

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO IMPLANTODONTIA**

**ISIS CARVALHO ENCARNAÇÃO**

**ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E  
MECÂNICAS DE ARCABOUÇO POROSO COMPOSTO  
DE PLGA, CERÂMICA BIFÁSICA E SINVASTATINA DE  
LIBERAÇÃO LENTA PARA ENGENHARIA DE TECIDO  
ÓSSEO**

**Tese de Doutorado**

**Florianópolis  
2016**



**ISIS CARVALHO ENCARNAÇÃO**

**ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E  
MECÂNICAS DE ARCABOUÇO POROSO COMPOSTO  
DE PLGA, CERÂMICA BIFÁSICA E SINVASTATINA DE  
LIBERAÇÃO LENTA PARA ENGENHARIA DE TECIDO  
ÓSSEO**

Tese de Doutorado

Tese apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Odontologia, do Centro de  
Ciências da Saúde, da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina, como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Doutora  
em Odontologia – Área de  
Concentração Implantodontia.

**Professora Orientadora:**  
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro**

**Professor Coorientador:**  
**Prof. Dr. Águedo Aragonez**

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Encarnação, Isis Carvalho

Análise das propriedades físico-químicas e mecânicas de arcabouço poroso composto de plga, cerâmica bifásica e sinvastatina de liberação lenta para engenharia de tecido ósseo / Isis Carvalho Encarnação ; orientadora, Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro ; coorientador, Águedo Aragones. - Florianópolis, SC, 2016.  
168 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós Graduação em Odontologia.

Inclui referências

1. Odontologia. 2. Arcabouço. 3. Sinvastatina. 4. Osso. 5. Polímero. I. Cordeiro, Mabel Mariela Rodríguez. II. Aragones, Águedo. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.



**ISIS CARVALHO ENCARNAÇÃO****ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E MECÂNICAS DE ARCABOUÇO POROSO COMPOSTO DE PLGA, CERÂMICA BIFÁSICA E SINVASTATINA DE LIBERAÇÃO LENTA PARA ENGENHARIA DE TECIDO ÓSSEO**

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do grau de **Doutora em Odontologia**, área de concentração **Implantodontia**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 19 de fevereiro de 2016.

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Izabel Cristina Santos Almeida  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro  
Orientadora

---

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini  
Membro

---

Prof. Dr. Celso Peres Fernandes  
Membro

---

Prof. Dr. Rubens Rodrigues Filho  
Membro

---

Prof. Dr. José Scarso Filho  
Membro

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Betsy Kilian Martins Luiz  
Membro

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ariadne Cristiane Cabral da Cruz  
Suplente



Dedico esta Tese,  
aos meus pais Januário Encarnação Jr e Liliane Carvalho.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me presentear com o convívio de tantas pessoas especiais ao longo desta jornada.

Aos meus pais Januário e Liliane, e às minhas irmãs Lara e Lais por me apoiarem e acreditarem em minhas escolhas. Com o amor de vocês é possível superar qualquer obstáculo!

Aos meus Avós, pelo amor de vocês, pela sua humildade e pelas orações constantes a nossa família.

A Tia Inês, por incentivar e vibrar com cada conquista realizada.

Ao Fernando, pelo amor, compreensão, respeito e apoio constante. Obrigada por fazer de mim uma pessoa melhor a cada dia!

Aos meus Professores do curso de especialização, especialmente ao Prof. Dr. José Scarso Filho, que sempre despertaram em mim a paixão e a dedicação pelo ensino e a busca por excelência na odontologia.

A Universidade Federal de Santa Catarina.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro, pelo seus ensinamentos e pelo seu exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa.

Àqueles que contribuíram diretamente com este trabalho:

- Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmen Maria Oliveira Müller e Prof. Dr. Alfredo Tiburcio Nunes Pires (POLIMAT - UFSC).

- Prof. Dr. Anderson Camargo Moreira, Prof. Dr. Vanderlei Souza, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Denise Prado Kronbauer e Prof. Dr. Celso Peres Fernandes (LMPT/ UFSC).

- Prof. Dr. Aguedo Aragonez (CEPID e CERMAT/UFSC).

- Prof. Dr. Márcio Celso Fredel (CERMAT-UFSC).

- A Eliana Medeiros (LCME-UFSC).

- Ao Darlan Dallacosta e ao Paulo Henrique Torquato (SCiTec).

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFSC, especialmente aos Professores Ricardo de Souza Magini, Antônio Carlos Cardoso e Marco Aurélio Bianchini pelo ensino e pelos momentos compartilhados no CEPID. Por criarem um ambiente de formação de excelência para todos nós que tivemos o privilégio de conviver com vocês.

Aos amigos do CEPID, pelo convívio acadêmico que resultou em grandes amizades, parcerias e respeito ao longo destes 6 anos de pós-graduação.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2D	- Bidimensional
3D	- Tridimensional
ANOVA	- Análise de variância
ASCs	- Células-tronco mesenquimais de origem do tecido adiposo
ASTM	- Sociedade Americana para Teste de Materiais ( <i>American Society for Testing and Materials</i> )
BCP	- Fosfato de cálcio bifásico (do inglês <i>Biphasic Calcium Phosphate</i> )
BMP-2	- Proteína Óssea Morfogenética 2 (do inglês <i>Bone Morphogenetic Protein 2</i> )
BMPs	- Proteínas Ósseas Morfogenéticas (do inglês <i>Bone Morphogenetic Proteins</i> )
BMSCs	- Células-tronco mesenquimais de origem da medula óssea
C	- Carbono
Ca	- Cálcio
Cl	- Cloro
cm	- Centímetro(s)
DSC	- Calorimetria exploratória diferencial
EDS	- Espectroscopia de raios X por dispersão em energia
g	- Grama(s)
h	- Hora(s)
HA	- Hidroxiapatita
HA/βTCP	- Cerâmica bifásica de hidroxiapatita e beta-tricalciofosfato
HMG-CoA	- 3-hidroxi 3-metilglutaril coenzima A
HPLC	- Cromatografia líquida de alta performance (do inglês <i>high performance liquid chromatography</i> )
K	- Potássio
Kg	- Quilograma(s)
L	- Litro(s)
LCME	- Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
LMPT	- Laboratório de Meios Porosos e Propriedades Termofísicas
LT	- Ácido polilático ( <i>Lactide</i> )
M	- Massa molar

m/v	-	Relação massa-volume
mA	-	Miliampére(s)
mD	-	MiliDarcy
MEV	-	Microscopia eletrônica de varredura
mg	-	Miligrama(s)
min	-	Minuto(s)
mL	-	Mililitro(s)
mm	-	Milímetro(s)
mM	-	Milimolar
Mpa	-	MegaPascal(s)
MSC	-	Células-tronco mesenquimais
n	-	Número absoluto
Na	-	Sódio
NIH	-	<i>National Institutes of Health</i>
O	-	Oxigênio
P	-	Valor de p
P	-	Fosfato
PA	-	Pureza absoluta
PBS	-	Tampão salina-fosfato (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
pH	-	Potencial hidrogeniônico
Pixels	-	Do inglês <i>Picture Element</i> , o menor componente da imagem digital em duas dimensões
PLA	-	Ácido polilático
PLGA	-	Poliácido láctico-co-glicólico
PLGA+HA /βTCP	-	Arcabouço poroso composto de PLGA e HA/βTCP
PLGA+HA /βTCP+SIN	-	Arcabouço poroso composto de PLGA e HA/βTCP e sinvastatina
Polimat	-	Laboratório de Materiais Poliméricos
PS	-	Solução aquosa
ROI	-	Região de Interesse (do inglês <i>Region of interest</i> )
S	-	Segundo(s)
SIN	-	Sinvastatina
Tg	-	Temperatura de transição vítrea
TGFβ-1	-	Fator de crescimento transformador beta-1 (do inglês <i>Transforming Growth Factor beta-1</i> )
UFSC	-	Universidade Federal de Santa Catarina
VEGF	-	Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )
Voxels	-	Deriva da combinação Volume e Pixel, um gride



	do espaço tridimensional
vs	- Versus
$\beta$ TCP	- Beta tricálcio fosfato
$\mu$ CT	- Microtomografia computadorizada
$\mu$ L	- Microlitro(s)
$\mu$ m	- Micrômetro(s)



## LISTA DE FIGURAS

FIGURAS DO ARTIGO	PÁGINA
<b>Figura 1:</b> Cilindro do arcabouço poroso de PLGA+HA/ $\beta$ TCP+SIN	91
<b>Figura 2:</b> Curvas de liberação de sinvastatina após 40 dias de “degradação”. A e C em PBS; B e D em PBS com 30% de etanol; E e F comparativo do comportamento da liberação das amostras com 30 e 70% de porosidade em ambos os meios, respectivamente.	92
<b>Figura 3:</b> Imagens da MEV das partículas de cerâmica bifásica e de sacarose. A - Partículas de cerâmica bifásica (50x), B - Superfície da cerâmica bifásica evidenciando a sua rugosidade superficial (2000x), C - EDS pontual na superfície do arcabouço; nas regiões 1 e 4 identificamos composição química compatível com polímero e nas regiões 2 e 3 com partículas de cerâmica bifásica envoltas por polímero devido ao alto conteúdo de Ca e P, D - Partículas de sacarose (50x), E - Superfície do cristal de sacarose evidenciando a sua rugosidade superficial (2000x), F – Arcabouço (50x) com irregularidades na superfície compatíveis com o “negativo” das partículas de sacarose.	94
<b>Figura 4:</b> Imagens da MEV dos arcabouços com 30% de porosidade, antes e após 40 dias de “degradação” e liberação de sinvastatina a 37°C e agitação constante. A, B, C, e D são arcabouços secos sendo, A e B - Arcabouços sem SIN 50x e 2.000x, respectivamente; C e D - Arcabouços com 8% de SIN 50x e 2.000x, respectivamente; E, F, G e H são arcabouços após 40 dias de “degradação” e liberação de sinvastatina em meio com PBS sendo, E e F - Arcabouços sem SIN 50x e 2.000x, respectivamente; G e H - Arcabouços com 8% de SIN 50x e 2.000x, respectivamente; I, J, K e L são arcabouços após 40 dias de “degradação” e liberação de sinvastatina em meio com PBS com 30% de etanol sendo, I e J - Arcabouços sem SIN 50x e 2.000x, respectivamente; K e L - Arcabouços com 8% de SIN 50x e 2.000x, respectivamente.	95
<b>Figura 5:</b> Termograma da calorimetria exploratória	96

diferencial, amostras de cerâmica bifásica pura, PLGA, arcabouço poroso de PLGA+HA/ $\beta$ TCP, PLGA+HA/ $\beta$ TCP+SIN e sinvastatina.

- Figura 6:** Dados obtidos do teste de compressão. 97
- Figura 7:** Seção transversal da  $\mu$ CT de amostras dos grupos (A) arcabouço com 30% de porosidade e sem SIN com resolução em 12,00  $\mu$ m e 1004x1024 pixels, (B) arcabouço com 30% de porosidade e 8% de SIN com resolução em 12,68  $\mu$ m e 1004x1024 pixels, e (C) arcabouço com 70% de porosidade sem SIN com resolução em 14,00  $\mu$ m e 1000x1024 pixels. 99
- Figura 8:** Distribuição de tamanho de poros - Fração do volume poroso 100
- Figura 9:** A e B - Volumes computacionais binários representativos do arcabouço com 70% de porosidade com resolução de 14,00  $\mu$ m e 600x600x400 voxels. C e D rede de poros e gargantas gerada pelo software C3DE. 101
- Figura 10:** A e B - Volumes computacionais binários representativos do arcabouço com 30% de porosidade sem SIN com resolução de 12,00  $\mu$ m e 600x600x399 voxels. C e D rede de poros e gargantas gerada pelo software C3DE. 102

#### FIGURAS DO ANEXO A

- Figura 1:** Ajustes da cinética de liberação de sinvastatina exemplificado no grupo de arcabouço composto poroso com 5% de sinvastatina com 30% de porosidade em PBS. Em A, o gráfico da liberação e, em B, o gráfico dos resíduos. 140
- Figura 2:** Ajustes da cinética de liberação de sinvastatina exemplificado no grupo de arcabouço composto poroso com 5% de SIN com 70% de porosidade em PBS. Em A, o gráfico da liberação e, em B, o gráfico dos resíduos. 141
- Figura 3:** Ajustes da cinética de liberação de sinvastatina exemplificado no grupo de arcabouço composto poroso com 5% de SIN com 30% de porosidade em PBS com 30% de etanol. Em A, o gráfico da liberação e, em B, o gráfico dos resíduos. 142
- Figura 4:** Ajustes da cinética de liberação de 143

sinvastatina exemplificado no grupo de arcabouço composto poroso com 5% de SIN com 70% de porosidade em PBS com 30% de etanol. Em A, o gráfico da liberação e, em B, o gráfico dos resíduos.

**Figura 5:** Termograma das amostras analisadas pelo DSC. A, Sinvastatina pura; B, PLGA puro; C, cerâmica bifásica; D, Arcabouço composto de PLGA e cerâmica bifásica e E, Arcabouço composto de PLGA e cerâmica bifásica e sinvastatina. 144

## FIGURAS DO ANEXO B, MATERIAIS E MÉTODOS DETALHADOS

**Figura 1:** Cilindro do arcabouço poroso de PLGA+HA/ $\beta$ TCP+SIN 153

**Figura 2:** Binarização da imagem de corte transversal da microtomografia ( $\mu$ CT). A) Imagem 2D obtida pela  $\mu$ CT. B) Imagem 2D após a segmentação binária. 154

**Figura 3A:** Ilustração do processo de binarização 2D: Imagem de microtomografia importada e convertida em escala de cinza, com 256 tons de cinza conforme histograma ao lado. 154

**Figura 3B:** Ilustração do processo de binarização 2D. O software permite mesclar as imagens dentro do limiar da escala de cinza selecionado para melhor visualização das fases. Fase PLGA+HA/ $\beta$ TCP em vermelho. Fase porosa em preto. 155

**Figura 3C:** Ilustração do processo de binarização 2D. O software permite inverter as fases dentro do limiar da escala de cinza selecionado para melhor visualização. Fase PLGA+HA/ $\beta$ TCP em escala de cinza. Fase porosa em vermelho. 155

**Figura 3D:** Ilustração do processo de binarização 2D. Após a escolha do limiar da escala de cinza que melhor separa as fases, obtêm-se a binarização 2D apresentada. Fase PLGA+HA/ $\beta$ TCP em preto e fase porosa em branco. 156

**Figura 3E:** Ilustração do processo de binarização 2D. Após a finalização da binarização 2D, a região de interesse foi definida. As bordas laterais foram recortadas devido a interferência da área externa na amostra com a fase porosa. Estes dados são utilizados 156

para o cálculo de porosidade.

- Figura 4A:** Ilustração do processo de binarização 3D. 157  
O conjunto de imagens da amostra é importada ao software. Neste caso, o software suportou uma renderização de 401 cortes consecutivos para obtenção da imagem 3D.
- Figura 4B:** Ilustração do processo de binarização 3D. 157  
Imagem 3D convertida em escala de cinza.
- Figura 4C:** Ilustração do processo de binarização 3D. 158  
Definição da ROI.
- Figura 4D:** Ilustração do processo de binarização 3D. 158  
Após o recorte da imagem 3D, obtêm-se um cubo com  $600 \times 600 \times 400$  voxels<sup>3</sup>.
- Figura 4E:** Ilustração do processo de binarização 3D. 159  
A imagem 3D foi binarizada utilizando-se o valor médio do limiar da escala de cinza obtido na binarização 2D.
- Figura 4F:** Ilustração do processo de binarização 3D. 159  
O software permitiu mesclar as imagens 3D dentro do limiar da escala de cinza selecionado. Isso foi utilizado para melhor visualização das fases e confirmação da escolha correta do limiar definido em 2D. Fase PLGA+HA/ $\beta$ TCP em vermelho. Fase porosa em preto.
- Figura 4G:** Ilustração do processo de binarização 3D. 160  
O software permitiu inverter as fases na imagem 3D. Isso foi utilizado para melhor visualização das fases e confirmação da escolha correta do limiar definido em 2D. PLGA+HA/ $\beta$ TCP em escala de cinza. Fase porosa em vermelho.
- Figura 4H:** Ilustração do processo de binarização 3D. 160  
Obtenção da binarização 3D.
- Figura 4I:** Ilustração do processo de binarização 3D. 161  
Cálculo da porosidade da imagem 3D (48,24%).
- Figura 4J:** Ilustração do processo de binarização 3D. 161  
Gráfico da fração porosa da imagem 3D.
- Figura 5A:** Imagem da reconstrução 3D binarizada no software C3DE. 162
- Figura 5B:** Imagem da reconstrução 3D binarizada no software C3DE. 162
- Figura 5C:** Rede de poros e gargantas em 3D. Esferas da mesma cor apresentam o mesmo raio. As gargantas 163

estão representadas em verde.

**Figura 5D:** Rede de poros e gargantas em 3D. A 163  
mesma amostra vista em outro ângulo.





## LISTA DE TABELAS

TABELAS DO ARTIGO	PÁGINA
<b>Tabela 1:</b> Grupos experimentais.	103
<b>Tabela 2:</b> Perfil de liberação de sinvastatina, em PBS, das amostras submetidas aos modelo cinético de Korsmeyer.	103
<b>Tabela 3:</b> Perfil de liberação de sinvastatina, em PBS com 30% de etanol, das amostras submetidas ao modelo cinético de Peppas & Sahlim.	103
<b>Tabela 4:</b> Perda de massa após o período de liberação, em PBS e em PBS com 30% de etanol, observada nos grupos de arcabouço composto com 70% de porosidade.	104
<b>Tabela 5:</b> Estatísticas descritivas e ANOVA para o diâmetro dos macroporos.	104
<b>Tabela 6:</b> Tabela comparativa da ocorrência dos formatos dos macroporos nos grupo experimentais.	105
<b>Tabela 7:</b> Tabela comparativa da ocorrência dos poros abertos e fechados nos grupo experimentais..	106
<b>Tabela 8:</b> Tabela comparativa dos diâmetros dos macroporos em formato de sacarose e esféricos.	107
<b>Tabela 9:</b> Estatísticas descritivas e ANOVA para o diâmetro das microirregularidades.	108
<b>Tabela 10:</b> Porosidade média dos grupos, obtida pelo Imago 2D.	108
<b>Tabela 11:</b> Número de poros e número de gargantas obtidos pelo software C3DE.	109
<b>Tabela 12:</b> Estatísticas descritivas e ANOVA para raio implícito.	109
<b>Tabela 13:</b> Estatísticas descritivas e ANOVA para número de gargantas.	110
<b>Tabela 14:</b> Estatísticas descritivas e ANOVA para raio implícito dos poros com nenhuma rede de gargantas.	110
<b>Tabela 15:</b> Estatísticas descritivas e ANOVA para raio implícito da rede de gargantas.	111
<b>Tabela 16:</b> Permeabilidade e fluxo de fluidos.	111

## TABELAS DO ANEXO A

<b>Tabela 1:</b> Dados do início da liberação de sinvastatina em PBS e PBS com 30% de etanol.	133
<b>Tabela 2:</b> Dados da liberação, em massa (mg) de sinvastatina em 50ml, nas amostras de arcabouço composto poroso de 30% de porosidade com 2, 5 e 8% de sinvastatina.	134
<b>Tabela 3:</b> Dados da liberação, em massa (mg) de sinvastatina em 50ml, nas amostras de arcabouço composto poroso e 70% de porosidade com 2, 5 e 8% de sinvastatina.	135
<b>Tabela 4:</b> Estatísticas descritivas das partículas de cerâmica bifásica avaliadas nas imagens obtidas pela MEV.	135
<b>Tabela 5:</b> Estatísticas descritivas dos cristais de sacarose avaliadas nas imagens obtidas pela MEV.	136
<b>Tabela 6:</b> Análise comparativa do módulo de elasticidade.	136
<b>Tabela 7:</b> Análise comparativa da deformação considerada 20% de deformação (mm).	136
<b>Tabela 8:</b> Análise comparativa da força compressiva com 20% de deformação (MPa).	137
<b>Tabela 9:</b> Análise comparativa da tensão obtida com 20% de deformação (MPa).	137
<b>Tabela 10:</b> Análise comparativa do módulo de elasticidade considerando 20% de deformação (MPa).	138
<b>Tabela 11:</b> Região de interesse (ROI) selecionada para análise.	138
<b>Tabela 12:</b> Correlação entre raio implícito e número de gargantas em cada grupo.	138
<b>Tabela 13:</b> Contagem do número de poros que não tem nenhuma rede de gargantas.	149

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	25
RESUMO.....	27
ABSTRACT.....	29
<b>CAPÍTULO II</b> .....	31
INTRODUÇÃO.....	33
OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS.....	41
<b>CAPÍTULO III</b> .....	43
VERSÃO DO ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	45
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	113
CONCLUSÕES.....	115
<b>CAPÍTULO V</b> .....	117
REFERÊNCIAS.....	119
<b>CAPÍTULO VI</b> .....	131
ANEXO A - TABELAS DE DADOS NÃO APRESENTADOS NO ARTIGO.....	133
ANEXO B - MATERIAIS E MÉTODOS DETALHADO.....	147
ANEXO C - TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O DOUTORADO.....	165



# CAPÍTULO I



ENCARNAÇÃO, Isis Carvalho. **Análise das propriedades físico-químicas e mecânicas de arcabouço poroso composto de PLGA, cerâmica bifásica e sinvastatina de liberação lenta para engenharia de tecido ósseo.** 2016. 168p. Tese (Doutorado em Odontologia – Área de Concentração em Implantodontia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

## RESUMO

Este estudo avaliou, *in vitro*, a liberação de sinvastatina em um arcabouço poroso “inteligente”, elaborado para engenharia de tecido ósseo, composto de PLGA e cerâmica bifásica, além das propriedades físico-químicas e mecânicas deste arcabouço. Foram obtidas amostras com 30 e 70% de porosidade sem sinvastatina e com 2, 5 e 8% de sinvastatina pela técnica de evaporação do solvente e lixiviação de partículas de sacarose. A degradação do arcabouço e a liberação de sinvastatina a partir destes arcabouços foi avaliada em meio contendo PBS e PBS com 30% de etanol. Os arcabouços foram analisados por microscopia eletrônica de varredura e microtomografia de Raios-X para caracterização morfológica 2D e 3D de sua porosidade, avaliação da interconectividade dos poros e permeabilidade de fluidos com auxílio dos softwares ImageJ, Imago e C3DE. O comportamento mecânico do arcabouço foi avaliado pelo teste de resistência à compressão e, sua caracterização química, foi determinada por meio de ensaio de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e por espectroscopia de Raios-X por dispersão em energia. Como resultado, observou-se uma liberação lenta e prolongada de sinvastatina a partir do arcabouço. Em PBS, a liberação seguiu o modelo de Korsmeyer de cinética por meio do qual se observou um predomínio de transporte Caso II para amostras com 30% de porosidade e um comportamento anômalo das amostras com 70% de porosidade. Em PBS com 30% de etanol, a liberação de sinvastatina seguiu o modelo de Peppas & Sahlin de cinética. Neste, pode-se observar que os processos difusionais prevaleceram sobre os processos de relaxação das cadeias poliméricas para a liberação de sinvastatina, ocorrendo de maneira mais intensa nas amostras com 70% de porosidade. Os arcabouços apresentaram tanto poros esféricos quanto em formato de cristais de sacarose que resultaram em uma porosidade heterogênea, com predomínio de poros abertos, permitindo sua interconectividade. A interconectividade dos poros e a permeabilidade

do arcabouço foi maior nas amostras em que o arcabouço possuía 70% de porosidade. A incorporação de sinvastatina ao arcabouço e o aumento de sua porosidade não influenciaram significativamente as propriedades mecânicas estudadas. Pode-se concluir que o arcabouço estudado apresentou uma liberação lenta, gradual e prolongada de sinvastatina, com características físico-químicas e mecânicas satisfatórias, sendo promissor para a regeneração óssea.

**Palavras-Chave:** Sinvastatina, Arcabouço, Osseocondução, Osso, Polímero, Cerâmica bifásica.



ENCARNAÇÃO, Isis Carvalho. **Analysis of physicochemical and mechanical properties of porous scaffold composed of PLGA, biphasic ceramic and simvastatin slow release for bone tissue engineering.** 2016. 168p. Thesis (PhD in Dentistry – Implant Dentistry) – Graduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate, *in vitro*, the simvastatin release of a porous "smart" scaffold composed by PLGA and biphasic ceramics and developed for bone tissue engineering. The physicochemical and mechanical properties of this scaffold were also evaluated. Samples with 30 and 70% porosity were obtained without simvastatin and with 2, 5 and 8% of simvastatin through the solvent evaporation technique and leaching sucrose particles. Scaffold degradation and simvastatin release were evaluated in PBS and in PBS with 30% ethanol media. Scaffolds were analyzed by scanning electron microscopy and microtomography for 2D and 3D morphological characterization of the porosity, interconnectivity and permeability of the fluids with ImageJ, Imago and C3DE softwares. The characterization was evaluated for compressive strength and chemical characterization by differential scanning calorimetry (DSC) and X-Ray spectroscopy by energy dispersion. Slow and prolonged release of simvastatin was observed from the scaffold. In PBS medium, the release followed the Korsmeyer's model of kinetics where there was predominance of transport Case II for the 30% porosity group and anomalous behavior in the group with 70% porosity. In PBS with 30% ethanol medium, the release followed the Peppas & Sahlin' kinetics model where the diffusional processes prevail on the relaxation processes of polymer chains for the release of simvastatin, and this process was more intense the group with 70% porosity. The release was also influenced by the slow degradation of the scaffolds due to strong chemical interaction between simvastatin and the polymer observed by DSC. The scaffolds presented spherical pores and sucrose-crystal format pores that resulted in a heterogeneous porosity, with a predominance of open pores, ensuring interconnectivity. The highest interconnectivity of the pores and permeability were observed in the scaffolds with 70% porosity. The addition of simvastatin to the scaffolds and the increase of the porosity did not influence the mechanical properties studied. The

scaffolds presented a slow, gradual and prolonged release of simvastatin, with satisfactory physicochemical and mechanical properties and may be promising for bone regeneration.

**Key-Words:** Simvastatin, Scaffold, Osseococonduction, Bone, Polymer, Biphasic ceramic.

## CAPÍTULO II



## <sup>1</sup>INTRODUÇÃO

A reabsorção e remodelação óssea alveolar que ocorrem em áreas edêntulas após exodontias, infecções ou traumas podem causar limitações dimensionais para a reabilitação com o uso de implantes osseointegráveis. Para a reconstrução do rebordo alveolar edêntulo, a Odontologia pode lançar mão de enxertos ósseos. No entanto, apesar de sua alta previsibilidade (CHIAPASCO; CASENTINI; ZANIBONI, 2009), o uso de enxertos ósseos autógenos para estas reconstruções apresenta desvantagens com relação à quantidade limitada de osso disponível nas áreas doadoras, à morbidade envolvida e, ainda, às complicações associadas a sua remoção (MCALLISTER; HAGHGAT, 2007).

A busca por substitutos ósseos que possam atuar de maneira semelhante ao osso autógeno, promovendo ao mesmo tempo osteocondução, osteoindução e osteogênese, fomenta pesquisas na área da engenharia tecidual. Os resultados vêm se mostrando promissores devido à associação de novas tecnologias de arcabouços, moléculas indutoras e células-tronco mesenquimais (MSCs) (HAMMERLE; KARRING, 1998; BUSER et al., 1999; CORDEIRO et al., 2008; SAKAI et al., 2010; ZHOU et al., 2010; WADAGAKI et al., 2011; QI et al., 2013;).

Os arcabouços osseocondutores são biomateriais porosos que formam um componente tridimensional, um dos focos da engenharia tecidual. Eles permitem uma interação complexa célula-célula e células-microambiente e dirigem a formação e regeneração tecidual (KIM et al., 2014). Para exercer esse papel, devem ser biocompatíveis e, além disso, devem permitir a adesão, migração e proliferação celular, facilitando a invasão vascular, bem como devem dar suporte à angiogênese.

Da mesma maneira, os arcabouços devem possuir propriedades mecânicas semelhantes ao tecido ósseo, com uma taxa de degradação controlada. Seu potencial para permitir a sinalização bioquímica intercelular e induzir a atração, crescimento e diferenciação de células hospedeiras do tecido adjacente é cada vez mais explorado como uma importante ferramenta para a osseoindução (THEVENOT et al., 2010; NAIR et al., 2011). Por essas razões, suas propriedades físico-químicas, topografia de superfície, arquitetura, porosidade, interconectividade dos poros, dureza, elasticidade e sua degradação, necessitam ser minuciosamente trabalhadas a fim de se obter um arcabouço eficiente

---

<sup>1</sup> Baseado na NBR 10520: 2002 da ABNT e as referências citadas neste capítulo estão na página 118.

(EBERLI et al., 2009; SAITO et al., 2010; WAGONER JOHNSON; HERSCHLER, 2011).

Fosfatos de cálcio são comumente utilizados na área médica devido à sua biocompatibilidade, segurança, disponibilidade ilimitada e custo-benefício (VALLET-REGI, 2001). A hidroxiapatita (HA)  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  é o principal componente inorgânico da matriz óssea humana (DORAIRAJAN; REDDY; KRIKLER, 2005). Sua forma sintética é utilizada para reparar defeitos ósseos devido a sua excelente biocompatibilidade, propriedades osteocondutoras (ISHIHARA et al., 1992; WAGONER JOHNSON; HERSCHLER, 2011) e degradação lenta (BOULER; LEGEROS; DACULSI, 2000). No entanto, apresenta-se como um material frágil e de baixa estabilidade mecânica (LOPES; MONTEIRO; SANTOS, 1999). Uma combinação de duas formas primárias de fosfato de cálcio sintético vem sendo estudada devido às vantagens da sua associação, permitindo manipulação da velocidade de degradação e de outras propriedades do arcabouço.

O termo fosfato de cálcio bifásico (BCP) foi utilizado pela primeira vez por Ellinger et al. (1986) para descrever uma biocerâmica que consistia em uma mistura de hidroxiapatita (HA) e fosfato tricálcio  $\beta$  ( $\beta$ TCP), denominado  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (ELLINGER; NERY; LYNCH, 1986). Os primeiros estudos de Legeros et al. (1990) e Daculsi (1998) sobre BCP com diferentes proporções de HA e  $\beta$ TCP, mostraram que sua bioatividade pode ser controlada por meio da manipulação destes índices (LEGEROS; DACULSI, 1990; DACULSI, 1998).

Esse conceito tem como base o equilíbrio entre a HA (fase mais estável) e o  $\beta$ TCP (fase mais solúvel). Enquanto a HA é altamente inerte e considerada relativamente não degradável, pois mantém o volume do biomaterial por períodos prolongados, a rápida reabsorção do  $\beta$ TCP permite a sua substituição por novo tecido ósseo mais rapidamente (LE GUEHENNEC et al., 2005; LEE et al., 2012). O ambiente rico em cálcio e fosfato (íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ ), devido à alta solubilidade e taxa de degradação do  $\beta$ TCP, é mais favorável à osteogênese (FRAYSSINT et al., 1993; YUAN et al., 1998).

Uma combinação na proporção de 60 para 40% de HA e  $\beta$ TCP, associada a MSCs, mostrou indução de formação de osso em defeitos ósseos (KADIYALA; JAISWAL; BRUDER, 1997; ARINZEH et al., 2003). Segundo Arinzeh et al. (2005), cerâmicas bifásicas contendo maiores proporções de  $\beta$ TCP induzem maior diferenciação de MSCs para a formação óssea. A proporção de 20 para 80% de HA e  $\beta$ TCP obteve melhor desempenho na formação óssea *in vitro* e *in vivo* (ARINZEH et al., 2005).

No entanto, os materiais sintéticos à base de Ca e P estão envolvidos com algumas desvantagens: fracas propriedades mecânicas, produção de baixo rendimento, falta da fase orgânica, presença de impurezas, tamanho e forma das partículas heterogêneas e dificuldade no controle da porosidade (DOROZHKIN, 2010). Conforme aumenta-se o conteúdo de  $\beta$ TCP, há prejuízo na manutenção da estrutura tridimensional a curto prazo devido ao comprometimento de suas propriedades mecânicas (DOROZHKIN, 2010).

Clinicamente, cerâmicas bifásicas com 60/40 de HA e  $\beta$ TCP têm uma taxa de reabsorção de 50% entre 1 e 2 anos de implantação (DACULSI, 1998), considerada lenta. Um dos fatores limitantes para o uso de cerâmicas bifásicas é sua baixa resistência à aplicação de tensões (RAMAKRISHNA; WINTERMANTEL; LEONG, 2001; REZWAN et al., 2006).

O desenvolvimento de arcabouços visa obter estruturas com propriedades mecânicas semelhantes às do osso hospedeiro, de acordo com as qualidade ósseas da área receptora. A associação de biomateriais possibilita a soma de características favoráveis para a elaboração de arcabouços biomiméticos, ou seja, com características mais próximas ao tecido ósseo. Polímeros sintéticos absorvíveis, como policaprolactona (PCL), ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA), e seus copolímeros, são fáceis de se processar sob a forma porosa empregando-se agentes porogênicos e diversas metodologias (ALMIRALL et al., 2004; BAO et al., 2011; BAO; FRANCO; LEE, 2011).

Esses polímeros possuem boas propriedades mecânicas, baixa imunogenicidade e toxicidade e uma taxa de degradação ajustável (RANI; AGARWAL; NEGI, 2011). O copolímero de ácido polilático coglicólico (PLGA) é amplamente pesquisado como arcabouço pela engenharia de tecido ósseo (LANSMAN et al., 2006; GOMEZ et al., 2006; LEBOURG; SUAY ANTON; GOMEZ RIBELLES, 2010; CIAPETTI; GRANCHI; BALDINI, 2012), e produz arcabouços promissores devido às suas excelentes propriedades físico-químicas e biológicas, biocompatibilidade, fácil absorção, controle de macro e microestrutura. Apesar de não apresentar bioatividade intrínseca para ossoindução (LEBOURG; SUAY ANTON; GOMEZ RIBELLES, 2010) permite a incorporação e liberação de proteínas com substantividade (LANSMAN et al., 2006; GOMEZ et al., 2006). Seu mecanismo de degradação é extremamente útil para a liberação controlada de moléculas sinalizadoras ou fatores de crescimento (CIAPETTI; GRANCHI; BALDINI, 2012). Entretanto, este copolímero está relacionado à baixa adesão e proliferação celular devido ao caráter hidrofóbico de sua

superfície (SHEN et al., 2011; LIU et al., 2011) e, ainda, à sua baixa resistência mecânica (JIANG et al., 2013).

A associação do PLGA às cerâmicas bifásicas, ou com HA e  $\beta$ TCP isoladamente, tem sido proposta e os resultados apresentam perspectivas interessantes (VERHEYEN et al., 1992; WEI; MA, 2004; GUAN; DAVIES, 2004; ZHANG et al., 2008; HUANG et al., 2008; KIM et al., 2012; TAYTON et al., 2014; FISHER et al., 2015; ENCARNAÇÃO et al., 2016; ROY et al., 2016). Os estudos mostraram que esta associação promove melhora das características mecânicas e do processo de degradação do arcabouço (ZHANG et al., 2008; FISHER et al., 2015; HUANG et al., 2008; WEI; MA, 2004; VERHEYEN et al., 1992; GUAN; DAVIES, 2004; TAYTON et al., 2014; ROY et al., 2016). Dessa maneira, combina-se, no mesmo material, outras características positivas como a liberação de íons cálcio e fosfato e a possibilidade de se incorporar substâncias bioativas para formar um sistema de liberação controlada para a osseointegração (YANG et al., 2006; BOERCKEL et al., 2011).

As proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) são a família mais importante de fatores de crescimento para a regeneração óssea e a substância bioativa mais estudada para essa finalidade. Possuem uma grande variedade de atividades biológicas, incluindo a indução de tecidos cartilaginoso e ósseo, diferenciação celular, proliferação celular e apoptose (JANSEN et al., 2005).

No entanto, deve-se assumir cautela quanto ao emprego de BMPs. Os riscos associados e altos custos das terapias gênicas e fatores de crescimento são alguns limitantes no seu uso. Tais fatores se somam à falta de controle da atuação dos fatores de crescimento devido à sua cinética de liberação complexa, uso de dosagens não fisiológicas, duração da expressão dos genes, imunogenicidade e segurança a longo prazo (BODEN, 1999; DOLL et al., 2001; RIOS et al., 2001; CASAGRANDE et al., 2011).

Por esses motivos, existe ainda a tentativa de se encontrarem outros compostos farmacológicos que possam regular favoravelmente os fatores de crescimento intrínsecos. Essas substâncias devem ser capazes de estimular a osteogênese e devem permitir a associação com substitutos osteocondutores. Por conseguinte, devem produzir arcabouços “inteligentes” capazes de reduzir os riscos e os custos dessas terapias, sem prejuízo de efetividade para a regeneração óssea.

Devido às razões apontadas, propõe-se o uso da sinvastatina. As estatinas são potentes redutores da síntese do colesterol, sendo amplamente utilizadas para prevenir doenças coronarianas e aterosclerose. Possuem capacidade de inibir a coenzima A hidroxil-



metilglutaril redutase (HMG-CoA) que está envolvida na síntese do colesterol endógeno, bloqueando a conversão do HMG-CoA em mevalonato (ZHANG; DRICU; SJÖVALL, 1997). Sua atuação sobre o tecido ósseo foi primeiramente descrita por Mundy et al. (1999). Esses pesquisadores demonstraram que as estatinas estimulam a formação óssea em roedores e são capazes de aumentar o volume de novo osso em culturas de células derivadas da calvária de camundongos. Seu efeito foi descrito como aumento do nível de expressão de BMPs nas células ósseas e estimulação da formação de osso (MUNDY et al., 1999; SUGIYAMA et al., 2000; OHNAKA et al., 2001; MAEDA; KAWANE; HORIUCHI, 2003; MAEDA et al., 2004; MACIEL-OLIVEIRA; BRADASCHIA-CORREA; ARANA-CHAVEZ, 2011; GENTILE et al., 2014; GENTILE et al., 2016).

Yamashita et al. (2010) demonstraram que a sinvastatina inibe a diferenciação de osteoclastos induzida por BMPs por meio da regulação da via RANKL/BMP-a- MAPK/AKT/Src, sugerindo um potencial para melhorar problemas relacionados à reabsorção excessiva de osso (YAMASHITA et al., 2010).

Entretanto, a administração sistêmica de sinvastatina apresentou resultados insignificantes sobre a formação óssea (HSIA; MORSE; LEVIN, 2002; D VON STECHOW et al., 2003). O emprego de doses maiores está associado a efeitos colaterais significativos que inviabilizam o seu uso para esta finalidade (TODD; GOA, 1990).

Diferente da indicação sistêmica, a aplicação de sinvastatina diretamente no local desejado mostrou resultados positivos para a formação óssea tanto *in vitro* como *in vivo* (GENTILE et al., 2016). A sinvastatina atua sobre a formação de osso estimulando a diferenciação de células-tronco em osteoblastos. Mostra também algum efeito inibitório sobre o potencial proliferativo de células-tronco mesenquimais da medula óssea (BMSCs) (BAEK et al., 2005).

Além de aumentar a expressão de BMPs, a sinvastatina também melhora acentuadamente a expressão de genes para VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) em células da linhagem osteoblástica. Dessa forma, BMPs e VEGF interagem para estimular a formação óssea pelos osteoblastos (DECKERS et al., 2002; MAEDA; KAWANE; HORIUCHI, 2003). Liu *et al.* (2008), também observaram, em ratos, aumento na expressão de fator de crescimento transformador beta 1 (TGF $\beta$ -1), proteína óssea morfogenética 2 (BMP-2) e VEGF, aumento temporal na expressão de marcadores osteogênicos como a fosfatase alcalina e mineralização, assim como verificaram um aumento da expressão de sialoproteína óssea, osteocalcina e colágeno tipo I após a

administração local de sinvastatina, uma semana depois da extração de dentes (LIU et al., 2008).

O aumento da expressão desses fatores de crescimento é semelhante ao que ocorre no processo de reparo. A interação de fatores de crescimento é benéfica, pois regula o processo de reparo e também tem sido objeto de estudos na engenharia tecidual. Essas pesquisas apontam que a associação de fatores de crescimento mimetiza os eventos moleculares endógenos (MAEDA; KAWANE; HORIUCHI, 2003; TAKENAKA et al., 2003; WALTER; ZEIHNER; DIMMELER, 2004; UNGER et al., 2010).

A sinvastatina, assim como os fatores de crescimento, requerem um meio adequado para controlar a sua liberação local para a formação óssea. Altas concentrações podem provocar morte celular e respostas inflamatórias exacerbadas (KUPCSIK et al., 2009). Estudos recentes testaram o efeito da aplicação local de sinvastatina associada a diferentes carreadores, como a gelatina de polietileno glicol (OZEC et al., 2007), ácido polilático coglicólico (HUANG et al., 2012), nanopartículas adicionadas ao PLGA (HO et al., 2011), microesferas de PLGA (NATH et al., 2013), micropartículas de PLGA e quitosana (NANDAGIRI et al., 2012; GENTILE et al., 2014; GENTILE et al., 2016), PLGA+HA/ $\beta$ TCP (HAN et al., 2014; ZHANG et al., 2015; ENCARNAÇÃO et al., 2016), PLGA associado a cerâmica bifásica e zircônia, (SADIASA; KIM; LEE, 2013) sulfato de cálcio (NYAN et al., 2007), fosfato de cálcio (MONTAZEROLGHAEN; ENGQVIST; KARLSSON, 2013) e  $\beta$ TCP (NYAN et al., 2009). Esses autores têm demonstrado o potencial em aumentar a formação óssea e possuem graus variados de sucesso (PARK, 2009). Apesar disso, como se pode observar, não há um consenso sobre qual o carreador ideal para a sinvastatina empregada nos defeitos ósseos e novos estudos são necessários.

Para se obter a regeneração óssea desejada, é extremamente importante ter arcabouços com microporosidades (diâmetro de poro  $< 10\mu\text{m}$ ) e macroporosidades interconectadas (poros de diâmetro  $> 10\mu\text{m}$ ). Isso permitirá a invasão por células ósseas e vasos sanguíneos, e, por consequência, a reabsorção do arcabouço e formação de novo tecido ósseo (KARAGEORGIU; KAPLAN, 2005; HING, 2005; BOHNER et al., 2011).

A taxa de liberação controlada do fármaco e a taxa de crescimento de tecido nos arcabouços é influenciada por diversas propriedades. Pode-se citar o tamanho do poro ou a densidade da porosidade, a composição do polímero, a hidrofobicidade, a cristalinidade e a degradabilidade (NUTTELMAN; TRIPODI; ANSETH,

2006; TACHIBANA et al., 2006). Yazawa et al. (2005) relataram uma dose ótima de sinvastatina de  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$ M para a máxima proliferação celular usando as células do ligamento periodontal (YAZAWA et al., 2005).

A incorporação de substâncias aos arcabouços de PLGA permite que, durante a sua degradação em ácido lático, sejam liberadas moléculas de sinvastatina por até 6 semanas, *in vitro* (WHANG et al., 2005). A administração local de 1,2 mg de sinvastatina, carregada por PLGA, promoveu a formação de novo osso e o reparo de alvéolos de ratos, bem como manteve a altura residual do rebordo alveolar (WU et al., 2008). Microesferas de PLGA mostraram encapsulação maior que 90% da sinvastatina, com liberação contínua do fármaco por mais de 3 semanas *in vitro*, associado ao aumento na proliferação dos osteoblastos e aumento da expressão dos marcadores ósseos (NATH et al., 2013). Da mesma maneira, resultados favoráveis à formação de tecido ósseo também foram demonstrados em diversos outros estudos (OZEÇ et al., 2007; NYAN et al., 2007; WU et al., 2008; NYAN et al., 2009; PARK, 2009; HO et al., 2011).

A associação de células-tronco, arcabouços porosos e sinvastatina também tem sido investigada por vários autores. Isso aponta o grande potencial do emprego de sinvastatina para o tratamento de fraturas e defeitos ósseos. Qi *et al.* (2013), utilizaram BMSCs em arcabouços de sulfato de cálcio carregados de sinvastatina. Os pesquisadores verificaram efeito osteogênico *in vitro* e formação óssea *in vivo*. Os arcabouços de nano e microfibras biodegradáveis da PLGA promoveram a liberação lenta e constante de sinvastatina com sucesso na diferenciação das BMSCs em osteoblastos, *in vitro* e *in vivo*. Foi demonstrada a viabilidade deste arcabouço para aplicação na engenharia de tecido ósseo (WADAGAKI et al., 2011).

Além das BMSCs, o uso de células-tronco mesenquimais de origem do tecido adiposo (ASCs), estimuladas por sinvastatina, também foram testadas com plasma rico em plaquetas, *in vitro* e *in vivo*, em defeitos ósseos na calota de camundongos. Os resultados indicam que a sinvastatina, em determinadas concentrações, pode ser utilizada para promover osteogênese quando associada ao plasma rico em plaquetas e a células tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo (ZHOU et al., 2010).

Frente aos resultados promissores que diversos pesquisadores vêm observando, especialmente em relação à associação de arcabouços porosos compostos por PLGA e cerâmicas bifásicas no reparo ósseo, como uma alternativa aos enxertos ósseos autógenos, propõe-se neste

estudo uma liberação lenta e controlada de sinvastatina incorporada ao arcabouço. Isso visa otimizar a eficácia deste material, tornando-a biodisponível gradativamente, acelerando o processo de reparo, uma vez que suas propriedades osteoindutoras poderiam amplificar os efeitos benéficos deste arcabouço. Para isso, é necessário que a degradação do arcabouço permita a liberação lenta e gradual da sinvastatina com uma concentração que favoreça o reparo ósseo, sem exacerbar a resposta inflamatória. Portanto, este estudo objetiva analisar, *in vitro*, a liberação de sinvastatina em um arcabouço poroso “inteligente”, elaborado para engenharia de tecido ósseo, composto de PLGA e cerâmica bifásica, além das propriedades físico-químicas e mecânicas deste arcabouço.

## OBJETIVO GERAL

Analisar, *in vitro*, a liberação de sinvastatina em um arcabouço poroso “inteligente”, elaborado para engenharia de tecido ósseo, composto de PLGA e cerâmica bifásica, assim como as suas propriedades.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar a liberação de sinvastatina em um arcabouço poroso composto por PLGA e cerâmica bifásica;
2. Avaliar a degradação do arcabouço poroso composto por PLGA e cerâmica bifásica;
3. Caracterizar morfologicamente o arcabouço quanto a sua porosidade e interconectividade dos poros;
4. Caracterizar a permeabilidade do arcabouço;
5. Avaliar as propriedades físico-químicas do arcabouço;
6. Avaliar as propriedades mecânicas de compressão do arcabouço.



# CAPÍTULO III





## **VERSÃO DO ARTIGO EM PORTUGUÊS**

O artigo a seguir foi formatado de acordo com as Normas para Elaboração de Artigos do periódico *Journal of Clinical Periodontology*.



## ARCABOUÇO POROSO COMPOSTO DE PLGA, CERÂMICA BIFÁSICA E SINVASTATINA DE LIBERAÇÃO LENTA PARA ENGENHARIA DE TECIDO ÓSSEO

Isis Carvalho Encarnação<sup>(1)</sup>  
Águedo Aragonez<sup>(2)</sup>  
Anderson Camargo Moreira<sup>(3)</sup>  
Celso Peres Fernandes<sup>(4)</sup>  
Marcio Celso Fredel<sup>(5)</sup>  
Carmen Maria Oliveira Müller<sup>(6)</sup>  
Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro<sup>(7)</sup>

<sup>(1)</sup>Mestre e Doutoranda em Implantodontia no Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis – Santa Catarina – Brasil. (isisencarnacao@hotmail.com)

<sup>(2)</sup>Diretor e Pesquisador do Biocentro - Florianópolis – Santa Catarina – Brasil. (aguedo@terra.com.br)

<sup>(3)</sup>Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais na Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis – Santa Catarina – Brasil. (anderson@lmpt.ufsc.br)

<sup>(4)</sup>Professor Doutor do Departamento de Engenharia Mecânica na Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis – Santa Catarina – Brasil. (celso@lmpt.ufsc.br)

<sup>(5)</sup> Professor Doutor do Departamento de Engenharia Mecânica na Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis – Santa Catarina – Brasil. (m.fredel@ufsc.br)

<sup>(6)</sup>Professora Doutora do Departamento de Ciências e Tecnologia dos Alimentos na Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis – Santa Catarina – Brasil. (carmenmull@gmail.com)

<sup>(7)</sup>Professora Doutora do Departamento de Ciências Morfológicas na Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis – Santa Catarina – Brasil. (m.cordeiro@ufsc.br)

**Título resumido:** Arcabouço para liberação lenta de sinvastatina.

**Palavras-Chave:** Sinvastatina, Arcabouço, Osseocondução, Osso, Polímero, Cerâmica bifásica.



## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar, *in vitro*, a liberação de sinvastatina em um arcabouço poroso composto de PLGA e cerâmica bifásica, e suas propriedades físico-químicas e mecânicas.

**Materiais e métodos:** Foram obtidas amostras com 30 e 70% de porosidade e com 0, 2, 5 e 8% de sinvastatina. A degradação do arcabouço e a liberação de sinvastatina foi avaliada em meio contendo PBS e PBS com 30% de etanol. Os arcabouços foram analisados por microscopia eletrônica de varredura e microtomografia computadorizada de Raios-X. A sua análise mecânica foi avaliada pela resistência a compressão e, a análise físico-química, pelo ensaio de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e por espectroscopia de raios x por dispersão em energia.

**Resultados:** Foi observada liberação lenta e prolongada de sinvastatina. Em PBS, a liberação seguiu o Modelo de Korsmeyer de cinética e, em PBS com 30% de etanol, seguiu o Modelo de Peppas & Sahlin. Observou-se forte interação química entre a sinvastatina e o polímero. Os arcabouços apresentaram predomínio de poros abertos. A permeabilidade e interconectividade foi maior no grupo com 70% de porosidade. Não foram observadas alterações nas propriedades mecânicas.

**Conclusões:** Este arcabouço apresentou liberação lenta e prolongada de sinvastatina e pode ser promissor para a regeneração óssea.



## RELEVÂNCIA CLÍNICA

As propriedades osseointegradoras da sinvastatina podem otimizar a eficácia de arcabouços porosos compostos por polímeros e cerâmicas bifásicas para acelerar o processo de reparo ósseo. Neste estudo, obteve-se um arcabouço de degradação lenta e de liberação lenta e prolongada de sinvastatina com alta permeabilidade que pode ser promissor para a regeneração óssea e apresenta potencial para translação clínica. A estrutura computacional e a visão fornecida no presente estudo será útil na melhoria da concepção de arcabouços porosos. Trabalhos futuros serão realizados para se estudar a habilidade destes arcabouços em induzir diferenciação osteogênica de MSCs e qual a dose-resposta mais adequada.





## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a contribuição do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME-UFSC), a Scitec Soluções em Ensaio de Materiais e Produtos, ao Programa de Bolsas de Estudos do CNPq (I.C.E) e ao financiamento do CNPq, FINEP e Genius Divisão de Biomateriais do grupo Baumer S.A.



## INTRODUÇÃO

A reabsorção e remodelação óssea alveolar que ocorre em áreas edêntulas após exodontias, infecções ou traumas podem causar limitações dimensionais para a reabilitação com o uso de implantes osseointegráveis. A busca por substitutos ósseos que possam atuar de maneira semelhante ao osso autógeno, promovendo ao mesmo tempo osteocondução, osteoindução e osteogênese, fomenta pesquisas na área da engenharia tecidual. Os resultados vêm se mostrando promissores devido à associação de novas tecnologias de arcabouços, indutores biológicos e células-tronco mesenquimais (Hammerle & Karring 1998, Buser et al. 1999, Cordeiro et al. 2008, Sakai et al. 2010, Qi et al. 2013, Wadagaki et al. 2011, Zhou et al. 2010).

O desenvolvimento de arcabouços osseocondutores visa obter estruturas com propriedades semelhantes às do osso hospedeiro. A associação do PLGA às cerâmicas bifásicas, ou com HA e  $\beta$ TCP isoladamente, tem sido proposta apresentando resultados promissores (Kim et al. 2012, Encarnação et al. 2016), pois os estudos mostraram que esta associação promove melhora das características mecânicas e do processo de degradação do arcabouço (Zhang et al. 2008, Fisher et al. 2015, Huang et al. 2008, Wei & Ma 2004, Verheyen et al. 1992, Guan & Davies 2004, Tayton et al. 2014, Roy et al. 2016). Dessa maneira, combinam-se características positivas como a liberação de íons cálcio e fosfato e a possibilidade de se incorporar substâncias bioativas para formar um sistema de liberação controlada para a osseoindução (Yang et al. 2006, Boerckel et al. 2011).

As estatinas são potentes redutores da síntese do colesterol endógeno, sendo utilizadas amplamente para prevenir doenças coronarianas e aterosclerose. Essas substâncias possuem capacidade de inibir a coenzima A hidroximetilglutaril redutase (HMG-CoA), envolvida na síntese do colesterol endógeno, bloqueando a conversão do HMG-CoA em mevalonato (Zhang et al. 1997). Sua atuação sobre o tecido ósseo foi primeiramente descrita por Mundy et al. em 1999. Esses pesquisadores demonstraram que as estatinas estimulam a formação óssea em roedores e são capazes de aumentar o volume de novo osso em culturas de células derivadas da calvária de camundongos. Seu efeito foi descrito como aumento do nível de expressão de BMPs nas células ósseas e estimulação da formação de novo osso (Mundy et al. 1999, Sugiyama et al. 2000, Ohnaka et al. 2001, Maeda et al. 2003, Maeda et al. 2004, Maciel-Oliveira et al. 2011, Gentile et al. 2014, Gentile et al. 2016).

A aplicação de sinvastatina diretamente no local de ação mostrou resultados positivos para a formação óssea, tanto *in vitro* como *in vivo* (Gentile et al. 2016, Baek et al. 2005). Além de aumentar a expressão de BMPs, a sinvastatina também aumenta acentuadamente a expressão de VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) em células da linhagem osteoblástica. Dessa forma, BMPs e VEGF interagem para estimular a formação óssea pelos osteoblastos (Maeda et al. 2003, Deckers et al. 2002). Liu et al. em 2008, também observaram, em ratos, aumento na expressão de fator de crescimento transformador beta 1 (TGF $\beta$ -1), proteína óssea morfogenética 2 (BMP-2) e VEGF, aumento temporal na expressão de marcadores osteogênicos, como a fosfatase alcalina e mineralização, assim como verificaram um aumento da expressão de sialoproteína óssea, osteocalcina e colágeno tipo I após a administração local de sinvastatina, uma semana após a extração de dentes.

A sinvastatina, assim como os fatores de crescimento, requerem um meio adequado para controlar a sua liberação local para a formação óssea. Altas concentrações podem provocar morte celular e respostas inflamatórias exacerbadas (Kupcsik et al. 2009). Estudos testaram o efeito da aplicação local de sinvastatina associada a diferentes carreadores, como a gelatina de polietileno glicol (Ozec et al. 2007), ácido polilático coglicólico (Huang et al. 2012), nanopartículas adicionadas ao PLGA (Ho et al. 2011), microesferas de PLGA (Nath et al. 2013), micropartículas de PLGA e quitosana (Nandagiri et al. 2012, Gentile et al. 2014, Gentile et al. 2016), PLGA+HA/ $\beta$ TCP (Encarnação et al. 2016, Han et al. 2014, Zhang et al. 2015), PLGA associado a cerâmica bifásica e zircônia, (Sadiasa et al. 2013) sulfato de cálcio (Nyan et al. 2007), fosfato de cálcio (Montazerolghaen et al. 2013) e  $\beta$ TCP (Nyan et al. 2009). Esses estudos têm demonstrado o potencial em aumentar a formação óssea e possuem graus variados de sucesso (Park 2009). Apesar disso, ainda não há um consenso sobre qual o carreador ideal para a sinvastatina empregada nos defeitos ósseos, o que justifica a realização de novos estudos.

Frente aos resultados promissores que diversos autores observaram na associação de arcabouços porosos compostos por PLGA e cerâmicas bifásicas no reparo ósseo como alternativa aos enxertos ósseos autógenos, propõe-se neste estudo uma liberação lenta e gradual de sinvastatina incorporada ao arcabouço. Isso visa otimizar a eficácia deste material e acelerar o processo de reparo, uma vez que as propriedades osteoindutoras da sinvastatina poderiam amplificar seus benefícios. Para isso, é necessário que a degradação do arcabouço

permita a liberação lenta e gradual da sinvastatina, com uma concentração que favoreça o reparo ósseo, sem exacerbar a resposta inflamatória. Portanto, este estudo objetivou analisar, *in vitro*, a liberação de sinvastatina em um arcabouço poroso composto de PLGA e cerâmica bifásica, elaborado para engenharia de tecido ósseo, além das propriedades físico-químicas e mecânicas deste arcabouço.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### **Obtenção e preparo do arcabouço poroso de PLGA+HA/ $\beta$ TCP e PLGA+HA/ $\beta$ TCP+SIN**

Os arcabouços compostos porosos foram produzidos com copolímero de ácido polilático coglicólico (PLGA) e cerâmica bifásica (hidroxiapatita e beta-tricálcio fosfato - HA/ $\beta$ TCP) obtidos pela técnica de evaporação de solvente e lixiviação de partículas de sacarose. Foram pesados 25% (m/v) de ácido polilático (PLA) (Resomer LT 706 S, Evonik Boehringer Ing. Pharma GmbH & Co. KG, Alemanha) e 75% (m/v) do copolímero PLGA (lactide-co-glicolide) (Resomer LG 824 S, Evonik Boehringer Ing. Pharma GmbH & Co. KG, Alemanha) (m:m) que, em seguida, foram solubilizados em 10% (m/v) de clorofórmio PA ( $\text{CHCl}_3$  – Synth – LabSynth, Diadema, São Paulo - Brasil) em temperatura ambiente e agitação constante por 24h. Após a dissolução completa dos polímeros, foram adicionados 30% ou 70% (m/m) de partículas de sacarose com granulação em torno de 500  $\mu\text{m}$  (Microbiology – Merck, Darmstadt Alemanha) de acordo com o grupo, e 33% (m/m) partículas em torno de 250  $\mu\text{m}$  de cerâmica bifásica (Genphos, Genius com HA e  $\beta$ TCP na proporção 70/30, Baumer, Mogi Mirim - Brasil) mantendo uma relação final entre PLGA e cerâmica bifásica de 2 para 1. Após a homogeneização da solução, a mesma foi mantida 24h sob agitação constante para evaporação parcial do solvente e o preenchimento dos moldes negativos de cilindros de 8 mm de diâmetro e 12 mm de altura. Após a evaporação total do solvente, as amostras foram cortadas e imersas em álcool polivinílico (Álcool polivinílico PS, Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro), em temperatura ambiente e agitação constante por 24h, para solubilização e remoção das partículas de sacarose. Em seguida, as amostras foram lavadas com água destilada para remoção dos resíduos. Para as amostras contendo Sinvastatina (SIM  $\geq 97\%$ , grau de cromatografia líquida de alta performance, HPLC, sólida M=418.57, *Sigma-Aldrich*, ONT, Canada), o fármaco foi adicionado simultaneamente à sacarose e à cerâmica

bifásica em 3 diferentes concentrações 2, 5 e 8% da massa final (ver grupos experimentais, Tabela 1). As amostras obtidas foram seccionadas com auxílio do sistema Exakt (Exakt Apparatebau GmbH & Co., Norderstedt, Alemanha do Laboratório de Pós-Graduação em Odontologia da UFSC) para obtenção de cilindros com bases paralelas entre si com 3 e 10 mm de altura (Figura 1).

### **Liberação da Sinvastatina**

Para avaliar a degradação dos arcabouços e a liberação de sinvastatina, as amostras foram pesadas e incubadas em 50ml de solução salina tamponada (PBS), pH 7,4 e em PBS com 30% de etanol, pH 7,4, em banho termostático a 37°C, sob agitação constante por 40 dias. Em intervalos de tempo distintos, 2 ml de solução foram recolhidos e, quando necessário, diluído a 10µg de Sinvastatina/ml. A absorvância desta solução foi medida em espectrofotômetro UV-Vis a um comprimento de onda de 240 nm (Espectrofotômetro UV-Vis Nova Instruments 1800-UV, Polimat – Laboratório de Materiais Poliméricos da UFSC). A curva padrão foi obtida de concentrações conhecidas de sinvastatina em acetonitrilo e utilizada para quantificar a sinvastatina carregada e liberada a partir das amostras.

Para analisar o modelo de cinética que representa o perfil de liberação de sinvastatina em PBS e em PBS com 30% de etanol, a concentração de sinvastatina foi redimensionalizada dividindo a quantidade absoluta de sinvastatina liberada no tempo  $t$ , representada por  $M_t$ , e a quantidade de sinvastatina no tempo infinito,  $M_\infty$ , considerada a concentração de equilíbrio obtida ao final de 40 dias experimentais. Os modelos foram avaliados pelo coeficiente de correlação ( $R^2$ ) e pela análise dos resíduos.

Após os 40 dias do ensaio, as amostras foram removidas, liofilizadas e pesadas para a avaliação da perda de massa em relação a massa inicial, mensurada imediatamente antes do início do experimento. A massa residual foi calculada pela relação:  $(\text{massa final} \times 100\%) / (\text{massa inicial})$ . As amostras foram analisadas em triplicata.

### **Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS)**

A morfologia tridimensional das amostras foi avaliada no seu estado seco e após 40 dias de liberação da sinvastatina e degradação utilizando-se microscópio eletrônico de varredura de alta resolução

(JEOL JSM-6390LV Scanning Electron Microscope do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica de Varredura – LCME - da UFSC). As amostras secas foram levadas ao aparelho metalizador para recobrimento com ouro de 300 Å (Spulter Balzers SCD- 050 Coater, do LCME da UFSC). Os espécimes foram examinados ao microscópio eletrônico de varredura, operando com 10 Kv. Cada amostra foi fotografada em 2 campos distintos com aumentos de 50x, 500x e 2.000x para análise da superfície e mensuração do tipo e forma dos poros com auxílio software ImageJ64 (NIH – National Institute of Health). As partículas de cerâmica bifásica e de sacarose foram examinadas da mesma maneira.

Para análise qualitativa da composição química da superfície das amostras, foi realizada espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) em aumento de 50x, utilizando-se o MEV de alta resolução (JEOL JSM-6390LV *Scanning Electron Microscope* do LCME- da UFSC).

### **Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

Medições de DSC (Shimadzu DSC-50 da Central de Análises do Departamento de Química - UFSC) foram utilizadas para caracterizar isoladamente o PLGA, a sinvastatina, HA/ $\beta$ TCP, e a associação de PLGA+HA/ $\beta$ TCP e PLGA+HA/ $\beta$ TCP+SIN. A temperatura variou de 0°C a 180°C, com taxa de aquecimento de 10°C/min usando atmosfera de nitrogênio. Essas caracterizações foram usadas para examinar a estabilidade físico-química do arcabouço.

### **Teste de Compressão**

Para as medidas de resistência à compressão, cilindros com diâmetro de 8 mm e altura de 12 mm foram utilizados em uma máquina universal de ensaios (Instron Emic DL-10000, modelo SV50 R9 255, Shimadzu AGS-H, do Laboratório SCiTec Soluções em Ensaios de Materiais e Produtos, Palhoça - Santa Catarina, Brasil), utilizando uma velocidade de 1mm/min e transdutor de força de 500 N seguindo o padrão da ASTM (D-1621). O ponto de fratura não foi observado durante a compressão. Assim, para a avaliação de resistência à compressão e à tensão utilizada na comparação entre os grupos, foram considerados os dados que geraram 20% de deformação (Hu, 2015; Kim, 2015; Qutachi, 2014; Fang 2014).

A curva de tensão-deformação, obtida através do ensaio de compressão, gerada durante a análise foi usada para calcular o módulo de Young (módulo de elasticidade), uma medida da rigidez das amostras. O módulo de elasticidade foi calculado pela determinação da inclinação da curva de tensão-deformação ao longo da porção elástica de deformação.

### **Microtomografia ( $\mu$ CT)**

As imagens da microarquitetura do arcabouço seco foram obtidas utilizando-se o sistema de  $\mu$ CT Versa XRM-500 (Xradia VERSA XRM-500, high resolution 3D X-ray microscope). As condições de escaneamento foram as mesmas para todas as amostras: tubo de Raios-X com voltagem a 30kV e potência a 2W, sem filtro, lente óptica 0,4X, passo angular de  $0.225^\circ$ , tempo de exposição de 15s e 1601 quadros por projeção (40 projeções de referência). As imagens resultantes foram 12-14  $\mu$ m de resolução espacial.

Para a caracterização da porosidade e distribuição dos poros em 2D e 3D, as imagens obtidas foram binarizadas com auxílio do software Imago (desenvolvido pelo Laboratório de Meios Porosos e Propriedades Termofísicas LMPT, UFSC, Brasil - em associação com ESSS - *Engineering Simulation and Scientific Software* e CENPES – PETROBRAS) (Oliveira et al. 2010, Moreira et al. 2012). A região de interesse (ROI) representativa da imagem foi selecionada utilizando o maior formato retangular possível dentro das amostras e reproduzido para todas as imagens do mesmo conjunto. O conjunto de imagens consecutivas da amostra foi importado e renderizado para obtenção da imagem 3D.

Os volumes totais analisados foram cubos de  $600 \times 600 \times 400$  voxels<sup>3</sup> para amostras dos grupos PLGA+HA/ $\beta$ TCP com 70% de porosidade, PLGA+HA/ $\beta$ TCP e PLGA+HA/ $\beta$ TCP+8%*SIN* com 30% de porosidade, respectivamente. Os dados dos volumes binários obtidos foram convertidos para análise no software C3DE, rede de poros e gargantas, desenvolvido no laboratório LAPIX (*Image Processing and Computer Graphics Lab* – UFSC), em parceria com o Laboratório de Meios Porosos e Propriedades Termofísicas - UFSC.

### **Análise estatística**

Os dados foram descritos utilizando as medidas: média, mediana, desvio padrão, máximo e mínimo. Para amostras grandes ou quando os



dados seguiam uma distribuição normal (pelo teste de Shapiro-Wilk) de probabilidade, os grupos foram comparados utilizando-se a análise de variância para 1 fator (ANOVA *de uma via*). Para amostras dentro de um grupo, empregou-se a análise de variância para dois fatores (grupos e amostras) sem interação. Em ambos os casos, quando necessário para comparação múltipla, procedeu-se com teste de Tukey. No caso em que os dados não apresentaram uma distribuição normal, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguindo do teste de comparação múltipla não-paramétrico. A associação entre variáveis foi obtida utilizando o coeficiente de correlação de Pearson. Todas as análises foram realizadas utilizando o software SPSS (v20) considerando um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

### **Liberação da Sinvastatina**

A liberação de sinvastatina das amostras com 30% e 70% de porosidade, incubadas a 37°C em PBS, mostraram um período de latência durante os primeiros dias experimentais. Esse período variou entre os grupos. Nas amostras com 30% de porosidade, o grupo com 2% de SIN iniciou a liberação do fármaco com 11 dias, o grupo com 5% de SIN iniciou com 7 dias e o grupo com 8% de SIN iniciou após 24h. Já nas amostras com 70% de porosidade, o grupo com 2% e 5% de SIN iniciou a liberação do fármaco com 1 e 2 dias, respectivamente, e o grupo com 8% de SIN iniciou com 5h (Anexo A, tabelas 1-3).

A liberação de sinvastatina das amostras com 30% e 70% de porosidade incubadas em PBS apresentou uma liberação lenta durante os 40 dias de experimento, atingindo valores de 1 a 2% de liberação em relação a sinvastatina incorporada nas amostras com 30% de porosidade e 2,5 a 4,5% nas amostras com 70% de porosidade e, mesmo após os 40 dias, a curva de liberação ainda apresentou um comportamento crescente, sem atingir um equilíbrio (Figura 2 A e C).

Já a liberação de sinvastatina das amostras com 30% e 70% de porosidade, incubadas a 37°C em PBS com 30% de etanol, apresentaram liberação do fármaco imediatamente após o início do experimento. Foi observada uma fase inicial de liberação rápida, atingindo-se em torno de 20 a 40% de liberação com 40 dias de experimento nas amostras com 30% de porosidade. Nas amostras com 70% de porosidade, variou de 30 a até 80% de liberação como foi observado nas amostras do grupo com 8% de SIN (Figura 2 B e D). Na

figura 2E e 2F é possível observar a comparação do comportamento da liberação dos grupos com 30% de porosidade (Figura 2 E) e com 70% de porosidade (Figura 2 F) nos diferentes meios de liberação.

Não foi calculada a eficiência máxima de encapsulação da sinvastatina nestes arcabouços, pois com a sua solubilização total, a leitura do pico de PLGA e o pico de sinvastatina na espectroscopia UV-Visível são alterados pela interação entre eles ou pela alta quantidade de polímero solubilizado no meio, sendo uma limitação deste ensaio. Foi observado que o grupo com 70% de porosidade e 5% de SIN liberou 80% de SIN em meio de PBS com 30% de etanol, o que demonstra que a eficiência de encapsulação de sinvastatina no arcabouço foi elevada (Figura 2 D).

Os dados da liberação da sinvastatina obtidos tanto em PBS como em PBS com 30% de etanol foram estudados para se analisar qual modelo de cinética de liberação ajusta-se melhor. Os modelos utilizados foram o Modelo de Ordem Zero (Modelo 1), Modelo de Higushi (Modelo 2), Modelo de Korsmeyer (Modelo 3) e o Modelo de Peppas & Sahlim (Modelo 4). Para a liberação em PBS, independente da porosidade e da concentração de sinvastatina no arcabouço, o modelo que melhor se ajustou aos dados experimentais foi o Modelo de Korsmeyer (Modelo 3), representado abaixo:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_0 \cdot t^n + b$$

Este modelo descreve as duas formas de liberação do fármaco, a difusional ou Fickiana e o transporte Caso II (não-Fickiano), controlado pelo relaxamento das cadeias poliméricas. Na equação,  $K_0$  corresponde a uma constante cinética que incorpora características estruturais e geométricas do arcabouço,  $n$  define o tipo de liberação e  $b$  é a constante de ajuste (Tabela 2). Comprova-se que este modelo se ajustou satisfatoriamente aos dados experimentais, uma vez que apresentou coeficientes de correlação acima de 0,98 para todas as amostras e os resíduos não apresentaram tendências (Tabela 2). Quando  $n < 0,45$ , há um predomínio da liberação difusional, para  $0,45 < n < 0,85$  há liberação anômala (combinação dos dois processos) e, quando  $n > 0,85$ , há predomínio do transporte Caso II (Lopes, 2005).

Na tabela 2, pode-se observar que nas amostras com 30% de porosidade houve predomínio do transporte Caso II e nas amostras com 70% de porosidade houve comportamento anômalo. Para exemplificar os ajustes neste modelo foram selecionados o grupo de arcabouço

composto poroso com 5% de SIN com 30% e 70% de porosidade em PBS. (ver Anexo A, Figura 1. A e B e Figura 2. A e B). As amostras com 70% de porosidade apresentaram maiores valores da constante K indicando uma taxa maior de liberação, provavelmente associada a área maior de transferência de massa nestas amostras quando comparadas com as amostras com 30% de porosidade. Nas amostras com 30% de porosidade observa-se um aumento da taxa com o aumento da concentração de sinvastatina o que está associado ao maior gradiente de concentração entre a amostra e o meio de liberação. Esse comportamento não foi observado nas amostras com 70% de porosidade, provavelmente devido ao fato de que a alta porosidade faz com que o comportamento de liberação seja anômalo. Estes resultados estão de acordo com os valores encontrados para o coeficiente n que caracteriza esse comportamento, ou seja, que nestas amostras o processo de liberação ocorre simultaneamente por mecanismos difusivos e devido aos processos de relaxamento das cadeias poliméricas (caso II).

Para a liberação em PBS com 30% de etanol, independente da porosidade e da concentração de sinvastatina no arcabouço, o modelo que melhor se ajustou aos dados experimentais foi o Modelo de Peppas & Sahlin (Modelo 4), representado abaixo:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_1 \cdot t^m + K_2 \cdot t^{2m}$$

Este modelo quantifica as contribuições relativas dos fenômenos difusivos e de relaxação responsáveis pela liberação pois descreve as duas formas de liberação do fármaco, a difusional ou fickiana e o transporte Caso II, que está associado ao processo de relaxação das cadeias poliméricas. Na equação,  $K_1$  e  $K_2$  representam constantes que refletem as contribuições relativas do mecanismo difusional e do mecanismo de erosão/relaxamento, respectivamente. O coeficiente  $m$  é o expoente de difusão Fickiana do sistema de liberação (Tabela 3). Comprova-se que este modelo se ajustou satisfatoriamente aos dados experimentais, uma vez que apresentou coeficientes de correlação acima de 0,98 para todas as amostras e os resíduos não apresentaram tendências. Para exemplificar os ajustes neste modelo, foram selecionados o grupo de arcabouço composto poroso com 5% de SIN com 30% e 70% de porosidade, em PBS com 30% etanol. (ver Anexo A, Figura 3A, 3B, 4A e 4B). Em geral  $K_1 > K_2$  indica que os processos

difusionais prevalecem no processo de liberação da sinvastatina sobre os processos de relaxamento das cadeias poliméricas. Por outro lado, observa-se que a importância relativa do mecanismo difusional em relação ao de relaxamento ( $K_1/K_2$ ) foi muito maior no arcabouço com 70% de porosidade quando comparado aos arcabouços com 30% de porosidade. Isso pode estar associado ao fato de que nos arcabouços com 30% de porosidade, o intumescimento é mais significativo no processo de liberação que nos arcabouços com 70% de porosidade, onde, mesmo que ocorra intumescimento, este processo não afeta de forma tão intensa o processo de liberação devido à sua alta porosidade. Como exemplo, pode-se comparar a relação de  $K_1/K_2$  nos arcabouços com 5% de SIN para os arcabouços com 30% e 70% de porosidade, obtendo valores de 0,95 e 19,0, respectivamente. Foi observada a perda de massa do arcabouço com 70% de porosidade após o ensaio de liberação, o que sugere a erosão do arcabouço durante este processo (Tabela 4). É possível que isto tenha contribuído para o processo de liberação anômala que foi observado nestas amostras. Nas amostras com 30% de porosidade, a perda de massa não foi analisada.

### **Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e EDS**

As partículas de cerâmica bifásicas apresentaram formato pontiagudo, sólido e achatado com tamanho médio no seu longo eixo de 283,83  $\mu\text{m}$  ( $\pm 95,5$ ) (Figura 3A), com alto número de irregularidades arredondadas na superfície, com diâmetro médio de 0,821  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0,59$ ) (Figura 3B, ver Anexo A, Tabela 4). A análise pontual de EDS na superfície do arcabouço permitiu a identificação dessas partículas uma vez que a sua composição química, rica em Ca e P, pode ser diferenciada do polímero (Figura 3C). A análise pelo EDS demonstrou que o arcabouço é formado essencialmente por C, O, Ca e P, e, após o processo de liberação e liofilização para a microscopia, também foram identificadas outras substâncias como Na, Cl e K que estavam presentes no arcabouço, provenientes do meio de liberação em PBS e PBS com 30% etanol. O EDS demonstrou ausência de impurezas nas amostras.

As partículas de sacarose utilizadas com agente porogênico apresentaram formato de cristais sólidos com tamanho médio no seu longo eixo de 578,33  $\mu\text{m}$  ( $\pm 187,50$ ) (Figura 3D, ver Anexo A, Tabela 5), com irregularidades arredondadas na superfície com diâmetro médio de 7,03  $\mu\text{m}$  ( $\pm 11,52$ ) (Figura 3E). Na superfície do arcabouço, podem-se observar poros no mesmo formato que os cristais de sacarose e poros

com formato esférico que originaram-se da incorporação não controlada de bolhas de ar (Figura 3 F).

As imagens de MEV dos arcabouços com 30% de porosidade foram avaliadas antes e após 40 dias de degradação e liberação, conforme sua macro (nos aumentos de 50x e 500x) e microirregularidades (no aumento de 2.000x) (Figura 4 A-L). Os grupos foram comparados entre si com relação aos parâmetros de maior diâmetro dos poros, o formato deles e se esses poros são abertos ou fechados (foi considerado poro aberto aquele que apresentava aberturas nas suas paredes em 2D).

ANOVA de uma via (Tabela 5) indicou diferença significativa entre os grupos em relação ao diâmetro dos macroporos ( $p = 0,01$ ). Porém, o teste de Tukey indicou que somente o grupo 3 (arcabouço seco com 5% de SIN, média de 270,43  $\mu\text{m}$ ) difere significativamente do grupo 7 (arcabouço com degradação em PBS com 5% de SIN, média de 355,60  $\mu\text{m}$ ).

A ocorrência dos formatos dos macroporos em cada grupo foi analisada pelo teste qui-quadrado (Tabela 6), obtendo valor de  $p = 0,009$ , apontando que existe diferença entre os grupos em relação ao seu formato, com predominância dos poros esféricos. O teste de comparação múltipla mostra que o grupo arcabouço com 8% de SIN em PBS, com 48% de macroporos com formato sacarose, difere significativamente do grupo arcabouço com 2% de SIN em PBS, com 26,2% de macroporos com formato sacarose. Isso pode ter ocorrido devido à maior proporção de poros esféricos neste último grupo, sendo que as demais comparações entre grupos não apresentaram diferença significativa.

Na análise da relação de macroporos abertos ou fechados, pelo teste qui-quadrado (Tabela 7), observou-se valor de  $p = 0,001$ , portanto, existe diferença entre os grupos. O teste de comparação múltipla mostra que o grupo arcabouço com 8% de SIN em PBS com etanol, com 74,7% de poros abertos, difere significativamente dos grupos arcabouço com 8% de SIN em PBS, com 46,9 % de poros abertos e arcabouço com 2% de SIN em PBS com etanol, com 45,4% de poros abertos, com predominância de poros abertos. As demais comparações entre grupos não apresentaram diferença significativa.

A comparação das médias (Tabela 8) dos diâmetros dos macroporos com formato de sacarose, em relação aos de formato esférico, dentro de cada grupo, apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em quase todos os grupos. Verificou-se maior diâmetro nos poros com formato de cristais de sacarose, com exceção do arcabouço sem SIN ( $p = 0,122$ ) e arcabouço com 5% de SIN, ambos em PBS ( $p =$

0,265). No geral, sem se separar por grupos, também houve diferença entre formato de sacarose e esférico.

Dentro dos macroporos, no aumento de 2.000x, observaram-se microirregularidades na sua superfície com formatos arredondados, irregulares e fechados (Figura 4B, 4D, 4F, 4H, 4J e 4L). ANOVA de uma via (Tabela 9) indicou que há diferença significativa entre os grupos em relação ao diâmetro das microirregularidades ( $p < 0,05$ ). O teste de Tukey indicou que o grupo arcabouço com 8% de SIN seco diferiu significativamente dos grupos listados na tabela 9.

Na figura 4, pode-se observar os arcabouços no seu estado inicial (seco) e após o período de 40 dias de degradação e liberação de sinvastatina em meio com PBS e PBS com etanol. Na superfície, pode-se notar, nos aumentos de 50x, que as irregularidades do polímero são maiores nos grupos que ficaram imersos em meio com PBS e etanol (Figuras 4A, 4C, 4E, 4G, 4I e 4K).

### **Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

O comportamento térmico da sinvastatina incorporada no arcabouço composto foi comparado ao da sinvastatina pura, PLGA puro e ao arcabouço composto sem a sinvastatina, como mostra a Figura 5. A sinvastatina, no seu estado natural, existe na forma cristalina. Conforme pode-se observar no termograma, a sinvastatina apresentou um único pico endotérmico associado à fusão ( $146^{\circ}\text{C}$ ) e não apresentou transição vítrea, caracterizando a sua estrutura cristalina (Nath, 2013). O PLGA puro apresentou características de materiais semicristalinos caracterizado por uma transição vítrea, proveniente das regiões amorfas, e um pico endotérmico associado a fusão das regiões cristalinas. A temperatura de transição vítrea foi de  $49,1^{\circ}\text{C}$  e o pico endotérmico foi  $156,7^{\circ}\text{C}$ . Na faixa de temperatura avaliada, não foi observada transição vítrea e pico endotérmico para a cerâmica bifásica pois apresenta transições térmicas em temperaturas superiores. Nas amostras do arcabouço composto por PLGA e cerâmica bifásica, observou-se transição vítrea e fusão com valores de  $74,7^{\circ}\text{C}$  e  $158,2^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Comparando-se estes valores com o PLGA puro, observou-se um deslocamento dos valores para temperaturas mais elevadas, o que indica uma interação entre os materiais (ver Anexo A – Figura 5A, 5B, 5C, 5D e 5E).

No termograma do arcabouço composto com sinvastatina, o pico endotérmico da sinvastatina não foi observado, indicando a formação de um complexo de inclusão amorfo. Observaram-se três

eventos térmicos: uma transição vítrea (37,9°C), um pico endotérmico (154,9°C) e um pico de cristalização (95,1°C). A transição vítrea e a fusão estiveram associadas ao polímero e suas interações com a cerâmica bifásica. Entretanto, o aparecimento desse pico de cristalização esteve associado à presença de sinvastatina, que interagiu com os componentes do arcabouço que induziram o processo de cristalização nesta temperatura.

### **Teste de Compressão**

Foi realizado teste de compressão para comparação entre os grupos de arcabouço com 30% de porosidade, com e sem SIN, e arcabouço com 70% de porosidade sem SIN. A comparação do módulo de elasticidade (módulo de Young) dos grupos pela ANOVA de uma via (Figura 6A, ver Anexo A, Tabela 6) indicou que não há diferença significativa entre os grupos ( $p = 0,291$ ).

O ponto de fratura não foi observado durante a compressão. Portanto, a resistência à compressão foi considerada como sendo a resistência que gerou 20% de deformação para comparação entre os grupos (Hu, 2015; Kim, 2015; Qutachi, 2014; Fang 2014). Assim, considerando-se os dados obtidos quando a amostra atingiu 20% da sua deformação final, foram analisados a força compressiva, a tensão e o módulo de elasticidade (Anexo A, Tabela 7). O valor médio da deformação de 20% foi de 0,011, 0,011 e de 0,007mm para os grupos com 30% de porosidade com e sem SIN e arcabouço com 70% de porosidade sem SIN, respectivamente. Estes dados não seguiram uma distribuição normal de probabilidade ( $p = 0.010$ ). Ao se comparar os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis (Anexo A, Tabela 7), verificou-se que não há diferença significativa entre os grupos em relação à deformação ( $p = 0,092$ ).

Para as variáveis força compressiva, tensão e módulo de elasticidade avaliou-se a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk. Verificou-se que esses dados não seguiram uma distribuição normal de probabilidade ( $p = 0.006$ ,  $p = 0.003$ , e  $p = 0.010$ , respectivamente). A comparação entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis (Figura 6B, 6C e 6D, ver Anexo A, Tabelas 8, 9 e 10) indica que não há diferença significativa entre os grupos para as variáveis estudadas ( $p = 0,179$ ,  $p = 0,189$ , e  $p = 0,906$ , respectivamente).

### **Microtomografia ( $\mu$ CT) – Porosidade e Permeabilidade**

Duas amostras dos grupos arcabouço com 30% de porosidade, com 8% de SIN e sem SIN, e arcabouço com 70% de porosidade sem SIN foram selecionadas para  $\mu$ CT e caracterização por meio da modelagem do espaço poroso. Exemplos de secções transversais das amostras são apresentados juntamente com as resoluções espaciais e o tamanho em pixels das imagens (Figura 7A, 7B e 7C). São imagens em escala de cinza com a fase porosa representada pelos tons mais escuros e a fase sólida pelos tons mais claros, sendo as partículas de cerâmica bifásicas mais próximas do branco e o polímero mais acinzentado.

Dentro dos conjuntos de imagens, uma região de interesse (ROI) foi selecionada para análise. Esta região buscou a representatividade da amostra e seu tamanho foi determinado levando-se em consideração o limite computacional dos softwares empregados durante a caracterização (ver Anexo A, Tabela 11).

As imagens foram binarizadas para identificar os voxels pertencentes à fase sólida e à fase porosa. Para estas etapas, foi utilizado o software Imago. Após a binarização, obteve-se o cálculo da porosidade média (Tabela 10) e a distribuição da fração do volume poroso (Figura 8A, 8B, 8C, 8D, 8E e 8F). Ambos os dados mostraram semelhança na porosidade média e na distribuição dos tamanhos dos poros entre as amostras dos grupos arcabouço composto com 30% de porosidade e arcabouço composto com 70% de porosidade. Porém, entre as amostras do grupo arcabouço composto 30% de porosidade e 8% de SIN, os dados obtidos foram diferentes tanto na porosidade média quanto na distribuição dos tamanhos dos poros, mostrando uma dificuldade na padronização na obtenção da porosidade entre amostras do mesmo grupo pelo método utilizado. De maneira geral, os dados mostraram a predominância de poros menores, sendo que nas amostras do grupo arcabouço composto com 30% de porosidade e na amostra CP3 do grupo arcabouço composto com 8% de SIN e 30% de porosidade, a maior parte dos poros apresentou raio em torno de 36  $\mu$ m. Já na amostra CP4 do grupo arcabouço composto com 8% de SIN e 30% de porosidade e o grupo arcabouço composto com 70% de porosidade apresentou raio em torno de 140  $\mu$ m.

As Figuras 9 e 10 permitem a visualização dos volumes computacionais binários. As redes foram extraídas dos mesmos volumes utilizados na seção anterior para a determinação de tamanhos de poros e gargantas (conexões). A metodologia adotada pela rede isolou o poro e mensurou seu raio tendo como base uma esfera de mesmo volume. Os raios das gargantas são raios de cilindros como base em cilindros dos



mesmos volumes. Portanto, para cada poro, foi possível obter o número de gargantas (ou conexões) associadas a ele (Tabela 11).

Houve diferença significativa entre os grupos quando comparados com relação ao tamanho médio do raio implícito, pela ANOVA (Tabela 12) ( $p = 0,0001$ ). O teste de Tukey indicou que o grupo arcabouço com 70% de porosidade diferiu significativamente do grupo arcabouço com 30% de porosidade e 8% de SIN e arcabouço com 30% de porosidade. Não houve diferença significativa entre arcabouço com 30% de porosidade e 8% de SIN e arcabouço com 30% de porosidade.

Com relação ao número de gargantas, a ANOVA (Tabela 13) também indicou que houve diferença significativa entre os grupos ( $p = 0,0001$ ). O teste de Tukey indicou que os três grupos diferiram entre si, com menor número de gargantas no grupo arcabouço com 70% de porosidade. Na análise da correlação entre raio implícito e número de gargantas em cada grupo, observou-se que todas as correlações foram baixas (menores que 0,32) o que indica que não existe associação entre o raio implícito e o número de gargantas (ver Anexo A, Tabela 12).

O número de poros fechados, isto é, o número de poros que não apresentam gargantas, também foram avaliados. ANOVA (Tabela 14, ver Anexo A, Tabela 13) indicou que houve diferença significativa entre o tamanho dos raios dos poros fechados ( $p = 0,0001$ ). O teste de Tukey mostrou que existe diferença significativa entre os três grupos, sendo que o grupo arcabouço com 70% de porosidade apresentou um número menor de poros fechados.

Quando comparados os grupos com relação ao raio implícito da rede de gargantas, ANOVA (Tabela 15) indica que há diferença significativa ( $p = 0,0001$ ). O teste de Tukey indicou que houve diferença significativa entre os três grupos, com maior média no grupo arcabouço com 70% de porosidade.

Os valores relativos à porosidade e à permeabilidade absoluta obtidos por meio das redes de poros-gargantas podem ser consultados na Tabela 16. A porosidade das imagens foi medida pela contagem do número de voxels pertencente à fase porosa em toda a imagem e a permeabilidade pelo fluxo de fluidos nos eixos x, y e z dos volumes analisados. Embora o grupo arcabouço com 70% de porosidade tenha apresentado um menor número de gargantas, ele apresentou maior raio das gargantas e menor número de poros fechados o que contribuiu para o grande aumento nos valores de permeabilidade.

## DISCUSSÃO

Diversos autores têm mostrado que a Sinvastatina apresenta efeito osteogênico (Mundy et al. 1999, Deckers et al. 2002, Sugiyama et al. 2005, Ohnaka et al. 2001, Maeda et al. 2001, Maeda et al. 2004, Liu et al. 2009, Yamashita et al. 2008, Maciel-Oliveira et al. 2011). O sucesso no seu uso está associado a um processo de liberação lenta e controlada. O uso da Sinvastatina apresenta ainda a vantagem do baixo custo envolvido na sua produção e risco reduzido quando comparado com o uso de terapias com fatores de crescimento ou terapia gênica. Entretanto, dosagens locais elevadas provocam uma ativação exacerbada da resposta inflamatória (Encarnação et al. 2016) devido à sua citotoxicidade e redução direta da produção de colesterol nas membranas celulares (Yamashita et al. 2008).

Dessa maneira, sugere-se que a sinvastatina necessita de um arcabouço carreador que libere uma dose suficiente para promover a osseoindução por um período de tempo prolongado e que, ao mesmo tempo, module favoravelmente o processo inflamatório (Park 2009). Este estudo propõe-se a avaliar a liberação de sinvastatina incorporada ao arcabouço poroso composto por PLGA e cerâmica bifásica, cuja associação já apresenta resultados promissores para o reparo ósseo *in vitro* (Sadiasa et al. 2013, Tai et al. 2013, Han et al. 2014, Zhang et al. 2015).

O período de latência da liberação de sinvastatina nas amostras incubadas em PBS, observado neste estudo, está relacionado a diversos fatores como a hidratação do arcabouço no meio. Este fato foi relatado por Gentili et al. em 2016, que observaram 3 dias de latência em micropartículas de PLGA devido à natureza hidrofóbica apresentada pelo polímero, o que faz com que a solução demore para entrar em contato com a superfície interna do arcabouço poroso para iniciar a sua degradação e difusão das partículas de sinvastatina (Hu et al. 2011).

Outros fatores que contribuem para o período de latência são o gradiente de concentração de sinvastatina na amostra e a porosidade e interconectividade dos poros no arcabouço. Foi observada uma redução do período de latência com o aumento da concentração da sinvastatina e com o aumento da porosidade e interconectividade dos poros que afetam a permeabilidade dos fluidos e o seu contato com o arcabouço para a transferência de massa. Esse período de latência implica que essas amostras devem ser hidratadas previamente em qualquer ensaio biológico, seja ele de cultura celular *in vitro* ou implantação *in vivo*, para se garantir que os fluidos biológicos possam invadir imediatamente o arcabouço para nutrição celular.

A liberação lenta de sinvastatina a partir de arcabouços em PBS tem sido atribuída à sua lipofilicidade, ou seja, possuir baixo coeficiente de solubilidade em meio aquoso. O resultado disso é uma dissolução progressiva, com difusão a partir da superfície do arcabouço em contato com PBS (Nandagiri et al. 2012, Liu et al. 2014).

Apesar da eficiência de encapsulação da Sinvastatina no arcabouço ser elevada, de maneira surpreendente, este estudo observou que uma quantidade muito pequena de sinvastatina foi liberada inicialmente (abaixo de 1%) atingindo de 2 a 4% após 40 dias em PBS. Adicionalmente, a liberação manteve-se lenta durante os 40 dias experimentais.

Arcabouços sem gradiente de estrutura, na forma de micropartículas, apresentam liberação do fármaco mais rapidamente do que aqueles com gradiente de estrutura tridimensional como os arcabouços porosos (Tai et al. 2013, Lin et al. 2015). Zhang et al. em 2015, desenvolveram arcabouços com 65% de porosidade com PLGA (50:50) e cerâmica bifásica (50:50) e observaram uma liberação rápida de 60% de sinvastatina em 7 dias e 100% em 21 dias. Estudos utilizando micropartículas de PLGA, observaram que a liberação inicial lenta foi seguida por uma fase de liberação rápida da droga ao longo de 2 a 7 dias que pode ser atribuída à difusão da droga facilitada pela erosão progressiva das microesferas por hidrólise (Dunne et al. 2000, Dunne et al. 2009, Ramirez et al. 1999). Posteriormente, a velocidade foi reduzida e se manteve sustentada ao longo dos 28 dias (Gentile et al. 2015, Gentile et al. 2016).

Sadiasa et al. em 2013, utilizando arcabouço poroso de cerâmica bifásica e zircônia recobertos por uma película de PLGA, obtiveram amostras com 30% de porosidade que liberaram 80% de sinvastatina em 28 dias, com uma rápida liberação inicial devido à presença do fármaco na sua superfície. O melhor estímulo para diferenciação osteogênica foi observado com a taxa mais lenta de liberação, obtida com a proporção 2:1 de polímero em relação ao conteúdo de cerâmica e zircônia. Han et al. em 2014, produziram arcabouços de PLGA e cerâmica bifásica carregados de sinvastatina com 90% de porosidade, com taxa de liberação lenta e sucesso na proliferação e diferenciação de BMSCs com doses de 0,5mg sinvastatina *in vitro*.

Neste estudo, o período de latência e liberação lenta não foi observado nas amostras incubadas em PBS com 30% de etanol. Embora este meio não seja representativo de nenhuma condição fisiológica humana, ele ilustra como o arcabouço se comporta quando utilizamos um meio no qual o fármaco é solúvel e que também atua para a

degradação do polímero. Em comparação, 40 a 80 % de sinvastatina foi liberada no mesmo período de 40 dias em PBS com 30% de etanol.

Comparando-se o termograma do arcabouço poroso de PLGA e cerâmica com sinvastatina e sem sinvastatina, observou-se uma queda na temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) quando adicionou-se a sinvastatina. Vey et al. em 2012, compararam a degradação de PLGA com diferentes proporções de PLA e PGA. Sugeriram que uma queda na  $T_g$  está relacionada a uma alteração no comportamento conformacional de segmentos poliméricos ricos em ácido polilático. Isso sugere que, neste estudo, houve uma forte interação da sinvastatina com o polímero. Observaram também que quanto maior a  $T_g$  da amostra, mais lenta será a difusão de água. Isso pode explicar o período de latência observado. Além disso, os resultados do termograma indicaram que a sinvastatina, quando associada ao arcabouço poroso de PLGA e cerâmica bifásica, permaneceu em uma forma amorfa, dificultando a separação de fases para a libertação do fármaco a partir do arcabouço (Nath et al. 2013). Portanto, devido a essa forte interação com o polímero, a liberação da sinvastatina parece depender de degradação hidrolítica das cadeias poliméricas para estar disponível para o processo de difusão.

A liberação de sinvastatina do arcabouço decorre de dois processos químicos diferentes: difusão e relaxamento (intumescimento) das cadeias poliméricas. Independente do modelo cinético utilizado neste estudo, observou-se que em PBS com 30% de porosidade existe uma estrutura mais densa de polímero, predominando a liberação pelo transporte Caso II, sendo, portanto, mais dependente do relaxamento das cadeias poliméricas. Já as amostras com 70% de porosidade, com estrutura polimérica menos densa, os processos difusionais prevaleceram. Em PBS com 30% etanol, as amostras com 30% de porosidade apresentaram um comportamento anômalo, que reflete uma combinação dos dois processos químicos de liberação. As amostras com 70% de porosidade mostraram uma predominância expressiva do processo difusional. Essas diferenças mostram claramente o efeito do meio de liberação sobre a solubilidade do fármaco e sua interação com o arcabouço. Portanto, a forma de degradação do arcabouço no meio e a sua porosidade são importantes para compreender o processo de liberação.

Os arcabouços osseocondutores devem atuar como estrutura temporária para facilitar, ou até mesmo acelerar, o reparo ósseo enquanto a reconstrução do defeito ósseo não atinge a sua completa resolução. Portanto, eles não devem atuar como um substituto para o tecido de osso de maneira permanente (Fisher et al. 2015). O PLGA é

conhecido como um polímero biodegradável. Nas amostras em PBS a perda de massa variou de 4,3 a 6,3%. Em PBS com 30% de etanol, variou de 7,8 a 10,1%. Isso evidenciou a influência da hidrofobicidade do PLGA que pode retardar o processo de degradação e, consequentemente, a liberação de sinvastatina (Hu et al. 2011).

Segundo Lu et al. em 2000, os arcabouços porosos de PLGA na proporção 85:15 apresentaram meia-vida em torno de 9 semanas. O processo de degradação do PLGA baseia-se numa reação hidrolítica. A difusão de água provoca a hidrólise das ligações de éster nas cadeias poliméricas, levando à geração de oligômeros solúveis em água. Os produtos de degradação difundem-se para o meio circundante, o que resulta em uma perda de massa do polímero (Pamula & Menaszek 2008, Shirazi et al. 2014, Vey et al. 2012, Neghabat et al. 2015). O mesmo foi observado neste estudo. A difusão dos produtos de degradação ocorre mais lentamente em amostras de tamanhos maiores, devido ao maior comprimento de difusão (Dunne et al. 2000, Grayson et al. 2005, Lu et al. 1999, Witt & Kissel 2001). Isto leva ao acúmulo de produtos de degradação no interior da matriz polimérica, os quais são capazes de catalisar a hidrólise das outras ligações de éster e, por conseguinte, aceleram o processo de degradação em alguns sítios. Este fenômeno é chamado autocatálise. Por isso, devido ao efeito autocatalítico, as grandes amostras de PLGA sofrem uma degradação heterogênea com uma velocidade de degradação que é maior no centro do que na sua superfície (Neghabat et al. 2015).

Os prótons gerados a partir dos subprodutos ácidos libertados pela degradação de PLGA interagem com os íons fosfato presentes nas partículas de cerâmica bifásica e, assim, provocam a presença de ânions  $\text{HPO}_2^{4-}$  e  $\text{H}_2\text{PO}^{4-}$ . A formação destes ânions divalentes e monovalentes de fosfato não só diminui o pH do meio circundante, como também aumenta a dissolução do fosfato de cálcio que levam ao aumento na liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  solúvel no meio (Roy et al. 2016). Dessa maneira, como relatado por Liu et al. em 2015, a acidez dos produtos de degradação foi neutralizada pela adição de  $\beta$ TCP e/ou HA, que libera íons que alcalinizam o meio. Assim, os produtos da degradação do polímero atuam facilitando ou acelerando a reabsorção da cerâmica bifásica em velocidades mais curtas do que sua dissolução normal, consideradas extremamente longas para as cerâmicas bifásicas (Habraken et al. 2010, Lanao et al. 2011). Isso foi benéfico para a absorção total do arcabouços porosos compostos utilizados neste estudo (Roy et al. 2016).

Muitos estudos concentraram-se na fabricação de arcabouços compostos por polímero e cerâmica bifásica, nos quais os polímeros apresentam um teor que varia de 30 a 90 % (Gao et al. 2013). A degradação dos arcabouços de PLGA associados a cerâmicas bifásicas foi investigada por 4 semanas variando-se a proporção entre PLGA e cerâmica bifásica associada a zircônia (1:2, 1:1 e 2:1) (Sadiasa et al. 2013). O grupo com teor inferior em PLGA (1:2) resultou em uma perda de massa mais rápida e também se observaram maiores taxas de liberação de sinvastatina (Sadiasa et al. 2013).

A liberação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  leva à formação de hidroxiapatita carbonatada que reflete a bioatividade dos biomateriais para o desenvolvimento de uma interface osso/arcabouço única (Hench 1994). Sua importância na atividade celular tem sido elucidada (Yamada, 1994; Daculsi 1998). A liberação destes íons ajuda a reverter as desvantagens relacionadas aos polímeros no que diz respeito à sua hidrofobia, à adesão celular, à possibilidade de inflamação asséptica e à bioatividade (Hersel et al. 2003).

A topografia tridimensional do arcabouço influencia fortemente a proliferação das MSCs (Cheng et al. 2015). A configuração porosa dos arcabouços osseocondutores é essencial pois melhora consideravelmente a sua capacidade de união óssea por aumentar a superfície de contato. Isso favorece a sua degradação e liberação de substâncias, aumentando a sua bioatividade. Além disso, a interconectividade dos poros fornece uma estrutura para assegurar tanto o suprimento sanguíneo necessário para transporte de nutrientes, oferta de oxigênio e remoção de produtos e resíduos do metabolismo celular. Isso favorece o crescimento ósseo internamente ao arcabouço, aumentando a estabilidade ao osso adjacente e reduz micromovimentos que são deletérios para o reparo ósseo (Karageorgiou & Kaplan 2005).

Arcabouços densos com baixa porosidade e/ou baixa interconectividade, podem prejudicar a invasão e o crescimento de tecido ósseo devido à barreira física que limita a proliferação de vasos sanguíneos, essenciais para a reparo ósseo. Estudos *in vitro* e *in vivo*, demonstraram que não só a macroporosidade dos implantes tem uma influência sobre a integração e regeneração óssea, como também a microporosidade tem uma influência sobre a sensibilidade biológica (Boyde et al. 1999, Hing et al. 2005, Yuan et al. 1999, Bignon et al. 2003, Annaz et al. 2004).

No entanto, não se pode sugerir uma porosidade e o tamanho dos poros padrão para obter resultados ótimos na formação de tecido ósseo de maneira geral. Isso se deve à complexidade da sua arquitetura e à

variabilidade das propriedades do tecido ósseo, tais como a porosidade, tamanho de poro, propriedades mecânicas, mineralização ou densidade mineral, bem como diferenças de idade, estado nutricional, atividade (carga mecânica) e *status* da saúde dos indivíduos, além da diversidade de biomateriais, células e citocinas para utilização *in vitro* e *in vivo* (Karageorgiou & Kaplan 2005).

O osso trabeculado humano apresenta microporosidade (diâmetro < 10  $\mu\text{m}$ ) que permite a circulação de fluido corporal. Enquanto isso, uma macroporosidade (diâmetro >100  $\mu\text{m}$ ) fornece um arcabouço para a colonização celular (Ghosh et al. 2008). Com base no trabalho inicial de Hulbert et al. de 1970, o tamanho mínimo recomendado de poros para um arcabouço é de 100  $\mu\text{m}$ . Mas estudos posteriores demonstraram melhor osteogênese para implantes com poros maiores que 300 $\mu\text{m}$  (Tsuruga et al. 1997, Kuboki et al. 2001, Gotz et al. 2004, Karageorgiou & Kaplan 2005).

Na maioria dos casos, a porosidade é obtida em biomateriais sintéticos por técnicas que resultam num padrão de tamanho e distribuição de poros, como *gas foaming* (Deschamps et al. 2002), partículas de lixiviação (Liu et al. 1997) e a técnica de réplica de espuma (Kwon et al. 2002, Deisinger et al. 2004). No processo de lixiviação, a quantidade, o tamanho dos poros e forma dentro da matriz são manipulados ajustando o tamanho de partícula dos materiais orgânicos (Ghosh et al. 2008). Este estudo utilizou o método de evaporação do solvente para fabricação de arcabouços porosos compostos por PLGA e cerâmica bifásica utilizando partículas de sacarose para obter a porosidade após o processo de lixiviação. Este método permitiu criar amostras heterogêneas, com grande variabilidade no tamanho dos poros avaliados por MEV e  $\mu\text{CT}$ , e uma porosidade média de 23 a 78%. A adição de sinvastatina não afetou a morfologia ou os parâmetros de porosidades quando comparados ao grupo sem o fármaco, como observado por outros autores (Gentile et al. 2016).

É consenso que a porosidade aberta é crucial para a incorporação de um substituto ósseo (Royer et al. 1993). Por outro lado, encontrar uma arquitetura ótima implica que é possível caracterizar uma rede porosa com precisão e também desenvolver um arcabouço com uma porosidade precisa, o que geralmente não é viável (Bohner et al. 2011). Diversos métodos podem ser utilizados para analisar os poros: microscopia eletrônica de varredura, abordagens físico-químicas (adsorção e desorção de nitrogênio) e abordagens capilares (porosimetria de mercúrio) (Ho, 2006). No entanto, somente as técnicas avançadas de imageologia, tais como microtomografia computadorizada

( $\mu$ CT) (Ho & Hutmacher 2006, van Lenthe et al. 2007) e ressonância magnética (Potter et al. 2006), podem fornecer uma representação tridimensional do arcabouço.

Embora estas técnicas sejam extremamente úteis e potentes, todas possuem limitações. É exemplo disso a dificuldade em processar a grande quantidade de dados recolhidos. A determinação do tamanho médio dos poros é baseada na suposição de que os poros têm uma geometria específica (esferas, por exemplo), o que é obviamente uma aproximação (Bohner et al. 2011). Nesse caso, os autores utilizam uma aproximação do tamanho do poros (Muench & Holzer 2008). Neste estudo, cada poro foi aproximado ao valor do raio da esfera maior que pode conter o poro. A extração da rede de poros e gargantas é obtida por meio de análise computadorizada das esferas máximas que estão centradas nos voxels presentes no espaço poroso e são construídas de modo que o diâmetro alcance um tamanho máximo. A descrição detalhada do cálculo da rede de poros e gargantas utilizando os softwares Imago e C3DE foi descrita por Moreira et al. em 2014. Obviamente, dependendo da irregularidade do poros, uma esfera pode preencher uma porção maior do que o espaço poroso real. Esta abordagem prioriza a precisão porém pode gerar tamanhos de poros médios maiores. Segundo Bohner et al. em 2011, a dificuldade em definir perfeitamente a geometria da maioria dos arcabouços compromete a comparação dos resultados de vários estudos, porque o método utilizado para determinar o tamanho dos poros e a sua interconectividade varia de estudo para estudo.

As observações da MEV, que avaliaram somente a superfície externa do arcabouço, em 2D, mostraram de 45 a 74% dos poros abertos avaliando parcialmente cada amostra em 2 campos aleatórios. Enquanto isso, as observações obtidas pelo rede de poros e gargantas, que reflete a interconectividade entre os poros da amostra 3D variou entre amostras do mesmo grupo. A quantidade de porosidades fechadas, com ausência de interconectividade, foi menor no grupo com 70% de porosidade. Quando simulada a permeabilidade e fluxo de fluidos, observou-se um aumento da permeabilidade nestas amostras com 70% de porosidade. Isso sugere que as amostras de 70% de porosidade apresentam um espaço poroso mais adequado para a semear células, além de permitir um melhor crescimento e proliferação celular. O código computacional C3DE foi originalmente construído para aplicações de cálculo de permeabilidade em rochas reservatório de petróleo cujos valores de permeabilidade são bastante inferiores aos dos materiais objeto deste estudo. Ainda que os valores aqui obtidos parecem ser consistentes,



novas simulações de permeabilidade, incluindo outros métodos de cálculo, devem ser realizados para confirmação destes resultados.

Estudos sobre crescimento celular *in vitro* e *in vivo*, mostraram que o suprimento de nutrientes através de difusão e vascularização de implantes porosos apresenta melhores resultados com poros que variam de 100 a 800  $\mu\text{m}$  de tamanho e uma porosidade aberta superior a 50 % em volume como ideal para o crescimento ósseo (Karageorgiou & Kaplan 2005, Frosch et al. 2004). Outros estudos sugerem que a interconectividade dos poros, o diâmetro das gargantas, deve ser maior que 50  $\mu\text{m}$  para permitir a invaginação e crescimento de vasos sanguíneos (Karageorgiou & Kaplan 2005, Lu et al. 1999; Otsuki et al. 2006). Os resultados aqui observados mostraram que o raio médio das gargantas variou de 235 a 249  $\mu\text{m}$  nos grupos com 30% de porosidade e foi de 312  $\mu\text{m}$  no grupo com 70% de porosidade.

Embora um arcabouço altamente poroso tenha claramente grandes benefícios para a regeneração de tecidos, o aumento exagerado da porosidade também resulta em propriedades mecânicas pobres que podem levar à instabilidade estrutural na fase inicial de implantação (Zhao et al. 2008, Metsger et al. 1999, Karageorgiou & Kaplan 2005, Liu 1997, Rice 1993). Por isso, as propriedades mecânicas, especialmente o módulo de compressão, são particularmente importantes para os arcabouços desenhados para regeneração óssea, pois deveriam mimetizar as propriedades do osso natural (Gentile et al. 2016).

As diferenças na porosidade entre as amostras do mesmo grupo obtida pelo método empregado para a confecção dos arcabouços, observada na MEV e  $\mu\text{CT}$ , pode ser responsável pela alta variabilidade observada nos dados dos testes mecânicos de compressão. Em todos os fatores analisados, houve uma diferença nos valores, porém sem significância estatística. Em geral, a área de resistência de um material diminui com o aumento de tamanho dos poros, reduzindo a sua resistência mecânica (Al-Munajjed et al. 2009). Isso foi observado para as amostras com 70% de porosidade e também sem significância estatística.

A redução dos valores obtidos nos testes de compressão no grupo com 8% de sinvastatina e 30% de porosidade, quando comparada com o grupo com porosidade semelhante sem sinvastatina, pode ser atribuída à porcentagem de sinvastatina incorporada na amostra, com redução de 8% da massa do polímero e cerâmica bifásica bem como à heterogeneidade dos poros. Utilizando arcabouços porosos de PLGA, Qutachi et al. em 2014, observaram valores de módulo de Young

inferiores a 10MPa e resistência à compressão inferiores a 2MPa. Fang & Feng em 2014, mostraram que quanto maior a proporção de polímero em relação à cerâmica, maior a resistência mecânica e o módulo de Young. Yoshida et al. em 2015, utilizando arcabouço poroso de PLGA e TCP consideraram satisfatória a resistência à compressão de 0,8MPa. Zhang et al. em 2015, desenvolveram arcabouços com 65% de porosidade com PLGA cerâmica bifásica e obtiveram resistência de compressão em torno de 6MPa.

A fim de apoiar o preparo ósseo, o arcabouço deve manter estabilidade suficiente durante a degradação. A perda de peso e propriedade de intumescimento em arcabouços são parâmetros que influenciam o seu desempenho pois afetam a sua durabilidade, porosidade e permeabilidade (Gentile et al. 2014, Neghabat et al. 2015). Neste estudo, a macroestrutura externa dos arcabouços observadas pela MEV foi mantida no período de 40 dias, sugerindo que a maior perda de massa possa ter acontecido na região interna do arcabouço. O mesmo foi observado por Kim et al. em 2015.

A interface de interação do arcabouço *in vivo* não é um processo estático, mas dinâmico, em constante evolução pois leva em consideração a fisiopatologia óssea, fatores biomecânicos e maturação do osso (Daculsi, 1998). A estrutura computacional e a visão fornecida no presente estudo será útil na melhoria da concepção e análise de arcabouços porosos. Este arcabouço apresentou uma liberação lenta, gradual e prolongada de sinvastatina e pode ser promissor para a regeneração óssea. Esta liberação foi influenciada pela lenta degradação do arcabouço devido a forte interação química entre a sinvastatina e o polímero. A liberação de sinvastatina e a degradação e permeabilidade do arcabouço foi maior nas amostras em que o arcabouço possuía 70% de porosidade. A incorporação de sinvastatina ao arcabouço e o aumento de sua porosidade não influenciaram significativamente as propriedades mecânicas estudadas. Trabalhos futuros devem ser realizados para se estudar a habilidade destes arcabouços em induzir diferenciação osteogênica de MSCs e qual a dose-resposta mais adequada para a bioatividade desses arcabouços.

## REFERÊNCIAS

Al-Munajjed, A.A., Plunkett, N.A., Gleeson, J.P., Weber, T., Jungreuthmayer, C., Levingstone, T., Hammer, J., O'Brien, F.J. (2009) Development of a biomimetic collagen-hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering using a SBF immersion technique. *Journal of Biomedical Materials Research Part B* **90**, 584-591.

Annaz, B., Hing, K.A., Kayser, M., Buckland, T. & Di Silvio, L. (2004) Porosity variation in hydroxyapatite and osteoblast morphology: A scanning electron microscopy study. *Journal of Microscopy* **215**, 100–110.

Baek, K.H., Lee, W.Y., Tae, H.J., Lee, J.M., Han, J.H., Kang, M.I., Cha, B.Y., Lee, K.W., Son, H.Y. & Kang, S.K. (2005) The effect of simvastatin on the proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells. *Journal of Korean Medical Science* **20**, 438-44.

Banerjee, I., Mishra, D. & Maiti, T.K. (2009) PLGA Microspheres Incorporated Gelatin Scaffold: Microspheres Modulate Scaffold Properties. *International Journal of Biomaterials* **30**, 1-9.

Bignon, A., Chouteau, J., Chevalier, J., Fantozzi, G., Carret, J.P., Chavassieux, P., Boivin, G., Melin, M. & Hartmann, D. (2003) Effect of micro- and macroporosity of bone substitutes on their mechanical properties and cellular response. *Journal of Material Science: Materials in Medicine* **14**, 1089–1097.

Boerckel J.D., Kolambkar, Y.M., Dupont, K.M., Uhrig, B.A., Phelps, E.A., Stevens, H.Y., Garcia, A.J. & Goldberg, R.E. (2011) Effects of protein dose and delivery system on BMP-mediated bone regeneration. *Biomaterials*, **32**, 5241–51.

Bohner, M., Loosli, Y., Baroud, G. & Lacroix D. (2011) Commentary: Deciphering the link between architecture and biological response of a bone graft substitute. *Acta Biomaterialia* **7**, 478–484.

Boyd, A., Corsi, A., Quarto, R., Cancedda, R. & Bianco, P. (1999) Osteoconduction in large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: Evidence for a complementary integration and disintegration mechanism. *Bone* **24**, 579-89.

Buser, D., Dula, K., Hess, D., Hirt, H.P. & Belser, U.C. (1999) Localized ridge augmentation with autografts and barriers membranes. *Periodontology 2000* **19**, 151-63.

Cheng, D., Hou, J., Hao, L., Cao, X., Gao, H., Fu, X. & Wang, Y. (2015) Bottom-up topography assembly into 3D porous scaffold to

mediate cell activities. *Journal of Biomedical Materials Research Part B* **26**, 000-000.

Chiapasco, M., Casentini P. & Zaniboni M. (2009) Bone augmentation procedures in implant dentistry. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **24**, 237-259, 2009.

Chua, C.K., Leong, K.F., Tan, K.H., Wiria, F.E. & Cean, C.M. (2004) Development of tissue scaffolds using selective laser sintering of polyvinyl alcohol/hydroxyapatite biocomposite for craniofacial and joint defects. *Journal of Material Science: Material in Medicine* **15**, 1113–1121.

Cordeiro M.M., Dong, Z., Kaneko, T., Zhang, Z., Miyazawa, M., Shi, S., Smith, A.J. & Nör, J.E. (2008) Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *Journal of Endodontics* **34**, 962-9.

Cui, W., Li, X., Zhou, S. & Weng, J. (2008) Degradation patterns and surface wettability of electrospun fibrous materials. *Polym. Degrad. Stab.* **93**, 731–738.

Daculsi, G. (1998) Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials* **19**, 1473-1478.

Deckers, M.M, Van Bezooijen, R.L., Van Der Horst G, et al. (2002) Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* **143**, 1545-53.

Deisinger, U., Stenzel, F. & Ziegler, G. (2004) Development of hydroxyapatite ceramics with tailored pore structure. *Key Engineering Materials* **254–256**, 977–80.

Deschamps, A.A., Claase, M.B., Sleijster, W.J. & de Bruijn, J.D. (2002) Design of segmented poly(ether ester) materials and structures for the tissue engineering of bone. *Journal of Controlled Release* **78**, 175–86.

Duan, B., Wang, M. & Soc, J.R. (2010) Customized Ca-P/PHBV nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering: design, fabrication, surface modification and sustained release of growth factor. *Interface* **7**, S615–629.

Dunne, M., Corrigan, O.I. & Ramtoola, Z. (2000) Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles. *Biomaterials* **21**, 1659–1668.

Dunne, M.M., Ramtoola, Z. & Corrigan, O.I. (2009) Fluphenazine release from biodegradable microparticles:

characterization and modelling of release. *Journal of Microencapsulation* **26**, 403–410.

Encarnação, I.C., Ferreira Xavier, C.C., Bobinski, F., Dos Santos, A.R., Corrêa, M., de Freitas, S.F., Aragonéz, A., Goldfeder, E.M. & Cordeiro, M.M. (2016) Analysis of bone repair and inflammatory process caused by simvastatin combined with PLGA+HA+ $\beta$ TCP Scaffold. *Implant Dentistry*, **25**, 140-148.

Fang, Z. & Feng, Q. (2014) Improved mechanical properties of hydroxyapatite whisker-reinforced poly(L-lactic acid) scaffold by surface modification of hydroxyapatite. *Materials Science and Engineering C* **35**, 190–194.

Fisher, P.D., Venugopal, G., Milbrandt, T.A., Hilt, J.Z., Puleo, D.A. (2015). Hydroxyapatite-reinforced in situ forming PLGA systems for intraosseous injection. *Journal of Biomedical Material Research Part A* **103**, 2365–2373.

Frosch, K., Barvencik, F., Viereck, V., Lohmann, C.H., Dresing, K., Breme, J., Brunner, E. & Sturmer, K.M. (2004) Growth behavior, matrix production, and gene expression of human osteoblasts in defined cylindrical titanium channels. *Journal of Biomedical Material Research Part A* **68**, 325–34.

Gao, C., Yang, B., Hu, H., Liu, J., Shuai, C. & Peng, S. (2013) Enhanced sintering ability of biphasic calcium phosphate by polymers used for bone scaffold fabrication. *Materials Science and Engineering C* **33**, 3802–3810.

Gentile, P., Chiono, V., Carmagnola, I. & Hatton, P.V. (2014) An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences* **15**, 3640-3659.

Gentile, P., Nandagiri, V.K., Daly, J., Chiono, V., Mattu, C., Tonda-Turo, C., Ciardelli, G. & Ramtoola, Z. (2016) Localised controlled release of simvastatin from porous chitosan–gelatin scaffolds engrafted with simvastatin loaded PLGA-microparticles for bone tissue engineering application. *Materials Science and Engineering C* **59**, 249–257.

Ghosh, S.K., Nandi, S.K., Kundu, B., Datta, S., De, D.K., Roy, S.K. & Basu, D. (2008). In Vivo Response of Porous Hydroxyapatite and b-Tricalcium Phosphate Prepared by Aqueous Solution Combustion Method and Comparison With Bioglass Scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **86**, 217–227.

Gotz, H.E., Muller, M., Emmel, A., Holzwarth, U., Erben, R.G. & Stangl, R. (2004) Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants. *Biomaterials* **25**, 4057–64.

Grayson, A.C.R., Cima, M.J. & Langer, R. (2005) Size and temperature effects on poly(lactic-co-glycolic acid) degradation and microreservoir device performance. *Biomaterials* **26**, 2137–2145.

Guan, L. & Davies, J.E. (2004) Preparation and characterization of a highly macroporous biodegradable composite tissue engineering scaffold. *Journal of Biomedical Material Research Part A* **71**, 480–487.

Habraken, W., Liao, H.B., Zhang, Z., Wolke, J.G.C., Grijpma, D.W., Mikos, A.G., Feijen, J. & Jansen, J.A. (2010) In vivo degradation of calcium phosphate cement incorporated into biodegradable microspheres. *Acta Biomaterialia* **6**, 2200–2211.

Hammerle C.H. & Karring T. (1998) Guided bone regeneration at oral implant sites. *Periodontology 2000* **17**, 151–75.

Han, X.Q., Dong, Z.H., Yu, X.R., Guo, C.C., Gu, X. & Wu, Z. (2014) Experimental study of tissue-engineered bone constructed with simvastatin carried by PLGA/CPC and bone marrow stromal cells. *Shanghai Kou Qiang yi Xue* **23**, 7–14.

Heljak, M.K., Swieszkowski, W., Lam, C.X.F., Hutmacher, D.W. & Kurzydłowski, K.J. (2012) Evolutionary design of bone scaffolds with reference to material selection. *International Journal for Numerical Methods in Biomedical Engineering* **28**, 789–800.

Hench, L.L. (1994) Bioceramics: from concept to clinic. *Journal of American Ceramic Society* **74**, 1487–510.

Hersel, U., Dahmen, C. & Kessler, H. (2003) RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* **24**, 4385–4415.

Hing, K.A., Annaz, B., Saeed, S., Revell, P.A. & Buckland, T. (2005) Microporosity enhances bioactivity of synthetic bone graft substitutes. *Journal of Material Science: Materials in Medicine* **16**, 467–475.

Ho M.H., Chiang, C.P. Liu, Y.F. Kuo, M.Y., Lin, S.K., Lai, J.Y. & Lee, B.S. (2011) Highly efficient release of lovastatin from poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles enhances bone repair in rats. *Journal of Orthopaedic Research* **29**, 1504–10.

Ho, S.T. & Hutmacher, D.W. (2006) A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds. *Biomaterials* **27**, 1362–76.

Hu, Z., Liu, Y., Yuan, W., Wu, F., Su, J. & Jin, T. (2011) Effect of bases with different solubility on the release behavior of risperidone loaded PLGA microspheres. *Colloids and Surfaces B* **86**, 206–11.

Huang, W., Shang, W.L., Li, D.H., Wu, W.W. & Hou, S.X. (2012) Simvastatin protects osteoblast against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage via inhibiting the upregulation of Nox4. *Molecular and Cellular Biochemistry* **360**, 71-7.

Huang, Y.X., Ren, J., Chen, C., Ren, T.B. & Zhou, X.Y. (2008) Preparation and properties of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA)/nano-hydroxyapatite (NHA) scaffolds by thermally induced phase separation and rabbit MSCs culture on scaffolds. *Journal of Biomaterials Applications* **22**, 409-432.

Hulbert, S.F., Young, F.A., Mathews, R.S., Klawitter, J.J., Talbert, C.D. & Stelling, F.H. (1970) Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *Journal of Biomedical Materials Research* **4**, 433–56.

Karageorgiou, V. & Kaplan, D. (2005) Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* **26**, 5474–5491.

Keaveny, T.M. & Hayes, W.C. (1993) Mechanical Properties of Cortical and Trabecular Bone. In *Bone Growth*, eds. Boca Raton, FL: CRC Press., pp. 285–344.

Keaveny, T.M., Morgan, E.F., Niebur, G.L. & Yeh, O.C. (2001) Biomechanics of trabecular bone. *Annual Review of Biomedical Engineering* **3**, 307–33.

Kim, J., McBride, S., Tellis, B., Alvarez-Urena, P., Song, Y.H., Dean, D.D., Sylvia, V.L., Elgandy, H., Ong, J. & Hollinger, J.O. (2012) Rapid-prototyped PLGA/beta-TCP/hydroxyapatite nanocomposite scaffolds in a rabbit femoral defect model. *Biofabrication* **4**, 025003.

Kim, J., Li, W.A., Sands, W. and Mooney, D.J. (2014) Effect of Pore Structure of Macroporous Poly(Lactide-co-Glycolide) Scaffolds on the in Vivo Enrichment of Dendritic Cells. *Appl. Mater. Interfaces* **6**, 8505–8512.

Kuboki, Y., Jin, Q. & Takita, H. (2001) Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis. *The Journal of Bone & Joint Surgery* **83**, S105–15.

Kupcsik, L., Meurya, T., Flury, M., Stoddart, M. & Alini, M. (2009) Statin-induced calcification in human mesenchymal stem cells is cell death related. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **13**, 4465-73.

- Kwon, S., Jun, Y., Hong, S., Lee, I., Kim, H. & Won, Y.Y. (2002) Calcium phosphate bioceramics with various porosities and dissolution rates. *Journal of the American Ceramic Society* **85**, 3129–31.
- Lanao, F.R.P., Leeuwenburgh, S.C.G., Wolke, J.G.C. & Jansen, J.A. (2011) In vitro degradation rate of apatitic calcium phosphate cement with incorporated PLGA microspheres. *Acta Biomaterialia* **7**, 3459–3468.
- Liu, C., Wu, Z. & Sun, H. (2009) The effect of simvastatin on mRNA expression of transforming growth factor- $\beta$ 1, bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor in tooth extraction socket. *International Journal of Oral Science* **1**, 90-98.
- Liu, D. (1997) Influence of porosity and pore size on the compressive strength of porous hydroxyapatite ceramic. *Ceramics International* **23**, 135–9.
- Lin, L., Gao, G. & Dong, Y. (2015) Bone regeneration using a freeze-dried 3D gradient-structured scaffold incorporating OIC-A006-loaded PLGA microspheres based on b-TCP/PLGA. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **26**, 3.
- Liu, Y., Zhang, X., Jin, X., Fan, C., Ye, H., Ou, M., Lv, L., Wu, G. & Zhou, Y. (2014) Bi-functionalization of a calcium phosphate-coated titanium surface with slow-release simvastatin and metronidazole to provide antibacterial activities and pro-osteodifferentiation capabilities. *Plos One* **9**, 97741.
- Lopes, C.M., Lobo, J.M.S. & Costa, P. (2005) Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Brazilian Journal of Pharmaceuticals Sciences* **41**, 143-154.
- Lu, J.X., Flautre, B., Anselme, K., Hardouin, P., Gallur, A., Descamps, M. & Thierry, B. (1999) Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo. *Journal of Material Science: Materials in Medicine* **10**, 111–20.
- Lu, L., Garcia, C.A. & Mikos, A.G. (1999) In vitro degradation of thin poly(DL-lactic-co-glycolic acid) films. *Journal of Biomedical Materials Research* **46**, 236–244.
- Lu, L., Peter, S.J., D Lyman, M., Lai, H., Leite, S.M., Tamada, J.A., Uyama, S., Vacanti, J.P., Langer, R. & Mikos, A.G. (2000) In Vitro and In Vivo Degradation of Porous Poly(DL-Lactic-co-Glycolic Acid) Foams. *Biomaterials* **21**, 1837–1845.
- Maciel-Oliveira, N., Bradaschia-Correa, V. & Arana-Chavez, V.E. (2011) Early alveolar bone regeneration in rats after topical administration of simvastatin. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology & Oral Radiology Endodontics* **112**, 170-9.



Maeda, T., Matsunuma, A., Kawane, T. & Horiuchi, N. (2001) Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **280**, 874–877.

Maeda, T., Kawane, T. & Horiuchi, N. (2003) Statins Augment Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Osteoblastic Cells via Inhibition of Protein Prenylation. *Endocrinology* **144**, 681-92.

Maeda, T., Matsunuma, A., Kurahashi, I., Yanagawa, T., Yoshida, H, Horiuchi, N. (2004) Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **92**, 458-471.

Metsger, D.S., Rieger, M.R. & Foreman, D.W. (1999) Mechanical properties of sintered hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramic. *Journal of Material Sciences: Materials in Medicine* **10**, 9-17.

Montazerolghaem, M., Engqvist, H. & Karlsson Ott, M. (2013) Sustained release of simvastatin from premixed injectable calcium phosphate cement. *Journal of Biomedical Materials Research A* **102**, 340-7.

Moreira, A.C., Kronbauer, D.P., Cunha, A.R., Ribeiro, A.A., Oliveira, M.V. & Fernandes, C.P. (2014) Quantitative Analysis of Titanium Samples by Means of the Pore-Throat Network Code Application. *Materials Science Forum* **802**, 501-506.

Moreira, A.C., Rouxinol, R.L.M., Santos, P.A.A., Fernandez, C.P., Ribeiro, A.A., Balestra, R.M., Oliveira, M.V. (2012) Three-Dimensional Stochastic Modeling And X-Ray Microtomography Applied To Titanium Scaffolds: A Comparative Approach. *Materials Science Forum* **727-728**, 67-72.

Muench, B. & Holzer, L. (2008) Contradicting geometrical concepts in pore size analysis attained with electron microscopy and mercury intrusion. *Journal of American Ceramic Society* **91**, 4059–67.

Mundy, G., Garrett, R. & Harris S. (1999) Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* **286**, 1946–1949.

Nandagiri, V.K., Mattu, C., Daly, J., Ramtools, Z., Ciardelli, G., Montevecchi, F.M. (2012) Preparation and Characterization of Simvastatin Loaded PLGA Microparticles for Tissue Engineering Applications. *Research in Pharmaceuticals Science* **10**.

Nath, S.D., Son, S., Sadiasa, A., Min, Y.K. & Lee, B.T. (2013) Preparation and characterization of PLGA microspheres by the electrospraying method for delivering simvastatin for bone regeneration. *International Journal of Pharmaceutics* **443**, 87-94.

Neghabat, S.R., Ronana, W., Rochev, Y., McHugh, P. (2016) Modelling the degradation and elastic properties of poly(lactic-co-glycolic acid) films and regular open-cell tissue engineering scaffolds. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **54**, 8-59.

Nyan, M., Sato, D., Oda, M., Machida, T., Kobayashi, H., Nakamura, T. & Kasugai, S. (2007) Bone Formation With the Combination of Simvastatin and Calcium Sulfate in Critical-Sized Rat Calvarial Defect. *Journal of Pharmacological Science* **104**, 384-6.

Nyan, M. Sato, D., Kihara, H., Machida, T., Ohya, K. & Kasugai, S. (2009) Effects of the combination with alpha-tricalcium phosphate and simvastatin on bone regeneration. *Clinical Oral & Implants Research* **20**, 280-7.

Ohnaka, K., Shimoda, S., Nawata, H., Shimokawa, H., Kaibuchi, K., Iwamoto, Y. & Takayanagi, R. (2001) Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of Rho-associated kinase in human osteoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **287**, 337-342.

Oliveira, M.V., Ribeiro, A.A., Moreira, A.C., Moraes, A.M.C., Appoloni, C.R. & Pereira, L. (2010) Comparison of Porosity Measurement Techniques for Porous Titanium Scaffolds Evaluation. *Materials Science Forum* **660-661**, 100-105.

Otsuki, B., Takemoto, M., Fujibayashi, S., Neo, M., Kokubo, T. & Nakamura, T. (2006) Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: three-dimensional micro-CT based structural analyses of porous bioactive titanium implants. *Biomaterials* **27**, 5892-900.

Ozeç, I., Kiliç, E., Gümüş, C. & Göze, F. (2007) Effect of local simvastatin application on mandibular defects. *Journal of Craniofacial Surgery* **18**, 546-50.

Pamula, E. & Menaszek, E. (2008) In vitro and in vivo degradation of poly(L-lactide-co-glycolide) films and scaffolds. *Journal of Material Science: Materials in Medicine* **19**, 2063-2070.

Park, J.B. (2009) The use of simvastatin in bone regeneration. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* **14**, 485-8.

Potter, K., Sweet, D.E., Anderson, P., Davis, G.R., Isogai, N., Asamura, S., Kusuhara, H. & Landis, W.J. (2006) Nondestructive studies of tissue-engineered phalanges by magnetic resonance microscopy and X-ray microtomography. *Bone* **38**, 350-8.

Qi, Y., Zhao, T., Yan, W., Xu, K., Shi, Z. & Wang, J. (2013) Mesenchymal stem cell sheet transplantation combined with locally

released simvastatin enhances bone formation in a rat tibia osteotomy model. *Cytotherapy* **15**, 44-56.

Qutachi, O., Vetsch, J.R., Gill, D., Cox, H., Scurr, D.J., Hofmann, S., Müller, R., Quirk, R.A., Shakesheff, K.M., Rahman, C.V. (2014) Injectable and porous PLGA microspheres that form highly porous scaffolds at body temperature. *Acta Biomaterialia* **10**, 5090–5098

Ramirez, L., Pastoriza, P. & Herrero-Vanrell, R. (1999) Biodegradable poly(DL-lactic-co-glycolic acid) microspheres containing tetracaine hydrochloride. In-vitro release profile. *Journal of Microencapsulation* **16**, 105–115.

Rice, R.W. (1993) Comparison of stress concentration versus minimum solid area based mechanical property-porosity relations. *Journal of Materials Sciences* **28**, 2187–90.

Roy, A., Jhunjunwala, S., Bayer, E., Fedorchak, M., Little, S.R. & Kumta, P.N. (2016) Porous calcium phosphate-poly (lactic-co-glycolic) acid composite bone cement: A viable tunable drug delivery system. *Materials Science and Engineering C* **59**, 92–101

Royer, A., Viguie, J.C., Heughebaert, M. & Heughebaert, J.C. (1993) Stoichiometry of hydroxyapatite: influence on the flexural strength. *Journal of Material Science: Materials in Medicine* **4**, 76–82.

Sadiasa, A., Kim, M.S. & Lee, B.T. (2013) Poly(lactide-co-glycolide acid)/biphasic calcium phosphate composite coating on a porous scaffold to deliver simvastatin for bone tissue engineering. *Journal of Drug Target* **21**, 719–729.

Sakai, V.T., Zhang, Z., Dong, Z., Neiva, K.G., Machado, M.A., Shi, S., Santos, C.F. & Nör, J.E. (2010) SHED Differentiate into Functional Odontoblasts and Endothelium. *Journal of Dental Research* **89**, 791-6.

Schumacher, M., Deisinger, U., Detsch, R. & Ziegler, G. (2010) Indirect rapid prototyping of biphasic calcium phosphate scaffolds as bone substitutes: influence of phase composition, macroporosity and pore geometry on mechanical properties. *Journal of Material Science: Materials in Medicine* **21**, 3119–3127.

Shirazi, R.N., Aldabbagh, F., Erxleben, A., Rochev, Y. & McHugh, P. (2014) Nanomechanical properties of poly(lactic-co-glycolic) acid film during degradation. *Acta Biomaterialia* **10**, 4695-703.

Sugiyama, M., Kodama, T., Konish, K., Abe, K., Asami, S. & Oikawa, S. (2000) Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein 2 in human osteosarcoma cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **271**, 688-92.

Sugiyama, O., An, D.S., Kung, S.P., Feeley, B.T., Gamradt, S., Liu, N.Q., Chen, I.S. & Lieberman, L.R. (2005) Lentivirus-Mediated Gene Transfer Induces Long-Term Transgene Expression of BMP-2 in Vitro and New Bone Formation in Vivo. *Molecular Therapy* **11**, 390-398.

Sung, H.J., Meredith, C., Johnson, C. & Galis, Z.S. (2004) The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. *Biomaterials* **25**, 5735-5742.

Tai, I., Fu, Y., Wang, C., Chang, J. & Hi, M. (2013) Local delivery of controlled-release simvastatin/PLGA/HAP microspheres enhances bone repair. *International Nanomedicine* **8**, 3895-3905.

Tayton, E., Purcell, M., Aarvold, A., Smith, J.O., Briscoe, A., Kanczler, J.M., Shakeshelf, K.M., Howdle, S.M., Dunlop, D.G. & Oreffo, R.O. (2014) A comparison of polymer and polymer-hydroxyapatite composite tissue engineered scaffolds for use in bone regeneration. An in vitro and in vivo study. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **102**, 2613-2624.

Tsuruga, E., Takita, H., Itoh, H., Wakisaka, Y. & Kuboki, Y. (1997) Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP- induced osteogenesis. *The Journal of Biochemistry* **121**, 317-24.

van Lenthe, G.H., Hagenmuller, H., Bohner, M., Hollister, S.J., Meinel, L. & Muller, R. (2007) Nondestructive micro-computed tomography for biological imaging and quantification of scaffold-bone interaction in vivo. *Biomaterials* **28**, 2479-90.

Verheyen, C.C., de Wijin, J.R., van Blitterswijk, C.A. & de Groot, K. (1992) Evaluation of hydroxylapatite/poly(l-lactide) composites: Mechanical behavior. *Journal of Biomedical Material Research* **26**, 1277-1296.

Vey, E., Rodger, C., Meehan, L., Booth, J., Claybourn, M., Miller, A.F. & Saiani, A. (2012) The impact of chemical composition on the degradation kinetics of poly(lactic-co-glycolic) acid copolymers cast films in phosphate buffer solution. *Polymer Degradation and Stability* **97**, 358-365.

Wadagaki, R., Mizuno, D., Yamawaki-Ogata, A., Satake, M., Kaneko, H., Hagiwara, S., Yamamoto, N., Narita, Y., Hibi, H. & Ueda, M.e (2011) Osteogenic induction of bone marrow-derived stromal cells on simvastatin-releasing, biodegradable, nano-to microscale fiber scaffolds. *Annuals of Biomedical Engineering* **39**, 1872-81.

Wei G. & Ma P.X. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/ polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **25**, 4749-4757.

Wiria, F.E., Leong, K.F., Chua, C.K. & Liu, Y. (2007) Poly-epsilon-caprolactone/hydroxyapatite for tissue engineering scaffold fabrication via selective laser sintering. *Acta Biomaterialia* **3**, 1–12.

Witt, C. & Kissel, T. (2001) Morphological characterization of microspheres, films and implants prepared from poly(lactide-co-glycolide) and ABA triblock copolymers: is the erosion controlled by degradation, swelling or diffusion? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **51**, 171–181.

Yamada, S., Nakamura, T., Kokubo, T., Oka, M. & Yamamuro, T. (1994) Osteoclastic resorption of apatite formed on apatite and wollastonite-containing glass ceramic by a simulated body fluid. *Journal of Biomedical Materials Research* **28**, 1357-63.

Yamashita, M., Otsuka, F., Mukai, T., Otani, H., Inagaki, K., Miyoshi, T., Goto, J., Yamamura, M. & Makino, H. (2008) Simvastatin antagonizes tumor necrosis factor inhibition of bone morphogenetic proteins-2-induced osteoblast differentiation by regulating Smad signaling and Ras/Rho-mitogen-activated protein kinase pathway. *Journal of Endocrinology* **196**, 601-613.

Yang, F., Cui, W., Xiong, Z., Liu, L., Bei, J. & Wang, S. (2006) Poly (L,L-lactide-co-glycolide)/tricalcium phosphate composite scaffold and its various changes during degradation in vitro. *Polymer Degradation and Stability* **91**, 3065–73.

Yoshida, T., Miyaji, H., Otani, K., Inoue, K., Nakane, K., Nishimura, H., Ibara, A., Shimada, A., Ogawa, K., Nishida, F., Sugaya, T., Sun, L., Fugetsu, B. & Kawanami, M. (2015) Bone augmentation using a highly porous PLGA/b-TCP scaffold containing fibroblast growth factor-2. *Journal of Periodontal Research* **50**, 265-273.

Yuan, H., Kurashina, K., De Bruijn, J.D., Li, Y., De Groot, K. & Zhang X. (1999) A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* **20**, 1799–1806.

Zhang, H.X., Xiao, G.Y., Wang, X., Dong, Z.G., Ma, Z.Y., Li, L., Li, Y.H., Pan, X. & Nie, L. (2015) Biocompatibility and osteogenesis of calcium phosphate composite scaffolds containing simvastatin-loaded PLGA microspheres for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Material Research Part A* **103**, 3250–3258.

Zhang, J., Dricu A. & Sjövall, J. (1997) Studies on the relationships between 7 alpha-hydroxylation and the ability of 25- and

27- hydroxycholesterol to suppress the activity of HMG-CoA reductase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1344**, 241-9.

Zhang, L.F., Yang de, J., Chen, H.C., Sun, R., Xu, L., Xiong, Z.C., Govender, T. & Xiong, C.D. (2008) An ionically crosslinked hydrogel containing vancomycin coating on a porous scaffold for drug delivery and cell culture. *International Journal of Pharmaceutics* **353**, 74–87.

Zhao, J., Guo, L.Y., Yang, X.B. & Weng, J. Preparation of bioactive porous HA/PCL composite scaffolds. *Applied Surface Science* **255**, 2942-6 (2008).

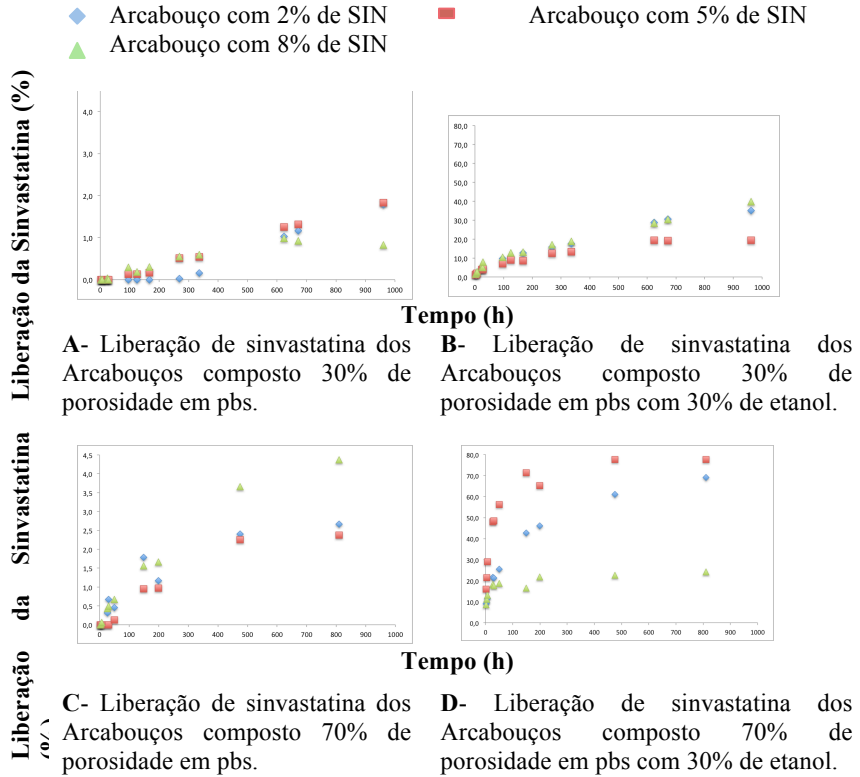
Zhou, W.Y., Lee, S.H., Wang, M., Cheung, W.L. & Ip, W.Y. (2008) Selective laser sintering of porous tissue engineering scaffolds from poly(L:-lactide)/carbonated hydroxyapatite nanocomposite microspheres. *Journal of Material Sciences: Materials in Medicine* **19**, 2535–2540.

Zhou, Y., Ni, Y., Liu, Y., Zeng, B., Xu, Y. & Ge, W. (2010) The role of simvastatin in the osteogenesis of injectable tissue-engineered bone based on human adipose-derived stromal cells and platelet-rich plasma. *Biomaterials* **31**, 5325-35.

## FIGURAS

**Figura 1:** Cilindro do arcabouço poroso de PLGA+HA/ $\beta$ TCP+SIN

**Figura 2:** Curvas de liberação de sinvastatina após 40 dias de “degradação”. A e C em PBS; B e D em PBS com 30% de etanol; E e F comparativo do comportamento da liberação das amostras com 30 e 70% de porosidade em ambos os meios, respectivamente.




**A-** Liberação de sinvastatina dos Arcabouços composto 30% de porosidade em pbs.

**B-** Liberação de sinvastatina dos Arcabouços composto 30% de porosidade em pbs com 30% de etanol.

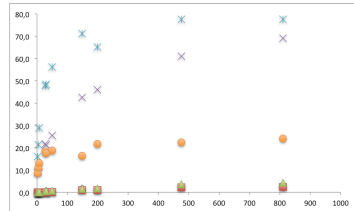
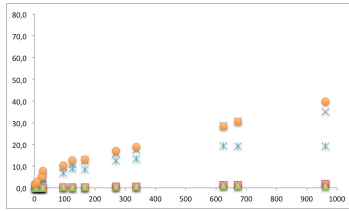
**C-** Liberação de sinvastatina dos Arcabouços composto 70% de porosidade em pbs.

**D-** Liberação de sinvastatina dos Arcabouços composto 70% de porosidade em pbs com 30% de etanol.



Liberação da Simvastatina (%)

- ◆ Arcabouço com 2% de SIN em PBS
- ▲ Arcabouço com 8% de SIN em PBS
- X Arcabouço com 2% de SIN em PBS e etanol
- Arcabouço com 5% de SIN em PBS e etanol
- Arcabouço com 5% de SIN em PBS
- X Arcabouço com 2% de SIN em PBS e etanol
- Arcabouço com 8% de SIN em PBS e etanol

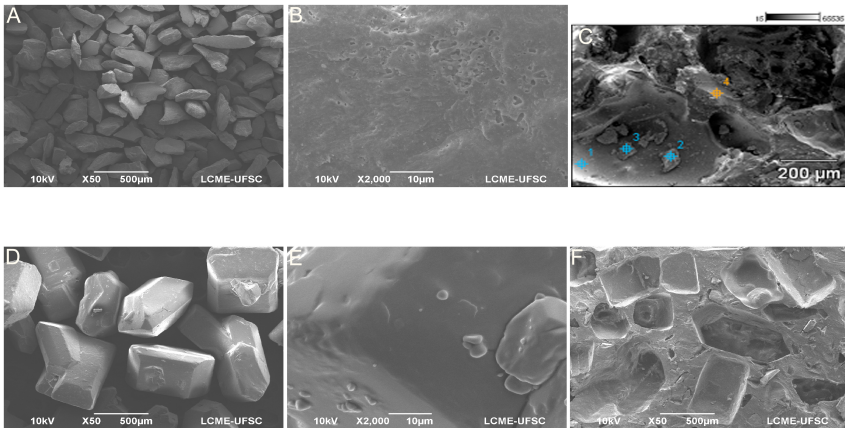


**Tempo (h)**

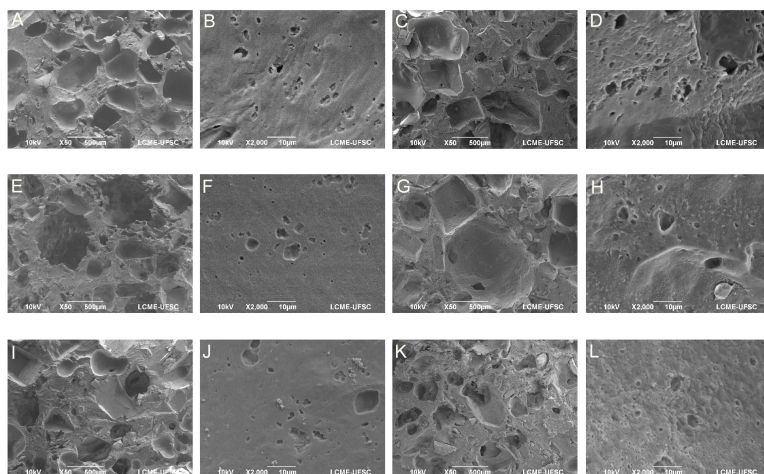
**E-** Liberação de simvastatina dos Arcabouços composto 30%.

**F-** Liberação de simvastatina dos Arcabouços composto 70%.

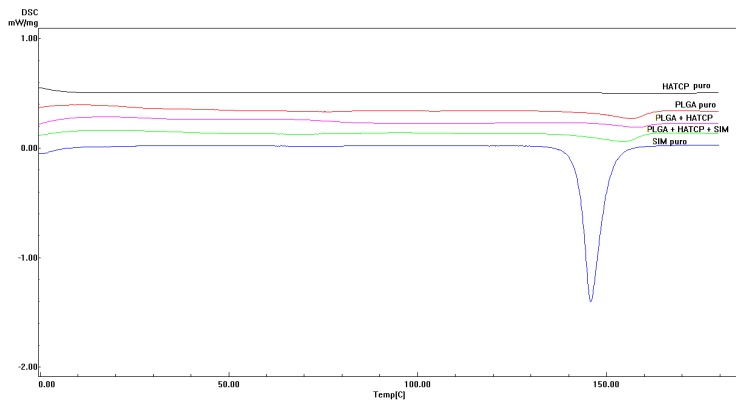
**Figura 3:** Imagens da MEV das partículas de cerâmica bifásica e de sacarose. A - Partículas de cerâmica bifásica (50X), B - Superfície da cerâmica bifásica evidenciando a sua rugosidade superficial (2000X), C - EDS pontual na superfície do arcabouço; nas regiões 1 e 4 identificamos composição química compatível com polímero e nas regiões 2 e 3 com partículas de cerâmica bifásica envoltas por polímero devido ao alto conteúdo de Ca e P, D - Partículas de sacarose (50X), E - Superfície do cristal de sacarose evidenciado a sua rugosidade superficial (2000X), F – Arcabouço (50X) com irregularidades na superfície compatíveis com o “negativo” das partículas de sacarose.



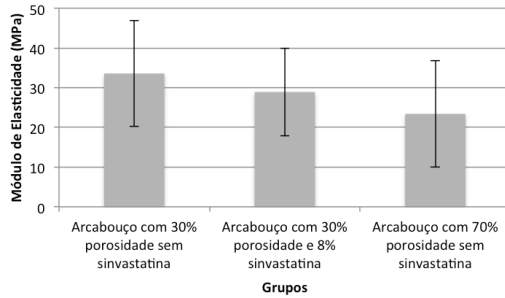
**Figura 4:** Imagens da MEV dos arcabouços com 30% de porosidade antes e após 40 dias de “degradação” e liberação de sinvastatina a 37°C e agitação constante. A, B, C, e D são arcabouços secos sendo, A e B - Arcabouços sem SIN 50X e 2.000X, respectivamente; C e D - Arcabouços com 8% de SIN 50X e 2.000X, respectivamente; E, F, G e H são arcabouços após 40 dias de “degradação” e liberação de sinvastatina em meio com PBS sendo, E e F - Arcabouços sem SIN 50X e 2.000X, respectivamente; G e H - Arcabouços com 8% de SIN 50X e 2.000X, respectivamente; I, J, K e L são arcabouços após 40 dias de “degradação” e liberação de sinvastatina em meio com PBS com 30% de etanol sendo, I e J - Arcabouços sem SIN 50X e 2.000X, respectivamente; K e L - Arcabouços com 8% de SIN 50X e 2.000X, respectivamente.



**Figura 5:** Termograma da calorimetria exploratória diferencial; amostras de cerâmica bifásica pura, PLGA, arcabouço poroso de PLGA+HA/ $\beta$ TCP, PLGA+HA/ $\beta$ TCP+SIN e sinvastatina.

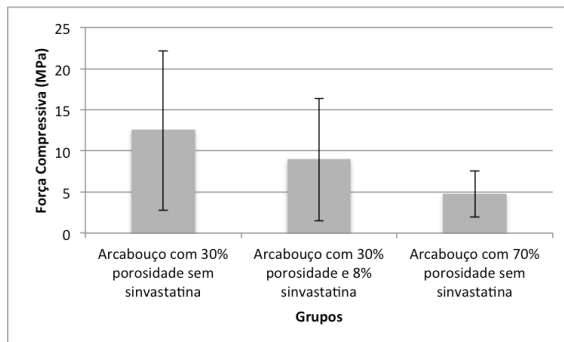


**Figura 6:** Dados obtidos do teste de compressão.



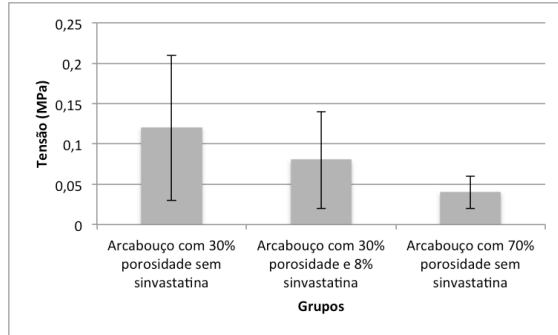
**A**

Módulo de elasticidade obtido pelo teste de compressão



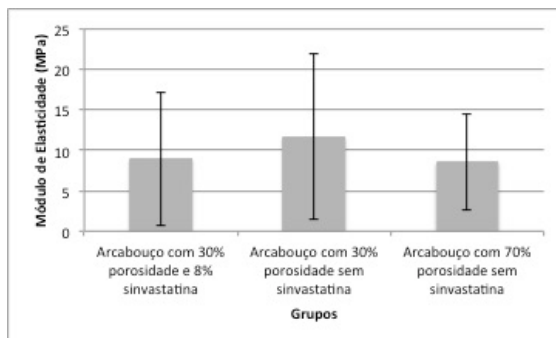
**B**

Força compressiva considerando 20% de deformação (MPa).



C

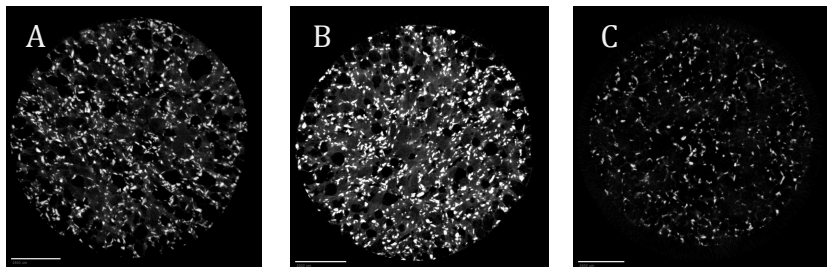
Tensão considerando 20% de deformação (MPa)



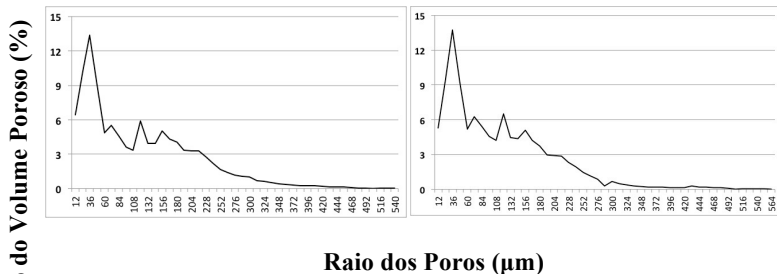
D

Módulo de elasticidade considerando 20% de deformação (MPa)

**Figura 7:** Seção transversal da  $\mu$ CT de amostras dos grupos (A) arcabouço com 30% de porosidade e sem SIN com resolução em 12,00  $\mu$ m e 1004x1024 pixels, (B) arcabouço com 30% de porosidade e 8% de SIN com resolução em 12,68  $\mu$ m e 1004x1024 pixels, e (C) arcabouço com 70% de porosidade sem SIN com resolução em 14,00  $\mu$ m e 1000x1024 pixels.

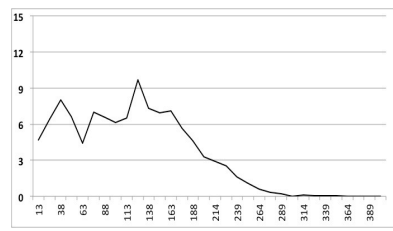
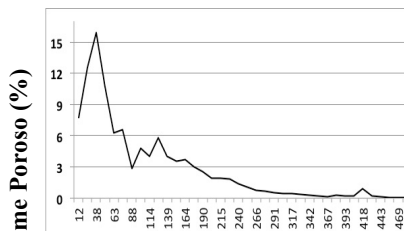


**Figura 8:** Distribuição de tamanho de poros - Fração do volume poroso.



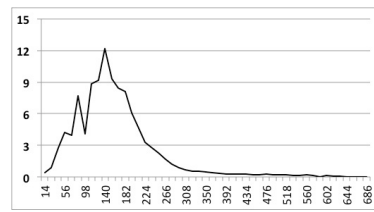
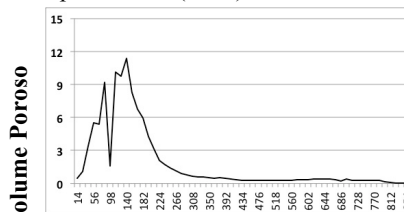
**A-** Arcabouço composto com 30% de porosidade (CP 1)

**B-** Arcabouço composto com 30% de porosidade (CP 2)



**C-** Arcabouço composto com 8% de SIN e 30% de porosidade (CP 3)

**D-** Arcabouço composto com 8% de SIN e 30% de porosidade (CP 4)



**E-** Arcabouço composto com 70% de porosidade (CP 5)

**F-** Arcabouço composto com 70% de porosidade (CP 6)

Fração do Volume Poroso (%)

Raio dos Poros ( $\mu\text{m}$ )

Fração do Volume Poroso (%)

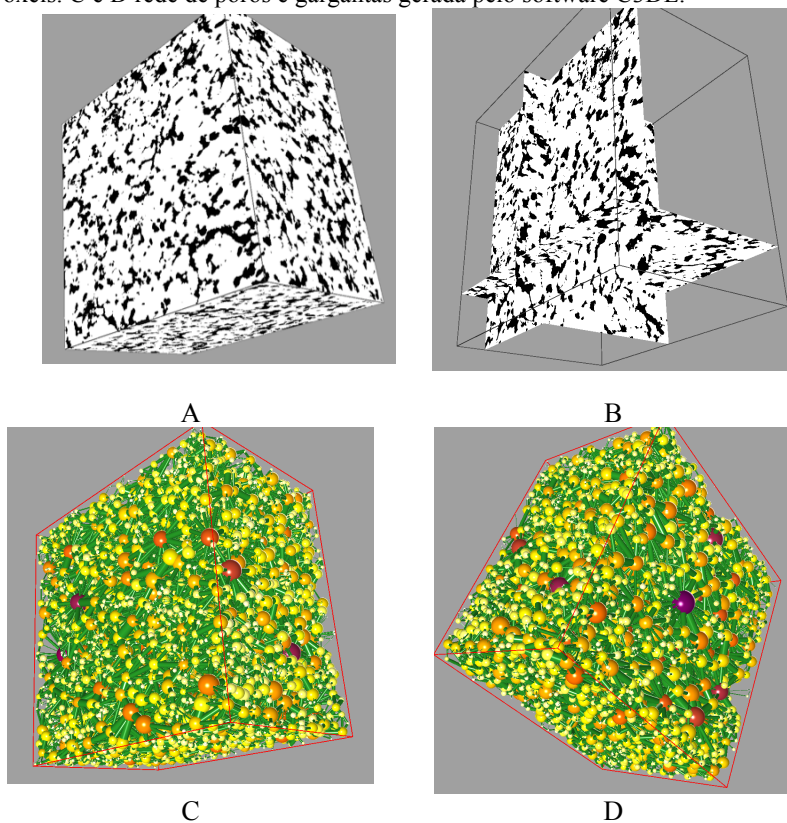
Raio dos Poros ( $\mu\text{m}$ )

Fração do Volume Poroso (%)

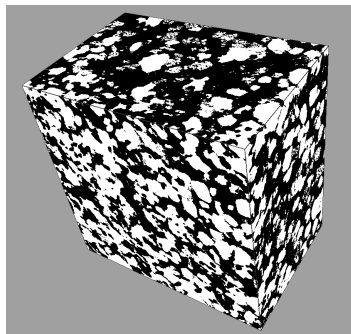
Raio dos Poros ( $\mu\text{m}$ )



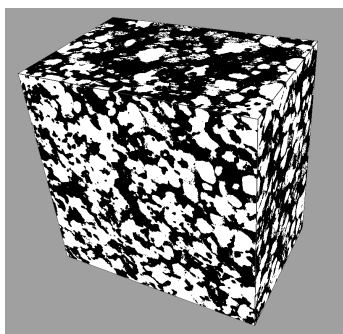
**Figura 9:** A e B - Volumes computacionais binários representativos do arcabouço com 70% de porosidade com resolução de 14,00  $\mu\text{m}$  e 600x600x400 voxels. C e D rede de poros e gargantas gerada pelo software C3DE.



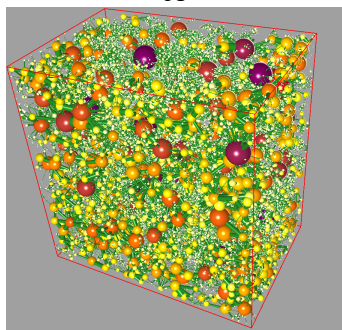
**Figura 10:** A e B - Volumes computacionais binários representativos do arcabouço com 30% de porosidade sem SIN com resolução de 12,00  $\mu\text{m}$  e 600x600x399 voxels. C e D rede de poros e gargantas gerada pelo software C3DE.



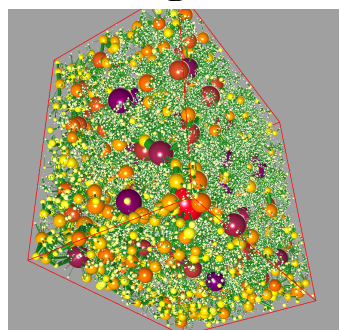
A



B



C



D

## TABELAS

**Tabela 1:** Grupos experimentais

<b>Grupos</b>	<b>Arcabouço composto com 30% de Porosidade</b>	<b>Arcabouço composto com 70% de Porosidade</b>
<b>Subgrupos</b>	Sem SIN	Sem SIN
	2% de SIN	2% de SIN
	5% de SIN	5% de SIN
	8% de SIN	8% de SIN

**Tabela 2:** Perfil de liberação de sinvastatina, em PBS, das amostras submetidas ao modelo cinético de Korsmeyer.

Grupos		k	n	b	R <sup>2</sup>
Arcabouço composto com 30% de porosidade	2% de SIN	0,00003	1,52	-0,06	0,98
	5% de SIN	0,00080	1,05	-0,03	0,99
	8% de SIN	0,03000	0,54	-0,09	0,99
Arcabouço composto com 70% de porosidade	2% de SIN	0,21300	0,25	-0,0003	0,98
	5% de SIN	0,02400	0,56	-0,05	0,99
	8% de SIN	0,01900	0,61	-0,028	0,99

**Tabela 3:** Perfil de liberação de sinvastatina, em PBS com 30% de etanol, das amostras submetidas ao modelo cinético de Peppas & Sahlim.

Grupos		K1	K2	m	R <sup>2</sup>
Arcabouço composto com 30% de porosidade	2% de SIN	0,003	0,016	0,30	0,98
	5% de SIN	0,190	0,020	0,15	0,99
	8% de SIN	0,020	0,002	0,44	0,99
Arcabouço composto com 70% de porosidade	2% de SIN	0,08	-0,002	0,48	0,98
	5% de SIN	0,19	-0,010	0,36	0,99
	8% de SIN	0,41	-0,040	0,21	0,99

**Tabela 4:** Perda de massa após o período de liberação, em PBS e em PBS com 30% de etanol, observada nos grupos de arcabouço composto com 70% de porosidade.

	Arcabouço com 70% de porosidade	Perda de massa (%)
Em PBS	2% de SIN	5,32
	5% de SIN	6,30
	8% de SIN	4,37
Em PBS com 30% de etanol	2% de SIN	7,80
	5% de SIN	8,58
	8% de SIN	10,10

**Tabela 5:** Estatísticas descritivas e ANOVA para o diâmetro dos macroporos

	Grupos	n	Media	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Secas	Sem SIN	75	273,07 <sub>ab</sub>	283,88	208,18	10,18	855,87
	2% SIN	128	305,79 <sub>ab</sub>	296,62	204,04	11,46	1076,28
	5% SIN	140	270,43 <sub>a</sub>	246,39	231,39	10,20	958,08
	8% SIN	121	287,89 <sub>ab</sub>	265,92	222,71	10,32	893,45
Em PBS	Sem SIN	102	316,63 <sub>ab</sub>	326,07	212,04	11,74	839,89
	2% SIN	195	342,96 <sub>ab</sub>	341,61	200,82	10,27	1087,73
	5% SIN	156	355,60 <sub>b</sub>	351,06	218,46	12,52	1002,94
	8% SIN	98	306,43 <sub>ab</sub>	294,07	214,96	0,02	1318,82
Em PBS com Etanol	Sem SIN	110	326,59 <sub>ab</sub>	335,42	213,95	10,85	984,27
	2% SIN	108	353,96 <sub>ab</sub>	367,16	229,05	11,03	867,92
	5% SIN	94	324,32 <sub>ab</sub>	366,79	238,82	10,11	899,67
	8% SIN	95	297,31 <sub>ab</sub>	274,45	172,74	10,38	754,03
	p		0,010				

Obs: médias seguidas com pelo menos uma letra igual indica que não há diferença significativa entre as médias ( $p > 0.05$ ) e seguida por letras diferentes indica que há diferença significativa entre as médias ( $p < 0.05$ ).

**Tabela 6:** Tabela comparativa da ocorrência dos formatos dos macroporos nos grupo experimentais.

Formato	Grupos												
	Secas				Em PBS				Em PBS com Etanol				
	Sem SIN	2% SIN	5% SIN	8% SIN	Sem SIN	2% SIN	5% SIN	8% SIN	Sem SIN	2% SIN	5% SIN	8% SIN	
Sacarose	n	35 a, b	54 a, b	51 a, b	47 a, b	41 a, b	51 b	55 a, b	47 a	42 a, b	37 a, b	25 a, b	33 a, b
	% dentro grupo	46	42	36	38	40	26	35	48	38	34	26	34
Esférico	n	40 a, b	74 a, b	89 a, b	74 a, b	61 a, b	144 b	101	51 a	68 a, b	71 a, b	69 a, b	62 a, b
	% dentro grupo	53	57	63	61	59	73	64	52	61	65	73	65
	N total	75	128	140	121	102	195	156	98	110	108	94	95

Obs: médias seguidas com pelo menos uma letra igual indica que não há diferença significativa entre as médias ( $p > 0.05$ ) e seguida por letras diferentes indica que há diferença significativa entre as médias ( $p < 0.05$ ).

**Tabela 7:** Tabela comparativa da ocorrência dos poros abertos e fechados nos grupo experimentais.

Aberto / Fechado		Grupos											
		Secas				Em PBS				Em PBS com Etanol			
		Sem SIN	2% SIN	5% SIN	8% SIN	Sem SIN	2% SIN	5% SIN	8% SIN	Sem SIN	2% SIN	5% SIN	8% SIN
Aberto	n	45 a,b,c	81 a,b,c	84 a,b,c	80 a,b,c	62 a,b,c	118 a,b,c	91 a,b,c	46 b,c	69 a,b,c	49 c	66 a,b	71 a
	% dentro grupo	60	63	60	66	60	60	58	46	62	45	70	74
Fechado	n	30 a,b,c	47 a,b,c	56 a,b,c	41 a,b,c	40 a,b,c	77 a,b,c	65 a,b,c	52 b,c	41 a,b,c	59 c	28 a,b	24 a
	% dentro grupo	40	36	40	33	39	39	41	53	37	54	29	25
Ntotal		75	128	140	121	102	195	156	98	110	108	94	95

Obs: médias seguidas com pelo menos uma letra igual indica que não há diferença significativa entre as médias ( $p>0.05$ ) e seguida por letras diferentes indica que há diferença significativa entre as médias ( $p<0.05$ ).

**Tabela 8:** Tabela comparativa dos diâmetros dos macroporos em formato de sacarose e esféricos.

		Sacarose	Esférico	P
Secas	Sem SIN	331,59	221,86	0,022
	2% SIN	344,20	277,76	0,069
	5% SIN	445,16	170,31	0,000
	8% SIN	391,66	221,98	0,000
Em PBS	Sem SIN	353,70	291,70	0,122
	2% SIN	402,26	321,95	0,007
	5% SIN	382,08	341,17	0,265
	8% SIN	350,57	265,76	0,047
Em PBS com etanol	Sem SIN	428,17	263,84	0,000
	2% SIN	443,71	307,19	0,001
	5% SIN	438,57	282,92	0,001
	8% SIN	380,37	253,11	0,001
Geral		389,44	274,50	0,000

**Tabela 9:** Estatísticas descritivas e ANOVA para o diâmetro das microirregularidades.

	Grupos	n	Media	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Secas	Sem SIN	252	1,69 a	1,20	1,46	0,25	9,27
	2% SIN	440	1,93 a	1,42	1,54	0,11	9,59
	5% SIN	314	2,54 ab	1,95	1,99	0,001	11,72
	8% SIN	237	7,97 b	1,74	88,66	0,29	1367,00
Em PBS	Sem SIN	397	1,72 a	1,24	1,51	0,001	8,92
	2% SIN	430	2,65 ab	2,04	1,93	0,001	9,90
	5% SIN	159	2,26 a	1,61	1,82	0,001	9,36
	8% SIN	456	1,94 a	1,55	1,42	0,18	8,94
Em PBS	Sem SIN	335	2,21 a	1,74	1,62	0,000	9,64
	2% SIN	259	2,42 a	1,64	1,94	0,39	9,73
	5% SIN	308	1,69 a	1,08	1,72	0,04	9,40
	8% SIN	627	1,36 a	0,97	1,23	0,14	10,31
	p		0,05				

Obs: médias seguidas com pelo menos uma letra igual indica que não há diferença significativa entre as médias ( $p > 0.05$ ) e seguida por letras diferentes indica que há diferença significativa entre as médias ( $p < 0.05$ ).

**Tabela 10:** Porosidade média dos grupos, obtida pelo Imago 2D

Grupos	Amostras	Porosidade (%)
Arcabouço composto com 30% de porosidade	CP 1	29,55
	CP 2	31,88
Arcabouço composto com 8% de SIN e 30% de porosidade	CP 3	23,21
	CP 4	44,56
Arcabouço composto com 70% de porosidade	CP 5	73,97
	CP 6	78,00



**Tabela 11:** Número de poros e número de gargantas obtidos pelo software C3DE.

Grupos	Amostras	Número de Poros	Número de Gargantas
Arcabouço composto com 30% de porosidade	CP 1	147918	160792
	CP 2	53138	224238
Arcabouço composto com 8% de SIN e 30% de porosidade	CP 3	99237	194615
	CP 4	122438	163423
Arcabouço composto com 70% de porosidade	CP 5	4927	18845
	CP 6	53139	108825

**Tabela 12:** Estatísticas descritivas e ANOVA para raio implícito.

Grupos	Arcabouço com 30% de porosidade	Arcabouço com 30% de porosidade e 8% de SIN	Arcabouço com 70% de porosidade	p
n	17689	22167	70603	
Media	300,38 b	294,69 b	345,30 a	0,0001
Mediana	274,24	261,95	252,44	
Desvio padrão	201,94	171,32	2.919,54	
Mínimo	13,52	16,36	0,02	
Máximo	999,99	999,83	368.197,00	

Obs: médias seguidas com pelo menos uma letra igual indica que não há diferença significativa entre as médias ( $p > 0.05$ ) e seguida por letras diferentes indica que há diferença significativa entre as médias ( $p < 0.05$ ).

**Tabela 13:** Estatísticas descritivas e ANOVA para número de gargantas.

Grupos	Arcabouço com 30% de porosidade	Arcabouço com 30% de porosidade e 8% de SIN	Arcabouço com 70% de porosidade	p
n	176892	221675	70602	
Media	4,09 b	3,23 c	4,93 a	0,0001
Mediana	3,00	2,00	4,00	
Desvio padrão	3,61	3,94	4,66	
Mínimo	0	0	0	
Máximo	136	193	145	

Obs: médias seguidas com pelo menos uma letra igual indica que não há diferença significativa entre as médias ( $p>0.05$ ) e seguida por letras diferentes indica que há diferença significativa entre as médias ( $p<0.05$ ).

**Tabela 14:** Estatísticas descritivas e ANOVA para raio implícito dos poros com nenhuma rede de gargantas.

Grupos	Arcabouço com 30% de porosidade	Arcabouço com 30% de porosidade e 8% de SIN	Arcabouço com 70% de porosidade	p
n	5390	12843	1660	
Media	227,90 b	256,99 c	221,30 a	0,0001
Mediana	243,50	254,82	233,85	
Desvio padrão	125,44	93,76	133,74	
Mínimo	13,52	16,36	13,29	
Máximo	975,32	979,69	979,58	

Obs: médias seguidas com pelo menos uma letra igual indica que não há diferença significativa entre as médias ( $p>0.05$ ) e seguida por letras diferentes indica que há diferença significativa entre as médias ( $p<0.05$ ).

**Tabela 15:** Estatísticas descritivas e ANOVA para raio implícito da rede de gargantas

Grupos	Arcabouço com 30% de porosidade	Arcabouço com 30% de porosidade e 8% de SIN	Arcabouço com 70% de porosidade	P
n	196605	262140	131440	
Media	235,17 b	249,46 c	312,77 a	0,0001
Mediana	214,72	218,32	238,77	
Desvio padrão	169,23	146,03	243,17	
Mínimo	13,52	16,362	12,34	
Máximo	999,99	999,98	999,89	

Obs: médias seguidas com pelo menos uma letra igual indica que não há diferença significativa entre as médias ( $p>0.05$ ) e seguida por letras diferentes indica que há diferença significativa entre as médias ( $p<0.05$ ).

**Tabela 16:** Permeabilidade e fluxo de fluidos.

Grupos	Amostras	Porosidade (%)	Permeabilidade (D)		
			Eixo X	Eixo Y	Eixo Z
Arcabouço composto com 30% de porosidade	CP 1	29,55	6,8	4,2	4,3
	CP 2	31,87	5,8	4,8	1,7
Arcabouço composto com 8% de SIN e 30% de porosidade	CP 3	44,56	7,6	6,6	3,5
	CP 4	23,21	5,8	5,4	4,6
Arcabouço composto com 70% de porosidade	CP 5	77,53	4.969,7	3.828,9	4.006,2



# CAPÍTULO IV



## CONCLUSÕES

Este estudo observou, *in vitro*, uma liberação lenta, gradual e prolongada de sinvastatina incorporada a um arcabouço poroso composto por PLGA e cerâmica bifásica. Esta liberação foi influenciada pela lenta degradação do arcabouço devido à forte interação química entre a sinvastatina e o polímero.

A liberação de sinvastatina e a degradação e permeabilidade do arcabouço foi maior nas amostras em que o arcabouço possuía 70% de porosidade.

A incorporação de sinvastatina ao arcabouço e o aumento de sua porosidade não influenciaram significativamente as propriedades mecânicas estudadas. A metodologia para obtenção de porosidade utilizada neste estudo gerou amostras com heterogeneidade de porosidades.

As características físico-químicas e mecânicas do arcabouço estudado mostram que este pode ser promissor para aplicação em abordagens de regeneração óssea.





# CAPÍTULO V



## REFERÊNCIAS

ALMIRALL A. et al. Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an a-TCP paste. **Biomaterials**, v.25, p.3671-80, 2004.

ARINZEH T.L. et al. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. **Biomaterials**, v.26, p.3631-3638, 2005.

ARINZEH T.L. et al. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. **J. Bone Joint Surg. Am.** v.85-A(10), p.1927-35, 2003.

BAEK KH. et al. The effect of simvastatin on the proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells. **J. Korean Med. Sci.**, v.20(3), p.438-44, 2005.

BAO T.Q. et al. Fabrication and characterization of porous poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres for use as a drug delivery system. **J. Mater. Sci.**, v.46, p.10-17, 2011.

BAO T.Q., FRANCO R.A., LEE B.T. Preparation and characterization of novel poly(caprolactone)/biphasic calcium phosphate hybrid composite microspheres. **J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.**, v.98(2), p.272-9, 2011.

BODEN S.D. Bioactive factors for bone tissue engineering. **Clin. Orthop Relat. Res.** v.84S, p.94, 1999.

BOERCKEL J.D. et al. Effects of protein dose and delivery system on BMP-mediated bone regeneration. **Biomaterials**, v.32(22), p.5241-51, 2011.

BOHNER M. et al. Commentary: Deciphering the link between architecture and biological response of a bone graft substitute. **Acta Biomater.** v.7, p.478-484, 2011.

BOULER J.M., LEGEROS R.Z., DACULSI, G. Biphasic calcium phosphates: influence of three synthesis parameters on the HA/beta-TCP ratio. **J. Biomed. Mater. Res.** v.51(4), p.680-4, 2000.

BUSER D., et al. Localized ridge augmentation with autografts and barriers membranes. **Periodontol** 2000. v.19, p.151-63, 1999.

CASAGRANDE L. et al. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. **Odontology.** v.99(1), p.1-7, 2011.

CHIAPASCO M., CASENTINI P., ZANIBONI M. Bone augmentation procedures in implant dentistry. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants., Lombard,** v.24, p.237-259, 2009.

CIAPETTI G., GRANCHI D., BALDINI N. The Combined Use of Mesenchymal Stromal Cells and Scaffolds for Bone Repair. **Curr Pharm Des.,** V.18(13), P. 1796-820, 2012.

CORDEIRO M.M., et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. **J. Endod,** v.34(8), p.962-9, 2008.

DACULSI G. Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. **Biomaterials,** v.19(16), p.1473–8, 1998.

DECKERS M.M. et al. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. **Endocrinology.,** v.143(4), p.1545-53, 2002.

DOLL B. et al. Critical aspects of tissue-engineered therapy for bone regeneration. **Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.** v.11(1-3), p.173-98, 2001.

DORAIRAJAN A., REDDY R.M., KRIKLER S. Outcome of acetabular revision using an uncemented hydroxiapatite-coated component: two- to five-year results and review. **J. Arthroplasty,** v.20(2), p.209-18, 2005.

DOROZHKIN SV. Bioceramics of calcium orthophosphates. **Biomaterials,** v.31, p.1465–1485, 2010.

EBERLI D., et al. Composite scaffolds for the engineering of hollow organs and tissues. **Methods,** v.47(2), p.109-15, 2009.

ELLINGER R.F., NERY E.B., LYNCH K.L. Histological assessment of periodontal osseous defects following implantation of hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate ceramics: A case report. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.** v.6(3), p.22-33, 1986.

ENCARNAÇÃO I.C. et al. Analysis of bone repair and inflammatory process caused by simvastatin combined with PLGA+HA+ $\beta$ TCP Scaffold. **Implant Dent.**, in press.

FISHER PD. et al. 2015. Hydroxyapatite-reinforced in situ forming PLGA systems for intraosseous injection. **J. Biomed. Mater. Res. Part A**, v.103(7), p.2365-73, 2015.

FRAYSSINT P. et al. Osteointegration of macroporous calcium phosphate ceramics having a different chemical composition. **Biomaterials**, v.14(6), p.423-9, 1993.

GAO K. et al. Neuroprotective Effect of Simvastatin via Inducing the Autophagy on Spinal Cord Injury in the Rat Model. **BioMed. Res. Int.**, v.2015, p.9, 2015.

GENTILE P. et al. An Overview of Poly(lactic-*co*-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering. **Int. J. Mol. Sci.** v.15, p.3640–3659, 2014.

GENTILE P. et al. Localised controlled release of simvastatin from porous chitosan–gelatin scaffolds engrafted with simvastatin loaded PLGA-microparticles for bone tissue engineering application. **Mat. Sci. Engineering C**, v.59, p.249–257, 2016.

GÓMEZ G., et al. Effect of FGF and polylactide scaffolds on calvarial bone healing with growth factor on biodegradable polymer. **J. Craniofac. Surg.**, v.17(5), p.935-42, 2006.

GUAN L, DAVIES JE. Preparation and characterization of a highly macroporous biodegradable composite tissue engineering scaffold. **J. Biomed. Mater. Res. Part A**. v.71, p.480-487, 2004.

HAMMERLE C.H., KARRING T. Guided bone regeneration at oral implant sites. **Periodontol 2000**. v.17: p.151-75, 1998.

HAN XQ. et al. Experimental study of tissue-engineered bone constructed with simvastatin carried by PLGA/CPC and bone marrow stromal cells. **Shanghai Kou Qiang yi Xue**, v.23(1), p.7-14, 2014.

HING K.A. Bioceramic Bone Graft Substitutes: Influence of Porosity and Chemistry. **Int. J. Appl. Ceram. Technol.** v.2, p.184–199, 2005.

HO M.H. et al. Highly efficient release of lovastatin from poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles enhances bone repair in rats. **J. Orthop. Res.** v.29(10), p.1504-10, 2011.

HSIA J., MORSE M., LEVIN V. Effect of simvastatin on bone markers in osteopenic women: a placebo-controlled, dose-ranging trial. **BMC Musculoskelet Disord** v.3, p.7, 2002.

HU Y. et al. Facile Fabrication of Poly(L-lactic Acid)-Grafted Hydroxyapatite/ Poly(lactic-co-glycolic Acid) Scaffolds by Pickering High Internal Phase Emulsion Templates. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v.6(19), p.17166-75, 2014.

HUANG W. et al. Simvastatin protects osteoblast against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage via inhibiting the upregulation of Nox4. **Mol. Cell. Biochem.** v.360(1-2), p.71-7, 2012.

HUANG Y.X. et al. Preparation and properties of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA)/nano-hydroxyapatite (NHA) scaffolds by thermally induced phase separation and rabbit MSCs culture on scaffolds. **J. Biomater. Appl.** v.22(5), p.409-432, 2008.

ISHIHARA K., et al. Adhesive bone cement containing hydroxiapatite particle as bone compatible filler. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.26(7), p.937-45, 1992.

JANSEN JA. et al. Growth factor-loaded scaffolds for bone engineering. **J. Control. Release**, v.101(1-3), p.127-36, 2005.

JIANG L.Y. et al. Degradation behavior of hydroxyapatite/poly(lactic-co-glycolic) acid nanocomposite in simulated body fluid. **Mater. Res. Bull.** v.48, p.4186–4190, 2013.

KADIYALA S., JAISWAL N., BRUDER S.P. Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-sized segmental bone defect. **Tissue Eng.** v.3(2), p.173-85, 1997.

KARAGEORGIU V., KAPLAN D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v.26(27), p.5474–91, 2005.

KIM J, et al. Rapid-prototyped PLGA/beta-TCP/hydroxyapatite nanocomposite scaffolds in a rabbit femoral defect model. **Biofabrication.**, v.4(2), p. ,2012.

KIM J. et al.. Effect of Pore Structure of Macroporous Poly(Lactide-co-Glycolide) Scaffolds on the in Vivo Enrichment of Dendritic Cells. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v.6(11), p.8505–12, 2014.

KUPCSIK L, et al. Statin-induced calcification in human mesenchymal stem cells is cell death related. **J. Cell. Mol. Med.** v.13(11-12), p.4465-73, 2009.

LANSMAN S. et al. Poly-L/D- lactide (PLDLA) fibrous implants: histological evaluation in the subcuts of experimental design. **J. Craniofac. Surg.**, v.17(6), p.1121-8, 2006.

LE GUEHENNEC L. et al. Small-animal models for testing macroporous ceramic bone substitutes. **J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.**, v.72(1), p.69-78, 2005.

LEBOURG M., SUAY ANTON J., GOMEZ RIBELLES J.L. Characterization of calcium phosphate layers grown on polycaprolactone for tissue engineering purposes. **Compos. Sci. Technol.**, v.70, p.1796-804, 2010.

LEE J.E. et al. Bone Regeneration with Rabbit Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells and Bone Graft Materials. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.27(6), p.1389-99, 2012.

LEGEROS RZ, DACULSI G. In vivo transformation of bisphasic calcium phosphate ceramics: Ultrastructural and physicochemical characterizations. In: Yamamuro T, Hench LL, Wilson J, editors. CRC Handbook of Bioactive Ceramics. Boca Raton: CRC Press; 1990. p 17–28.

LIN L., GAO H., DONG Y.. Bone regeneration using a freeze-dried 3D gradient-structured scaffold incorporating OIC-A006-loaded PLGA microspheres based on b-TCP/PLGA. **J. Mater. Sci. Mater. Med.** v.26(1), p.5327, 2015.

LIU X. et al. Hydroxyapatite/Biodegradable Poly(L-lactide-co-caprolactone) Composite Microparticles as Injectable Scaffolds by a Pickering Emulsion Route. **Acta Biomater.**, v.7(2), p.821-8, 2011.

LOPES M.A., MONTEIRO F.J., SANTOS, J.D. Glass-reinforced hydroxyapatite composites: fracture toughness and hardness dependence on microstructural characteristics. **Biomaterials.** v.20(21), p.2085-90, 1999.

MACIEL-OLIVEIRA N., BRADASCHIA-CORREA V., ARANA-CHAVEZ V.E. Early alveolar bone regeneration in rats after topical administration of simvastatin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 112(2), p. 170-9, 2011.

MAEDA T. et al. Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells. **J. Cell. Biochem.**, v. 92(3), p. 458-71, 2004.

MAEDA T., KAWANE T., HORIUCHI N. Statins Augment Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Osteoblastic Cells via Inhibition of Protein Prenylation. **Endocrinology.** v.144(2), p.681-92, 2003.

MCALLISTER B.S., HAGHGAT K. Bone augmentation techniques. **J Periodontol.** v.78(3), p.377-96, 2007.

MONTAZEROLGHAEM M., ENGQVIST H., KARLSSON OTT M. Sustained release of simvastatin from premixed injectable calcium phosphate cement. **J Biomed Mater Res A.**, v.102(2), p.340-7, 2013.

MUNDY G. et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. **Science.** v.286(5446), p.1946-9, 1999.

NAIR, A. et al. Biomaterial Implants Mediate Autologous Stem Cell Recruitment in Mice. **Acta Biomater.**, v.7(11), p.3887–95, 2011.



NANDAGIRI V.K. et al. Preparation and Characterization of Simvastatin Loaded PLGA Microparticles for Tissue Engineering Applications. **Current Res. Pharmaceut. Sci.**, v.2, p.81-90, 2012.

NATH SD. et al. Preparation and characterization of PLGA microspheres by the electrospraying method for delivering simvastatin for bone regeneration. **Int. J. Pharm.** v.443(1-2), p.87-94, 2013.

NUTTELMAN C.R., TRIPODI M.C., ANSETH K.S. Dexamethasone-functionalized gels induce osteogenic differentiation of encapsulated hMSCs. **J. Biomed. Mater. Res. A**, v.76A, p.183–195, 2006.

NYAN M. et al. Bone Formation With the Combination of Simvastatin and Calcium Sulfate in Critical-Sized Rat Calvarial Defect. **J Pharmacol Sci.** v.104(4), p.384-6, 2007.

NYAN M. et al.. Effects of the combination with alpha-tricalcium phosphate and simvastatin on bone regeneration. **Clin Oral Implants Res.** v.20(3), p.280-7, 2009.

OHNAKA K. et al. Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of Rho- associated kinase in human osteoblasts. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.267(2), p.337-42, 2001.

OZEÇ I. et al. Effect of local simvastatin application on mandibular defects. **J. Craniofac. Surg.** v.18(3), p.546-50, 2007.

PARK J.B. The use of simvastatin in bone regeneration. **Med. Oral Patol. Oral Cir.Bucal.**, v.14(9), p.485-8, 2009.

QI Y. et al.. Mesenchymal stem cell sheet transplantation combined with locally released simvastatin enhances bone formation in a rat tibia osteotomy model. **Cytotherapy.** v.15(1), p.44-56, 2013.

RAMAKRISHNA S.M.J., WINTERMANTEL E., LEONG K. Biomedical applications of polymer–composite materials: a review. **Composites Science and Technology.** v.61, p.34, 2001.

RANI M., AGARWAL A., NEGI, Y.S. Characterization and biodegradation studies for interpenetrating polymeric network (IPN) of chitosan- amino acid beads. **J. Biomed. Sci. Eng.**, v.2, p.71-84, 2011.

REZWAN K. et al. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v.27(18), p.3413-31, 2006.

RIOS HF. et al. Cell- and gene-based therapeutic strategied for periodontal regenerative medicine. **J Periodontol.**, v.82(9), p.1223-37, 2001.

ROY A. et al. Porous calcium phosphate-poly (lactic-co-glycolic) acid composite bone cement: A viable tunable drug delivery system. **Mat. Sci. Engineering C**, v.59, p.92–101, 2016.

SADIASA A., KIM M.S., LEE B.T. Poly(lactide-co-glycolide acid)/biphasic calcium phosphate composite coating on a porous scaffold to deliver simvastatin for bone tissue engineering. **J Drug Target.**, v.21(8), p.719–729, 2013.

SAITO E., et al. Experimental and computational characterization of designed and fabricated 50:50 PLGA porous scaffolds for human trabecular bone applications. **J. Mater. Sci. Mater. Med.** v.21(8), p.2371-83, 2010.

SAKAI V.T., et al. SHED Differentiate into Functional Odontoblasts and Endothelium. **J. Dent. Res.**, v.89(8), p.791-6, 2010.

SHEN H. et al. Cell Affinity for bFGF Immobilized Heparin-Containing Poly(lactide-co-glycolide) Scaffolds. **Biomaterials**, v.32(13), p.3404-12, 2011.

SUGIYAMA M. et al. Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein 2 in human osteosarcoma cells. **Biochem & Biophys. Res. Commun.**, v.271(3), p.688-92, 2000.

TACHIBANA A. et al. Modified keratin sponge: binding of bone morphogenetic protein-2 and osteoblast differentiation. **J. Biosci. Bioeng.**, v.102, p.425–429, 2006.

TAKENAKA M. et al. Simvastatin stimulates VEGF release via p44/p42 MAP kinase in vascular smooth muscle cells. **Biochem Biophys Res Commun.** v.301(1), p.198-203, 2003.

TAYTON E. et al. A comparison of polymer and polymer-hydroxyapatite composite tissue engineered scaffolds for use in bone regeneration. An in vitro and in vivo study. **J. Biomed. Mater. Res. Part A**, v.102A, p.2613–2624, 2014.

THEVENOT P.T. et al. The Effect of Incorporation of SDF-1 $\alpha$  into PLGA Scaffolds on Stem Cell Recruitment and the Inflammatory Response. **Biomaterials**, v.31(14), p.3997–4008, 2010.

TODD P.A., GOA K.L. Simvastatin. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in hypercholesterolaemia. **Drugs**, v.40(4), p.583-607, 1990.

UNGER R.E. et al. The rapid anastomosis between prevascularized networks on silk fibroin scaffolds generated in vitro with cocultures of human microvascular endothelial and osteoblast cells and the host vasculature. **Biomaterials**. v.31(27), p.6959-67, 2010.

VALLET-REGI M. Ceramics for medical applications. **J. Chem. Soc.**, v.97, p.108, 2001.

VERHEYEN CC. et al. Evaluation of hydroxylapatite/poly(l-lactide) composites: Mechanical behavior. **J. Biomed. Mater. Res.** v.26(10), p.1277-1296, 1992.

VEY E. et al. The impact of chemical composition on the degradation kinetics of poly(lactic-co-glycolic) acid copolymers cast films in phosphate buffer solution. **Polymer Degrad. Stability**, v.97, p.358-365, 2012.

VON STECHOW D. et al. Does simvastatin stimulate bone formation in vivo? **BMC Musculoskelet. Disord.**, v.28, p.4-8, 2003.

WADAGAKI R. et al. Osteogenic induction of bone marrow-derived stromal cells on simvastatin-releasing, biodegradable, nano-to-microscale fiber scaffolds. **Ann Biomed Eng.** v.39(7), p.1872-81, 2011.

WAGONER JOHNSON A.J., HERSCHLER B.A. A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair. **Acta Biomater.**, v.7(1), p.16-30, 2011.

WALTER D.H., ZEIHNER A.M., DIMMELER S. Effects of statins on endothelium and their contribution to neovascularization by mobilization of endothelial progenitor cells. **Coron. Artery Dis.**, v.15(5), p.235-42, 2004.

WEI G., MA P.X. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**; v.25(19), p.4749-4757, 2004.

WHANG K. et al. A novel osteotropic biomaterial OG-PLG: Synthesis and in vitro release. **J. Biomed. Mater. Res. A.** v.74(2), p.237-46, 2005.

WU Z. et al. The effect of simvastatin on remodelling of the alveolar bone following tooth extraction. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.** v.37(2), p.170-6, 2008.

YAMASHITA M. et al. Simvastatin inhibits osteoclast differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 and RANKL through regulating MAPK, AKT and Src signaling. **Regul. Pept.** v.162(1-3), p.99-108, 2010.

YANG F. et al. Poly (L,L-lactide-co-glycolide)/tricalcium phosphate composite scaffold and its various changes during degradation in vitro. **Polym. Degrad. Stab.** v.91, p.3065-73, 2006.

YAZAWA H. et al. Simvastatin promotes cell metabolism, proliferation, and osteoblastic differentiation in human periodontal ligament cells. **J. Periodontol.**, v.76, p.295-302, 2005.

YOSHIDA T. et al. Bone augmentation using a highly porous PLGA/b-TCP scaffold containing fibroblast growth factor-2. **J. Periodont. Res.**, v.50, p.265-273, 2015.

YUAN H. et al. Bone morphogenetic protein and ceramic-induced osteogenesis. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v.9(12), p.717-21, 1998.

Zhang H-X. et al. Biocompatibility and osteogenesis of calcium phosphate composite scaffolds containing simvastatin-loaded PLGA microspheres for bone tissue engineering. **J Biomed Mater Res Part A**, v.103A, p.3250-3258, 2015.

ZHANG J., DRICU A., SJÖVALL, J. Studies on the relationships between 7 alpha-hydroxylation and the ability of 25- and 27-hydroxycholesterol to suppress the activity of HMG-CoA reductase. **Biochim Biophys Acta**. v.1344(3), p.241-9, 1997.

ZHANG L.F. et al. An ionically crosslinked hydrogel containing vancomycin coating on a porous scaffold for drug delivery and cell culture. **Int. J. Pharm.**, v.353, p.74–87, 2008.

ZHOU Y. et al. The role of simvastatin in the osteogenesis of injectable tissue-engineered bone based on human adipose-derived stromal cells and platelet-rich plasma. **Biomaterials**. v.31(20), p.5325-35, 2010.



# CAPÍTULO VI





## ANEXO A

## TABELAS E FIGURAS CITADOS E NÃO APRESENTADOS NO ARTIGO

**Tabela 1:** Dados do início da liberação de sinvastatina em PBS e PBS com 30% de etanol.

Grupo	Início da liberação de SIN (d)			Quantas mg liberou	
	PBS	PBS com 30% de etanol	com de	PBS	PBS + 30% de etanol
Arcabouços com 30% de porosidade	2% 11	5% 7	8% 1	Imediato	Imediato
Arcabouços com 70% de porosidade	2% 1	5% 2	8% 1 (5h)	Imediato	Imediato
				0,0022(0,2%)	0,0757(1,1%)
				0,0277 (0,1%)	0,1602 (1,1%)
				0,0067 (0,3%)	0,4657 (1,6%)
				0,0149 (0,3%)	0,4917 (9%)
				0,0146 (0,1%)	0,9897 (16%)
				0,0063 (0,1%)	0,8994 (8,5%)

**Tabela 2:** Dados da liberação, em massa (mg) de sinvastatina em 50ml, nas amostras de arcabouço composto poroso de 30% de porosidade com 2, 5 e 8% de sinvastatina.

Tempo (h)	Em solução de PBS			Em solução de PBS com 30% de etanol		
	2% de SIN	5% de SIN	8% de SIN	2% de SIN	5% de SIN	8% de SIN
2	0	0	0	0,075	0,160	0,465
5	0	0	0	0,072	0,215	0,610
7	0	0	0	0,126	0,724	0,775
24	0	0	0,006	0,307	0,564	1,519
26	0	0	0,001	0,303	0,567	1,506
28	0	0	0,036	0,345	0,630	2,318
96	0	0	0,071	0,691	1,017	3,061
125	0	0	0,048	0,780	1,300	3,820
167	0	0,027	0,077	0,901	1,2588	3,922
269	0,002	0,084	0,144	1,118	1,832	5,095
336	0,012	0,089	0,156	1,241	1,954	5,683
624	0,078	0,205	0,256	2,036	2,841	8,658
672	0,089	0,215	0,241	2,169	2,817	9,167
961	0,137	0,299	0,220	2,460	2,825	12,308
Peso da amostra (mg)	332,1	339,0	367,0	310,4	305,1	414,2
SIN incorporada (mg)	7,67	16,3	26,9	7,17	14,67	30,36

**Tabela 3:** Dados da liberação, em massa (mg) de sinvastatina em 50ml, nas amostras de arcabouço composto poroso e 70% de porosidade com 2, 5 e 8% de sinvastatina.

Tempo (h)	Em solução de PBS			Em solução de PBS com 30% de etanol		
	2% de SIN	5% de SIN	8% de SIN	2% de SIN	5% de SIN	8% de SIN
2	0	0	0	0,491	0,989	0,8994
5	0	0	0,006	0,547	1,277	1,1539
7	0	0	0,008	0,634	1,749	1,3376
27	0,014	0	0,053	1,151	2,891	1,9020
30	0,020	0	0,061	1,129	2,909	1,8203
50	0,017	0,014	0,083	1,395	3,364	1,9578
149	0,043	0,084	0,189	2,272	4,319	1,6469
199	0,027	0,087	0,198	2,403	3,958	2,2257
475	0,063	0,199	0,439	3,022	4,775	2,3411
810	0,070	0,206	0,525	3,117	5,000	2,5090
Peso da amostra (mg)	140,3	164,2	151,6	202,8	129,8	129,8
SIN incorporada (mg)	2,80	8,21	12,12	4,05	6,49	10,38

**Tabela 4:** Estatísticas descritivas das partículas de cerâmica bifásica avaliadas nas imagens obtidas pela MEV.

	n	Media	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Maior diâmetro das partículas	168	283,83	270,61	95,50	4,45	583,50
Diâmetro das irregularidades de superfície	212	0,82	0,65	0,59	0,11	3,67

**Tabela 5:** Estatísticas descritivas dos cristais de sacarose avaliadas nas imagens obtidas pela MEV.

	n	Media	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Maior diâmetro dos cristais de sacarose	54	578,33	586,55	187,50	187,57	1142,09
Irregularidades de superfície	210	7,03	2,95	11,52	0,19	111,80

**Tabela 6:** Análise comparativa do módulo de elasticidade

	Arcabouço com 30% porosidade sem SIN	Arcabouço com 30% porosidade e 8% SIN	Arcabouço com 70% porosidade sem SIN	p
n	9	5	8	
Média	33,56	28,91	23,39	0,946
Mediana	32,46	27,49	27,17	
desvio padrão	13,30	11,03	13,37	
mínimo	17,25	18,10	5,84	
máximo	55,13	45,55	40,09	

**Tabela 7:** Análise comparativa da deformação considerada 20% de deformação (mm)

	30% porosidade sem SIN	30% porosidade com 8% SIN	70% porosidade sem SIN	p
N	9	5	9	
Média	0,011	0,011	0,007	0,092
Mediana	0,010	0,008	0,005	
Desvio Padrão	0,005	0,006	0,003	
Mínimo	0,006	0,005	0,004	
máximo	0,023	0,017	0,012	

**Tabela 8:** Análise comparativa da força compressiva considerando 20% de deformação (MPa)

	Arcabouço com 30% porosidade sem SIN	Arcabouço com 30% porosidade e 8% SIN	Arcabouço com 70% porosidade sem SIN	p
n	10	5	9	
Média	12,48	8,91	4,72	
Mediana	9,36	9,28	5,57	0,179
Desvio padrão	9,70	7,44	2,81	
Mínimo	2,36	1,18	0,68	
máximo	29,01	18,89	8,94	

**Tabela 9:** Análise comparativa da tensão obtida com 20% de deformação (Mpa)

	Arcabouço com 30% porosidade sem SIN	Arcabouço com 30% porosidade e 8% SIN	Arcabouço com 70% porosidade sem SIN	p
n	9	5	9	
Média	0,12	0,08	0,04	
Mediana	0,11	0,08	0,05	0,189
Desvio padrão	0,09	0,06	0,02	
Mínimo	0,02	0,01	0,01	
máximo	0,27	0,16	0,08	

**Tabela 10:** Análise comparativa do módulo de elasticidade considerando 20% de deformação (MPa)

	Arcabouço com 30% porosidade sem SIN	Arcabouço com 30% porosidade com 8% SIN	Arcabouço com 70% porosidade sem SIN	p
N	9	5	9	
Média	11,63	8,92	8,57	
Mediana	4,73	9,42	10,08	0,906
Desvio padrão	12,22	8,24	5,97	
Mínimo	1,14	0,61	0,49	
máximo	30,25	21,31	16,28	

**Tabela 11:** Região de interesse (ROI) selecionada para análise.

Grupos	Amostras	Resolução ( $\mu\text{m}$ )	Volume (Voxels <sup>3</sup> )
Arcabouço composto com 30% de porosidade	CP 1	12,00	600x600x633
	CP 2	12,00	600x600x800
Arcabouço composto com 8% de SIN e 30% de porosidade	CP 3	12,68	600x600x802
	CP 4	12,56	600x600x799
Arcabouço composto com 70% de porosidade	CP 5	14,00	600x600x800
	CP 6	14,00	600x600x799

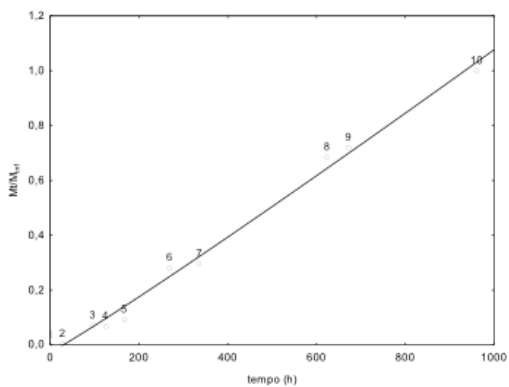
**Tabela 12:** Correlação entre raio implícito e número de gargantas em cada grupo.

GRUPO	Correlação
Arcabouço com 30% de porosidade	0,32
Arcabouço com 30% de porosidade e 8% de SIN	0,18
Arcabouço com 70% de porosidade	0,03

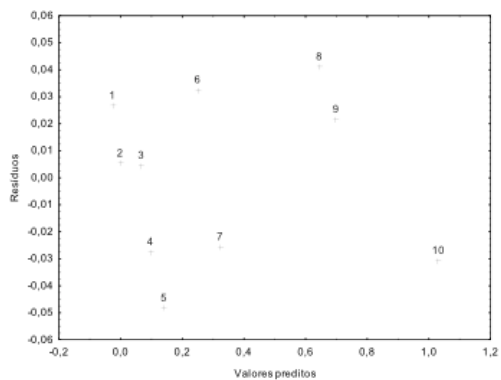
**Tabela 13:** Contagem do número de poros que não tem nenhuma rede de gargantas.

Número de gargantas	Arcabouço com 30% de porosidade		Arcabouço com 30% de porosidade e 8% de SIN		Arcabouço com 70% de porosidade	
	n	%	n	%	n	%
0	5394	2,2	12843	5,2	1735	0,7
Maiores que 0	239490	97,8	232041	94,8	243149	99,3
Total	244884		244884		244884	

**Figura 1:** Ajustes da cinética de liberação de sinvastatina exemplificado no grupo de arcabouço composto poroso com 5% de sinvastatina com 30% de porosidade em PBS. Em A, o gráfico da liberação e, em B, o gráfico dos resíduos.



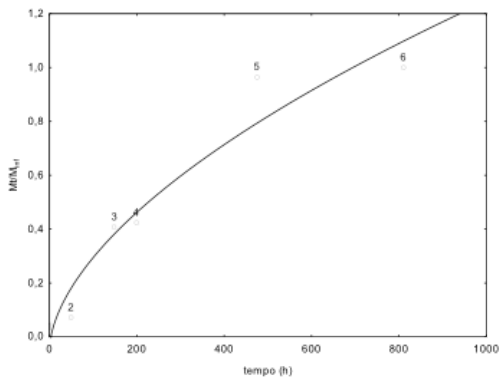
A



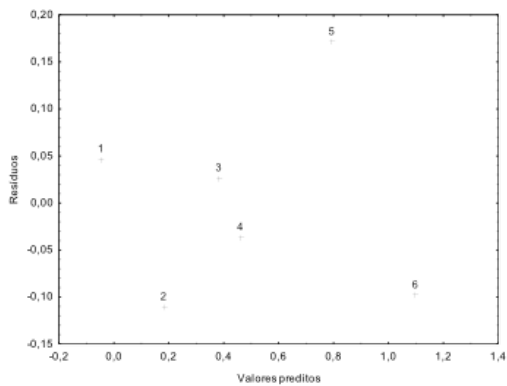
B



**Figura 2:** Ajustes da cinética de liberação de sinvastatina exemplificado no grupo de arcabouço composto poroso com 5% de SIN com 70% de porosidade em PBS. Em A, o gráfico da liberação e, em B, o gráfico dos resíduos.

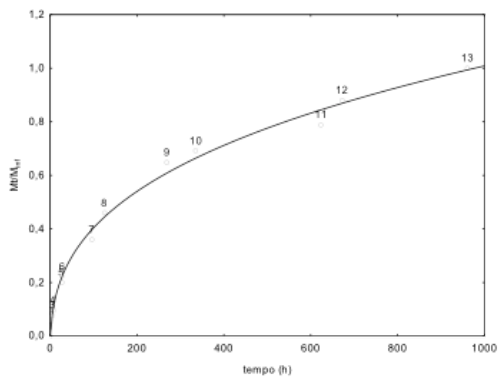


A

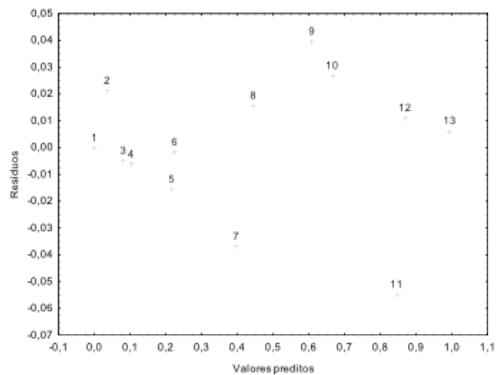


B

**Figura 3:** Ajustes da cinética de liberação de sinvastatina exemplificado no grupo de arcabouço composto poroso com 5% de SIN com 30% de porosidade em PBS com 30% de etanol. Em A, o gráfico da liberação e, em B, o gráfico dos resíduos.

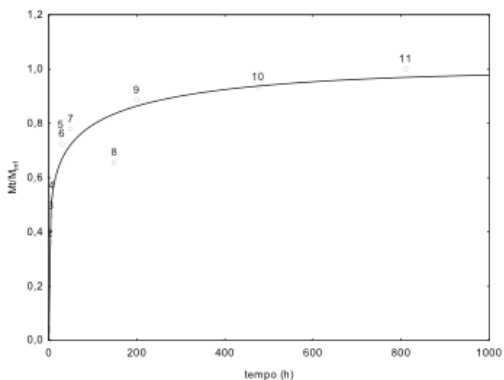


A

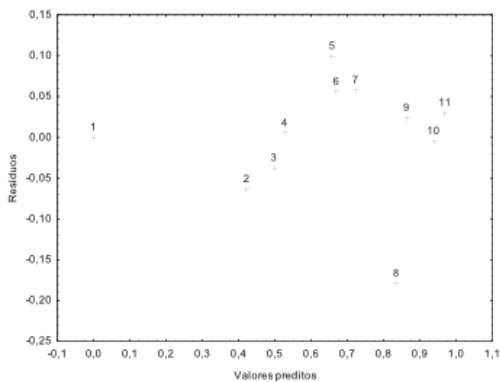


B

**Figura 4:** Ajustes da cinética de liberação de sinvastatina exemplificado no grupo de arcabouço composto poroso com 5% de SIN com 70% de porosidade em PBS com 30% de etanol. Em A, o gráfico da liberação e, em B, o gráfico dos resíduos.

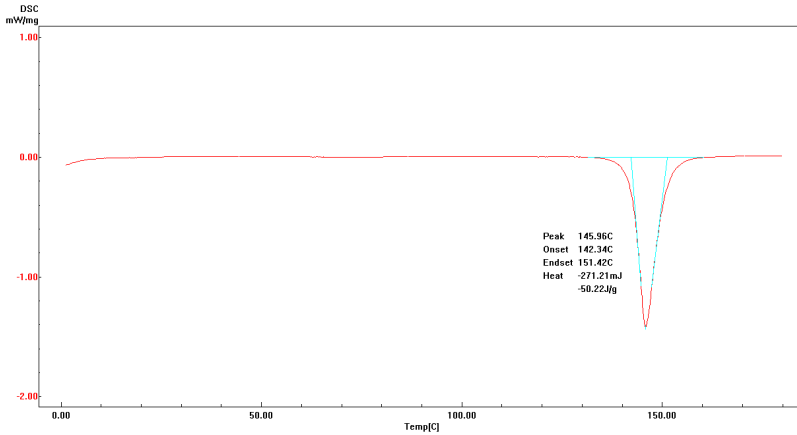


A



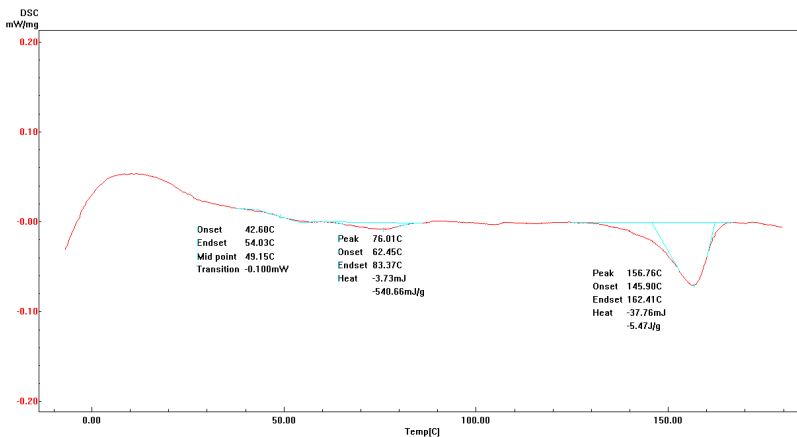
B

**Figura 5:** Termograma das amostras analisadas pelo DSC. A, Sinvastatina pura; B, PLGA puro; C, cerâmica bifásica; D, Arcabouço composto de PLGA e cerâmica bifásica e E, Arcabouço composto de PLGA e cerâmica bifásica e sinvastatina.



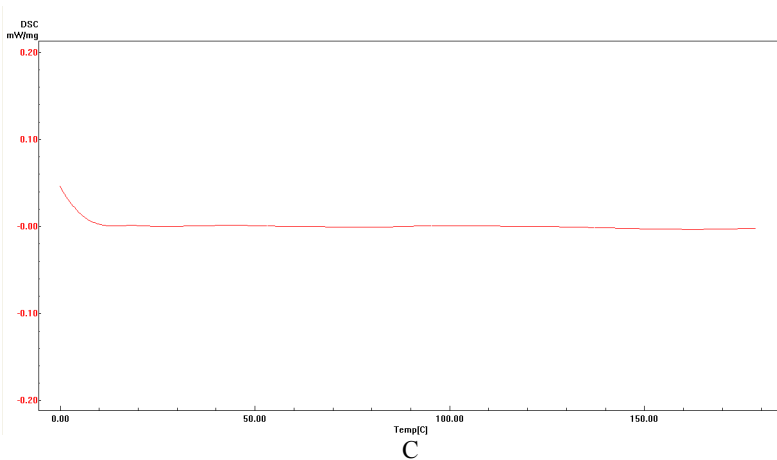
A

Sinvastatina pura

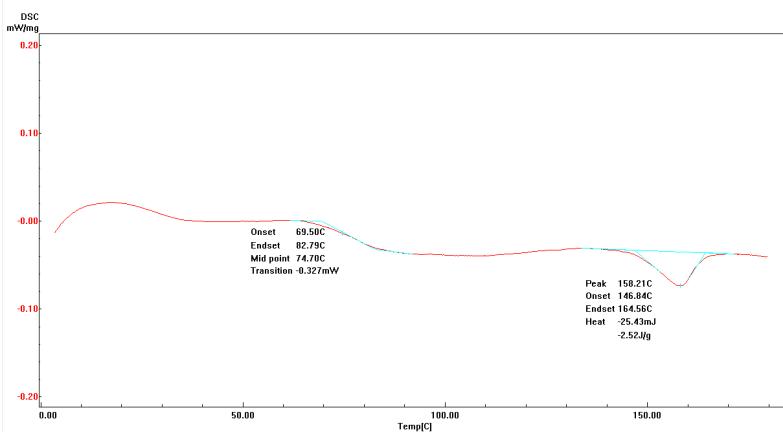


B

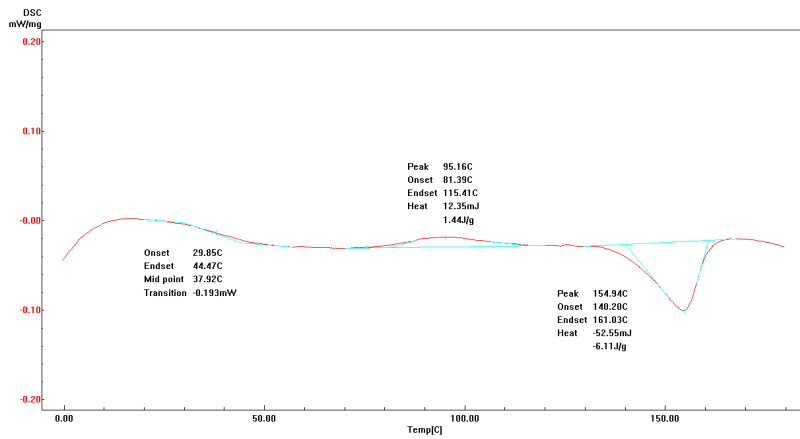
PLGA puro



C  
Cerâmica bifásica



D  
Arcabouço composto de PLGA e cerâmica bifásica



E

Arcabouço composto de PLGA, cerâmica bifásica e sinvastatina

## ANEXO B

### MATERIAIS E MÉTODOS DETALHADO

Este trabalho foi realizado na Universidade Federal de Santa Catarina nos seguintes laboratórios: Laboratório de Materiais Cerâmicos (Cermat), Laboratório de estudos de Materiais Poliméricos (Polimat), Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), Laboratório de Meios Porosos e Propriedades Termofísicas (LMPT), Laboratório de Pós-Graduação em Odontologia e na Scitec Soluções em Ensaio de Materiais e Produtos.

#### **1. Obtenção do arcabouço poroso de PLGA+HA/ $\beta$ TCP**

Os arcabouços porosos compostos foram produzidos com copolímero de ácido polilático coglicólico (PLGA) e cerâmica bifásica (hidroxiapatita e beta-tricálcio fosfato - HA/ $\beta$ TCP) obtidos pela técnica de evaporação de solvente e lixiviação de partículas de sacarose.

Foram pesados 25% (m/v) de ácido polilático (PLA) (Lactide - Resomer LT 706 S, Evonik Boehringer Ing. Pharma GmbH & Co. KG, Alemanha) e 75% (m/v) do copolímero PLGA (lactide-co-glicolide) (Resomer LG 824 S, Evonik Boehringer Ing. Pharma GmbH & Co. KG, Alemanha), (m:m). Em seguida, esses materiais foram solubilizados em 10% (m/v) de clorofórmio PA ( $\text{CHCl}_3$  - Synth - LabSynth, Diadema, São Paulo, Brasil) em temperatura ambiente e mantidos sob agitação constante por 24 horas.

Com a dissolução completa dos polímeros, foram adicionados 30% ou 70% (m/m) de partículas de sacarose com granulação em torno de 500  $\mu\text{m}$  (Microbiology - Merck, Darmstadt, Alemanha). Nesse mesmo material, ainda foram acrescentados 33% (m/m) partículas com tamanho em torno de 250  $\mu\text{m}$  de cerâmica bifásica (Genphos, Genius com HA e  $\beta$ TCP na proporção 70/30, Baumer, Mogi Mirim, Brasil) mantendo uma relação final entre PLGA e cerâmica bifásica de 2 para 1 (duas partes de polímero para uma parte de cerâmica).

Após a homogeneização, a solução foi mantida durante 24 horas sob agitação constante para evaporação parcial do solvente. Isso teve como objetivo se adquirir uma consistência arenosa necessária para preencher os moldes negativos de cilíndricos de 8 mm de diâmetro e 20 mm de altura.

Após a evaporação do solvente, os moldes foram cortados e imersos em álcool polivinílico (Álcool polivinílico PS, Vetec Química

Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) em temperatura ambiente e mantidos em agitação constante por 24 horas para solubilização e remoção das partículas de sacarose (processo de lixiviação). Após a lixiviação, o material foi lavado com água destilada para remoção dos resíduos.

## **2. Preparo do arcabouço poroso de PLGA+HA/ $\beta$ TCP com SINVASTATINA**

Para o preparo dos arcabouços contendo sinvastatina (SIM  $\geq 97\%$ , grau de cromatografia líquida de alta performance, HPLC, sólida M=418.57, *Sigma-Aldrich*, Ontario, Canadá) empregou-se o seguinte processo: a sinvastatina foi adicionada simultaneamente à sacarose e à cerâmica bifásica em 3 diferentes concentrações, a saber, 2, 5 e 8% da massa final (ver grupos experimentais, Tabela 1). Os materiais obtidos foram seccionados com auxílio do sistema Exakt (Exakt Apparatebau GmbH & Co., Norderstedt, Alemanha do Laboratório de Pós-Graduação em Odontologia da UFSC) para obtenção de cilindros com bases paralelas entre si com 3 e 10 mm altura (Figura 1).

## **3. Análise de liberação controlada de sinvastatina**

Para avaliar a degradação dos arcabouços e a liberação controlada de sinvastatina, as amostras foram pesadas e incubadas em duas soluções: 50ml de solução salina tamponada (PBS) com pH 7,4; ou em PBS com 30% de etanol, com final também de pH 7,4. Essa segunda solução é o meio no qual a sinvastatina é conhecidamente solúvel.

Logo em seguida, independente da solução de incubação utilizada, as amostras foram colocadas em banho termostático a 37°C sob agitação constante por 40 dias. Durante essa fase, em intervalos de tempo específicos, 2 ml de solução foram recolhidos e analisados. Quando necessário para a análise, esse material colhido foi diluído a 10  $\mu$ g de sinvastatina por mL.

A absorbância desta solução foi medida em espectrofotômetro UV-Vis a um comprimento de onda de 240 nm (Espectrofotômetro UV-Vis, Nova Instruments 1800-UV, Polimat, Laboratório de Materiais Poliméricos da UFSC). A curva padrão foi obtida de concentrações conhecidas de sinvastatina em acetoneitrilo. Essa curva foi utilizada para quantificar a sinvastatina carregada e liberada das amostras.

Para analisar o modelo de cinética que representa o perfil de liberação de sinvastatina em PBS e em PBS com 30% de etanol a concentração sinvastatina foi redimensionalizada dividindo a quantidade absoluta de sinvastatina liberada no tempo  $t$ , representada por  $M_t$ , e a quantidade de



sinvastatina no tempo infinito,  $M_{\infty}$ , considerada a concentração de equilíbrio. Os modelos foram avaliados pelo coeficiente de correlação ( $R^2$ ) e pela análise dos resíduos.

Após os 40 dias do ensaio, as amostras foram removidas, liofilizadas e pesadas para a avaliação da perda de massa. Para o cálculo da massa residual utilizou-se a seguinte relação: (massa final x 100%)/(massa inicial). As amostras foram analisadas em triplicata.

#### **4. Análise das propriedades físico-químicas e mecânicas do arcabouço poroso composto de PLGA, cerâmica bifásica e sinvastatina**

##### **4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Raios X por Dispersão em Energia (EDS)**

A morfologia tridimensional das amostras foi avaliada no seu estado seco e após 40 dias de liberação e degradação. Para isso, foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura de alta resolução (JEOL JSM-6390LV Scanning Electron Microscope, Laboratório Central de Microscopia Eletrônica de Varredura da UFSC). As amostras secas foram levadas ao aparelho metalizador para recobrimento com ouro de 300Å (Sputter Balzers SCD - 050 Coater, do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC). Os espécimes foram examinados ao microscópio eletrônico de varredura, operando com 10Kv. Cada amostra foi fotografada em dois campos distintos com aumentos de 50X, 500X e 2.000X. Isso permitiu a análise da superfície e mensuração do tipo e forma dos poros pelo software ImageJ64 (NIH – National Institute of Health). As partículas de cerâmica bifásica e de sacarose foram examinadas da mesma maneira.

Para análise qualitativa da composição química da superfície das amostras, foi realizada uma espectroscopia de Raios-X por dispersão em energia (EDS). O aumento necessário foi de 50 vezes e utilizou-se uma MEV de alta resolução (JEOL JSM-6390LV *Scanning Electron Microscope* do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica de Varredura da UFSC).

##### **4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

Para se caracterizar a estabilidade física e química do arcabouço, foi utilizado o método de calorimetria exploratória diferencial (DSC). As medições de DSC (Shimadzu DSC-50, Central de

Análises do Departamento de Química da UFSC) foram utilizadas para caracterizar isoladamente o PLGA, a sinvastatina e o HA/ $\beta$ TCP, como a associação de PLGA+HA/ $\beta$ TCP e PLGA+HA/ $\beta$ TCP+SIN. A temperatura variou de 0°C a 180°C, com taxa de aquecimento de 10°C/minuto em nitrogênio.

### 4.3 Teste de Compressão

Para as medidas de resistência à compressão, cilindros com diâmetro de 8 mm e altura de 12 mm foram utilizados em uma máquina universal de ensaios (Instron Emic DL-10000, modelo SV50 R9 255, Shimadzu AGS-H, do Laboratório SCiTec soluções em ensaios de materiais e produtos, Palhoça - Santa Catarina, Brasil), utilizando uma velocidade de 1mm/min e transdutor de força de 500 N seguindo o padrão da ASTM (D-1621). O ponto de fratura não foi observado durante a compressão, portanto a resistência a compressão e a tensão foram consideradas os dados que geraram 20 % de deformação para comparação entre os grupos (Hu, 2015; Kim, 2015; Qutachi, 2014; Fang 2014).

A curva de tensão-deformação de compressão gerada durante a análise foi usada para calcular o módulo de Young (módulo de elasticidade) como uma medida da rigidez das amostras. O módulo de elasticidade foi calculado pela determinação da inclinação da curva de tensão-deformação ao longo da porção elástica de deformação.

### 4.4 Microtomografia ( $\mu$ CT)

As imagens da microarquitetura do arcabouço seco foram obtidas utilizando o sistema de microtomografia ( $\mu$ CT, Versa XRM-500 Xradia VERSA XRM-500, high resolution 3D X-ray microscope). As condições de escaneamento foram as mesmas para todas as amostras: tubo de Raios-X com voltagem de 30kV e potência de 2W, sem filtro, lente óptica 0,4 vezes, passo angular de 0.225°, tempo de exposição de 15 segundos e 1601 quadros por projeção (40 projeções de referência). As imagens resultantes tiveram 12 a 14  $\mu$ m de resolução espacial.

Após a aquisição das imagens, foi necessário o seu processamento para que fosse possível a caracterização estrutural do arcabouço poroso. Esse processamento envolveu uma segmentação binária, aquela em que os pixels assumem apenas dois valores, 0 ou 1, preto ou branco. Em seguida, converteu-se as imagens de  $\mu$ CT em um histograma de tons de cinza para imagens em preto e branco. Nesse

processo, utilizou-se o software Imago (desenvolvido pelo LMPT da UFSC, em associação com ESSS - Engineering Simulation and Scientific Software e CENPES - PETROBRAS) (Oliveira et al. 2010, Moreira et al. 2012). Este software permitiu a caracterização das propriedades físicas dos elementos porosos, a medição automática e semi-automática das propriedades microestruturais dos materiais e a simulação em modelos microestruturais 3D. Neste estudo, permitiu ainda a caracterizar a porosidade e a distribuição dos poros em 2D e 3D. Para esta análise, selecionou-se uma escala de cinza que separa o conteúdo polimérico. A cerâmica bifásica foi vista em preto e a fase porosa, em branco (Figura 2A e 2B).

Para cada amostra, foram geradas em torno de 1.000 imagens (1 imagem a cada  $\mu\text{m}$ ). Seis imagens aleatórias foram individualmente inseridas no software Imago e binarizadas para obtenção do limiar da escala de cinza que melhor separou a fase PLGA+HA/ $\beta$ TCP da fase porosa. A escolha do limiar foi realizada por um mesmo indivíduo treinado previamente, uma vez que a interpretação depende da experiência do observador e pode gerar variações no resultado final (Figura 3A, 3B, 3C e 3D). Após a binarização 2D foi necessário selecionar a região de interesse (ROI) representativa da imagem. Utilizou-se um formato retangular maior possível dentro das amostras. Isso se deveu ao fato de que a análise da área externa à amostra levaria ao erro nos cálculos de porosidade obtido pelo software (Figura 3E). O ROI determinado para uma imagem foi reproduzido para todas as imagens do mesmo conjunto.

O conjunto de imagens consecutivas da amostra foi importado e renderizado para obtenção da imagem 3D. A imagem 3D foi convertida em escala de cinza e a ROI tridimensional foi definida. Obteve-se, então, um cubo com  $600 \times 600 \times 400$  voxels<sup>3</sup> (Figura 4A, 4B, 4C e 4D). A partir desse momento, a imagem 3D foi binarizada utilizando o valor médio do limiar da escala de cinza obtido na binarização 2D. Da mesma maneira, o software também permitiu mesclar e inverter as imagens dentro do limiar da escala de cinza selecionado para visualização das fases, possibilitando a confirmação da escolha correta do limiar definido em 2D (Figura 4E, 4F e 4G). Com a obtenção da binarização 3D, calculou-se a fração porosa do arcabouço e a porosidade média (Figura 4H, 4I e 4J).

Os volumes totais analisados foram os cubos de  $600 \times 600 \times 400$  voxel<sup>3</sup> para amostras dos grupos PLGA+HA/ $\beta$ TCP com 70% de porosidade, PLGA+HA/ $\beta$ TCP e PLGA+HA/ $\beta$ TCP+8%SIN com 30% de porosidade.

Os dados dos volumes binários obtidos foram convertidos para análise no software C3DE (Figura 5A e 5B), rede de poros e gargantas, desenvolvido no laboratório LAPIX - Image Processing and Computer Graphics Lab da UFSC, em parceria com o Laboratório de Meios Porosos e Propriedades Termofísicas da UFSC. Os resultados dos estudos de Moreira et al., em 2014, permitiram a quantificação de poros e conexões de modo separado (Figura 5C e 5D). Foram realizadas simulações de fluxo de fluidos para determinação da permeabilidade intrínseca e quantificação de porosidade aberta e fechada.

O método empregado pelo software C3DE possibilitou isolar o poro e mensurar seu raio. Para tanto, considerou-se uma esfera de mesmo volume, assim os raios das conexões seriam raios de cilindros de mesmos volumes. A extração da rede de poros e gargantas, detalhada por Kronbauer em 2014, baseou-se em uma análise computadorizada das esferas máximas que estavam centradas nos voxels presentes no espaço poroso e foram construídas de modo que o diâmetro alcançasse um tamanho máximo (Moreira et al. 2014).

## 5. Análise estatística

Os dados foram descritos utilizando as medidas: média, mediana, desvio padrão, máximo e mínimo. Quando se tem amostras grandes ou os dados seguem distribuição normal (pelo teste de Shapiro-Wilk) de probabilidade, os grupos foram comparados utilizando análise de variância para 1 fator (ANOVA *de uma via*) e quando se têm amostras dentro do grupo utilizou-se a análise de variância para dois fatores (grupos e amostras) sem interação (ANOVA de duas vias), sendo que ambos os casos, quando necessário, procedeu com teste de Tukey para comparação múltipla. No caso dos dados não apresentaram uma distribuição utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguindo do teste de comparação múltipla não-paramétrico. A associação entre variáveis foram feitas utilizando o coeficiente de correlação de Pearson. Todos os análises foram feitas utilizando o software SPSS (v20) e um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

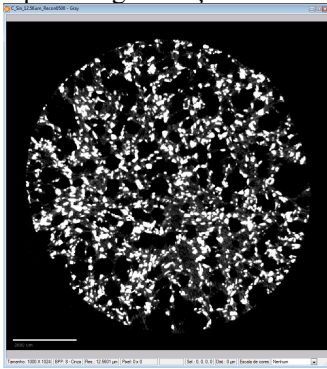
## FIGURAS E TABELAS DA METODOLOGIA EXPANDIDA

**Tabela 1:** Divisão dos grupos e subgrupos.

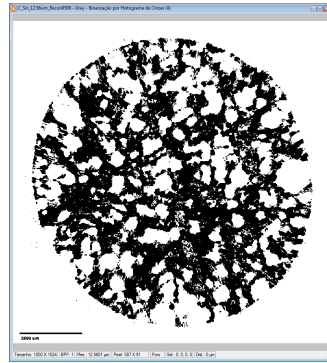
<b>Grupos</b>	<b>Arcabouço composto com 30% de Porosidade</b>	<b>Arcabouço composto com 70% de Porosidade</b>
<b>Subgrupos</b>	Sem SIN	Sem SIN
	2% de SIN	2% de SIN
	5% de SIN	5% de SIN
	8% de SIN	8% de SIN

**Figura 1:** Cilindro do arcabouço poroso de PLGA+HA/ $\beta$ TCP+SIN

**Figura 2:** Binarização da imagem de corte transversal da microtomografia ( $\mu$ CT). A) Imagem 2D obtida pela  $\mu$ CT. B) Imagem 2D após a segmentação binária.

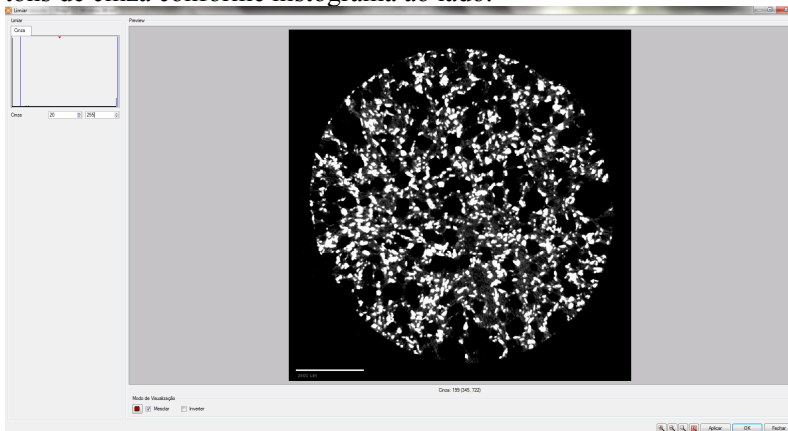


A

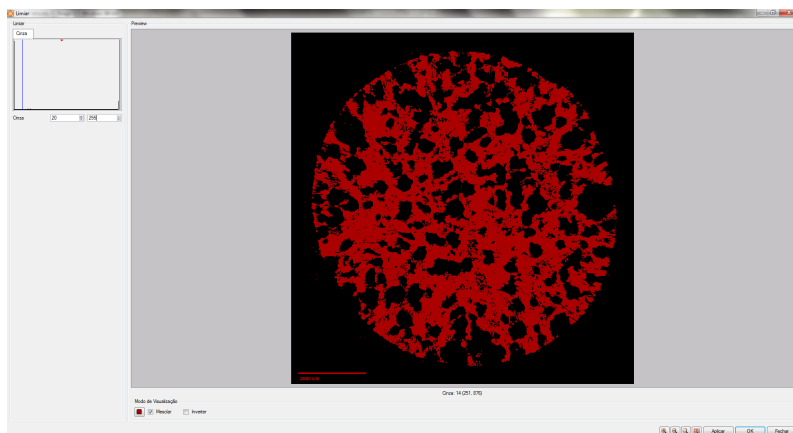


B

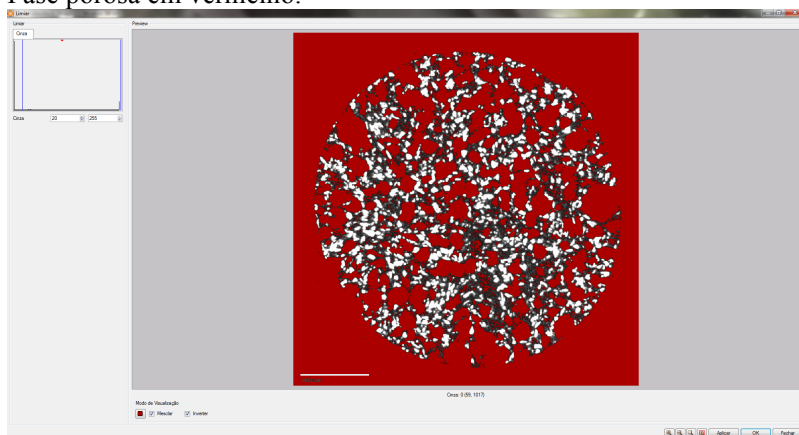
**Figura 3A:** Ilustração do processo de binarização 2D: Imagem de microtomografia importada e convertida em escala de cinza, com 256 tons de cinza conforme histograma ao lado.



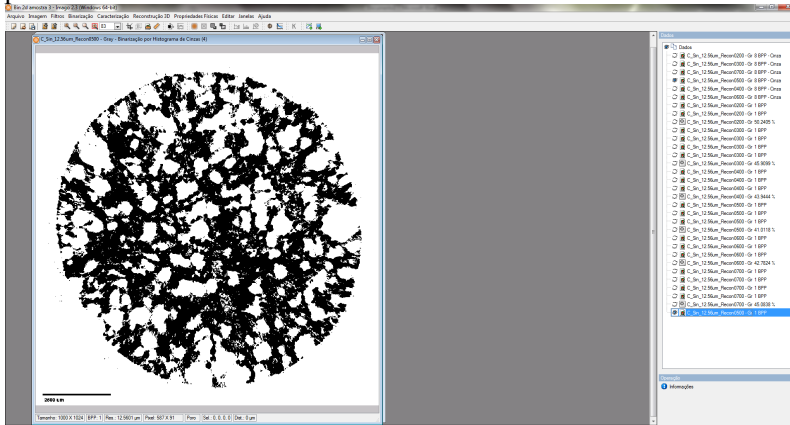
**Figura 3B:** Ilustração do processo de binarização 2D. O software permite mesclar as imagens dentro do limiar da escala de cinza selecionado para melhor visualização das fases. Fase PLGA+HA/ $\beta$ TCP em vermelho. Fase porosa em preto.



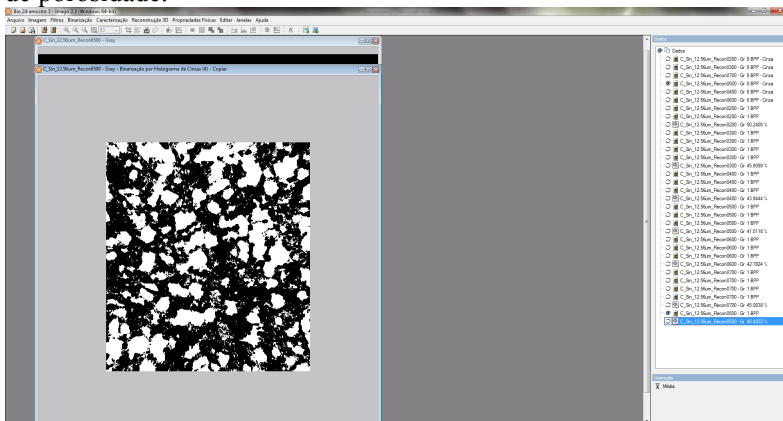
**Figura 3C:** Ilustração do processo de binarização 2D. O software permite inverter as fases dentro do limiar da escala de cinza selecionado para melhor visualização. Fase PLGA+HA/ $\beta$ TCP em escala de cinza. Fase porosa em vermelho.



**Figura 3D:** Ilustração do processo de binarização 2D. Após a escolha do limiar da escala de cinza que melhor separa as fases, obtêm-se a binarização 2D apresentada. Fase PLGA+HA/ $\beta$ TCP em preto e fase porosa em branco.

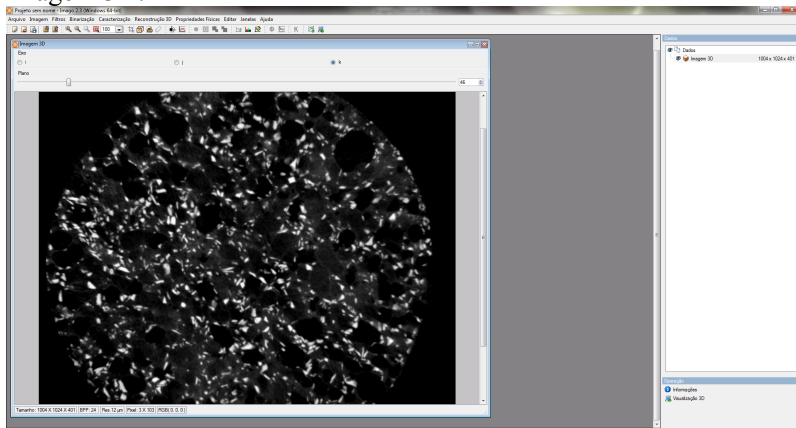


**Figura 3E:** Ilustração do processo de binarização 2D. Após a finalização da binarização 2D, a região de interesse foi definida. As bordas laterais foram recortadas devido a interferência da área externa na amostra com a fase porosa. Estes dados são utilizados para o cálculo de porosidade.

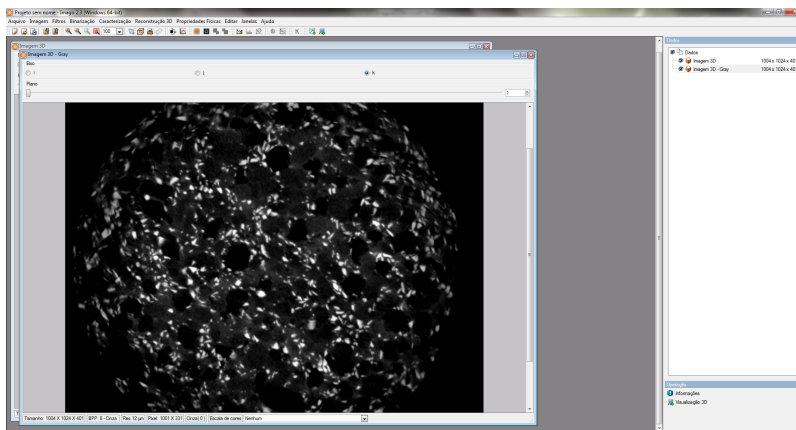




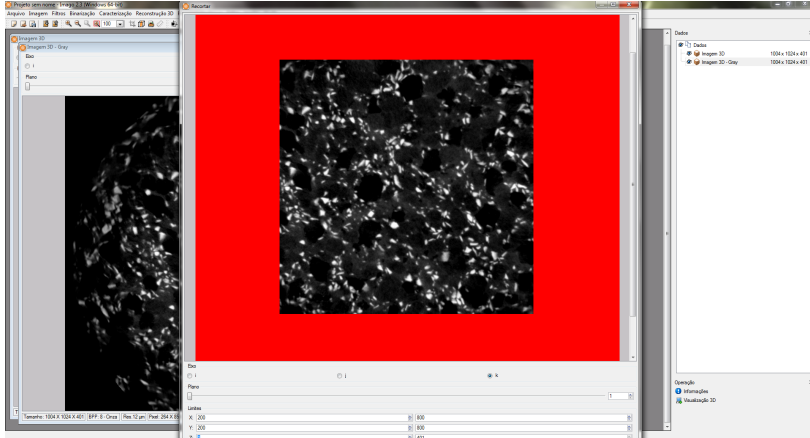
**Figura 4A:** Ilustração do processo de binarização 3D. O conjunto de imagens da amostra é importada ao software. Neste caso, o software suportou uma renderização de 401 cortes consecutivos para obtenção da imagem 3D.



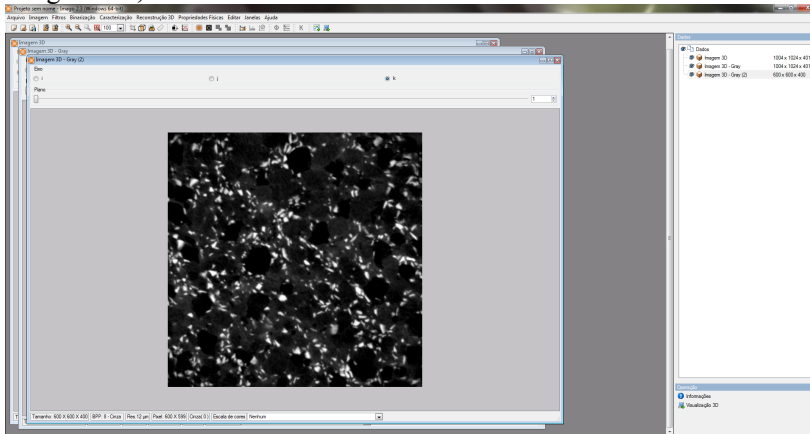
**Figura 4B:** Ilustração do processo de binarização 3D. Imagem 3D convertida em escala de cinza.



**Figura 4C:** Ilustração do processo de binarização 3D. Definição da ROI.



**Figura 4D:** Ilustração do processo de binarização 3D. Após o recorte da imagem 3D, obtêm-se um cubo com  $600 \times 600 \times 400$  voxels<sup>3</sup>.



**Figura 4E:** Ilustração do processo de binarização 3D. A imagem 3D foi binarizada utilizando-se o valor médio do limiar da escala de cinza obtido na binarização 2D.



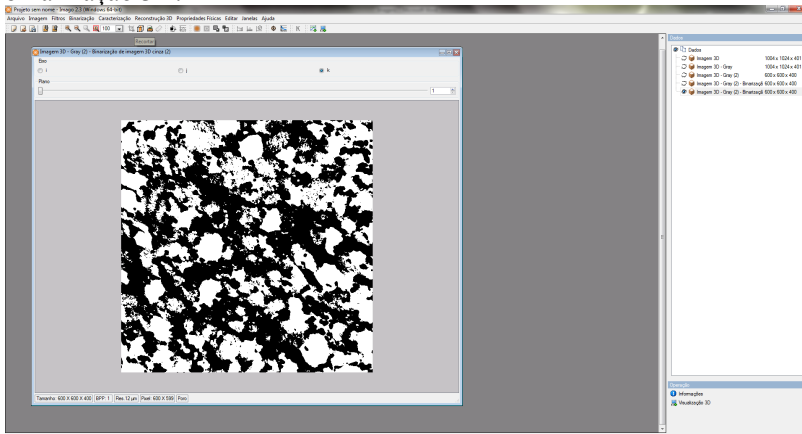
**Figura 4F:** Ilustração do processo de binarização 3D. O software permitiu mesclar as imagens 3D dentro do limiar da escala de cinza selecionado. Isso foi utilizado para melhor visualização das fases e confirmação da escolha correta do limiar definido em 2D. Fase PLGA+HA/ $\beta$ TCP em vermelho. Fase porosa em preto.



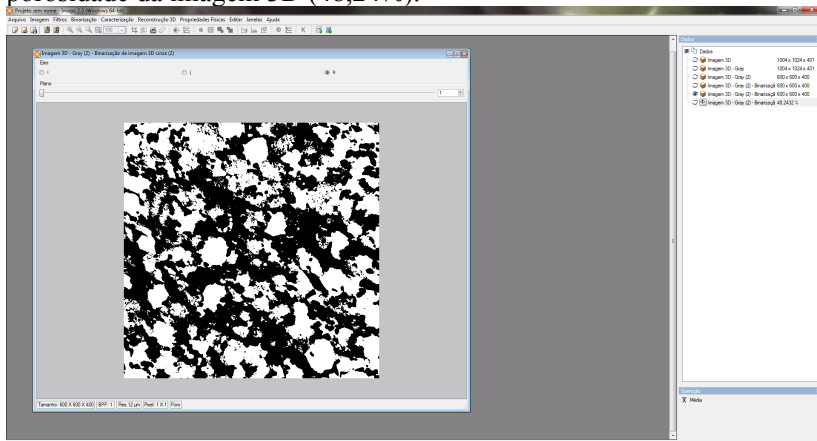
**Figura 4G:** Ilustração do processo de binarização 3D. O software permitiu inverter as fases na imagem 3D. Isso foi utilizado para melhor visualização das fases e confirmação da escolha correta do limiar definido em 2D. PLGA+HA/ $\beta$ TCP em escala de cinza. Fase porosa em vermelho.



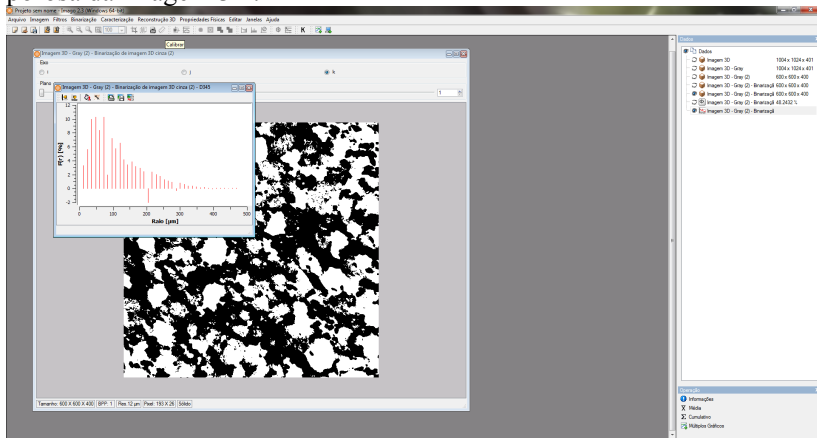
**Figura 4H:** Ilustração do processo de binarização 3D. Obtenção da binarização 3D.

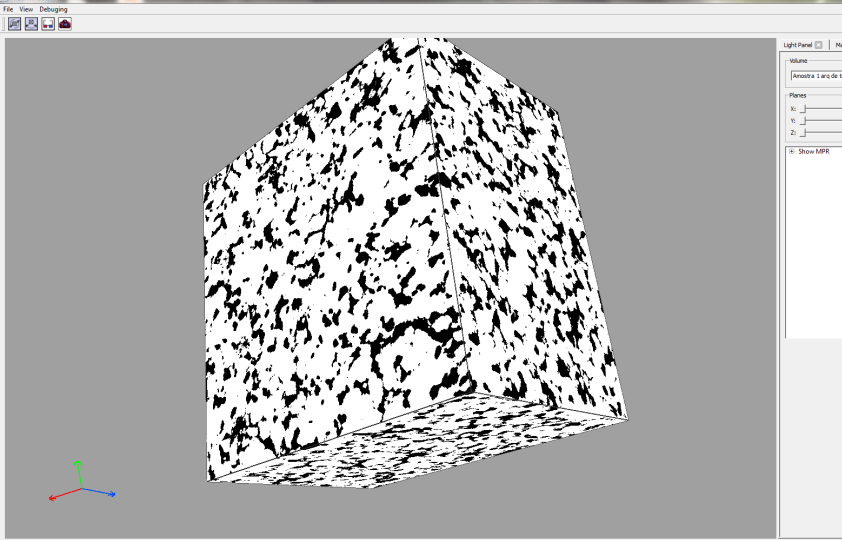
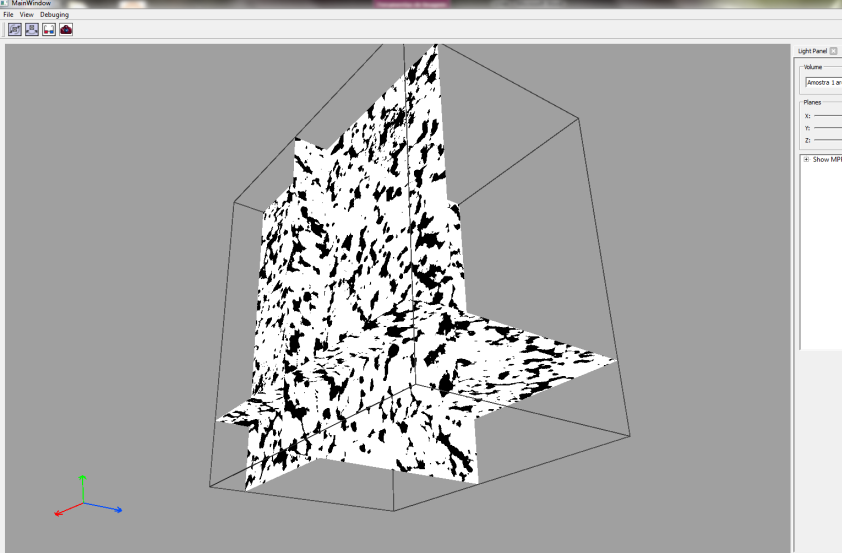


**Figura 4I:** Ilustração do processo de binarização 3D. Cálculo da porosidade da imagem 3D (48,24%).

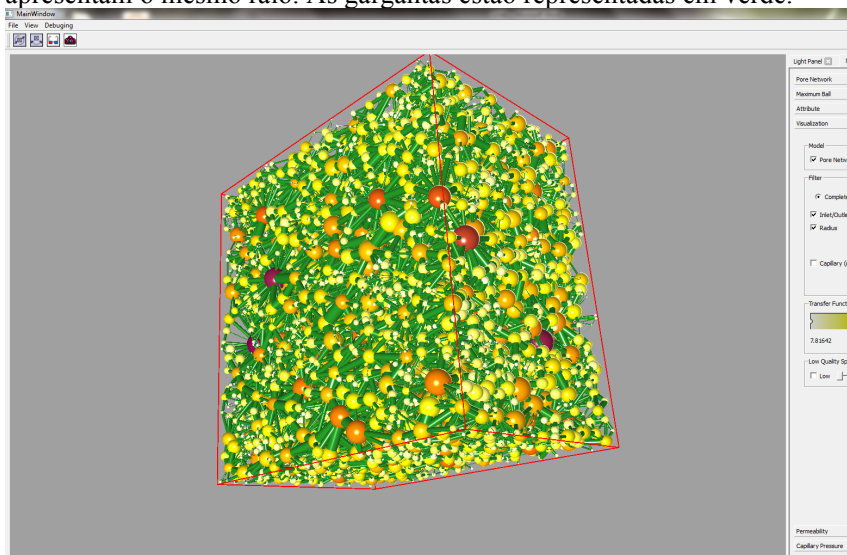


**Figura 4J:** Ilustração do processo de binarização 3D. Gráfico da fração porosa da imagem 3D.

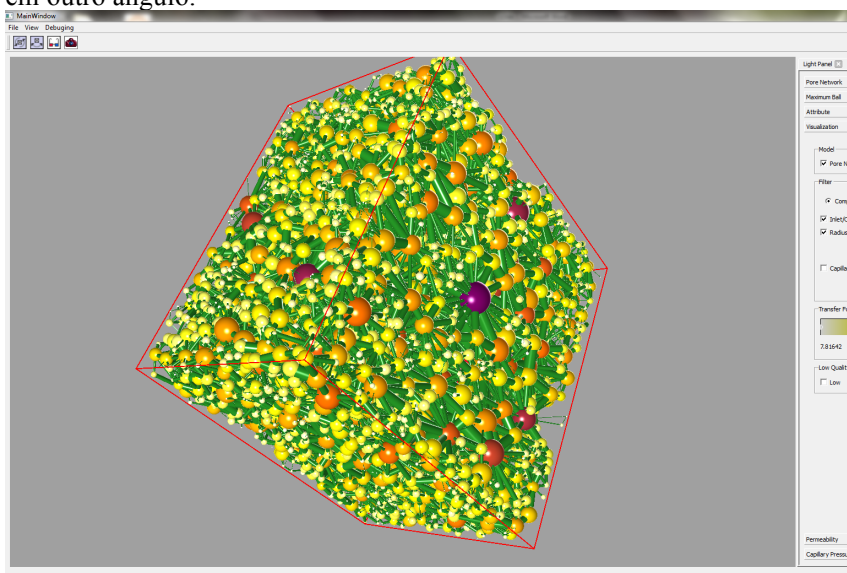


**Figura 5A:** Imagem da reconstrução 3D binarizada no software C3DE.**Figura 5B:** Imagem da reconstrução 3D binarizada no software C3DE.

**Figura 5C:** Rede de poros e gargantas em 3D. Esferas da mesma cor apresentam o mesmo raio. As gargantas estão representadas em verde.



**Figura 5D:** Rede de poros e gargantas em 3D. A mesma amostra vista em outro ângulo.







## ANEXO C

## TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O DOUTORADO

## - Artigos publicados:

1. **ENCARNAÇÃO, I.C.**; XAVIER, C.C.F.; BOBINSKI, F.; SANTOS, A.R.S.; CORREA, M.; Freitas S.F.T.D.; ARAGONEZ, A.; GOLDFEDER, E.M.; CORDEIRO, M.M.R. Analysis of bone repair and inflammatory process caused by simvastatin combined with PLGA+HA+ $\beta$ TCP scaffold. *Implant Dentistry* **25**, 140-148.
- 2.
3. **ENCARNAÇÃO, I.C.**; RAFAEL, C.F.; CORDEIRO, M.M.R.; SCARSO, J.F. A versatilidade do uso da tuberosidade maxilar para pequenas reconstruções teciduais na implantodontia. *Full Dentistry in Science*, v.6, p.462-471, 2015.
4. MOLINA, I.C.; MOLINA, G.C.; **ENCARNAÇÃO, I.C.**; SOARES, C.; BARATIERI, L.N. Flapless Esthetic Gingival Remodeling: The Ultimate Approach for Crown Lengthening. *Quintessence of Dental Technology*, v. 1, p. 71-80, 2015.
5. **ENCARNAÇÃO, I.C.**; MOLINA, I.C.; LUNA, M.P.; CARDOSO, A.C. Arcada Dentária Reduzida: Conceitos e Atualidades - Revisão da Literatura. *Revista Dental Press de periodontia e implantologia*, v.6, p.68-75, 2012.
6. LACERDA, E.; LACERDA, H.; **ENCARNAÇÃO, I.C.**; CARDOSO, A.C. Moldagem de transferência e registro interoclusal - técnica diferenciada. *Full Dentistry in Science*, v. 3, p. 439-443, 2012.

## - Resumo expandido publicado em revista internacional

1. **ENCARNAÇÃO, I.C.**; Noronha Oliveira, M.A.P.P.N.; ARAGONEZ, A.; Müller, C.O.; CORDEIRO, M.M.R. Bioactive and absorbable composite porous scaffold for bone tissue engineering: PLGA, biphasic ceramic and

Simvastatin slow release. In: EAO Congress, Stockholm, September 2015, Clinical Oral Implants Research. 2015. v. 26. p. 105-105.

- Publicação de resumo em anais de eventos científicos

1. SOUZA, C.R.; **ENCARNAÇÃO, I.C.**; RODRIGUES FILHO, R.; SANTOS, A.R.S.; CORDEIRO, M.M.R. Influência do tratamento com extrato de *Polygala Paniculata* sobre a doença periodontal induzida em ratos. In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2015, Campinas. Brazilian Oral Research - Proceedings of the 32<sup>nd</sup> SBPqO Annual Meeting, 2015. v. 29. p. 54-54.

2. ALECIO, A.B.W.; **ENCARNAÇÃO, I.C.**; DIAS, S.; ARAGONEZ, A.; MAGINI, R.S.; Bianchini, M.A.; Cardoso, A.C.; Benfatti, C.A.M. Guided bone regeneration by poly lactic-co-glycolic acid membrane with hydroxyapatite. In: IADR/PER Congress, 2014, Dubrovnik. Journal of Dental Research, 2014.

3. **ENCARNAÇÃO, I.C.**; XAVIER, C.C.F.; GOLDFEDER, E.M.; SANTOS, A.R.S.; ARAGONEZ, A.; CORDEIRO, M.M.R. Avaliação do reparo ósseo após implantação de arcabouços de PLGA+HA+TCP e simvastatina em defeitos da calota craniana. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa odontológica, 2013, Águas de Lindóia. Brazilian Oral Research, 2013. v. 27. p. 261-261.

4. HEIDENREICH, R.; KHOURY, A.B.S.A.M.; **ENCARNAÇÃO, I.C.**; GOLDFEDER, E.M.; SANTOS, A.R.S.; CORDEIRO, M.M.R. Uso do extrato hidroalcoólico de *Polygala paniculata* Linneu como adjuvante no tratamento de doença periodontal experimental em ratos. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa odontológica, 2013, Águas de Lindóia. Brazilian Oral Research, 2013. v. 27. p. 109-109.

5. **ENCARNAÇÃO, I. C.**; XAVIER, C.C.F.; BOBINSKI, F.; SANTOS, A. R.S.; ARAGONEZ, A.; CORDEIRO, M.M.R. Effect of simvastatin and PLGA+HA scaffolds on bone healing. In: IADR 90<sup>th</sup> General session, 2012, Foz do Iguaçu. 90<sup>th</sup> General session IADR Latin American Regional Meeting, 2012.

- Painéis apresentados em eventos científicos
1. Noronha Oliveira,, M.A.P.P.N.; **ENCARNAÇÃO, I.C.**; ARAGONEZ, A.; Müller, C.O.; CORDEIRO, M.M.R.. Bioactive and absorbable composite porous scaffold for bone tissue engineering: PLGA, biphasic ceramic and Simvastatin slow release. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
  2. ALECIO, A.B.W.; **ENCARNAÇÃO, I.C.**; ARAGONEZ, A.; Magini, R.S. Guided bone regeneration by poly lactic-co-glycolic acid membrane with hydroxyapatite. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
  3. **ENCARNAÇÃO, I. C.**; XAVIER, C.C.F.; GOLDFEDER, E.M.; SANTOS, A.R.S.; ARAGONEZ, A.; CORDEIRO, M.M.R. Avaliação do reparo ósseo após implantação de arcabouços de PLGA+HA+TCP e sinvastatina em defeitos da calota craniana. 2013. (Apresentação de Trabalho/Outra).
  4. HEIDENREICH, R.; KHOURY, A.B.S.A.M.; **ENCARNAÇÃO, I.C.**; GOLDFEDER, E.M.; SANTOS, A.R.S.; CORDEIRO, M.M.R. Uso do extrato hidroalcoólico de Polygala Paniculata Linneu como adjuvante no tratamento da doença periodontal experimental em ratos. 2013. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
  5. **ENCARNAÇÃO, I.C.**; XAVIER, C.C.F.; BOBINSKI, F.; CORREA, M.; SANTOS, A.R.S.; Freitas S.F.T.D.; ARAGONEZ, A.; CORDEIRO, M.M.R. Effect of simvastatin and PLGA+HA scaffolds on bone healing. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

