam no processamento e no resultado final.
- Determinar a resistência à flexão das amostras deste trabalho, pois essas solicitações são limitantes para a aplicação de muitos materiais.
- Avaliação *in vivo* do potencial dos *scaffolds* para regeneração óssea.
- Avaliar a cinética de degradação do PCL utilizado nesse estudo ($M_w = 80.000$).
- Avaliar as propriedades mecânicas e estruturais dos *scaffolds* após imersão em SBF.

8.4. CONTRIBUIÇÕES PARA A LITERATURA

- D.M.M. dos Santos, S.M. de Carvalho, M.M. Pereira, M. Houmard, E.H.M. Nunes. Freeze-cast composite *scaffolds* prepared from sol-gel derived 58S bioactive glass and polycaprolactone, *Ceramics International* 45 (2019) 9891-9900. doi: 10.1016/j.ceramint.2019.02.030.

- D.M.M. dos Santos, T. Martins, S.M. de Carvalho, M.M. Pereira, M. Houmard, E.H.M. Nunes. Simple preparation of 58S bioactive glass/polycaprolactone composite *scaffolds* by freeze-drying under ambient conditions. Artigo submetido para *Materials Letters* e em fase final de revisão.

CAPÍTULO 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] WHO | Physical activity, WHO. (2017). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs385/en/> (accessed November 24, 2017).
- [2] N.T.C. Oliveira, V. Perrotti, A. Palmieri, A.C. Guastaldi, A. Pellati, C.L. Scapin, A. Piattelli, F. Carinci, *Journal of osseointegration.*, Scopus. (2011) 10–16. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/72334> (accessed November 26, 2017).
- [3] R.L. Oréfice, M. de M. Pereira, H.S. Mansur, *Biomateriais: fundamentos e aplicações.*, 1st ed., Grupo Gen - Guanabara Koogan, 2012. <http://www.grupogen.com.br/e-book-biomateriais-fundamentos-aplicacoes> (accessed November 25, 2017).
- [4] H. Fouad, Effects of the bone-plate material and the presence of a gap between the fractured bone and plate on the predicted stresses at the fractured bone, *Med. Eng. Phys.* 32 (2010) 783–789. doi:10.1016/j.medengphy.2010.05.003.
- [5] L.J. Loch, M.O. Pedersen, S. Markholt, B.M. Bibby, A. Larsen, M. Penkowa, M. Stoltenberg, J. Rungby, Metallic silver fragments cause massive tissue loss in the mouse brain, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 109 (2011) 1–10. doi:10.1111/j.1742-7843.2010.00668.x.
- [6] L.L. Hench, Bioceramics, *Stress Int. J. Biol. Stress.* 28 (1998) 1705–1728. doi:10.1111/j.1151-2916.1998.tb02540.x.
- [7] P. Cao, J. Jeyabalan, F. Aqil, S. Ravoori, R.C. Gupta, M. V. Vadhanam, Polymeric implants for the delivery of green tea polyphenols, *J. Pharm. Sci.* 103 (2014) 945–951. doi:10.1002/jps.23864.
- [8] N. Siddiqui, S. Asawa, B. Birru, R. Baadhe, S. Rao, PCL-Based Composite Scaffold Matrices for Tissue Engineering Applications, *Mol. Biotechnol.* 60 (2018) 506–532. doi:10.1007/s12033-018-0084-5.

- [9] P. Fabbri, V. Cannillo, A. Sola, A. Dorigato, F. Chiellini, Highly porous polycaprolactone-45S5 Bioglass® scaffolds for bone tissue engineering, *Compos. Sci. Technol.* 70 (2010) 1869–1878. doi:10.1016/j.compscitech.2010.05.029.
- [10] M.A. Woodruff, D.W. Hutmacher, The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century, *Prog. Polym. Sci.* 35 (2010) 1217–1256. doi:10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002.
- [11] V.C. Costa, H.S. Costa, W.L. Vasconcelos, M.D.M. Pereira, R.L. Oréfice, H.S. Mansur, Preparation of hybrid biomaterials for bone tissue engineering, *Mater. Res.* 10 (2007) 21–26. doi:10.1590/S1516-14392007000100006.
- [12] M.K. Minata, A.C. Motta, M.D.L. P, C.A. Rincon, Estudo da Biocompatibilidade da Blenda de Poli (L-ácido láctico)/ Policaprolactona-triol, *Polímeros Ciência e Tecnol.* 23 (2013) 242–247. doi:10.4322/polimeros.2013.019.
- [13] X. Liu, M.N. Rahaman, Q. Fu, Oriented bioactive glass (13-93) scaffolds with controllable pore size by unidirectional freezing of camphene-based suspensions: Microstructure and mechanical response, *Acta Biomater.* 7 (2011) 406–416. doi:10.1016/j.actbio.2010.08.025.
- [14] S. Deville, Freeze-casting of porous ceramics: A review of current achievements and issues, *Adv. Eng. Mater.* 10 (2008) 155–169. doi:10.1002/adem.200700270.
- [15] G.T. Araújo, T.S. Brito, D.F. Souza, A.M.A. Silva, E.H.M. Nunes, M. Houmard, Preparation of Al₂O₃ and MgAl₂O₄-based samples with tailored macroporous structures, *Ceram. Int.* 44 (2017) 580–587. doi:10.1016/j.ceramint.2017.09.216.
- [16] S. Deville, E. Saiz, A.P. Tomsia, Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials.* 27 (2006) 5480–5489. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.06.028.
- [17] M. de M. Pereira, A.E. Clark, L.L. Hench, Calcium phosphate formation on sol-gel-derived bioactive glasses in vitro., *J Biomed Mater. Res* 28 (1994) 693–698.
- [18] E. Mody, E. Matzkin, *Musculoskeletal health in women*, 2014. doi:10.1007/978-

1-4471-4712-1.

- [19] A. Reinisch, D. Thomas, M.R. Corces, X. Zhang, D. Gratzinger, W.J. Hong, K. Schallmoser, D. Strunk, R. Majeti, A humanized bone marrow ossicle xenotransplantation model enables improved engraftment of healthy and leukemic human hematopoietic cells, *Nat. Med.* 22 (2016) 812–821. doi:10.1038/nm.4103.
- [20] M. Kawamura, S. Miyagawa, S. Fukushima, A. Saito, K. Toda, T. Daimon, T. Shimizu, T. Okano, Y. Sawa, Xenotransplantation of Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cell Sheets Attenuates Left Ventricular Remodeling in a Porcine Ischemic Cardiomyopathy Model, *Tissue Eng. Part A.* 21 (2015) 2272–2280. doi:10.1089/ten.tea.2014.0036.
- [21] B. Baroli, From natural bone grafts to tissue engineering therapeutics: Brainstorming on pharmaceutical formulative requirements and challenges, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 1317–1375. doi:10.1002/jps.21528.
- [22] L.C.U. Junqueira, J. Carneiro, *Histologia básica texto, atlas*, Guanabara-Koogan, 2008.
- [23] A.B. Rs, Tissue Response : Compromised Osseous tissue Biomaterials Dental implants Tissue response Osseous lesions, *Dent. Clin. NA.* 59 (2015) 305–315. doi:10.1016/j.cden.2014.10.010.
- [24] A.R. Amini, C.T. Laurencin, S.P. Nukavarapu, Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 40 (2012) 363–408. doi:10.1615/CritRevBiomedEng.v40.i5.10.
- [25] R. Dimitriou, E. Tsiridis, P. V. Giannoudis, Current concepts of molecular aspects of bone healing, *Injury.* 36 (2005) 1392–1404. doi:10.1016/j.injury.2005.07.019.
- [26] B.D. Ratner, A. Hoffman, F. Schoen, J. Lemons, *Biomaterials science : an introduction to materials in medicine*, 3rd ed., Academic Press, 2013.
- [27] Medbullets Team, Bone Formation - STEP1 MSK - Step 1 - Medbullets.com, (2017). <https://www.medbullets.com/step1-msk/12021/bone-formation> (accessed

November 25, 2017).

- [28] R. Jahagirdar, B.E. Scammell, Principles of fracture healing and disorders of bone union, *Surgery*. 27 (2009) 63–69. doi:10.1016/j.mpsur.2008.12.011.
- [29] C.S. Bahney, D.P. Hu, T. Miclau, R.S. Marcucio, The multifaceted role of the vasculature in endochondral fracture repair, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 6 (2015) 1–10. doi:10.3389/fendo.2015.00004.
- [30] A.N. Cormack, A. Tilocca, Structure and biological activity of glasses and ceramics, *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 370 (2012) 1271–1280. doi:10.1098/rsta.2011.0371.
- [31] L.L. Hench, R.J. Splinter, W.C. Allen, T.K. Greenlee, Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials, *J. Biomed. Mater. Res.* 5 (1971) 117–141. doi:10.1002/jbm.820050611.
- [32] M. Cerruti, D. Greenspan, K. Powers, Effect of pH and ionic strength on the reactivity of Bioglass® 45S5, *Biomaterials*. 26 (2005) 1665–1674. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.07.009.
- [33] M.N. Rahaman, D.E. Day, B. Sonny Bal, Q. Fu, S.B. Jung, L.F. Bonewald, A.P. Tomsia, Bioactive glass in tissue engineering, *Acta Biomater.* 7 (2011) 2355–2373. doi:10.1016/j.actbio.2011.03.016.
- [34] M. Barbeck, T. Serra, P. Booms, S. Stojanovic, S. Najman, E. Engel, R. Sader, C.J. Kirkpatrick, M. Navarro, S. Ghanaati, Analysis of the in vitro degradation and the in vivo tissue response to bi-layered 3D-printed scaffolds combining PLA and biphasic PLA/bioglass components – Guidance of the inflammatory response as basis for osteochondral regeneration, *Bioact. Mater.* 2 (2017) 208–223. doi:10.1016/j.bioactmat.2017.06.001.
- [35] L. Ji, W. Qiao, K. Huang, Y. Zhang, H. Wu, S. Miao, H. Liu, Y. Dong, A. Zhu, D. Qiu, Synthesis of nanosized 58S bioactive glass particles by a three-dimensional ordered macroporous carbon template, *Mater. Sci. Eng. C*. 75 (2017) 590–595. doi:10.1016/j.msec.2017.02.107.

- [36] C.-L. Huang, W. Fang, I.-H. Chen, T.-Y. Hung, Manufacture and biomimetic mineral deposition of nanoscale bioactive glasses with mesoporous structures using sol-gel methods, *Ceram. Int.* 44 (2018) 17224–17229. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.06.180>.
- [37] L.L. Hench, Bioceramics – from concept to clinic, *Am. Ceram. Soc. Bull.* 74 (1991) 1487–1510.
- [38] A.B. Houreh, S. Labbaf, H.K. Ting, F. Ejeian, J.R. Jones, M.H.N. Esfahani, Influence of calcium and phosphorus release from bioactive glasses on viability and differentiation of dental pulp stem cells, *J. Mater. Sci.* 52 (2017) 8928–8941. doi:[10.1007/s10853-017-0946-4](https://doi.org/10.1007/s10853-017-0946-4).
- [39] Q. Fu, E. Saiz, M.N. Rahaman, A.P. Tomsia, Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: State of the art and future perspectives, *Mater. Sci. Eng. C.* 31 (2011) 1245–1256. doi:[10.1016/j.msec.2011.04.022](https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.04.022).
- [40] Q.Z. Chen, A. Efthymiou, V. Salih, A.R. Boccaccini, Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds: Study of cell proliferation and scaffold degradation in vitro, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 84 (2008) 1049–1060. doi:[10.1002/jbm.a.31512](https://doi.org/10.1002/jbm.a.31512).
- [41] A. Hoppe, N.S. Güldal, A.R. Boccaccini, A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics, *Biomaterials.* 32 (2011) 2757–2774. doi:[10.1016/j.biomaterials.2011.01.004](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.004).
- [42] W. Höland, Biocompatible and bioactive glass-ceramics - State of the art and new directions, *J. Non. Cryst. Solids.* 219 (1997) 192–197. doi:[10.1016/S0022-3093\(97\)00329-3](https://doi.org/10.1016/S0022-3093(97)00329-3).
- [43] O. Peitl, E. Dutra Zanotto, L.L. Hench, Highly bioactive P₂O₅–Na₂O–CaO–SiO₂ glass-ceramics, *J. Non. Cryst. Solids.* 292 (2001) 115–126. doi:[10.1016/S0022-3093\(01\)00822-5](https://doi.org/10.1016/S0022-3093(01)00822-5).
- [44] H. Teramoto, A. Kawai, S. Sugihara, A. Yoshida, H. Inoue, Resorption of Apatite-wollastonite containing glass-ceramic and beta-tricalcium phosphate in vivo, *Acta Med. Okayama.* 59 (2005) 201–207. doi:[10.18926/AMO/31974](https://doi.org/10.18926/AMO/31974).

- [45] W.D. Kingery, H.K. Bowen, D.R. (Donald R. Uhlmann, Introduction to ceramics, Wiley, 1976.
- [46] B.R. Barrioni, A.C. Oliveira, M. de Fátima Leite, M. de Magalhães Pereira, Sol-gel-derived manganese-releasing bioactive glass as a therapeutic approach for bone tissue engineering, *J. Mater. Sci.* 52 (2017) 8904–8927. doi:10.1007/s10853-017-0944-6.
- [47] E. Gentleman, Y.C. Fredholm, G. Jell, N. Lotfibakhshaiesh, M.D. O'Donnell, R.G. Hill, M.M. Stevens, The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro, *Biomaterials.* 31 (2010) 3949–3956. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.121.
- [48] E. Quinlan, S. Partap, M.M. Azevedo, G. Jell, M.M. Stevens, F.J. O'Brien, Hypoxia-mimicking bioactive glass/collagen glycosaminoglycan composite scaffolds to enhance angiogenesis and bone repair, *Biomaterials.* 52 (2015) 358–366. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.02.006.
- [49] E. Boccardi, F.E. Ciraldo, A.R. Boccaccini, Bioactive glass-ceramic scaffolds: Processing and properties, *MRS Bull.* 42 (2017) 226–232. doi:10.1557/mrs.2017.28.
- [50] J.R. Jones, Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids, *Acta Biomater.* 23 (2015) S53–S82. doi:10.1016/j.actbio.2015.07.019.
- [51] C.J. Brinker, G.W. Scherer, Sol-gel science : the physics and chemistry of sol-gel processing, Academic Press, 1990.
- [52] H. Nagai, M. Sato, Heat Treatment in Molecular Precursor Method for Fabricating Metal Oxide Thin Films, *Heat Treat. - Conv. Nov. Appl.* (2012). doi:10.5772/50676.
- [53] C.J. Brinker, C.S. Ashley, R.A. Cairncross, K.S. Chen, A.J. Hurd, S.T. Reed, J. Samuel, P.R. Schunk, R.W. Schwartz, C.S. Scotto, Sol-gel derived ceramics films - Fundamentals and applications, in: K.H. Stern (Ed.), *Metall. Ceram. Prot. Coatings*, Amsterdam: Springer Netherlands, 1996: pp. 112–151.

- [54] B.A. Allo, A.S. Rizkalla, K. Mequanint, Synthesis and electrospinning of ϵ -polycaprolactone-bioactive glass hybrid biomaterials via a sol-gel process, *Langmuir*. 26 (2010) 18340–18348. doi:10.1021/la102845k.
- [55] J. Lao, Y. Wittrant, C. Bossard, H. Tiainen, C. Vial, H. Granel, É. Jallot, Polycaprolactone / bioactive glass hybrid scaffolds for bone regeneration, *Biomed. Glas.* 4 (2018) 108–122. doi:10.1515/bglass-2018-0010.
- [56] H.Y. Kweon, M.K. Yoo, I.K. Park, T.H. Kim, H.C. Lee, H.S. Lee, J.S. Oh, T. Akaike, C.S. Cho, A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering, *Biomaterials*. 24 (2003) 801–808. doi:10.1016/S0142-9612(02)00370-8.
- [57] S.S. Mulay, G. Becker, R. Vayrette, J.P. Raskin, T. Pardoën, M. Galceran, S. Godet, L. Noels, Multiscale modelling framework for the fracture of thin brittle polycrystalline films: Application to polysilicon, *Comput. Mech.* 55 (2015) 73–91. doi:10.1007/s00466-014-1083-4.
- [58] M. Labet, W. Thielemans, Synthesis of polycaprolactone: a review, *Chem. Soc. Rev.* 38 (2009) 3484. doi:10.1039/b820162p.
- [59] D.W. Hutmacher, Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues — state of the art and future perspectives, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 12 (2001) 107–124. doi:10.1163/156856201744489.
- [60] D. Rosa, D. Penteado, M. Calil, Propriedades Térmicas e Biodegradabilidade de PCL e PHB em um Pool de Fungos, *Polímeros Ciência e Tecnol.* (2000) 75–80. <http://www.unimep.br/phpg/editora/revistaspdf/rct15art09.pdf>.
- [61] G. Becker, Numerical simulations of brittle and elasto-plastic fracture for thin structures subjected to dynamic loadings, *Univ. Liege.* (2012) 252. doi:\href{http://hdl.handle.net/2268/113142}{DOI}.
- [62] O. Coulembier, P. Degée, J.L. Hedrick, P. Dubois, From controlled ring-opening polymerization to biodegradable aliphatic polyester: Especially poly(β -malic acid) derivatives, *Prog. Polym. Sci.* 31 (2006) 723–747.

doi:10.1016/j.progpolymsci.2006.08.004.

- [63] S.V. Canevarolo Jr., *Ciência dos polímeros : um texto básico para tecnólogos e engenheiros*, Artliber, 2002. https://books.google.com.br/books/about/Ciência_dos_polímeros.html?id=Vm00AQAACAAJ&redir_esc=y (accessed November 25, 2017).
- [64] H. Sun, L. Mei, C. Song, X. Cui, P. Wang, The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant, *Biomaterials*. 27 (2006) 1735–1740. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.09.019.
- [65] S. Ahn, Y.S. Lee, Y.D. Song, C.B. Chang, S.B. Kang, Y.S. Choi, Does surgical reconstruction produce better stability than conservative treatment in the isolated PCL injuries?, *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 136 (2016) 811–819. doi:10.1007/s00402-016-2454-4.
- [66] G. Cinotti, P. Sessa, M. Amato, F.R. Ripani, G. Giannicola, Preserving the PCL during the tibial cut in total knee arthroplasty, *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.* 25 (2017) 2594–2601. doi:10.1007/s00167-015-3842-y.
- [67] P.J.C. Heesterbeek, L. Labey, P. Wong, B. Innocenti, A.B. Wymenga, A new spacer-guided, PCL balancing technique for cruciate-retaining total knee replacement, *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.* 22 (2014) 650–659. doi:10.1007/s00167-013-2660-3.
- [68] C.J. Brinker, G.W. Scherrer, Sol-gel Processing, in: *Sol Gel Sci. Phys. Chem. Sol-Gel Process.*, New York, 1990: pp. 2–11.
- [69] Xia Li, J. Shi, X. Dong, L. Zhang, H. Zeng, A mesoporous bioactive glass/polycaprolactone composite scaffold and its bioactivity behavior, *J. Biomed. Mater. Res.* 84A (2008) 84–91. doi:10.1002/jbm.a.
- [70] M. Sadat-Shojai, M.T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, A. Jamshidi, Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures, *Acta Biomater.* 9 (2013) 7591–7621. doi:10.1016/j.actbio.2013.04.012.

- [71] E. Tamjid, R. Bagheri, M. Vossoughi, A. Simchi, Effect of particle size on the in vitro bioactivity, hydrophilicity and mechanical properties of bioactive glass-reinforced polycaprolactone composites, *Mater. Sci. Eng. C*. 31 (2011) 1526–1533. doi:10.1016/j.msec.2011.06.013.
- [72] L. Saigo, V. Kumar, Y. Liu, J. Lim, S.H. Teoh, B.T. Goh, A pilot study: Clinical efficacy of novel polycaprolactone-tricalcium phosphate membrane for guided bone regeneration in rabbit calvarial defect model, *J. Oral Maxillofac. Surgery, Med. Pathol.* 30 (2018) 212–219. doi:10.1016/j.ajoms.2017.12.007.
- [73] S. Deville, Freeze-casting of porous biomaterials: Structure, properties and opportunities, *Materials (Basel)*. 3 (2010) 1913–1927. doi:10.3390/ma3031913.
- [74] T. Fukasawa, M. Ando, T. Ohji, S. Kanzaki, Synthesis of Porous Ceramics with Complex Pore Structure by Freeze-Dry Processing, *J. Am. Ceram. Soc.* 84 (2001) 230–232. doi:10.1111/j.1151-2916.2001.tb00638.x.
- [75] W.L. Li, K. Lu, J.Y. Walz, Freeze casting of porous materials: review of critical factors in microstructure evolution, *Int. Mater. Rev.* 57 (2012) 37–60. doi:10.1179/1743280411Y.0000000011.
- [76] Alichtner, File:FrontParticles2.pdf - Wikipedia, (2014). <https://en.wikipedia.org/wiki/File:FrontParticles2.pdf#filelinks> (accessed November 29, 2017).
- [77] J.W. Moon, H.J. Hwang, M. Awano, K. Maeda, Preparation of NiO-YSZ tubular support with radially aligned pore channels, *Mater. Lett.* 57 (2003) 1428–1434. doi:10.1016/S0167-577X(02)01002-9.
- [78] J. Han, C. Hong, X. Zhang, J. Du, W. Zhang, Highly porous ZrO₂ ceramics fabricated by a camphene-based freeze-casting route: Microstructure and properties, *J. Eur. Ceram. Soc.* 30 (2010) 53–60. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2009.08.018.
- [79] M.M. Pereira, J.R. Jones, R.L. Orefice, L.L. Hench, Preparation of bioactive glass-polyvinyl alcohol hybrid foams by the sol-gel method, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*

- 16 (2005) 1045–1050. doi:10.1007/s10856-005-4758-8.
- [80] L.D. Lacerda, D.F. Souza, E.H.M. Nunes, M. Houmard, Macroporous alumina structures tailored by freeze-casting using naphthalene–camphor as freezing vehicle, *Ceram. Int.* 44 (2018) 16010–16016. doi:10.1016/j.ceramint.2018.06.036.
- [81] X. Song, Y. Chen, T.W. Lee, S. Wu, L. Cheng, Ceramic fabrication using Mask-Image-Projection-based Stereolithography integrated with tape-casting, *J. Manuf. Process.* 20 (2015) 456–464. doi:10.1016/j.jmapro.2015.06.022.
- [82] C. Slots, M.B. Jensen, N. Ditzel, M.A.B. Hedegaard, S.W. Borg, O. Albrektsen, T. Thygesen, M. Kassem, M.Ø. Andersen, Simple additive manufacturing of an osteoconductive ceramic using suspension melt extrusion, *Dent. Mater.* 33 (2017) 198–208. doi:10.1016/j.dental.2016.11.012.
- [83] D. Myers, *Surfaces, interfaces, and colloids : principles and applications*, Wiley-VCH, 1999.
- [84] J.N. Israelachvili, *Intermolecular and surface forces*, Academic Press, 2011.
- [85] I.R. Oliveira, A.R. Studart, M. Innocentini, L.A. Nascimento, V.C. Pandolfelli, Influência de aditivos dispersantes nas propriedades de concretos refratários de Al₂O₃ e Al₂O₃-MgO (Influence of dispersants in Al₂O₃ and Al₂O₃-MgO refractory castables), *Cerâmica.* 50 (2004) 1–6.
- [86] R. Asakura, T. Isobe, K. Kurokawa, T. Takagi, H. Aizawa, M. Ohkubo, Effects of citric acid additive on photoluminescence properties of YAG:Ce³⁺ nanoparticles synthesized by glycothermal reaction, *J. Lumin.* 127 (2007) 416–422. doi:10.1016/j.jlumin.2007.02.046.
- [87] C.E. Humanidades, S. Paulo, RENEÉ SIMÕES ARGOLO DO CARMO Ácido cítrico : um estudo sobre a viabilidade comercial e técnica de sua utilização na indústria de beneficiamento têxtil RENEÉ SIMÕES ARGOLO DO CARMO Ácido cítrico : um estudo sobre a viabilidade comercial e técnica de sua ut, (2015).
- [88] M.M. Pereira, A.E. Clark, L.L. Hench, Calcium phosphate formation on sol-gel-

- derived bioactive glasses *in vitro*, *J. Biomed. Mater. Res.* 28 (1994) 693–698. doi:10.1002/jbm.820280606.
- [89] T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity?, *Biomaterials.* 27 (2006) 2907–2915. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.017.
- [90] M.B. da S. Palma, E.J. Corat, C.P. Soares, AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DE SUPERFÍCIES RECOBERTAS POR NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDE MÚLTIPLA (MWCNT), 2008.
- [91] K.S.W. Sing, Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity, *Pure Appl. Chem.* 54 (1982) 2201–2218. doi:10.1351/pac198557040603.
- [92] P. Sepulveda, J.R. Jones, L.L. Hench, Characterization of melt-derived 45S5 and sol-gel-derived 58S bioactive glasses, *J. Biomed. Mater. Res.* 58 (2001) 734–740. doi:10.1002/jbm.10026.
- [93] P. González, J. Serra, S. Liste, S. Chiussi, B. León, M. Pérez-Amor, Ageing of pulsed-laser-deposited bioactive glass films, *Vacuum.* 67 (2002) 647–651. doi:10.1016/S0042-207X(02)00256-7.
- [94] H.Y. Jung, R.K. Gupta, E.O. Oh, Y.H. Kim, C.M. Whang, Vibrational spectroscopic studies of sol-gel derived physical and chemical bonded ORMOSILs, *J. Non. Cryst. Solids.* 351 (2005) 372–379. doi:10.1016/j.jnoncrysol.2005.01.004.
- [95] J. Ma, C.Z. Chen, D.G. Wang, X.G. Meng, J.Z. Shi, Influence of the sintering temperature on the structural feature and bioactivity of sol-gel derived SiO₂-CaO-P₂O₅ bioglass, *Ceram. Int.* 36 (2010) 1911–1916. doi:10.1016/j.ceramint.2010.03.017.
- [96] B.C. Smith, *Infrared spectral interpretation : A systematic approach*, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, 1999.

- [97] F. Zuleta, P.A. Velasquez, P.N. De Aza, In vitro characterization of laser ablation pseudowollastonite coating, *Mater. Sci. Eng. C.* 31 (2011) 377–383. doi:10.1016/j.msec.2010.10.013.
- [98] I.M. Martínez, P. Velásquez, L. Meseguer-Olmo, P.N. De Aza, Production and study of in vitro behaviour of monolithic α -tricalcium phosphate based ceramics in the system $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$, *Ceram. Int.* 37 (2011) 2527–2535. doi:10.1016/j.ceramint.2011.03.062.
- [99] L. Lefebvre, J. Chevalier, L. Gremillard, R. Zenati, G. Thollet, D. Bernache-Assolant, A. Govin, Structural transformations of bioactive glass 45S5 with thermal treatments, *Acta Mater.* 55 (2007) 3305–3313. doi:10.1016/j.actamat.2007.01.029.
- [100] E.A. Aguilar-Reyes, C.A. León-Patiño, E. Villicaña-Molina, V.I. Macías-Andrés, L.P. Lefebvre, Processing and in vitro bioactivity of high-strength 45S5 glass-ceramic scaffolds for bone regeneration, *Ceram. Int.* 43 (2017) 6868–6875. doi:10.1016/j.ceramint.2017.02.107.
- [101] A.A.R. De Oliveira, D.A. De Souza, L.L.S. Dias, S.M. De Carvalho, H.S. Mansur, M. De Magalhães Pereira, Synthesis, characterization and cytocompatibility of spherical bioactive glass nanoparticles for potential hard tissue engineering applications, *Biomed. Mater.* 8 (2013). doi:10.1088/1748-6041/8/2/025011.
- [102] L.L. Hench, Chronology of Bioactive Glass Development and Clinical Applications, *New J. Glas. Ceram.* 03 (2013) 67–73. doi:10.4236/njgc.2013.32011.
- [103] S. Ramesh, C.Y. Tan, M. Hamdi, I. Sopyan, W.D. Teng, The influence of Ca/P ratio on the properties of hydroxyapatite bioceramics, *Int. Conf. Smart Mater. Nanotechnol. Eng.* 6423 (2007) 64233A. doi:10.1117/12.779890.
- [104] M. Peroglio, L. Gremillard, C. Gauthier, L. Chazeau, S. Verrier, M. Alini, J. Chevalier, Mechanical properties and cytocompatibility of poly(ϵ -caprolactone)-infiltrated biphasic calcium phosphate scaffolds with bimodal pore distribution,

- Acta Biomater. 6 (2010) 4369–4379. doi:10.1016/j.actbio.2010.05.022.
- [105] F.J. Martínez-Vázquez, F.H. Perera, P. Miranda, A. Pajares, F. Guiberteau, Improving the compressive strength of bioceramic robocast scaffolds by polymer infiltration, *Acta Biomater.* 6 (2010) 4361–4368. doi:10.1016/j.actbio.2010.05.024.
- [106] W.J.W. Donald R. Askeland, Pradeep P. Fulay, What is Materials Science and Engineering ?, Virginia Tech. sixth edit (2010). doi:10.1016/0921-5107(92)90012-X.
- [107] D.F.D.F. Souza, E.H.M.E.H.M. Nunes, D.S.D.S. Pimenta, D.C.L.D.C.L. Vasconcelos, J.F.J.F. Nascimento, W. Grava, M. Houmard, W.L.W.L. Vasconcelos, Synthesis and structural evaluation of freeze-cast porous alumina, *Mater. Charact.* 96 (2014) 183–195. doi:10.1016/j.matchar.2014.08.009.
- [108] W. Weibull, A statistical distribution function of wide applicability, *J. Appl. Mech.* 18 (1951) 293–297. doi:citeulike-article-id:8491543.
- [109] H.J. Hausser, R.E. Brenner, Phenotypic instability of Saos-2 cells in long-term culture, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333 (2005) 216–222. doi:10.1016/j.bbrc.2005.05.097.
- [110] T.H. Chung, S.H. Wu, M. Yao, C.W. Lu, Y.S. Lin, Y. Hung, C.Y. Mou, Y.C. Chen, D.M. Huang, The effect of surface charge on the uptake and biological function of mesoporous silica nanoparticles in 3T3-L1 cells and human mesenchymal stem cells, *Biomaterials.* 28 (2007) 2959–2966. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.03.006.
- [111] J.R. Jones, L.M. Ehrenfried, L.L. Hench, Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials.* 27 (2006) 964–973. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.07.017.
- [112] S. Eqtesadi, A. Motealleh, A. Pajares, F. Guiberteau, P. Miranda, Influence of sintering temperature on the mechanical properties of ϵ -PCL-impregnated 45S5 bioglass-derived scaffolds fabricated by robocasting, *J. Eur. Ceram. Soc.* 35 (2015)

3985–3993. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2015.06.021.

- [113] L.J. Gibson, Biomechanics of cellular solids, *J. Biomech.* 38 (2005) 377–399. doi:10.1016/j.jbiomech.2004.09.027.
- [114] S.-H. Rhee, J.-Y. Choi, H.-M. Kim, Preparation of a bioactive and degradable poly(ϵ -caprolactone)/silica hybrid through a sol–gel method, *Biomaterials.* 23 (2002) 4915–4921. doi:[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00251-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00251-X).
- [115] Y. Ding, J.A. Roether, A.R. Boccaccini, D.W. Schubert, Fabrication of electrospun poly (3-hydroxybutyrate)/poly (ϵ -caprolactone)/silica hybrid fibermats with and without calcium addition, *Eur. Polym. J.* 55 (2014) 222–234. doi:10.1016/j.eurpolymj.2014.03.020.