

RICARDO RAMÍREZ AGUDELO

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MATRIZES DE LIBERAÇÃO  
CONTROLADA DE DOXICICLINA À BASE DE NANOFIBRAS DE  
POLICAPROLACTONA E GELATINA CARREADAS COM  
NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química- Química Inorgânica.

Belo Horizonte

2015

© 2015, Ricardo Ramírez Agudelo.  
Todos os direitos reservados.

A282p

2015

D

Ramírez Agudelo, Ricardo

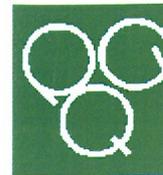
Preparação e Caracterização de matrizes de Liberação Controlada de Doxíciclina à base de Nanofibras de Policaprolactona e Gelatina Carreadas com Nanopartículas de Hidroxiapatita / Ricardo Ramírez Agudelo. — Belo Horizonte, 2015  
xviii, 70 f. : il.

Dissertação (mestrado) — Universidade Federal de Minas Gerais- Departamento de Química

Orientador: Sinisterra Millán, Rubén Dario

1. Química inorgânica - Teses. 2. Preparações de liberação controlada - Teses. 3. Nanopartículas - Teses. 4. Agentes antineoplásicos - Teses. 5. Tetraciclina - Teses. 6. Hidroxiapatita - Teses. I. Sinisterra Millán, Rubén Dario, Orientador II. Título.

CDU 043



**"Preparação e Caracterização de Matrizes de Liberação Controlada de Doxiciclina à Base de Nanofibras de Policaprolactona e Gelatina Carreadas com Nanopartículas de Hidroxiapatita"**

**Ricardo Ramírez Agudelo**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Rubén Dario Sinisterra Millán - Orientador  
UFMG

Prof. Geraldo Magela de Lima  
UFMG

Prof. Ricardo Mathias Orlando  
UFMG

Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2015.

*Dedico este trabalho à minha mãe pelo amor e pelo exemplo dado a cada dia e ao meu pai in memoriam, que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos.*

# Agradecimentos

Agradeço a Deus pelas oportunidades que me foram dadas na vida, principalmente por ter conhecido pessoas e lugares interessantes e por ter iluminado o meu caminho durante esta caminhada.

A minha mãe e irmãos pelo apoio, amor e dedicação em todos os momentos;

Ao meu orientador Rubén Dario Sinisterra pelos ensinamentos, pela orientação e pela confiança depositada em mim necessária para realização desse trabalho;

A Professora Dra. Maria Esperanza Cortés pela ajuda nos primeiros dias da minha chegada no Brasil, também pela colaboração e contribuição nos ensaios biológicos realizados;

A todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica, aos professores da banca examinadora Ricardo Mathias e Geraldo que contribuíram para melhoria desse trabalho;

Às técnicas do laboratório de difração de raios X, Luciana e Juliana, pelos difratogramas, também a técnica de cromatografia Vany por toda a ajuda, ensinamentos e amizade;

Ao professor Luiz Carlos Alves de Oliveira e sua aluna de doutorando Talita pelo auxílio nas análises de área superficial e tamanho de poro, ao professor Paulo Renato Paiva do CEFET-MG pela contribuição nas análises de ângulo de contato;

À sempre prestativa Karina Scheuermann, muito obrigado por me ajudar nas análises na cultura celular;

Ao Alfonso Gala-García pelo auxílio com a avaliação antibacteriana das fibras;

À Virginia, Ana Paula, Karina, Grazy, Carlos Felipe, Juan Felipe agradeço suas contribuições para que este trabalho se apresentasse melhor;

Aos amigos do Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais (LEMB): Karina S., Andrés, Diego Fernando, Ana Delia, Ana Paula, Michele, Alinne, Larissa, Gabriela, Karina T., Pedro, Eduardo, Sávio, Alfonso que me acompanharam durante os dois anos do meu mestrado;

Aos amigos Juan Felipe, Edgar, Luz Elena, Lenka, Andrés, John Jairo, Luis Eduardo, Olivia Santos, Karen Johanna pelos excelentes momentos de discussão e descontração;

Ao professor Walter Torres da Universidad del Valle (Cali-Colômbia) pela sua confiança e ensinamentos nas aulas de graduação.

Agradeço a todos que de alguma forma direta ou indireta, me auxiliaram na execução deste projeto;

Aos órgãos governamentais de fomento CNPq e CAPES fundamental para realização deste trabalho.

# Resumo

Os biomateriais são todas substâncias ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que podem ser utilizados por tempo indeterminado em tratamentos, reparos ou substituição de órgãos e tecidos. Existe uma necessidade crescente por biomateriais para serem usados como dispositivos médicos para o tratamento de doenças e traumas, que permitam superar as limitações de procedimentos convencionais. Nesse sentido a medicina regenerativa tem surgido com o potencial para fornecer biomateriais, que servem como arcabouços (*scaffolds*) para a regeneração de órgãos e tecidos. Neste contexto, a eletrofiação é reconhecida como uma técnica eficiente para a fabricação de scaffolds à base de nanofibras por sua capacidade para mimetizar a matriz extracelular nativa (MEC), o que favorece o crescimento e regeneração celular.

Baseado nisso, esse trabalho teve como objetivo geral obter e caracterizar as fibras da blenda Policaprolactona/Gelatina (PCL/GEL) e Policaprolactona/Gelatina-nanoHidroxiapatita-Doxiciclina (PCL/GEL-nHA-Dox) formadas a partir da técnica de eletrofiação para utilizá-la como um sistema de liberação controlada de doxiciclina. A caracterização das fibras e da hidroxiapatita foi realizada através de análises físico-químicas (espectroscopia de absorção na região de infravermelho e de absorção na região de ultra-violeta visível), análise térmica (TG, DTG e DTA), difração de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de transmissão (MET). No caso da hidroxiapatita, também foram realizadas medidas da análise de adsorção de gás (BET); assim como medidas do ângulo de contato para as fibras.

Os resultados obtidos mostraram que as nanopartículas de hidroxiapatita (nHA) que foram sintetizadas pelo método de co-precipitação, em presença e ausência de surfactante, apresentaram morfologia de bastões com diâmetro e comprimento de  $27,5 \pm 6,6$  nm e  $39,6 \pm 16,8$  nm respectivamente. Essas nanopartículas receberam tratamento térmico a 100, 550 e 850 °C e apresentaram mudança de fase, aumento da cristalinidade e redução da área superficial específica com o aumento da temperatura.

No estudo de adsorção-dessorção da doxíciclina a partir das nanopartículas de HA foi observada uma maior capacidade de adsorção do fármaco nas amostras de HA sintetizadas em presença de surfactante. O tratamento térmico influenciou também na capacidade de adsorção do fármaco, o aumento da temperatura reduziu a capacidade de adsorção na HA.

A análise por Microscopia Eletrônica Varredura (MEV) permitiu observar a morfologia das fibras preparadas com presença e ausência de HA as quais tiveram tamanho médio de  $401 \pm 181$  nm e  $485 \pm 144$  nm, respectivamente. A inclusão da HA na fibra não afetou o tamanho da fibra quando comparadas com fibras somente contendo a mistura polimérica. A análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) mostrou fibras imiscíveis, no entanto compatíveis. Na avaliação do sistema inédito de liberação de doxíciclina desenvolvido a partir do encapsulamento do fármaco em nanofibras, fabricadas pela técnica de eletrofiação, observou-se uma liberação rápida de doxíciclina, independente das proporções PLC/GEL utilizadas.

Ambos os eluatos doxíciclina-HA e doxíciclina eluídos das fibras apresentaram citotoxicidade dose-dependente frente às células fibroblastos e entre leve a moderadamente citotóxico nas células A431. Além da formação de halos de inibição em cultura de bactérias frente a *Staphylococcus aureus* e *Porphyromonas gingivalis*.

**Palavras-chave:** Eletrofiação, Nanofibras, Nanopartículas de Hidroxiapatita, Liberação de fármacos, Doxíciclina.

# Abstract

## **Preparation and characterization of electrospun Polycaprolactone/gelatin-hydroxyapatite nanofibers as a doxycycline controlled release system**

One of the most important stages of tissue engineering (TE) is the design and processing of a porous, biodegradable three-dimensional scaffolds. There is an increasing need for materials which having the potential capacity for the controlled delivery of drugs and at the same time provide structural support for cells. Thus improve a tissue-implant interface leading to the integration of the biomaterial. In this context, electrospinning is recognized as an efficient technique for the fabrication of nanofibers that can be used to obtain scaffoldos that mimicking extracellular matrix and promote cell growth. On the other hand, hydroxyapatite (HA) is one of the most biocompatible ceramics due to its structural and chemical similarity with the mineral components of human bones and teeth, and that way has been used to manufacture numerous implants.

In the present study, poly ( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) / gelatin (GEL) nanofiber were produced with the use of electrospinning technique. Polymer were dissolved using diluted acetic and ethyl acetate mixture. Well dispersed nanoparticles of HA powders and Doxycycline (Dox) were then mixed with the PCL/GEL solution, and the final solution was electrospun. Hydroxyapatite was synthesized by co-precipitation method with and without adding Pluronic F127, used it as non- ionic surfactant. The HA was subjected to several heat-treatment process. The Dox is a broad spectrum antibiotic used as a therapeutic agent in order to reduce the risk of infection associated with the biomaterial implants procedures in tissue engineering applications.

Fibers and HA were characterized by various physicochemical techniques: Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Ultraviolet-visible Spectroscopy (UV-Vis), thermal analysis (TG, DTG, DTA), X-ray diffraction (XRD), Scanning

Electron Microscopy (SEM), Transmission Electron Microscopy (TEM). In the case of HA, Nitrogen adsorption measurements (BET) and for the fibers contact-angle measurements was made.

TEM micrographs revealed that the synthesized nanoparticles of HA (nHA) was homogeneous and rod-like particles, with a diameter of about  $27.5 \pm 6.6$  nm, a length of  $39.6 \pm 16.8$  nm. On the other hand, the nanoparticles obtained were thermally treated at various temperatures. The influence of temperature on structural, textural, and morphological properties of the materials was studied.

In this comparative investigation, three types of PCL/GEL-based scaffolds were engineered: the PCL/GEL, PCL/GEL-HA and PCL/GEL-HA-Dox. Nanofibers were examined using a field emission scanning electron microscope (FESEM) for the fiber size and morphology. The incorporation of nHAs within the fibers didn't affect the size of nanofibers. The average diameter of fibers PCL/GEL and PCL/GEL-HA were respectively  $401 \pm 181$  and  $485 \pm 144$  nm. TEM images showed fibers composed of two polymer phases but the blend was compatible

MTT assay results showed that doxycycline eluted from fibers was concentration-dependent cytotoxicity against Human epidermoid carcinoma cell A431 and L929 mouse fibroblasts after 24 and 48 hours of treatment. Likewise, the fibers showed inhibition zone on an agar plate of bacterial culture of *against S. aureus* and *P. gingivalis*.

**Keywords:** Electrospinning, Nanofibers, Hydroxyapatite nanoparticles, Drug delivery, Doxycycline .

# Lista de Figuras

1.1	Representação esquemática da técnica de eletrofição. Adaptado de Z.M. Huang et al. 2004. . . . .	8
2.1	Fórmula estrutural do polímero policaprolactona. . . . .	13
2.2	Estrutura do hclato de doxiciclina. . . . .	14
3.1	Montagem experimental utilizada na produção das nanofibras por eletrofição. . . . .	22
4.1	Espectro de absorção na região do infravermelho da HA1. . . . .	27
4.2	Espectros de absorção na região do infravermelho das HAs sintetizadas com surfactante HA1 (●) seca a 100 °C, HA2 (●) seca a 550 °C, HA3 (●) calcinada a 850 °C e sem surfactante HA4 (●) seca a 100 °C e HA5 (●) seca a 550 °C. . . . .	27
4.3	Curva TG das nHA sintetizadas com surfactante HA1(●) seca a 100 °C, HA2 (●) seca a 550 °C e sem surfactante HA4 (●) seca a 100 °C e HA5 (●) seca a 550 °C. . . . .	28
4.4	Curva DTG das nHA sintetizadas com surfactante HA1 (●) seca a 100 °C, HA2 (●) seca a 550 °C e sem surfactante HA4 (●) seca a 100 °C e HA5 (●) seca a 550°C. . . . .	29
4.5	Curva DTA das nHA sintetizadas com surfactante; HA1 (●) seca a 100 °C, HA2 (●) seca a 550 °C, HA4 (●) seca a 100 °C e HA5 (●) seca a 550 °C. . . . .	29
4.6	Influência do tratamento térmico sobre as isotermas de adsorção e dessorção de N2 sobre as nHA; HA1 (●) seca a 100 °C, HA2 (●) seca a 550 °C, HA3 (●) seca a 850 °C, HA4 (●) seca a 100 °C e HA5 (●) seca a 550 °C. . . . .	30
4.7	Distribuição do tamanho de poro das nHA; HA1 (●) seca a 100 °C, HA2 (●) seca a 550 °C, HA3 (●) seca a 850 °C, HA4 (●) seca a 100 °C e HA5 (●) seca a 550 °C. . . . .	31
4.8	Difratogramas de DRX das nanopartículas de hidroxiapatita. HA1(●), HA2(●), HA3(●), HA4(●) e HA5(●). . . . .	32

4.9	Imagens da MET das nanopartículas da HA. a) HA4 seca a 100°C, b) HA5 seca a 550°C, c) HA1 seca a 100°C, d) HA2 seca a 550°C e e) HA3 calcinada a 850°C. . . . .	35
4.10	a) Mostra a distribuição do diâmetro e b) Mostra a distribuição do comprimento das nanopartículas de hidroxiapatita HA1 na forma de histograma. . . . .	36
4.11	Curva de liberação controlada de doxiciclina a partir das nanopartículas de HA1. . . . .	38
4.12	Curvas TG/DTG e DTA do PCL. . . . .	39
4.13	Curvas TG, DTG e DTA de gelatina. . . . .	40
4.14	Curva TG, DTG e DTA da doxiciclina. . . . .	40
4.15	Espectro de absorção na região do infravermelho FTIR para gelatina, polycaprolactona, doxiciclina e hidroxiapatita. . . . .	41
4.16	Padrão de difração de raios X de pó do PCL, Gelatina, Doxiciclina e HA1. . . . .	42
4.17	Imagem da gota de água sobre a superfície da fibra PGH1. . . . .	43
4.18	Curva TG, DTG e DTA da fibra PG1. . . . .	44
4.19	Curva TG, DTG e DTA da fibra PG2. . . . .	45
4.20	Curva TG, DTG e DTA da fibra PG3. . . . .	45
4.21	Curvas termogravimétricas a) PG1, PGHA1 e PGHAD1, b) PG2, PGHA2 e PGHAD2 e c) PG3, PGHA3 e PGHAD3. . . . .	46
4.22	Curva DSC das fibras PCL/GEL . . . . .	47
4.23	Espectros de absorção na região do infravermelho das fibras PG1, PG2 e PG3. . . . .	48
4.24	Espectros de absorção na região do infravermelho das fibras PGHA1, PGHA2 e PGHA3. . . . .	48
4.25	Espectros de absorção na região do infravermelho das fibras PGHAD1, PGHAD2 e PGHAD3. . . . .	49
4.26	DRX das fibras a) PG , b) PGHA e c) PGHAD. . . . .	50
4.27	Imagens obtidas por MEV e histograma da distribuição de diâmetro das fibras, a) PG1, b) PG2 e c) PG3. . . . .	51
4.28	Imagens obtidas por MEV e histograma da distribuição de diâmetro das fibras, a) PGHA1, b) PGHA2 e c) PGHA3. . . . .	52
4.29	Imagens obtidas por MEV das fibra, a) PGHAD1, b) PGHAD2 e c) PGHAD3. . . . .	53
4.30	Imagens por MET das fibras a) PGHA1 b) PGHD2 e c) PGHAD3. . . . .	54
4.31	Curva de liberação controlada de doxiciclina das fibras PGHAD1, PGHAD2 e PGHAD3. . . . .	55
4.32	Proliferação celular de Fibroblastos após 24 e 48 horas de tratamento com Dox-HA e Dox desde 0,010 até 0,060 mM de Dox. *(P < 0,05), *** (P<0,001). . . . .	56

4.33 Resultado do ensaio de proliferação das células A-431 pelo teste de MTT após 24 e 48 horas de tratamento com Dox-HA e Dox nas concentrações de 0,010 até 0,060 mM de Dox, ** ( P < 0,01) e *** ( P < 0,001). . . . .	57
---	----

# Lista de Tabelas

1.1	Variáveis do processo de eletrofiação. . . . .	9
3.1	Quantidades utilizadas de PCL, GEL, nHA e Dox na preparação das fibras.	21
4.1	Área superficial, tamanho de poro e tamanho das nHAs . . . . .	32
4.2	Valores de tamanho de cristalito das amostras de HA determinados pelo método de Debye Scherer. . . . .	34
4.3	Principais eventos térmicos nas fibras PG e PGHA. . . . .	46
4.4	Atividade antibacteriana das fibra expressa em diâmetros da zona de inibição em mm. . . . .	58

# Sumário

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xiv
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Objetivos . . . . .	12
1.1.1 Objetivos gerais . . . . .	12
1.1.2 Objetivos específicos . . . . .	12
<b>2 Materiais e Equipamentos</b>	<b>13</b>
2.1 Reagentes . . . . .	13
2.2 Equipamento . . . . .	15
2.2.1 Liofilizador . . . . .	15
2.2.2 Sonicador . . . . .	15
2.2.3 Equipamento de Eletrofição . . . . .	15
2.2.4 Análises texturiais . . . . .	15
2.2.5 Ângulo de contato . . . . .	16
2.2.6 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho . . . . .	16
2.2.7 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível . . . . .	16
2.2.8 Análise térmica . . . . .	16
2.2.9 Cromatografia líquida de alta eficiência CLAE . . . . .	17
2.2.10 Difração de raios-X . . . . .	17
2.2.11 Microscopia eletrônica de transmissão . . . . .	17

2.2.12	Microscopia eletrônica de varredura . . . . .	17
<b>3</b>	<b>Parte Experimental</b>	<b>18</b>
3.1	Síntese da hidroxiapatita . . . . .	18
3.1.1	Adsorção de doxiciclina em hidroxiapatita . . . . .	19
3.1.2	Dessorção de doxiciclina da HA1 . . . . .	19
3.2	Preparação das fibras . . . . .	20
3.2.1	Preparação de matrizes de liberação controlada de Dox à base de nanofibras a partir da mistura de policaprolactona e gelatina nas proporções (70:30), (60:40) e (50:50) m/m (PCL:GEL) na presença e ausência de HA . . . . .	20
3.2.2	Eletrofiação . . . . .	21
3.3	Determinação do teor total de doxiciclina na fibra . . . . .	21
3.4	Liberação controlada de doxiciclina a partir das nanofibras . . . . .	22
3.5	Avaliação do potencial de citotoxicidade in vitro . . . . .	23
3.5.1	Cultura celular . . . . .	23
3.5.2	Teste de citotoxicidade . . . . .	24
3.5.3	Ensaio de MTT . . . . .	24
3.6	Avaliação da atividade antibacteriana . . . . .	25
3.7	Análise estatística . . . . .	25
<b>4</b>	<b>Resultados e Discussões</b>	<b>26</b>
4.1	Caracterização das nanopartículas de Hidroxiapatita . . . . .	26
4.1.1	Espectros FTIR de absorção na região do Infravermelho . . . . .	26
4.1.2	Análise térmica . . . . .	28
4.1.3	Determinação de área superficial específica e tamanho de poro . . . . .	30
4.1.4	Difração de raios X em pó . . . . .	32
4.1.5	Morfologia das HAs secas a 100 °C, 550 °C e calcinada a 850 °C . . . . .	35
4.2	Adsorção de Doxiciclina em HA . . . . .	36
4.2.1	Determinação da capacidade de adsorção de Doxiciclina em HA . . . . .	36
4.2.2	Dessorção de Doxiciclina . . . . .	37
4.3	Caracterização das fibras obtidas pela técnica de eletrofiação . . . . .	38
4.3.1	Análise térmica . . . . .	38
4.3.2	Análise por infravermelho . . . . .	41
4.3.3	Difração de raios X . . . . .	42
4.3.4	Ângulo de contato . . . . .	43
4.3.5	Análise térmica . . . . .	44

4.3.6	Calorimetria diferencial de varredura . . . . .	47
4.3.7	Infravermelho . . . . .	47
4.3.8	Difração de raios X . . . . .	49
4.3.9	Microscopia de Eletrônica de Varredura e de Transmissão . . . . .	50
4.3.10	Microscopia Eletrônica de Varredura . . . . .	50
4.3.11	Microscopia de Eletrônica de Transmissão . . . . .	54
4.3.12	Testes de liberação controlada de Doxiciclina . . . . .	54
4.3.13	Teste de citotoxicidade . . . . .	55
4.3.14	Avaliação da atividade antibacteriana . . . . .	57
<b>5</b>	<b>Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros</b>	<b>59</b>
5.1	Conclusões . . . . .	59
5.2	Sugestões para trabalhos futuros . . . . .	61
	<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>62</b>

# Lista de Abreviaturas

---

<i>Abreviatura</i>	<i>Descrição</i>
<b>BET</b>	<i>Brunauer-Emmett-Teller</i>
<b>BJH</b>	<i>Barrett-Joyner-Halenda</i>
<b>CLAE</b>	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>Dox</b>	<i>Doxiciclina</i>
<b>DRX</b>	<i>Difração de raios-X de pó</i>
<b>DSC</b>	<i>Calorimetria Exploratória Diferencial</i>
<b>DTG</b>	<i>Termogravimetria Diferencial</i>
<b>DTA</b>	<i>Análise Térmica Diferencial</i>
<b>FWHM</b>	<i>Full-Width-at-Half-Maximum</i>
<b>FTIR</b>	<i>Fourier Transform Infrared</i>
<b>GEL</b>	<i>Gelatina</i>
<b>HA</b>	<i>Hidroxiapatita</i>
<b>HEPES</b>	<i>4- (2-hidroxietil) - ácido 1-piperazina- etano-sulfônico</i>
<b>ET</b>	<i>Engenharia de Tecidos</i>
<b>MET</b>	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>
<b>MTT</b>	<i>Brometo de 3- (4,5- dimetilazol- 2-il)- 2,5- (difeniltetrazol)</i>
<b>nHA</b>	<i>Nanopartículas de Hidroxiapatita</i>
<b>PBS</b>	<i>Solução tampão de fosfato</i>
<b>PCL</b>	<i>Polímero de Policaprolactona</i>
<b>PG</b>	<i>Blenda de Policaprolactona-Gelatina</i>
<b>PGHA</b>	<i>Blenda de Policaprolactona-Gelatina-Hidroxiapatita</i>
<b>PGHAD</b>	<i>Blenda de Policaprolactona-Gelatina-Hidroxiapatita-Doxiciclina</i>
<b>SBF</b>	<i>Solução de fosfato de cálcio simuladora de fluídos biológicos</i>
$T_d$	<i>Temperatura de decomposição</i>
<b>TG</b>	<i>Termogravimetria</i>
$T_g$	<i>Temperatura de transição vítrea</i>
$T_m$	<i>Temperatura de fusão</i>

---

# Capítulo 1

## Introdução

A doença periodontal ou periodontite é uma doença inflamatória crônica ou aguda da gengiva e do periodonto, que causa destruição do tecido conjuntivo, do ligamento periodontal, perda óssea e conseqüentemente, perda dos dentes. Ocorre devido à infecção causada por bactérias que afeta os tecidos que rodeiam os dentes. A principal abordagem para tratamentos não cirúrgicos é a raspagem e alisamento e o uso de antibióticos de liberação local. Nos estágios mais avançados da doença, as técnicas cirúrgicas incluem a regeneração tecidual guiada (RTG). A RTG se refere ao uso de meios físicos para promover um selamento total de um local anatômico para prevenir que outros tecidos, principalmente tecido conjuntivo, interfiram na osteogênese, bem como no direcionamento da formação óssea [1–3]. A forma mais comum de doença periodontal é a periodontite crônica que afeta 10% a 15% dos adultos em todo o mundo. Estudos recentes demonstram também que mais de 75% da população adulta possui bolsa periodontal com um menor grau de comprometimento [4].

Nesse cenário, o desenvolvimento de novas tecnologias vem ocorrendo com o intuito de buscar novos biomateriais que possam regenerar e reparar de forma apropriada partes danificadas do corpo. Os biomateriais ou materiais biomédicos são definidos como toda substância ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que durante um período de tempo indeterminado, podem ser usados como dispositivo médico que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo [5, 6].

Nesse sentido a área de medicina regenerativa (MR) tem surgido como uma alternativa potencial para a regeneração de órgãos e reparação de tecidos visando superar as limitações de tratamentos convencionais. O que difere a MR do transplante de órgãos convencional é que ela geralmente envolve o isolamento de tecido do próprio

paciente, o qual é dissociado em células e cultivado sobre suportes biodegradáveis, biológicos ou sintéticos (conhecidos como andaimes ou arcabouços), para então serem reinsertos no paciente. Após o implante se degrada gradualmente com o tempo e dessa forma é substituído por um novo tecido gerado a partir das células semeadas [7].

Recentes avanços na área da MR e da engenharia tecidual possibilitaram o desenvolvimento e aprimoramento de novos biomateriais com propriedades mecânicas e biológicas específicas semelhantes às da matriz extracelular nativa (MEC). A superfície dos andaimes tem um destaque especial, pois é neste local que se dá a interface com os agentes biológicos, e as suas propriedades superficiais são essenciais para a adsorção de proteínas, a coagulação do sangue e o reconhecimento das células [8]. Na última década, vários métodos para a construção de andaimes foram desenvolvidos para aplicações na engenharia de tecidos e medicina regenerativa com o intuito de mimetizar a arquitetura da MEC. Entre os diversos métodos de formação de andaimes, a eletrofição ganhou popularidade por permitir a produção de fibras com diâmetro que variam desde nanômetros até micrômetros a partir de soluções poliméricas [9].

Os materiais mais utilizados para a obtenção de andaimes são os polímeros biodegradáveis e as cerâmicas bioativas. Vários polímeros sintéticos tais como poli (ácido láctico) (PLLA), poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) e policaprolactona, e polímeros naturais como colágeno, quitosana, fibroína de seda e quitina [10], bem como a combinação de polímeros sintéticos e polímeros de origem natural.

### **Biocerâmicas de fosfatos de cálcio**

As cerâmicas de fosfatos de cálcio possuem grande potencial de aplicação na área de implantes ósseos, e têm merecido lugar de destaque entre as denominadas biocerâmicas por não apresentar toxicidade local ou sistemática, ausência de resposta de corpo estranho ou inflamação e aparente habilidade em interagir com o tecido hospedeiro [11]. As biocerâmicas podem ser de origem (natural ou sintético), podem apresentar diferentes composições tais como Hidroxiapatita,  $\beta$ -Tricálcio fosfato, fosfato de cálcio bifásico, diferentes formas físicas (micro ou nano particulado, blocos, cimento, etc.). Os fosfatos de cálcio na forma de apatita carbonatada apresentam composição similar ao osso mineral e têm razões molares Ca/P variadas devido a sua estrutura complexa. A apatita é um material altamente capaz de acolher outros elementos químicos, permitindo substituições de Ca e P por vários outros íons. As apatitas

são definidas pela fórmula química  $M_{10}(ZO_4)_6X_2$ , onde a espécie M são tipicamente cátions metálicos divalentes tais como: Ca, Sr, Ba, Pb, etc. As espécies Z são um dos seguintes ânions trivalentes: P, V, As, S, Si, Ge,  $CO_3$ , etc. Os ânions monovalentes X são geralmente F, Cl, OH, O, Br,  $CO_3$ , etc [12].

Dentre os minerais mais representativos do grupo da apatita, encontra-se a hidroxiapatita (HA;  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ) um fosfato de cálcio com razão Ca/P de 1,67 e cristalografia definida. A célula unitária dos cristais de HA pode apresentar simetria monoclinica ( $P_2 1/b$ ) e simetria hexagonal ( $P_6 3/m$ ). Na área de regeneração óssea a HA é um dos biomateriais mais utilizados devido ao fato desta ser a principal fase mineral encontrada no tecido ósseo. A HA sintética possui excelente biocompatibilidade e osteointegração com ossos e dentes devido a sua semelhança química e física, tornando-a substituta em implantes e próteses. No entanto, HA sintética é mecanicamente frágil, por isso as suas aplicações são limitadas apenas para peças não estruturais na forma de pós ou grânulos de pequenas dimensões, ou usado como uma camada de revestimento de metais [10, 13].

No corpo humano, a hidroxiapatita é o principal componente inorgânico do tecido ósseo e dos dentes. As hidroxiapatitas biológicas têm sido descritas como apatitas deficientes de cálcio, e possuem íons carbonatos como substitutos, sendo conhecida como HA carbonatada (CHA). Os íons carbonato podem substituir os grupos hidroxila ( $OH^-$ ) ou fosfato ( $PO_4^{-3}$ ), dando origem a CHA tipo A e tipo B, respectivamente. A fórmula química para a CHA tipo A é  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_{2-2y}(CO_3)_y$ , onde  $0 \leq y \leq 1$ , enquanto que para CHA tipo B se tem  $Ca_{10-x}(PO_4)_{6-x}(CO_3)_x(OH)_{2-x}$ , onde  $0 \leq x \leq 2$ , sendo que os íons de sódio estão localizados nos locais de cálcio, induzindo o balanço de cargas [14].

Os métodos de preparação, bem como o tipo de reagentes usados, temperatura da reação, pH da solução, concentração dos reagentes e a utilização de surfactantes são conhecidos como parâmetros importantes para o controle do tamanho e morfologia das partículas de HA. Assim, partículas de HA com tamanho nano ou micrométrico, com diferentes morfologias tais como esferas, bastões, agulhas, etc., têm sido sintetizadas com sucesso usando os métodos de sol-gel, reação de estado sólido, reações hidrotérmicas, sínteses por microemulsão, mecano-química e co-precipitação [15]. O processo de síntese química de HA por via úmida baseado na rota de precipitação é o mais empregado para a síntese, por ser um processo simples e gera HA nanocristalina a baixas temperaturas. Zhao et al., [16] prepararam nHA com uma variedade de formas

(bastões, esferas, agulhas) através da técnica de precipitação química usando diferentes tipos de surfactantes seguido de tratamento térmico. O uso de surfactante como agente direcionador permite a obtenção de materiais com propriedades estruturais específicas com maior área superficial e formação de mesoporos. Também foram encontrados no estado da arte diversos estudos os quais relatam a síntese de HA nanoestruturada com utilização de diversos surfactantes catiônicos [17], assim como a preparação de nanotubos e nanoesferas de HA ocas com o uso de uma mistura de surfactantes não-iônicos [18], HA mesoporosa [19] e fosfatos de cálcio mesoestruturados [20].

O controle da liberação de fármacos em sítios de ação específicos através da utilização de sistemas carreadores é uma estratégia que tem sido objeto de intensa pesquisa nas últimas duas décadas. Dispositivos de liberação controlada de fármacos podem reduzir efeitos colaterais, melhorar a eficácia dos fármacos existentes e possibilitar novos tratamentos. Dentre as matrizes para a liberação controlada de fármacos encontram-se os fosfatos de cálcio, usados comumente como implantes para reconstrução óssea [21].

Várias estratégias têm sido utilizadas para carregar diferentes agentes terapêuticos em HA. Essas estratégias podem ser classificadas em duas abordagens gerais. A primeira consiste em carregar os fármacos durante a síntese da HA, isto é, adicionar o fármaco desejado na mistura da reação antes de terminar a formação da HA (carreamento *in situ*). A segunda abordagem implica carrear os agentes só depois que a HA é sintetizada. Desse modo, os agentes terapêuticos são adsorvidos na superfície da HA (carreamento *ex-situ*) [22].

O processo de adsorção/dessorção de fármacos da HA é complexo e depende da concentração de equilíbrio do fármaco, do pH e de outros fatores próprios do meio. Embora sejam encontrados estudos os quais usam a HA como matriz para a liberação de fármaco, ela apresenta efeito explosão e é observada uma liberação de curto tempo [23]. Dessa forma as, aplicações de HA como sistema de liberação controlada de fármacos apresentam limitações. Por outro lado, a combinação de HA com outras matrizes como as poliméricas formando materiais compósitos pode ser uma estratégia para a preparação de sistemas de liberação controlada de fármacos [24]. Esse tipo de combinação é conhecido como compósitos de polímeros biodegradáveis e os fosfatos de cálcio [25].

## Matrizes poliméricas

Os polímeros são os materiais mais utilizados na fabricação de andaimes para aplicações da medicina regenerativa e engenharia de tecidos. Dentre os polímeros mais usados estão os poliésteres biodegradáveis baseados nos monômeros ácido láctico e glicólico. Esses materiais foram empregados há 30 anos em cirurgia como materiais para suturas e fixação de dispositivos ósseos. Os polímeros feitos a partir dos monômeros láctico (PLA) e glicólico (PGA) se caracterizam por ter tempos de degradação que variam de dias até anos, dependendo da formulação específica e do peso inicial do monômero [26]. A partir desses outros polímeros biodegradáveis tem sido sintetizados e usados como matrizes de liberação de fármacos como a caprolactona.

A Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) é um poliéster alifático semicristalino, de grande interesse na engenharia de tecidos. Pode ser obtido pela reação de abertura de anel da  $\epsilon$ -caprolactona, seu monômero cíclico. O PCL degrada-se a uma taxa significativamente menor do que o PLA, PGA, e PLGA. O PCL é hidrofóbico e solúvel em vários solventes orgânicos, apresenta ponto de fusão entre 55-60 °C e temperatura de transição vítrea por volta de -60 °C, tendo a capacidade de formar misturas miscíveis com uma grande variedade de polímeros. Sua cristalinidade elevada tende a diminuir com o aumento do peso molecular. O tempo de degradação do PCL é bastante lento aproximadamente de 2 a 3 anos sobre condições fisiológicas, por isso é recomendado em implantes de longa duração. O PCL tem baixa resistência à tração (23 MPa) e alta resistência à ruptura (>700 %) [27]. Assim, esse polímero hidrofóbico tem amplas perspectivas para aplicações na engenharia de tecido ósseo devido a suas propriedades mecânicas e degradação mais lenta [28].

Na área de medicina regenerativa têm sido usados além dos polímeros biodegradáveis os polímeros naturais como os polissacarídeos, os derivados de colágeno como a gelatina. A gelatina é uma proteína natural derivada do colágeno, usada para aplicações médicas e farmacêuticas devido à sua biodegradabilidade e biocompatibilidade em ambientes fisiológicos. A gelatina é reconhecida pelo FDA [29] por ser um material seguro para ser usado como expansor plasmático, como ingrediente na fabricação de cápsulas na indústria farmacêutica e como vedante para próteses vasculares [30]. De acordo com o método de pré-tratamento do colágeno, dois tipos de gelatina podem ser produzidos. Gelatina tipo A (tratamento ácido) e tipo B (tratamento alcalino). Esses dois tipos de gelatinas apresentam propriedades ligeiramente diferentes, sendo que o processo alcalino hidrolisa os grupos amida da asparagina e glutamina a grupos

carboxilatos, convertendo muitos desses resíduos para aspartato e glutamato. Em contraste, o pré-tratamento ácido tem pouco efeito sobre os grupos amida presentes [30]. A gelatina tipo A tem uma ampla faixa de distribuição molar de 30 a 300 kDa, por sua vez gelatina tipo B é considerada de melhor qualidade por apresentar uma distribuição de massa molar próxima de 100 kDa e cadeias ligeiramente ramificadas [31]. Assim como o colágeno, a gelatina é composta por 18 aminoácidos diferentes que estão unidos por ligações peptídicas na formação da molécula de gelatina, cujo peso molecular médio varia entre 20.000 a 250.000, dependendo do grau de hidrólise do colágeno. As fontes mais abundantes de gelatina são obtidas a partir da pele de porco (46 %), pele bovina (29,4%) e carne de porco e ossos de gado (23,1%). A qualidade da gelatina para uma aplicação particular depende em grande parte de suas propriedades reológicas e propriedades físico-químicas, tais como os parâmetros de composição, solubilidade, transparência, cor e odor. Os principais atributos que melhor definem a qualidade comercial global da gelatina são a resistência do gel (temperaturas de gelificação) e estabilidade térmica (temperatura de fusão) [32].

A gelatina mostra características importantes como dispositivo carregador de biomoléculas com cargas positivas ou negativas. O ponto isoelétrico da gelatina pode ser ajustado através de tratamento ácido/base para conseguir a máxima capacidade de carregamento, segundo as propriedades eletrostáticas do fármaco. A gelatina é um material à base de proteínas com vários locais de reconhecimento celular, em combinação com polímeros sintéticos, que mostram melhor processabilidade e propriedades físicas ajustáveis, pode resultar em dispositivo com características específicas para a liberação de fármacos [29].

### **Métodos de fabricação de Andaimos**

As técnicas recentes na fabricação de andaimos tem permitido o desenvolvimento de estruturas complexas bem definidas, mediante a combinação de diferentes materiais visando aperfeiçoar a função destas estruturas na engenharia de tecidos. A capacidade dos andaimos tridimensionais em estimular o crescimento e proliferação celular pode ser favorecida em estruturas porosas e com uma maior área superficial. Os principais requisitos para a escolha dos materiais na engenharia de tecidos, é que estes tenham superfícies compatíveis e boas propriedades mecânicas. O desenho e preparação de estruturas multicomponentes representa uma estratégia viável, a fim de desenvolver materiais inovadores. A combinação de polímeros com sua diversidade estrutural e excelentes propriedades mecânicas, junto à altamente bioativa HA é

claramente uma estratégia importante para a fabricação de andaimes para aplicações na engenharia de tecido ósseo [28]. Dentre os métodos existentes, podemos enumerar como os mais utilizados, a lixiviação, inversão de fase empacotamento de fibras, tecnologias baseadas na fusão, métodos baseados em alta pressão, liofilização e a eletrofiação.

Várias abordagens têm sido desenvolvidas para a fabricação de andaimes 3D à base de biomateriais. Dentre as mais recentemente estão a produção de nanofibras poliméricas para serem usadas como andaimes de vasos sanguíneos arteriais, ossos, cartilagens, coração e nervos [33]. A fabricação de andaimes a partir de nanofibras permite o desenvolvimento de suportes que imitam a arquitetura do tecido humano natural na escala nanométrica. A elevada relação área/volume das nanofibras combinada com a sua estrutura microporosa, favorece a adesão, proliferação, migração e diferenciação celular, essas propriedades são altamente desejadas na engenharia de tecidos [34]. Várias metodologias estão disponíveis para a obtenção de nanofibras: separação de fase, auto-organização, eletrofiação entre outros. Dentre as técnicas citadas acima a eletrofiação é a técnica mais amplamente estudada e também parece exibir os resultados mais promissores para aplicações na medicina regenerativa [35].

O método de eletrofiação é um processo relativamente simples e de baixo custo, permite a obtenção de fibras ultrafinas com diâmetros na faixa de micro até nanômetros. O processo é iniciado com uma gota da solução polimérica que é mantida na ponta de um capilar devido a sua tensão superficial. Quando um campo elétrico, gerado por uma fonte de alta voltagem é aplicado entre o capilar e uma placa coletora, uma gota pendente da solução polimérica torna-se altamente eletrificada e as cargas induzidas são distribuídas uniformemente sobre a superfície. Um aumento no potencial elétrico leva inicialmente ao alongamento da superfície hemisférica da gota na ponta do capilar até adquirir uma forma cônica chamada cone de Taylor [36–38]. A Figura 1.1 mostra um esquema básico da configuração para o processo de eletrofiação que consiste de três componentes principais: a fonte de alta tensão, uma bomba de infusão, e um coletor.

Quando o campo elétrico alcança um valor crítico suficiente para superar a tensão superficial da gota, jatos múltiplos carregados são ejetados da ponta do cone de Taylor. Enquanto o jato viaja através do ar sofre uma série de instabilidades que permitem com que gradualmente forme-se um fio muito comprido e fino devido principalmente ao alongamento e evaporação do solvente. O jato carregado forma nanofibras orientadas aleatoriamente que podem ser recolhidas em um coletor metálico

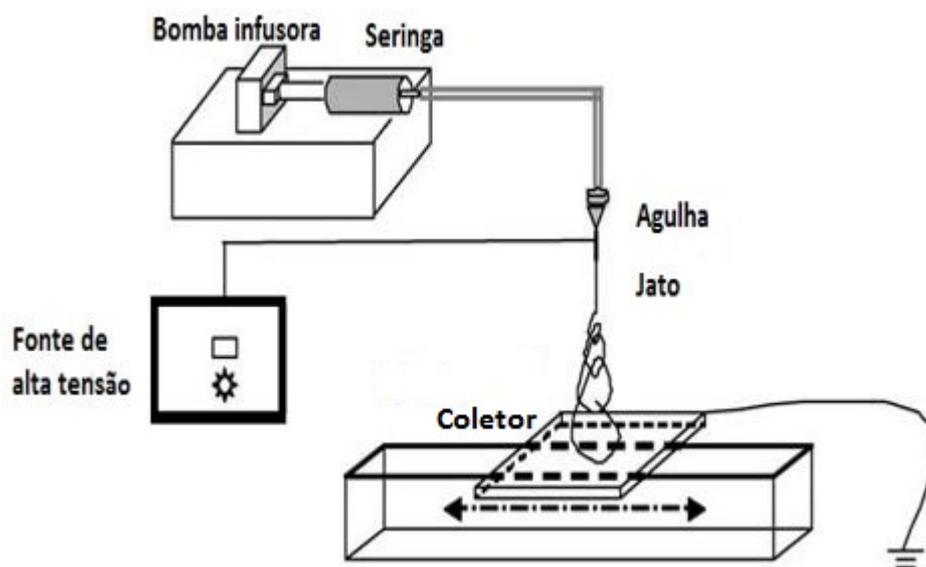


Figura 1.1: Representação esquemática da técnica de eletrofição. Adaptado de Z.M. Huang et al. 2004.

aterrado fixo ou rotatório [36, 37].

Embora relativamente simples, o processo de eletrofição precisa do controle de vários parâmetros que influenciam o diâmetro e morfologia das nanofibras. Os parâmetros que afetam a técnica de eletrofição são força do campo elétrico, diâmetro do orifício da agulha, distância entre a agulha e o coletor, temperatura, umidade, velocidade do ar, vazão e propriedades da solução, tipo de polímero, peso molecular do polímero, tensão superficial, condutividade e viscosidade. A forma de movimento do coletor determina o modelo de deposição das fibras e permite obter fibras alinhadas ou aleatórias. A Tabela 1.1 mostra de forma geral como podem ser agrupadas as variáveis que controlam as características das nanofibras, estas podem ser agrupadas em variáveis de processo e variáveis do sistema [37].

O processo de eletrofição usando a combinação de polímeros sintéticos e naturais, está se tornando uma forma eficaz para o desenvolvimento de andaimes com melhores propriedades físico-químicas e biológicas para aplicações na engenharia de tecidos [39]. O potencial de aplicação de eletrofição de misturas de polímeros sintéticos-naturais tem sido pouco explorado devido principalmente ao número limitado de solventes para dissolver os dois polímeros na mesma solução [39]. A obtenção de fibras por eletrofição de polímeros naturais a partir de sistemas aquosos é

Variáveis do sistema		
Composição Química (T)	Peso molecular do polímero (T)	Distribuição do peso molecular (T)
Viscosidade da solução	Tensão superficial	Qualidade da solução
Concentração da solução	Densidade de carga	Condutividade da Solução
Variáveis do processo		
Forma do capilar	Material do eletrodo	Força do campo elétrico
Distância ao coletor	Taxa de evaporação (T,P)	Vazão

Tabela 1.1: Variáveis do processo de eletrofição.

inadequada devido a sua elevada tensão superficial e sua baixa volatilidade da solução aquosa. Além disso, polímeros naturais são pouco solúveis em solventes orgânicos. Existe um número limitado de solventes, incluindo 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol e ácido trifluoroacético, que pode ser usado para dissolver polímeros naturais e sintéticos [39, 40]. No entanto, o custo, a toxicidade e os problemas ambientais relacionados com esses solventes geram algum tipo de receio na sua utilização em aplicações biomédicas. Recentes estudos tem mostrado que a utilização de solventes ácidos como o ácido acético e o ácido fórmico conseguem dissolver polímeros naturais tais como quitosano e gelatina. Song et al [40] utilizou uma mistura de acetato de etila com ácido acético diluído e conseguiu obter através de eletrofição nanofibras de gelatina. A utilização deste sistema para dissolver tanto polímeros naturais quanto sintéticos tem sido pouco explorada. Diferentes solventes têm sido usados na preparação de fibras a partir da mistura entre polímeros sintéticos e naturais, especialmente da combinação PCL/GEL, mas todos os solventes são baseados em solventes fluorados. O presente trabalho usou solventes não fluorados, menos tóxicos e mais biocompatíveis como alternativa.

O estado da arte relata estudos que mostram que a blenda PCL/GEL possui uma boa biocompatibilidade e propriedades mecânicas, físicas e químicas melhoradas. Portanto, a fabricação desses andaimes com uma ótima relação custo-benefício é um grande avanço no desenvolvimento de materiais que ainda não são disponíveis devido ao pouco sucesso dos dispositivos atuais para suprir essas necessidades [39, 41].

O presente trabalho além da estratégia de usar blendas poliméricas como o PCL com gelatina também usou a estratégia de usar as nanopartículas de HA nas nanofibras para modular a liberação controlada de doxiciclina uma vez que a incorporação de nanopartículas de HA em compósitos de polímeros biodegradáveis aumenta a capacidade osteoindutora e reforça as propriedades mecânicas dos andaimes quando usados em reconstituição óssea ou câncer de osso [42].

Os sistemas de liberação controlada de fármacos ganharam importância na última década quando comparadas com os sistemas convencionais de dosagem. A maioria dos fármacos tem seu efeito terapêutico apenas quando sua concentração plasmática está acima do seu nível mínimo eficaz. No entanto, cada fármaco tem seu tempo de meia-vida biológica e não pode manter uma concentração eficaz durante longo tempo. O aumento da dose do fármaco pode prolongar sua ação, embora com o risco de aumentar a probabilidade de efeitos adversos. Formulações e dispositivos de liberação controlada de fármacos são desenvolvidos para liberarem o medicamento gradualmente mantendo a concentração plasmática do fármaco em níveis terapêuticos adequados por períodos de tempo prolongados [34].

Vários sistemas de liberação de fármacos têm sido estudados: lipossomas, micelas poliméricas e complexos. Nos últimos anos a fabricação de nanofibras à base de polímeros obtidos a partir do processo de eletrospinning foi objeto de muita atenção como um promissor carregador de fármacos em aplicações biomédicas [43]. As principais vantagens de sistemas carregadores à base de fibras quando comparados a outros tipos de aplicações de sistema de liberação de fármaco, é a diversidade na escolha dos materiais e fármacos. As nanofibras têm também uma alta capacidade de carga, alta eficiência de encapsulamento e podem carregar simultaneamente diferentes agentes terapêuticos [36].

O presente trabalho escolheu como fármaco de estudo a doxiciclina por ser um fármaco com propriedades antimicrobianas e anti-cancerígenas e para a restauração de perda óssea em doenças como a periodontal. A doxiciclina é um antibiótico de amplo espectro, derivado sintético das oxitetraciclinas, eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A Dox tem ação bacteriostática, inibindo a síntese proteica bacteriana, devido ao rompimento do RNA transferase e RNA mensageiro nos ribossomos. A doxiciclina é frequentemente empregada no tratamento de uma grande variedade de infecções incluindo a doença periodontal, osteomielite e para combater *S. aureus* resistente à metilicina (*S. aureus*, MRSA) [44, 45]. Dox é considerado um dos

mais potentes inibidores das metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs), sendo que vários estudos indicam que a Dox tem efeitos benéficos no tratamento de doenças em que as MMPs desempenham papéis patológicos, tais como hipertensão arterial, aneurisma aórtico abdominal, infarto agudo do miocárdio e câncer de colo retal [46]. Efeitos benéficos da Dox sobre o metabolismo de ossos foram relatados, mesmo a baixas concentrações, entre 2-5  $\mu\text{gmL}^{-1}$  [45].

Os métodos de regeneração óssea guiada (ROG) e regeneração tecidual guiada (RTG) são terapias bem estabelecidas para reparar defeitos ósseos e teciduais, baseiam-se no uso de meios físicos para promover um selamento total de um local anatômico para prevenir que outros tecidos, principalmente tecido conjuntivo, interfiram na osteogênese, bem como no direcionamento da formação óssea. Esta barreira (membrana) é colocada em contato direto com a superfície óssea circundante, posicionando o perióstio na superfície externa da membrana [1, 3]. Apesar de que, as membranas convencionais para ROG e RTG fabricadas com diferentes polímeros mostram excelentes resultados clínicos, um segundo procedimento cirúrgico é necessária para remover as membranas após geração de novo osso. Por outro lado, as membranas degradáveis tem a vantagem de evitar uma segunda cirurgia a causa da sua degradação mais rápida. Outro desafio importante dessas membranas está associado a sua capacidade osteocondutiva, estabilidade mecânica e controle de infecções no local da cirurgia.

Portanto, Andaimos à base de nanofibras da mistura polimérica PCL/GEL com nanopartículas de HA na superfície das fibras e com a capacidade de liberar um antibiótico de amplo espectro é um excelente candidato para a regeneração óssea guiada ou regeneração tecidual guiada.

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivos gerais

O presente trabalho objetiva a obtenção e caracterização de nanofibras com base na blenda PCL/GEL e o compósito PCL/GEL-nHA-Dox para a liberação controlada de doxiciclina.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Obtenção e caracterização físico-química de nanofibras usando o processo de eletrofição de soluções poliméricas (PCL/GEL) nas proporções (70/30), (60/40) e (50/50) e das soluções poliméricas contendo HA nanoparticulada e Dox (PCL/GEL-HA-Dox);
- Avaliação do perfil cinético de liberação *in vitro* de doxiciclina encapsulada nas fibras obtidas;
- Avaliação da citotoxicidade e biocompatibilidade *in vitro* das fibras obtidas em células normais (fibroblastos) e células de linhagem tumoral (A431);
- Avaliação da atividade antibacteriana das fibras obtidas em bactérias Gram-positivas (*S. aureus*) e Gram-negativas (*P. gingivalis*).

## Capítulo 2

# Materiais e Equipamentos

Neste capítulo serão listados os materiais utilizados no presente trabalho e suas respectivas origens e purezas.

### 2.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de alto grau de pureza e não sofreram qualquer tipo de purificação.

Policaprolactona - (PCL) (Polysciences, Inc., EUA) - Polímero semicristalino, hidrofóbico e solúvel em vários solventes orgânicos. Fórmula molecular  $(C_6H_{10}O_2)_n$  massa molar 43,000-50,000  $g \cdot mol^{-1}$ . Ponto de fusão entre 59 °C a 64 °C. Lote 541261. A Figura 2.1 mostra fórmula estrutural do polímero PCL.

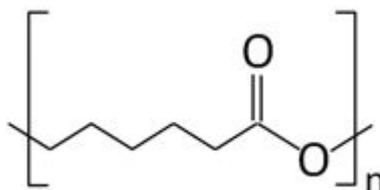


Figura 2.1: Fórmula estrutural do polímero policaprolactona.

Gelatina tipo B (Gel) obtida de pele bovina - (Sigma-Aldrich, Brasil) - O número de Bloom (proporcional à massa molecular média) da gelatina de pele bovina varia entre 90-300. A gelatina é mais solúvel em água quente do que em água fria, e é praticamente insolúvel na maioria dos solventes orgânicos. O pH de uma solução 1,5%

a 25 °C é 5,0-7,5. Lote 051m0012.

Doxiciclina hclato - (Araujo Manipulação) teor de 86%. Solúvel em água e metanol, ligeiramente solúvel em etanol. Umidade 1,4% - 2,8%. Conteúdo de etanol 4,3 - 6,0%. A fórmula molecular  $C_{22}H_{25}ClN_2O_8 \cdot \frac{1}{2}C_2H_6O \cdot \frac{1}{2}H_2O$ . Massa molecular 512,9  $g \cdot mol^{-1}$ . Ponto de fusão 201 °C. O fármaco apresenta absorção UV, em torno de 270 e 360 nm e possui três pKas: pKa<sub>1</sub> 3,02; pKa<sub>2</sub> 7,97; pKa<sub>3</sub> 9,15. Lote 1211159. A Figura 2.2 mostra formula estrutural da doxiciclina.

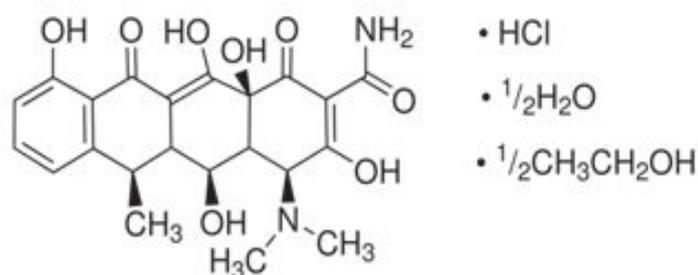


Figura 2.2: Estrutura do hclato de doxiciclina.

Outros materiais utilizados no trabalho

- Ácido acético glacial (Grupo Química, Brasil) - teor mínimo 99,8%
- Acetato de etila (Vetec, Brasil) - teor mínimo 99,5%
- Pluronic F127 Surfactante não-iônico (Sigma-Aldrich, EUA)
- Nitrato de cálcio (Synth, Brasil) - Reagente P.A. ACS., teor mínimo 99,0%
- Fosfato de sódio dibásico anidro (VETEC, Brasil) - Reagente PA, teor mínimo 99,0%
- Hidróxido de amônia (Synth, Brasil) - teor 28-30%
- Cloreto de sódio (Grupo Química, Brasil) - teor mínimo 99,0%
- Cloreto de potássio (VETEC, Brasil) - teor mínimo 99,0%
- Fosfato de potássio monobásico anidro (VETEC, Brasil) - Reagente PA, teor mínimo 99%

- Água deionizada proveniente de um sistema Milli-Q- Millipore (Millipore, EUA)
- Antibiótico (Penicilina e Estreptomicina) (Cultilab, Brasil)
- Dodecil Sulfato de Sódio (LGC Biotecnologia, Brasil)
- DMEM (Duldecco´s Modified Eagle´s)
- MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) - (Invitrogen, EUA)
- Soro fetal bovino (Gidco, EUA)
- Tripsina-EDTA (0,25%) (Sigma-Aldrich, EUA)

## 2.2 Equipamento

### 2.2.1 Liofilizador

As liofilizações foram realizadas empregando-se o aparelho Thermo, modelo *Savant ModulyoD freezer Dyer*.

### 2.2.2 Sonicador

As sonicações foram efetuadas em equipamento *Vibra-cell High Intensity Ultrasonic Liquid Processors* operado a uma amplitude 30 %.

### 2.2.3 Equipamento de Eletrofiação

O equipamento de eletrofiação é constituído de uma fonte de alta tensão ajustável de 0 a 30 kV *Gamma High voltage*, empregado para gerar o campo elétrico. Uma bomba de infusão *Harvard Apparatus PHD 2000*, uma placa metálica de aço inoxidável de 20x20 cm e uma agulha de 0,8 mm de diâmetro.

### 2.2.4 Análises texturiais

As análises de área superficial específica e a distribuição do tamanho de poro foram feitas por o método de BET e BJH, respectivamente. O equipamento empregado foi o *Autosorb 1-Quantachrome System*. As amostras foram submetidas a vácuo para sua desgaseificação a uma temperatura constante de 180 °C, por duas horas, para eliminação de possíveis contaminantes presentes. A amostra foi submetida a um fluxo

de nitrogênio gasoso e posteriormente foi imersa em um banho de nitrogênio líquido em condições criogênicas ( $T = -196^{\circ}\text{C}$ ).

### 2.2.5 Ângulo de contato

A medida do ângulo de contato caracteriza a afinidade entre a água e a superfície das fibras. As medidas de ângulo de contato foram feitas no equipamento *Kruss* modelo DSA100 a  $25^{\circ}\text{C}$ . A aquisição e o tratamento de dados foram realizados pelo software *Drop Shape Analyzer*. Foram obtidas 5 medidas de ângulo de contato para gotas de  $10\ \mu\text{L}$  de volume depositada na superfície da fibra.

### 2.2.6 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em espectrofotômetro *Perkin Elmer Spectrum GX* obtido a partir de pastilhas de KBr na região de  $4000\text{-}400\ \text{cm}^{-1}$ .

### 2.2.7 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível

Os espectros de absorção na região do UV-Vis foram registrados em espectrofotômetro *Thermo Multiskan Spectrum*. Foram utilizadas cubetas de quartzo com 1 cm de caminho ótico. As análises foram feitas em água e/ou tampão PBS pH 7,4 e medidos em comprimentos de onda de 270 e 350 nm, picos esses característicos do hialato de doxiciclina. Ambos foram usados para a quantificação da Dox o primeiro para dessorção do fármaco das nHA e o segundo para a liberação controlada a partir das fibras.

### 2.2.8 Análise térmica

Os experimentos de análise termogravimétrica TG/DTG e análise térmica diferencial DTA foram realizadas no aparelho *TA Instruments* modelo SDT Q600 com registro simultâneo, sob atmosfera dinâmica de  $\text{N}_2$ , com vazão de aproximadamente  $50\ \text{mL min}^{-1}$ . A massa das amostras variou entre 5-10 mg e foi pesada em cadinhos de alumina de  $40\ \mu\text{L}$ , empregando-se uma razão de aquecimento de  $10\ ^{\circ}\text{C min}^{-1}$  de 25 até  $700\ ^{\circ}\text{C}$ . Os dados obtidos foram analisados no software *TA universal Analysis 2000* e posteriormente plotados utilizando o programa *OriginPro 7.0, OriginLab Corporation*.

### 2.2.9 Cromatografia líquida de alta eficiência CLAE

A quantificação da Dox liberada das fibras foi feita em equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência marca Shimadzu modelo LC 20AT, equipado com duas bombas acopladas e dois detectores ligados em série: detector com arranjo de diodos (DAD) UV/vis modelo *SPD 20A Prominence* operando a 270 e 350 nm. A coluna empregada foi *EC Nucleodur C<sub>18</sub>* (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 3 mm) e uma válvula de injeção *Rheodyne*, com um alça dosadora de 20  $\mu\text{L}$ . A fase móvel utilizada foi ácido acético a 5 %: acetonitrila (75:25 v/v). A aquisição e o tratamento de dados foram realizados pelo software LC Solution.

### 2.2.10 Difração de raios-X

A caracterização das fases cristalinas das amostras foram determinadas em um difractômetro de raios X *Rigaku Geiger-flex 2037*. Utilizou-se tubo de cobre e radiação de  $\text{CuK}_\alpha = 1,54051$ , operando a 30 kV e 30 mA, com a variação do ângulo  $2\Theta$  de 4 a  $60^\circ$  e velocidade de varredura de  $4\Theta \text{ min}^{-1}$ .

### 2.2.11 Microscopia eletrônica de transmissão

A morfologia das amostras foi estudada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) utilizando microscópio *Tecnai G2-12 Spirit Biotwin FEI*. As amostras foram depositadas em um *grid* de cobre e recobertas com uma camada de 5 nanômetros de carbono para facilitar a condução de elétrons e evitar o acúmulo de cargas e com consequente destruição da amostra.

### 2.2.12 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia das amostras foi estudada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando microscópio eletrônico *FEG-Quanta 200 FEI*, com uma tensão de aceleração de 10 kV e magnificações de 30000 x. Os valores dos diâmetros médios das fibras e nanopartículas foram obtidos pela medida de 50 fibras diferentes e 100 nanopartículas, com auxílio do software de edição de imagens *ImageJ*.

# Capítulo 3

## Parte Experimental

### 3.1 Síntese da hidroxiapatita

A hidroxiapatita foi preparada pelo método de co-precipitação com o copolímero tri-bloco Pluronic F127 ( $EO_{99}PO_{65}EO_{99}$ ) como *template* e surfactante, de acordo com o método descrito na literatura com algumas modificações [47, 48]. Pesou-se 3,00 g de Pluronic F127 e foram dissolvidos em 100 mL de água deionizada, em seguida foram adicionados 9,45 g de  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  (0,04 moles  $Ca^{2+}$ ), deixando sob agitação por 3 horas. Em outro béquer foram dissolvidos 3,41 g de  $Na_2HPO_4$  (0,024 moles de  $PO_4^{3-}$ ) em 60 ml de água deionizada e o pH foi ajustado em 10 usando uma solução de amônia (28%). A solução de  $PO_4^{3-}$  foi adicionada gota a gota à solução de  $Ca^{+2}/F127$ , sob agitação. A mistura foi deixada sob refluxo, em banho de silicone a  $90\text{ }^\circ C$ , por 24 h, com agitação constante. Após esse tempo o precipitado formado foi deixado em repouso por 24 h, depois foi filtrado e lavado com cerca de 500 mL de água. Por fim o precipitado foi dividido em três partes e cada uma delas submetida a diferentes tratamentos térmicos. A primeira foi secada em estufa a  $100\text{ }^\circ C$  por 24 horas (HA1), a segunda calcinada a  $550\text{ }^\circ C$  por 6 horas (HA2) e a terceira calcinada a  $850\text{ }^\circ C$  por 3 horas (HA3).

Para efeitos de comparação e estudo do papel do surfactante na obtenção das nanopartículas, um segundo grupo de amostras de HA foram preparadas utilizando o mesmo procedimento descrito acima sem o uso do copolímero F127 como surfactante. O precipitado obtido aqui foi secado a  $100\text{ }^\circ C$  (HA4) e calcinado a  $550\text{ }^\circ C$  (HA5).

### 3.1.1 Adsorção de doxiciclina em hidroxiapatita

Para o estudo da adsorção do fármaco doxiciclina na matriz cerâmica de HA usou-se o método convencional de “*batch*”. Assim, uma solução de volume conhecido  $V$  (mL) e concentração inicial  $C_i$  (mg/mL) do adsorvato foi colocada em contato com uma quantidade conhecida de adsorvente (g), por um tempo maior ao tempo de equilíbrio. Após filtração do adsorvente, a concentração de equilíbrio  $C_e$  (mg/mL) de adsorvato na solução foi medida e a quantidade adsorvida  $q_e$  (mg/g) foi calculada usando a Equação 3.1.

$$q_e = \frac{(C_i - C_e)V}{g} \quad (3.1)$$

O ensaio de adsorção foi feito para determinar capacidade de adsorção do fármaco pela HA sintetizada. Neste experimento foram utilizadas 350 mg das diversas HAs obtidas e submetida a diferentes tratamentos térmicos. Essas foram colocados em contato com 50 mL de uma solução de Dox (3,0 mg/mL) em PBS pH 7,4. Os tubos foram mantidos por um período de interação de 24 horas em um banho com temperatura controlada de 25°C, e posteriormente a amostra foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos. O composto HA-Dox foi separado do sobrenadante e liofilizado. A quantidade de Dox adsorvida foi calculada a partir da diferença entre a concentração inicial e a concentração final do fármaco no sobrenadante, após o contato com a HA, as análises foram realizadas em triplicatas. As concentrações foram determinadas usando-se uma curva de calibração na faixa de 0,015 até 0,097 mM, obtida com base em concentrações conhecidas de Dox em PBS e analisadas em espectrofotômetro UV-Vis, monitorando-se a absorção do fármaco no comprimento de onda de 270 nm. O presente experimento permitiu avaliar as diferentes capacidades de absorção de Dox pelas diferentes HA preparadas.

### 3.1.2 Dessorção de doxiciclina da HA1

O estudo de dessorção da Dox adsorvida na HA1 foi feito para conhecer a cinética de liberação do fármaco. Num tubo plástico de 15 mL foram colocados 50 mg de HA1 e 4 mL de água deionizada e submetidas à agitação em *vortex*. O estudo foi realizado em triplicata. Em seguida, as soluções foram mantidas sob agitação em incubadora a 25°C. Em períodos de tempo de 0,5, 1, 2, 5, 10, 16, 24, 36, 48, 72 h, alíquotas de 3 mL foram retiradas a cada tempo e repostas com água deionizada. Após a centrifugação a 5000 rpm por 5 min a concentração de Dox nos sobrenadantes foi determinada por espectroscopia UV-vis.

## 3.2 Preparação das fibras

As fibras poliméricas uniaxiais à base da mistura policaprolactona/gelatina foram preparadas em várias proporções (70:30), (60:40) e (50:50) (m/m) na presença e ausência de HA como matrizes para a liberação controlada de Dox. Foram preparados três grupos de fibras para o presente estudo.

A preparação da mistura polimérica foi feita utilizando como solvente uma solução de ácido acético glacial, acetato de etila e água na proporção de 3:2:1, a concentração total de polímero foi de 16% (m/m) e as proporções foram de 70:30 (PG1), 60:40 (PG2) e 50:50 (PG3) % (m/m) de PCL/GEL. Um segundo conjunto de fibras igual ao anterior foi também preparado, porém com adição de nHA, em uma porcentagem de 7% com respeito à concentração total da mistura polimérica e foram identificadas como 70:30 (PGHA1), 60:40 (PGHA2) e 50:50 (PGHA3). Um terceiro grupo de fibras foi preparado com acréscimo de nHA e Dox, essas fibras foram identificadas como 70:30 (PGHAD1), 60:40 (PGHAD2) e 50:50 (PGHAD3).

### 3.2.1 Preparação de matrizes de liberação controlada de Dox à base de nanofibras a partir da mistura de policaprolactona e gelatina nas proporções (70:30), (60:40) e (50:50) m/m (PCL:GEL) na presença e ausência de HA

Inicialmente foram dissolvidos 1,44 g de GEL em 25,2 mL da solução que foi mantida sob agitação magnética, em temperatura entre 45-50°C, por 2 horas. Em seguida, foram adicionados 3,36 g do polímero PCL na solução e agitou-se até que o polímero estivesse completamente dissolvido. A solução foi dividida em três partes iguais: a primeira foi utilizada no processo de eletrofição para a obtenção da fibra PG1; às duas partes restantes, foram adicionadas 110 mg de nHA. Estas nHA foram dispersadas em 1 mL da mistura de acetato de etila e ácido acético diluído e sonicada por 10 minutos a uma amplitude de 30 % [39, 40]. Uma das duas partes restantes foi submetida ao processo de eletrofição para a obtenção da fibra PGHA1. Na última das três partes foram adicionados 50 mg de doxiciclina a qual foi deixada sob agitação magnética, por 3 horas. Posteriormente, esta solução foi submetida ao processo de eletrofição, para obtenção da fibra PGHAD1. De forma semelhante, os conjuntos de fibras PG2,

PGHA2, PGHAD2 e PG3, PGHA3, PGHAD3 foram preparadas usando as quantidades de PCL, GEL, nHA e Dox de acordo a Tabela 3.1.

Componentes	Fibra								
	70:30 (PCL:GEL)			60:40 (PCL:GEL)			50:50 (PCL:GEL)		
	*PG1	†PGHA1	‡PGHAD1	PG2	PGHA2	PGHA2	PG3	PGHA3	PGHAD3
PCL (g)	1,12	1,12	1,12	0,96	0,96	0,96	0,50	0,50	0,50
GEL (g)	0,48	0,48	0,48	0,64	0,64	0,64	0,50	0,50	0,50
HA (mg)	–	110	110	–	110	110	–	110	110
Dox (mg)	–	–	50	–	–	50	–	–	50

\*PG=PCL/GEL,

†PGHA=PCL/GEL-HA ,

‡PGHAD=PGHA=PCL/GEL-HA-Dox

Tabela 3.1: Quantidades utilizadas de PCL, GEL, nHA e Dox na preparação das fibras.

### 3.2.2 Eletrofiação

No processo de eletrofiação foram alterados os parâmetros de tensão aplicada, vazão e distância ao coletor, para a obtenção das fibras com as características físico-químicas desejadas. Após ter as condições experimentais ajustadas, a solução polimérica foi colocada numa seringa plástica de 5 mL, onde foi acoplada uma agulha de aço inox de diâmetro interno de 0,8 mm. Uma fonte de alta tensão foi conectada entre a agulha e o coletor para gerar uma diferença de potencial de 10 kV. A seringa foi posicionada na bomba de infusão a uma taxa de vazão de 1,3 mL/h, sendo que a distância entre a ponta da agulha e o coletor foi fixada em 10 cm. As fibras foram retiradas do coletor após 8 horas de eletrofiação e secas em estufa a vácuo a 40 °C por 24 horas. Na Figura 3.1 está apresentado um esquema da montagem do processo de eletrofiação.

## 3.3 Determinação do teor total de doxiciclina na fibra

A determinação do teor de Dox nas nanofibras foi feita da seguinte maneira: 25 mg de cada fibra PGHAD1, PGHAD2 e PGHAD3 foram dissolvidas em três béqueres vedados contendo 5 mL da mesma solução utilizada para preparar as fibras. A mistura foi mantida em agitação magnética até degradação das fibras. As amostras foram filtradas e foi tomada uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  a qual foi injetada no equipamento de CLAE. A condição de operação do aparelho foi em modo isocrático, fase móvel

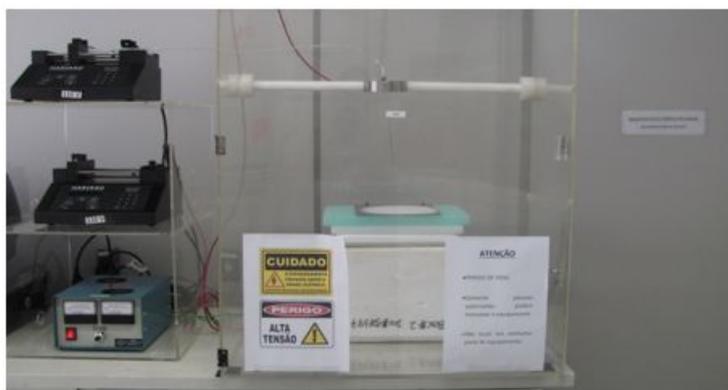


Figura 3.1: Montagem experimental utilizada na produção das nanofibras por eletrofição.

constituída de ácido acético 5%: acetonitrila (75:25, v/v) e a temperatura do forno de coluna a 25 °C. A quantificação da Dox foi realizada com auxílio de uma curva de calibração de concentrações conhecidas de Dox no comprimento de onda de 350 nm.

### 3.4 Liberação controlada de doxiciclina a partir das nanofibras

O teste de liberação *in vitro* da Dox, a partir das nanofibras, foi realizado da seguinte maneira: 20 mg de nanofibras foram colocados em um tubo plástico de 15 mL e foram adicionados 5 mL de solução tampão fosfato pH 7,4 a uma temperatura de 37 °C sob agitação de 150 rpm em uma incubadora de bancada.

Em intervalos pré-determinados de 1, 2, 4, 10, 24 e 60 h foram removidas alíquotas do meio de liberação que foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos, e finalmente foram adicionados 5 mL de novo meio. Após centrifugação a 5000 rpm por 5 min, uma alíquota de 20  $\mu$ L de cada amostra foi injetada no equipamento CLAE. A condição de operação do aparelho foi em modo isocrático e fase móvel constituída de ácido acético 5%: acetonitrila (75:25, v/v) e a temperatura do forno de coluna a 25 °C. A quantificação da Dox foi feita com auxílio de uma curva de calibração de concentrações conhecidas de Dox no comprimento de onda de 350 nm.

## 3.5 Avaliação do potencial de citotoxicidade in vitro

Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade das fibras foram realizados testes de cultura celular utilizando dois modelos de células: uma cancerígena (células de carcinoma epidermóide A431) (ATCC CRL- 1555) e outra de linhagem de células normais (fibroblastos 3T3-11).

### 3.5.1 Cultura celular

Os fibroblastos foram cultivados em garrafas de cultivo contendo meio Dulbecco's modified eagle medium high glucose (DMEM) da Gibco Life Technologies (Cat. N° 12800-017), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico-antimicótico (Penicilina 10.000 UI/mL / estreptomicina 10mg/mL, Cultilab). Já as células de carcinoma epidermóide, A-431, foram cultivadas em garrafas de cultivo contendo meio Dulbecco's Modified eagle's medium (DME) da Sigma-Aldrich (Cat. N° D1152), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de aminoácidos não essenciais (M7145, Sigma-Aldrich), 1% de L-Glutamina e 1% de antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 UI/mL / estreptomicina 10mg/mL, Cultilab). Essas células foram mantidas em uma incubadora *Revco elite II* a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, e quando atingiram uma confluência de 70-80% o meio de cultivo foi desprezado e o tapete de células foi lavado com PBS 1x pH7,2 estéril contendo 1% de antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 UI/mL / estreptomicina 10 mg/mL, Cultilab).

Posteriormente, as células foram tripsinizadas com 2-3 mL de uma solução de tripsina (2,5g/L) EDTA (250mg/L) (Cultilab) durante 3 minutos à temperatura de 37°C. Para inativar a tripsina foram adicionados 5 mL do meio de cultivo suplementado com 10% de SFB e o conteúdo da garrafa de cultivo foi centrifugado por 10 minutos a 1400 rpm. Após esse período, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi ressuspendido com 1 mL de meio de cultivo suplementado, para então efetuar-se a contagem de células em uma câmara de *Neubauer* com o auxílio de um microscópio óptico. Após a contagem e definição da densidade celular a ser distribuída nas placas, cada poço recebeu 1x10<sup>5</sup> células/poço e as placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 48h, até as células atingirem a confluência.

### 3.5.2 Teste de citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade foram feitos utilizando os eluatos das fibras PCL/GEL-HA-Dox e PCL/GEL-Dox com o propósito de avaliar a viabilidade celular e a atividade anticancerígena da doxíciclina na presença e ausência de HA. Os eluatos testados tanto de Dox-HA como os da Dox foram obtidos após de 48 horas de liberação em água estéril a partir das fibras de PCL/GEL-HA-Dox e PCL/GEL-Dox, respectivamente. A quantidade de fármaco liberado foi determinada através de uma curva de calibração e leituras a 270 nm por UV-vis. A partir dos dois tipos de eluatos foram preparadas diluições nas concentrações de 0,010, 0,020, 0,030, 0,040, 0,050 e 0,060 mM.

Alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  dos eluatos descritos acima foram misturadas com 180  $\mu\text{L}$  de meio e adicionadas nas placas da cultura das células em estado de confluência. As amostras e os respectivos controles foram testados em triplicata. As microplacas com células A431 e fibroblastos foram novamente incubadas a 37 °C em estufa úmida com 5%  $\text{CO}_2$  até sua análise em 24 e 48 h.

### 3.5.3 Ensaio de MTT

O ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio) é um teste colorimétrico utilizado para determinar a viabilidade celular através da atividade da enzima redutase mitocondrial em células vivas. O sal amarelo tetrazólio (membrana permeável) é reduzido a cristais de formazan azuis/púrpura por células metabolicamente ativas. Essa redução ocorre somente quando a enzima redutase mitocondrial está ativa nas células e portanto, pode ser diretamente relacionada à viabilidade celular.

Após deixar incubando as células em contato com os compostos testados nos tempos estabelecidos, foi removido o meio com os materiais testados. As células em placa foram lavadas utilizando solução de PBS pH 7,4 estéril e foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  do reagente de MTT e 90  $\mu\text{L}$  de meio sem vermelho de fenol. As placas foram protegidas da luz devido à fotossensibilidade do reagente de MTT e incubou-se por 4 horas. Após esse período foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da solução de SDS em 10% HCl e incubou-se novamente a placa por 12-18 horas. Por fim, a leitura das placas foi realizada através do espectrofotômetro de UV-Visível no comprimento de onda de 570 nm. É importante ressaltar que foram feitos os controles negativos e brancos referentes em todas as placas.

### 3.6 Avaliação da atividade antibacteriana

A atividade antimicrobiana foi testada *in vitro*, pelo método de difusão utilizando fibras de 5 mm de diâmetro que foram colocadas na superfície de uma placa de ágar, contendo bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Porphyromonas gingivalis*). Essa avaliação foi realizada com bactérias do laboratório de Biomateriais e Microbiologia do Departamento de Odontologia da UFMG coordenado pela Profa Dra. Maria Esperanza Cortés.

Neste método, as diferentes fibras PG, PGHA e PGHAD foram depositadas na superfície de uma placa de ágar que foi inoculada com uma suspensão padronizada das bactérias a serem testadas. Discos de papel no qual foi aplicado 10  $\mu\text{L}$  de uma solução de Dox na concentração de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  foram utilizados como controles positivos. As placas foram incubadas durante 24 h à temperatura de 37 °C. Após o período de incubação, mediram-se os halos de inibição. Os experimentos foram realizados em triplicata [49].

### 3.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio do software GraphPad 5.0. As comparações múltiplas entre grupos foram realizadas utilizando a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey.

# Capítulo 4

## Resultados e Discussões

Neste capítulo serão apresentados os resultados e a discussão da preparação dos materiais e sua respectiva caracterização físico-química através das técnicas de análise térmica (TG/DTG e DTA), isotermas de adsorção de nitrogênio (BJH/BET), espectroscopia de infravermelho, difração de raios X e microscopia eletrônica de Transmissão.

### 4.1 Caracterização das nanopartículas de Hidroxiapatita

#### 4.1.1 Espectros FTIR de absorção na região do Infravermelho

Os espectros de FTIR das nanopartículas de Hidroxiapatita estão apresentados nas Figuras 4.1 e 4.2. Analisando o espectro da HA1 na Figura 4.1, verificam-se bandas características da HA em  $3572\text{ cm}^{-1}$  associada ao estiramento do grupo OH. Uma banda larga entre aproximadamente  $3692\text{ cm}^{-1}$  a  $3100\text{ cm}^{-1}$  e a banda relativamente estreita em  $1634\text{ cm}^{-1}$  correspondem à água adsorvida [50]. Em  $1034\text{ cm}^{-1}$ , junto com um ombro em  $1090\text{ cm}^{-1}$  bem como outra em  $962\text{ cm}^{-1}$  são bandas associadas aos modos de vibração simétrico e assimétrico do grupo  $\text{PO}_4^{-3}$  respectivamente. Verificam-se ainda bandas em  $632\text{ cm}^{-1}$  e na faixa de  $634\text{-}564\text{ cm}^{-1}$  pertencem aos íons ortofostato da rede cristalina da HA como mostrado na Figura 4.2.

As bandas de baixa intensidade em  $2360\text{ cm}^{-1}$  e  $2336\text{ cm}^{-1}$  identificadas em todas as amostras, podem ser atribuídas a  $\text{CO}_2$  adsorvido da atmosfera durante a realização da análise. Foi observado um duplete em  $1456\text{-}1422\text{ cm}^{-1}$  e uma banda em  $874\text{ cm}^{-1}$  pertencente ao íon  $\text{CO}_3^{-2}$ . Ela é consequência da substituição de uma quantidade

pequena de íons  $\text{PO}_4^{-3}$  ou  $\text{OH}$  por  $\text{CO}_3^{-2}$  na estrutura da apatita. Existem dois tipos de apatita carbonatada, de acordo com o tipo de substituição do grupo  $\text{CO}_3^{-2}$ . Tipo A localizada em 1544 e 879  $\text{cm}^{-1}$ , quando os íons  $\text{CO}_3^{-2}$  substituem parcialmente o sitio dos íons  $\text{OH}$ , e tipo B localizada em 1455 e 1409  $\text{cm}^{-1}$ , quando substitui os íons  $\text{PO}_4^{-3}$  [14].

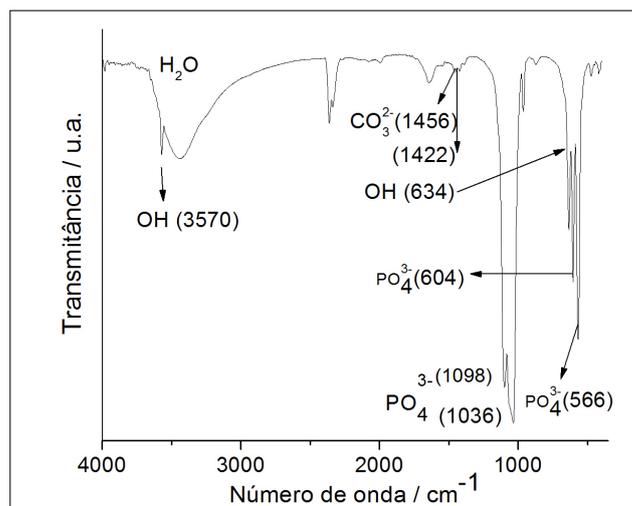


Figura 4.1: Espectro de absorção na região do infravermelho da HA1.

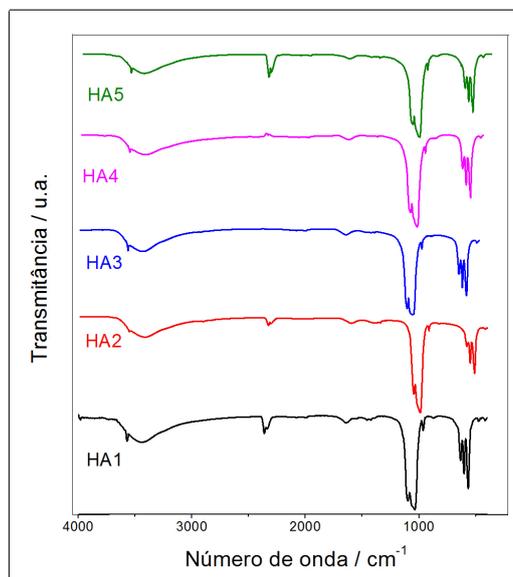


Figura 4.2: Espectros de absorção na região do infravermelho das HAs sintetizadas com surfactante HA1 (●) seca a 100 °C, HA2 (●) seca a 550 °C, HA3 (●) calcinada a 850 °C e sem surfactante HA4 (●) seca a 100 °C e HA5 (●) seca a 550 °C.

### 4.1.2 Análise térmica

As curvas TG, DTG e DTA das nanopartículas de HA são apresentadas nas Figuras 4.3, 4.4 e 4.5 respectivamente.

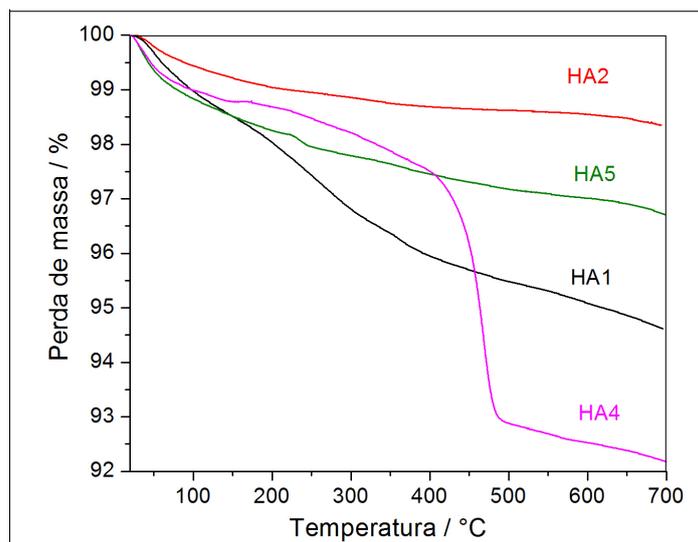


Figura 4.3: Curva TG das nHA sintetizadas com surfactante HA1(●) seca a 100 °C, HA2 (●) seca a 550 °C e sem surfactante HA4 (●) seca a 100 °C e HA5 (●) seca a 550 °C.

Analisando as curvas TG das HAs sintetizadas sem surfactante, apresentadas na Figura 4.3, observa-se que estas mostram uma perda de massa constante entre 25-700 °C e um perfil diferente quando comparadas com as sintetizadas empregando o surfactante. A perda total de massa de HA1, HA2, HA4 e HA5 foi 5,39%, 1,64%, 12,04% e 3,30%, respectivamente. Avaliando os dados de perda de massa para as diferentes HAs, pode-se afirmar que as diferenças estão relacionadas à maior quantidade de moléculas de água tanto adsorvidas superficialmente quanto as que fazem parte da estrutura intracristalina das amostras sintetizadas sem surfactante. As moléculas de água adsorvidas na superfície são liberadas a temperaturas entre 25 a 200 °C, e as intracristalinas na faixa de 200 a 400 °C, como relatado na literatura em sistemas semelhantes [19, 51, 52]

As curvas DTG e DTA para as HAs apresentaram um único evento térmico, um pico exotérmico em torno de 466 °C, associado à perda de água da amostra HA4 como pode ser identificado nas Figuras 4.4 e 4.5.

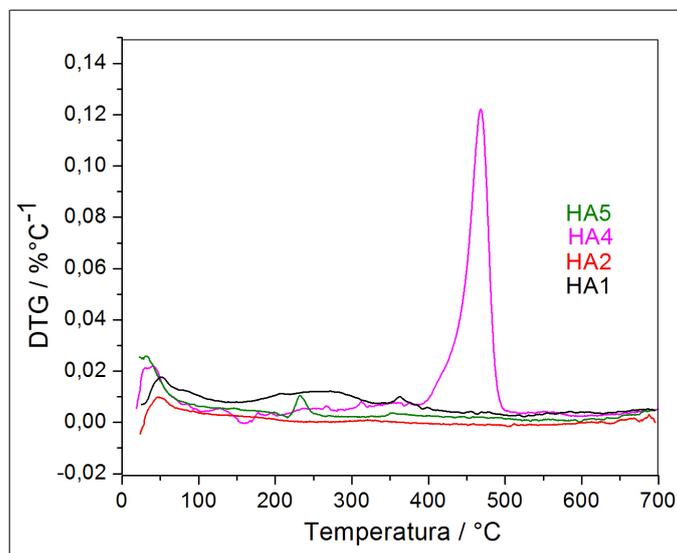


Figura 4.4: Curva DTG das nHA sintetizadas com surfactante HA1 (●) seca a 100 °C, HA2 (●) seca a 550 °C e sem surfactante HA4 (●) seca a 100 °C e HA5 (●) seca a 550°C.

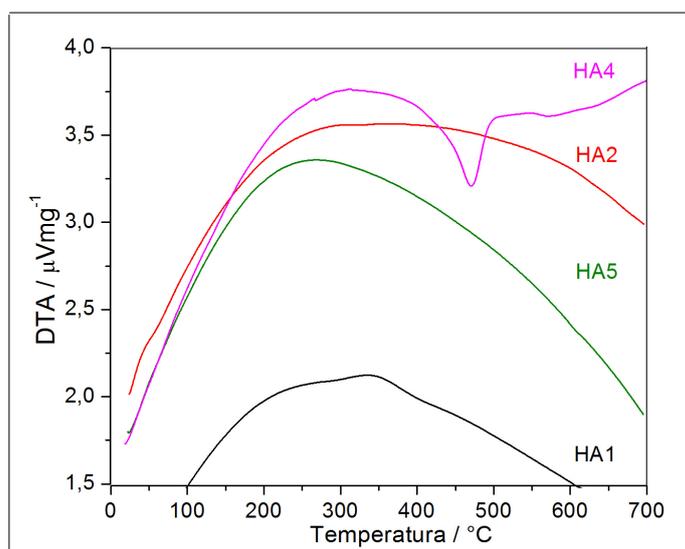


Figura 4.5: Curva DTA das nHA sintetizadas com surfactante; HA1 (●) seca a 100 °C, HA2 (●) seca a 550 °C, HA4 (●) seca a 100 °C e HA5 (●) seca a 550 °C.

### 4.1.3 Determinação de área superficial específica e tamanho de poro

Visando obter algumas informações sobre a área superficial específica, assim como da caracterização textural do material sintetizado da HA, foram feitas as isotermas de adsorção usando os métodos de BET e BJH, respectivamente.

Na Figura 4.6 apresentam-se as isotermas de adsorção/dessorção das HAs submetidas a diferentes tratamentos térmicos. A isoterma da amostra HA3 calcinada a 850 °C apresentou um regime de adsorção baixo e paralelo ao eixo x, associado com superfícies de materiais não porosos. Essa amostra apresentou a menor área superficial e um tamanho de poro irregular quando comparada com as outras HAs. No entanto, houve o aumento agudo na adsorção a pressões acima de 0,9 para as outras amostras tratadas termicamente a temperaturas menores de 550 °C. Neste ponto, a quantidade de gás adsorvido aumenta abruptamente com uma pequena variação de pressão, fato esse que pode ser atribuído à adsorção do material na superfície mesoporosa [53].

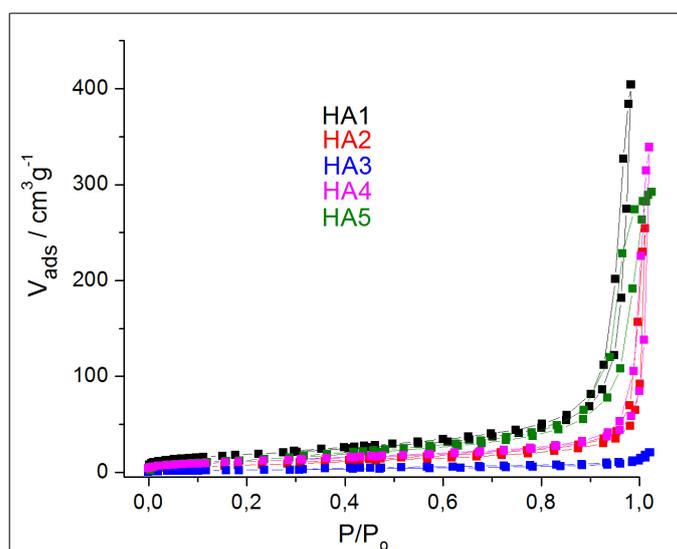


Figura 4.6: Influência do tratamento térmico sobre as isotermas de adsorção e dessorção de N<sub>2</sub> sobre as nHA; HA1 (●) seca a 100 °C, HA2 (●) seca a 550 °C, HA3 (●) seca a 850 °C, HA4 (●) seca a 100 °C e HA5 (●) seca a 550 °C.

A HA1 foi a amostra com a maior área superficial, como consequência da maior quantidade de adsorção de nitrogênio. A análise da área específica mostrou que a área diminuiu com o aumento da temperatura de secado da hidroxiapatita. Além disso, verificou-se que a ausência ou presença do surfactante na síntese da HA não exerceu

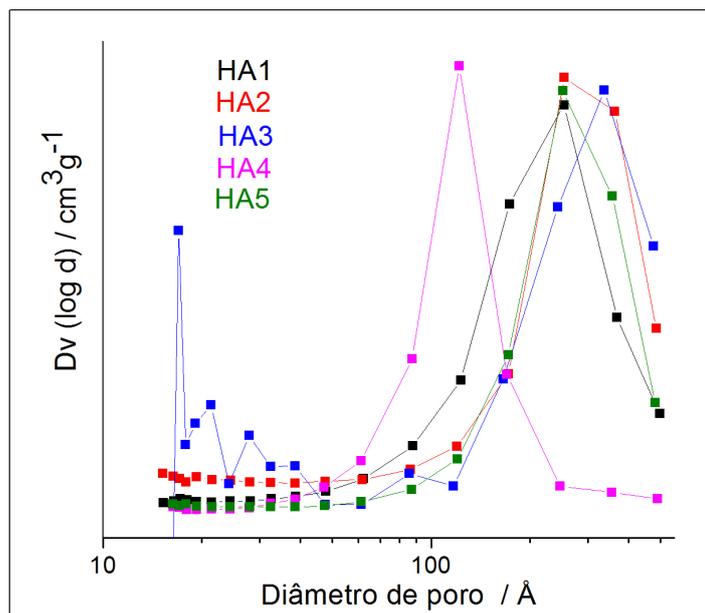


Figura 4.7: Distribuição do tamanho de poro das nHA; HA1 (●) seca a 100 °C, HA2 (●) seca a 550 °C, HA3 (●) seca a 850 °C, HA4 (●) seca a 100 °C e HA5 (●) seca a 550 °C.

efeito nenhum sobre a área superficial das nanopartículas obtidas: 67 m<sup>2</sup>/g para HA1 e 66 m<sup>2</sup>/g para HA4.

De acordo com dados da literatura, se tem uma classificação dos poros em função de seu diâmetro, sendo que os poros com diâmetro dentre  $20 < \phi < 500$  Å são considerados mesoporosos [54]. Portanto, as HAs obtidas são um material mesoporoso, elas apresentaram poros com diâmetros na faixa de  $123 < \phi < 340$  Å. Na Figura 4.7 apresenta-se a distribuição do tamanho de poro das nanopartículas de HA. A HA seca a 550 °C apresentaram uma maior superfície porosa, no entanto, quando calcinadas a 850 °C as partículas sofreram uma remoção dos poros, como consequência do aumento na densificação do material. Esse efeito é dado como consequência da força motriz de sinterização que tende a reduzir a energia interfacial entre as partículas, deste modo o tamanho do grão dessas partículas aumentou.

A distribuição de tamanho de poro obtida para as amostras de HA mostrou um aumento de poro somente acima de 850°C, mas isso está relacionado com as irregularidades da superfície. A área superficial e o tamanho de poro das amostras são apresentados na Tabela 4.1.

Amostra	Área superficial específica ( $m^2/g$ )	Tamanho de poro ( $\text{Å}$ )	Tamanho das nanopartículas (nm)
HA1	67	123	40,5
HA2	40	254	67,8
HA3	8,0	254	175
HA4	66	254	48,2
HA5	47	340	47,4

Tabela 4.1: Área superficial, tamanho de poro e tamanho das nHAs

#### 4.1.4 Difração de raios X em pó

Os difratogramas de raios X (DRX) em pó, da HA seca a  $100^\circ\text{C}$  e  $550^\circ\text{C}$  e calcinada a  $850^\circ\text{C}$ , são apresentados na Figura 4.8.

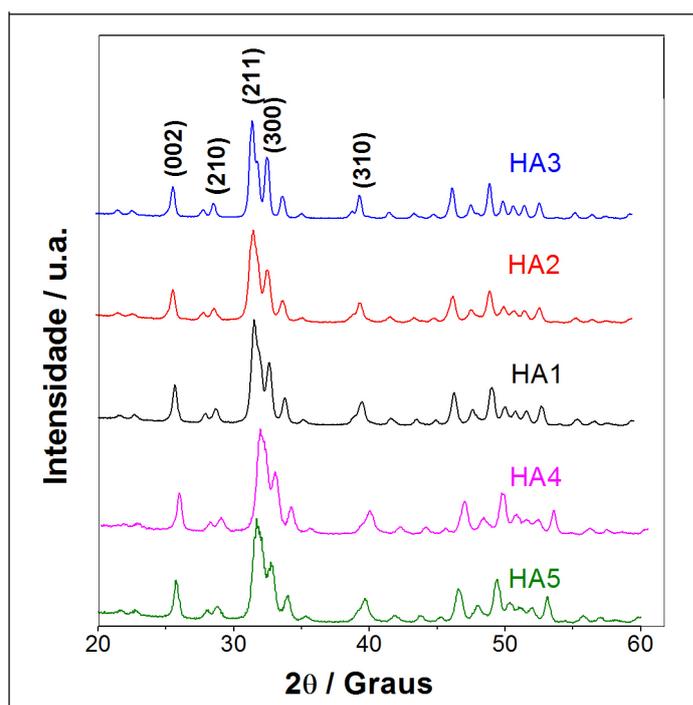


Figura 4.8: Difratogramas de DRX das nanopartículas de hidroxiapatita. HA1(●), HA2(●), HA3(●), HA4(●) e HA5(●).

Analisando os difratogramas das nanopartículas de HA observou-se em geral um padrão semelhante de difração com pequenos deslocamentos nos picos. Os picos mais intensos correspondem ao ângulo  $2\theta = 31,66^\circ$ , relativo ao plano (211);  $2\theta = 32,76^\circ$ , relativo ao plano (300) e  $2\theta = 25,74^\circ$ , relativo ao plano (002). Pela análise comparativa

dos difratogramas obtidos e o padrão disponível no banco de dados *JCPDS* (9-0932), verifica-se a presença de picos característicos da HA em todas as amostras [55].

Os perfis XRD da HA não mostraram nenhuma fase de composição de HA em fases secundárias, tais como  $\alpha$ -TCP,  $\beta$ -TCP, TTC ou CaO. Verificou-se também que as amostras após calcinação mostravam maior resolução e estreitamento dos picos. Esses resultados sugerem que a HA sem tratamento térmico apresentava baixa cristalinidade, e aumentou após tratamento térmico. Na literatura é relatado que a HAs preparadas por métodos de precipitação em solução aquosa apresentam picos com baixa resolução [56, 57].

Por outro lado, a presença do surfactante (Pluronic F127) não influenciou a formação de fases, como verificado pelos DRX. É possível perceber que as posições dos picos e as intensidades coincidem para as amostras sintetizadas com presença e ausência de surfactante. Também foi possível confirmar que produtos intermediários, por exemplo, fosfato de tricálcio não estão presentes na amostra.

O processo de sinterização de HA pode conduzir à decomposição térmica parcial em TCP e/ou CPPD. Dois fenômenos ocorrem: a desidroxilação para oxihidroxiapatita em temperaturas entre 850-900 °C e a decomposição para TCP e CPPD a temperaturas superiores a 1000 °C, esse processo é recomendado para o aumento das propriedades de resistência mecânica das mesmas. Por outro lado, a obtenção de HA com baixa cristalinidade são utilizadas para aplicações que não precisam de propriedades mecânicas, dado que nanoestruturas amorfas são mais próximas ao osso natural, além disso, são reabsorvidas mais rapidamente pelo corpo, e como discutidas anteriormente, possuem maior área superficial e maior diâmetro de poro propriedades essas que permitem sua utilização como sistema carregador de fármacos e fatores de crescimento em sistemas de regeneração óssea [58].

#### 4.1.4.1 Determinação do tamanho de cristalito

A determinação do tamanho de cristalito, a partir de perfis de difração de raios X, foi feito através de análise qualitativa comparando-se as larguras-totais-a-meia-altura (Full-Width-at-Half-Maximum, FWHM) das amostras, do plano (002) que correspondem ao pico  $2\Theta = 25,74$  dos difratogramas. Foi calculado o tamanho aparente médio do cristalito, por ser este um pico isolado e bem definido, de acordo com a fórmula de Debye Scherer 4.1:

$$t = \frac{0,9\lambda}{FWHM \cos \Theta_B} \quad (4.1)$$

Em que  $t$  é o tamanho do cristalito,  $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$  é o comprimento de onda da radiação,  $\text{CuK}_\lambda$ , FWHM é a largura à meia altura para o pico de difração sob consideração, em radianos e  $\Theta_B$  é o ângulo de intensidade máxima. Foi feita uma correção do erro instrumental no DRX usando um padrão de silício que possui uma FWHM de  $0,3563$  ( $^\circ$ ).

Na Tabela 4.2 estão os resultados dos parâmetros do ângulo  $2\Theta$ , da largura-total-a-meia-altura e os tamanhos de cristalito, obtidos das amostras de HA, com o auxílio do software Origin 7.0. Analisando os dados da Tabela 4.2 observa-se que o tamanho do cristalito da fase foi maior nas amostras HA1 e HA4, secas a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  quando comparado nas amostras HA2 e HA5, secas a  $550 \text{ }^\circ\text{C}$ . Essa mudança pouco comum no tamanho de cristalito após calcinação também foi observado por Gibson et al [59] e foi atribuída à perda de água (desidratação) para apatitas deficientes em íons cálcio. Por outro lado, Pang et al. verificou que a diminuição do tamanho do cristalito após calcinação a temperaturas de  $650 \text{ }^\circ\text{C}$  para nanopartículas de HA não era devido à perda de água nas moléculas de HA [60]. É possível observar que a amostras calcinadas a  $850 \text{ }^\circ\text{C}$  apresentaram o maior tamanho de cristalito devido ao processo de agregação pelo tratamento térmico.

Amostra	$2\Theta$ ( $^\circ$ )	FWHM (rad)	t (nm)
HA1	25,75	0,00389	36,51
HA2	25,73	0,00489	29,10
HA3	25,74	0,00283	50,18
HA4	25,75	0,00407	34,97
HA5	25,75	0,00495	31,96

Tabela 4.2: Valores de tamanho de cristalito das amostras de HA determinados pelo método de Debye Scherer.

#### 4.1.5 Morfologia das HAs secas a 100 °C, 550 °C e calcinada a 850 °C

A morfologia e a geometria das nanopartículas foram caracterizadas utilizando-se MET. A Figura 4.9 mostra as micrografias MET das nanopartículas após diferentes tratamentos térmicos. Um dos propósitos da utilização de surfactantes e/ou modificadores orgânicos na síntese de cristais de HA, é a obtenção de nanopartículas com morfologia e tamanho controlado [61].

Nas imagens da Figura 4.9, é possível observar que as amostras apresentaram tamanho nanométrico com forma de bastões e pouca aglomeração. Verifica-se ainda que a presença do surfactante teve pouco efeito sob a morfologia das nanopartículas. A 550 °C ocorre uma remoção do surfactante presente na superfície das nanopartículas como foi evidenciado nas imagens da Figura 4.9d. Na Figura 4.9c é possível observar que a morfologia da HA tratada a 850 °C é diferente das outras, tem maior tamanho de grão e apresentou uma superfície sem poros.

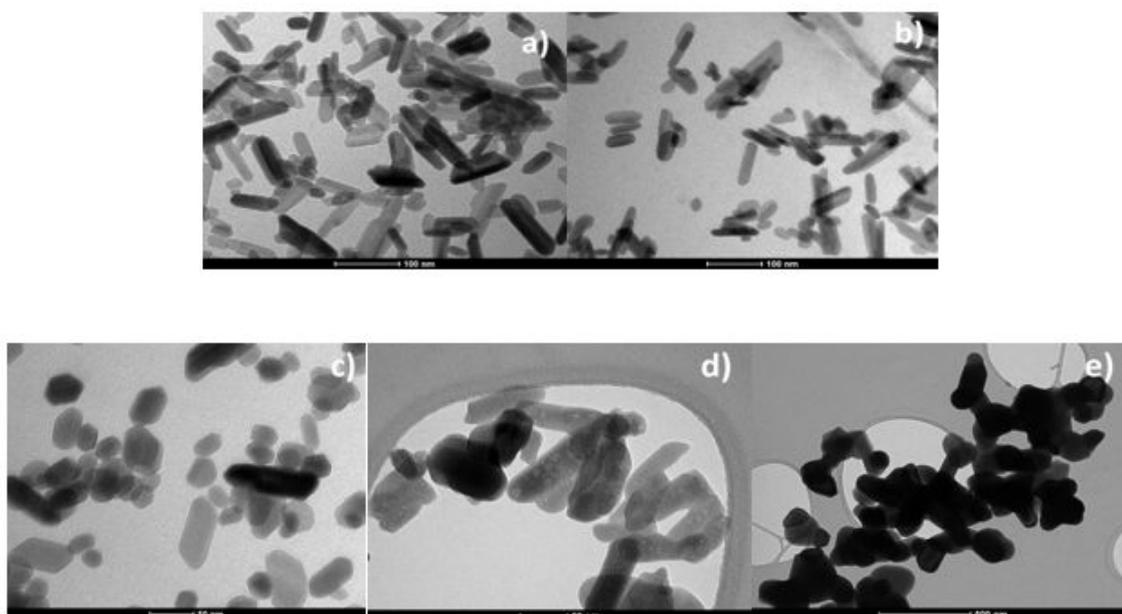


Figura 4.9: Imagens da MET das nanopartículas da HA. a) HA4 seca a 100°C, b) HA5 seca a 550°C, c) HA1 seca a 100°C, d) HA2 seca a 550°C e e) HA3 calcinada a 850°C.

As HA mostram propriedades mecânicas e biológicas superiores quando comparada com outros materiais cerâmicos [62]. O potencial uso da HA vai depender das características estruturais, bem como das características morfológicas. Assim, HA secas a temperaturas inferiores a 550 °C poderiam ser empregadas como um material

para promover um rápido crescimento de osso por ser menos cristalina. Por outro lado, as HA secas a temperaturas acima de 550 °C são um material mais denso, microestruturado e com melhor resistência, encontrando aplicabilidade como substituto ósseo de baixa carga fisiológica [63, 64].

#### 4.1.5.1 Tamanho das nanopartículas de hidroxiapatita (HA1)

Como observado nas imagens da Figura 4.10, as nanopartículas apresentaram uniformidade, pouca aglomeração e têm formato de bastonetes. A partir dessas micrografias, foi possível medir a distribuição do tamanho das nanopartículas utilizando o software de análise de imagem “ImageJ”. Com esse software determinou-se o diâmetro e comprimento delas. Como mostrado no histograma da Figura 4.10, o diâmetro e o comprimento obtidos foram  $27,5 \pm 6,6$  nm e  $39,6 \pm 16,8$  nm respectivamente, sendo que foram selecionadas aleatoriamente 100 partículas para realizar o cálculo. Em geral, todas as HAs mostraram as mesmas características de forma e de tamanho.

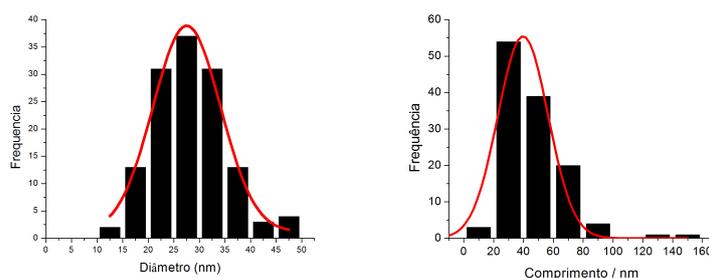


Figura 4.10: a) Mostra a distribuição do diâmetro e b) Mostra a distribuição do comprimento das nanopartículas de hidroxiapatita HA1 na forma de histograma.

## 4.2 Adsorção de Doxíciclina em HA

### 4.2.1 Determinação da capacidade de adsorção de Doxíciclina em HA

Como intuito de aprofundar nos processos de adsorção do antimicrobiano Dox nas matrizes nanoparticuladas de HA e determinar a capacidade de adsorção das mostras submetidas a diferentes tratamentos térmicos, foi feito um estudo que apresentou os seguintes resultados: a capacidades de adsorção em miligramas de fármaco por grama de HA para a HA1 foi 87,1 mg/g, para a HA2 8,6 mg/g, HA4 59,0 mg/g e para HA5 49,0 mg/g. Verifica-se uma maior absorção de Dox pela HA1 a qual tem uma maior

área superficial como discutido acima. Vale a pena salientar que a amostra HA4 a qual tem a mesma área superficial que a HA1 apresentou uma menor adsorção de Dox. Esse resultado pode ser explicado uma vez que a HA1 foi sintetizada utilizando surfactante e parte do mesmo pode ter ficado retido na superfície das nanopartículas gerando, uma maior capacidade adsorptiva através da formação de ligações de hidrogênio entre a matriz carregada de surfactante e o fármaco Dox.

#### 4.2.2 Dessorção de Doxiciclina

Estudos sugerem que as tetraciclina se ligam à superfície das apatitas, formando complexos, a partir de diferentes átomo ou grupos coordenantes do fármaco [65]. Por outro lado, a Dox possui três hidrogênios ionizáveis que influenciam muito seu comportamento químico na faixa de pH de 3 a 9. Em consequência disso, os  $pK_{a_s}$  associados à Dox são:  $pK_{a_1}$  3,4;  $pK_{a_2}$  7,7;  $pK_{a_3}$  9,3 [66]. Portanto, a molécula estará carregada positivamente a pHs menores do que  $pK_{a_1}$ , carregada negativamente a pHs maiores do que  $pK_{a_3}$  e em forma de zwitteriônica entre eles. A forma catiônica da Dox poderia se ligar aos sítios negativos da HA em condições ácidas, gerando uma elevada adsorção. Por outro lado, a espécie aniônica seria repelida da superfície da HA em pH alcalino. Entretanto, a HA mostra uma baixa estabilidade química em pH abaixo de 4 [67]. Portanto, o processo de adsorção/dessorção da Dox em HA é um processo complexo o qual depende de fatores como a concentração de equilíbrio do fármaco, do pH, da temperatura e da natureza da interação fármaco-HA. A HA como um dispositivo carregador de fármaco é limitada e exige a modificação da sua superfície visando incrementar sua capacidade para carregar tanto moléculas hidrofílicas quanto hidrofóbicas. No caso de moléculas pequenas e hidrossolúveis, como Dox, adsorvidas em HA, tem-se observado uma liberação rápida do fármaco [23].

No entanto, os estudos que têm demonstrado viabilidade da HA em sistemas carregadores de fármacos, são sistemas de liberação local. Nesses sistemas, a HA é empregada seja como uma cerâmica microcristalina ou como um cimento para promover regeneração dos ossos, e o fármaco é liberado localmente para evitar infecções [68, 69]. Analisando os resultados obtidos da liberação da Dox, apresentados na Figura 4.11, o sistema mostra um perfil de liberação pronunciado com aproximadamente o 50% do conteúdo total do fármaco liberado na primeira hora. Segundo dados da literatura, o ponto isoelétrico (PI) da HA em água ocorre numa faixa levemente ácida de pH entre 5 e 7 [67], assim a pH 7,4 a HA possui carga negativa, pelo que somado ao caráter anfotérico da Dox nesse mesmo pH, esperar-se-ia uma interação eletrostática

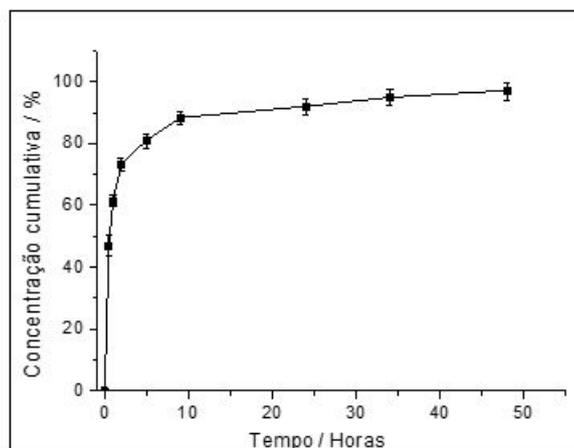


Figura 4.11: Curva de liberação controlada de doxiciclina a partir das nanopartículas de HA1.

entre a carga positiva da Dox e as hidroxilas da HA. No entanto, os resultados obtidos mostraram que o fármaco possui predominante carga negativa, e como resultado há uma repulsão entre Dox e HA. Outra questão importante da adsorção de Dox em HA, é que os íons cálcio na superfície desta estão pouco implicados no processo de adsorção.

### 4.3 Caracterização das fibras obtidas pela técnica de eletrofiação

No presente trabalho serão apresentados os resultados da caracterização das fibras obtidas por eletrofiação a partir da mistura polimérica de policaprolactona e gelatina (PCL/GEL). Além disso, foram preparadas as mesma fibras contendo HA e Dox denominadas de (PCL/GEL-HA) e (PCL/GEL-HA-Dox), respectivamente.

#### 4.3.1 Análise térmica

O PCL, a gelatina e a doxiciclina foram analisados através das técnicas de análise térmica (TG/DTG/DTA). As Figuras 4.12, 4.13, 4.14 apresentam as curvas termogravimétricas do PCL, gelatina e Dox, respectivamente.

Analisando a curva TG do polímero PCL apresentada na Figura 4.12 verifica-se um patamar de estabilidade térmica até aproximadamente 355 °C. Observa-se ainda que após essa temperatura o polímero sofre uma termodecomposição completa até a

temperatura de aproximadamente de 413 °C (valor máximo do pico da curva DTG). Verifica-se uma perda de massa total na temperatura final de 700 °C.

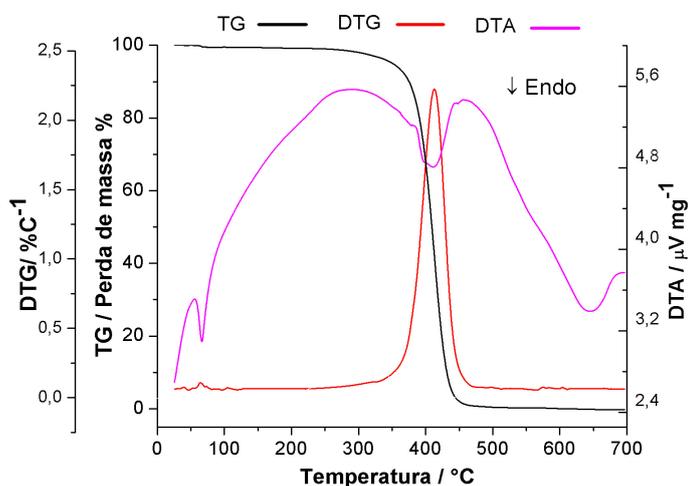


Figura 4.12: Curvas TG/DTG e DTA do PCL.

A curva DTA na Figura 4.12, mostra um pico endotérmico em torno de 66 °C que corresponde à temperatura de fusão do PCL. Após fusão, observou-se outro evento endotérmico seguido de um exotérmico, o qual corresponde à decomposição térmica completa do polímero. Estes dados estão de acordo com o reportado na literatura [70, 71].

Na Figura 4.13 estão apresentadas as curvas TG/DTG e DTA da gelatina. Analisando a curva TG verifica-se que a mesma não apresenta estabilidade térmica e o processo de termodecomposição é um fenômeno lento de acordo com o pico largo da curva DTG entre 25-250 °C. A mesma sofre a termodecomposição completa após essa temperatura até aproximadamente até 330 °C. O resíduo final da gelatina foi de 25% a uma temperatura final de 700 °C.

O fármaco doxiciclina se apresenta em três formas: hiclato, cloridrato e monohidrato. A porcentagem de doxiciclina na forma de hiclato é de 86,6% e cristaliza como hemidrato e hemialcoolato conjuntamente [72]. Na Figura 4.14 estão apresentadas as curvas TG/DTG e DTA da doxiciclina.

A curva TG da doxiciclina mostra três eventos de perdas de massa. O primeiro deles ocorre entre 135 e 190°C, e corresponde à eliminação de meia molécula de etanol e meia molécula de água, que equivale a uma perda de massa de 7%. Os

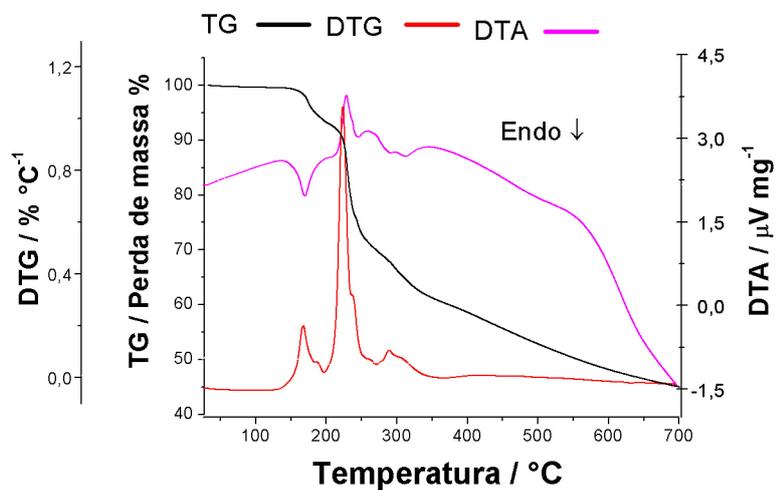


Figura 4.13: Curvas TG, DTG e DTA de gelatina.

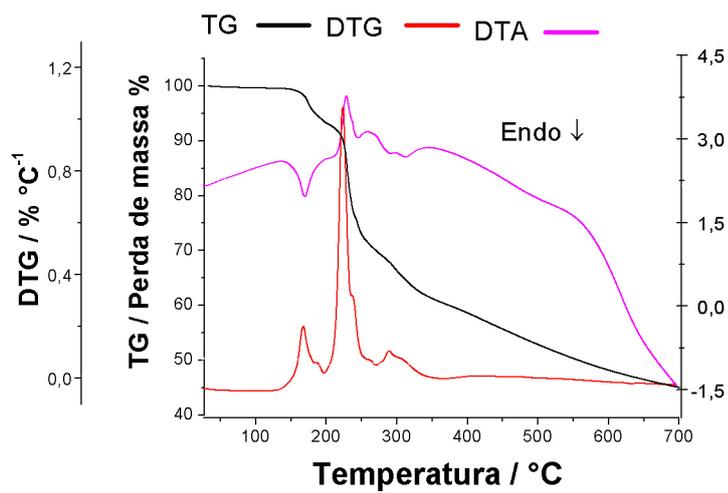


Figura 4.14: Curva TG, DTG e DTA da doxiciclina.

eventos seguintes correspondem a duas perdas de massa, em 222 °C e 288 °C, que correspondem às outras etapas de decomposição.

Na curva DTA observa-se o evento endotérmico referente à perda das moléculas de água e etanol em torno de 167 °C. A 201 °C a doxiciclina começa a se decompor, sem fundir. Depois disto, há um pico exotérmico a 227 °C o que corresponde a ao processo de termod decomposição parcial [73].

### 4.3.2 Análise por infravermelho

Na Figura 4.15 estão apresentados os espectros FTIR de (a) PCL, (b) gelatina, (c) doxiciclina (d) hidroxiapatita.

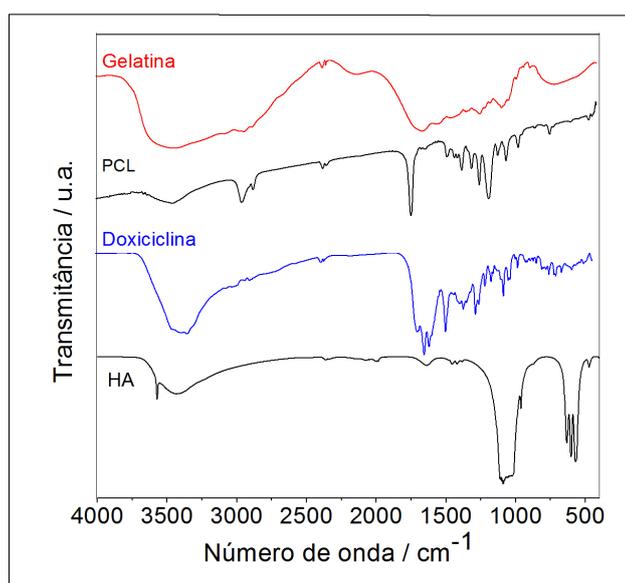


Figura 4.15: Espectro de absorção na região do infravermelho FTIR para gelatina, policaprolactona, doxiciclina e hidroxiapatita.

As bandas típicas do polímero PCL são os estiramentos da carbonila (C=O) a 1727  $\text{cm}^{-1}$ , os estiramentos simétrico e assimétrico em torno de 2865 e 2949  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas ao grupo  $\text{CH}_2$ . A banda em 1296  $\text{cm}^{-1}$  característica do estiramento na fase cristalina de C-O e C-C, também o estiramento assimétrico em 1238  $\text{cm}^{-1}$  atribuído ao C-O-C [74].

A gelatina apresenta uma banda intensa posicionada em 3100-3500  $\text{cm}^{-1}$  devida à presença de água livre e é também a região onde se apresentam as bandas de amida-A

e amida-B, no caso de proteínas. Além disso, a gelatina possui grupos característicos que apareceram em aproximadamente  $1650\text{ cm}^{-1}$  (amida I) e  $1540\text{ cm}^{-1}$  (amida II) atribuídas às vibrações de estiramento da ligação C=O e pelo acoplamento da flexão da ligação N-H e o estiramento das ligações C-N, respectivamente [75].

O FT-IR da Dox apresenta vários picos agudos entre  $1600$  e  $1400\text{ cm}^{-1}$  correspondentes às ligações aromáticas C=C, o pico a  $1242\text{ cm}^{-1}$  é atribuído à ligação C-O. As bandas a  $3400$  e  $3200\text{ cm}^{-1}$  são característica do OH e NH primária respectivamente [76].

### 4.3.3 Difração de raios X

Foram realizadas as análises de raios X de pó do polímero PCL, gelatina, hidroxiapatita e doxiciclina, cujo padrão de difração estão apresentados na Figura 4.16. O difratograma do PCL mostra dois picos intensos encontrados em aproximadamente  $2\theta = 21,25^\circ$  e  $23,60^\circ$ , pertencentes aos planos (110) e (200). Os picos apresentaram um halo devido possivelmente à região amorfa do PCL [77]. O padrão de difração da gelatina é um perfil completamente amorfo. A Dox apresenta um perfil de substância policristalina com picos estreitos a  $10,381, 15,421, 17,461, 19,141, 19,701, 22,321, 23,801^\circ$  no seu difratograma [76].

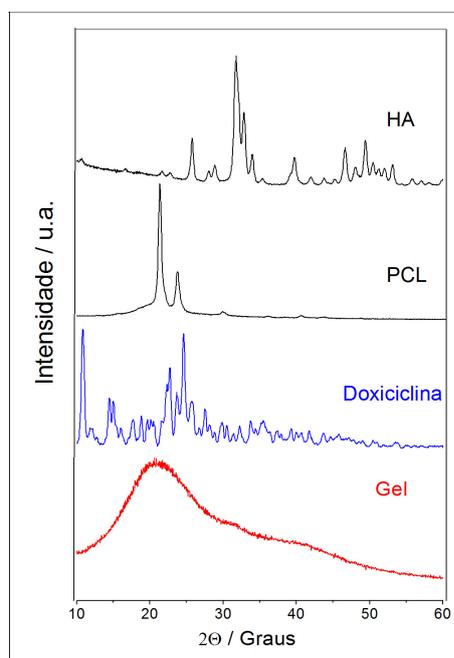


Figura 4.16: Padrão de difração de raios X de pó do PCL, Gelatina, Doxiciclina e HA1.

### 4.3.4 Ângulo de contato

As características de hidrofília/hidrofobia das fibras são propriedades físico-químicas que influenciam consideravelmente os processo de adesão e migração celular na interface entre o tecido humano e a superfície da fibra, visando utilizá-las como um implante [42]. Portanto, a inclusão de gelatina em PCL aumenta a interação das células com as fibras quando comparada com uma fibra de PCL puro. Um dos métodos mais simples de estimar as propriedades de adesão superficial dos materiais é o ângulo de contato. Fibras do polímero PCL puro mostram um ângulo de contato de  $118^\circ$  em água [78].

As fibras da blenda PCL/GEL (70/30), (60/40) e (50/50) foram identificadas como PG1, PG2 e PG3 respectivamente. As fibras PCL/GEL-HA (70/30), (60/40) e (50/50) as quais contem HA, são identificadas como PGHA1, PGHA2 e PGHA3 respectivamente. Os resultados da medição do ângulo de contato das nanofibras mostraram que somente as fibras PG1 e PGHA1, as quais possuem o maior teor do PCL, apresentaram um ângulo de contato diferente de zero, com valores de ângulo de  $31,85^\circ$  e  $32,65^\circ$ , respectivamente. Com o aumento do teor de gelatina nas fibras, aumenta a molhabilidade e o caráter hidrofílico das mesmas. A gota de água deionizada que foi gotejada sob as superfícies das fibras PG2, PGHA2, PG3 e PGHA3 não consegue manter-se na superfície e rapidamente desaparece. Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Zhang et al., [47].

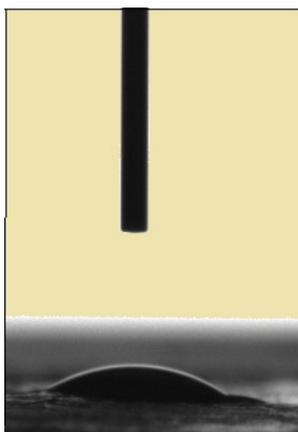


Figura 4.17: Imagem da gota de água sobre a superfície da fibra PGH1.

Por outro lado, a adição de nanopartículas de HA nas fibras não mostrou nenhum efeito sob o equilíbrio hidrofílico/ hidrofóbico. No entanto, acredita-se que a HA torna a superfície da fibra ainda mais hidrofílica e aumenta o grau de atração que a superfície da fibra exerce sobre outros materiais [42]. A Figura 4.17 mostra a imagem de uma

gota de água sobre a superfície da fibra PGH1. O alto grau de hidrofobicidade das fibras 60:40 e 50:50 (PCL/GEL) fez com que a gota de água sobre a superfície dessas fibras fosse absorvida rapidamente.

### 4.3.5 Análise térmica

As Figuras 4.18, 4.19 e 4.20 mostram as curvas TG, DTG e DTA das fibras PCL/-GEL(70/30), PCL/GEL(60/40) e PCL/GEL(50/50) identificadas como PG1, PG2 e PG3, respectivamente. Analisando as curvas TG verifica-se que a estabilidade térmica da fibra diminuiu, enquanto aumentou o teor da gelatina, que é o componente menos estável termicamente.

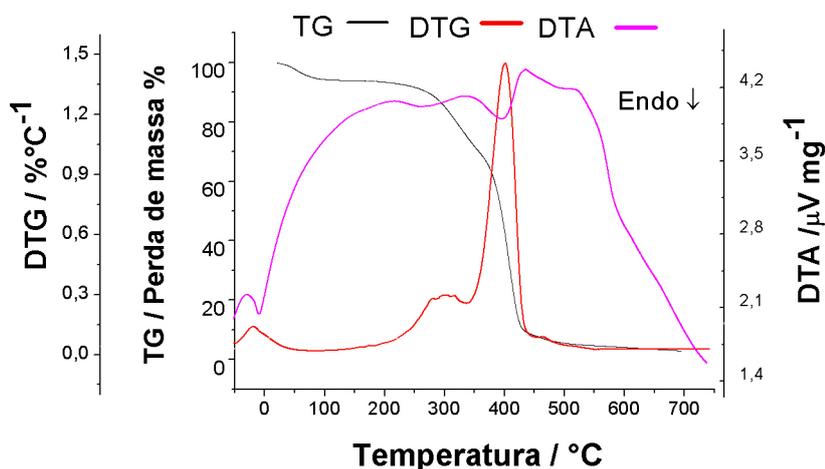


Figura 4.18: Curva TG, DTG e DTA da fibra PG1.

A partir da curva TG da fibra PG1 apresentada na Figura 4.18 determinou-se a primeira perda de massa atribuída a água e a outros componentes voláteis na faixa de 25-120°C, que correspondem a 5,6%. Na curva DTA foi possível observar um pico endotérmico a 60,84 °C característico da fusão do PCL. A curva DTG permite observar dois eventos de perda de massa a 316 °C e 407 °C devido à decomposição de gelatina e PCL, respectivamente. O resíduo após tratamento térmico até 700 °C da amostra foi de 3,1%.

As curvas DTG das fibras PG2 e PG3 apresentadas nas Figuras 4.19 e 4.20 respectivamente, mostram a existência dos dois eventos próprios de cada polímero, no caso da gelatina apresenta um evento que aumenta enquanto o teor de gelatina se incrementa na fibra. Esses fatos podem ser interpretados como uma evidência da

formação de uma blenda imiscível, no entanto composta por duas fases com boa adesão interfacial. Além disso, misturas poliméricas completamente miscíveis caracterizam-se por ter uma única temperatura de  $T_g$  em todas as proporções da blenda, o que indica miscibilidade no nível molecular. Assim, os sistemas obtidos são sistemas compatíveis, definidos como um estado intermediário entre miscibilidade e imiscibilidade, onde as propriedades da mistura polimérica vão depender das proporções poliméricas [79].

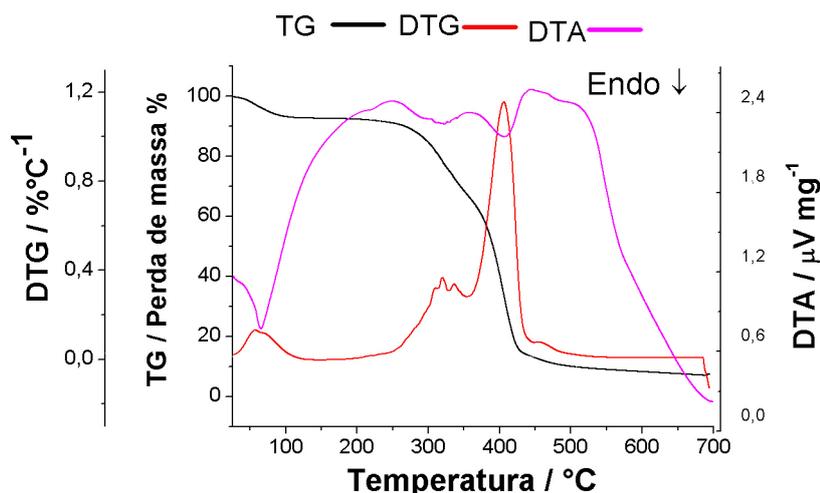


Figura 4.19: Curva TG, DTG e DTA da fibra PG2.

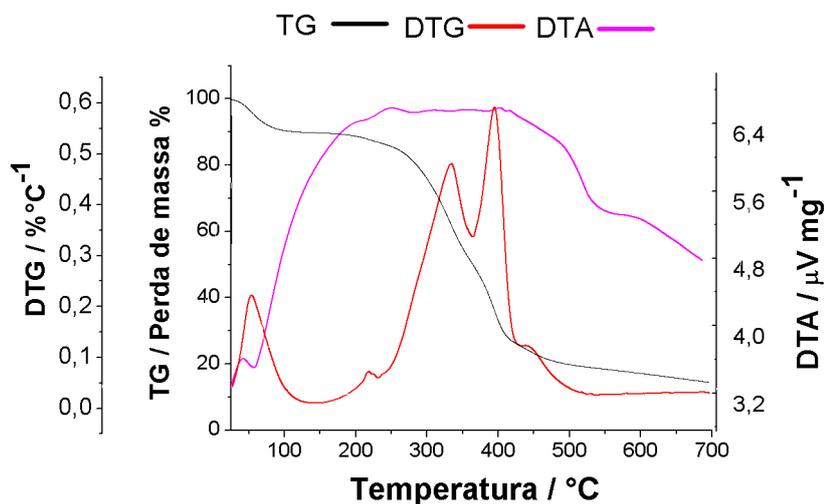


Figura 4.20: Curva TG, DTG e DTA da fibra PG3.

Na Tabela 4.3 estão apresentados os resultados dos principais eventos termogravimétricos das Fibras PG1, PG2, PG3, PGHA1, PGHA2 e PGHA3. Analisando os dados da Tabela 4.3, verifica-se que a medida que o teor de gelatina aumentou, a temperatura de decomposição ( $T_d$ ) das fibras diminuiu, o que indica que a estabilidade

Fibra	$T_m$ PCL/°C	$\Delta m_1$ (água) %	Resíduo	$T_d$ Gel/°C	$T_d$ PCL/°C
PCL	59,5	-	0	-	413
PCL/GEL(70/30)	56,3	5,60	3,14	322	408
PCL/GEL(60/40)	54,0	7,56	7,46	320	405
PCL/GEL(50/50)	55,7	10,2	14,5	332	394
PCL/GEL(70/30)-HA	55,6	7,67	14,9	326	402
PCL/GEL(60/40)-HA	53,4	9,36	11,2	331	402
PCL/GEL(50/50)-HA	51,5	11,1	15,8	331	395

$\Delta m_1$  = Porcentagem de perda de água

Tabela 4.3: Principais eventos térmicos nas fibras PG e PGHA.

térmica do compósito é menor. No entanto, o sistema apresenta maior estabilidade térmica quando contém HA. O PCL puro tem uma temperatura de decomposição aproximadamente de 413 °C, embora a maior temperatura de decomposição para o sistema PCL/GEL-HA tenha sido 407 °C.

As Figuras 4.21 mostram as curvas termogravimétricas das fibras obtidas e permitem comparar as estabilidades térmicas das mesmas. Analisando as curvas TG verifica-se um perfil muito semelhante entre elas, porém alguns detalhes devem ser destacados.

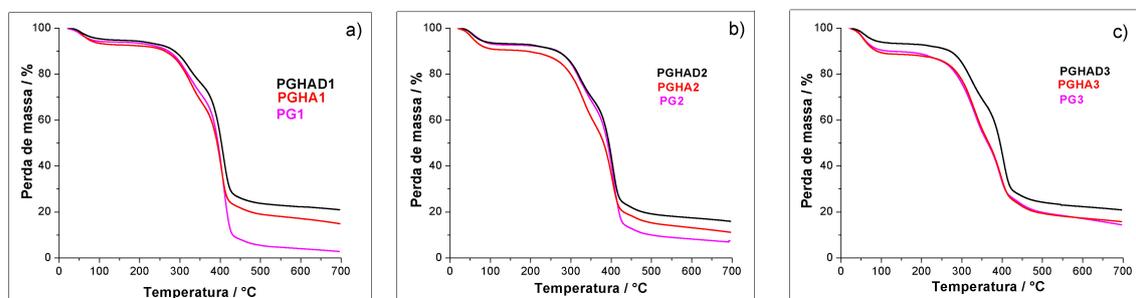


Figura 4.21: Curvas termogravimétricas a) PG1, PGHA1 e PGHAD1, b) PG2, PGHA2 e PGHAD2 e c) PG3, PGHA3 e PGHAD3.

Os resultados das curvas TG e dados na Tabela 4.3 indicam que a adição de partículas de HA e da doxiciclina nas fibras incrementa a temperatura de fusão em aproximadamente 3 °C, além de diminuir a temperatura de decomposição. Devido ao teor relativamente baixo de doxiciclina na fibra, os eventos de perdas de massa associados ao fármaco foram superpostos aos dos polímeros.

### 4.3.6 Calorimetria diferencial de varredura

A análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) permite determinar a temperatura de fusão ( $T_m$ ) do polímero puro, bem como das blends poliméricas. As curvas DSC do PCL, PG1, PG2 e PG3 são apresentadas na Figura 4.22.

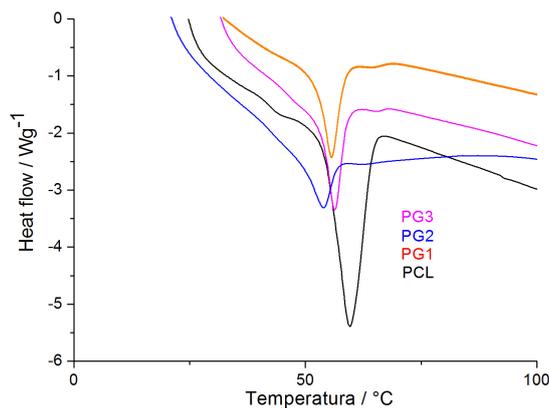


Figura 4.22: Curva DSC das fibras PCL/GEL

Analisando as curvas pode-se observar que a  $T_m$  praticamente não varia em função da composição da blenda, o que indica que a blenda é imiscível [80]. Nota-se que os perfis DSC das fibras PG1, PG2 e PG3 quando comparada com PCL puro, apresentam uma forma mais larga, enquanto o teor de gelatina aumenta, sendo que isso ocorre como consequência da superposição dos eventos próprios de cada polímero.

### 4.3.7 Infravermelho

Na Figura 4.15 já foram apresentados e discutidos os espectros de absorção na região do infravermelho para o polímero policaprolactona e da gelatina. Nas Figuras 4.23, 4.24 e 4.25 estão apresentados os espectros de absorção na região do infravermelho das fibras PG, PGHA e PGHAD, respectivamente.

Analisando os espectros verifica-se uma redução significativa na intensidade da banda da carbonila do PCL em  $1728\text{ cm}^{-1}$ . Observa-se ainda no espectro da mistura polimérica o desaparecimento da banda em torno de  $1294\text{ cm}^{-1}$ , que correspondente ao estiramento C-C e C-O, sugerindo a perda parcial da fase cristalina na PCL. O espectro apresenta uma banda larga de estiramento OH em torno de  $3458\text{ cm}^{-1}$  cuja intensidade aumenta com o teor de gelatina na fibra, que é oriunda da umidade da gelatina. Verifica-

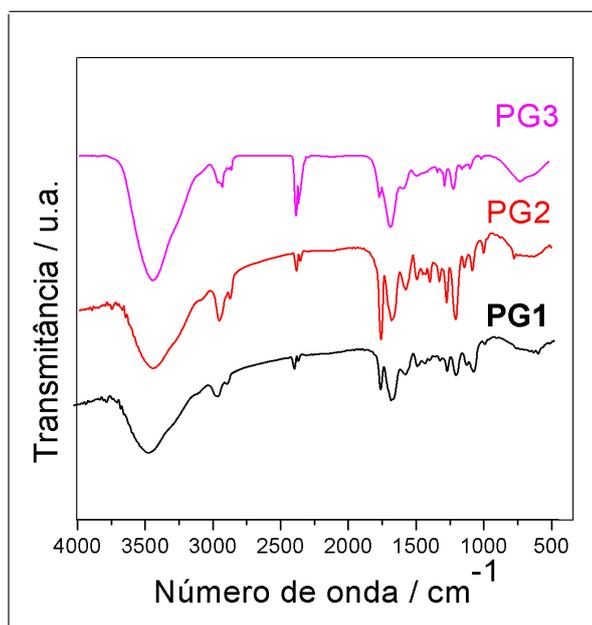


Figura 4.23: Espectros de absorção na região do infravermelho das fibras PG1, PG2 e PG3.

se ainda um aumento significativo do sinal a  $1644\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento da carbonila da amida I, à medida que há aumento da gelatina na fibra. Essa última banda se superpõe àquela da carbonila da PCL.

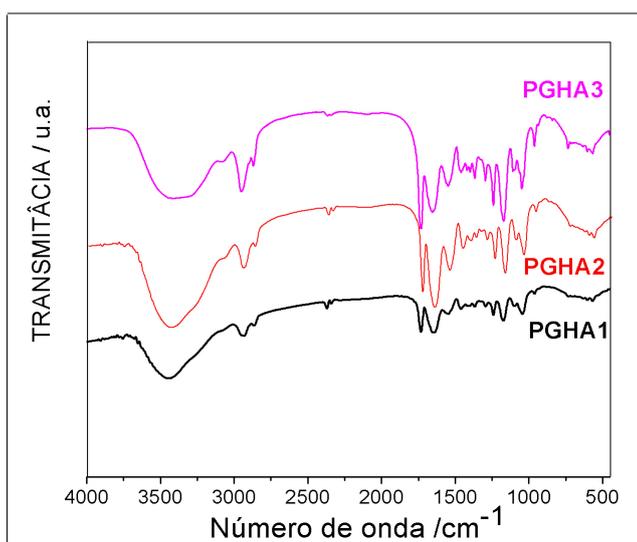


Figura 4.24: Espectros de absorção na região do infravermelho das fibras PGHA1, PGHA2 e PGHA3.

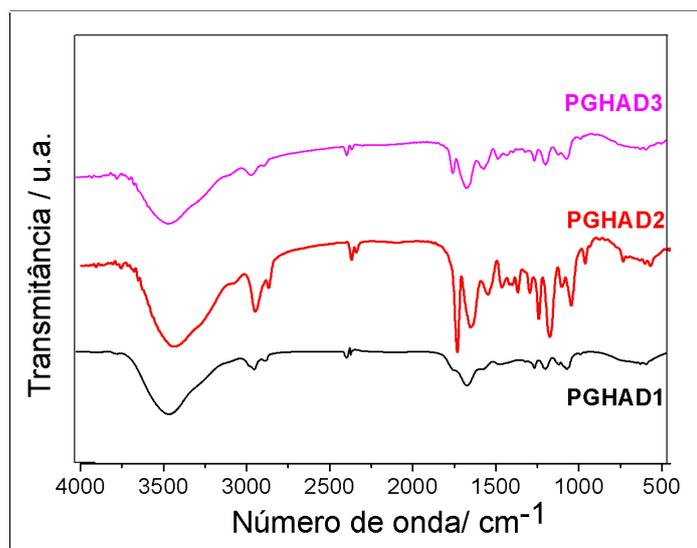


Figura 4.25: Espectros de absorção na região do infravermelho das fibras PGHAD1, PGHAD2 e PGHAD3.

A presença de HA nas fibras tem o efeito de alargamento da banda da carbonila a uma frequência maior em torno de 1732 a 1734  $\text{cm}^{-1}$ . Esse resultado sugere um aumento da fase amorfa na blenda polimérica, concordando com um estudo semelhante que foi feito por Guang-Mei [77].

### 4.3.8 Difração de raios X

As Figuras 4.26a, 4.26b e 4.26c apresentam os difratogramas correspondentes às fibras PCL/GEL, PCL/GEL-HA e PCL/GEL-HA-Dox, respectivamente. Em geral, os difratogramas das fibras apresentaram dois picos, similares àqueles encontrados na fibra do PCL. As intensidades de DRX dependem do tamanho do cristal, mas neste estudo observou-se que para todas as fibras obtidas os padrões característicos da HA, Dox e gelatina têm sido superpostos com a fase amorfa do PCL. Isto poderia ser indicativo da dispersão desses materiais na matriz do PCL. No caso da HA e Dox, a ausência dos picos característicos deles, está relacionada com o baixo teor desse material nas fibras. O fato de não ter sido observado o aparecimento de picos adicionais e deslocamentos nos ângulos de difração nos difratogramas, indica que não houve mudança na estrutura do PCL na blenda.

Guang-Mei et al., [77] compararam as reflexões das blendas PCL/GEL nas proporções 95:5, 90:10 com PCL pura empregado a técnica de Espalhamento de raios X a médios ângulos (WAXS) e observaram uma pequena mudança nas reflexões devido

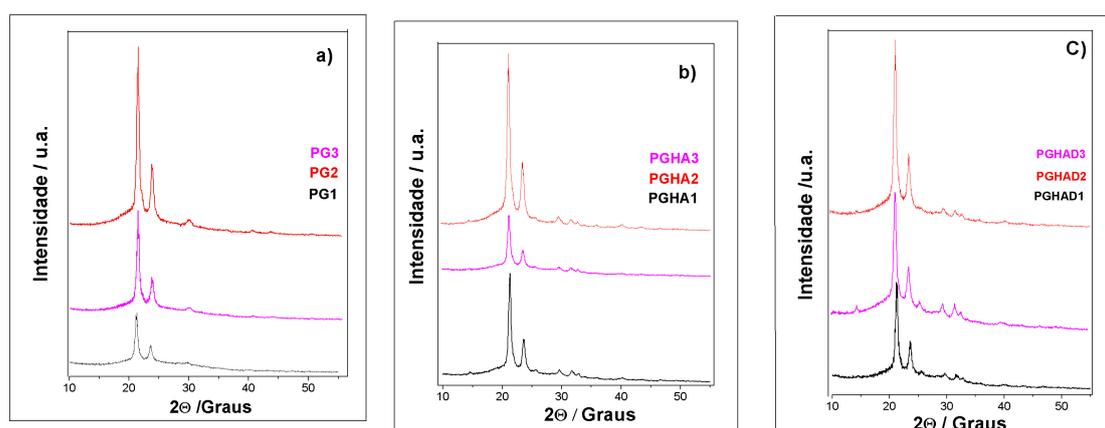


Figura 4.26: DRX das fibras a) PG , b) PGHA e c) PGHAD.

a um pequeno aumento nas fases do cristal do PCL. Eles afirmam que somente há formação de uma blenda miscível entre PCL e GEL para concentrações de gelatina menores de 10%, e que para concentrações maiores de gelatina se forma uma mistura polimérica compatível.

### 4.3.9 Microscopia de Eletrônica de Varredura e de Transmissão

A morfologia e a geometria (distribuição de diâmetros e orientação) das nanofibras eletrofiadas foram estudadas através de duas técnicas microscópicas: microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

A morfologia das fibras é influenciada principalmente pelas propriedades da solução polimérica (viscosidade, tensão superficial, concentração etc.), no entanto, a concentração da blenda PCL/GEL na solução foi fixada a 16%. As melhores condições de processabilidade da blenda de PCL/GEL foram determinadas variando parâmetros como a vazão da solução e voltagem, mantendo constante o tamanho do diâmetro da agulha e a distância ao coletor. Após a padronização das condições, a fibra foi depositada na placa metálica, e sua morfologia estudada usando MEV e MET.

### 4.3.10 Microscopia Eletrônica de Varredura

A Figura 4.27 mostra as imagens por MEV das fibras PCL/GEL, as fibras poliméricas contendo cerâmica PCL/GEL-HA são apresentadas na Figura 4.28 e a Figura 4.29 mostra as imagens das fibras poliméricas contendo cerâmica e o fármaco PCL/GEL-

HA-Dox.

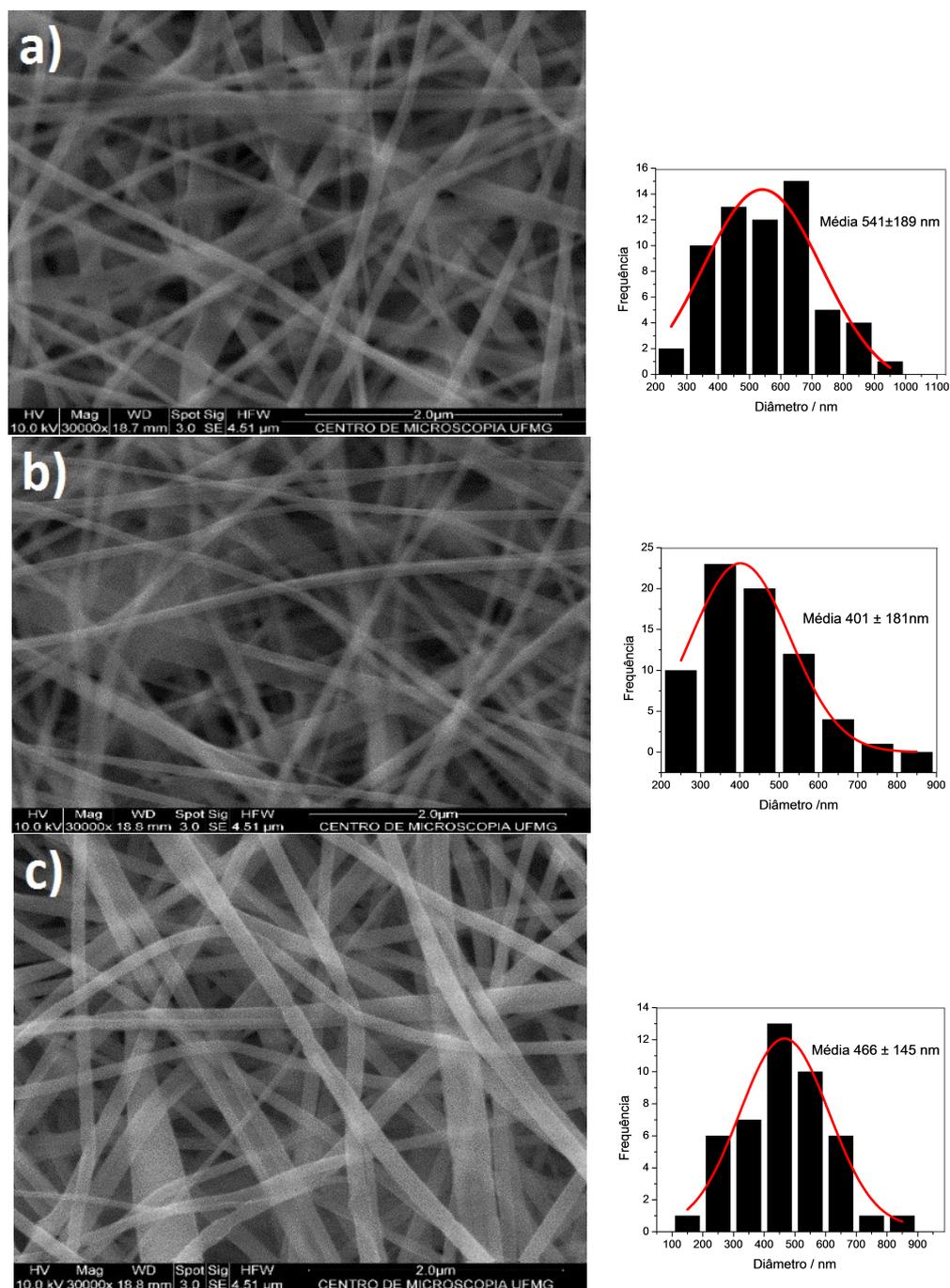


Figura 4.27: Imagens obtidas por MEV e histograma da distribuição de diâmetro das fibras, a) PG1, b) PG2 e c) PG3.

Conforme se verifica nas imagens, as fibras apresentaram superfície lisa, interconectadas e com perfil de seção transversal variável. As fibras obtidas por eletrofiação apresentam algumas regiões com defeitos, conhecidas *beads*. Os *beads* podem

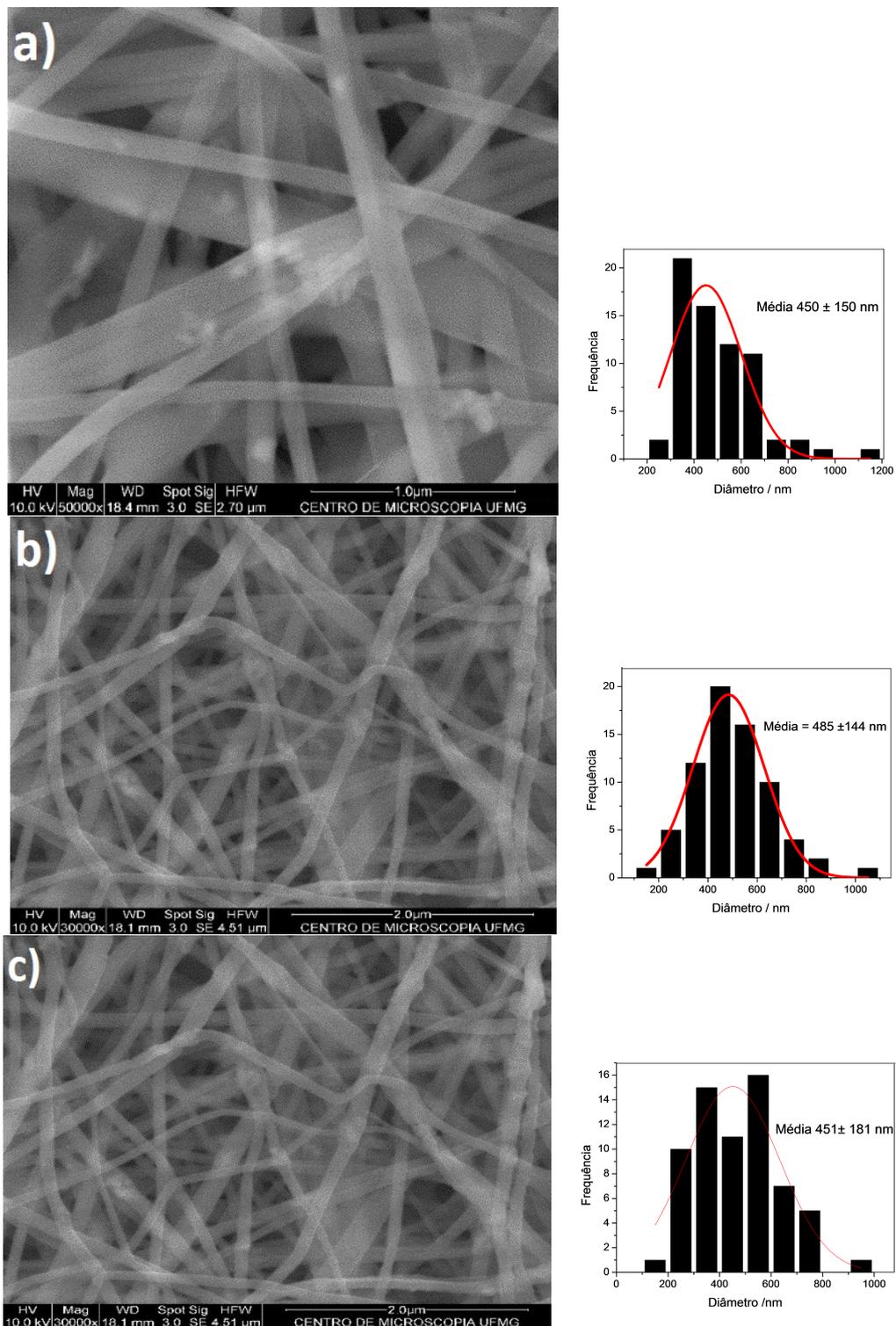


Figura 4.28: Imagens obtidas por MEV e histograma da distribuição de diâmetro das fibras, a) PGHA1, b) PGHA2 e c) PGHA3.

ser formados possivelmente devido à instabilidade do jato causada pela tensão superficial e/ou viscosidade da solução. Foi observada pouca aparência de *bead* nas fibras.

A morfologia das amostras não mostrou muita diferença em função da concentração de gelatina. A distribuição dos diâmetros das fibras PCL/GEL: (70/30), (60/40) e (50/50), e contendo HA-Dox, não mostraram alterações significativas. O diâmetro médio e desvio padrão das fibras PG1, PG2 e PG3 foram  $541\pm 189$  nm,  $401\pm 126$  nm e  $466\pm 145$  nm, respectivamente. Os diâmetros das fibras e os histogramas da distribuição do diâmetro são mostrados nas Figuras 4.27.

As imagens da Figura 4.28 mostram a incorporação das nHA no interior e na superfície das fibras. Também se observa a presença de agregados de HA, mesmo assim estes estão incorporados na fibra. A presença destes agregados de HA na superfície da fibra potencializa a transmissão de sinais osteoindutivos às células, o que favorece processos de mineralização visando utilizar a fibra como um biomaterial na regeneração óssea [81]. As imagens da Figura 4.29 mostram a presença de cristais de fármaco sobre a superfície da fibra. Esses aglomerados de Dox podem ter ocorrido pela incompleta evaporação do solvente durante o processo de eletrospiação. Esses cristais na superfície das fibras causaram uma liberação rápida (efeito explosão) da doxiciclina, sendo que este evento será discutido na seção 4.3.12.

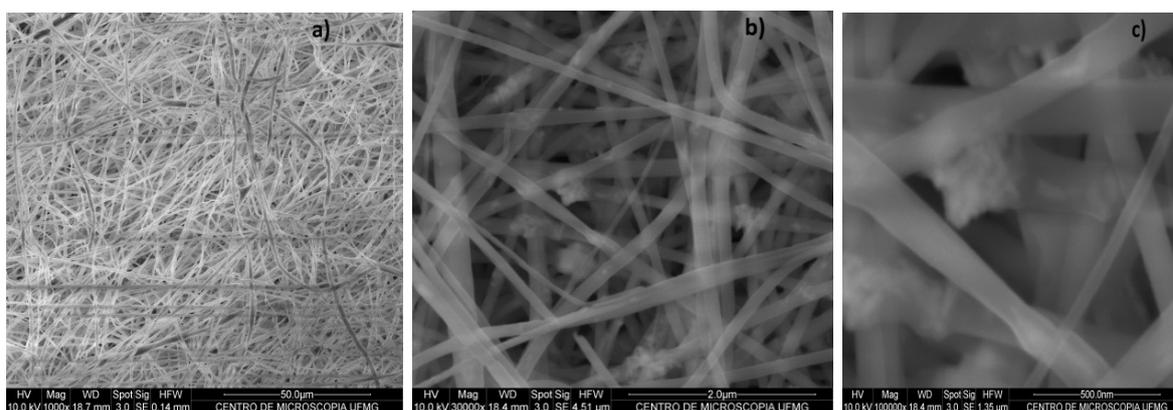


Figura 4.29: Imagens obtidas por MEV das fibra, a) PGHAD1, b) PGHAD2 e c) PGHAD3.



Figura 4.30: Imagens por MET das fibras a) PGHA1 b) PGHD2 e c) PGHAD3.

#### 4.3.11 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As imagens por microscopia eletrônica de transmissão das fibras são apresentadas na Figura 4.30. Nestas imagens pode-se observar que as nanopartículas de HA estão tanto no interior quanto na superfície da fibra. Esta superfície mais rugosa na fibra gerada pela deposição da biocerâmica pode resultar num aumento significativo na área superficial específica.

Como discutido anteriormente, alguns autores [82, 83] consideram que a miscibilidade depende do teor dos polímeros na blenda. Na mistura polimérica PCL/GEL, somente há miscibilidade quando o conteúdo de gelatina é menor do que 10% e maior que 80%. Para as outras faixas de composição, a blenda é imiscível e forma misturas heterogêneas. Como se pode observar na Figura 4.30c, que pertence à fibra na proporção polimérica 50/50, onde há uma separação de fase entre o PCL e gelatina. Polímeros termodinamicamente miscíveis misturam-se a nível molecular, porém as fibras obtidas formam uma blenda compatível onde podem ocorrer interações específicas e fortes entre os diferentes componentes, como interações do tipo ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo e interações iônicas [84].

#### 4.3.12 Testes de liberação controlada de Doxíciclina

As curvas de liberação acumulativa da doxíciclina em função do tempo são apresentadas na Figura 4.31. Em todas as fibras observou-se um efeito explosão em que na primeira hora é liberado cerca de 60% do fármaco. Esse resultado pode ser explicado devido à combinação de vários fatores: como a presença de cristais de doxíciclina na superfície da fibra, também devido à elevada quantidade de água adsorvida pela fibra

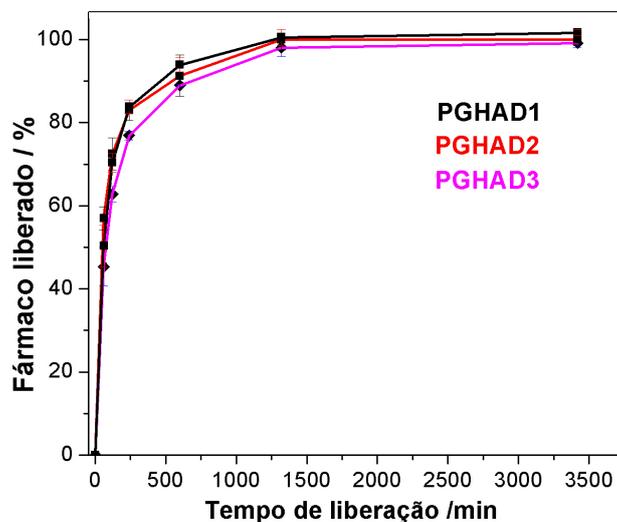


Figura 4.31: Curva de liberação controlada de doxiciclina das fibras PGHAD1, PGHAD2 e PGHAD3.

como consequência da rápida degradação da gelatina e por fim como consequência do tamanho nanométrico das fibras, as quais apresentam elevada relação área/volume, permitindo assim que mais moléculas de fármaco se difundam das nanofibras para o meio de liberação.

É possível perceber também que todas as fibras mostraram o mesmo perfil de liberação independente da composição da mistura polimérica e a concentração de gelatina não parece exercer influência significativa no perfil de liberação do fármaco. Indicando que o fármaco devido a sua natureza hidrofílica tem melhor afinidade pela gelatina do que pelo PCL.

A quantidade de fármaco liberado foi de aproximadamente de 90% em 600 min, a partir desse momento começa a ser importante a difusão das moléculas de doxiciclina retidas na região amorfa do PCL e que se difundem ao meio de liberação. Após 3400 min não foi detectado mais fármaco.

### 4.3.13 Teste de citotoxicidade

Foi realizada a avaliação da citotoxicidade sobre as células fibroblastos e da atividade antitumoral sobre células A431 com os eluatos das fibras PCL/GEL-HA-Dox e PCL/GEL-Dox. Após 24 e 48 h de incubação, os efeitos da concentração de doxiciclina

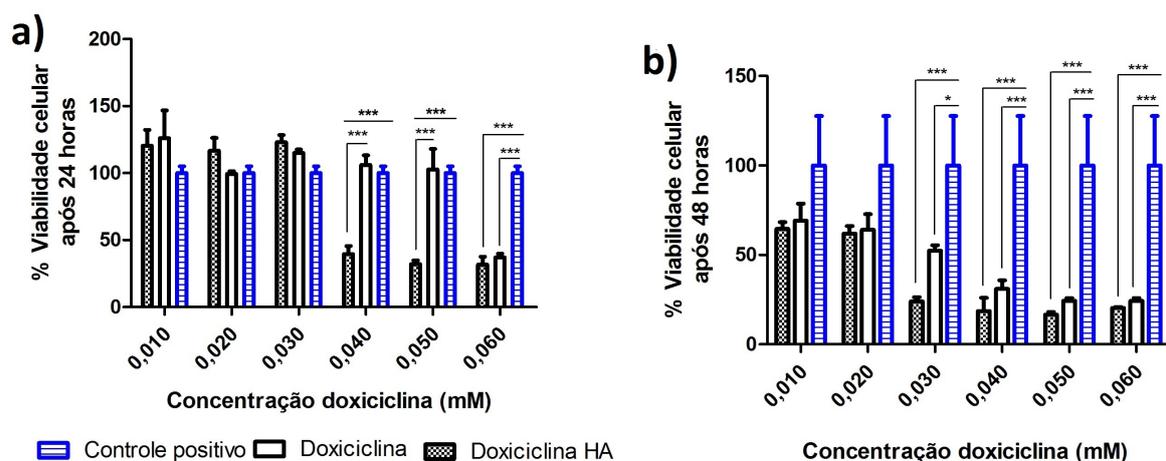


Figura 4.32: Proliferação celular de Fibroblastos após 24 e 48 horas de tratamento com Dox-HA e Dox desde 0,010 até 0,060 mM de Dox. \*( $P < 0,05$ ), \*\*\* ( $P < 0,001$ ).

com presença e ausência de HA foram avaliados sobre ambas as linhas celulares, utilizado seis concentrações diferentes do fármaco: 0,010, 0,020, 0,030, 0,040, 0,05 e 0,060 mM. A quantidade de Doxíciclina presente nos eluatos das fibras foi determinada como descrito na seção 3.3.

As Figuras 4.32 e 4.33 contêm os resultados do ensaio de MTT para células de fibroblastos e células A431 após tratamento por 24 e 48 horas. Tanto o eluato de doxíciclina sozinho quanto doxíciclina-hidroxiapatita tiveram uma citotoxicidade dose dependente frente as células testadas.

Neste estudo, observou-se que após 24 h de tratamento a viabilidade celular dos fibroblastos diminuiu somente para concentrações maiores de 0,050 mM do eluato que contém Dox, quando comparadas com o grupo controle. Por outro lado, o tratamento com o eluato que contém Dox-HA apresentou níveis de citotoxicidade moderada a partir de concentrações maiores que 0,030 mM como mostrado na Figura 4.32a. O eluato Dox-HA com as concentrações de 0,040, 0,050 e 0,060 mM atingirem níveis de citotoxicidade moderada, apresentando uma viabilidade celular em torno de 40,0%, 32,0% e 32,0% respectivamente.

Em contraste, os tratamentos em células de fibroblastos após 48 horas apresentados na Figura 4.32b mostraram ser levemente citotóxicos nas concentrações de 0,010 e 0,020 mM e não houve diferença ( $P < 0,001$ ) na citotoxicidade de ambos os grupos testados. No entanto, concentrações maiores de 0,020 até 0,060 mM do grupo Dox-HA

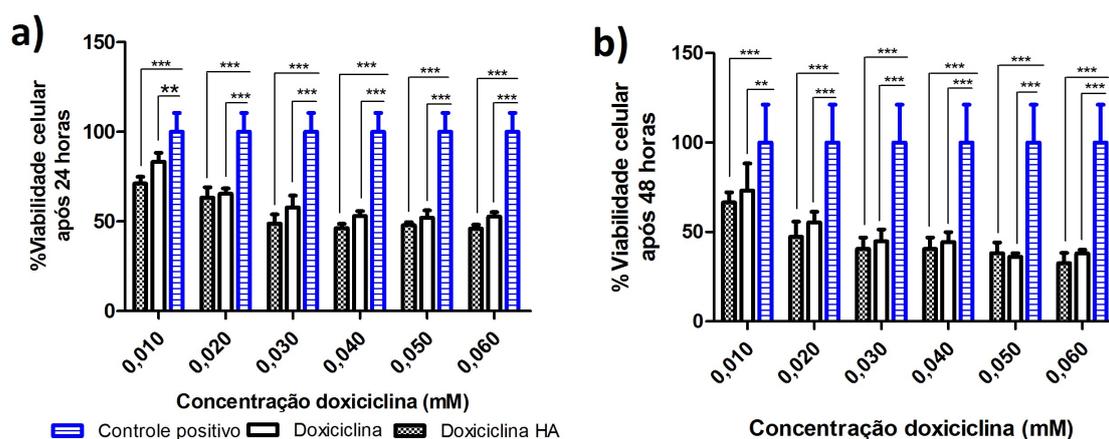


Figura 4.33: Resultado do ensaio de proliferação das células A-431 pelo teste de MTT após 24 e 48 horas de tratamento com Dox-HA e Dox nas concentrações de 0,010 até 0,060 mM de Dox, \*\* (  $P < 0,01$ ) e \*\*\* (  $P < 0,001$ ).

apresentou uma citotoxicidade severa com viabilidade celular menor de 30%.

Comparando as Figuras 4.33a e 4.33b podemos afirmar que há inibição das células tumorais para todas as concentrações dos grupos testados. Após 24 horas de tratamento as concentrações 0,010 até 0,060 mM para os grupos testados mostraram ser levemente citotóxicos. Com o aumento da concentração do tratamento, a viabilidade celular foi menor ( $P < 0,05$ ) para o ensaio de 48 horas quando comparada com o ensaio de 24 horas. No entanto, ambos os grupos estão na mesma faixa de citotoxicidade moderada.

#### 4.3.14 Avaliação da atividade antibacteriana

Os resultados obtidos nos testes in vitro da atividade antibacteriana foram avaliados através dos cálculos das medidas dos halos de inibição para as diferentes fibras. Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos com o auxílio de uma régua milimetrada e submetidos à análise para determinar os efeitos da combinação de Dox e HA nas fibras. Os dados dos halos de inibição estão apresentados na Tabela 4.4.

Considerando os resultados obtidos, foi observada a ausência de atividade antibacteriana das fibras PGHA e PG frente às bactérias *S. aureus* e *P. gingivalis*, visto que não foi observada a formação de halo de inibição. Podemos observar na Tabela 4.4 que as fibras PGHAD1, PGHAD2 e PGHAD3 apresentaram um resultado muito interessante devido ao efeito sinérgico entre a doxyciclina e as nanopartículas

Amostra	<i>S. aureus</i> Halo de inibição (mm)	<i>P. gingivalis</i> Halo de inibição (mm)
PCL/GEL (70/30)-HA-Dox	27,3 ± 1,5	23,3 ± 1,5
PCL/GEL (60/40)-HA-Dox	23,0 ± 1,0	23,3 ± 0,6
PCL/GEL (50/50)-HA-Dox	25,0 ± 1,0	24,3 ± 0,6
PCL/GEL-HA	0	0
PCL/GEL	0	0
HA	6,3 ± 0,6	0
Doxiciclina	13,2 ± 0,6	13,8 ± 0,9

Tabela 4.4: Atividade antibacteriana das fibra expressa em diâmetros da zona de inibição em mm.

de hidroxiapatita. A combinação das nanopartículas de HA e Dox na mesma fibra potencializa o efeito bactericida destas fibras e apresentaram halos de inibição maiores que a soma dos halos de inibição da nHA e Dox realizados de forma separada. Esse resultado indica a possibilidade de utilizar uma quantidade menor de fármaco numa fibra que contem nHA quando comparado com uma fibra que somente contem Dox.

Espera-se que cada cepa testada produza um halo inibitório dentro dos limites estabelecidos para o controle, segundo dados da literatura reportados pela técnica de difusão em disco de Kirby & Bauer para doxiciclina com concentração de 30  $\mu\text{g}$  sobre *S. aureus*, ele apresenta valores de halos inibitórios na faixa de 23 – 29 mm [85]. A fibra controle de doxiciclina apresentou um halo de inibição de  $13,2 \pm 0,6$  para *S. aureus* e  $13,8 \pm 0,9$  para *P. gingivalis*. As fibras PGHAD1, PGHAD2 e PGHAD3, com uma concentração aproximadamente 16,5  $\mu\text{g}$  de doxiciclina, apresentaram um halo de  $25 \pm 1,0$  frente a *S. aureus* e  $24,3 \pm 0,6$  em *P. gingivalis*.

Nota-se também que uma dispersão aquosa das nHA apresentou moderada atividade frente a bactérias *S. aureus*, mas não contra as *P. gingivalis*, como apresentado na Tabela 4.4. A maior susceptibilidade das bactérias Gram positivas, quando comparadas com as Gram negativas frente as nHA, tem sido observado com outro tipo de nanopartículas e agentes químicos e é amplamente relatado na literatura [86]. As bactérias Gram-negativas possuem paredes mais complexas que dificultam a entrada de antibióticos ou outras partículas [87].

# Capítulo 5

## Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros

### 5.1 Conclusões

Nanopartículas de HA foram sintetizadas pelo método de co-precipitação em presença e ausência de surfactante. O tratamento térmico executado para as HA obtidas a 100, 550 e 850 °C causou: mudança de fase, aumento de cristalinidade e redução da área superficial específica.

Resultados do estudo de adsorção-dessorção de Dox a partir das nanopartículas de HA mostraram uma maior capacidade de adsorção do fármaco para as amostras de HA sintetizadas pelo método de co-precipitação com surfactante, quando comparadas com as amostras preparadas pelo mesmo método sem surfactante.

Um novo sistema de liberação de Dox à base de nanofibras PCL/GEL contendo nanopartículas de HA foi preparado.

As diferentes blendas apresentaram semelhantes perfis de liberação do fármaco, isto sugere que o fármaco encontra-se disperso principalmente na GEL e que sua liberação é controlada pela degradação desse polímero hidrofílico.

As micrografias MEV confirmaram o tamanho nanoestruturado das fibras. A TEM permitiu confirmar a imiscibilidade da blenda polimérica nas proporções preparadas.

O aumento de concentração de gelatina e a presença de HA nas fibras teve pouco efeito na morfologia e na distribuição do tamanho das fibras.

Testes de MTT conduzidos a partir dos eluatos das fibra PCL/GEL-HA-Dox e PCL/GEL-Dox sobre células de fibroblastos mostraram citotoxicidade dose-dependente na faixa de concentrações de 0,010-0,060 mM. Os mesmos testes, em células tumorais A431 mostraram citotoxicidade leve da Dox na faixa de concentração de 0,010-0,02 mM e toxicidade moderada na faixa de 0,030-0,060 mM.

A combinação de nanopartículas de HA e Dox na mesma fibra potencializa o efeito bactericida da Dox nas fibras PGHAD1, PGHAD2 e PGHAD3.

## 5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Tomando-se por base os resultados obtidos neste estudo e visando aprofundar na caracterização dos compósitos preparados, a seguir são dadas algumas sugestões para trabalhos futuros:

Fazer estudo de resistência mecânica como módulo de elasticidade e resistência à tração das fibras preparadas.

Realizar testes de viabilidade e proliferação celular sobre as fibras. Realizar testes das fibras com osteoblastos para determinar processos de mineralização.

Estratégias para diminuir o efeito explosão na liberação do fármaco a partir das fibras. Duas propostas podem ser avaliadas: Fazer cross linking da gelatina ou obtenção de nanofibras do tipo concêntricas.

## Referências Bibliográficas

- [1] R. Andrade-Acevedo, M. S. Trentin, J. A. Shilblin, *et al.*, “Bases clínicas e biológicas da rog associadas a barreiras ou membranas,” *Rev. Bras. Implantodont. Prótese implante*, vol. 11, no. 43, pp. 251–7, 2004.
- [2] M. Chakraborti, J. K. Jackson, D. Plackett, D. M. Brunette, and H. M. Burt, “Drug intercalation in layered double hydroxide clay: Application in the development of a nanocomposite film for guided tissue regeneration,” *International journal of pharmaceutics*, vol. 416, no. 1, pp. 305–313, 2011.
- [3] K. Fujihara, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, “Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers,” *Bio-materials*, vol. 26, no. 19, pp. 4139–4147, 2005.
- [4] P. E. Petersen and H. Ogawa, “Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach,” *J Periodontol*, vol. 76, no. 12, pp. 2187–93, 2005.
- [5] R. Langer and D. A. Tirrell, “Designing materials for biology and medicine,” *Nature*, vol. 428, no. 6982, pp. 487–492, 2004.
- [6] A. F. Von Recum and M. Laberge, “Educational goals for biomaterials science and engineering: Prospective view,” *Journal of Applied Biomaterials*, vol. 6, no. 2, pp. 137–144, 1995.
- [7] S. H. Barbanti, C. A. Zavaglia, and E. A. Duek, “Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos,” *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 15, no. 1, pp. 13–21, 2005.
- [8] J. H. Lee, J.-H. Park, A. El-Fiqi, J.-H. Kim, Y.-R. Yun, J.-H. Jang, C.-M. Han, E.-J. Lee, and H.-W. Kim, “Biointerface control of electrospun fiber scaffolds for bone regeneration: engineered protein link to mineralized surface,” *Acta biomaterialia*, vol. 10, no. 6, pp. 2750–2761, 2014.

- [9] T. Lu, Y. Li, and T. Chen, “Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering,” *Int J Nanomedicine*, vol. 8, pp. 337–50, 2013.
- [10] H.-W. Kim, H.-H. Lee, and J. C. Knowles, “Electrospinning biomedical nanocomposite fibers of hydroxyapatite/poly(lactic acid) for bone regeneration,” *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 79A, no. 3, pp. 643–649, 2006.
- [11] M. Santos, A. Florentino, M. Saeki, A. Aparecida, M. L. Fook, and A. Guastaldi, “Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico,” *Eclética Química*, vol. 30, no. 3, pp. 29–35, 2005.
- [12] R. Z. LeGeros, “Calcium phosphate-based osteoinductive materials,” *Chemical Reviews*, vol. 108, no. 11, pp. 4742–4753, 2008.
- [13] V. Uskoković and D. P. Uskoković, “Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents,” *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 96, no. 1, pp. 152–191, 2011.
- [14] E. Garskaite, K.-A. Gross, S.-W. Yang, T. C.-K. Yang, J.-C. Yang, and A. Kareiva, “Effect of processing conditions on the crystallinity and structure of carbonated calcium hydroxyapatite,” *Cryst Eng Comm*, vol. 16, no. 19, pp. 3950–3959, 2014.
- [15] L. Bernard, M. Freche, J. L. Lacout, and B. Biscans, “Preparation of hydroxyapatite by neutralization at low temperature—influence of purity of the raw material,” *Powder Technology*, vol. 103, no. 1, pp. 19–25, 1999.
- [16] X. Zhao, S. Ng, B. C. Heng, J. Guo, L. Ma, T. T. Tan, K. W. Ng, and S. C. Loo, “Cytotoxicity of hydroxyapatite nanoparticles is shape and cell dependent,” *Arch Toxicol*, vol. 87, no. 6, pp. 1037–52, 2013.
- [17] Y. Wang, S. Zhang, K. Wei, N. Zhao, J. Chen, and X. Wang, “Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanopowders using cationic surfactant as a template,” *Materials Letters*, vol. 60, no. 12, pp. 1484–1487, 2006.
- [18] F. Ye, H. Guo, H. Zhang, and X. He, “Polymeric micelle-templated synthesis of hydroxyapatite hollow nanoparticles for a drug delivery system,” *Acta Biomaterialia*, vol. 6, no. 6, pp. 2212–2218, 2010.

- [19] Y. F. Zhao and J. Ma, “Triblock co-polymer templating synthesis of mesostructured hydroxyapatite,” *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 87, no. 2, pp. 110–117, 2005.
- [20] N. Ikawa, H. Hori, T. Kimura, Y. Oumi, and T. Sano, “Unique surface property of surfactant-assisted mesoporous calcium phosphate,” *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 141, no. 1â3, pp. 56–60, 2011.
- [21] E. Verron, I. Khairoun, J. Guicheux, and J.-M. Bouler, “Calcium phosphate biomaterials as bone drug delivery systems: a review,” *Drug Discovery Today*, vol. 15, no. 13â14, pp. 547–552, 2010.
- [22] S. C. Loo, T. Moore, B. Banik, and F. Alexis, “Biomedical applications of hydroxyapatite nanoparticles,” *Curr Pharm Biotechnol*, vol. 11, no. 4, pp. 333–42, 2010.
- [23] S. Wang, X. Wang, H. Xu, H. Abe, Z. Tan, Y. Zhao, J. Guo, M. Naito, H. Ichikawa, and Y. Fukumori, “Towards sustained delivery of small molecular drugs using hydroxyapatite microspheres as the vehicle,” *Advanced Powder Technology*, vol. 21, no. 3, pp. 268–272, 2010.
- [24] Q. Xu and J. T. Czernuszka, “Controlled release of amoxicillin from hydroxyapatite-coated poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres,” *J Control Release*, vol. 127, no. 2, pp. 146–53, 2008.
- [25] S. Bose and S. Tarafder, “Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review,” *Acta Biomaterialia*, vol. 8, no. 4, pp. 1401–1421, 2012.
- [26] L. G. Griffith, “Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering,” *Ann N Y Acad Sci*, vol. 961, pp. 83–95, 2002.
- [27] L. S. Nair and C. T. Laurencin, “Biodegradable polymers as biomaterials,” *Progress in Polymer Science*, vol. 32, no. 8â9, pp. 762–798, 2007.
- [28] I. Armentano, M. Dottori, E. Fortunati, S. Mattioli, and J. M. Kenny, “Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review,” *Polymer Degradation and Stability*, vol. 95, no. 11, pp. 2126–2146, 2010.
- [29] M. Santoro, A. M. Tatara, and A. G. Mikos, “Gelatin carriers for drug and cell delivery in tissue engineering,” *Journal of Controlled Release*, vol. 190, pp. 210–218, 2014.

- [30] S. Young, M. Wong, Y. Tabata, and A. G. Mikos, “Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules,” *Journal of Controlled Release*, vol. 109, no. 1â3, pp. 256–274, 2005.
- [31] R. C. Prestes, “Colágeno e seus derivados: características e aplicações em produtos cárneos; collagen and its derivatives: characteristics and applications in meat products,” *UNOPAR Cient., Ciênc. biol. saude*, vol. 15, no. 1, 2013.
- [32] T. H. C. Salles, “Electrofiacao de nanofibras de blendas de gelatina/PVP (poli (vinil pirrolidona)) a partir de soluções de água e ácido acético,” *Campinas 10 p.*, vol. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2013.
- [33] V. Pillay, C. Dott, Y. E. Choonara, C. Tyagi, L. Tomar, P. Kumar, L. C. du Toit, and V. M. K. Ndesendo, “A review of the effect of processing variables on the fabrication of electrospun nanofibers for drug delivery applications,” *Journal of Nanomaterials*, vol. 2013, p. 22, 2013.
- [34] Z. X. Meng, X. X. Xu, W. Zheng, H. M. Zhou, L. Li, Y. F. Zheng, and X. Lou, “Preparation and characterization of electrospun PLGA/gelatin nanofibers as a potential drug delivery system,” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 84, no. 1, pp. 97–102, 2011.
- [35] L. H. B. Khang G., Kim M. S., “A manual for biomaterials/ scaffold fabrication technology,” *Vol. 4 World Scientific Publishing Co. London*, 2007.
- [36] X. Hu, S. Liu, G. Zhou, Y. Huang, Z. Xie, and X. Jing, “Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications,” *Journal of Controlled Release*, vol. 185, no. 0, pp. 12–21, 2014.
- [37] C. Burger, B. S. Hsiao, and B. Chu, “Nanofibrous materials and their applications,” *Annual Review of Materials Research*, vol. 36, no. 1, pp. 333–368, 2006.
- [38] R. Vasita and D. S. Katti, “Nanofibers and their applications in tissue engineering,” *International Journal of Nanomedicine*, vol. 1, no. 1, pp. 15–30, 2006.
- [39] N. Binulal, A. Natarajan, D. Menon, V. Bhaskaran, U. Mony, and S. V. Nair, “PCL–gelatin composite nanofibers electrospun using diluted acetic acid–ethyl acetate solvent system for stem cell-based bone tissue engineering,” *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 25, no. 4, pp. 325–340, 2014.

- [40] J.-H. Song, H.-E. Kim, and H.-W. Kim, "Production of electrospun gelatin nanofiber by water-based co-solvent approach," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 19, no. 1, pp. 95–102, 2008.
- [41] E. J. Chong, T. T. Phan, I. J. Lim, Y. Z. Zhang, B. H. Bay, S. Ramakrishna, and C. T. Lim, "Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution," *Acta Biomaterialia*, vol. 3, no. 3, pp. 321–330, 2007.
- [42] N. D. Luong, I.-S. Moon, D. S. Lee, Y.-K. Lee, and J.-D. Nam, "Surface modification of poly(l-lactide) electrospun fibers with nanocrystal hydroxyapatite for engineered scaffold applications," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 28, no. 8, pp. 1242–1249, 2008.
- [43] E.-R. Kenawy, F. I. Abdel-Hay, M. H. El-Newehy, and G. E. Wnek, "Processing of polymer nanofibers through electrospinning as drug delivery systems," *Materials Chemistry and Physics*, vol. 113, no. 1, pp. 296–302, 2009.
- [44] R. C. Mundargi, S. Srirangarajan, S. A. Agnihotri, S. A. Patil, S. Ravindra, S. B. Setty, and T. M. Aminabhavi, "Development and evaluation of novel biodegradable microspheres based on poly(d,l-lactide-co-glycolide) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) for controlled delivery of doxycycline in the treatment of human periodontal pocket: In vitro and in vivo studies," *Journal of Controlled Release*, vol. 119, no. 1, pp. 59–68, 2007.
- [45] D. Pastorino, C. Canal, and M.-P. Ginebra, "Drug delivery from injectable calcium phosphate foams by tailoring the macroporosity-drug interaction," *Acta biomaterialia*, vol. 12, no. 0, pp. 250–259, 2015.
- [46] D. A. Guimarães, É. Rizzi, C. S. Ceron, A. Martins-Oliveira, R. F. Gerlach, and J. E. T. dos Santos, "Inibição de metaloproteinases da matriz extracelular: uma possível estratégia terapêutica na hipertensão arterial," *Rev Bras Hipertens*, vol. 17, pp. 226–230, 2010.
- [47] Y. Zhang, H. Ouyang, C. T. Lim, S. Ramakrishna, and Z.-M. Huang, "Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds," *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 72B, no. 1, pp. 156–165, 2005.
- [48] H. Yu-Tzu, I. Masataka, N. Yoshihiro, C. Chao-Hung, and Y. Yusuke, "Block-copolymer-assisted synthesis of hydroxyapatite nanoparticles with high surface

- area and uniform size,” *Science and Technology of Advanced Materials*, vol. 12, no. 4, p. 045005, 2011.
- [49] J. W. P. Espíndola *et al.*, “Avaliação da atividade antimicrobiana e citotoxicidade de derivados aril-semicarbazônicos,” *Rev. Bras. Farm.*, vol. 92, no. 3, pp. 171–175, 2011.
- [50] A. Jilavenkatesa and R. A. Condrate, “Sol–gel processing of hydroxyapatite,” *Journal of Materials Science*, vol. 33, no. 16, pp. 4111–4119, 1998.
- [51] D. Marchat, D. Bernache-Assollant, and E. Champion, “Cadmium fixation by synthetic hydroxyapatite in aqueous solution—thermal behaviour,” *Journal of Hazardous Materials*, vol. 139, no. 3, pp. 453–460, 2007.
- [52] A. Kafilak and W. Kolodziejcki, “Complementary information on water and hydroxyl groups in nanocrystalline carbonated hydroxyapatites from TGA, NMR and IR measurements,” *Journal of Molecular Structure*, vol. 990, no. 1–3, pp. 263–270, 2011.
- [53] C. A. García Negrete, *Síntesis de nanopartículas de Hidroxiapatita y óxido de aluminio para el desarrollo de sólidos porosos de interés biomédico*. PhD thesis, Universidad Nacional de Colombia, 2009.
- [54] V. G. Teixeira, F. M. Coutinho, and A. S. Gomes, “Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno,” *Química Nova*, vol. 24, no. 6, pp. 808–818, 2001.
- [55] N. Puvvada, P. K. Panigrahi, and A. Pathak, “Room temperature synthesis of highly hemocompatible hydroxyapatite, study of their physical properties and spectroscopic correlation of particle size,” *Nanoscale*, vol. 2, no. 12, pp. 2631–2638, 2010.
- [56] S. Ramesh, K. L. Aw, R. Tolouei, M. Amiriyan, C. Y. Tan, M. Hamdi, J. Purbolaksono, M. A. Hassan, and W. D. Teng, “Sintering properties of hydroxyapatite powders prepared using different methods,” *Ceramics International*, vol. 39, no. 1, pp. 111–119, 2013.
- [57] I. R. Gibson, S. Ke, S. M. Best, and W. Bonfield, “Effect of powder characteristics on the sinterability of hydroxyapatite powders,” *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 12, no. 2, pp. 163–171, 2001.

- [58] T. Matsumoto, M. Okazaki, M. Inoue, S. Yamaguchi, T. Kusunose, T. Toyonaga, Y. Hamada, and J. Takahashi, "Hydroxyapatite particles as a controlled release carrier of protein," *Biomaterials*, vol. 25, no. 17, pp. 3807–3812, 2004.
- [59] I. R. Gibson, I. Rehman, S. M. Best, and W. Bonfield\*, "Characterization of the transformation from calcium-deficient apatite to  $\beta$ -tricalcium phosphate," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 11, no. 12, pp. 799–804, 2000.
- [60] Y. X. Pang and X. Bao, "Influence of temperature, ripening time and calcination on the morphology and crystallinity of hydroxyapatite nanoparticles," *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 23, no. 10, pp. 1697–1704, 2003.
- [61] A. Wang, D. Liu, H. Yin, H. Wu, Y. Wada, M. Ren, T. Jiang, X. Cheng, and Y. Xu, "Size-controlled synthesis of hydroxyapatite nanorods by chemical precipitation in the presence of organic modifiers," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 27, no. 4, pp. 865–869, 2007.
- [62] W. Xia and J. Chang, "Well-ordered mesoporous bioactive glasses (MBG): A promising bioactive drug delivery system," *Journal of Controlled Release*, vol. 110, no. 3, pp. 522–530, 2006.
- [63] G. Muralithran and S. Ramesh, "The effects of sintering temperature on the properties of hydroxyapatite," *Ceramics International*, vol. 26, no. 2, pp. 221–230, 2000.
- [64] E. Landi, A. Tampieri, G. Celotti, R. Langenati, M. Sandri, and S. Sprio, "Nucleation of biomimetic apatite in synthetic body fluids: Dense and porous scaffold development," *Biomaterials*, vol. 26, no. 16, pp. 2835–2845, 2005.
- [65] B. C. A. Myers H.F., Tochon-Danguy H. J., "Ir absorption spectrophotometric analysis of the complex formed by tetracycline and synthetic hydroxyapatite," *Calcified Tissue International*, vol. 35, pp. 754–749, 1983.
- [66] S. Giovagnoli, T. Tsai, and P. P. DeLuca, "Formulation and release behavior of doxycycline-alginate hydrogel microparticles embedded into pluronic F127 thermogels as a potential new vehicle for doxycycline intradermal sustained delivery," *AAPS PharmSciTech*, vol. 11, no. 1, pp. 212–20, 2010.
- [67] J. M. Hughes, "Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 118, no. 12, pp. 3072–3072, 1996.

- [68] U. Gbureck, E. Vorndran, F. A. Müller, and J. E. Barralet, “Low temperature direct 3D printed bioceramics and biocomposites as drug release matrices,” *Journal of Controlled Release*, vol. 122, no. 2, pp. 173–180, 2007.
- [69] M. H. Alkhraisat, C. Rueda, J. Cabrejos-Azama, J. Lucas-Aparicio, F. T. Mariño, J. Torres García-Denche, L. B. Jerez, U. Gbureck, and E. L. Cabarcos, “Loading and release of doxycycline hyclate from strontium-substituted calcium phosphate cement,” *Acta Biomaterialia*, vol. 6, no. 4, pp. 1522–1528, 2010.
- [70] N.-T. Dai, M. Williamson, N. Khammo, E. Adams, and A. Coombes, “Composite cell support membranes based on collagen and polycaprolactone for tissue engineering of skin,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 18, pp. 4263–4271, 2004.
- [71] J. Kaloustian, A. M. Pauli, and J. Pastor, “DTA identification of polycaprolactone,” *Journal of thermal analysis*, vol. 37, no. 8, pp. 1767–1773, 1991.
- [72] A. C. Kogawa, “Análise químico-farmacético de hclato de doxiciclina em comprimidos e de seu complexo de inclusão,” *Univerddade Estadual Paulista*, vol. Araquara -SP, 2012.
- [73] H. Adi, P. M. Young, H.-K. Chan, P. Stewart, H. Agus, and D. Traini, “Cospray dried antibiotics for dry powder lung delivery,” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 97, no. 8, pp. 3356–3366, 2008.
- [74] S. Catledge, W. Clem, N. Shrikishen, S. Chowdhury, A. Stanishevsky, M. Koopman, and Y. Vohra, “An electrospun triphasic nanofibrous scaffold for bone tissue engineering,” *Biomedical Materials*, vol. 2, no. 2, p. 142, 2007.
- [75] C. S. Ki, D. H. Baek, K. D. Gang, K. H. Lee, I. C. Um, and Y. H. Park, “Characterization of gelatin nanofiber prepared from formic acid solution,” *Polymer*, vol. 46, no. 14, pp. 5094–5102, 2005.
- [76] M. Mishra and B. Mishra, “Formulation optimization and characterization of spray dried microparticles for inhalation delivery of doxycycline hyclate,” *Yakugaku Zasshi*, vol. 131, no. 12, pp. 1813–25, 2011.
- [77] C. Guang-Mei, Z. Tie-Mei, C. Lei, and Y.-P. H., “Crystallization properties of polycaprolactone induced by different hydroxyapatite nano-particles,” *Asian Journal of Chemistry*, vol. 22, no. 8, pp. 5902–5912, 2010.

- [78] L. Ghasemi-Mobarakeh, M. P. Prabhakaran, M. Morshed, M.-H. Nasr-Esfahani, and S. Ramakrishna, “Electrospun poly ( $\epsilon$ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 34, pp. 4532–4539, 2008.
- [79] W. Brostow, R. Chiu, I. M. Kalogeras, and A. Vassilikou-Dova, “Prediction of glass transition temperatures: Binary blends and copolymers,” *Materials Letters*, vol. 62, no. 17–18, pp. 3152–3155, 2008.
- [80] C. A. de Rezende and E. Duek, “Blendas de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)/poli (ácido láctico): degradação in vitro,” *Polímeros Ciência e Tecnologia*, vol. 13, no. 1, pp. 36–44, 2003.
- [81] J. Ramier, T. Boudier, O. Stoilova, N. Manolova, I. Rashkov, V. Langlois, E. Renard, P. Albanese, and D. Grande, “Biocomposite scaffolds based on electrospun poly(3-hydroxybutyrate) nanofibers and electrosprayed hydroxyapatite nanoparticles for bone tissue engineering applications,” *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, vol. 38, pp. 161–9, 2014.
- [82] D. Kolbuk, P. Sajkiewicz, P. Denis, and E. Choinska, “Investigations of polycaprolactone/gelatin blends in terms of their miscibility,” *Bulletin of the Polish Academy of Sciences: Technical Sciences*, vol. 61, no. 3, pp. 629–632, 2013.
- [83] E. M. Woo, T. K. Mandal, and S. C. Lee, “Relationships between ringed spherulitic morphology and miscibility in blends of poly( $\epsilon$ -caprolactone) with poly(benzyl methacrylate) versus poly(phenyl methacrylate),” *Colloid and Polymer Science*, vol. 278, no. 11, pp. 1032–1042, 2000.
- [84] A. C. Quental, F. P. Carvalho, E. S. Tada, and M. I. Felisberti, “Blendas de PHB e seus copolímeros: Miscibilidade e compatibilidade,” *Química Nova*, vol. 33, no. 2, pp. 438–446, 2010.
- [85] L. Laborclin, “Manual para antibiograma: Difusão em disco ( kirby-bauer),” *Pinharis, PR*, pp. 1–30, 2011.
- [86] G. Tortora, B. Funke, and C. Case, “Microbiology: An introduction, benjamin cummings publishing,” *San Francisco, USA*, p. 88, 2001.
- [87] H. S. I. Nathanael A. J., Mangalaraj D., “Biocompatibility and antimicrobial activity of hydroxyapatite/ titania bio-nanocomposite,” *18TH International Conference on Composite Materials*, Edinburgh, Scotland, 2009.