

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

KATILAYNE VIEIRA DE ALMEIDA

SCAFFOLDS MULTIFUNCIONAIS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA

Campina Grande – PB

2017

KATILAYNE VIEIRA DE ALMEIDA

SCAFFOLDS MULTIFUNCIONAIS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA

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

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook

Orientador Externo: Dr. Miguel Ángel Rodriguez Barbero

Co-orientador: Dr. Raúl Garcia Carrodéguas

Agência Financiadora: CAPES.

Campina Grande – PB

2017

A447s Almeida, Katilayne Vieira de.
Scaffolds multifuncionais para regeneração óssea / Katilayne Vieira de Almeida. – Campina Grande, 2017.
132 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2017.

"Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook, Prof. Dr. Miguel Ángel Rodrigues Barbero".

Referências.

1. Scaffolds Multifuncionais. 2. Biomateriais – Método da Réplica. 3. Regeneração Óssea. 4. Osteoindutor. I. Fook, Marcus Vinícius Lia. II. Barbero, Miguel Ángel Rodrigues. III. Título.

CDU 620.1(043)

VITAE

Química Industrial pela UEPB (2011).

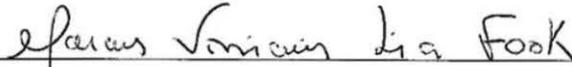
Mestre em Ciências e Engenharia de Materiais pela UFCG (2013).

KATILAYNE VIEIRA DE ALMEIDA

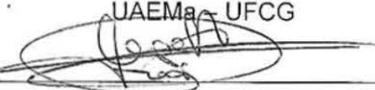
SCAFFOLDS MULTIFUNCIONAIS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA

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

Aprovado em: 17/02/2017

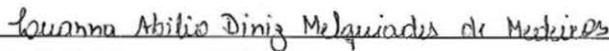


Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook
Orientador
UAEMA - UFCG

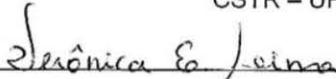

Dr. Miguel Ángel Rodrigues Barbero
Orientador Externo
ICV - CSIC



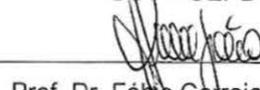
Prof.ª Dr.ª Solange Maria Kerpel
Examinador Externo
CSTR - UFCG



Prof.ª Dr.ª Luanna Abílio Diniz Melquiades de Medeiros
Examinador Externo
CSTR - UFCG



Prof.ª Dr.ª Verônica Evangelista de Lima
Examinador Externo
CCT - UEPB


Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio
Examinador Externo
CCS - UFPB

*Esta tese é integralmente dedica a
Maria de Lourdes Vieira da Silva e a
José Maria de Almeida Silva.*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não poderia ser concluído sem a ajuda de diversas pessoas às quais presto minha sincera homenagem:

Agradeço incondicionalmente a minha mãe, minha maior ídola por ter embarcado comigo nessa loucura que é a vida acadêmica, a minha irmã por tanto ter feito para que eu tivesse sempre a melhor educação e as minhas duas irmãs por cuidarem e acreditarem em mim.

Agradeço amorosamente a meu sobrinho por me ensinar a ter um coração batendo fora do peito, a meus dois cunhados, irmãos que a vida me deu e a minha princesinha de 4 patas por me torna uma pessoa melhor cada dia.

Agradeço ao programa de pós graduação em Ciências e Engenharia de Materiais desta instituição.

Agradeço imensuravelmente ao professor doutor Marcus Vinícius Lia Fook por ter sido o responsável pela minha formação profissional. Sem dúvidas não estaria em melhores mãos.

Agradeço ao Dr. Raúl García Carrodéguas pela base do projeto, pelos ensinamentos transmitidos, pela paciência e dedicação na construção desta tese.

Agradeço carinhosamente ao pesquisador Miguel Ángel Rodrigues por ser o grande responsável em mostrar-me o fascínio da pesquisa e por me incentivar a crescer ainda mais.

Agradeço a Alejandro Fuentes Iglesias por ter me recebido tão bem em seu país, por todo auxílio, companheirismo e sobretudo por estar construindo uma nova etapa de vida junto comigo.

Agradeço aos meus “bichinhos da caverna” por transformar os dias de trabalho em prazer e alegria.

Agradeço de forma nominal a três importantes pessoas que durante minha jornada no Certbio me apoiaram de forma profissional e pessoal: Dr. Márcio Cardoso, obrigada por ter sido do primeiro ao último dia a minha base. Dr. Thiago Fidélis, obrigada por ser meu guia acadêmico, sempre solucionando meus questionamentos e me desenvolvendo o pensamento crítico e a Seu Sérgio Pereira por estar disponível e receptivo sempre que necessitei.

Agradeço de maneira geral à família Certbio, funcionários, NGI e alunos, pela oportunidade de estar com vocês e de concretizar minhas realizações enquanto estudante.

Agradeço aos que fazem parte do *Instituto de Cerámica y Vidrio* - Madrid, pesquisadores, funcionários e alunos, por terem me recebido com tanto carinho em especial à Dr. Maria Canillas por seus ensinamentos e companheirismo durante todo meu tempo em Madrid.

Agradeço ao Dr. Rodrigo Moreno Botella por ter transmitido seus conhecimentos na área de reologia além do seu carinho por mim.

Agradeço aos funcionários do programa de pós graduação da UFCG Márcia e André por todo auxílio prestado.

Agradeço a empresa Nycon pela doação da matéria prima Wollastonita utilizada nesta tese.

Agradeço a Capes pelo apoio financeiro à pesquisa

RESUMO

Apesar do tecido ósseo possuir a capacidade de reparar-se frente a algum tipo de defeito, esta capacidade pode apresentar limitações e ocorrer em tempo prolongado. A Engenharia de Biomateriais oferece alternativas para acelerar este processo através da utilização de *scaffolds*, estruturas que proporcionam ambiente adequado a proliferação, fixação e diferenciação celular, e que podem ser utilizados como artefato para liberação de drogas. Mediante isto, esta tese desenvolveu *scaffolds* porosos, com composição cerâmica-vitrocerâmica em variadas concentrações, e adicionou-se em parte desses *scaffolds*, substâncias contendo princípios ativos para atuarem no processo de osteoindução e no combate a infecções. A matéria prima utilizada foi β -Fosfato Tricálcico e Wollastonita em três composições variando a concentração em massa destes constituintes: a composição formada por 20% em massa de Wollastonita com 80% em massa de β -Fosfato Tricálcico foi denominada de 20%W + 80% de β -Fosfato Tricálcico; o mesmo seguiu-se para as outras composições 60%W + 40% de β -Fosfato Tricálcico e 80%W + 20% de β -Fosfato Tricálcico. Os *scaffolds* foram processados pelo método da réplica da esponja polimérica e sinterizados. Após sinterização, parte destes *scaffolds* foram recobertos com uma solução polimérica de Caprolactona contendo Vancomicina e posteriormente com uma segunda solução polimérica de Pluronic contendo Dexametasona. As matérias-primas principais e os *scaffolds* com e sem adição dos princípios ativos foram então caracterizados. Os principais resultados mostram que o fenômeno da Biodegradação ocorreu de maneira mais rápida para a amostra 80% de W + 20% de β -Fosfato Tricálcico. O ensaio de Bioatividade, comprovou eficácia quanto a formação da capa de apatita para as três concentrações, diferenciando-se apenas quanto ao tempo de formação. O modelo de *scaffolds* proposto provou ser eficaz no carregamento e na liberação dos princípios ativos, e o teste de deposição celular comprovou a característica osteocondutora da Wollastonita.

Palavras- chave: *Scaffolds* Multifuncionais. Biomateriais Método da Réplica. Regeneração Óssea. Osteoindutor.

ABSTRAT

Although the bone tissue has the ability to be repaired by itself against some kind of defect, this capacity may present limitations and occur in a prolonged time. In view of this, the Biomaterials Engineering seeks alternatives to accelerate this process through the use of scaffolds, which provide an adequate environment for cell proliferation, fixation and differentiation, and can be used as device for drug distribution. Taking account of this fact, this thesis developed porous scaffolds with ceramic-vitroceramic composition at various concentrations, and substances containing active principles to act in the process of osteoinduction and osteomyelitis were partially added to these scaffolds. The raw material used was β -Tricalcium Phosphate and Wollastonite in three concentrations: 20% Wollastonite with 80% β -Tricalcium Phosphate, 60% Wollastonite with 40% β -Tricalcium Phosphate and 80% Wollastonite with 20% β -Tricalcium phosphate. The scaffolds were processed by the method of replica of the polymeric sponge and sintered. After sintering, part of these scaffolds were coated with a Vancomycin-containing caprolactone polymer solution and subsequently with a second Pluronic polymer solution containing Dexamethasone. The main raw materials and scaffolds with and without addition of the active principles were then characterized. The main results show that the phenomenon of Biodegradation occurred more quickly for the sample containing 80% Wollastonite with 20% of β -Tricalcium Phosphate. The Bioactivity essay proved to be effective in the formation of the apatite layer for the three concentrations, differing only in the time for making-up. The scaffold model as proposed proved to be effective in carrying and releasing the active principles, and the cell deposition test proved the osteoconductive characteristic of Wollastonite.

Keywords: Multifunction *Scaffolds*. Biomaterials Replication Method. Bone Regeneration. Osteoinducer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da Matriz Extracelular com alguns de seus componentes.....	22
Figura 2 - Estrutura Anatômica de um osso longo	25
Figura 3 Etapas da regeneração óssea.	27
Figura 4 - Ilustração de vários implantes e dispositivos utilizados para substituir ou melhorar a função dos tecidos doentes ou órgãos perdidos	29
Figura 5 Modelos de comportamento de fluxos reológicos	45
Figura 6 Estágios da sinterização em fase sólida. a) formação dos pescoços; b) densificação; c) eliminação de poros	50
Figura 7 - Diagrama Ternário dos elementos de interação com o tecido ósseo.....	58
Figura 8 Fluxograma com as etapas de produção dos scaffolds (Própria,2017).....	65
Figura 9:Diagrama de fases sistema $2\text{CaO}.\text{P}_2\text{O}_5$ e CaO	67
Figura 10 Etapas de produção do β -TCP A=pó de HA, B=ácido ortofosfórico, C=água destilada, D= agitador mecânico usado para mistura, E=pasta formada por HA e ácido ortofosfórico, F= estufa com circulação de ar, G=pó de TCP amorfo, H=forno usado para sinterização do β -TCP (Própria,2017).	68
Figura 11 Representação de um moinho de atrito	69
Figura 12 - Esponja de poliuretano utilizada na confecção dos scaffolds.	72
Figura 13 Ciclo térmico utilizado na sinterização dos scaffolds	73
Figura 14 – scaffolds	73
Figura 15 Representação gráfica da espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier da Wollastonita	82
Figura 16 Representação gráfica da espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier da Hidroxiapatita	82
Figura 17 Representação gráfica da espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier do β -TCP.....	83
Figura 18 Perfil da curva termogravimétrica e da análise térmica diferencial da Wollastonita.....	83
Figura 19 Perfil da curva termogravimétrica e da análise térmica diferencial da Hidroxiapatita	84
Figura 20 Perfil da curva termogravimétrica e da análise térmica diferencial do β -TCP	84
Figura 21 DRX da amostra de Wollastonita	85
Figura 22 DRX da amostra de Hidroxiapatita.....	85

Figura 23 DRX da amostra de β -TCP	86
Figura 24 Perfil da distribuição das partículas da Wollastonita	87
Figura 25 Perfil da distribuição das partículas da Hidroxiapatita	87
Figura 26 Perfil da distribuição das partículas do β -TCP	87
Figura 27 Microscopia Eletrônica da Wollastonita	88
Figura 28 Microscopia Eletrônica da Hidroxiapatita	89
Figura 29 Microscopia Eletrônica do β -TCP	89
Figura 30 Perfil da distribuição das partículas da Wollastonita após moagem.....	90
Figura 31 Perfil da distribuição das partículas do β -TCP após moagem.....	90
Figura 32 Perfil da curva da influência do potencial hidrogeniônico no potencial zeta da Wollastonita.....	91
Figura 33 Perfil da curva da influência do potencial hidrogeniônico no potencial zeta do β -TCP.....	91
Figura 34 Perfil da curva da influência da concentração do dispersante no potencial zeta da Wollastonita	92
Figura 35 Perfil da curva da influência da concentração do dispersante no potencial zeta do β -TCP	92
Figura 36 Viscosidade Aparente em função da Fração Volumétrica de Sólidos	93
Figura 37 Curva de Fluxo da Fração Volumétrica de Sólidos	93
Figura 38 Curva de Fluxo da suspensão cerâmica de composição 20%W+80% β -TCP	94
Figura 39 Curva de Fluxo da suspensão cerâmica de composição 60%W+40% β -TCP	94
Figura 40 Curva de Fluxo da suspensão cerâmica de composição 80%W+20% β -TCP	95
Figura 41 Curva de Fluxo da suspensão cerâmica de composição 20%W+80% β -TCP sob efeito do tempo de ultrassom	95
Figura 42 Curva de Fluxo da suspensão cerâmica de composição 60%W+40% β -TCP sob efeito do tempo de ultrassom	96
Figura 43 Curva de Fluxo da suspensão cerâmica de composição 80%W+20% β -TCP sob efeito do tempo de ultrassom	96
Figura 44 Curva de Fluxo da suspensão cerâmica de composição 20%W+80% β -TCP representando o efeito da concentração de ligante	97

Figura 45 Curva de Fluxo da suspensão cerâmica de composição 60%W+40%β-TCP representando o efeito da concentração de ligante	97
Figura 46 Curva de Fluxo da suspensão cerâmica de composição 60%W+40%β-TCP representando o efeito da concentração de ligante	97
Figura 47 Perfil da curva de dilatométrica para as composições: A-20%W+80%β-TCP	98
Figura 48 Perfil da curva de dilatométrica para as composições: A-60%W+40%β-TCP	98
Figura 49 Perfil da curva de dilatométrica para as composições: A-80%W+20%β-TCP	99
Figura 50 Difratoograma do scaffold de composição 20%W+80%β-TCP	99
Figura 51 Difratoograma do scaffold de composição 60%W+40%β-TCP	100
Figura 52 Difratoograma do scaffold de composição 80%W+20%β-TCP	100
Figura 53 Micrografia Eletrônica da superfície do scaffold de composição 20%W+80%β-TCP	101
Figura 54 Micrografia Eletrônica da superfície do scaffold de composição 60%W+40%β-TCP	101
Figura 55 Micrografia Eletrônica da superfície do scaffold de composição 80%W+20%β-TCP	102
Figura 56 Scaffold impregnado com solução de Pluronic e Dexametasona	103
Figura 57 Scaffold impregnado com solução de Caprolactona e Vancomicina.....	103
Figura 58 Perfil da curva de liberação da Dexametasona.....	104
Figura 59 Perfil da curva de liberação da Vancomicina	104
Figura 60 Biodegradação em meio TRIS dos scaffolds 20%W+80%β-TCP	105
Figura 61 Biodegradação em meio TRIS dos scaffolds 60%W+40%β-TCP	105
Figura 62 Biodegradação em meio TRIS dos scaffolds 80%W+40%β-TCP	106
Figura 63 Micrografia da superfície dos scaffolds no tempo 0 de imersão.....	106
Figura 64 Micrografia da superfície dos scaffolds no tempo de 1 dia de imersão...	107
Figura 65 Micrografia da superfície dos scaffolds no tempo de 3 dias de imersão .	108
Figura 66 Micrografia da superfície dos scaffolds no tempo de 7 dias de imersão .	108
Figura 67 Micrografia da superfície dos scaffolds no tempo de 14 dias de imersão	109
Figura 68 Micrografias adesão celular em scaffold e scaffold com princípios ativo composição 20W+80β-TCP	109

Figura 69 Micrografias adesão celular em scaffold e scaffold com princípios ativo composição 60W+40 β -TCP	110
Figura 70 Micrografias adesão celular em scaffold e scaffold com princípios ativo composição 20W+80 β -TCP	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação e algumas propriedades dos principais compostos de fosfato de cálcio (Hench, 1999).....	39
Tabela 2: Relação entre forças de interações e tamanho de partícula (Horn, 1995).	46
Tabela 3: Mecanismo relacionado ao tipo de dispersante utilizado em reologia (Moreno, 2005).....	47
Tabela 4 - Requisitos para obtenção de Biomaterial. (Hench et al. 1971)	60
Tabela 5 - Material, empresa comerciante e especificação técnica dos produtos utilizados na produção dos scaffolds (Própria,2017).....	64
Tabela 6 Porcentagem em óxido dos elementos químicos em Wollastonita e Hidroxiapatita	81
Tabela 7 Valores de resistência à compressão dos scaffolds	102

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	19
1 INTRODUÇÃO.....	19
CAPÍTULO 2	22
2 REVISÃO LITERÁRIA	22
2.1 Tecido Ósseo.....	22
2.1.1 Estrutura Óssea	25
2.1.2 Regeneração do Tecido Ósseo	26
2.2 Engenharia de Biomateriais	28
2.3 Scaffolds	34
2.4 <i>Scaffolds</i> Cerâmicos	37
2.4.1 Fosfato de Cálcio	38
2.4.2 Vitrocerâmicas Bioativas.....	40
2.5 Métodos para Produção de <i>Scaffolds</i>	41
2.5.1 Método da Réplica	42
2.6 Reologia.....	43
2.6.1 Reologia das suspensões	46
2.7 Sinterização Cerâmica	48
2.7.1 Sinterização por fase solida	49
2.7.2 Técnicas de Sinterização	51
2.7.3 <i>Scaffolds</i> Multifuncionais	51
CAPÍTULO 3	57
3 ESTADO DA ARTE.....	57
CAPÍTULO 4	64
4 MATERIAIS E MÉTODOS	64
4.1 Materiais	64
4.2 Métodos	65
4.2.1 Local da Pesquisa.....	65
4.2.2 Delineamento Experimental	65
4.2.3 ETAPA 1	66
4.2.4 ETAPA 2	69
4.2.5 Formulação das Suspensões Cerâmicas.	70

4.2.6 ETAPA 3	72
4.2.7 ETAPA 4	74
4.2.8 Caracterizações	76
CAPÍTULO 5	81
5 RESULTADOS	81
5.1 RESULTADOS ETAPA 1	81
5.1.1 Caracterização das Matérias Primas e da Hidroxiapatita.	81
5.1.2 RESULTADOS ETAPA 2	90
5.1.3 Caracterização dos <i>Scaffolds</i>	90
5.1.4 RESULTADOS ETAPA 3	98
5.1.5 Dilatometria	98
5.1.6 RESULTADOS ETAPA 4	102
CAPÍTULO 6	112
6 DISCUSSÕES	112
CAPÍTULO 7	118
7 CONCLUSÕES	118
7.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	119
REFERÊNCIAS	120
ANEXOS	131

CAPÍTULO 1

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Fraturas ósseas são definidas como a perda da continuidade do tecido e são causadas pela incidência de uma carga excessiva que ultrapassa sua capacidade de resistência mecânica ou ainda por um processo de fadiga na estrutura óssea. As fraturas, representam um problema de alta incidência e elevado custo socioeconômico para o sistema de saúde pública, configurando causa de morbidade e mortalidade (Velloso, 2005).

Apesar do tecido ósseo, possuir a capacidade de restaurar a sua arquitetura tecidual e função, após uma lesão, retornando ao seu estado normal por meio da proliferação celular e estreitas interações entre as células e a matriz extracelular, essa capacidade tem suas limitações e também pode apresentar falhas, se certas condições não forem atingidas, como por exemplo: defeitos na vascularização, instabilidade mecânica, tecidos invasores com alta atividade proliferativa, entre outros (Fröhlich *et al* , 2008;Schenk *et al.*, 1994).

Visando auxiliar e acelerar o processo natural da regeneração do tecido ósseo, a Engenharia de Biomateriais desenvolveu suportes sintéticos denominados de *scaffolds*, capazes de fornecerem os sinais necessários para promover a constituição dos tecidos funcionais (Furth *et al.*, 2007).

Os *scaffolds* proporcionam um suporte físico para a adesão celular e um modelo para formação de um novo tecido, para que isso ocorra, é necessário que eles apresentem propriedades físicas e biológicas adequadas ao tipo de tecido, tais como: tamanho e estrutura dos poros, topografia da superfície, composição química, resistência mecânica e taxa de degradação controlada (Jang *et al.*, 2006).

Para sua conformação, vários métodos têm sido descritos em literatura como por exemplo o método da: fabricação sólida de forma livre, da réplica da esponja polimérica, da lixiviação de sal, da mistura de dupla fase, gel de fundição, fabricação aditiva, entre outros. Dentre eles tem merecido destaque, o método de réplica da esponja polimérica devido ao potencial de formação em escala industrial,

possibilidade de reprodução por um grande número de materiais, e formação de produtos com alta porosidade e interconectividade (Ahrens *et al.*, 2007).

Na escolha da classe do Biomaterial ideal para produção dos *scaffolds* utilizados em regeneração óssea, as biocerâmicas do tipo β -fosfato tricálcico têm sido bastante utilizadas devido à semelhança inorgânica com a estrutura óssea, excelente bioabsorção, biocompatibilidade e osteocondutividade. Os Biovidros também tem sido bastante utilizados por apresentarem alta bioatividade em decorrência da presença de silício que desempenha um papel essencial nos eventos metabólicos induzindo uma nova formação óssea, como é o caso do biovidro Wollastonita (EL-GHANNAM, 2005)

O objetivo desta tese foi desenvolver *scaffolds* cerâmicos para regeneração óssea pelo método da réplica, utilizando esponja de poliuretano; Formular e estabelecer condições reológicas ideais de suspensões cerâmicas de Wollastonita e β -TCP para confecção dos *scaffolds* em três composições: 20% de Wollastonita com 80% de β -Fosfato Tricálcico (m/m); 60% de Wollastonita com 40% de β -Fosfato Tricálcico (m/m); 80% de Wollastonita com 20% de β -Fosfato Tricálcico (m/m); Desenvolver metodologia e incorporar nos *scaffolds* produzidos, as substância Dexametasona com finalidade de atuar como osteoindutora e substância Vancomicina com finalidade de atuar no tratamento de infecções ósseas.

A tese é dividida em sete capítulos onde: o primeiro capítulo consiste na introdução, com a apresentação do trabalho, justificativa e os objetivos a serem alcançados; o segundo capítulo é constituído da revisão literária, para fundamentação da parte teórica; no terceiro capítulo é apresentado o estado da arte da utilização de Wollastonita e β -TCP; enquanto que no quarto capítulo, são apresentados a descrição da metodologia, os equipamentos e os materiais utilizados para o desenvolvimento do trabalho; no quinto e no sexto capítulo são apresentados os resultados e as discussões; e sétimo capítulo são apresentadas as conclusões obtidas a partir dos resultados e descrição para trabalhos futuros .

CAPÍTULO 2

Revisão Literária

2 REVISÃO LITERÁRIA

2.1 Tecido Ósseo

A diferenciação celular que ocorre durante o desenvolvimento embrionário gera os inúmeros tecidos que atuam de modo integrado na realização das diferentes funções do nosso organismo (Ovalle *et al.*, 2014).

Os tipos de Tecidos encontrados no nosso corpo são: Tecido Epitelial (responsável pelo revestimento interno e externo do organismo e pela produção de secreções), Tecido Conjuntivo (responsável por preencher os espaços entre os órgãos, dar sustentação, atuar na defesa e nutrição celular), Tecido Muscular (responsável pela locomoção e contração do corpo) e Tecido Nervoso (responsável pela coordenação das funções dos diferentes órgãos) (Ovalle *et al.*, 2014).

O Tecido Conjuntivo, apresenta células imersas em uma grande quantidade de material extracelular (sem célula) que se organiza em forma de rede denominada de Matriz Extracelular (MEC), (Figura 1), formada por: Proteínas Estruturais Fibrosas, como o colágeno e a elastina; Glicoproteínas Adesivas, como a fibronectina e laminina; e Cadeias de Polissacarídeos da classe glicosaminoglicanas (GAGs), que são em geral encontradas ligadas covalentemente a proteínas na forma de proteoglicanos (Gartner *et al.*, 2007; Aarestrup, 2012).

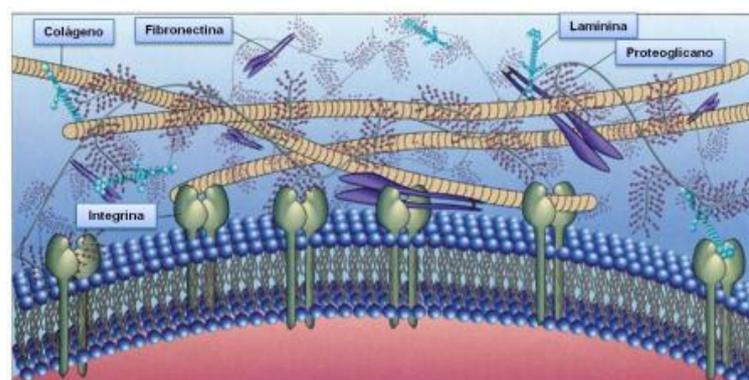


Figura 1 - Estrutura da Matriz Extracelular com alguns de seus componentes.

Fonte: (<http://docplayer.com.br/11783381-Tecido-conjuntivo-celulas-matriz-extracelular-mec-abundante.html>)

Dentre as funções que uma MEC tem a desenvolver estão: preencher os espaços não ocupados pelas células; dar resistência aos tecidos; fornecer o meio por onde chegam os nutrientes e por onde se elimina os dejetos celulares; fornecer uma estrutura de ancoragem e migração para as células e prover o ambiente para o transporte de sinais intercelulares (Aarestrup, 2012).

Direcionando a pesquisa ao Tecido Conjuntivo de Consistência Rígida encontramos o Tecido Ósseo, constituinte do esqueleto ósseo cujas funções são: servir de suporte aos tecidos moles; proteger órgãos vitais; alojar e proteger a medula óssea; oferecer apoio aos músculos esqueléticos transformando suas contrações em movimentos úteis; servir de alavanca na ampliação das forças geradas na contração muscular; armazenar ou liberar cálcio, fosfato e outros íons, de forma a manter constante seus níveis no organismo além de, absorver toxinas e metais pesados do organismo, minimizando seus efeitos no corpo (Lopes *et al.*, 2013).

A MEC deste tecido é calcificada e recebe o nome de Matriz Óssea. É nela que ocorre o local de ancoragem e atividade das células ósseas: osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Esta MEC está formada por uma fase inorgânica e por uma fase orgânica (Lopes *et al.*, 2013).

A porção inorgânica da matriz óssea é a parte que se encontra calcificada por íons cálcio e íons fosfatos, além da presença de magnésio e de outros íons em quantidades menores como: bicarbonato, potássio, sódio e citrato (Frost, 2001; Fawatt *et al.*, 2002; Kierszenbaum, 2012).

O Cálcio é o mineral mais abundante no corpo humano, é essencial para a mineralização de ossos e dentes, e para a regulação de eventos intracelulares em diversos tecidos. O esqueleto é o seu principal reservatório no organismo, uma vez que abriga, juntamente com os dentes, 99% do total de cálcio, sendo um dos responsáveis pela manutenção da concentração do cálcio sérico. Os outros 1% estão distribuídos no sangue, fluido extracelular e tecidos moles, sendo que desses 1%, 50% encontra-se na forma ionizada (fração biologicamente ativa), 40% ligado a proteínas não difundíveis, principalmente albumina (fração biologicamente inativa) e os 10% restantes sob a forma de complexos com íons fosfato e citrato (Frost, 2001; Fawatt *et al.*, 2002; Kierszenbaum, 2012).

Já para o Fósforo, 80% está na forma de cristais de fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e fosfato de magnésio ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$) presente nos ossos e nos dentes,

10% estão ligados a proteínas e outros 10% encontra-se em forma inorgânica (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}). O Fósforo possui diversas funções, além de propiciar rigidez óssea, é o componente essencial do trifosfato de adenosina (ATP) e do fosfato de creatina (CP), que ao se unir com lipídeos, forma fosfolipídios que são elementos essenciais nas membranas celulares (Frost, 2001; Fawatt *et al.*, 2002; Kierszenbaum, 2012).

Já a parte orgânica da MEC é formada por fibras colágenas constituídas principalmente de Colágeno do tipo I e por uma quantidade pequena de Proteoglicanos e Glicoproteínas que possuem participação na mineralização da matriz (Frost, 2001; Fawatt *et al.*, 2002; Kierszenbaum, 2012).

O Colágeno tipo I é o mais abundante do corpo humano. É responsável pela manutenção da integridade dos tecidos em função das suas propriedades mecânicas e pela interação com as células presentes na MEC. Ocorre como estruturas denominadas de fibrilas de colágeno e está presente nos ossos, dentina, tendões, cápsulas de diversos órgãos e derme (Frost, 2001; Fawatt *et al.*, 2002; Kierszenbaum, 2012).

Os Proteoglicanos e as Glicoproteínas são moléculas secretadas pelos Fibroblastos, e constituem a substância intercelular fundamental na matriz. São responsáveis por atuar como componente estrutural da MEC, por ancorar células à matriz e por aderirem os componentes da MEC entre si ou com as células (Frost, 2001; Fawatt *et al.*, 2002; Kierszenbaum, 2012).

Em relação as células ósseas, os Osteócitos apesar de apresentarem pouca atividade sintética, são os responsáveis pela manutenção óssea. A quantidade de Osteócitos existente por unidade de volume ósseo está, diretamente relacionada ao processo de formação óssea. Quanto maior for a rapidez de formação óssea, maior será a quantidade de Osteoblastos que se transformarão, em Osteócitos (Junqueira *et al.* 2013; Nijweide *et al.*, 2002).

Osteoblastos são as células responsáveis por sintetizar a parte orgânica da matriz óssea. São capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz e em sua fase de síntese, mostram características ultra estruturais das células produtoras de proteínas (Junqueira *et al.* 2013; Nijweide *et al.*, 2002).

Já os Osteoclastos são células móveis, gigantes, multinucleadas e extensamente ramificadas, com formas irregulares e espessura variáveis

frequentemente encontradas nas áreas de reabsorção de tecidos ósseos (Junqueira *et al.* 2013; Nijweide *et al.*, 2002).

Fazem parte também da estrutura óssea, membranas conjuntivas: Endóstio e Perióstio que contém células osteogênicas revestindo a superfície interna e externa dos ossos. As principais funções destas células são a nutrição do tecido ósseo e o fornecimento de novos Osteoblastos para o crescimento e a recuperação óssea (Junqueira *et al.* 2013; Nijweide *et al.*, 2002).

2.1.1 Estrutura Óssea

A estrutura de um osso de forma macroscópica, apresenta regiões sem cavidades visíveis, denominadas de osso compacto e regiões dotadas de cavidades intercomunicantes os ossos esponjosos. Apesar desta aparência morfológica, ambas regiões possuem a mesma estrutura histológica básica (Andia *et al.*, 2006).

Nos ossos classificados como longos, (Figura 2), as extremidades, que recebem o nome de epífises são formadas por osso esponjoso com uma delgada camada superficial compacta. Já a parte cilíndrica, chamada de diáfise, é quase totalmente compacta, com pequena quantidade de osso esponjoso na região mais profunda, delimitando o canal medular. Nos osso longos, o osso compacto recebe também o nome de osso cortical (Berne *et al.*,2000).

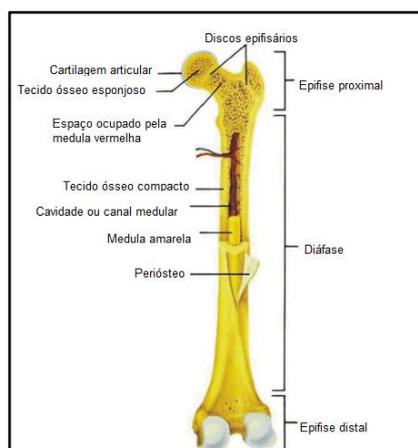


Figura 2 - Estrutura Anatômica de um osso longo
Fonte: (Adaptação de Roesler, 2006).

Já os ossos classificados como curtos, apresentam o centro esponjoso, sendo toda sua periferia recoberta por uma camada compacta. Nos ossos

classificados como chatos, existem duas camadas de osso compacto, as chamadas tábuas internas e externas, separadas por osso esponjoso que, nesta localização, recebe o nome de *díploe* (Berne *et al*,2000).

Nas cavidades do osso esponjoso e o canal medular da diáfise dos osso longos, encontramos a medula óssea. Na Figura 2 estão representadas as regiões acima que compõem a estrutura óssea.

Histologicamente, o tecido ósseo pode ser denominado de: Imaturo ou primário – referente aquele que surge primeiro tanto no desenvolvimento embrionário como na reparação de fraturas, sendo do tipo temporário e substituído. As fibras colágenas neste tecido se dispõem irregularmente. O outro tipo é denominado de Osso maduro, secundário ou lamelar, referente aquele que substitui o osso primário e diferentemente do anterior, suas fibras encontram-se organizadas em lamelas (Gartner, 2007).

2.1.2 Regeneração do Tecido Ósseo

O tecido ósseo é capaz de reparar fraturas ou defeitos locais por meio do processo de regeneração em decorrência da alta capacidade de multiplicação celular, formando um novo tecido com a mesma organização estrutural e funcional do tecido anterior. Para este processo, algumas condições básicas devem ser respeitadas como por exemplo, amplo suprimento sanguíneo, boa estabilidade mecânica e fornecimento de uma base sólida (Junqueira *et al*. 2013).

A regeneração óssea tem seu início a partir da presença de um hematoma, decorrente do sangramento ocorrido na região óssea lesionada e nos tecidos circundantes Segundo as etapas de consolidação óssea, nas primeiras duas semanas, segue-se o mesmo padrão da cicatrização da pele ou de qualquer outra ferida. O local é preenchido com sangue a as extremidades quebradas dos ossos ficam necróticas, então o coágulo sanguíneo é invadido por Macrófagos e Osteoclastos, que removem o osso morto, e por Osteoblastos, que produzem osso, em lugar de Fibroblastos, que formariam o tecido fibroso nas lesões de tecidos moles (AL-AQL *et al*, 2008).

Entre duas e seis semanas após a lesão, desenvolve-se um tecido osteóide, formam-se a massa firme, ou calo, em torno da fratura e se inicia a ossificação do osteóide. O calo se forma fora do osso, como calo subperiosteal, e dentro dele,

como calo endosteal. O pH dos tecidos aumenta nesta etapa e ocorre a deposição de cálcio (Kaigler *et al.*, 2013; Dimitriou *et al.*, 2011).

Entre seis e doze semanas ocorre a ossificação, uma ponte óssea sólida atravessa o espaço e o osso readquire resistência mecânica. Entre 12 e 26 semanas o calo amadurece. Entre seis e doze meses os espaços entre as extremidades corticais são preenchidos. Entre um e dois anos ocorre remodelamento, ou seja; as proeminências ósseas tornam-se lisas e é restaurada a arquitetura óssea normal. O processo é muito variável e é muito mais rápido nas crianças, quando o calo pode ser evidenciado com duas semanas. Na figura 3 estão descritas as etapas da regeneração (Kaigler *et al.*, 2013; Dimitriou *et al.*, 2011).

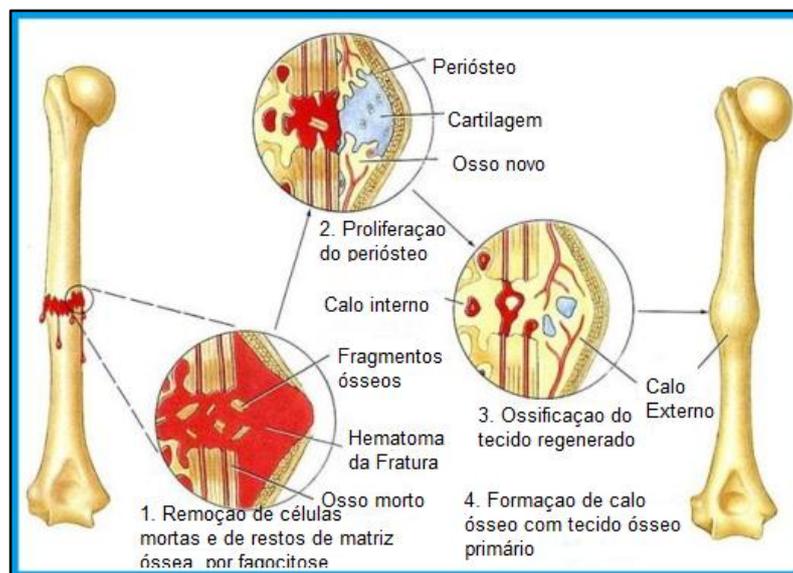


Figura 3 Etapas da regeneração óssea.

Fonte: (<http://www.sobiologia.com.br/conteudos/FisiologiaAnimal/sustentacao2.php>)

Em alguns casos como por exemplo, extensas lesões, ocorre uma invasão de tecido fibroso preenchendo o espaço do defeito e impedindo a formação da vascularização ou simplesmente a rede da matriz não se forma. Nestes casos, a regeneração não é completa e esse defeito ainda permanece como um desafio clínico. Quando isto ocorre, faz-se necessário a utilização de artefatos encontrados na Engenharia de Biomateriais que auxiliam esse mecanismo de regeneração natural (Nussbaum *et al.*, 2008).

2.2 Engenharia de Biomateriais

Em 1919, Karl Ereky apresentou a primeira definição para o termo Biotecnologia, como sendo: “A ciência e os métodos que permitem a obtenção de produtos a partir de matéria prima, mediante a intervenção de organismos vivos” e que posteriormente foi aceita pelo Food and Agriculture Organization (FAO) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como sendo: “qualquer aplicação tecnológica que usa sistemas biológicos, organismos vivos ou seus derivados, para criar ou modificar produtos e processos para usos específicos” (Ferro, 2010).

Ao longo dos anos não apenas o conceito foi aprimorado como também a própria ciência, resultando nas últimas décadas em uma intensa expansão na Biotecnologia, que correspondente a aquisição de novos conhecimentos no desenvolvimento de processos tecnológicos e de sua aplicação na produção de insumos para a área de saúde, seguindo atualmente múltiplas vertentes, frequentemente complementares e interativas como é o caso da Engenharia de Biomateriais (Malajovich, 2009).

O conceito de Engenharia de Biomateriais tem sido definido por diversos autores ao longo dos anos, de modo que nesta tese definimos como: “Dispositivos, ou seja, aparelhos constituídos com determinada finalidade, aplicados em contato com sistemas biológicos, incluindo fluidos, ou utilizados em aplicações diagnósticas, cirurgias ou procedimentos terapêuticos, constituídos de componentes de origem sintética ou natural, assim como de componentes naturais quimicamente modificados, conformados em forma sólida, gelatinosa, pastosa ou líquida, não sendo necessariamente fabricados como é o caso das válvulas cardíacas de porcos ou das parte de pele humana tratadas para uso como implante”. A Figura 4 abaixo mostra aplicações de Biomateriais ao longo do corpo humano (Park, 2001; Smith, 2012; Ratner *et al.*, 2013).

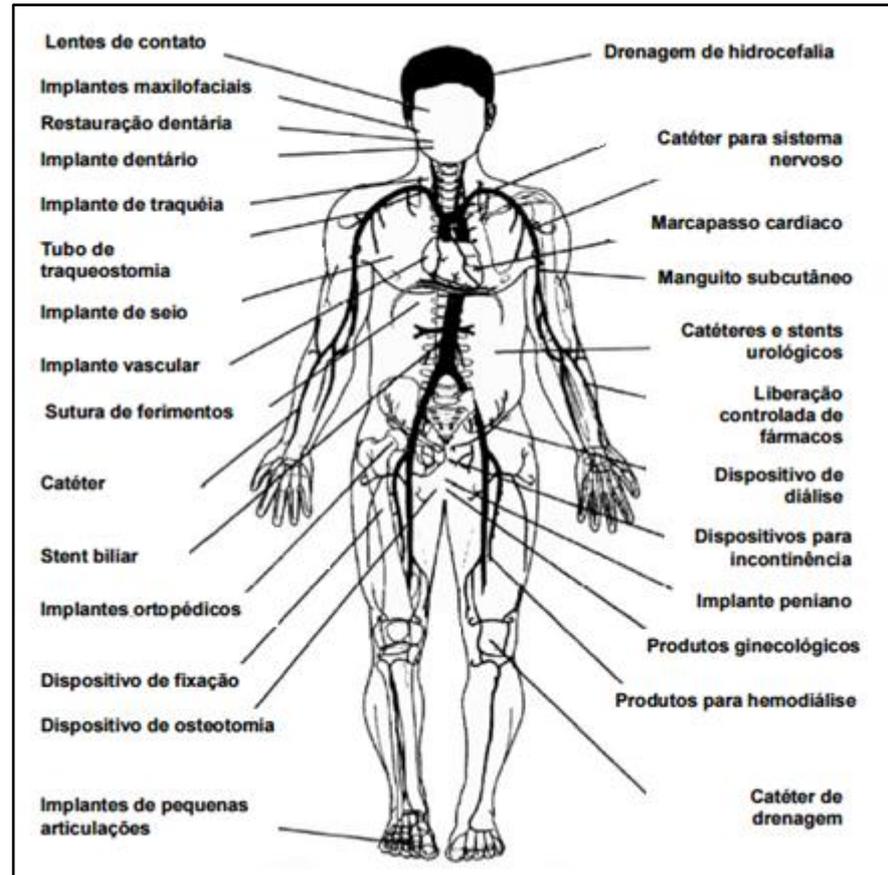


Figura 4 - Ilustração de vários implantes e dispositivos utilizados para substituir ou melhorar a função dos tecidos doentes ou órgãos perdidos
 Fonte: (Adaptação de Hill, 1998).

Uma vez que foi definido que os Biomateriais mantêm uma relação com o ser vivo, estes devem ser biocompatíveis. O termo biocompatibilidade pressupõe que a aplicação clínica de um Biomaterial não cause reações adversas, tóxicas ou carcinogênicas ao paciente. A norma “ISO 10993-1: *General Principles*” é o ponto de partida mais recomendado para a avaliação da biocompatibilidade, a qual apresenta os princípios fundamentais que governam a avaliação biológica de Biomateriais e dispositivos biomédicos (ISO 10993-1, 2009).

A biocompatibilidade, está diretamente associada ao comportamento das células em contato com o Biomaterial e particularmente com adesão na superfície. As características da superfície do material, topografia, composição química e superfície energética, são parâmetros importantes em estudos da biocompatibilidade e cito-compatibilidade *in vitro* e correspondem à primeira fase na interação célula/material, que irá influenciar na capacidade das células se diferenciarem em contato com o implante, promovendo a reconstituição inicial do tecido original (Oréfice *et al.*, 2006).

Para Craighead *et al.*, (2001), a interação das células com as superfícies dos materiais é de extrema importância na efetivação de implantes médicos, podendo definir o seu grau de rejeição. O conhecimento dos mecanismos básicos de interação célula/material e um melhor entendimento dos processos a nível celular durante a adesão podem colaborar para o desenvolvimento de novos biomateriais e para o desenvolvimento de novos produtos biomédicos (Craighead *et al.*, 2001).

Segundo Barbanti *et al.*, (2005), quando se trata de regeneração de órgãos e tecidos, torna-se fundamental o estudo do comportamento e diferenciação celular induzidos pela estrutura, composição e presença de elementos biológicos dos suportes, para otimizar os mesmos e avançar em técnicas de cultivo celular, que possam permitir a reprodução dos tecidos e órgãos em toda sua complexidade (Barbanti *et al.*, 2005).

A anexação, a adesão e o alongamento das células dependentes de ancoragem, pertencem à primeira fase de interação entre célula-suporte, sendo que a qualidade desta primeira etapa influenciará as respostas subsequentes das células e tecidos, como na capacidade das células de se proliferarem e diferenciarem em contato com o biomaterial (Andrade, 2007).

A adesão celular a um biomaterial está relacionada a dois fenômenos diferentes: fase de anexação e fase de adesão. A anexação, que ocorre rapidamente, é o movimento da célula em direção ao biomaterial recém implantado, nesta ocorrem alguns eventos como ligações físico-químicas, através de forças iônicas e forças de Van der Waals (Anselme, 2000).

A fase de adesão ocorre posteriormente e envolve diversas moléculas biológicas como proteínas de matriz extracelular, proteínas de membrana celular e do citoesqueleto, que interagem conjuntamente para induzir a transdução do sinal, promovendo a ação de fatores de transcrição e conseqüentemente regulando a expressão gênica (Anselme, 2000).

Para Gumbiner (2000), os aspectos da dinâmica da adesão celular necessitam de regulação destes receptores de adesão celular, que se encontram na superfície da célula. A capacidade adesiva dos conjuntos de receptores de adesão ou dos processos citoesqueleto-dependentes como o espalhamento celular, são cruciais para uma boa adesão celular, controle do crescimento e mobilidade celular (Gumbiner, 2000).

As características hidrofílicas e hidrofóbicas dos materiais são muito importantes nestas interações entre células e substrato, ou seja, as células aderem mais fortemente a superfícies de materiais mais hidrofílicos, isto pode ser explicado em parte pela própria constituição de algumas regiões da membrana celular lipídica, que sendo altamente hidratadas tendem a desenvolver contatos com superfícies igualmente hidratadas (Yang et al., 2002).

A adesão celular influencia vários fenômenos naturais, como: embriogênese, manutenção estrutural dos tecidos, cicatrização, resposta imune, metástase, e interação célula/material. Para que novos Biomateriais possam ser aplicados com sucesso na engenharia de tecidos, há a necessidade fundamental do estudo das interações entre as células e estes materiais e é através deste perfil que os materiais utilizados como Biomateriais são de intensa importância (Pertile, 2007).

Sobre essa relação com o organismo vivo, os Biomateriais podem responder a essa interação ao menos por três maneiras:

Bioinertes – materiais menos susceptíveis a causar alguma reação biológica devido a sua estabilidade química em comparação com outros materiais. Não ocorre reações do tipo químicas entre o material e o tecido. A formação de envoltório fibroso é mínima. O material não libera nenhum tipo de componente ou quando o faz ocorre em quantidades mínimas. A quantidade de células fagocitárias na interface é mínima. A resposta fagocitária será passageira e uma fina cápsula tomará lugar após o implante. Como exemplos, podem-se citar: carbono, alumina, zircônia, titânio, tântalo e nióbio (Park, 2001; Smith, 2012; Ratner *et al.*, 2013).

Bioativos - definido como sendo a propriedade de formar tecido sobre a superfície de um Biomaterial e estabelecer uma interface capaz de suportar cargas funcionais. Devido à similaridade química entre esses materiais e a parte mineral óssea esta classe de Biomateriais realizam ligações químicas com o tecido ósseo, um fenômeno chamado de osteointegração permitindo a osteocondução por meio do recobrimento por células ósseas. Como exemplos, podem-se citar: vidros bioativos, vitro-cerâmicas e cerâmicas de fosfato de cálcio (Park, 2001; Smith, 2012; Ratner *et al.*, 2013).

Biotoleráveis – materiais apenas tolerados pelo organismo sendo separados do tecido hospedeiro pela formação de um envoltório de tecido fibroso. Esta camada é induzida pela liberação de compostos químicos nos, produtos de corrosão e outros por parte do material implantado. A espessura da camada e sua composição

dependem do tipo de material usado. Quanto maior a espessura da camada de tecido fibroso formado, menor a tolerabilidade dos tecidos ao material. Os materiais biotoleráveis são praticamente todos os polímeros sintéticos assim como a maioria dos metais (Park, 2001; Smith, 2012; Ratner *et al.*, 2013).

Para esta tese o foco foi direcionado aos Biomateriais Bioativos.

Em relação ao tipo de ligação química e estrutura atômica, os Biomateriais podem ser classificados em: Biomateriais Metálicos, Poliméricos ou Cerâmicos, que compreendem os materiais que são utilizados de alguma forma em contato com o organismo vivo. Alguns autores remetem essas matérias a classificação de: Biometálicos, Biopolímeros ou Biocerâmicas quando esses materiais são oriundos de fontes naturais e renováveis e que são utilizados de alguma forma em contato com o organismo vivo.

De maneira sucinta, as características de cada grupo são:

Biomateriais Metálicos ou Biometálicos - são materiais formados por substâncias inorgânicas compostas por um ou mais elementos metálicos e/ou conter elementos não metálicos. Apresentam estrutura cristalina ordenada, em geral são bons condutores térmicos e elétricos. Quase todos são mecanicamente resistentes, dúcteis, e muitos mantêm essa resistência mesmo a altas temperaturas (Park, 2001; Smith, 2012; Ratner *et al.*, 2013).

Biomateriais Poliméricos ou Biopolímeros – consiste em cadeias moleculares orgânicas (carbônicas) de longa extensão. Estruturalmente, a maioria destes materiais não são cristalinos porém, alguns exibem uma mistura de regiões cristalinas e não-cristalinas. A resistência mecânica e ductilidade apresenta grande variedade. Devido sua estrutura interna a maioria conduz calor e eletricidade de maneira precária isto permite que os mesmos sejam utilizados como isolantes na confecção de dispositivos e equipamentos eletrônicos. Em geral possuem temperatura de decomposição relativamente baixa (Park, 2001; Smith, 2012; Ratner *et al.*, 2013).

Biomateriais Cerâmicos ou Biocerâmicos – materiais inorgânicos constituídos por elementos metálicos e não-metálicos unidos por meio de ligações químicas. Estes materiais podem ser cristalinos, não-cristalino ou mistura de ambos. A maioria dos cerâmicos apresenta alta dureza além de serem bons isolantes térmicos. Entretanto tais materiais são, normalmente frágeis (Park, 2001; Smith, 2012; Ratner *et al.*, 2013).

Apesar dos Biomateriais serem utilizados há vários séculos, o fato da sociedade aspirar longevidades centenárias e qualidade de vida inabaláveis pela idade e patologias, torna-se necessário à criação de uma nova geração de Biomateriais, capaz de minimizar desconfortos, valorizar e ampliar expectativas de vida.

O desafio de se criar tal nova geração de Biomateriais passa fundamentalmente pela necessidade de explorar e de guiar as interações entre tecidos vivos e materiais sintéticos, visando a otimização de processos como bioreconhecimento, biofixação e biocolonização (Dee, *et al* 2002).

O sucesso desses processos não só viabiliza a fixação do dispositivo no local de implantação mas também, permite a manipulação de mecanismos intracelulares responsáveis pela reprodução celular, transferência de informações genéticas, produção e distribuição de fatores de crescimento e mediadores de respostas imunológicas e inflamatórias que finalmente favorecerão a regeneração do tecido anfitrião. Com isto, foi criada a Engenharia de Tecidos (Ahsan *et al*, 2005).

A Engenharia de Tecidos, tem como objetivos o desenvolvimento e a manipulação de implantes artificiais, de tecidos gerados em laboratório e/ou de células ou moléculas capazes de substituir ou estimular funcionalmente partes defeituosas ou lesadas de nossos organismos. No caso de tecidos humanos, isto inclui o fígado, músculos, ossos, cartilagem, músculos do coração, nervos, vasos sanguíneos e ilhotas do pâncreas (Borojevic, 2008; Park, 2009).

Os princípios da ETO engloba a retirada de um número mínimo de células do paciente, por técnica de biópsia; expansão celular em laboratório; implantação das células no Biomaterial desejado ou implantação das células na presença de fatores de crescimento e diferenciação. As células que estiverem providas com as condições e sinais adequados para sua viabilidade irão secretar determinados componentes de matriz extracelular para criar, de fato, um tecido vivo que pode ser então usado como tecido substituto a ser reimplantado no sítio defeituoso do paciente (Bianco, 2001).

A ETO cria ambientes sintéticos denominado de *scaffolds* que fornece os sinais necessários para promover a formação dos tecidos funcionais a partir de marcadores naturais (fatores de crescimento) e componentes do próprio organismo (células-tronco mesenquimais) (Rose, 2002; Jang *et al.*, 2006).

Quando a ETO se utiliza das células do próprio organismo, são as células-tronco mesenquimais que agem nesses materiais implantados. Já os fatores de crescimento, por sua vez, desempenham papel fundamental no controle da proliferação e diferenciação desse tipo específico de célula (Costa, 2005).

As células-tronco mesenquimais (CTM) funcionam como um mecanismo de manutenção, diferenciando-se fisiologicamente em vários tipos de células do organismo, uma vez adultas, são conhecidas como células-tronco somáticas. É capaz de proliferar originando outras células-tronco (o que é denominado auto regeneração) e células com capacidade de se diferenciar, originando células diferenciadas com capacidade funcional normal. Assim, ao se multiplicarem mantêm a quantidade de células indiferenciadas constantes (Santos, 2004; Lacerda, 2007).

Dessa forma, as células-tronco mesenquimais proporcionam, ao menos teoricamente, essa inesgotável fonte celular que, a depender do tipo e do fator de crescimento envolvido, pode originar determinado tecido ou vários tecidos do corpo, tais como ósseo, cartilaginoso, adiposo, fibroso, muscular e medular (Costa, 2005).

Caplan e colaboradores (1992 apud REICHERT *et al.*, 2009) foram os primeiros a investigar o potencial das células tronco na área de engenharia de tecido ósseo através da combinação de células tronco humanas com um *scaffold* (Reichert *et al.*, 2009).

2.3 Scaffolds

De acordo com a ASTM F2312-11 (Standard Terminology Relating to Tissue Engineered Medical Products), *scaffolds* são suportes, veículos de liberação, ou matriz, que possuem a finalidade de facilitar a migração, adesão ou transporte celular ou de moléculas bioativas utilizadas para substituir, reparar ou regenerar tecidos (Liu *et al.*, 2007 Taylor, 2009).

A função principal de um *scaffold* é auxiliar nas limitações terapêuticas atuando temporariamente como um suporte, facilitando e guiando o crescimento celular até a completa regeneração do tecido. Para alcançar tal finalidade é imprescindível que os *scaffolds* mantenham morfologia e propriedades mecânicas adequadas ao longo do processo regenerativo, até que a região da lesão esteja completamente recuperada (Stevens *et al.*, 2005).

Seu uso como dispositivo utilizado na regeneração óssea é justificado devido ao fato do osso ser um tecido tridimensional ativo assim os *scaffolds* proporcionam um ambiente adequado para as células se agregarem proliferarem diferenciam e permitir deposição da nova matriz extracelular óssea, podendo serem implantados no organismo preenchidos por células previamente cultivadas em biorreatores, ou, preenchidos por células coletadas diretamente do hospedeiro ou ainda, implantados sem a presença de células. Neste último caso, o preenchimento destes *scaffolds* ocorrerá através dos processos de indução e recrutamento de células osteoblásticas do próprio organismo pelas células tronco já mencionadas anteriormente (Burg *et al.*, 2000; Stevens *et al.*, 2005).

Quando o *scaffold* é implantado no defeito ósseo que precisa ser regenerado, dá-se início à osteoindução de células tronco mesenquimais que migram e se aderem na superfície destes *scaffolds*. Em seguida ocorre a osteocondução onde as células mesenquimais começam a migrar para o interior dos *scaffolds* e a se diferenciarem em células ósseas (osteoblastos), que então se proliferam e sintetizam a matriz óssea. Ao passo que o novo tecido vai sendo formado o *scaffold* é absorvido/degradado pelo próprio organismo, tendo como resultado final a regeneração total do defeito inicial (Hutmacher *et al.*, 2007).

Uma vez que atuam como material implantado no meio corpóreo, os *scaffolds* devem ser biocompatíveis ou seja, não devem induzir respostas inflamatórias, reações imunes extremas ou exercer efeitos tóxicos sobre as células, tecidos ou órgãos e se possível devem ser osteocondutores e/ou osteoindutores. Além disso, a composição e geometria dos *scaffolds* desempenham papéis cruciais na capacidade de colonização celular.

Devem apresentar caráter no mínimo biodegradável ou bioabsorvível, permitindo assim que o novo tecido ocupe o espaço deixado pelo material. Os subprodutos originados dessa degradação não devem produzir qualquer efeito nocivo ao corpo portanto devem serem degradados naturalmente ao longo do tempo e absorvido pelo corpo sem gerar efeitos colaterais (Cheung, 2007, Casadei, 2009).

A degradação desses materiais podem ocorrer de duas maneiras: por hidrólise, que é mediada pela água, ou por degradação enzimática, que é mediada principalmente por agentes biológicos, como enzimas (Cheung, 2007, Casadei, 2009).

Com relação à geometria, um *scaffold* deve ser tridimensional e altamente poroso com poros interconectados para facilitarem a penetração das células, as trocas gasosas, a vascularização, a entrada de nutrientes e oxigênio e a remoção de excretas, tudo isso através da associação de macroporos e microporos. Além disso o tamanho e a forma dos poros pode interferir na atividade celular (Nair, 2007; Cheung, 2007; Saito, 2010).

Segundo Karageorgiou (2005). O tamanho mínimo necessário para o crescimento de células ósseas é de 100 - 200 μm . Poros menores entre 75 - 100 μm resultam no crescimento de tecido osteóide não mineralizado. Poros menores ainda, entre 10 – 75 μm permitem a penetração apenas de tecido fibroso. (Karageorgiou, 2005).

Whang *et al.* (1998), demonstrou através de experimentos o efeito do tamanho do poro na regeneração de tecidos. Os poros de 5 μm permitiram a neovascularização, entre 5-15 μm o crescimento de fibroblastos, entre 40-100 μm o crescimento da matriz osteóide e entre 100-350 μm regeneração óssea (Whang *et al.*, 1998; Hollister, 2005).

Outra característica relevante é a integridade mecânica do *scaffold*. Como atuam como suporte físico temporário no local da implantação, devem garantir o suporte estrutural durante o manuseamento e as atividades normais do paciente e resistir às tensões internas e externas na região do implante. Assim, as propriedades mecânicas devem ser similares as propriedades do novo tecido que será formado, destacando-se a rigidez, a força e resistência às tensões sofridas *in vivo* até que o novo tecido formado ocupe a matriz do *scaffold* (Buckley, 2004; Dai, 2010).

Todas essas características e propriedades dependem intimamente dos materiais componentes e das condições de processamento desses *scaffolds*. Sendo assim, a escolha do material e do processo de fabricação adequado para melhor atender as necessidades do tecido que se pretende substituir, ainda apresenta-se como um grande desafio para a Engenharia de Tecidos (Casadei, 2009).

Os materiais utilizados na fabricação dos *scaffolds* como já mencionado são Biomateriais de origem metálica, polimérica ou cerâmica, dentre os quais destacamos os *scaffolds* de: constituição polimérica como o poli (L-ácido láctico) (PLLA), a poli(ϵ -caprolactona), a quitosana; os de constituição cerâmica como os a base de fosfatos e biovidros; os de constituição metálica como as ligas de magnésio biodegradáveis, ou ainda uma junção dessas classes. (Abukawa *et al.*, 2006).

No início desta revisão literária, aprendemos que grande parte do volume da fração óssea é composta por material inorgânico, contendo principalmente íons de cálcio e fósforo. Devido a isto um grande número de materiais cerâmicos tem sido empregues para reparação e reconstrução óssea por apresentam excelentes biocompatibilidade devido a sua semelhança esturural e teor químico inorgânico ósseo. Tradicionalmente, as cerâmicas utilizadas na área biomédica são as diferentes formas de fosfatos de calcio, tais como hidroxiapatita e fosfatos tricálcico (Mistry,2005).

Recentemente, vidros bioativos tem sido empregue em materiais para regeneração por serem excelentes osteocondures, que promovem a formação óssea e se degradam ao longo do tempo, liberando íons cálcio e sílcio solúveis, que atuam como ativadores de crescimento ósseo (Hench, 2002).

2.4 *Scaffolds* Cerâmicos

Tradicionalmente as cerâmicas apresentam utilização limitada a poucas aplicações, decorrente da sua fragilidade, da sua baixa resistência mecânica a tração e a flexão e também a sua baixa resistência ao impacto. Contudo, a partir do final dos anos sessenta, foram desenvolvidas novas cerâmicas com propriedades específicas e a sua utilização aumentou consideravelmente (Shackelford, J.F., 1999; Dubok, V.A., 2000)

As Cerâmicas utilizada como Biomateriais foram desenvolvidas para ter um comportamento fisiológico específico ao serem aplicadas em construção de próteses ou órgãos artificiais através do seu emprego isolado ou em associação com outros materiais (Sastre, R., et al., 2004 [Vallet-Regi M., 2001] [Hulbert, S.F., et al.,1987].

As cerâmicas mais conhecidas utilizadas como Biomateriais são: fosfatos de cálcio, alumina, zircônia e titânia. Uma classificação agrupa essa cerâmicas em quatro categorias:

a) De acordo com a resposta do tecido em:

- Bioinertes: Alumina (α - Al_2O_3), Zircônia (ZrO_2) e os carbonos pirolíticos.
- Bioativas: Hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), biovidros e as vitrocerâmicas bioativas.

- Biodegradáveis e reabsorvíveis: Fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$).

b) De acordo com a aplicação a qual se destina em:

- Estrutural: São cerâmicas de elevada resistência mecânica e geralmente bioinertes. Exemplos típicos são a alumina (α - Al_2O_3) e a zircônia (ZrO_2).
- Não estrutural: São geralmente biocerâmicas bioativas ou reabsorvíveis, densas ou porosas, com baixa resistência mecânica, já que não necessitam suportar grandes cargas. Exemplos típicos, são a hidroxiapatita conhecida como HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e o fosfato tricálcico conhecido como TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$).

c) De acordo com as características do material em:

- Biocerâmicas densas e inertes: são materiais com porosidade inexistente. Sua união ao osso é morfológica e se realiza de três formas: por crescimento do tecido nas irregularidades superficiais do implante, por união através de um cimento acrílico ou por acoplamento do implante no defeito mediante pressão. Exemplo típico deste grupo é a alumina tanto monocristalina quanto policristalina.
- Biocerâmicas porosas e inertes: a união com o osso é mecânica e a fixação biológica, já que a produção do crescimento ósseo se dá através dos poros do implante. A alumina policristalina porosa é também um bom exemplo deste grupo.
- Biocerâmicas densas ou porosas bioativas: A união do tecido ósseo é do tipo químico e a fixação é bioativa. Exemplo típico deste grupo é a hidroxiapatita (HA). Ao mesmo grupo pertencem, os biovidros e as vitrocerâmicas bioativas.
- Biocerâmicas densas reabsorvíveis: Este grupo se caracteriza pelo fato do implante ser lentamente substituído pelo osso. A este grupo pertencem o fosfato tricálcico (TCP) e outros fosfatos assim como o sulfato de cálcio ($\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$).

2.4.1 Fosfato de Cálcio

As cerâmicas de fosfato de cálcio despertaram o interesse da Engenharia de Biomateriais por apresentarem ausência de toxicidade local ou sistêmica, ausência de respostas a corpos estranhos e inflamações, além de algumas apresentarem capacidade em ligar-se ao tecido hospedeiro. Tais características positivas podem ser explicadas pela natureza química destes materiais que por serem formados basicamente por cálcio e fosfato, participam ativamente do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica.

Os fosfatos de cálcio costumam ser classificados conforme sua razão molar Ca/P como representa a Tabela 1

Tabela 1 - Classificação e algumas propriedades dos principais compostos de fosfato de cálcio (Hench, 1999)

Composto	Sigla	Fórmula química	Ca/P	Resposta biológica
Metafosfato de Cálcio	CMP	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,5	Forte atividade macrofágica
Pirofosfato de Cálcio	CPP	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1	Forte atividade macrofágica
Fosfato Dicálcico Anidro	DCP	CaHPO_4	1	Fraca atividade macrofágica
Fosfato Dicálcico Dihidratado	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1	Fraca atividade macrofágica
Fosfato Octacálcico Pentahidratado	OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33	Absorvível
Fosfato Tricálcico	TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	Absorvível
Hidroxiapatita	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67	Ativo biologicamente
Fosfato Tetracálcico	TeCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2	Sem relevância clínica

2.4.1.1 Fosfato Tricálcico (β -TCP)

O fosfato tricálcico é um Biomaterial bastante aplicado como componente de cimentos para reparação óssea, preenchimento de defeitos, substituição, regeneração e extensão de contornos do tecido ósseo, bem como em sistemas de liberação controlada de fármacos ou como *scaffolds*. Sua importância, também se deve, ao fato de ser um dos precursores mais bem sucedidos na síntese de Ha, além de ser empregado, em certos casos, em misturas bioativas de estímulo ao crescimento ósseo (Vallet-Regi et al., 2004).

Este material possui três fases polimórficas: uma romboédrica estável até temperaturas próximas a 1180°C denominada de fase beta (β -TCP); uma fase monoclinica, estável na faixa de 1180°C a 1430°C chamada de fase alfa (α -TCP); e uma fase de alta temperatura (acima de 1430°C) denominada de super-alfa ou alfa' (α' -TCP) (Gibson, 1996).

Dentre os polimorfos do fosfato tricálcico, a fase que tem despertado maior interesse para aplicação proposta nesta pesquisa foi a fase de baixa temperatura

por apresentar uma taxa de bioabsorção mais rápida comparado com a hidroxiapatita e o α -TCP nas mesmas condições (Yamada, *et al.*,2007).

A absorção do fosfato tricálcico depende basicamente de três fatores: dissolução físico-química, que depende da solubilidade do material e o pH do ambiente onde o material se encontra; desintegração física, por ataque químico preferencial nos contornos de grão; e fatores biológicos, como a fagocitose, que causa mudanças locais no pH do meio (Gonda, 2009).

Na literatura encontramos um grande número de indicações deste material, para neoformação óssea. Em defeitos de dimensões reduzidas, como os defeitos periodontais, o β -TCP pode ser comparado ao osso autógeno em potencial regenerativo, no que diz respeito ao tempo de neoformação óssea completa e qualidade de osso formado. Além disso, possui melhores resultados na reparação óssea quando utilizado em defeitos tridimensionais (Velasco *et al.*, 2007; Podaropoulos *et al.*,2009) (Zavaglia, 2011).

Conforme Gonda, *et.al.* (2009) e Yamada (2007), a degradação do β -TCP em meio tecidual inicia-se com 8 semanas. Com dois meses já há evidências de neoformação óssea. Com 4 meses e com 6 meses já pode ser observada a presença de β -TCP remanescente cercado por tecido ósseo trabecular, e com 9 meses a quantidade é visivelmente menor. Após 12 meses, a neoformação óssea no local enxertado e reabsorção do β -TCP estão concluídas (Shiratori,2005).

2.4.2 Vitrocerâmicas Bioativas

A utilização de vidros como Biomaterias, teve origem no final da década de 60 a partir do desenvolvimento de materiais à base de vidros silicatos, em um trabalho pioneiro produzido por Larry Hench que resultou na produção do Bioglass® 45S5.

A principal característica dos vidro do sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ é a sua capacidade de promover uma rápida e durável ligação química, através da interface apatítica com o tecido ósseo, o que lhe valeu a designação de vidro bioativo. Com isto, nasceu o conceito de bioatividade e acelerou-se toda a investigação realizada no campo dos materiais para restauração óssea.

Nas investigações para restauração óssea, as vitrocerâmicas têm demonstrando em estudos *in vitro* que as propriedades osteogênicas são devido a

seus produtos de dissolução estimular células osteoprogenitoras no nível genético e em ensaios *in vivo* os óxidos bioativos se ligarem com o osso mais rapidamente do que outros biocerâmicos.

2.4.2.1 Wollastonita

Nas últimas décadas tem sido descobertos vários compostos cristalinos dentro dos sistemas de equilíbrio apresentado acima como por exemplo: o diopsídio ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$) e a pseudowollastonita ($\alpha\text{-CaSiO}_3$), que tiveram sua bioatividade comprovada por diferentes pesquisadores (O'Driscoll, 1993).

A wollastonita é um metasilicato de cálcio (CaSiO_3) que apresenta dois isomorfos; o isomorfo de baixa temperatura, chamado parawollastonita ($\beta\text{-CaSiO}_3$) ou simplesmente wollastonita, com estrutura monoclínica, e o isomorfo de alta temperatura, pseudowollastonita, triclínico. A transformação isomórfica é reversível e ocorre à temperatura de $\sim 1125^\circ\text{C}$. (DE AZA *et al.*, 1999; Yazdani, et al., 2013).

A utilização da fase polimórfica pseudowollastonita está no fato que elas, reagem rapidamente em fluido fisiológico simulado (SBF); os íons de cálcio da sua rede cristalina são trocados por íons H^+ do SBF. Como resultado, forma-se uma camada amorfa de sílica. Devido a essa troca iônica o pH na interface pseudowollastonita/SBF aumenta até 10.5, e ocorre portanto, dissolução parcial da sílica amorfa e precipitação de uma fase semelhante com a apatita na superfície da pseudowollastonita (DE AZA *et al.*, 2000, 2001).

Testes *in vivo* feitos na tibia de ratos demonstraram que os osteoblastos migraram para a superfície da pseudowollastonita e depositaram novo osso diretamente sobre o implante. As cerâmicas de pseudowollastonita sintéticas não foram citotóxicas quando testadas frente a culturas de osteoblastos *in vitro* e os produtos da sua dissolução induziram a formação de núcleos de calcificação (Dufrane *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2004).

Além da escolha das matérias primas, o método de obtenção dos *scaffolds* é de suma importância para garantir a eficácia no implante.

2.5 Métodos para Produção de *Scaffolds*

Dentre as técnicas utilizadas para produção de *scaffolds* podemos citar algumas das que fazem parte do conjunto de técnicas denominadas de prototipagem rápida como por exemplo: as que envolvem técnicas de sinterização seletiva a laser, que utiliza raio laser para fundir materiais pulverulentos, tais como náilon, elastômeros e metais, em um objeto sólido (Ahrens *et al.*, 2007).

Outras técnicas são as que utilizam Impressão por Jato de Tinta (MJT, Multi Jet Modeling; BPM, Ballistic Particle Manufacturing) onde um cabeçote de impressão por jato de tinta "imprime" seletivamente um agente ligante que funde e aglomera o pó nas áreas desejadas. Ao se terminar o processo a peça "verde" é sinterizada, removendo-se o pó que ficou solto. Podem ser usados pós de materiais poliméricos, cerâmicos e metálicos. Existem ainda técnicas por Estereolitografia (SLA, Stereolithography), que constrói modelos tridimensionais a partir de polímeros líquidos sensíveis à luz, que se solidificam quando expostos à radiação ultravioleta (Phan, 1998; Volpato, 2007).

Nem todas as técnicas de prototipagem rápida já encontram-se disponíveis a nível industrial ou ainda, nem todas as técnicas é possível ser utilizada para qualquer material cerâmico. Devido a esses entraves muitas vezes é preferível recorrer à técnicas já consolidadas, como é o caso da Técnica da Réplica.

2.5.1 Método da Réplica

O Método da Réplica é considerado como o primeiro método utilizado para a produção de cerâmicas de estrutura celular porosa. Seu desenvolvimento iniciou-se no início dos anos 1960, quando Schwartzwalder e Somers utilizaram esponjas poliméricas como modelos para se obter estruturas cerâmicas celulares de diversos tamanhos de poros, porosidades e composições químicas (Schwartzwalder *et al.*, 1963).

Este método atualmente é o mais utilizado na produção de cerâmicas porosas na indústria, principalmente para fabricação de filtros cerâmicos para serem usados na filtração de metais fundidos e gases a altas temperaturas. Dentre os fatores que contribuem para difusão da técnica estão o custo relativamente baixo, a simplicidade e flexibilidade do método (Studart *et al.*, 2006).

A produção de cerâmicas porosas pelo método da réplica, envolve uma esponja, de origem natural ou sintética, altamente porosa, inicialmente mergulhada

em uma suspensão cerâmica até completa impregnação das paredes da esponja. As esponjas mais comumente utilizadas são as de origem poliméricas, geralmente poliuretano (Choi *et al.*, 2010).

Após ser realizada a impregnação com a suspensão, é feita a remoção do excesso da suspensão da esponja, usualmente através da passagem por uma calandra, permitindo assim a formação de uma fina camada cerâmica ao longo da estrutura celular da esponja original. Em seguida a esponja impregnada é submetida a um tratamento térmico onde ocorre a queima (decomposição do material orgânico) e posteriormente a sinterização do material cerâmico, resultando em um corpo cerâmico que consiste em uma réplica da estrutura da esponja onde a suspensão cerâmica foi impregnada inicialmente (Choi *et al.*, 2010).

Cerâmicas porosas obtidas por este método podem chegar a uma porosidade aberta total na faixa de 40% a 90%, e são caracterizadas por uma estrutura reticulada de poros altamente interligados com tamanhos a partir de 200µm até escalas bastante superiores, dependendo da esponja utilizada (Montanaro *et al.*, 1998)

Uma das condições para obtenção de uma boa réplica se faz através do controle das condições da suspensão utilizada para impregnação por meio de estudo reológico.

2.6 Reologia

Reologia é definida como sendo o estudo do fluxo e da deformação da matéria submetida a tensões, sob determinadas condições termodinâmicas ao longo de um intervalo de tempo. No caso das suspensões utilizadas no método da réplica, estas devem apresentar propriedades de fluidez e viscosidade controladas, além de um grande teor de sólidos, de modo que, essas propriedades resultem em maior densidade de camada, fluidez adequada para remoção do excesso de suspensão durante a impregnação, recobrimento total dos filamentos da esponja, de modo que não ocorra preenchimento dos poros.

As propriedades reológicas são medidas através de ensaios de reometria, em equipamentos que permitem investigar o comportamento reológico sob condição de fluxo pleno e determinar o comportamento viscoelástico de certo fluido. Os medidores de viscosidade podem ser do tipo: medidores rotacionais: onde o torque

requerido para girar um disco ou um cilindro é a força requerida para mover uma placa em função da viscosidade e são apropriados para fluidos não-newtonianos. Exemplos: viscosímetro de Couette e de Brookfield. Ou medidores do fluxo através de uma restrição ou ainda, medidores da vazão em torno de obstruções, esfera (Tanner *et al.*, 1998; Scharramm, 2006).

De acordo com Ferreira *et al* (2005), Isaac Newton, em 1687, definiu a viscosidade de um fluido como a resistência ao deslizamento de suas moléculas devido ao atrito interno e, quanto maior o grau de atrito interno de um fluido, maior é a sua viscosidade. Em seu livro “Princípios Matemáticos da Filosofia Natural”, Newton, desenvolveu leis para corpos rígidos em seu livro introduzindo um corolário onde descreve o comportamento mecânico de um líquido. Segundo Newton, a resistência derivada da falta de deslizamento das partes de um líquido é proporcional a velocidade a que esses líquidos se separam entre si. Ou seja, ao duplicar a tensão aplicada a um líquido, se duplica o gradiente de velocidade. As substâncias que cumprem este requisito, chamamos de Fluidos Newtonianos (Ferreira, 2005, Moreno, 2005).

Por outro lado, todas as substâncias que não cumprem os requisitos de um fluido newtoniano são chamadas de fluidos não newtonianos, e são definidos como aqueles em que a relação entre a taxa de deformação e a tensão de cisalhamento não é constante (Moreno, 2005).

As curvas de fluxos dos fluidos não-newtonianos são representadas por 3 tipos: plástica, pseudoplástica ou dilatante e o comportamento dessas curvas podem ser: viscoelásticos, dependentes e independentes de tempo (Morrison, 2001; Ortega, 2012). A Figura 5 abaixo representa os modelos de curva de fluxo existentes.

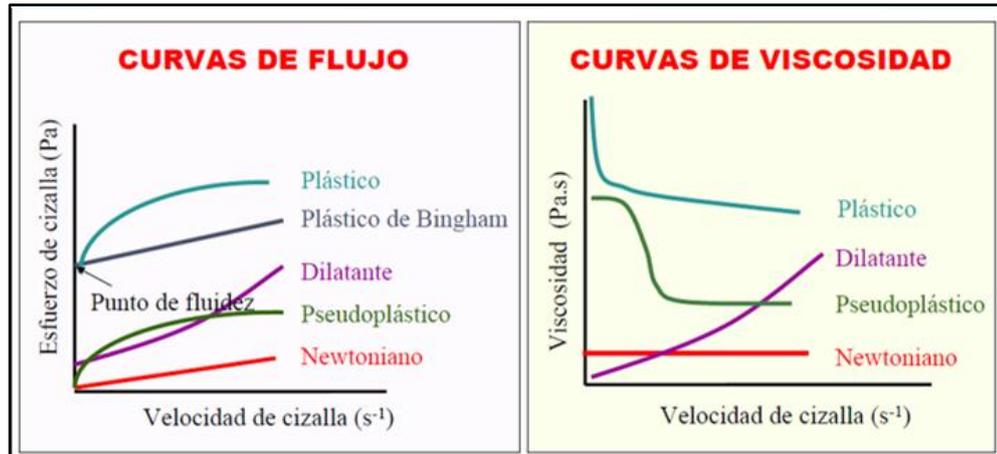


Figura 5 Modelos de comportamento de fluxos reológicos
 Fonte: (Moreno, 2005)

As curvas de comportamento plástico ocorrem quando existe um ponto de fluxo definido ou seja, um valor mínimo a partir do qual se produz o fluxo. Possuem tensão de cisalhamento e podem apresentar uma relação linear, não linear ou estacionário, entre esta tensão e a taxa de deformação, a partir do momento em que se atinge uma tensão de cisalhamento inicial. Esse fluido comporta-se como sólido em condições estáticas ou de repouso, e após aplicação de uma força ele começa a fluir. Esta força aplicada denomina-se tensão de deformação (Gutierrez, *et al.*,2000).

As curvas pseudoplásticas ocorre quando a velocidade tende a diminuir a medida que aumenta a tensão de cisalhamento. Isto é chamado de “cisalhamento fino”. Ao efetuar a leitura em um viscosímetro, rotacionando-o da mais baixa para mais alta velocidade e retornando para a baixa velocidade, se as leituras nas mesmas velocidades coincidirem, o material é considerado pseudoplástico independente de tempo e de cisalhamento fino. Quando em repouso, essas substâncias apresentam suas moléculas em um estado desordenado, e quando submetidas a uma tensão de cisalhamento, suas moléculas tendem a se orientar na direção da força aplicada. E quanto maior essa força, maior será a ordenação e, conseqüentemente, menor será a viscosidade aparente. Esse fluido pode ser descrito pelo modelo de Orswaldo-de-Waele ou modelo Power Law (Gutierrez, *et al.*,2000).

Já as curvas dilatantes: a viscosidade aumenta com o aumento da taxa de cisalhamento. Se o material é medido de baixa para alta velocidade e a viscosidade aumenta com o aumento da velocidade, o material é classificado como dilatante

Este tipo de comportamento é mais raro que a pseudoplasticidade, e observando em fluidos contendo altos níveis de defloculantes (Barnes, 2000).

Os materiais viscoelásticos possuem características de líquidos viscosos com propriedades elásticas (Modelo de Maxwell) e de sólidos com propriedades viscosas (Modelo de Kelvin-Voigt), ou seja, possuem propriedades elásticas e viscosas acopladas. Estas substâncias quando submetidas à tensão de cisalhamento sofrem uma deformação e quando esta cessa, ocorre uma certa recuperação da deformação sofrida (comportamento elástico) (Moreno, 2005).

Os fluidos dependentes do tempo apresentam mudanças na viscosidade em função do tempo sob condições constantes de taxa de cisalhamento e dois fenômenos devem ser considerados: Tixotropia: que compreende os sistemas cuja viscosidade diminui com o tempo para uma taxa de cisalhamento constante e aumenta quando esta taxa de cisalhamento diminui por recuperação estrutural do material (reversível) e Reopexia: que são sistemas cuja viscosidade aumenta com o tempo a uma taxa de cisalhamento constante (Moreno, 2005).

Já os fluidos independentes do tempo, suas propriedades reológicas não dependem do tempo de aplicação da tensão de cisalhamento. Eles podem ser: sem tensão inicial - não necessitam de uma tensão de cisalhamento inicial para começarem a escoar (compreendem a maior parte dos fluidos não-newtonianos); e com tensão inicial - aqueles que necessitam da tensão para escoar (Moreno, 2005).

2.6.1 Reologia das suspensões

Quando se introduz um pó em um líquido, este tende a molhar o pó, se a energia de interação for mais fraca que a energia exercida pela tensão superficial. A partir disto, tem-se origem forças de interação, com as quais, as mais representativas são as forças superficiais (forças de van der Waals, repulsão eletrostática, impedimento estérico ou forças brownianas) e as forças gravitacionais e inertes. A Tabela 2 abaixo as energias típicas associadas as distintas interações em sistemas de partículas de diferentes tamanhos (Horn, 1995).

Tabela 2: Relação entre forças de interações e tamanho de partícula (Horn, 1995).

Forças de interação	Tamanho de partícula (μm)		
	0.1	1	10
Atração de van der	10	10^2	10^3

Waals			
Repulsão eletrostática	$0-10^2$	$0-10^3$	$0-10^4$
Movimento browniano	1	1	1
Energia cinética de sedimentação	10^{-13}	10^{-6}	10
Energia cinética da mistura	1	10^3	10^6

Considerando que as forças de interação de Van der Waals são forças atrativas fortes, a estabilização das partículas em meio a dispersão faz-se necessário através do desenvolvimento de forças repulsivas que permitam que as partículas sejam rodeadas pelo meio líquido e evitem o contato entre elas (Horn, 1995).

Esta estabilidade pode ser alcançada por distintas formas, associados a dois mecanismos: Repulsão Eletrostática (derivada da interação entre a carga das superfícies) e Estabilização Polimérica (proporcionada pela presença de moléculas de elevado peso molecular) (Pugh, 1994).

A repulsão eletrostática pode ser obtida por meio da modificação do pH ou acréscimo de soluções de eletrólitos. Já a estabilização polimérica pode ser alcançada através da presença de moléculas de polímeros livres no meio (estabilização por depleção) ou por meio da adsorção de polímeros sobre a superfície das partículas (mecanismo estérico) ou ainda, por meio de polímeros carregados eletricamente o que resulta em um mecanismo em que se combina a repulsão eletrostática e o impedimento estérico (mecanismo eletroestático) a este último polímero citamos o nome de polieletrólitos (Moreno, 2011).

Ainda neste contexto pode ocorrer também a presença de compostos orgânicos que se adsorvam sobre a superfície das partículas ou ainda moléculas que não se adsorvem mas que relacionam quimicamente com a superfície (Takahashi, 1991).

A Tabela 3 resume os distintos tipos de substâncias que podem ser empregadas para facilitar a dispersão das partículas em um meio líquido. Estes aditivos se conhece como dispersantes ou defloculantes.

Tabela 3: Mecanismo relacionado ao tipo de dispersante utilizado em reologia (Moreno, 2005).

Dispersante	Mecanismo
Íons determinantes de potencial (pH)	Eletroestático

Eletrólitos (sais inorgânicos)	Eletrostático
Cadeias anfífilas	Adsorção + Eletrostático
Polímeros adsorvidos	Estérico
Polímeros carregados adsorvidos (Polieletrólitos)	Estérico + Eletrostático
Polímeros não adsorvidos	Depleção
Agentes de acoplamento	Adsorção + Eletrostático

2.6.1.1 Forças de Repulsão Eletrostática - Dupla camada elétrica

Além dos fenômenos descritos até agora, outra condição a ser levada em consideração ocorre quando um sistema particulado se dispersa em um líquido polar, e este desenvolve uma dupla camada ao redor de cada partícula. A separação de cargas que ocorre na interface se denomina: dupla camada elétrica e consiste em duas regiões de cargas contrárias (Pradip *et al.*, 1994).

As superfícies dos óxidos hidratados são anfóteras e por tanto as expressões relacionadas com o potencial de repulsão podem ser moduladas a partir de reações ácido-base onde os prótons e as hidroxila podem adsorver-se especificamente. Por essa razão os íons H^+ e OH^- se denominam: íons determinantes de potencial (Moreno, 2005).

A carga superficial é negativa a altos valores de pH, logo os prótons são atraídos. Quando a concentração do íon determinante de potencial é alterada, a adsorção relativa dos íons na superfície varia. Neste caso existe uma concentração definida na qual o número de sítios na superfície carregados negativamente que podem ser neutralizados pelos carregados positivamente e portanto, o potencial superficial será zero. A essa concentração definimos como Ponto de Carga Zero (PZC). Como consequência, uma suspensão deve ser preparada a valores de pH suficientemente distante do PZC, com finalidade de assegurar a estabilidade das partículas (Moreno, 2005).

Com o término do processo de impregnação da esponja polimérica nas suspensões, o próximo passo ocorre com a sinterização da peça cerâmica.

2.7 Sinterização Cerâmica

A sinterização é uma das etapas mais importantes no processamento de materiais. É nesta etapa que a massa das partículas já conformada ganha resistência mecânica e adquire quase todas suas propriedades finais.

O estudo da sinterização consiste em relacionar o aspecto estrutural da peça sinterizada ou seja, porosidade residual, fases presentes, tamanho médio de grão, distribuição de grão, homogeneidade estrutural, etc.; às características dos pós usados ou seja, tamanho médio e distribuição de tamanho de partículas; considerando também as condições de sinterização, tais como temperatura, tempo e atmosfera de sinterização.

A densificação sofrida pelo conjunto de partículas, a partir dos mecanismos físico-químicos responsáveis pelo transporte de material causador da densificação deve ser observada no decorrer do tempo, em função dos parâmetros de sinterização (temperatura e tempo) levando-se em consideração as características dos pós usados desde momento inicial em que é apenas uma massa de partículas,

Existem basicamente dois tipos de sinterização, denominados sinterização por fase sólida e sinterização por fase líquida. Embora ambas atuem no sentido de densificar a estrutura, os mecanismos que produzem tal densificação são distintos. Nesta tese foi utilizada apenas os métodos de sinterização por fase sólida: sinterização por fase sólida para sistema monofásico e sinterização por fase sólida para sistemas com mais de um componente.

2.7.1 Sinterização por fase sólida

O modelo de sinterização em fase sólida descreve o processo, acompanhando o crescimento do raio do pescoço entre duas partículas. O objetivo é determinar o mecanismo de transporte de matéria responsável pela sinterização.

As partículas são sinterizadas por meio de movimento atômico, que elimina a alta energia superficial associada ao pó. Quanto menores as partículas, maior a área superficial específica e, portanto, maior é a energia associada ao sistema e mais rápido o processo de sinterização. O mecanismo de sinterização descreve o caminho de movimentação atômico que produz o fluxo de massa.

Esses mecanismos são, normalmente, processos de difusão termicamente ativados sobre a superfície, ao longo da fronteira do grão, ou pela rede cristalina

As mudanças estruturais associadas com o crescimento de pescoços dependem, sobretudo, destes mecanismos de transporte. Como a difusão é termicamente ativada, se faz necessária uma energia mínima para a ocorrência do movimento atômico. O movimento ocorre quando os átomos atingem energia igual

ou superior à energia de ativação, fazendo com que se movam para dentro das vacâncias.

A sinterização forma ligações sólidas entre as partículas quando aquecidas. Estas ligações reduzem a energia de superfície por meio da remoção de superfícies livres, com uma eliminação secundária da área de contorno de grão via crescimento do grão. O processo normalmente é dividido em três estágios representados na Figura 6.

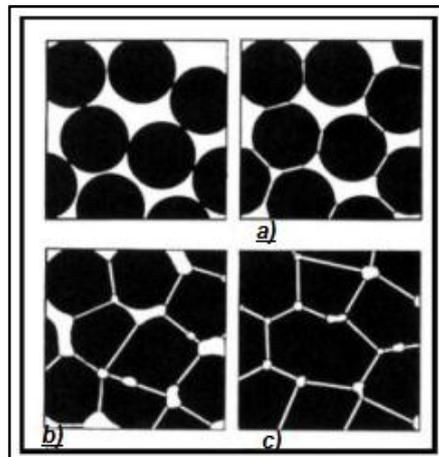


Figura 6 Estágios da sinterização em fase sólida. a) formação dos pescoços; b) densificação; c) eliminação de poros

Fonte :(<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAejskAA/seminario-ciencia-dos-materiais-materiais-ceramicos-materiais-a-base-carbono? Part =3>)

A sinterização por fase sólida ainda se subdivide em dois sistemas descritos abaixo:

- 1) Sinterização por fase sólida para sistema monofásicos - Sistemas monofásicos são aqueles de um só constituinte. Este tipo de sistema sinteriza mais simplesmente, uma vez que reações entre constituintes estão descartadas. Supõe-se, além disso, que não existe qualquer reação entre o sinterizante e a atmosfera, ou que esta reação é desprezível em termos de variação de energia livre
- 2) Sinterização por fase sólida para sistema com mais de um componente – para este sistema deve-se considerar as energias envolvidas na interação entre os componentes. O transporte de material agora tem duas forças motoras: o gradiente de concentração de vacâncias e o gradiente de composição por parte dos componentes.

2.7.2 Técnicas de Sinterização

As técnicas de sinterização pode ser entendidas como os métodos usados na prática para se obter a sinterização de um dado sistema. Podem ser divididas em técnicas tradicionais, que podemos citar: a sinterização em forno resistivo, a sinterização com auxílio de pressão e a sinterização reativa e em técnicas inovadoras nas quais podemos citar a sinterização por micro-ondas, a sinterização por laser e a sinterização por plasma. Para esta tese foi utilizado o método tradicional de sinterização em forno resistivo.

2.7.2.1 Sinterização em forno resistivo

É a mais usada tanto em escala industrial como em escala de laboratório. Trata-se simplesmente de usar um forno resistivo. Em algumas ocasiões, o elemento aquecedor é a própria amostra. A estrutura sinteriza apenas com o auxílio da temperatura. Geralmente, trabalha-se com baixas taxas de aquecimento e resfriamento, devido "à inércia térmica dos fornos". Pode-se ainda manipular a atmosfera de sinterização. Os fornos resistivos são os de mais fácil fabricação e permitem o processamento de uma maior quantidade de amostras cada vez.

2.7.3 Scaffolds Multifuncionais

Uma variável dos *scaffolds*, é o que pesquisadores atualmente denominam como *scaffolds* multifuncionais. Como visto no início desta pesquisa, o processo de regeneração óssea é acompanhada por fatores de crescimento, sinalização molecular e diversas atividades celulares, isso resulta no fato de que investigadores tem tratado esses suportes simultaneamente como estrutura para o processo regenerativo e como veículo para substâncias ativas que auxiliem esse processo (Blackwood *et al.*, 2012).

As principais substâncias ativas incorporadas em *scaffolds* compreendem, anti-inflamatórios, antibióticos, agentes biológicos, fatores de crescimento, inibidores, substâncias envolvidas na homeostasia e no processo regenerativo de tecidos. Nesta pesquisa, o foco da multifuncionalidade nos *scaffolds* está

realacionada à moléculas indutoras osteogênicas e em fármacos utilizados para tratamento de infecções ósseas (Ekenseair *et al.*, 2013).

Para a engenharia de tecido ósseo, os materiais osteoindutores estimulam as células indiferenciadas a se diferenciarem em osteoblastos, que são responsáveis pela formação óssea. São usados como biomateriais osteoindutores o osso autógeno, fatores de crescimento ósseo e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (Dong *et al.*, 2001).

A osteoindução é o processo que sustenta a mitogênese de células-tronco mesenquimais induzindo à formação de células osteoprogenitoras com capacidade de formar novo osso. Diferentemente dos materiais osteocondutores, as substâncias osteoindutoras promovem a formação óssea em locais extra-esqueletais (Dong *et al.*, 2001).

Tratando-se das infecções, a osteomielite é uma inflamação óssea, usualmente causada por infecção bacteriana ou fúngica, que pode permanecer localizada ou difundir-se, comprometendo medula, parte cortical, parte esponjosa e periósteo. Os ossos mais freqüentemente acometidos são os ossos longos dos membros e da coluna vertebral, mas pode ser encontrada em qualquer parte do sistema ósseo (Sanders *et al.*, 2010).

A osteomielite pós-traumática possui morbidade elevada, levando o paciente muitas vezes à lesões permanente incapacitantes, do ponto de vista físico e/ou psicológico e/ou a tratamentos onerosos e prolongados com resultados às vezes pouco animadores. Portanto, o controle e o desenvolvimento de fatores que visem terapia com antibiótico torna-se importante para anular o efeito preditivo de infecção no tratamento de fraturas. (Hake *et al.*, 2015).

Dentre as vantagens de utilizar um *scaffold* associado de forma química ou física com uma substância para tratamento ósseo temos que, a administração sistêmica, produz redução de efeitos adversos e o risco de sobredosagem, além de melhorar a biodisponibilidade do fármaco e distribuir sua concentração efetivamente no local destinado (Hum *et al.*, 2012).

Todas essas vertentes implica que, ao se projetar e desenvolver *scaffolds* multifuncionais diversas variáveis devem ser levadas em consideração dentre elas o tipo de interação entre o *scaffold* e a substância, o mecanismo de degradação do *scaffold*; seleção do processo de fabricação, estabilidade e cinética de liberação da substância (Drury *et al.*, 2003).

O processamento dos *scaffolds* geralmente envolvem métodos que são incompatíveis com a incorporação e estabilidade das substâncias e deve ser evitadas tais como: altas temperaturas, uso de certos solventes orgânicos, aplicação de pressão e radicais livres que podem levar a decomposição (Kretlow *et al.*, 2000).

A partir dos anos 2000 técnicas já conhecidas para fabricação de *scaffolds* foram recebendo de forma controlada a incorporação dessas substâncias como por exemplo: técnica de gel casting preparada por uma solução de Biomaterial com agente porogênico e substância ativa; ou ainda técnica da réplica, onde o *scaffold* é submerso em uma solução contendo alguma substância ativa que irá recobri-lo. Por volta de 2003, técnicas envolvendo prototipagem rápida recebe uma mescla de pós de biomaterial e fármaco e a partir de 2007, técnicas de nanofabricação eletrospinning passaram a utilizar uma suspensão de Biomaterial com fármaco para obter nanofibras impregnadas (Kundu, 2010).

Algumas pesquisas foram publicadas envolvendo *scaffolds* com as substâncias ativas propostas para este trabalho, por exemplo, Duarte *et al.*, (2009), que testou dexametasona em uma matriz porosa de PLA/Amido utilizando da técnica de inversão de fase supercrítica. Wu *et al.*, (2011), utilizou de modelos de bloco de esponja polimérica de poliuretano mais a técnica de imersão em solução de PBS contendo dexametasona, utilizando como matriz boro mais vidro bioativo. Já Cabañas *et al.*, (2009) produziu matrizes porosas de β -TCP/agarose contendo vancomicina utilizando-se da técnica de freeze-drying (Duarte *et al.*; Cabañas *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011).

2.7.3.1 Dexametasona

A Dexametasona, pertence ao grupo dos glicocorticóides sintéticos que são capazes de induzir a diferenciação em células do estroma da medula óssea humana em fenótipo osteoblástico. Assim, esta molécula apresenta um papel fundamental na indução da proliferação de células com fenótipo osteoblástico em vários sistemas (Brugge *et al.*, 2002).

Diversas pesquisas comprovaram a eficácia da dexametasona na diferenciação celular. Fernandes (1995) observou que culturas de células ósseas obtidas de explantes de osso alveolar humano, na presença de dexametasona, apresentam níveis elevados de fosfatase alcalina e formação de áreas mineralizadas

e que na ausência deste composto, as culturas referidas apresentam uma atividade de fosfatase alcalina significativamente mais baixa e ausência de mineralização (Fernandes *et al.*, 1995).

Beloti *et al.*, (2005) e seus colaboradores investigaram o efeito do tratamento contínuo e descontínuo com dexametasona sobre a diferenciação de células de medula óssea humana. Foi efetuada uma cultura de células primária e a partir dessas, foram cultivadas células com e sem dexametasona onde avaliou-se: a proliferação e viabilidade celulares, o conteúdo de proteína total, atividade da fosfatase alcalina e formação de matriz mineralizada. Os resultados da pesquisa concluiu que a dexametasona deve estar presente após a primeira passagem para permitir a diferenciação osteoblástica expressa por proliferação celular reduzida e aumento da atividade de fosfatase alcalina e da formação de matriz mineralizada (Beloti *et al.*, 2005).

Atmani *et al.*, (2003) usaram culturas de células do estroma medular, isoladas dos ossos longos do rato (fêmur), concluíram que estas células do estroma da medula óssea dos ratos cresceram no meio suplementado com dexametasona criando populações de células semelhantes a osteoblastos e adipócitos. Verificou-se também que a dexametasona aumentou a síntese de DNA. Similarmente, o número de células osteoblásticas, caracterizadas pela atividade da fosfatase alcalina, aumenta na presença de dexametasona (Atmani *et al.*, 2003).

2.7.3.2 Vancomicina

A vancomicina é usada para tratar infecções ósseas causadas por *Staphylococcus aureus*, principal bactéria causadora de osteomielite. A osteomielite é um distúrbio inflamatório do osso que pode levar à destruição ou necrose. Pode ocorrer devido a uma fratura óssea, principalmente em fraturas expostas ou por ferimentos profundos que infeccionam e podem chegar a difundir a bactéria até o osso mais próximo (Pace *et al.*, 2006).

A vancomicina é um antibiótico glicopeptídico de estrutura cíclica complexa, produzida por *Streptomyces orientalis* isolada em 1956 e introduzida no mercado em 1958. Este antibiótico é capaz de inibir a síntese da parede celular causando a morte de bactérias do tipo gram-positivas (Carvalho *et al.*, 2007).

Com propósito de se erradicar estes tipos de infecções, concentrações terapêuticas do antibióticos devem ser mantidas no local por um determinado período de tempo. Tradicionalmente, a osteomielite é tratada com antibióticos por via parentéricas por período de 4-6 semanas após cirurgia (Lazzarini et al.,2004).

Estudos têm mostrado que 80% da vancomicina é excretada inalterada na urina dentro de 24h após a sua administração. Isso se deve ao fato de que administração parentérica não é bem sucedida no tratamento de infecções ósseas devido apresentarem insuficiente penetração a nível local da administração sistêmica. Mesmo depois de uma administração intra-articular (IA), o tempo de meia-vida da vancomicina foi de pouco mais de 3h, e o nível terapêutico foi mantido durante 24h em conjunto com soro (Zalavras et al.,2004).

Muitos cirurgiões tratam a osteomielite utilizando-se de dispositivos para deposição de antibióticos, como as pérolas impregnadas implantáveis. A ideia é fornecer antibiótico com níveis locais altos e níveis sistêmicos mínimos e, ao mesmo tempo, ajudar a preencher o espaço morto (Lipsky *et al.*,2010).

As pérolas de polimetilmetacrilato (PMMA) contendo o antibiótico têm sido usado há décadas. As principais limitações de seu uso estão no fato de que apenas alguns antimicrobianos não são capazes de resistir ao calor produzido no processo de formação das pérolas (Lipsky *et al.*,2010).

A concentração local de antibiótico atinge o pico máximo no 1º dia de uso e subsequentemente diminui no decorrer de algumas semanas, sendo que muitos fármacos atingem concentrações insuficientes para a manutenção de uma concentração terapêutica. Essa concentração depende da área de superfície, das características e da permeabilidade do veículo de distribuição, do tipo e concentração do antibiótico usado, e da existência de líquido circundante (Price et al. 1996).

Essas características essenciais para promover a concentração em níveis eficazes dos fármacos, é a causa principal do desenvolvimento de sistemas para liberação de fármacos *in situ*.

CAPÍTULO 3

Estado da Arte

3 ESTADO DA ARTE

Por muitos anos a ênfase no desenvolvimento dos Biomateriais estava centrada no fato de que eles fossem tão inertes quanto possível ao serem expostos ao ambiente fisiológico, isso porque os primeiros materiais utilizados como implantes se comportavam como corpo estranho quando em contato com o organismo vivo e formavam tecido cicatricial não aderente na interface implante-tecido. Esses biomateriais inertes ficaram conhecidos como materiais da primeira geração

No início de 1900, aplicaram-se as primeiras placas ósseas feitas de metal, com a finalidade de remover fissuras ou fraturas. Durante os anos seguintes, as ligas metálicas foram o único tipo de biomaterial utilizado. Suas aplicações se estenderam desde reparações ósseas até sistemas de distribuição de drogas.

Entre 1940 e 1975, aproximadamente cem milhões de cirurgias foram realizadas em seres humanos para colocação de implantes metálicos. Apesar de serem muitas as aplicações dos materiais metálicos, o número de tentativas para introduzi-los no interior do corpo nem sempre são satisfatórios, uma vez que ainda ocorrem falhas devido a sua aplicação, tais como desgaste, corrosão, liberação de espécies iônicas, dentre outras (Azevedo e Hippert Jr., 2002; Martín, 2004).

Em paralelo a isso, a Segunda Guerra Mundial contribuiu para o rápido avanço na ciência de polímeros, voltada principalmente para aplicações médicas, principalmente após a descoberta dos polímeros sintéticos que passaram a terem registros na área de medicina em meados da década de 1940. O Poli (metacrilato de metilo) (PMMA) por exemplo foi um dos primeiros polímeros utilizados como material biomédico aplicado na reparação da córnea humana. O uso dos materiais poliméricos ocorre principalmente devido à disponibilidade de uma variedade de composições, propriedades e formas (sólida, fibra, tecido, filme e gel). Contudo, esses materiais tendem a ser muito flexíveis e fracos, de modo que não suportam demandas mecânicas em certas aplicações como, por exemplo, implantes ortopédicos. Além de, absorverem líquidos e se dilatarem, dependendo de seu uso e sua aplicação.

Com base nas informações anteriores, após a realização de uma conferência para discutir o problema de rejeição dos implantes metálicos e poliméricos, dois membros da faculdade ortopédica da Universidade da Flórida, Ted Greenlee e Bill Allen, participaram de um projeto de investigação no ano de 1968 baseados na hipótese de que: “O corpo humano rejeita materiais metálicos e polímeros sintéticos porque os tecidos vivos não são compostos de tais materiais. O osso contém um componente de fosfato de cálcio hidratado, a hidroxiapatita (HA) e portanto, se um material for capaz de formar uma camada de HA *in vivo* este possa não ser rejeitado pelo organismo” (Hench, 2006).

A utilização de cerâmicas como biomateriais remonta a 1894, quando Dreesman relatou o uso de gesso como um possível substituto para ossos. Porém, suas propriedades pouco atrativas praticamente excluíram a utilização do gesso como biocerâmica implantável. A década de 1970 marcou o início do uso mais intenso de materiais cerâmicos com propriedades que possibilitam a sua classificação como biocerâmica.

O conceito de material inerte foi então modificado, quando um vidro de soda cal com silicato e fosfato, foi implantado, pelo Dr. Ted Greenlee e demais colegas da Universidade da Flórida, em fêmur de ratos, com o intuito de que este, fosse capaz de formar vínculo com os tecidos vivos. A composição deste vidro foi determinada por Hench a partir da utilização do diagrama de fases ternário $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$ (Figura 7).

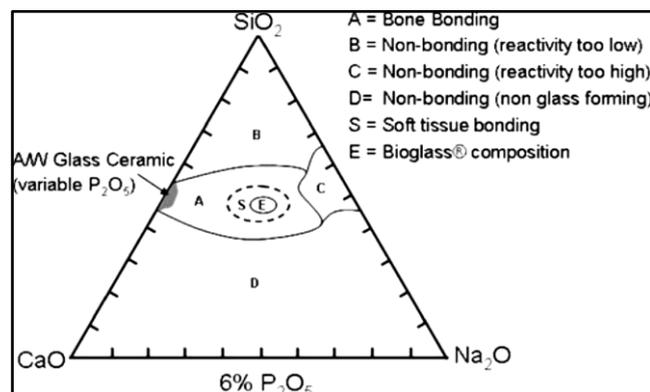


Figura 7 - Diagrama Ternário dos elementos de interação com o tecido ósseo
Fonte: (Adaptado de Siqueira e Zanotto, 2011).

O vidro de Hench resultou em uma composição próxima ao ponto eutético em 45% SiO_2 , 24,5% NaO usado como modificador de rede e 24,5% CaO . Além de 6%

de P_2O_5 para simular a razão Ca/P da Hidroxiapatita, constituinte da fase mineral inorgânica do osso e recebeu o nome de 45S5 referindo-se a 45% de Si e uma razão 5 de Ca/P e em seguida foi patenteado com o nome de Bioglass (Hench, 2006).

O diagrama define a região em que ocorre ligação com o osso, onde estão inseridos as vitrocerâmicas; a região onde ocorre ligação com os tecidos moles, e o Bioglass. Também apresenta as regiões em que não ocorre essa ligação seja devido a alta ou baixa reatividade, ou por não formação da fase vítrea (Hench, 2006).

Em 1971, Beckman; Greenlee e Crebo relataram esta pesquisa no artigo denominado *Bone Formation at a Ceramic Implant Interface*. Os autores buscaram demonstrar por meio de microscopias a relação entre o osso mineralizado e a cerâmica (Beckham et al, 1971).

Após seis semanas de implantação, os ratos utilizados na pesquisa foram sacrificados e as porções de fêmur contendo as amostras de cerâmicas foram avaliadas. Dentre as conclusões os autores descreveram ser difícil encontrar uma técnica morfológica reprodutível para avaliar a interface osso-implante, sendo a microscopia eletrônica de transmissão a técnica mais favorável e comentam o uso de tetraciclina como sistema útil de rastreamento em implantes (Beckham et al, 1971).

O grande interesse da pesquisa está nas conclusões finais do artigo onde os autores discutem que, mesmo tratando-se de um estudo preliminar, materiais implantados com estrutura cristalina semelhante ao osso, podem chegar a proporcionar uma ligação química factível; a composição da cerâmica pode aumentar o processo de ossificação e que se até o presente momento a maioria dos implantes ósseos testados foram escolhidos por causa das características mecânicas e respostas inertes ao organismo, o implante descrito no artigo foi concebido para estimular uma resposta no corpo (Beckham et al, 1971).

Por fim, a resposta esperada ocorreu por meio da deposição óssea em contato íntimo com o implante, aparentemente, proporcionando fixação do implante ao osso. E finalizam afirmando que este tipo de implante pode fornecer uma nova abordagem para os materiais a serem colocados no corpo (Beckham et al, 1971).

Neste mesmo ano, Hench et al. (1971) publica seu primeiro artigo do gênero denominado *Bonding Mechanisms at the Interface of Ceramic Prosthetic Materials* com o intuito de avaliar quais as possíveis fontes de ligação na interface osso-

material e a força relativa de cada, e que variáveis dos materiais devem ser controladas para provocar uma ligação forte e viável (Hench et al, 1971).

O autor descreve três principais formas de ligações que podem ocorrer na interface implante-tecido: ligações do tipo mecânica, física e/ou química. Sendo as ligações mecânicas a base de interesse em próteses porosas e em métodos tradicionais de fixação de pinos.

Hench et al. (1971) apresenta uma tabela (Tabela 4) na qual descreve o que deve ser avaliado em cada requisito para se obter um Biomaterial com a finalidade acima requerida:

Tabela 4 - Requisitos para obtenção de Biomaterial. (Hench et al. 1971)

Composição Química	Cristalografia	Na Microestrutura
Materiais com variada taxa de dissolução iônica a diferentes pH	Materiais capazes de fornecer um substrato para as proteínas e para obtenção de finas camadas minerais sobre o substrato cristalino.	Materiais que apresentem uma percentagem em relação ao tamanho e distribuição da porosidade, sendo considerado também sua área interfacial; e os tipos de interações presentes.

O autor define que a classe de materiais cerâmicos conhecida como vitrocerâmicas oferecem o melhor potencial para satisfazer cada um dos requisitos do modelo acima e ainda possuem propriedades físicas adequadas para aplicações de Engenharia de Biomateriais.

Ainda sobre o artigo, Hench descreve de forma detalhada a composição do vidro bioativo e revela com ajuda de microscopia eletrônica de transmissão (TEM), evidências da ligação vítrea com o tecido ósseo, por meio do crescimento de uma camada óssea mineral interdigitada com fibrilas de colágenos geradas por osteoblastos.

Em 1985, Nakamura *et al.*, publicou um artigo denominado: *A new glass-ceramic for bone replacement: Evaluation of its bonding to bone tissue*, que anos depois seria o marco inicial para o desenvolvimento das composições propostas nesta tese.

Em seu artigo, Nakamura produziu uma vitro-cerâmica contendo oxipatita, fluoroapatita e cristais de wollastonita produzida a partir de 4.6 MgO; 44.9 CaO; 34.2 SiO₂; 16.3 P₂O₅ e 0.5 CaF₂ (em peso) com MgO, CaCO₃.2H₂O, CaHPO₄.2H₂O, e CaF₂.

Todo o processamento para obtenção da nova vitro-cerâmica: reação dos elementos químicos, moagem do pó, calcinação, preparação de corpos de provas em formato de disco, foram detalhados no artigo. Sendo o principal foco a biocompatibilidade da nova vitro-cerâmica que foi então avaliada *in vivo* em tibia de coelhos após períodos de implantação de 2, 4, 8 e 25 semanas, em três regiões distintas: região entre as arestas do córtex e a cerâmica; região entre a medula óssea e a cerâmica; e região entre a membrana endosperiosteal e a cerâmica.

Por meio de microscopia eletrônica de varredura Nakamura observou que após duas semanas do procedimento cirúrgico no qual foi implantado os discos cerâmicos, a osteogênese teve seu início. A região entre a aresta do córtex e a cerâmica foi recoberta com tecido fibroso sem presença de reação inflamatória. A região entre a membrana endosperiosteal apresentou tecido ósseo imaturo ao longo da cerâmica.

Após a 4^a semana a formação óssea aumentou. Em alguns casos, a região entre as arestas do córtex e a cerâmica foi preenchida com tecido ósseo. Na região entre a membrana endosperiosteal e a cerâmica o tecido ósseo tornou-se mais maduro. Também foi observado pela micrografia, formação de osso denso.

Com 8 semanas, as regiões entre as arestas do córtex e a cerâmica preenchidas por tecido ósseo foram substituídas por tecido ósseo lamelar. E formação de osso lamelar na superfície da cerâmica em contato com osso remodelado.

Após 25 semanas novos tecidos ósseos foram remodelados em osso lamelar na região de córtex e na superfície da cerâmica e a região da medula óssea foi coberta com osso recém formado.

As propriedades mecânicas das novas vitro-cerâmicas também foram avaliadas e comparadas com material de hidroxiapatita densa e mostrou-se superior em resistência a flexão compressão e modulo yong.

Como conclusão, Nakamura comenta que a vitro-cerâmica proposta permitiu formação de novo tecido ósseo diretamente sobre a superfície do implante. O tempo de formação de novo tecido ósseo variou entre as amostras mas que em um período de 8 semanas todas as lacunas foram preenchidas com novo osso. E que as propriedades mecânicas da nova vitro-cerâmica foram superiores as das outras vitro-cerâmicas descritas em literatura.

A partir destes trabalhos várias pesquisas utilizando materiais bioativos têm sido reportados em literatura até os dias atuais. Em relação à proposta desta tese, em 2009, De Aza publicou um artigo intitulado *Devitrification studies of wollastonite-tricalcium phosphate eutectic glass* e *Bioeutectic: a new ceramic material for human bone replacement* (Aza et al., 2009).

Ainda em 2009 Duarte et al., testou o efeito osteoindutor da Dexametasona em matrizes porosas de quitosana e Cabañas estudou o efeito da inclusão de Vancomicina como antibiótico em matrizes porosas de HA/PLC e em BTCP/agarose (Duarte et al.; Cabañas 2009).

Em 2012, Son et al., que induziu o efeito osteogênico através da introdução de dexametasona em nanopartículas de HA/TCP

Em 2013, Paula, avaliou o efeito da adição de *whiskers* de silicato de cálcio (wollastonita) nas propriedades físicas e mecânicas de *scaffolds* de β -TCP produzidos pelo método de *gelcasting* e Padmanabhan escreveu um artigo intitulado: *Wollastonite/hydroxyapatite scaffolds with improved mechanical, bioactive and biodegradable properties for bone tissue engineering*. Sulaiman desenvolveu *scaffolds* de Fosfato tricálcico / Hidroxiapatite (HA - TCP) como candidato potencial para a formação ossea em engenharia de tecidos (Paula e Padmanabhan et al., 2013)

Em 2014, Santos desenvolveu *scaffolds* baseados em uma nova formulação de cimentos de fosfato de cálcio – TCP reforçado com *whiskers* de silicato de cálcio e gelatina (Santos 2014).

Recentemente, Shao (2016), publicou um trabalho intitulado: *3D printing magnesium-doped wollastonite/ β -TCP bioceramics scaffolds with high strength and adjustable degradation* (Shao et al., 2016).

CAPÍTULO 4

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo encontra-se definido as matérias primas utilizadas na produção dos *scaffolds* multifuncionais, bem como as substâncias utilizadas no processo e a metodologia descritiva das etapas do desenvolvimento.

4.1 Materiais

Para a produção dos *scaffolds* foi utilizado como matérias primas Wollastonita de origem natural e β -Fosfato Tricálcico sintetizado a partir de Hidroxiapatita e Ácido Orto-Fosfórico. Na formulação das suspensões cerâmicas, utilizou-se Dolapix PCN como dispersante e Optapix PAF 35 como agente ligante. Para conformação dos *scaffolds*, utilizou-se a técnica da réplica da esponja polimérica, tendo como molde esponjas de poliuretanos de células abertas. As substâncias utilizadas como princípios ativos adicionadas aos *scaffolds* foram: Dexametasona e Vancomicina. Na Tabela 5 encontra-se de maneira detalhada a descrição destes materiais.

Tabela 5 - Material, empresa comerciante e especificação técnica dos produtos utilizados na produção dos *scaffolds* (Própria,2017).

Material	Empresa comerciante	Especificação
Wollastonita	Nyco minerals, USA	NYAD M400 – lote: M140415C01
Hidroxiapatita	LabSynth	Fosfato de Cálcio Tribásico P.A lote: 163276
Ácido Orto-fosfórico	Panreac	85% P.A lote: 204282
Dolapix PCN	Zschimmer & Schwarz GmbH	Poliacrilato de Amônio
Optapix PAF 35	Zschimmer & Schwarz GmbH	Álcool polivinílico
Espuma de Poliuretano	Procider	Célula aberta, 60 ppi
Vancomicina	Pfizer	Pó concentrado para solução de perfusão EFG 500mg Lote: K380012-A
Dexametasona	Sigma-Aldrich	Bioreagente adequado para culturas de células D4902-100mg Lote:#BCBP98CE
Caprolactona	Sigma-Aldrich	704067-500g
Pluronic	Sigma-Aldrich	F127 P2443-250g

Fibroblastos	Banco de células do Rio de Janeiro	L9N2
--------------	------------------------------------	------

4.2 Métodos

4.2.1 Local da Pesquisa

Esta pesquisa foi desenvolvida no laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais no Nordeste - CERTBIO, localizado na Universidade Federal de Campina Grande - UFCG - Campina Grande - PB - Brasil e no *Instituto de Cerámica y Vidrio - ICV*, pertencente ao *Consejo Superior de Investigaciones Científica – CSIC*, localizado no *Campus de la Universidad Autónoma de Madrid* em Cantoblanco - Madrid - ES- Espanha.

4.2.2 Delineamento Experimental

O delineamento experimental do estudo se deu conforme as principais etapas mostradas no fluxograma da Figura 8.

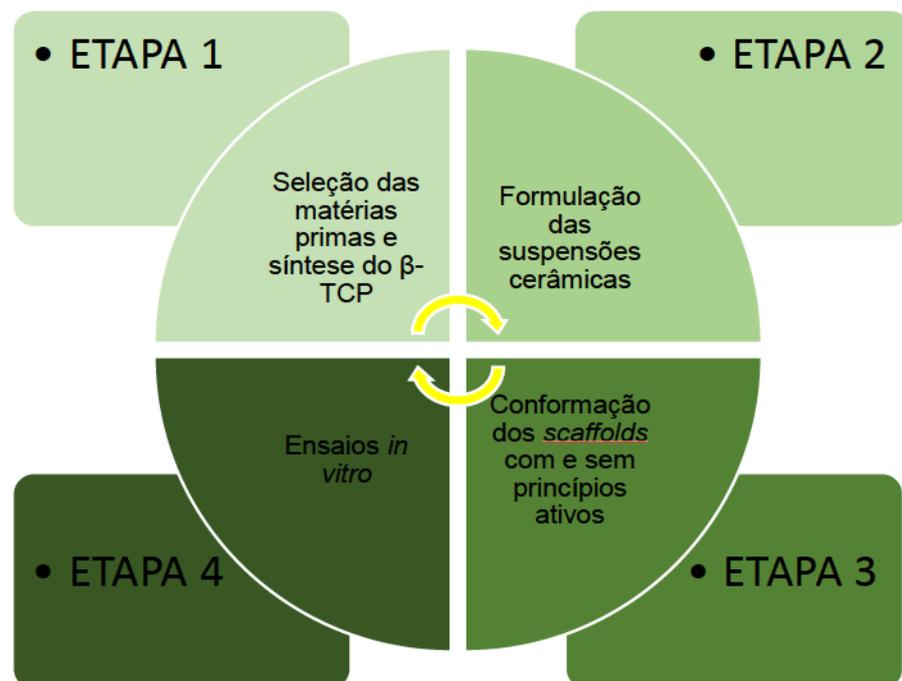


Figura 8 Fluxograma com as etapas de produção dos *scaffolds* (Própria,2017).

4.2.3 ETAPA 1

4.2.3.1 Aquisição das Matérias Primas

A Wollastonita utilizada nesta pesquisa foi obtida por meio de doação da empresa Nyco minerals, USA.

O β -Fosfato Tricálcico (β -TCP) foi obtido por meio de síntese de Hidroxiapatita (HA) comercial.

4.2.3.2 Determinação do Teor de Cinzas

Avaliou-se a combustão total de matéria orgânica das amostras de Wollastonita e de Hidroxiapatita via método por calcinação onde as amostras em cadinhos foram submetidas à mufla em temperatura de 1000°C por 1h e obteve-se os valores de perda de matéria na Wollastonita de 1,10% e na Hidroxiapatita de 5,58%.

O valor calculado para Wollastonita apresentou-se acima do valor descrito em laudo pela empresa comerciante que é de 0,47%. Esse valor superior possivelmente é decorrente do fenômeno de carbonatação. Já na amostra de Hidroxiapatita, o valor calculado condiz com o da empresa que é de 5,52%. Essas perdas de matéria foram calculadas para ajustes das massas antes da sinterização.

4.2.3.3 Síntese de β -Fosfato Tricálcico (β -TCP)

O β -Fosfato Tricálcico (β -TCP) foi sintetizado a partir de Hidroxiapatita (HA) e Ácido Orto-fosfórico pelo método de via úmida e sinterizado a 1100°C conforme observado no diagrama de fases da Figura 9 abaixo.

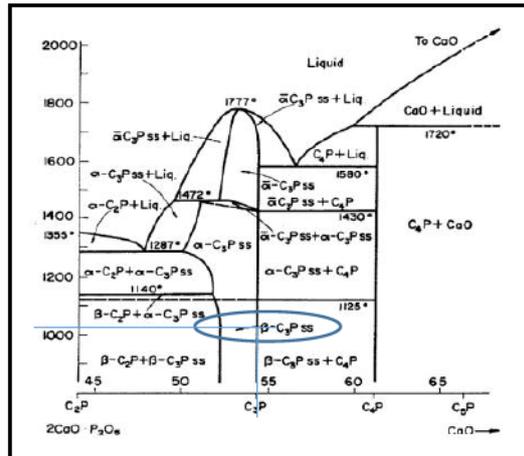


Figura 9: Diagrama de fases sistema $2\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$ e CaO
 Fonte: (Escobar, 2010).

Os processos por via úmida envolvem a preparação de uma solução homogênea de sais contendo um dos íons de interesse e a sua mistura com um agente precipitante, geralmente uma solução contendo o outro íon de interesse, de modo a exceder o produto de solubilidade de alguma das espécies químicas. Comumente utilizam-se cloretos, nitratos ou carbonatos, como sais de cálcio e sais de fosfatos ou ácido fosfórico. Este precipitado pode ser o pó cerâmico desejado ou um intermediário que, após receber tratamento térmico, será convertido ao produto esperado.

A reação entre a Hidroxiapatita e o Ácido Orto-fosfórico apresenta maior potencial para produção de Fosfato Tricálcio uma vez que existe apenas água como subproduto da reação.

O Ácido Orto-fosfórico é o responsável por fornecer íons PO_4^- que durante a reação modificam a razão Ca/P de 1,67 da HA para 1,5 do TCP (Gibson *et al.*, 2000; Gouveia *et al.*, 2004).

A equação química que ocorre entre a Hidroxiapatita e o Ácido Orto-fosfórico é do tipo neutralização como descrito na Equação.



As massas dos reagentes foram determinadas por meio de cálculos estequiométricos. Com relação a quantidade em massa utilizada de HA, utilizou-se a massa calculada por estequiometria, levando em consideração a porcentagem de

óxido de magnésio (Mg^{2+}) encontrada na HA e levando também em consideração a perda de massa avaliada pelo teor de cinzas.

Definida a massa de HA, esta foi solubilizada em solução aquosa de Ácido Orto-fosfórico, $[HA + (H_3PO_4 + H_2O)]$ com auxílio de agitador mecânico. A mistura foi vertida em um recipiente e seca em estufa com circulação de ar a $60^\circ C/24h$ para evaporação total da água. A mistura já seca foi triturada com auxílio de almofariz e pistilo. O pó obtido após este processo, recebeu tratamento térmico com temperatura de sinterização a $1100^\circ C$ (temperatura abaixo da temperatura de formação da fase α) por um período de 15h, tempo suficiente para garantir a obtenção de um β -TCP com maior cristalinidade, tendo em vista que, o tempo de envelhecimento e a cinética de reação são variáveis críticas para a pureza e para as características cristalográficas do material obtido. Após o período de sinterização o pó tratado foi submetido a caracterização via difração de raios X. O espectro de difração obtido nesta etapa encontra-se no Capítulo Resultados. Na Figura 10 podemos ver imagens correspondentes as etapas deste processo

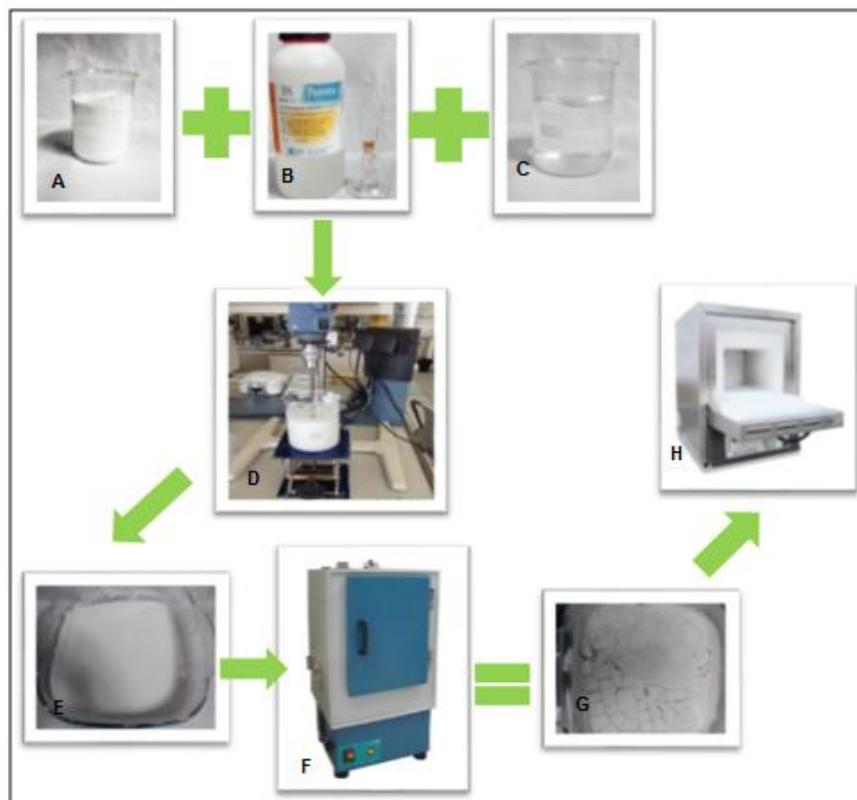


Figura 10 Etapas de produção do β -TCP A=pó de HA, B=ácido ortofosfórico, C=água destilada, D= agitador mecânico usado para mistura, E=pasta formada por HA e ácido ortofosfórico, F= estufa com circulação de ar, G=pó de TCP amorfo, H=forno usado para sinterização do β -TCP (Própria,2017).

4.2.4 ETAPA 2

4.2.4.1 Moagem das Matérias Primas

A próxima etapa foi a preparação de suspensões cerâmicas contendo os pós de Wollastonita e β -TCP, para isso, os pós foram submetidos de forma individual a um processo de moagem cuja finalidade foi a uniformização das partículas

Utilizando-se de moinho de atrito, os pós foram incorporados à álcool isopropílico e esferas de óxido de zircônio de 1 e 2 mm. O preparo do corpo de moagem obedeceu a ordem de: $\frac{1}{4}$ do volume do moinho ocupado pela massa, $\frac{1}{4}$ por álcool isopropílico, $\frac{1}{4}$ por esferas e $\frac{1}{4}$ permanecendo vazio, Figura 11.

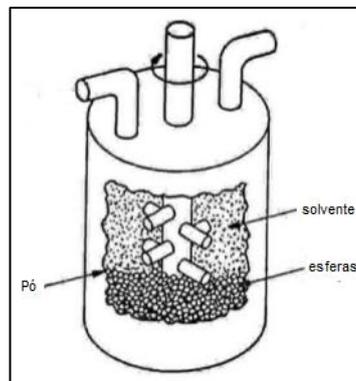


Figura 11 Representação de um moinho de atrito
Fonte: (Própria 2017).

O processo teve duração de 4h e após transcorrido este tempo, as esferas foram retiradas e o restante do conteúdo seco em estufa com circulação de ar por 24h. Com o material já seco, houve um processo de trituração com auxílio de almofariz e pistilo e os pós com agora nova granulometria seguiram para caracterização. O álcool isopropílico foi empregado como veículo da moagem com finalidade de evitar a formação de aglomerados do tipo eletrostático entre as partículas.

Após moagem, as partículas foram submetidas a um processo de medição da carga da superfície através da avaliação do potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento (PZ). Essa carga foi avaliada em relação a influência da variação do potencial hidrogeniônico (pH) e da concentração de substância

dispersante na estabilidade das partículas. Nesta etapa definiu-se o pH em que as suspensões foram formuladas e a quantidade de dispersante utilizada.

A metodologia utilizada encontra-se descrita abaixo e faz parte de uma metodologia empregada pelo *Instituto de Cerámica y Vidrio*.

Protocolo desenvolvido pelo *Instituto de Cerámica y Vidrio* para avaliação da carga superficial das partículas.

Curva PZ versus pH

1. Preparar “solução mãe” - 1g do pó de estudo em 100mL de solução de KCl 10^{-2} M.
2. Levar a “solução mãe” ao ultrassom por 1 minuto e depois mantê-la sob agitação constante.
3. Preparar alíquotas contendo 10 mL de “solução mãe” + 90ml de solução KCl 10^{-2} M.
4. Medir o pH desta alíquota e ler em equipamento Zetasizer
5. Variar o pH da alíquota utilizando-se de KOH e HCl a 2M.
6. Realizar a leitura de cada variação em equipamento Zetasizer.

Curva PZ versus dispersante

1. Preparar “solução mãe” - 1g do pó de estudo em 100mL de solução de KCl 10^{-2} M.
2. Levar a “solução mãe” ao ultrassom por 1 minuto e depois mantê-la em agitação constante.
3. Preparar alíquotas de modo que o volume total seja de 100mL seguindo a sequência: 10 mL de solução mãe + x mL de solução KCl + x mL de dispersante.
4. Exemplo: 10 mL de solução madre + 89 mL de solução KCl + 1mL de dispersante (0,1%dispersante)
10 L de solução mãe + 88 mL de solução KCl + 2mL de dispersante
5. Realizar a leitura de cada alíquota em equipamento Zetasizer.

4.2.5 Formulação das Suspensões Cerâmicas.

4.2.5.1 Metodologia das Suspensões Cerâmicas

A próxima etapa foi a preparação das suspensões cerâmicas em meio aquoso utilizando-se Wollastonita e β -TCP em três composições distintas. A metodologia de preparo inicia-se com a adição da quantidade de dispersante definida na etapa anterior, em um Becker sob agitador mecânico e adição de água deionizada, nesta etapa, quando necessário se ajusta o pH. Acrescenta-se a quantidade de β -TCP e após total solubilização acrescenta-se a quantidade de Wollastonita. Ao final, a suspensão recebe tratamento de sonicação para melhor dispersão das partículas e certa quantidade de ligante cuja finalidade é diminuir a tensão superficial para melhorar impregnação da suspensão nas esponjas.

4.2.5.2 Determinação do Volume de Sólidos.

O conteúdo de sólidos utilizado nas suspensões cerâmicas foi definido, de modo a conter a máxima quantidade de sólidos e mantendo a viscosidade suficiente para impregnação na esponja. Foram preparadas suspensões com concentrações em volume de sólidos variando em 25%, 30%, 33% e 36% e avaliadas por meio da curva da viscosidade aparente em razão da fração volumétrica de sólidos. O perfil da curva para essas concentrações em volume encontra-se no Capítulo Resultados.

4.2.5.3 Determinação da Porcentagem de cada Material nas Suspensões Cerâmicas.

A porcentagem de Wollastonita e de β -TCP presente em cada suspensão é fundamentada em trabalhos anteriores e descritos em literatura, no qual utiliza-se do ponto eutético do sistema binário Wollastonita- β -TCP, correspondente a mescla de 60% de Wollastonita + 40% β -TCP. Além dessa, outras duas composições foram formuladas levando-se ao extremo a porcentagem em massa das matérias primas, ou seja, 20% de Wollastonita + 40% β -TCP e 80% de Wollastonita + 20% β -TCP. A quantidade em massa de Wollastonita e de β -TCP nas suspensões formuladas foi de:

Para a suspensão de 20% de Wollastonita + 80% β -TCP utilizou-se: 10ml de água destilada + 0,078 g dispersante + 5,2 g W + 20,8 g β -TCP.

Para a suspensão de 60% de Wollastonita + 40% β -TCP utilizou-se 10ml de água destilada + 0,078 g dispersante + 15,6 g W + 10,4g β -TCP.

Para a suspensão de 80% de Wollastonita + 20% β -TCP utilizou-se 10ml de água destilada + 0,078 g dispersante + 20,8 g W + 5,2 g β -TCP.

4.2.5.4 Sonicação.

Para melhorar a dispersão entre as partículas na suspensão e favorecer a estabilidade do sistema, a influência da energia vibracional em tempo de sonicação por minuto, foi avaliada utilizando-se ultrassom com amplitude de 80% e 1Hz (UP400S, Dr. Hielsher GmbH, Alemanha). O tempo ideal de sonicação para cada

suspensão foi determinado avaliando-se a curva de viscosidade das suspensões e encontra-se descrito no Capítulo Resultados.

4.2.5.5 Adição de Agente Ligante às Suspensões.

Após o processo de sonicação, adicionou-se uma substância com caráter ligante nas suspensão com finalidade de auxiliar a resistência à verde da cerâmica e diminuir a tensão superficial. A concentração utilizada de ligante em cada composição foi determinada por meio da curva de viscosidade e encontra-se descrita no Capítulo Resultados.

4.2.6 ETAPA 3

4.2.6.1 Método do Réplica da Esponja Polimérica

Para formação dos *scaffolds*, esponjas poliméricas de poliuretano foram cortadas em tamanho de 8mm de diâmetro por 2mm de espessura correspondente à área do defeito ósseo na calota craniana de coelhos (Figura 12).



Figura 12 - Esponja de poliuretano utilizada na confecção dos *scaffolds*.
Fonte: (Própria, 2017)

Cada esponja foi impregnada em uma das suspensão cerâmicas, o excesso foi removido com auxílio de jato de ar, e as amostras secas em estufa a 60°C/24h. Após secos em estufa, os corpos de prova foram sinterizados até 1275°C (Figura 13). Foram preparados uma quantidade de 5 corpos de prova para cada caracterização.

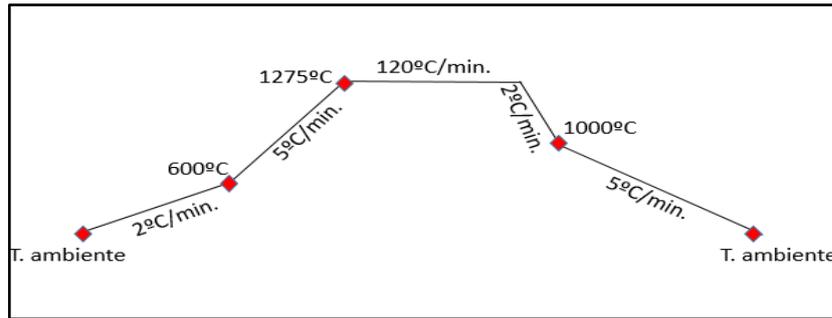


Figura 13 Ciclo térmico utilizado na sinterização dos *scaffolds*
 Fonte: (Própria, 2017)

O ciclo térmico de sinterização dos *scaffolds* inicia-se com temperatura a 600°C utilizada para queima do poliuretano, a uma taxa de aquecimento lenta, de forma que o molde é eliminado permitindo ao mesmo tempo a estruturação do corpo cerâmico. Em seguida a uma taxa de aquecimento mais rápida, atinge-se a temperatura de 1275°C para que ocorra o processo de sinterização e modificação de fase da Wollastonita, que passa da fase de baixa temperatura para a fase de alta temperatura. Neste patamar permanece por 2h como forma de assegurar que o tempo de exposição seja eficiente para a sinterização e para mudança de fase pretendida.

A próxima etapa é um resfriamento lento partindo da temperatura anterior, de 1275°C até 1000°C. Essas condições são estabelecidas para que se retorne a fase de maior estabilidade do fosfato tricálcico que é a fase beta. Abaixo desta temperatura o resfriamento segue a um taxa de 5°C/min até temperatura ambiente. A Figura 14 representa os *scaffolds* sinterizados e prontos para caracterização.



Figura 14 – *scaffolds*
 Fonte: (Própria, 2017)

4.2.6.2 Adição dos Princípios Ativos aos Scaffolds.

Os *scaffolds* foram impregnados com solução poliméricas contendo princípios ativos.

Para a primeira camada a impregnação foi de Vancomicina através da preparação de uma solução de Caprolactona em Diclorometano a 20% em temperatura de 30°C para facilitar a dissolução. Simultaneamente preparou-se uma solução aquosa de Vancomicina 1%. Ambas as soluções foram vertidas uma na outra em agitação constante. A proporção utilizada foi de 15 ml da solução de Caprolactona e 7,5ml da solução de Vancomicina, o que conduz a uma concentração de 2.5% de Vancomicina em respeito a Caprolactona. Os *scaffolds* foram imersos na mistura e submetidos ligeiramente em vazio, para evitar formação de bolhas e garantir que a solução chega-se a recobrir todas as paredes do biomaterial.

Após secos, os *scaffolds* receberam uma segunda camada de impregnação desta vez contendo o princípio ativo Dexametasona onde foram submersos em solução aquosa contendo 20% de Pluronic e 0.8 % de Dexametasona, previamente solubilizada em Etanol. A proporção utilizada foi a mesma do processo anterior. Esse processo foi repetido por duas vezes (2x) com intuito de prover maior quantidade de fármaco sem que comprometesse a abertura dos poros. Os *scaffolds* foram mantidos em dessecador para secagem livre de umidade.

A quantidade de dexametasona e de vancomicina nos *scaffolds* foi de 3mg para cada substância.

4.2.7 ETAPA 4

4.2.7.1 Avaliação da Cinética de Liberação dos Princípios Ativos

Para estudo da cinética de liberação dos princípios ativos, foram preparados *scaffolds* contendo apenas Dexametasona e *scaffolds* contendo apenas Vancomicina. Esses *scaffolds* foram mantidos em solução de Simulated Body Fluid (SBF) e após transcorrido o tempo de 2, 4 e 8h para Dexametasona e 2, 4, 8, 24 e

36h para Vancomicina. O líquido na qual os scaffolds se encontravam, foi submetido a análise em equipamento Ultravioleta.

4.2.7.2 Avaliação da Biodegradação dos Scaffolds

A biodegradação química dos *scaffolds*, foi avaliada por meio de solução *Tris* (Hidroximetil) Aminometano em Ácido Clorídrico 1M em períodos de 1 dia, 1 semana, 2 semanas, 4 e 8 semanas com o qual em cada um desses períodos uma amostra foi mantida imersa e armazenada em estufa bacteriológica a 36°C sob agitação constante para cada uma das três composições (20%W+80%β-TCP; 60%W+40%β-TCP e 80%W+20%β-TCP).

Ao final de cada período, as amostras foram filtradas e o resíduo líquido avaliado mediante ICP-OES. O volume de *Tris* em cada recipiente no qual as amostras estavam submersas, foi determinado considerando a área superficial relativa a cada amostra.

4.2.7.3 Avaliação da Bioatividade

A bioatividade foi medida em corpos densos medindo 5x5mm para facilitar a visualização em microscópio. Cada corpo de prova correspondente a cada concentração foi mantida imerso em SBF e armazenada em estufa bacteriológica a 36°C sob agitação constante por períodos de 1 dia, 3, 7 e 14 dias. A solução de SBF foi trocada a cada 2 dias. Após este período as amostras foram retiradas da solução, metalizadas com prata e visualizadas em microscópio eletrônico.

O SBF foi preparado em concentração iônica quase semelhante ao plasma sanguíneo humano, de acordo com o procedimento proposto por Kokubo (método de Kokubo) As quantidades apropriadas de reagentes compreendendo NaCl, NaHCO₃, KCl, K₂HPO₄.3H₂O, MgCl₂.6H₂O, CaCl₂, Na₂SO₄ e tampão *tris* são dissolvidas em 1 l de água destilada dupla de modo a terem concentração iônica de vários ions inorgânicos semelhantes aos do plasma sanguíneo humano.

4.2.7.4 Avaliação da Deposição Celular

Para avaliação da deposição celular nos *scaffolds*, cultivou-se células de fibroblasto em meio RPMI, preparado com soro fetal bovino 10% e enriquecido com antimicótico e antimicrobiano 1%. Quando atingiu-se 80% de confluência, as células foram tripsinizadas. A contagem celular utilizada foi de 1×10^5 .

Os *scaffolds* foram esterilizados por meio de autoclave a $121^\circ\text{C}/30\text{min}$. Em câmara de fluxo laminar, os *scaffolds* foram acondicionados em placa de 24 poços, adicionou-se 1 ml das células e foram mantidos em estufa de CO_2 a 5%, 37°C por 7 dias. Durante esse período ocorreu 2 passagens de troca de meio.

Após 7 dias, removeu-se o meio, lavou-se com phosphate buffered saline (PBS), e fixou-se as células com solução de formaldeído a 10% por 10 minutos. Lavou-se novamente com PBS e deixou secando por 24h em estufa microbiológica a 37°C e seguiu-se para caracterização.

4.2.8 Caracterizações

4.2.8.1 Fluorescência de raios X (FRX)

A técnica de fluorescência de raios X, avaliada em equipamento *Philips, modelo PW 2400* foi utilizada como análise química com o intuito de avaliar a qualidade da Wollastonita e da Hidroxiapatita através da composição elementar. Para isso, empregou-se curva de análises quantitativa de $\text{SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$ e de Fosfatos. As amostras foram preparadas em forma de pastilha de vidro contendo: 0,3000g de amostra e 5,5g de $\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$ mediante fusão em forno de indução.

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

O FTIR teve por finalidade, avaliar as bandas em absorbância correspondentes as vibrações moleculares, referente aos principais grupos funcionais presentes nas amostras de Hidroxiapatita, Wollastonita e $\beta\text{-TCP}$. O método serviu como parâmetro de qualidade para as matérias primas comerciais, e para controle do processo de sintetização do $\beta\text{-TCP}$.

As amostras foram avaliadas na faixa de comprimento de onda correspondente ao infravermelho médio que situa-se no intervalo de 4000 a 400 cm-

1. O equipamento utilizado foi o espectrômetro da marca Perkin Elmer modelo Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR que utiliza-se das transformadas de Fourier (um processo matemático para conversão dos dados recolhidos no espectro de radiação). O processo de leitura das amostras foi realizado sem a necessidade de preparo de pastilhas de KBr, pois utilizou-se do dispositivo de contato direto ATR (*attenuated total reflectance*).

4.2.8.3 Termogravimetria (TG) e Análises Térmica Diferencial (DTA)

A TG e a DTA utilizada para os pós de Hidroxiapatita e Wollastonita, foi avaliada na faixa de 25° a 1000°C na estimativa de avaliar possível presença de eventos térmicos que confirma-se presença de outras fases ou contaminantes, o que poderia descaracterizar a matéria prima quanto a fase escolhida para esta pesquisa. Além de servir na verificação da perda de massa ocorrida neste intervalo de temperatura e confrontá-los com os laudos das empresas. Já para o β -TCP a técnica foi estudada em uma faixa de temperatura de 25° até 1600°C, onde foi possível avaliar a que temperatura ocorre mudança de fase, degradação do material, e ocorrência de Hidroxiapatita remanescente do processo de sintetização. O equipamento utilizado foi Setaram modelo Setsys 16/18.

4.2.8.4 Tamanho de Partícula

O método de análise do tamanho de partícula foi realizado por dispersão a laser, utilizando o equipamento Mastersizer 2000 da empresa Malvern, modelo APA 2000 concebido para medir a distribuição de diferentes tamanhos de partículas dentro das amostras de Wollastonita, Hidroxiapatita e β -TCP.

4.2.8.5 Potencial Zeta (PZ)

A avaliação da carga efetiva das partículas de Wollastonita e β -TCP, foi realizada em equipamento Zetasizer Nano ZS, da Malvern, com finalidade de determinar as melhores condições de repulsão eletrostática frente ao potencial hidrogeniônico e a substâncias de caráter dispersantes.

4.2.8.6 Comportamento Reológico

O comportamento reológico (CR) das suspensões foi estudado, com finalidade de avaliar as curvas de fluxos das suspensões preparadas. Foi utilizando um reômetro de rotação (MARS, Thermo Haake, Alemanha) operado em condições de taxa de cisalhamento controlada. O sistema de sensor consistiu em um rotor de cone duplo (com um diâmetro do cone 60 mm e ângulo de 2°) e uma placa estacionária, rodeado por uma parede cilíndrica. As medições foram realizadas através do aumento da taxa de cisalhamento de 0 a 1000 s⁻¹ em 5 min, mantendo a 1000 s⁻¹ durante 2 min e voltando para 0 em 5 min. A temperatura foi mantida constante a 25 ° C.

4.2.8.7 Superfície Específica

A área superficial dos pós e dos *scaffolds* produzidos foi avaliada mediante equipamento Monosorb Surface Área Analyzer, Quantachrome, Model MS-13. Este equipamento realiza a medida de forma dinâmica, com detectores de condutividade térmica que lhe permite medir valores de superfície baixa, diferente dos equipamentos de medida volumétricos. Desta forma foi possível medir a superfície específica dos *scaffolds*.

4.2.8.8 Dilatometria

A técnica de dilatometria foi utilizada com o propósito de definir as temperaturas de transições das fases componentes dos *scaffolds*, auxiliando assim a formulação de um perfil de sinterização adequado. O equipamento utilizado para isto foi o dilatômetro SETSYS TMA 16/18 SETARAM e as amostras produzidas em formato cilíndrico, mediante prensagem a 200 MPa, denso, medindo 5mm.

4.2.8.9 Difração de raios X (DRX)

A técnica de difração de raios X, permitiu verificar as fases presentes nos materiais e possíveis variações na cristalinidade como forma de controle da matéria prima. Além disso, a técnica foi utilizada também para confirmar as fases pretendidas nos *scaffolds*. O equipamento utilizado para esta técnica foi o

difratômetro de pó Bruker Modelo D8 Advance com radiação $K\alpha$ de Cu e detector rápido do tipo “lynx eye”.

4.2.8.10 Espectroscopia Ultravioleta Visível

A espectroscopia de ultravioleta visível foi utilizada na identificação dos elementos poliméricos e dos princípios ativos liberados, identificando-os através dos seus espectros de absorção por meio de equipamento da Perkin Elmer Lambda 900 UV VIS NIR Spectrometer Modelo Lambda 900.

4.2.8.11 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura foi utilizado para obtenção das informações detalhadas acerca da morfologia e topografia da superfície das amostras. Observar o tamanho, a distribuição, a interconectividades dos poros nos *scaffolds*, e o recobrimento da fase polímero/princípio ativo. Além disto, foi de grande importância para detecção da camada bioativa formada nos *scaffolds* e para visualização da deposição celular.

Os equipamentos utilizados para estas verificações foram: microscópio eletrônico de varredura de bancada, modelo TM-1000, marca Hitachi, microscópio de emissão de campo de cátodo frio modelo FE-SEM Hitachi modelo S-4700, utilizando as amostras metalizadas com prata para visualização da camada bioativa e microscópio eletrônico PRO-X modelo X800-07334 utilizando as amostras metalizadas com ouro para visualização da deposição celular.

4.2.8.12 Resistência Mecânica à Compressão.

O comportamento tensão/deformação dos *scaffolds*, foi obtido por meio de Máquina de Ensaio Universal da marca Instron (UK) onde as amostras foram diretamente testadas quanto a sua capacidade de compressão e limite de ruptura em amostragem de 5 unidades por composição, submetidas a uma carga de 5N.

CAPÍTULO 5

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 RESULTADOS ETAPA 1

5.1.1 Caracterização das Matérias Primas e da Hidroxiapatita.

5.1.1.1 Fluorescência de raios X – (FRX)

A Tabela 6 abaixo, mostra o resultado da análise química em porcentagem de óxidos, obtido para as amostras de Wollastonita e de Hidroxiapatita por meio da Técnica de Fluorescência de raios X.

Tabela 6 Porcentagem em óxido dos elementos químicos em Wollastonita e Hidroxiapatita (Própria 2017).

Elementos	% em peso	% em peso
Óxidos	Wollastonita	Hidroxiapatita
Al ₂ O ₃	0.35	<0.2
CaO	46.1	52.8
Fe ₂ O ₃	0.24	<0.10
K ₂ O	< 0.06	<0.1
MgO	<0.10	0.46
SiO ₂	52.3	<0.4
P ₂ O ₅	-	40.9
Na ₂ O	<0.10	0.17

5.1.1.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

Os espectrogramas obtidos por meio de vibrações moleculares dos principais grupos constituintes das amostras de Wollastonita, Hidroxiapatita e β -TCP estão representados nas Figuras 15, 16 e 17.

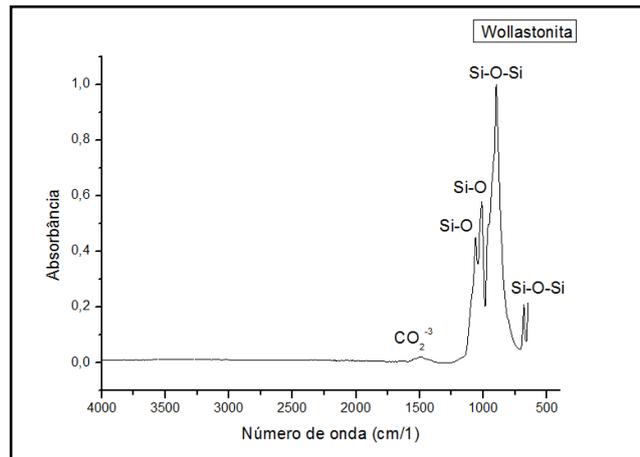


Figura 15 Representação gráfica da espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier da Wollastonita (Própria 2017).

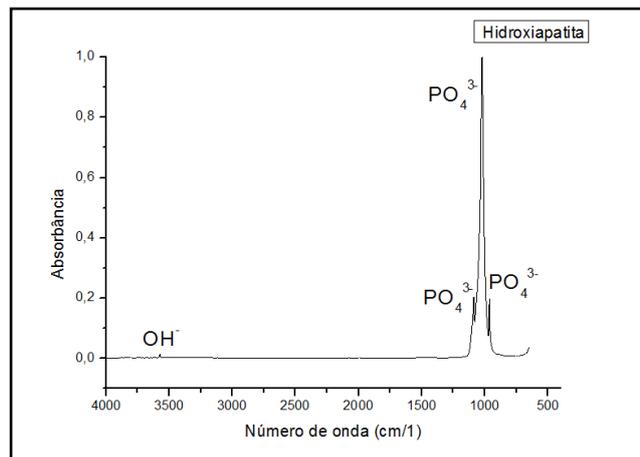


Figura 16 Representação gráfica da espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier da Hidroxiapatita (Própria 2017).

O espectro por FTIR identificou na amostra de Wollastonita, Figura 15, picos em 681,897 e 931 cm^{-1} correspondentes a bandas de estiramento Si-O-Si. Bandas

de absorção em 1010 e 1069 cm^{-1} correspondente as bandas de vibração Si-O e bandas de alongamento assimétrico CO_2^{-3} próximo a 1500 cm^{-1} .

No espectro da Hidroxiapatita, Figura 16, encontrou-se fortes bandas de PO_4^{3-} em 1100, 1037 e 967 cm^{-1} além de uma banda em 3572 cm^{-1} atribuída a vibração OH. Para o espectro de β -TCP, Figura 17, foi encontrado bandas na região de 945, 973, 1017 e 1132 cm^{-1} .

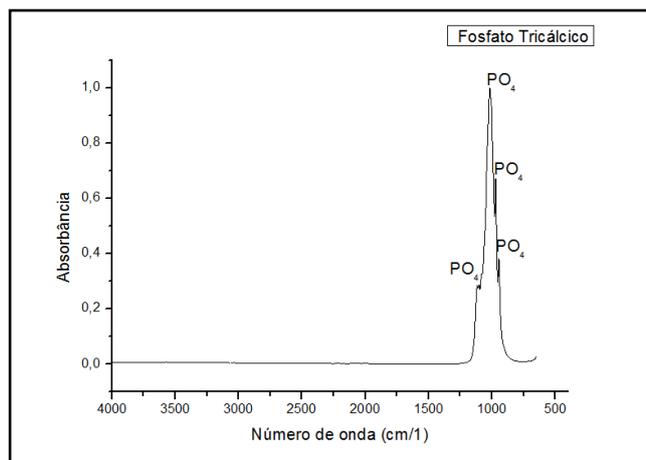


Figura 17 Representação gráfica da espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier do β -TCP (Própria 2017)

5.1.1.3 Termogravimetria (TG) Análise Térmica Diferencial (DTA)

Os termogramas obtidos para as amostras de Wollastonita, Hidroxiapatita e β -TCP estão representados nas Figuras 18, 19 e 20.

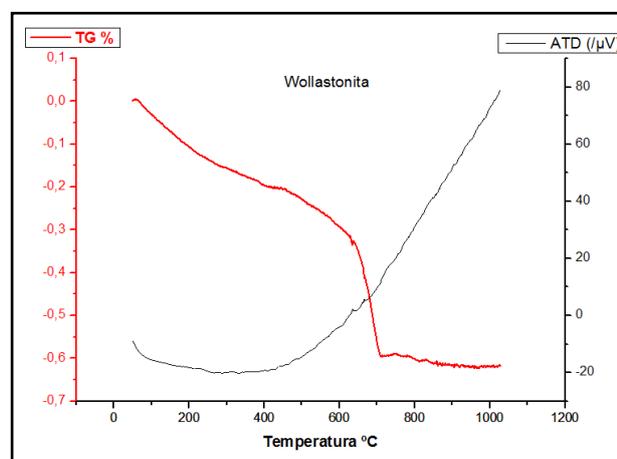


Figura 18 Perfil da curva termogravimétrica e da análise térmica diferencial da Wollastonita (Própria 2017).

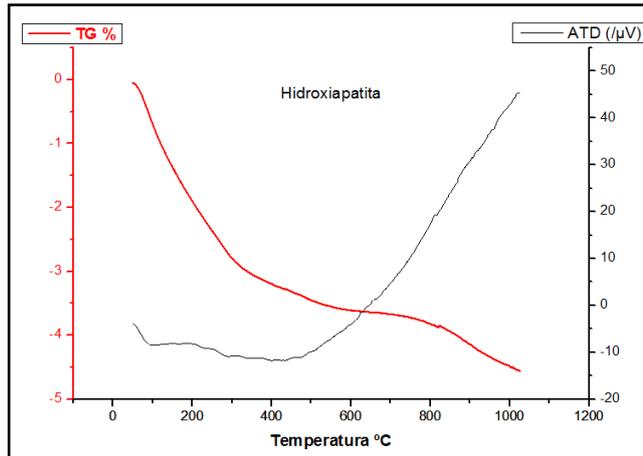


Figura 19 Perfil da curva termogravimétrica e da análise térmica diferencial da Hidroxiapatita (Própria 2017).

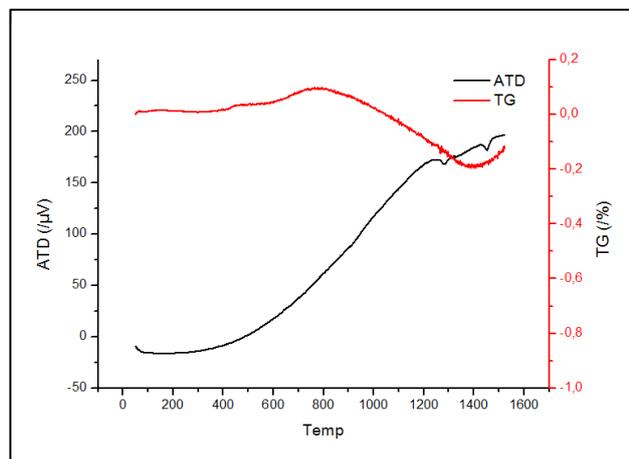


Figura 20 Perfil da curva termogravimétrica e da análise térmica diferencial do β -TCP (Própria 2017).

5.1.1.4 Difração de raios X

Os difratogramas obtidos para as amostras de Wollastonita, Hidroxiapatita e β -TCP estão representados nas Figuras 21, 22 e 23 abaixo.

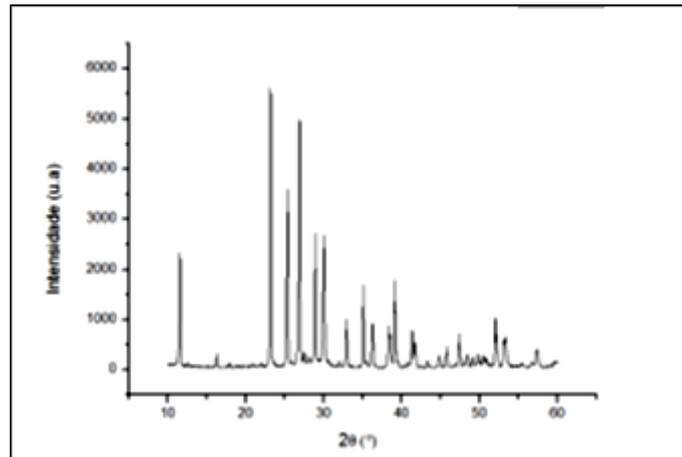


Figura 21 DRX da amostra de Wollastonita (Própria 2017)

A técnica de DRX para amostra de Wollastonita identificou Parawollastonita pela carta nº 0043-1460 que corresponde à fase de baixa temperatura. A fase identificada na Hidroxiapatita corresponde a Hidroxiapatita pura (HA) (JCPDS 9-432) e O perfil cristalográfico do β -TCP identificou esta fase através da carta nº 00-009-0169.

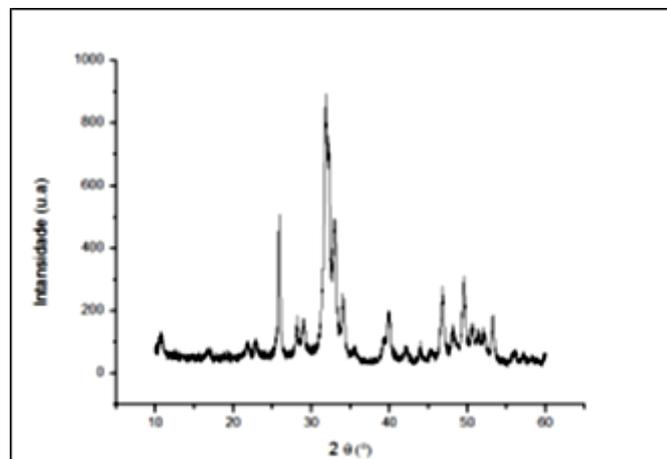


Figura 22 DRX da amostra de Hidroxiapatita (Própria 2017).

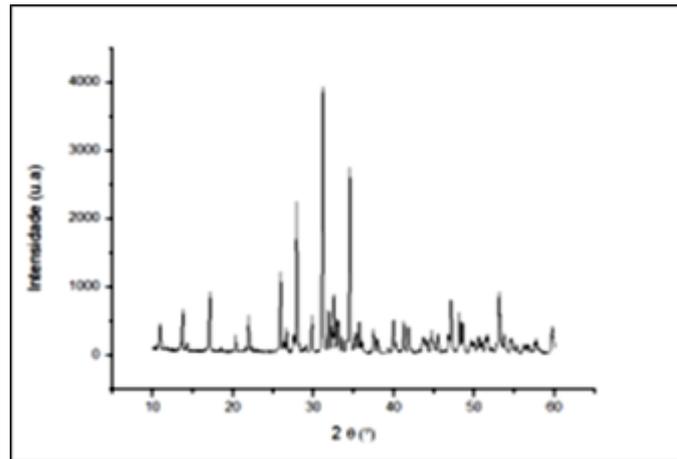


Figura 23 DRX da amostra de β -TCP (Própria 2017).

5.1.1.5 Tamanho e Distribuição de Partícula

A análise do tamanho de partículas apresentou como resultados para a Wollastonita, diâmetros entre 1,0 – 15,0 μm onde, 10% das partículas possuem diâmetro de 1,0 μm , 50% possuem diâmetro de 4,5 μm e 90% possuem diâmetro de 15,0 μm .

Para a Hidroxiapatita as partículas apresentaram diâmetros entre 1,4 e 22,0 μm onde, 10% possuem diâmetro de 1,4 μm , 50 % possuem diâmetro de 4,9 μm e 90% possuem diâmetro de 22,0 μm .

O β -TCP, apresentou partículas entres 0,86 - 20,11 μm onde, 10% possuem diâmetro de 0,86 μm , 50 % possuem diâmetro de 3,65 μm e 90% possuem diâmetro de 20,11 μm .

As Figuras 24, 25 e 26, representam o perfil da distribuição das partículas para os materiais citados acima.

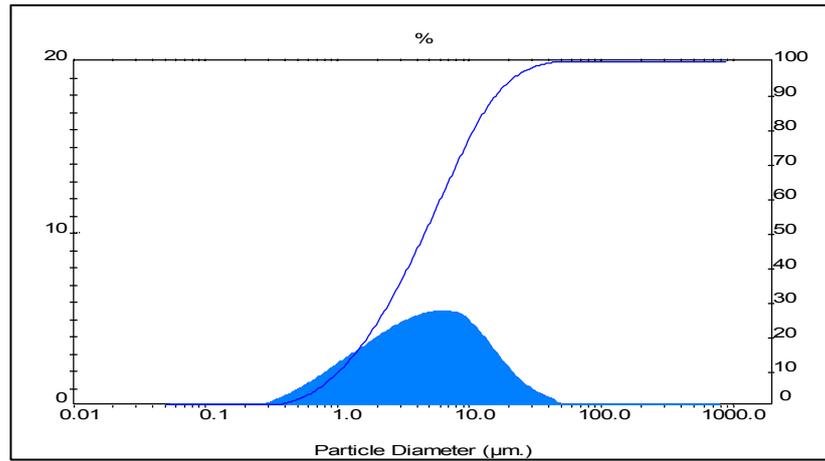


Figura 24 Perfil da distribuição das partículas da Wollastonita (Própria 2017).

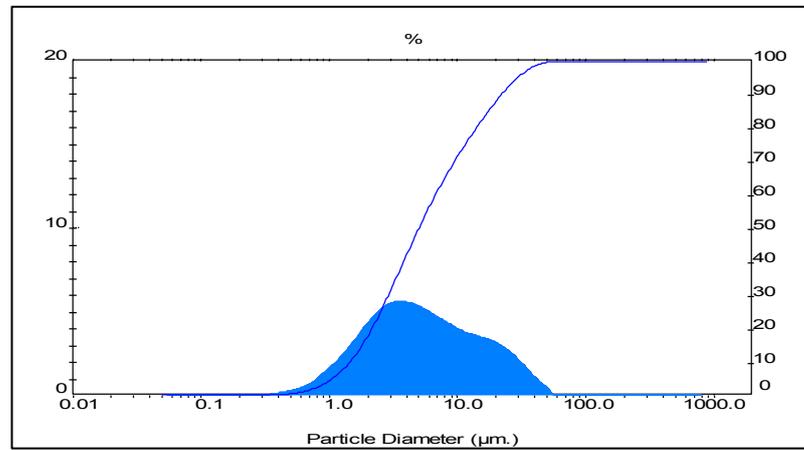


Figura 25 Perfil da distribuição das partículas da Hidroxiapatita (Própria 2017).

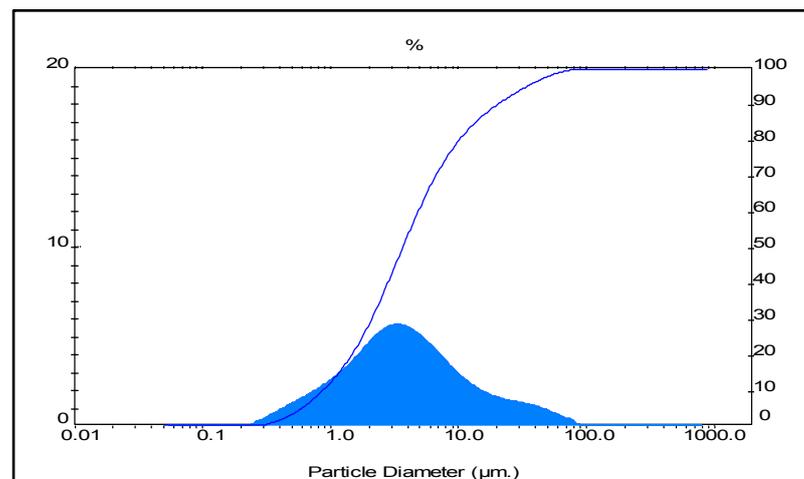


Figura 26 Perfil da distribuição das partículas do β -TCP (Própria 2017).

5.1.1.6 Superfície específica

A análise de superfície específica revelaram uma área de 1,78 m²/g para a Wollastonita, 70,15 m²/g para a Hidroxiapatita e 0,88 m²/g para o β -TCP.

5.1.1.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

As Figuras 27, 28 e 29 mostram a morfologia das amostras de Wollastonita, Hidroxiapatita e β -TCP.



Figura 27 Microscopia Eletrônica da Wollastonita (Própria 2017).

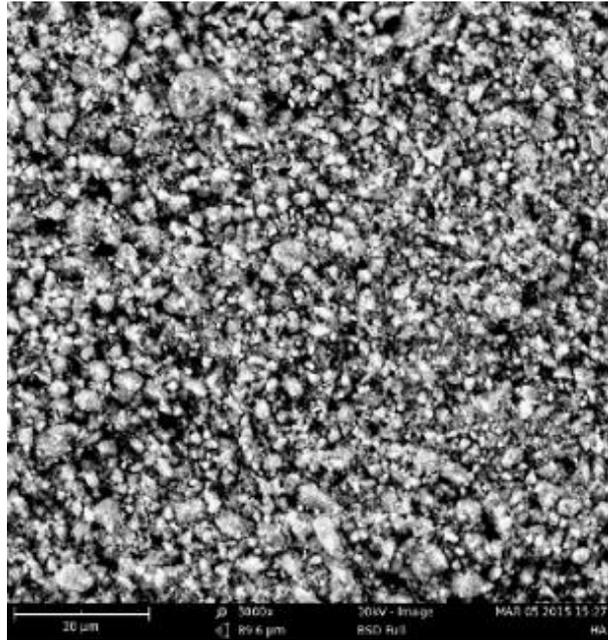


Figura 28 Microscopia Eletrônica da Hidroxiapatita (Própria 2017).

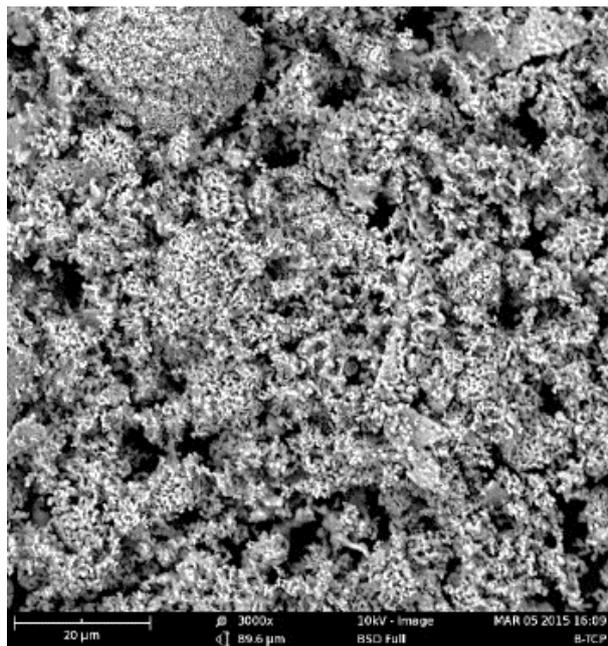


Figura 29 Microscopia Eletrônica do β -TCP (Própria 2017).

5.1.2 RESULTADOS ETAPA 2

5.1.3 Caracterização dos *Scaffolds*

As amostras de Wollastonita e de β -TCP após processo de moagem apresentaram valores de tamanho de partícula de: Wollastonita com partículas de diâmetro entre 1,0 - 9,22 μ m onde, 10% possuem diâmetro de 1,0 μ m, 50% possuem diâmetro de 3,36 μ m e 90% possuem diâmetro de 9,22 μ m. E β -TCP com partículas de diâmetro entre 0,80 - 3,16 μ m onde, 10% possuem diâmetro de 0,80 μ m, 50 % possuem diâmetro de 1,63 μ m e 90% possuem diâmetro de 3,16 μ m.

As Figura 30 e 31 mostram o novo perfil de distribuição dessas partículas.

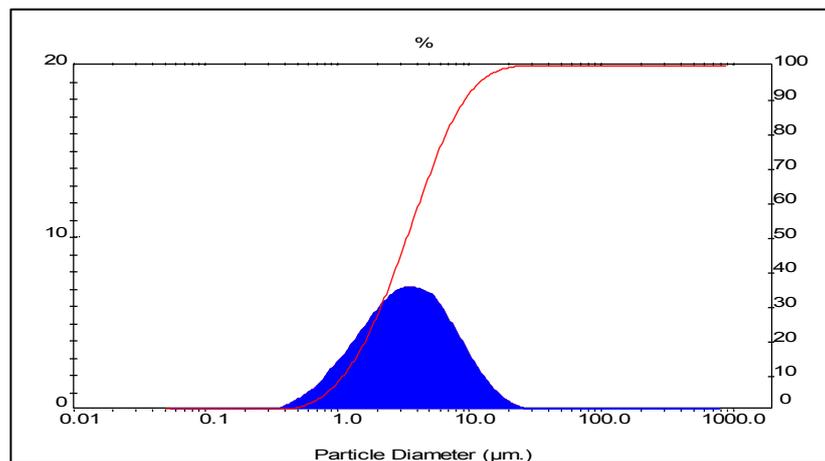


Figura 30 Perfil da distribuição das partículas da Wollastonita após moagem (Própria 2017).

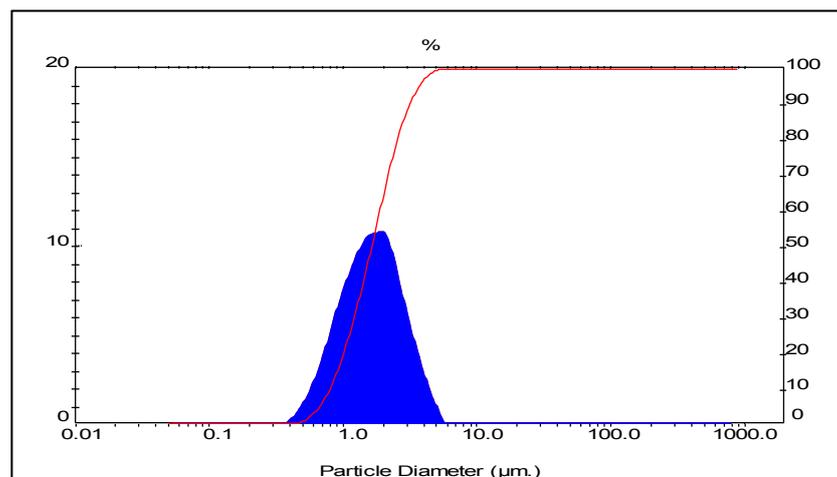


Figura 31 Perfil da distribuição das partículas do β -TCP após moagem (Própria 2017).

5.1.3.1 Carga das Partículas

As imagens abaixo representam a carga das partículas avaliadas por meio do Potencial Zeta (PZ) para os pós de Wollastonita e para o β -TCP.

Nas Figuras 32 e 33, respectivamente, estão representadas os perfis das curvas de potencial zeta em função da variação do pH.

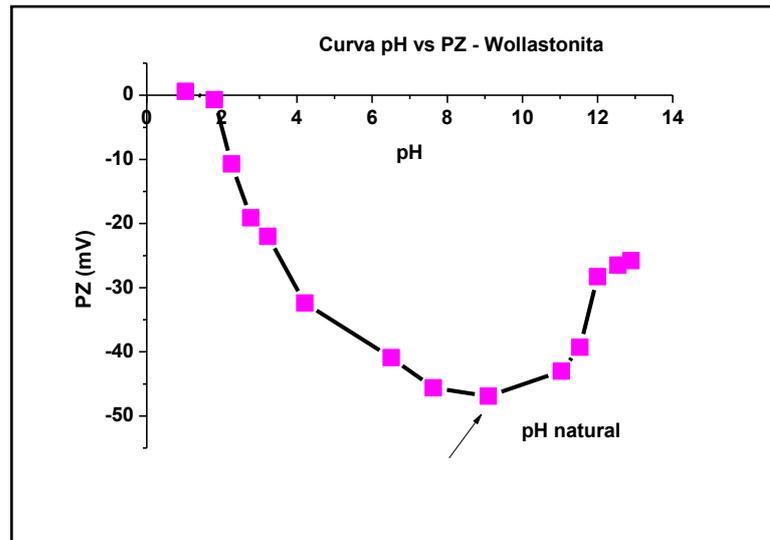


Figura 32 Perfil da curva da influência do potencial hidrogeniônico no potencial zeta da Wollastonita (Própria 2017).

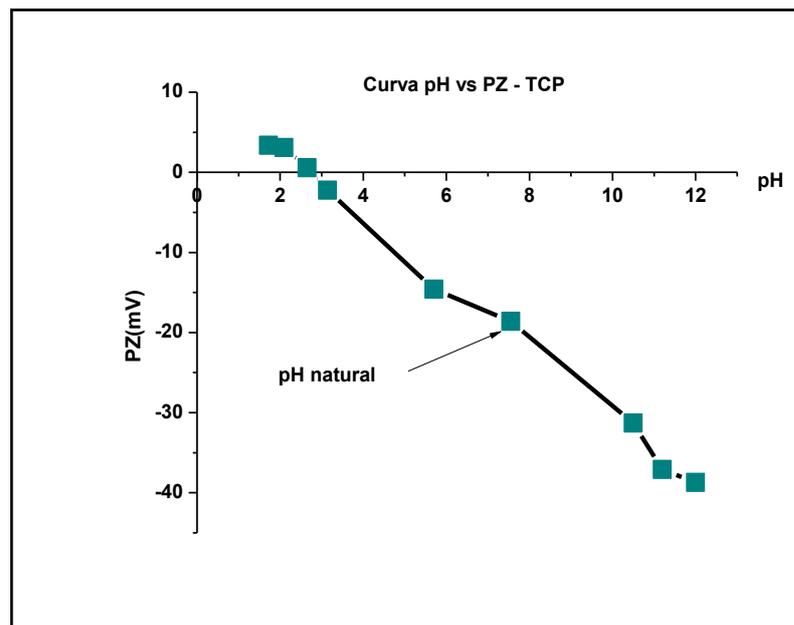


Figura 33 Perfil da curva da influência do potencial hidrogeniônico no potencial zeta do β -TCP (Própria 2017).

Nas Figuras 34 e 35, respectivamente, estão representadas os perfis das curvas de potencial zeta em função da concentração de dispersante.

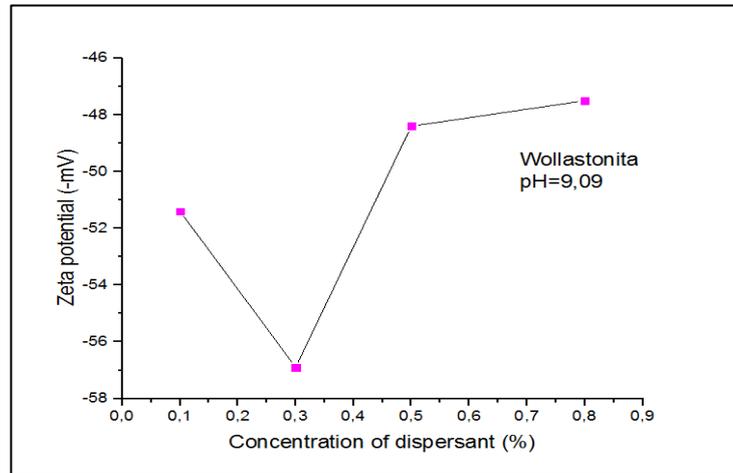


Figura 34 Perfil da curva da influência da concentração do dispersante no potencial zeta da Wollastonita (Própria 2017)

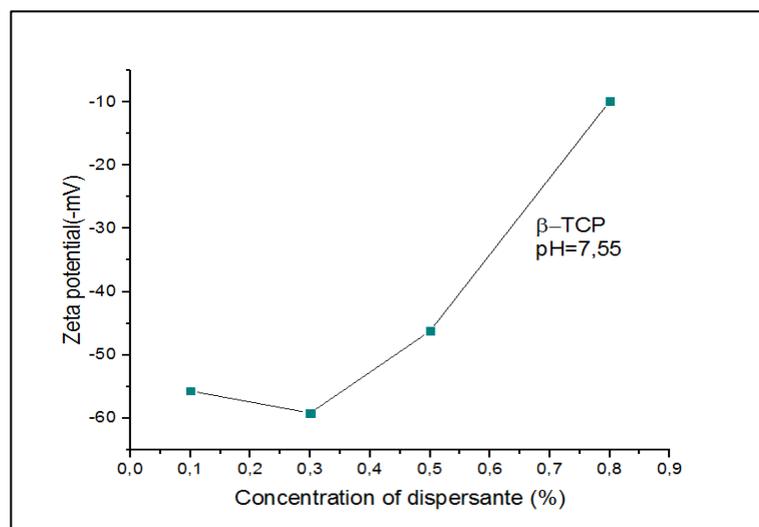


Figura 35 Perfil da curva da influência da concentração do dispersante no potencial zeta do β -TCP (Própria 2017).

5.1.3.2 Determinação do Teor de Sólidos

Por meio de estudo reológico foi avaliado a Fração Volumétrica de Sólidos por Viscosidade Aparente e a Taxa de Cisalhamento pela Tensão de Cisalhamento desta fração volumétrica representado na Figura 36 e 37 respectivamente.

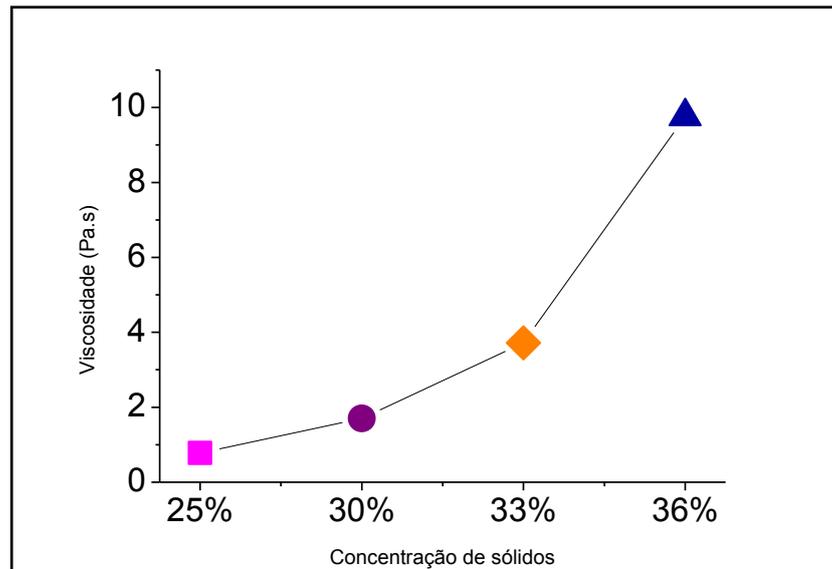


Figura 36 Viscosidade Aparente em função da Fração Volumétrica de Sólidos (Própria 2017).

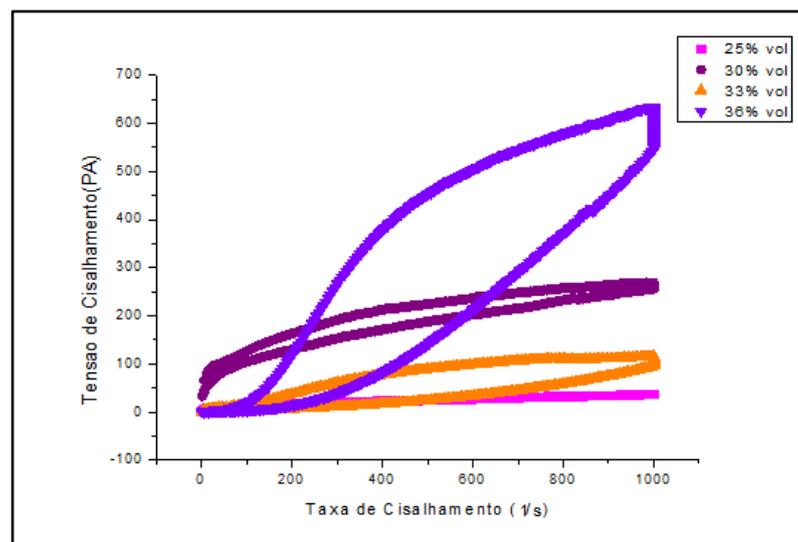


Figura 37 Curva de Fluxo da Fração Volumétrica de Sólidos (Própria 2017).

5.1.3.3 Curva de Fluxo das Composições

As Figuras 38, 39 e 40, representam as Curvas de Fluxo obtidas para as concentrações 20%W+80% β -TCP, 60%W+40% β -TCP e 80%W+20% β -TCP cuja suspensões foram preparadas contendo o volume de sólidos determinado anteriormente.

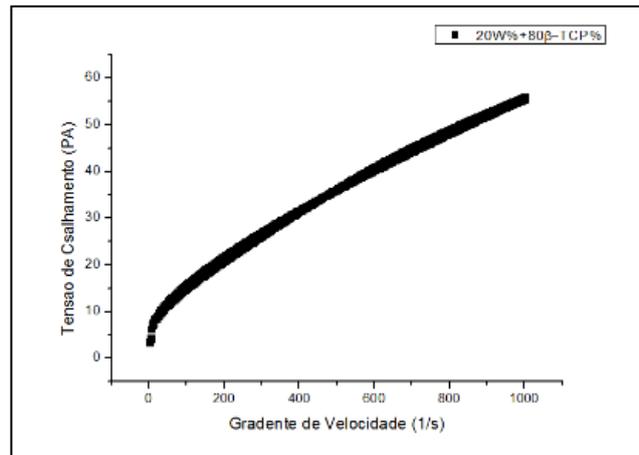


Figura 38 Curva de Fluxo da suspensão cerâmica de composição 20%W+80% β -TCP (Própria 2017).

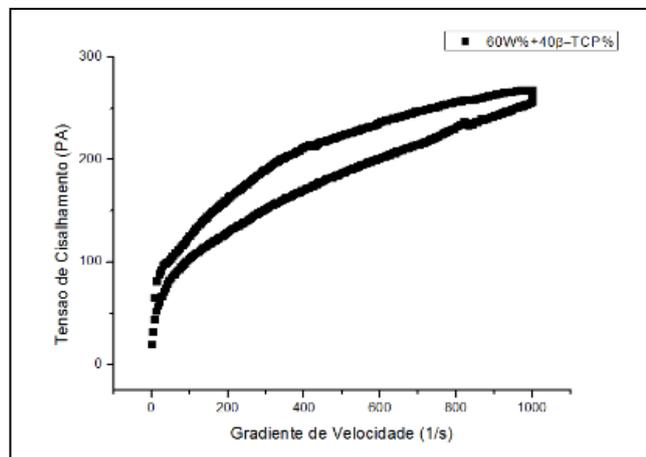


Figura 39 Curva de Fluxo da suspensão cerâmica de composição 60%W+40% β -TCP (Própria 2017).

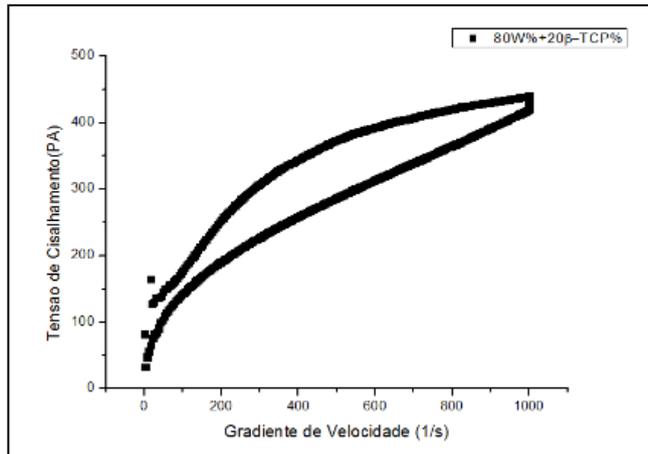


Figura 40 Curva de Fluxo da suspensão cerâmica de composição 80%W+20%β-TCP (Própria 2017).

5.1.3.4 Curva de Fluxo das Composições em relação ao tempo de ultrassom

As Figuras 41, 42 e 43, representam as Curvas de Fluxo das concentrações 20%W+80%β-TCP, 60%W+40%β-TCP e 80%W+20%β-TCP em função do tempo de ultrassom em minutos aplicado.

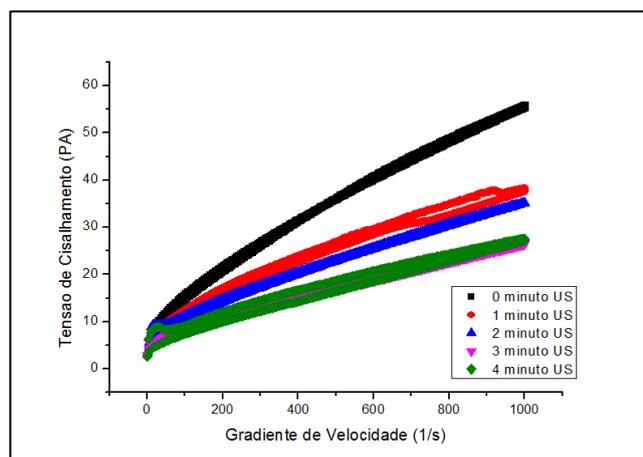


Figura 41 Curva de Fluxo da suspensão cerâmica de composição 20%W+80%β-TCP sob efeito do tempo de ultrassom (Própria 2017).

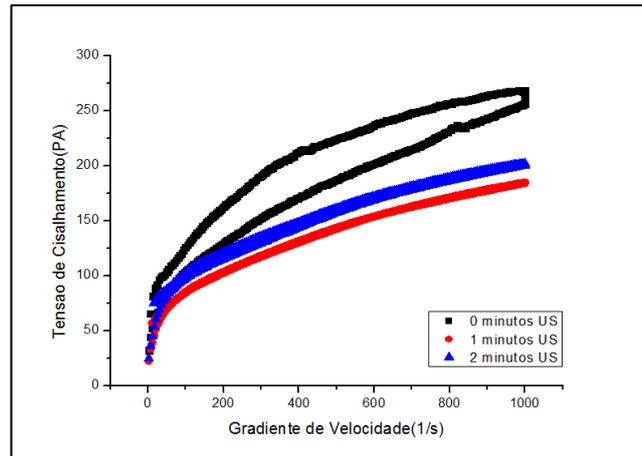


Figura 42 Curva de Fluxo da suspensão cerâmica de composição 60%W+40% β -TCP sob efeito do tempo de ultrassom (Própria 2017).

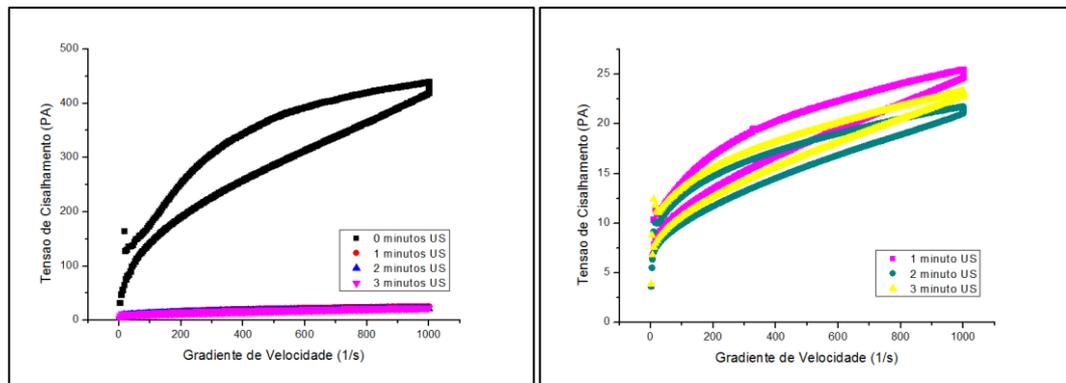


Figura 43 Curva de Fluxo da suspensão cerâmica de composição 80%W+20% β -TCP sob efeito do tempo de ultrassom (Própria 2017).

5.1.3.5 Curva de Fluxo das Composições em relação à concentração de ligante

As Figuras 44, 45 e 46, representam as Curvas de Fluxo das concentrações 20%W+80% β -TCP, 60%W+40% β -TCP e 80%W+20% β -TCP em função da concentração de ligante.

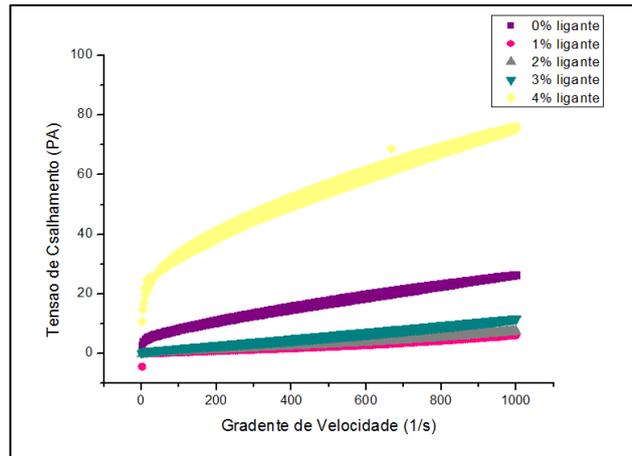


Figura 44 Curva de Fluxo da suspensão cerâmica de composição 20%W+80%β-TCP representando o efeito da concentração de ligante (Própria 2017).

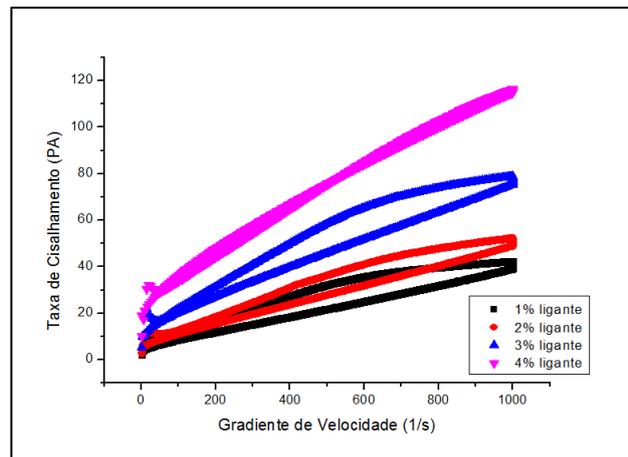


Figura 45 Curva de Fluxo da suspensão cerâmica de composição 60%W+40%β-TCP representando o efeito da concentração de ligante (Própria 2017).

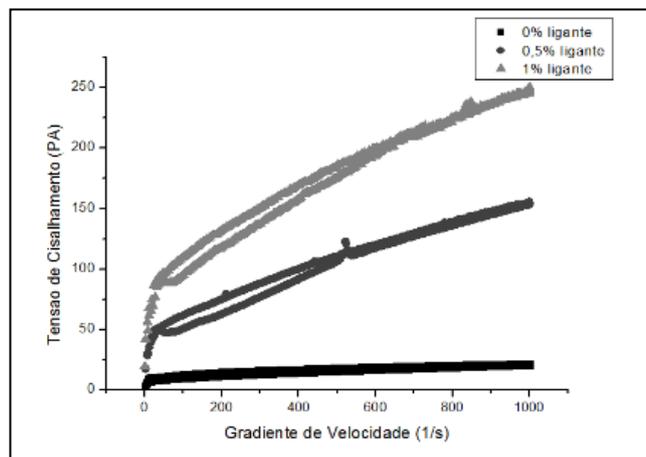


Figura 46 Curva de Fluxo da suspensão cerâmica de composição 60%W+40%β-TCP representando o efeito da concentração de ligante (Própria 2017).

Ao final tivemos: 20%W+80% β -TCP, 3 minutos de US e 4% de ligante, 60%W+40% β -TCP e 1 minuto de US e 1% de ligante e para a composição 80%W+20% β -TCP, 2 minutos de US e 0,5% de ligante.

5.1.4 RESULTADOS ETAPA 3

5.1.5 Dilatometria

Os possíveis eventos térmicos ocorridos durante o processo de sinterização dos *scaffolds* foi observado mediante análise por dilatometria representada nas Figuras 47, 48 e 49.

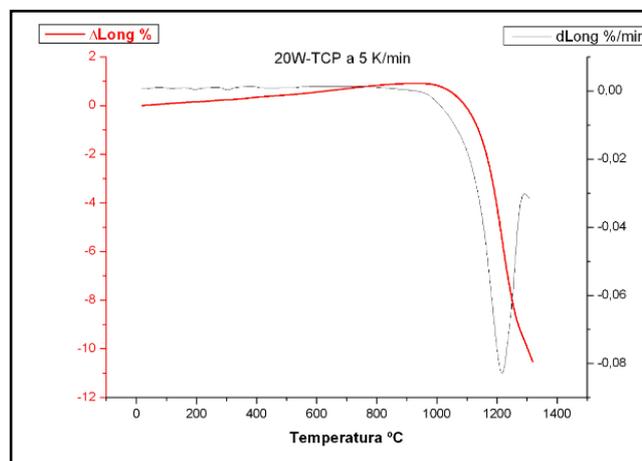


Figura 47 Perfil da curva de dilatometria para as composições: A-20%W+80% β -TCP (Própria 2017).

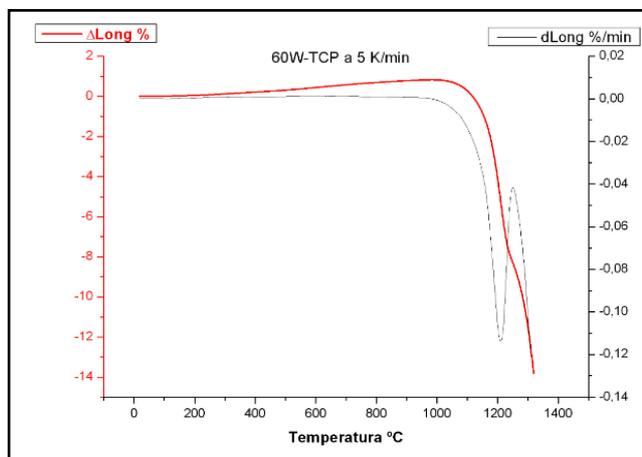


Figura 48 Perfil da curva de dilatometria para as composições: A-60%W+40% β -TCP (Própria 2017)

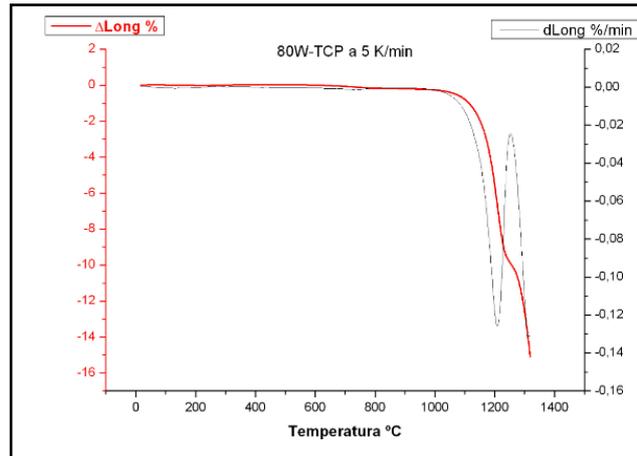


Figura 49 Perfil da curva de dilatométrica para as composições: A-80%W+20%β-TCP (Própria 2017).

5.1.5.1 Superfície específica dos *scaffolds*

A superfície específica dos *scaffolds* foram avaliados resultando em 0,012 m²/g para os *scaffolds* produzidos pela composição 20%W+80%β-TCP, 0,014 m²/g para os *scaffolds* produzidos pela composição 60%W+40%β-TCP; e 0,015 m²/g para os *scaffolds* produzidos pela composição 80%W+20%β-TCP.

5.1.5.2 Difração de raios X dos *scaffolds*

As Figuras 50, 51 e 52 representam o difratograma para as três composições de *scaffolds*.

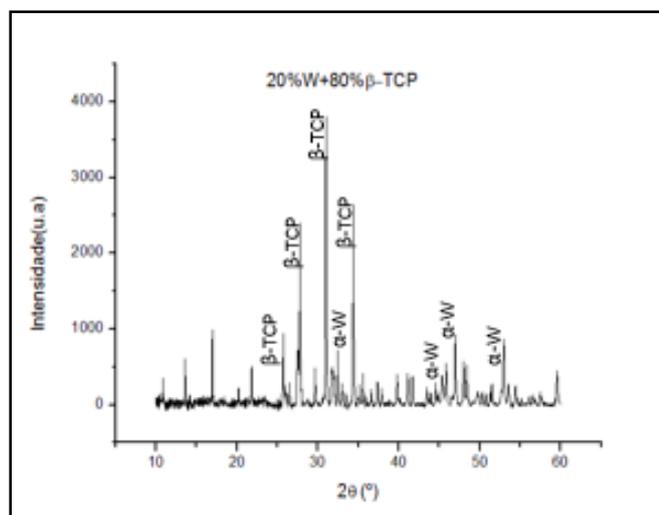


Figura 50 Difratograma do *scaffold* de composição 20%W+80%β-TCP (Própria 2017).

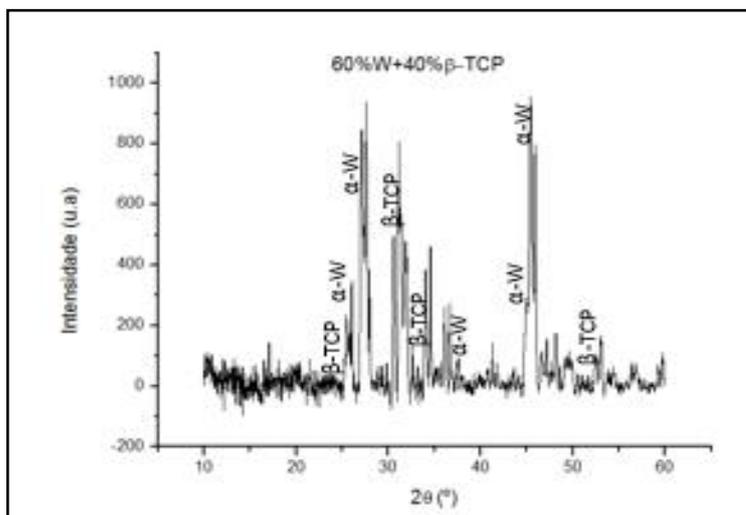


Figura 51 Difratoograma do *scaffold* de composição 60%W+40%β-TCP (Própria 2017)

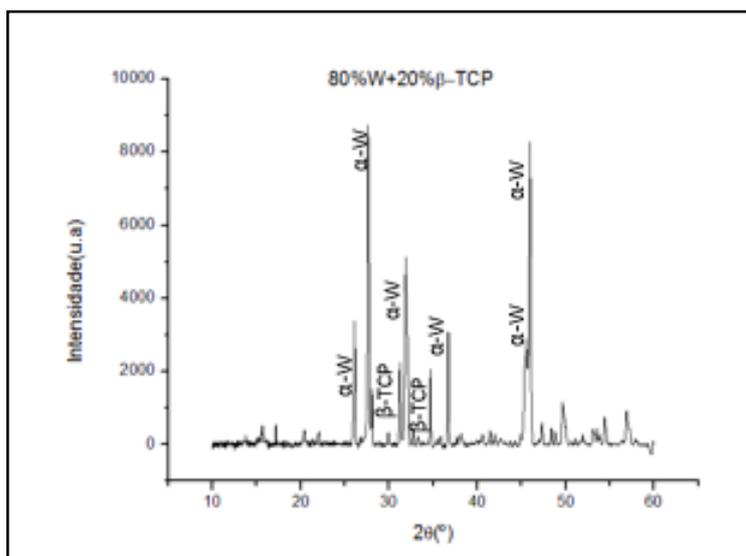


Figura 52 Difratoograma do *scaffold* de composição 80%W+20%β-TCP (Própria 2017).

Nas três composições dos *scaffolds* foram identificadas as fases β-TCP – whilockite -00-09-0169 e Wollastonita de alta temperatura – 01-076-0186.

5.1.5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura dos *Scaffolds*

As Figuras 53, 54 e 55 mostram as micrografias obtidas em equipamento Hitachi em aumentos de 50x e de 500x da superfície dos *scaffolds* e da região de interconectividade dos poros, para as três composições.

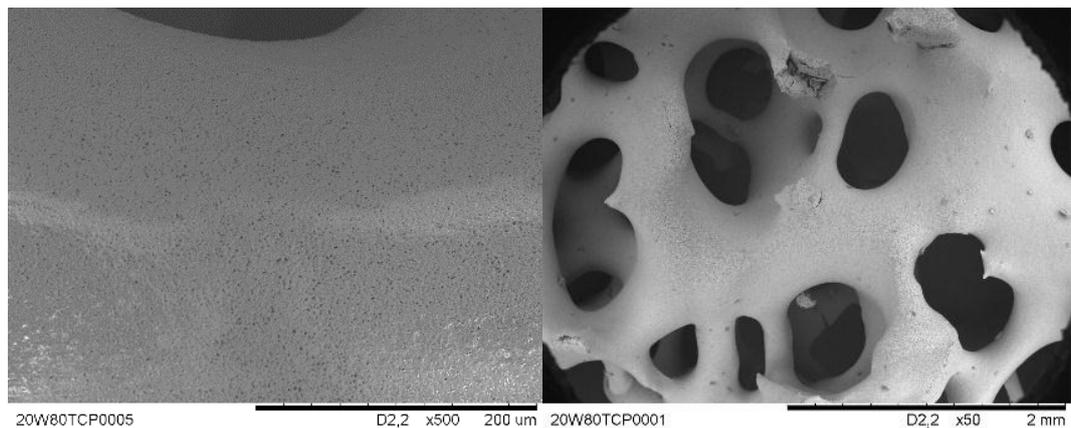


Figura 53 Micrografia Eletrônica da superfície do *scaffold* de composição 20%W+80%β-TCP (Própria 2017).

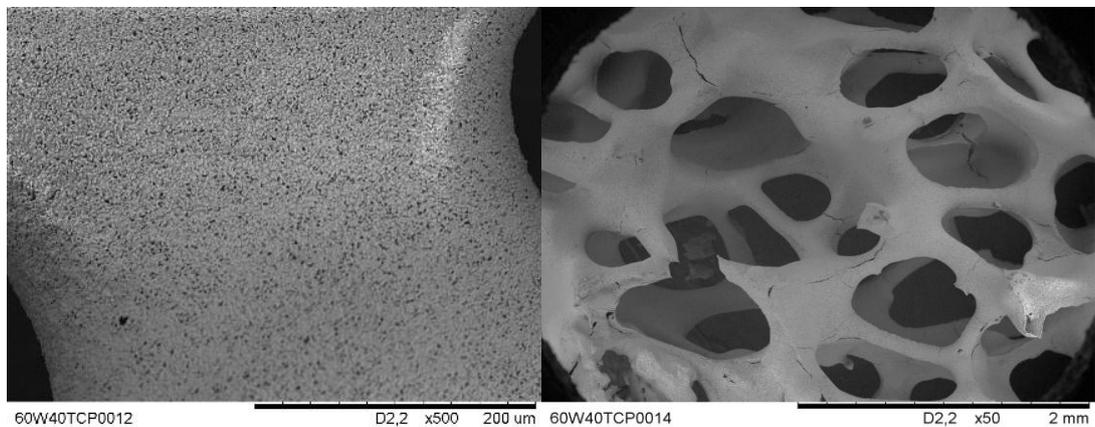


Figura 54 Micrografia Eletrônica da superfície do *scaffold* de composição 60%W+40%β-TCP (Própria 2017).

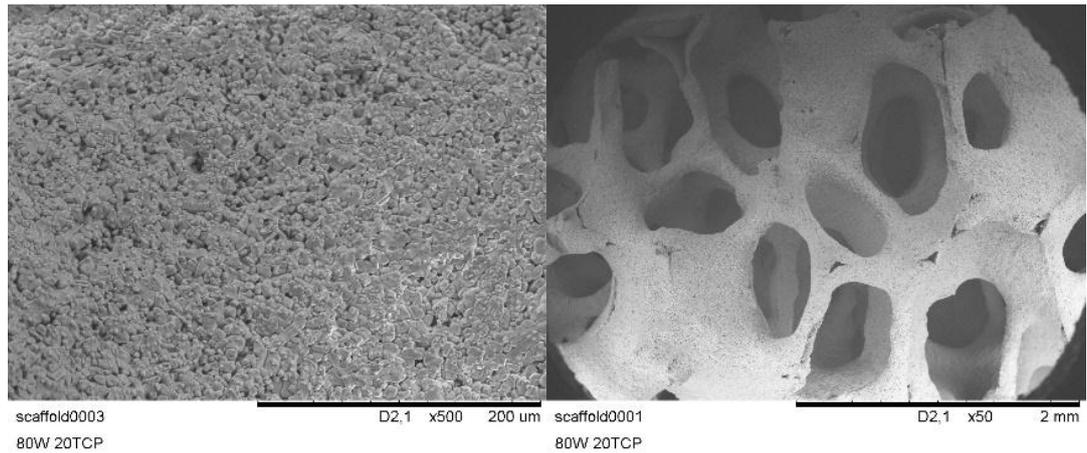


Figura 55 Micrografia Eletrônica da superfície do *scaffod* de composição 80%W+20%β-TCP (Própria 2017).

5.1.5.4 Ensaio Mecânico

A Tabela 7 abaixo mostra os valores de resistência à compressão para os *scaffolds* nas três composições.

Tabela 7 Valores de resistência à compressão dos *scaffolds* (Própria 2017).

Composição	Resistência à compressão
20 % W + 80 % β – TCP	0,61N/cm ² ± 0,06
60 % W + 40 % β – TCP	0,64 N/cm ² ± 0,06
80 % W + 20 % β – TCP	0,65 N/cm ² ± 0,06

5.1.6 RESULTADOS ETAPA 4

5.1.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura dos *scaffolds* com princípios ativos

As Figuras 56 e 57 representam a superfície dos *scaffolds* após serem impregnados pelo princípios ativos descritos anteriormente.

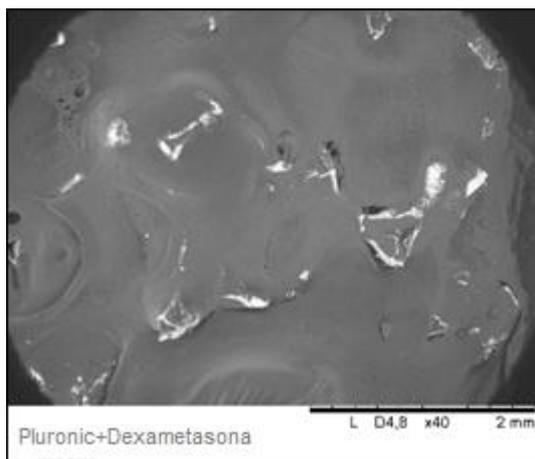


Figura 56 *Scaffold* impregnado com solução de Pluronic e Dexametasona (Própria 2017).

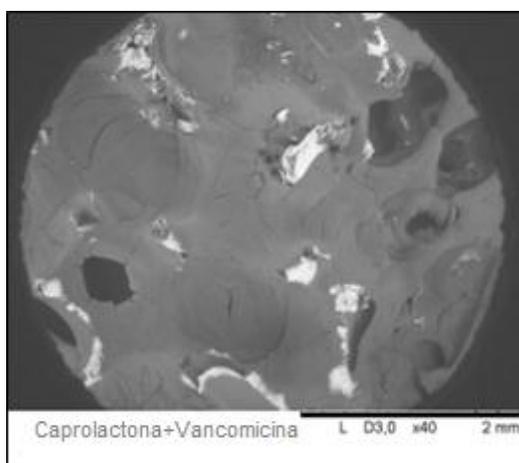


Figura 57 *Scaffold* impregnado com solução de Caprolactona e Vancomicina (Própria 2017).

5.1.6.2 Liberação de Princípios Ativos

Os gráficos das Figuras 58 e 59 representam a curva de liberação dos princípios ativos em meio SBF.

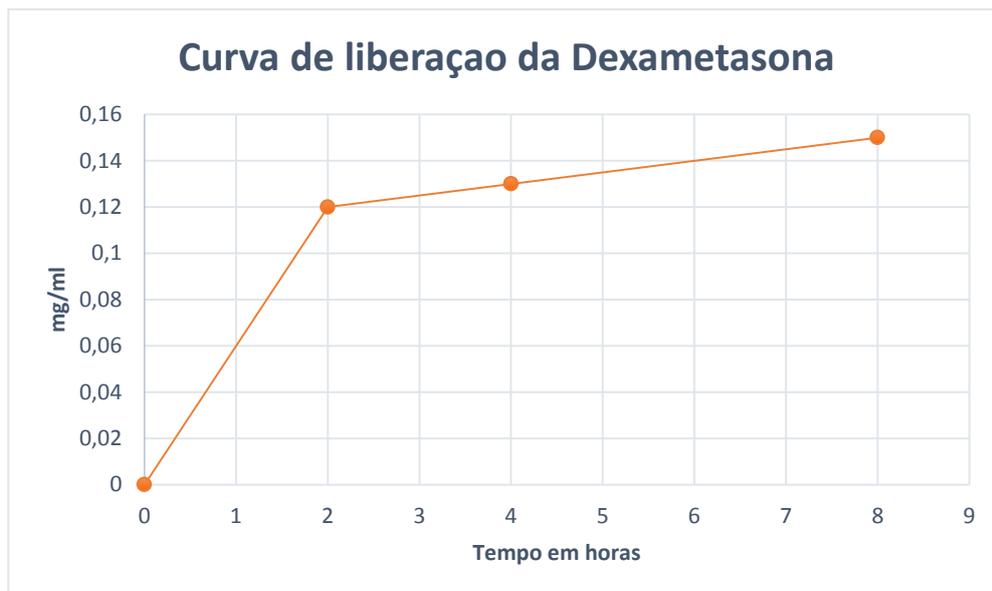


Figura 58 Perfil da curva de liberação da Dexametasona (Própria 2017).

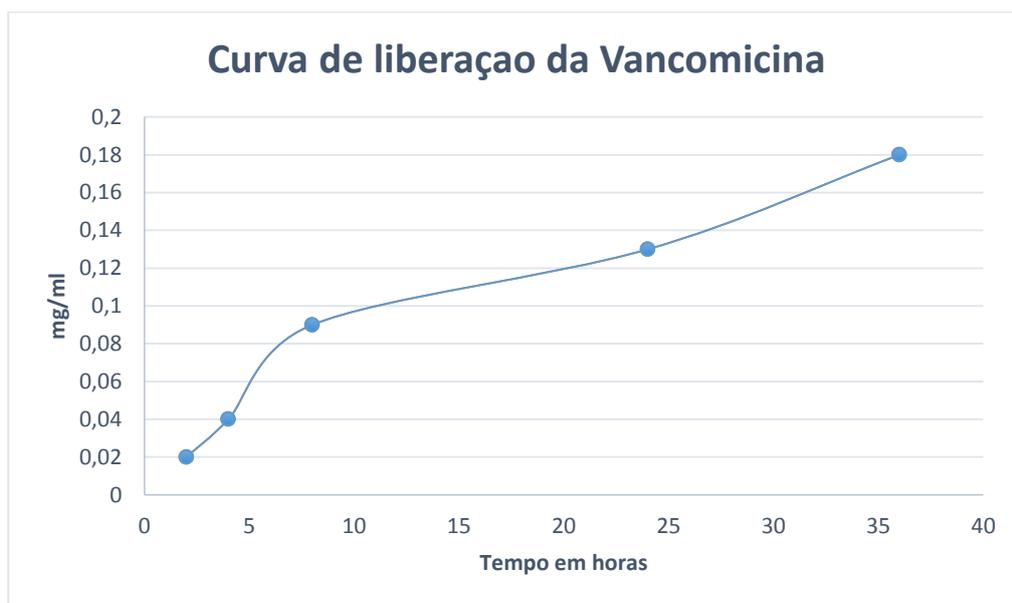


Figura 59 Perfil da curva de liberação da Vancomicina (Própria 2017).

5.1.6.3 Biodegradação

Os gráficos demonstrados nas Figuras 60, 61 e 62 representam a concentração em mg/L de íons cálcio e fósforo em meio TRIS ao longo de 28 dias.

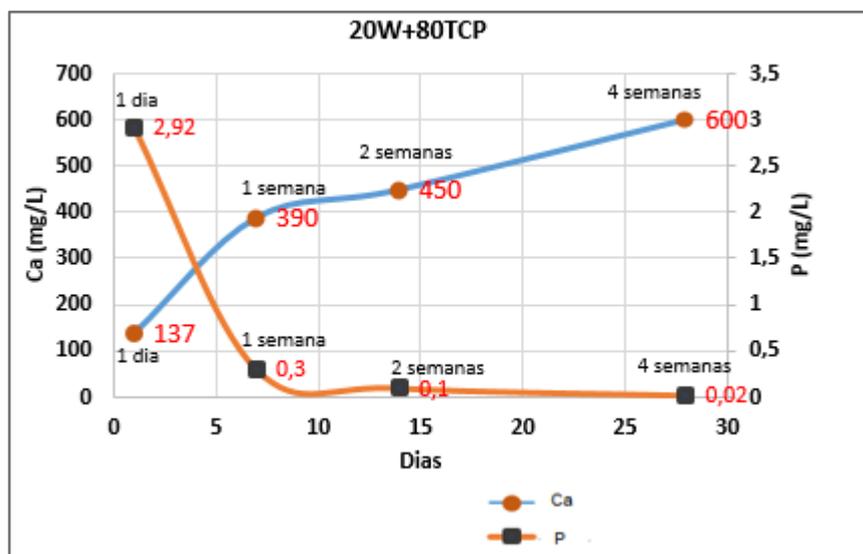


Figura 60 Biodegradação em meio TRIS dos *scaffolds* 20%W+80% β -TCP (Própria 2017).

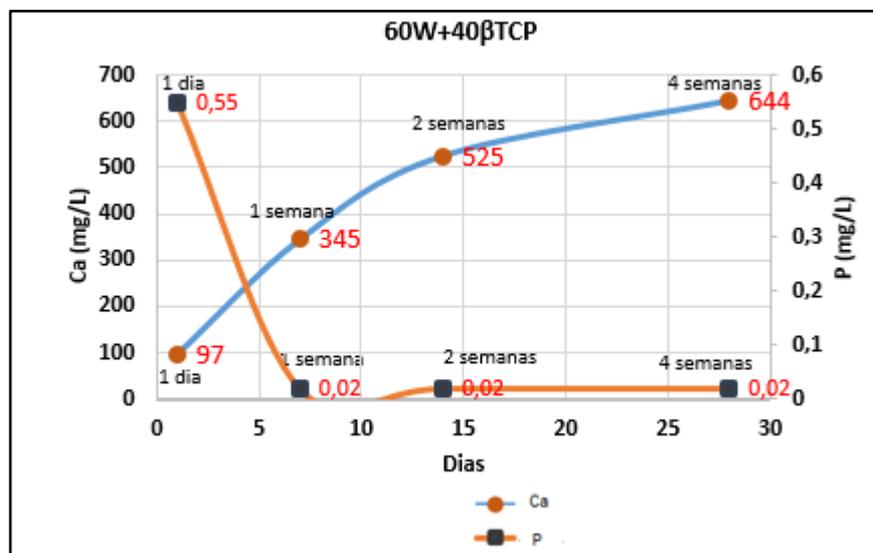


Figura 61 Biodegradação em meio TRIS dos *scaffolds* 60%W+40% β -TCP (Própria 2017).

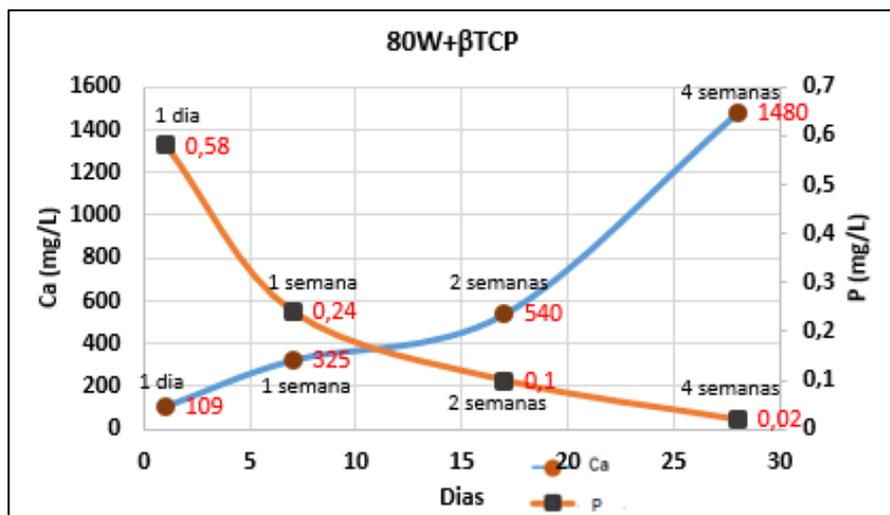


Figura 62 Biodegradação em meio TRIS dos *scaffolds* 80%W+40%β-TCP (Própria 2017).

5.1.6.4 Bioatividade

As micrografias das Figuras de 63 até 67 apresentam as superfícies dos *scaffolds* após serem submetidos à solução de SBF por um período de até 14 dias.

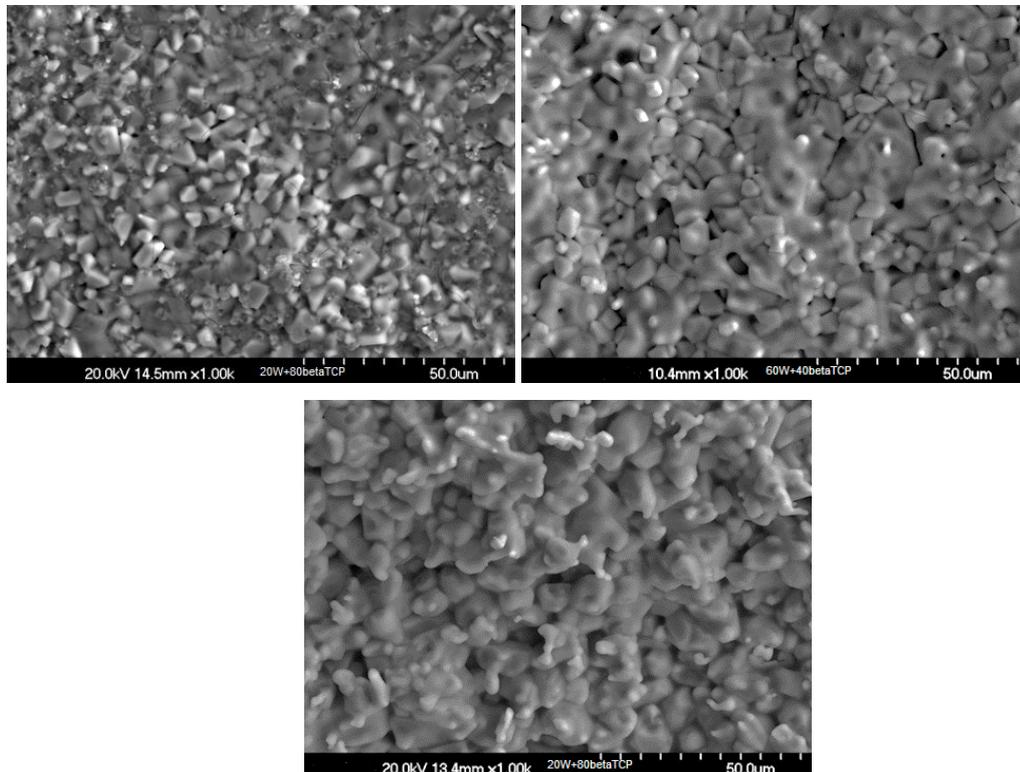


Figura 63 Micrografia da superfície dos *scaffolds* no tempo 0 de imersão (Própria 2017).

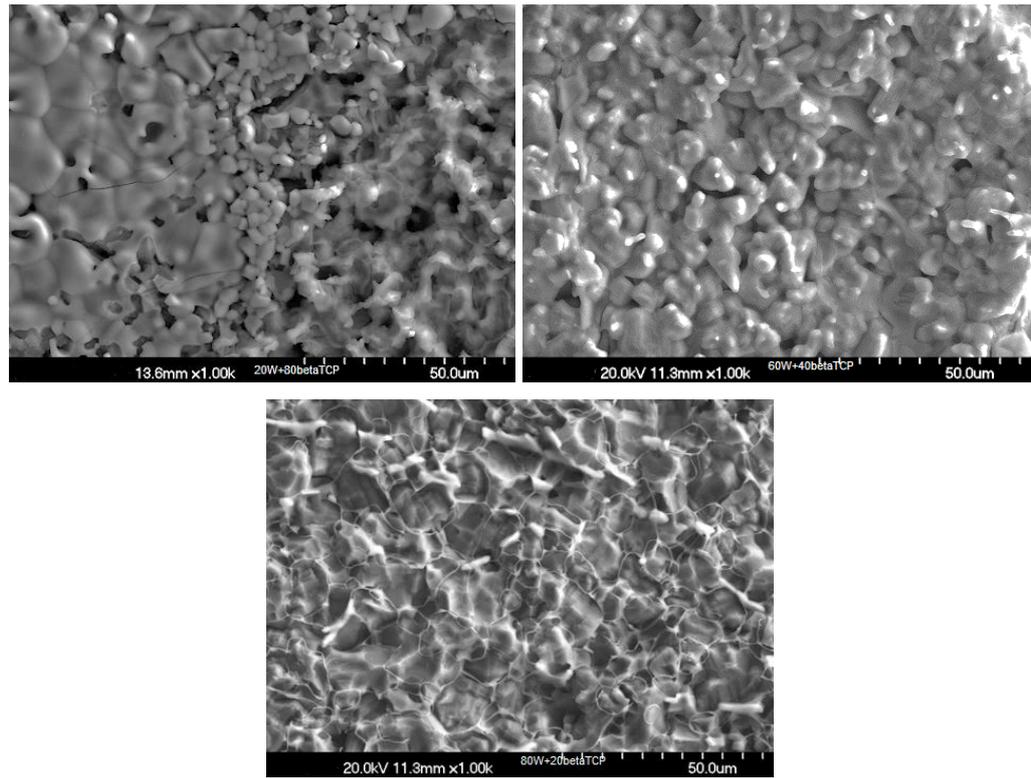
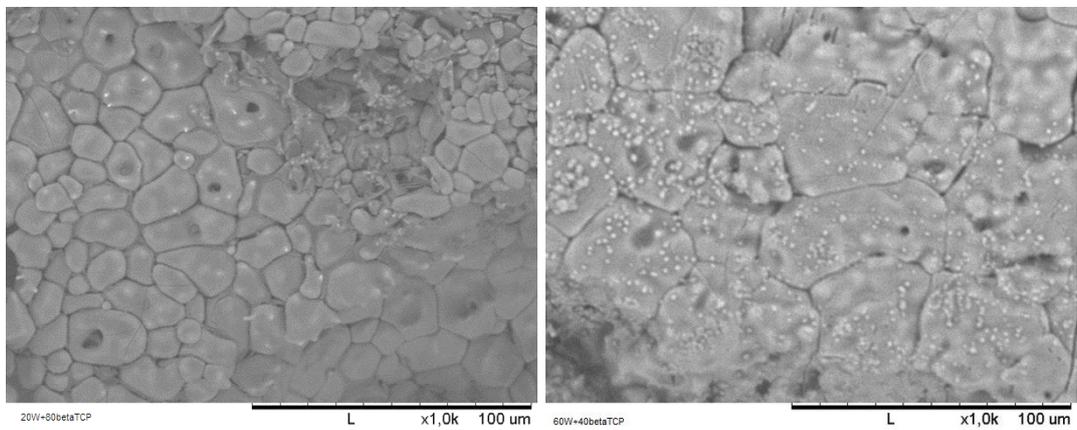


Figura 64 Micrografia da superfície dos *scaffolds* no tempo de 1 dia de imersão (Própria 2017).



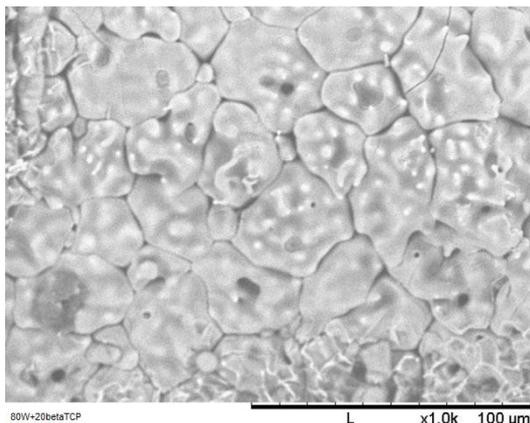


Figura 65 Micrografia da superfície dos *scaffolds* no tempo de 3 dias de imersão (Própria 2017).

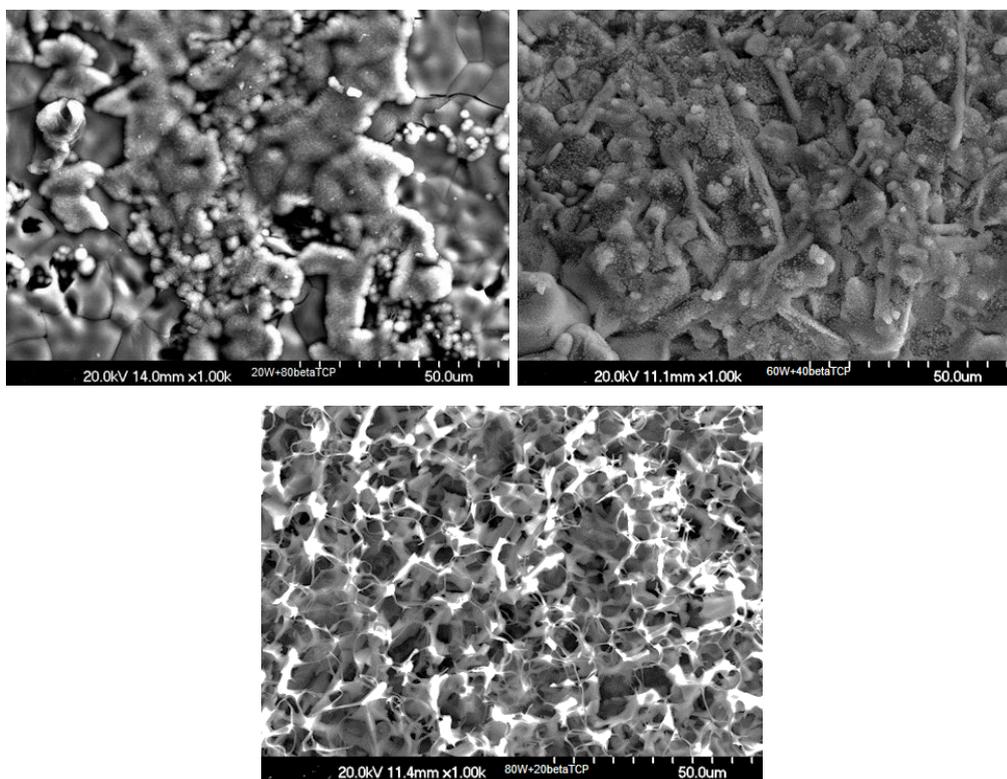


Figura 66 Micrografia da superfície dos *scaffolds* no tempo de 7 dias de imersão (Própria 2017).

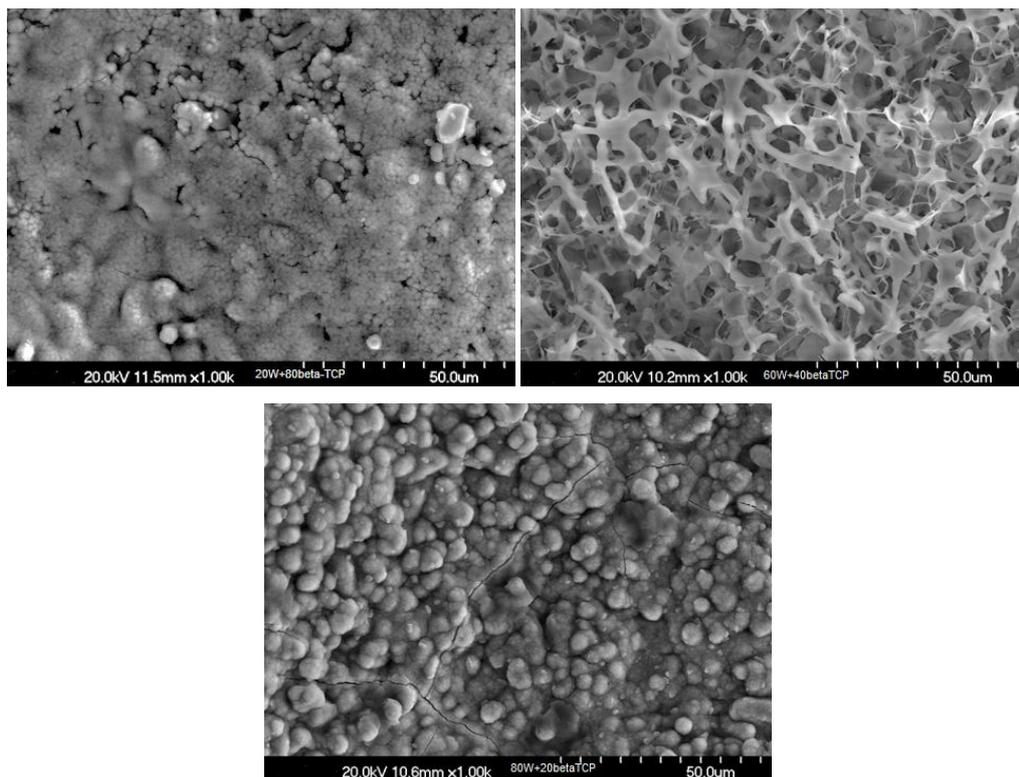


Figura 67 Micrografia da superfície dos *scaffolds* no tempo de 14 dias de imersão (Própria 2017).

5.1.6.5 Deposição Celular

As micrografias das Figuras 68, 69 e 70 representam a deposição celular sobre a superfície dos *scaffolds* e sobre a superfície dos *scaffolds* com princípio ativo.

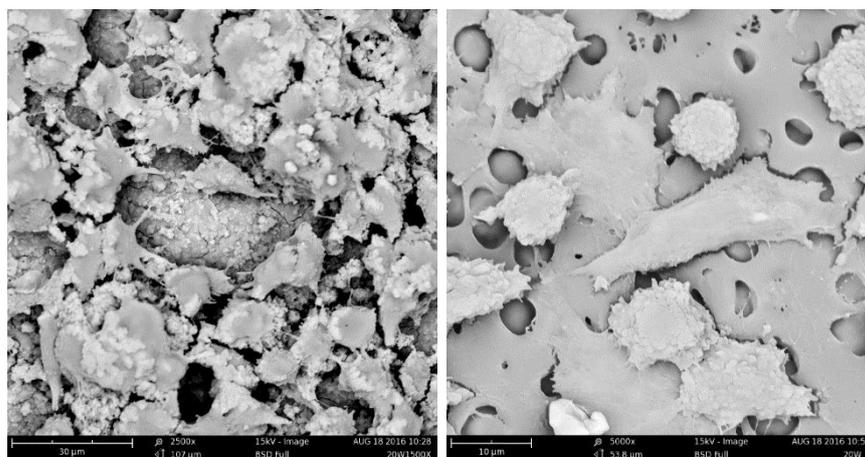


Figura 68 Micrografias de adesão celular em *scaffold* e em *scaffold* com princípios ativo composição 20W+80 β -TCP (Própria 2017).

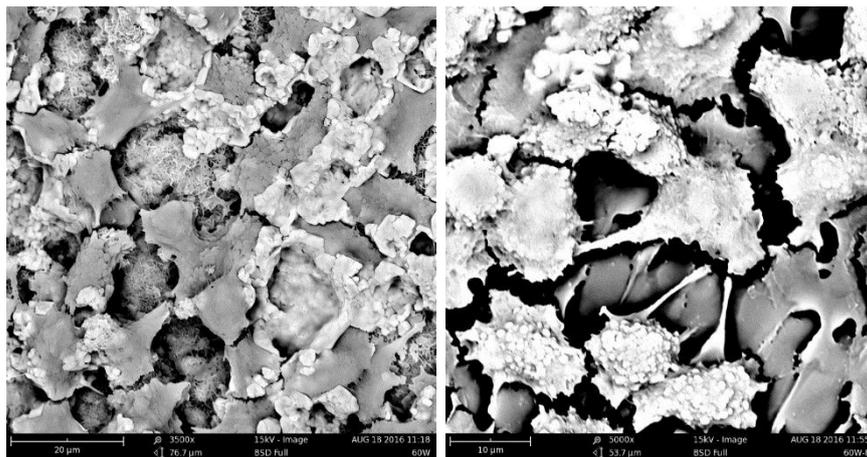


Figura 69 Micrografias de adesão celular em *scaffold* e em *scaffold* com princípios ativo composição 60W+40 β -TCP (Própria 2017).

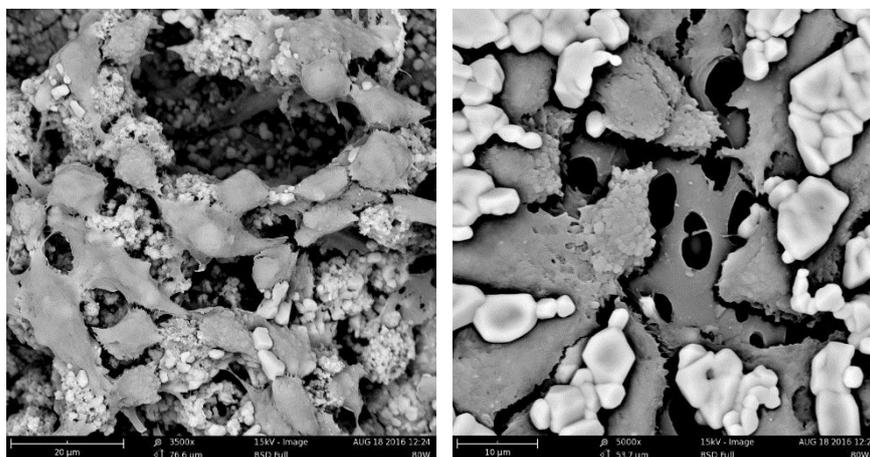


Figura 70 Micrografias de adesão celular em *scaffold* e em *scaffold* com princípios ativo composição 20W+80 β -TCP (Própria 2017).

CAPÍTULO 6

Discussões

6 DISCUSSÕES

As porcentagens de óxidos presentes nas amostras de Wollastonita e de Hidroxiapatita pela técnica FRX, apresentaram similaridade com a composição informada em laudo (vide anexo) emitido pelas empresas comerciantes de ambos materiais.

Calculando a razão Ca/Si da Wollastonita, encontramos valores similares ao informado em laudo pela empresa, onde 0,94 é a razão determinada por ensaio FRX e 0,90 a informada por laudo. A razão calculada de Ca/P para a Hidroxiapatita, foi de 1,65 caracterizando portanto esse material como HA.

Ainda sobre a técnica de FRX, foi encontrada cerca de 0,46% de óxido de magnésio na amostra de Hidroxiapatita. Relatos da literatura, descreve esta quantidade de MgO como material dopante. Sua presença é decorrente do processamento utilizado na produção de HA.

Uma variedade de metais podem substituir íons de Ca^{2+} alterando estrutura e propriedades em um material. São os chamados íons bivalentes no qual se encontra o íon magnésio (Mg^{2+}). Este íon é um dos íons bivalentes mais importantes associados com apatitas biológicas. É conhecido por seu efeito significativo em processos de mineralização. Sua incorporação à estrutura da HA está associada a uma gradual transformação em β -TCP. Isso é explicado pelo fato do raio iônico do Mg^{2+} ser menor do que o raio iônico do íon Ca^{2+} ; essa substituição do íon maior pelo íon menor favorece a distorção da rede e conseqüentemente a conversão térmica em β -TCP. (Gouveia, 2007; Carrodeguas *et al.*, 2008).

A porcentagem de magnésio encontrada, não prejudicou a proposta da pesquisa, ou seja, a conformação dos *scaffolds*, no entanto, os resultados desta pesquisa não foram suficientes para comprovar que este componente tenha favorecido ao processo. O que sabe-se é que, a literatura aporta várias investigações que indicam que, quando a estrutura de HA possui íons cálcio substituídos pelos íons de magnésio, o biomaterial tem sua reatividade acelerada em contato com os fluidos fisiológicos.

De fato, a importância da detecção desta porcentagem de Mg teve relevância nos cálculos estequiométricos utilizados na síntese do β -TCP.

As vibrações encontradas nas amostras de Wollastonita, Hidroxiapatita e β -TCP pela técnica de FTIR, correspondem aos principais grupos funcionais presentes nessas amostras que são as bandas dos elementos Si-O para Wollastonita e PO_4^{3-} para os fosfatos anteriormente observados no resultado de FRX. Além disso, na Wollastonita, a presença de banda de alongamento assimétrico CO_2^{3-} próximo a 1500cm^{-1} corresponde à carbonatação sofrida, justificando o acréscimo de matéria encontrada durante a perda por calcinação corroborando com Ptacek *et al.*, (2010). No FTIR do β -TCP observamos ausência da banda de OH em torno de 3572cm^{-1} que serve de indicativo de que a transformação da HA para a fase β -TCP foi completa e que o processo de sinterização e ajuste do volume de ácido ortofosfórico foi efetivo, ambos corroborando com o trabalho de Neto *et al.*, (2015).

A análise térmica da wollastonita apresentou perda total ao logo da temperatura analisada ($25^\circ\text{-}1000^\circ\text{C}$) de 0,6%. A wollastonita sofre transformação de baixo para alto peso molecular a 1125°C portanto, qualquer evento térmico neste intervalo é considerado como impureza. O evento térmico mais expressiva ocorre por volta de 710°C confirmado em pico exotérmico pela DTA, e corresponde a decomposição de calcita CaCO_3 uma vez que quase todos os carbonatos da superfície se carbonatam em presença com o a atmosfera como já observado na caracterização anterior. Próximo a 900° o peso torna-se constante corroborando com Ptacek *et al.*, (2010).

A TG da Hidroxiapatita apresentou curva característica de processo de decomposição de matéria orgânica e impurezas, na qual gerou-se uma perda de massa total de 4,5%. Este perfil obtido está de acordo com o descrito em literatura A perda de massa ocorrida na análise por TG condiz com os já observado nos ensaio de perda por calcinação. Sua ATD revela um pico endotérmico próximo a 100°C possivelmente relativo a perda de moléculas de água como também foi observado no trabalho de Lacerda (2005).

Em relação à TG do β -TCP, observamos uma pequena perda de massa relacionada possivelmente a desidroxilação do material. A curva DTA apresenta os picos relacionados a novos eventos térmicos, provenientes do aquecimento do TCP constituindo novas fases no material onde, um pico endotérmico em 1300°C possivelmente corresponde à mudança de fase de β -TCP para α -TCP e outro pico

endotérmico em aproximadamente 1500°C relativo a mudança para fase α '-TCP. Nota-se também que não houve nenhum evento exotérmico anterior aos citados, que indica-se resquícios residual de fase HA o que corrobora com o ensaio de FTIR e está de acordo com o trabalho de Ramalho (2006).

A técnica de DRX para a Wollastonita e Hidroxiapatita foram identificadas as fases informadas pelas empresas. O perfil cristalográfico do β -TCP identificou esta fase e não apresentou picos correspondente à fase HA apontando transição completa de fase, reafirmando o FTIR e DTA. O DRX dos *scaffolds* apresentou nas três composições, os picos correspondentes as fases pretendidas nesse estudo que são Wollastonita de alta temperatura e β -TCP.

Através do ensaio de tamanho de partícula podemos definir que para obter *scaffolds* pelo método da réplica, foi preparada uma suspensão cerâmica tendo em vista que ambas as partículas de Wollastonita e as partículas de β -TCP apresentaram tamanho superior a 100nm. O processo de moagem ao qual as matéria primas foram submetidas, promoveu uma maior homogeneidade das partículas, notado pelo estreitamento da base do gráfico de distribuição.

A Wollastonita e o β -TCP apresentam ponto isoelétrico em pH próximo a 2,0 o que propicia a instabilidade da suspensão e a floculação. No caso de Wollastonita, a maior estabilidade para a suspensão foi no seu pH natural e para o β -TCP acima de pH 11. Escolheu-se formular as suspensões cerâmicas com estes materiais em seus pH naturais tendo em vista que em pH extremos ocorre grande influência iônica.

A concentração de dispersante elegida foi 0,3% (m/m) em relação à massa de pó utilizada e foi a que melhor contribuiu para a estabilidade da suspensão, aumentando a distância entre o potencial isoelétrico e o potencial elétrico dos materiais

A Fração volumétrica que melhor viscosidade aparente resultou foi a de 30% (caráter pseudoplástico), que se comprovou na curva de fluxo onde as concentrações 25% apresentou caráter quase newtoniano, a amostra de 33% apresentou caráter quase que dilatante e a de 36% apresenta alta viscosidade e alto efeito tixotrópico.

As curvas de fluxo das suspensões 20%W+80% β -TCP, 60%W+40% β -TCP e 80%W+20% β -TCP apresentaram caráter pseudoplásticos, ideal para impregnação pelo método da réplica. A variação na viscosidade destas suspensões que foram

ajustadas por ultrassom e presença de ligante aproximaram sobre tudo as composições 60%W+40% β -TCP e 80%W+20% β -TCP.

A utilização do ultrassom desaglomerou as partículas por meio de fornecimento de energia vibracional. O tempo de ultrassom escolhido como ideal foi aquele em que a tensão de cisalhamento decaiu indicando o rompimento de possíveis aglomerados unidos por forças atrativas, que ao serem submetidos a um tempo adequado de homogeneização são destruídos

A utilização do ligante foi importante para prover resistência à verde do *scaffold* e diminuir a tensão superficial e conseqüentemente melhorar a molhabilidade na esponja sem modificar o perfil reológico da suspensão.

Observa-se que, como o aumento da quantidade de Wollastonita esta provoca uma pequena distorção no processo observado por dilatométrica na temperatura próxima a 1230°C esse fenômeno está possivelmente relacionado a presença de fase vítrea por parte destes materiais a estas temperaturas. As dilatométricas para as três composições mostraram que a partir de 1300°C a velocidade de sinterização aumenta muito, o que traz o efeito encontrado a 1230°C, indicando a presença de fase vítrea isso foi importante na definição da temperatura máxima definida no processo de queima.

A resistência à compressão alcançada, é suficiente para a manipulação desses *scaffolds* sem que haja riscos de ruptura. E uma vez que foram desenvolvidos para ocupar temporariamente uma região de pouco ou nenhum esforço mecânico, esses valores obtidos são suficientes em um primeiro momento

A liberação dos princípios ativos, apresentou perfil de curva correspondente a um mecanismo de liberação controlado por uma etapa de difusão, com liberação do princípio ativo ao longo do tempo, com isso os *scaffolds* demonstram efetividade no mecanismo proposto como atuante na entrega de princípio ativo *in situ*.

As micrografias apresentadas para as amostras de Wollastonita, Hidroxiapatita e β -TC confirmam os tamanhos de partículas apresentadas no ensaio de tamanho e distribuição de partículas. Além disto mostrou o aspecto morfológicos destas partículas. Para os *scaffolds* mostrou a microporosidade crescente no aumento da concentração da Wollastonita o que podemos explicar pela própria geometria EM formato de agulha, que diminui o empacotamento do material, visto na micrografia do pó de Wollastonita.

O recobrimento dos *scaffolds* pela solução contendo os princípios ativos não comprometendo a sua característica porosa e a segunda impregnação por se tratar de apenas uma imersão rápida dos *scaffolds* na solução contendo o princípio ativo dexametasona, deixa a porção dos poros mais visível, o que também é o desejado, uma vez que esta camada é mais delgada por necessitar de uma liberação mais rápida em comparação com a vancomicina.

A concentração de cálcio aumentou com o tempo de imersão em solução de TRIS uma vez que está sendo liberado parte pelo β -TC e parte pela Wollastonita, ao passo que a concentração de fósforo passa a ser imperceptível no meio já saturado de Ca^{2+} . Este resultado serviu como indicativo para a definição da formação da capa de apatita e principalmente na definição da degradação do material. Quando maior esta liberação de cálcio para o meio, maior a degradação deste *scaffold*.

A bioatividade foi presente desde os primeiros dias nas três composições. Ao longo do período de 14 dias foi possível notar etapas de precipitação, nucleação e deposição de fosfato de cálcio na superfície desses *scaffolds*, além disto, a espessura de camada mais evidente no *scaffold* 80%W+20% β -TCP evidencia sobreposição de camadas, indicando alta bioatividade desta composição.

Por fim a deposição celular mostra etapas desde as primeiras deposições celulares, como processos de espalhamento e interdigitações celular, algumas amostras recobertas mostraram invaginações celulares confirmando preferência celular pela superfície do *scaffold*, confirmando o caráter osteocondutor da Wollastonita.

CAPÍTULO 7

Conclusões/Sugestões

7 CONCLUSÕES

- ✓ O método da réplica da esponja polimérica adotado para o processamento dos mostrou-se efetivo e reprodutível.
- ✓ Os *scaffolds* mostraram resultado promissor como dispositivo para liberação de princípios ativos.
- ✓ Os *scaffolds* das três composições são degradáveis, sendo a composição de 80% wollastonita + 20% β -TCP apresentou maior velocidade de degradação.
- ✓ As três composições apresentaram potencial para regeneração óssea, pois em todas verificou-se presença de camada apatita em sua superfície.
- ✓ Nos ensaios de deposição celular comprovou-se a aderência das células em todas as composições sobretudo naquela com maior quantidade de Wollastonita, comprovando seu caráter osteocondutor.

7.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Buscar alternativas para melhorar a resistência mecânica dos *scaffolds*.

Buscar um modelo *in vitro* que avalie a capacidade osteoindutora da Dexametasona em função do tempo e da concentração definidas nesta tese.

Avaliar a efetividade da concentração e da liberação do fármaco Vancomicina em contato com células de estafilococos aureus.

Avaliar as composições de *scaffolds* formuladas nesta tese em ensaios *in vivo*

REFERÊNCIAS

AARESTRUP, B.J. **Histologia Essencial** Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 2012. ISBN 9788527720588.

ABDULLAH, M.A. *et al.* Cell engineering and molecular pharming for biopharmaceuticals. **Open Med. Chem. J.**, v.14, n.2, p.49-61, 2008.

ABUKAWA, H. The engineering of craniofacial tissues in the laboratory: A review of scaffolds and implant coatings. **Dental Clinics of North American**, Philadelphia, v.50, n.2, p.205-216, 2006.

AHRENS, C. H. *et al.* **Prototipagem Rápida:Tecnologia e aplicações**. Blucher, São Paulo, 2007.

AHSAN, T.; NEREM, R.M. Bioengineered tissues: the science, the technology, and the industry. **Orthod. Craniofacial Res.**, v.8, p.134- 140, 2005.

AL-AQL, Z. S.; ALAGL, A. S.; GRAVES, D. T.; GERSTENFELD, L. C.; EINHORN, T. A. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction. **Journal of Dental Research**, Washington, v.87, n.2, p.107-118, 2008.

ANDERSON, D. G.; BURDICK, J. A.; LANGER, R. Smart biomaterials. **Science**, Washington, v.305, n.5692, p.1923-1924, 2004.

ANDIA, D. C.; CERRI, P. S.; SPOLIDORIO, L. C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, v.35, n.2, p.191-198, 2006.

ANDRADE, A.D. *et al.* Biologia óssea: uma revisão da literatura. **Rev Implant News**, São Paulo, v.4, n.6, p.659-662, 2007.

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, (Guildford) v.21, n.7, p.667-681, apr. 2000.

ATALA, A. Engineering organs. **Curr. Opin. Biotechnol**, v.20, n.5, p.575-592, 2009.

ATMANI, H.; CHAPPARD, D.; BASLE, M. F. Proliferation and differentiation of osteoblasts and adipocytes in rat bone marrow stromal cell cultures: effects of dexamethasone and calcitriol. **Journal of cellular biochemistry**, v. 89, n. 2, p. 364–72, 2003.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, A. C. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 15, nº 1, p. 13-21, 2005.

BARNES, H.A. A handbook of elementary rheology. **The University of Wales Aberystwyth**, Reino Unido, 2000.

BARSOUM, M.W. **Fundamentals of ceramics**. New York: McGraw-Hill International, cap 10 p 331-390, 1997.

BELOTI, M. M.; BELLESINI, L. S.; ROSA, A. L. Purmorphamine enhances osteogenic activity of human osteoblasts derived from bone marrow mesenchymal cells. **Cell biology international**, v. 29, n. 7, p. 537–41. 2005.

BERNE, R. M. & LEVY, M. N. **Fisiologia**. 4. ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.

BIANCO, P.; ROBEY, P.G. Stem cells in tissue engineering. **Nature**, v.414, n.6859, p.118-121, 2001.

BLACKWOOD, K.; BOCK, N.; DARGAVILLE, Y.; WOODRUFF, M. A. Scaffolds for growth factor delivery as applied to bone tissue engineering . **Int J Polym Sci**. 2012.

BLOM, A. Which scaffold for which application? **Curr. Orthop**, v.21, p.280-287, 2007.

BOROJEVIC, R. Terapias Celulares e Bioengenharia. **Gaz. Med. Bahia**, v.78, supl.1, p.42-46, 2008.

BROWN, L. et al. Mechanism of osteoinduction by pseudowollastonite (psW) ceramic7th World Biomaterials Congress Sydney, AustraliaC ausal Productions for **Australian Society for Biomaterials**, 2004.

BRUGGE, P. J. T. E. R.; JANSEN, J. A. In Vitro Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Cell Subculture with and without Dexamethasone. **Tissue Engineering**, v. 8, n. 2, p. 321–331, 2002.

BUCKLEY, C. T.; O'KELLY, K. U. Regular scaffold fabrication techniques for investigations in tissue engineering (P. J. Prendergast, P. E. McHugh, Eds.)**Topics in Bio-Mechanical Engineering**. Anais, Dublin: TCBE & NCBES, 2004.

BURG, K. J.; PORTER, S.; KELLAM, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2347–59, 2000.

CABAÑAS, M.; PEÑA, J.; ROMÁN, J.; VALLET-REGÍ, M. Tailoring vancomycin release from x-TCP/agarose scaffolds. **Eur. J. Pharm. Sci.** 37 249–256, 2009.

CARVALHO VILA, M. M. D.; OLIVEIRA, R. M.; GONÇALVES, M. M. Analytical methods for vancomycin determination in biological fluids and in pharmaceuticals. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 395–399, 2007.

CARRODEGUAS, R.G.; DE AZA, A.H.; TURRILLAS, X.; PENA, P.; DE AZA, S. New Approach to the b-a Polymorphic Transformation in Magnesium-Substituted

Tricalcium Phosphate and its Practical Implications. *J. Am. Ceram. Soc.*, 91 [4] 1281–1286, 2008.

CHAWLA, K. Biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine: Treatment of musculoskeletal injury and disease. **Materials Science and Engineering: A**, v. 557, p. 45–53, 2012.

CHOI, S.; ZHANG, Y.; XIA, Y. Three-dimensional Scaffolds for Tissue Engineering: The Importance of Uniformity in Pore Size and Structure *Langmuir*, vol. 21, p. 19001-19006, 2010.

COLORADO *et al.* Wollastonite based-Chemically Bonded Phosphate Ceramics with lead oxide contents under gamma irradiation **Journal of Nuclear Materials** 425 197–204 2012.

COSTA, R.C.C.; MIGUEL, F.B.; ROSA, F.P. Estratégias de bioengenharia tecidual na reconstrução óssea. **R. Ci. Med. Biol.**, v.4, n.1, p.70-76, 2005.

CRAIGHEAD, H.G.; JAMES, C.D.; TURNER, A.M.P. Chemical and topographical patterning for directed cell attachment. **Current Opinion in Solid State and Materials Science** v.5, issue 2-3 p.177-184, 2001.

DE AZA, P. N. *et al.*, Bioeutectic: a new ceramic material for human bone replacement. **Biomaterials**, p 1285-1291, 1997.

DE AZA, P. N. *et al.*, Bioactivity of pseudowollastonite in human saliva. **Journal of Dentistry**, v. 27, n. 2, p. 107–113, 1999.

DE AZA, P. N. *et al.*, Morphological and structural study of pseudowollastonite implants in bone. **Journal of Microscopy-Oxford**, v. 197, p. 60–67, 2000.

DE AZA, P. N. *et al.*, Transmission electron microscopy of the interface between bone and pseudowollastonite implant. **Journal of Microscopy-Oxford**, v. 201, p. 33–43, 2001.

DE AZA, P. N. *et al.*, Devitrification studies of wollastonite-tricalcium phosphate eutectic glass. *Acta Biomater.* 2009.04.026. Epub 2009.

DEE, K. C.; PULEO, D. A.; BIZIOS, R.; An introduction to tissue-biomaterial interactions. **John Wiley & Sons**: New Jersey, 2002.

DIMITRIOU, P.; JONES E ; MCGONAGLE D.; GIANNOUDIS, P.V. Bone regeneration: current concepts and future direction, **BMC Medicina**, vol 9, article 66, 2011.

DMHOU, P.; JONES E ; MCGONAGLE D.; GIANNOUDIS, P.V. Bone regeneration: current concepts and future direction, **BMC Medicina**, vol 9, article 66, 2011.

DONG, J.; KOJIMA, H.; UEMURA, T.; KIKUCHI, M.; TATEISHI, T.; TANAKA, J. In vivo evaluation of a novel porous hydroxyapatite to sustain osteogenesis of

transplanted bone marrow-derived osteoblastic cells . **J. Biomed. Mater. Res.** 57 208–216, 2001.

DRURY, J; MOONEY, D. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications **Biomaterials** 24 4337–4351, 2003.

DUARTE, A.; MANO, J.; REIS, R. Dexamethasone-loaded scaffolds prepared by supercritical-assisted phase inversion. **Acta Biomater** 5 2054–2062, 2009.

DUFRANE, D. *et al.* Indirect cytotoxicity evaluation of pseudowollastonite. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 14, n. 1, p. 33–38, 2003.

EKENSEAIR, A.; KASPER, F.; MIKOS, A. Perspectives on the interface of drug delivery and tissue engineering **Adv Drug Deliv Rev** 65 89-92, 2013

EL-GHANNAM, A. Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering. **Expert Rev. Med. Devices**, v.2, n.1, p.87-101, 2005.

FERNANDES, M. H.; COSTA, M. A.; CARVALHO, G. S. In vitro osteogenesis by human alveolar bone cells in the presence of dexamethasone. **Pharmacol. Res** 31(suppl), 8, 1995.

FAWATT, D.W.; JENSH, R.P.; **Bloom & Fawcett's Concise Histologys**, 2º edição London, Arnold Publishers, 2002.

FERREIRA, E. *et al.* Reologia de suspensões minerais: uma revisão. **Rem: revista escola de minas**, v. 58, n. 1, p. 83-87, 2005.

FERRO. E. S. Biotecnologia translacional: hemopressina e outros peptídeos intracelulares. **Estudos Avançados** vol.24 n.70 São Paulo, 2010.

FRÖHLICH, M. *et al.* Tissue Engineered Bone Grafts: Biological Requirements, Tissue Culture and Clinical Relevance. **Curr. Stem Cell Res. Ther.**, v.3, n.4, p.254-264, 2008.

FROST, H.M. From Wolff's law to the Utah paradigm: Insights about bone physiology and its clinical applications, *Anat Rec.*2001; 262(4):398-419.

FURTH, M.E.; ATALA, A.; VAN DYKE, M.E. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. **Biomaterials**, v.28, p.5068-5073, 2007.

GARTNER, L. P; HIATT, J.L. **Tratado de Histologia em cores**, 3º edição, Rio de Janeiro, Guanabara, 2007. ISBN 9788535223477.

GIBSON, I.R.; AKAO, M.; BEST, S.M.; BONFIELD, W. Phase Transformation of tricalcium phosphates using high temperature x-ray diffraction, **Bioceramics**, vol.9 173-176, 1996.

GONDA, Y. K.; OKUDA T.; et al., Osteoconductivity of hydrothermally synthesized beta-tricalcium phosphate composed of rod-shaped particles under mechanical unloading. Key **Engineering Materials**. 396-398 p.253–256, 2009.

GOUVEIA, D.S; RIBEIRO, C; BRESSIANI, A.H.A.; BRESSIANI, J.C. Sinterização de Pós de Hidroxapatita Comercial e Obtido Pelo Método de Neutralização. In: **CBECIMat**, 2004, Porto Alegre, 2004.

GOUVEIA, D.S.; COUTINHO, A.C.S.; GUIMARÃES, L.M.F.; BRESSIANI, A.H.A.; BRESSIANI, J.C. Utilização do Método de Rietveld na caracterização de Ha com adição do Mg. In: 51° Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2007, Salvador - BA. Anais do 51° Congresso Brasileiro de Cerâmica - Ref 13-10. São Paulo: **Associação Brasileira de Cerâmica**. p. 1-10, 2007.

GUMBINER, B.M. Regulation of cadherin adhesive activity **J Cell Biol**. 148(3): 399–404, 2000.

GUTIERRES, M.; LOPES, M. A. HUSSAIN, N. S.; CABRAL, A. T.; ALMEIDA, L.; SANTOS, J. D. Substitutos ósseos: Conceitos gerais e estado atual, **Arquivos de Medicina**, Rio de Janeiro, v.19, n.4, p.153- 162, 2006.

GUTIERREZ, C.A.; SANCHEZ-HERENCIA, A.J. MORENO, R. **¿Plástico o pseudoplástico? Métodos de determinação y análisis del punto de fluidez de suspensiones cerámicas**. Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidr., 39 p 105-117, 2000.

HAKE, M.E. ; OH, J.K. ; KIM, J.W. *et al.*, Difficulties and challenges to diagnose and treat post-traumatic long bone osteomyelitis, **Eur J Orthop Surg Traumatol**, 2015.

HENCH, L.L.; POLAK, J.M. **Third-generation biomedical materials**. 295 (5557):1014-7, 2002.

HILL, D. **Desing engineering of biomaterials for medical devices**. New York: Wiley, 1998.

HOLLISTER, S. Porous scaffold design for tissue engineering **Nat. Mater**. 4,518–524, 2005

HORN, R.G. Particle interaction in suspensions. P 58-101 en: Ceramic processing, Terpstra, R.A.; PEX, P.P.A.C.; A.H. DE VRIES. Champmam and Hall, London, Reino Unido, 1995.

HUM, J.; BOCCACCINI, A. Bioactive glasses as carriers for bioactive molecules and therapeutic drugs: a review **J Mater Sci Mater Med**. 23 2317–2333, 2012.

HUTMACHER, D. W.; SCHANTZ, J. T.; LAM, C. X.; TAN. K. C.; LIM. T. C. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. **Journal of tissue 28 engineering and regenerative medicine**, Chinchester, v.1, n.4, p.245- 260, 2007.

ISO 10993-1:2009 Biological evaluation of medical devices -- Part 1: Evaluation and testing within a risk management process.

JANG, J.H. *et al.* Surface adsorption of DNA to tissue engineering scaffolds for efficient gene delivery. **J. Biomed. Mater Res. A**, v.77, n.1, p.50-58, 2006.

JUNQUEIRA, L.C. ; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: texto e atlas**, 12º edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2013.

KAIGLER, D.; PAGNI, G.; PARK, C.H. ; BRAUM T.M. ; *et al.* Stem cell therapy for cranofacial bone regeneration: a randomized, controlled feasibility trial **Cell Transplant**, 2013, 767-777.

KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D., Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, **Biomaterials** 26 5474–5491, 2005.

KIERSZENBAUM A.L.; TRES, L.L., **Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia**, 3º edição, Rio de Janeiro, Elsevier, 2012.

KRETLOW, J.; MIKOS, A. From material to tissue: biomaterial development, scaffold fabrication, and tissue engineering. **AIChE J.** 54 3048–3067, 2008.

KUNDU, B.; SOUNDRAPANDIAN, C.; NANDI, S. K.; MUKHERJEE, P.; DANDAPAT, N. *et al.* Development of new localized drug delivery system based on ceftriaxone-sulbactam composite drug impregnated porous hydroxyapatite: a systematic approach for *in vitro* and *in vivo* animal trial **Pharm. Res.** 27 1659–1676, 2010.

LACERDA, V.A.M.; MARTINS, C.F. Capacidade das células-tronco em regenerar o epitélio da pele. **Univ. Ci. Saúde**, v.5, n.1/2, p.135-154, 2007.

LAZZARINI, L.; MADER, J.T.; CALHOUN J H. **Osteomyelitis in long bones**. J Bone Joint Surg Am. 2004.

LIPSKY, B.A.; BERENDT, A.R. **Osteomyelitis**. ACP Medicine 1-20, 2010.

LIU, C.; XIA, Z.; CZERNUSZKA, J. T. Design and Development of Three Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 85, n. 7, p. 1051–1064, jan. 2007.

LOH, N.J.; SIMAO, L.; FALLER, C.A.; DE NONI, A.Jr.; MONTEDO, O.R.K. A review of two-step sintering for ceramics. **Ceramics Internation** vol.42 issue 11, 15 p.12556-12572, 2016.

LOPES, S.; ROSSO, S.; **Bio**: volume único, 3º edição, Saraiva, 2013, 677-696.

MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia: Fundamentos**. Biblioteca Max Feffer. Rio de Janeiro, v. 8, p. 5, 2009.

MISTRY, A.S.; MIKOS, A.G. Tissue Engineering Strategies for Bone Regeneration. In regenerative medicine II: clinical and preclinical applications. 1 ed. 1-22. Berlin: Springer, 2005.

MONTANARO, L.; JORAND, Y.; FANTOZZI, G.; NEGRO, A. Ceramic foams by powder processing. **J. Eur. Ceram. Soc.** V.18, p.1339-50, 1998.

MORENO, R. **Reología de suspensiones cerâmicas**. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, 2005.

MORRISON, F.A. Understanding rheology. **Oxford University Press**, Oxford, Reino Unido, 2001.

NIJWEIDE PJ, Burger EH, Klein-Nulend J. The osteocyte. In Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. Principles of Bone Biology. London, **Academic Press**, 93–107, 2002.

NAKAMURA, T.; YAMAMURO, T.; SHOICHIRO, H. A new glass-ceramic for bone replacement: Evaluation of its bonding to bone tissue **Journal of Biomedical Materials Research**, Vol. 19, 685-698. John Wiley & Sons, Inc. 1985.

NUSSBAUM R.L. ; MCINNES R. R. ; WILLARD, H.F., **Thompson & Thompson Genética Médica**, 7º edição, Rio de Janeiro, Elsevier, 2008.

O'DRISCOLL, M. Wollastonite. Ceramics remains top consumer. **Industrial Minerals**, n. Special Issue, p. 77–83, 1993.

OH, S.; OH, NANSIK.; APPLEFORD, M.; ONG, J. Bioceramics for tissue engineering applications – A review. **American Journal of Biochemistry & Biotechnology**, New York, v.2, n.2, p.49-56, 2006.

OLIVEIRA, L. S. A.; OLIVEIRA, C. S.; MACHADO, A. P. L.; ROSA, F. P. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – Métodos de análise e perspectivas futuras. **Revista de ciências médicas e biológicas**, Rio Grande do Sul, v.9, n.1, p.37-44, 2010.

ORÉFICE, R. L.; Pereira, M. M.; Mansur, H. S.; **Biomateriais: fundamentos e aplicações**, Cultura Médica: Rio de Janeiro, 2006.

ORTEGA, H. Escoamento de fluidos: propriedades reológicas, fluidos newtonianos e não-newtonianos. Unicamp. São Paulo, 2012. Disponível em: www.unicamp.br/fea/ortega/aula/aula04_reologia.ppt

OVALLE, N.KK.; NAHIRNEY, P.C.; NETTER, F.H.; **Netter Bases da Histologia**, 2º edição, Rio de Janeiro, Elsevier, ISBN 9788535273106. 2014.

PACE, J. L.; YANG, G. Glycopeptides: Update on an old successful antibiotic class. **Biochemical pharmacology**, v. 71, n. 7, p. 968–80, 2006.

PADMANABLAN, S.K *et al.*, Wollastonite/hydroxyapatite scaffolds with improved mechanical, bioactive and biodegradable properties for bone tissue engineering. **Ceramics Internaonal**. Volume 39, issue-1. P-619-627, 2013.

PARK, J. B.; Bronzino, J. D **Biomaterials: Principles and Applications**; eds.; CRC Press: Boca Raton, cap. 1, 2002.

PAULA G.C. **Preparação e Caracterização de Scaffolds de beta; fosfato tricálcico reforçados com whiskers de silicato de cálcio**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), 2013.

PERTILE, R.A.N. **Estudo in vitro da interação da linhagem de fibroblastos L929 com membrana de celulose bacteriana para aplicações em engenharia de tecidos**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2007.

PHAM, D. T.; GAULT, R. S. A comparison of rapid prototyping technologies. **International Journal of Machine Tools and Manufacture**, No. 38, p. 1257-1287, 1998.

PODAROPOULOS L., VEIS A.A., PAPADIMITRIOU S., ALEXANDRIDIS C., KALYVAS D. Bone regeneration using beta-tricalcium phosphate in a calcium sulfate matrix. **J Oral Implantol**. 35(1):28-36, 2009.

PRADIP, R.S.; PREMACHANDRAN ;MALGHAN, S.G. Electrokinetic Behaviour and Dispersion Characteristic of Ceramic Powders with Cationic and Anionic Polyelectrolytes, **Bull. Mater. Sci.**, 17 [6] 911-920,1994.

PRICE, J.; TENCER, A.; ARM, D.; BOHACH, G. Controlled release of antibiotics from coated orthopaedic implants. **J. Biomed. Mater. Res.** 30 281–286, 1996.

PTACEK, P.; NOSKOVA,M; BRANDSTETR,J. *et al.*, Dissolving behavior and calcium release from fibrous wollastonite in acetic acid solution, **Thermochimica Acta**, 498 54–60, 2010.

PUGH, R.J. Dispersion and stability of ceramic powders in liquids, p 127-92 en Surface and colloid chemistry in advanced ceramics processing. Pugh, R.J. Bergstrom, Marcel Dekker Inc, Ney York, EEUU, 1994.

RAMALHO, E.G. **Obtenção de Cerâmicas à Base de Tricálcio Fosfatos Utilizando Óxido de Manganês como Aditivo**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2006.

REICHERT, J.C. *et al.* Fabrication of polycaprolactone collagen hydrogel constructs seeded with mesenchymal stem cells for bone regeneration. **Biomed. Mater.**, v.4, n.1, p.1-11, 2009.

ROBBINS & COTRAN, **Bases patológicas das doenças**, 8º edição, Rio de Janeiro, Elsevier, 2010.

ROESLER,, C.R.M., **Adaptação Mecânica do osso em torno de implantes ortopédicos**, Tese de Doutorado - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2006.

ROSE, F.R.; OREFFO, R.O. Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.292, n.1, p.1-7, 2002.

SANDERS J.; MAUFFREY C. Long bone osteomyelitis in adults: fundamental concepts and current techniques, **Orthopedics**, 2014.

SACHLOS, E.; CZERNUSZKA, J. T. Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. **European Cells and Materials**, Glasgow, v. 5, p.29-40, 2003.

SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.P.A.; CARVALHO, A.C.C. Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.37, n.6, p.490-495, 2004.

SANTOS, V.R. **Cimento de fosfato de cálcio , whiskers de CaSiO₃ e gelatina, melhora da resitência mecânica e controle da porosidade**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), 2014.

SCHARAMM, G. **Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos**. São Paulo, Artliber Editora, 2006.

SHACKELFORD, J. F.; **Ciência dos Materiais**, Pearson, Prentice Hall, 6^a ed São Paulo, 2008.

SHAO, H. *et al.*, Printing magnesium-doped wollastonite/ β -TCP bioceramics scaffolds with high strength and adjustable degradation. **Journal of the European Ceramic Society**. Volume 36, issue 6, p. 1495-1503, 2016.

SCHENK, R.K.; BUSER, D.; HARDWICK, W.R.; DAHLIN, C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.9, n.1, p.13-29, Jan. 1994.

SCHWARTZWALDER, K.; SOMERS, A. V. Method of Making Porous Ceramic **Articles United States**, 1963

SHIRATORI, K. et al. Bone formation in beta-tricalcium phosphate-filled bone defects of the rat femur: morphometric analysis and expression of bone related protein mRNA. **Biomedical research** (Tokyo, Japan), v. 26, n. 2, p. 51–9, maio 2005.

SIQUEIRA, R. L.; ZANOTTO, E. D. - BIOSILICATO®: Histórico de uma vitrocerâmica brasileira de elevada bioatividade. **Quim. Nova**, Vol. 34, n°. 07, 1231-1241, 2011.

SMITH, W. F.; Hashemi, J.; **Fundamentos de Engenharia e Ciência dos Materiais**, 5^a ed., McGrawHill: Porto Alegre, 2012.

STEVENS, M.M.; GEORGE, J.H. Exploring and Engineering the Cell Surface Interface. **Science**, Washington, v.310, n.18, p.1135-1138, 2005.

STUDART, A. R.; *et al.* Processing Routes to Macroporous Ceramics: A Review. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 89, n. 6, p. 1771–1789, 2006.

TAKAHASHI, A. Interaction of polymers adsorbed on particles and processing of colloidal dispersion p, 241.250 en Ceramic Transaction vol.22, Ceramic power science, Hirano, S.; Messing, G.L; HAUSNER, H. **The Am. Cera. Soc. Inc.**, Westerville, OH, EEUU, 1991.

TANNER, R.I.; WALTERS, K. **Rheology: an historical perspective**. Elsevier, Amsterdam, Holanda, 1998.

TAYLOR, E. D.; KHAN, Y.; LAURENCIN, C. T. Tissue engineering of bone: a primer for the practicing hand surgeon. **The Journal of hand surgery**, v. 34, n. 1, p. 164–6, jan. 2009.

VALLET-REGI, M.; GONZALÉZ-CELLBET, J. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. **Elsevier Science**: Pub, 31p. 2004.

VELASCO, O E.; PATO, M J.; SEGURA, E.J.J.; Pérez, P. O., MEDEL, S. R. La utilización del beta-fosfato tricálcico como biomaterial en implantología oral. **Avances em Periodoncia**. 19(3), 2007.

VELLOSO, G.R. **Univ. Ci. Saúde**, Brasília, v. 3, n. 2, p. 297-301, jul./dez. 2005.
VILLA, P.E.A.; NUNES, T.R.; GONÇALVES, F.P. *et al.*, Avaliação clínica de pacientes com osteomielite crônica após fratura exposta tratados no Hospital de Urgência de Goiania, Goias, **Rev.bras.ortop** vol 48 n.1 São Paulo Feb 2013.

VOLPATO, N. **Prototipagem rápida: tecnologias e aplicações**. São Paulo: Edgard Blücher, 2007.

ZALAVRAS, C.; PATZAKIS M.J.; HOLTOM, P. Local antibiotic therapy in the treatment of open fractures and osteomyelitis. **Clin Orthop Relat Res** 427 86-93, 2004.

ZAVAGLIA, F. D. C. Síntese, caracterização e processamento de [beta]-Fosfato Tricálcico para manufatura de implantes personalizados. **Universidade Estadual de Campinas**. Campinas, p. 70. 2011.

WHANG, K.; TSAI, D. C.; NAM, E. K.; SPRAGUE, S. M.; PATEL, P. K.; HEALY, K. E. Ectopic bone formation via rhBMP-2 delivery from porous bioabsorbable polymer scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research**, Hoboken, v.42, p.491-499, 1998.

WU, C.; MIRON, R.; SCULEAN, A.; KASKEL, S.; DOERT, T.; SCHULZE, R.; ZHANG, Y. Proliferation, differentiation and gene expression of osteoblasts in boroncontaining associated with dexamethasone deliver from mesoporous bioactive glass scaffolds . **Biomaterials** 32 7068–7078, 2011.

YAMADA M.; SHIOTA M.; YAMASHITA, Y. Histological and histomorphometrical comparative study of the degradation and osteoconductive characteristics of alpha and beta-tricalcium phosphate in block graft. **Journal of biomedical materials research** 82(1):139-148, 2007.

YANG, X.; ZHAO, K.; CHEN, G.Q. Effect of surface treatment on the biocompatibility of microbial polyhydroxyalkanoates. **Biomaterials**, v.23, n.5, p.1391-1397, 2002.

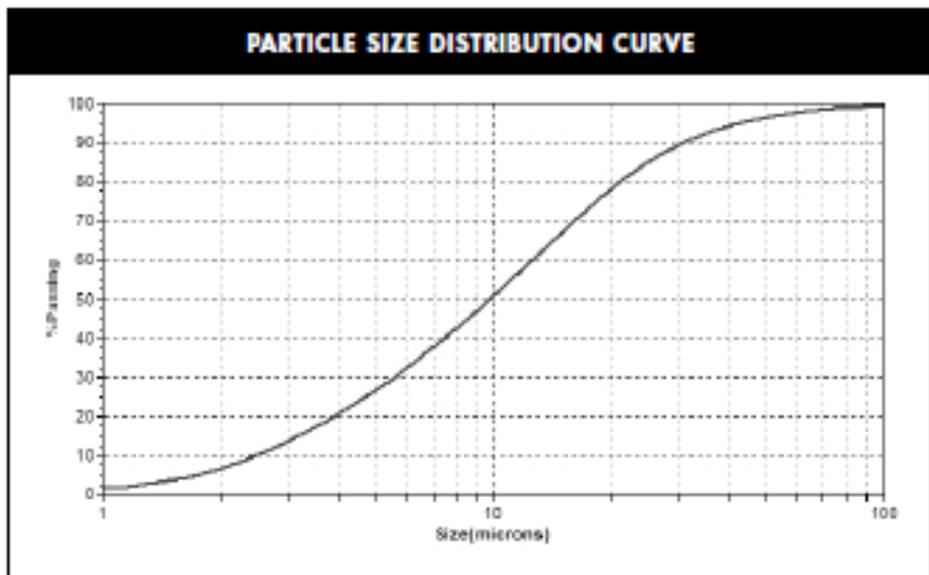
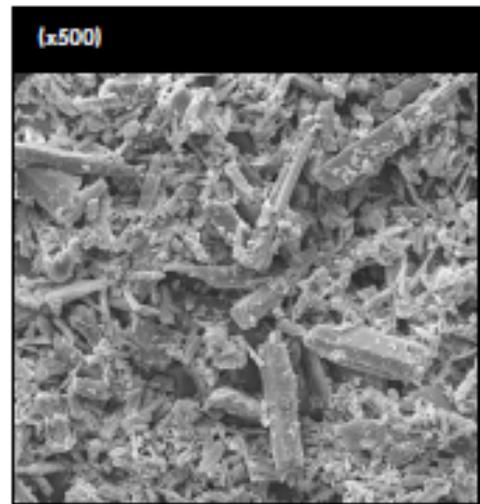
YAZDANI, A. et al. The effect of processing parameters on the hydrothermal synthesis of wollastonite at low pressure. **Journal of Ceramic Processing Research**, v. 14, n. 1, p. 12–16, 2013.

ANEXOS

Anxo 1 – Laudo comercial da Wollastonite

 Brand of the S&B Group	<h1>Wollastonite</h1>
	<h2>NYAD® M400</h2>

TYPICAL PROPERTY	TYPICAL VALUE
G.E. BRIGHTNESS	87
OIL ABSORPTION (lbs./100 lbs.)	24
FINENESS OF GRIND	4
BULK DENSITY	
LOOSE (lbs./cu.ft.)	41
(g/cc)	0.65
TAPPED (lbs./cu.ft.)	62
(g/cc)	1.0
MEDIAN PARTICLE SIZE (µm) (MICROTRAC)	9
SURFACE AREA (m ² /g) (BET)	1.6
MINUS 400 U.S. MESH SCREEN (%)	99
MOISTURE (%)	0.12



nyco

Brand of the S&B Group

- State-of-the-art processing operations
- World-class chemical modification technology
- Industry leader
- World-wide distribution network
- Customer-focused global technical support
- Premium quality wollastonite

Wollastonite is a naturally occurring mineral, is non-hazardous, and is not regulated by shipping agencies. Based upon toxicological studies, there is no evidence of any significant health risks to workers.

NORTH AMERICAN OPERATION

P.O. Box 368, 803 Mountain View Dr.
Willsboro, New York, 12996-0368 USA
Tel.: 518-963-4262
Fax: 518-963-1110

ISO 9001/14001 CERTIFIED

LATIN AMERICAN OPERATION

Hermosillo, Sonora, Mexico
Tel.: 52-662-289-1000
Fax: 52-662-289-1090

ISO 9001/14001 CERTIFIED

For any further information,
please contact:

info@nycominerals.com

This data contains general information and describes typical properties only. It is offered for use by persons qualified to determine for themselves the suitability of our products for particular purposes. No guarantee is made or liability assumed, the application of this data and the products described herein being at the sole risk of the user.

Wollastonite

NYAD® M400

TYPICAL PROPERTIES	VALUE
APPEARANCE	WHITE
MORPHOLOGY	ACICULAR
MOLECULAR WEIGHT	116
SPECIFIC GRAVITY	2.9
REFRACTIVE INDEX	1.63
pH (10% SLURRY)	9.9
WATER SOLUBILITY (g/100cc)	0.0095
DENSITY (lbs./cu.ft.)	181
BULKING VALUE (gal./lb.)	0.0413
MOHS HARDNESS	4.5
COEFFICIENT OF EXPANSION (mm/mm/°C)	6.5×10^{-4}
MELTING POINT (°C) - theoretical	1540
MELTING POINT (°C) - by ASTM D1857	1410

CHEMICAL COMPOSITION: CaSiO ₃	
COMPONENT	TYPICAL VALUE (%)
CaO	44.94
SiO ₂	52.94
Fe ₂ O ₃	0.28
Al ₂ O ₃	0.30
MnO	0.04
MgO	0.75
TiO ₂	0.05
K ₂ O	0.23
Wt. Loss (1000°C)	0.47

www.nycominerals.com

Anexo 1 – Laudo comercial da Hidroxiapatita

DEPARTAMENTO DE CONTROLE DE QUALIDADE		FAB.: 01/10/2014	
BOLETIM TÉCNICO		VAL.: 01/10/2017	
PRODUTO		Origem :	
FOSFATO DE CALCIO TRIBASICO P.A.		-----	
		Lote Fabricante :	

LOTE	FÓRMULA	P.M.	CHAVE AUTENTICIDADE
183034	$Ca_2(OH)(PO_4)_2$	502,32	UN8MP-HJWTS-ELNOJ-BAFDH
TESTES	LIMITES	RESULTADOS	
01 CARACTERÍSTICAS	Pó fino, branco, inodoro	de acordo	
02 AMEBIO	máx. 03ppm	< 03ppm	
03 BÁRIO	Passa o teste	P.T.	
04 CARBONATOS	Passa o teste	P.T.	
05 CHUMBO	máx. 05ppm	< 05ppm	
06 CLORETO	máx. 0,14%	< 0,14%	
07 SOLÚVEIS a/ ÁCIDO	máx. 0,2%	< 0,2%	
08 METAIS PESADOS	máx. 0,003%	< 0,003%	
09 NITRATOS	Passa o teste	P.T.	
10 PERDA POR IGNIÇÃO	máx. 10,0%	5,52%	
11 SUBST. SOLÚVEIS a/ ÁGUA	máx. 0,5%	0,25%	
12 SULFATOS	máx. 0,8%	< 0,8%	
13 TMO	34,0 - 40,0% c/ Ca	37,02%	

DATA EMISSÃO	ANALISTA	RESPONSÁVEL	RESULTADO
08/10/2014	JOSYANE	IZILDA MORELLI	APROVADO

CERTIFICADO EMITIDO VIA SISTEMA INTEGRADO COM APROVAÇÃO ELETRÔNICA

Página 01 de 01

Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda.