

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

DANIEL BEZERRA DE LIMA

**RECONSTRUÇÕES DE TECIDOS ÓSSEOS: BIOMATERIAL INJETÁVEL A BASE
DE FOSFATOS DE CÁLCIO**

Campina Grande – PB

2018

DANIEL BEZERRA DE LIMA

**RECONSTRUÇÕES DE TECIDOS ÓSSEOS: BIOMATERIAL INJETÁVEL A BASE
DE FOSFATOS DE CÁLCIO**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

Agência financiadora: CAPES

Campina Grande – PB

2018

L732r Lima, Daniel Bezerra de.
Reconstruções de tecidos ósseos: biomaterial injetável a base de fosfatos de cálcio / Daniel Bezerra de Lima. – Campina Grande, 2018.
123 f. : il. color.

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

1. Biomateriais 2. Substituto Ósseo Injetável. 3. Regeneração Óssea.
4. Substituto Ósseo Injetável - Fosfatos de Cálcio. I. Fook, Marcus Vinícius Lia. II. Título.

CDU 62:61(043)

VITAE DO CANDIDATO

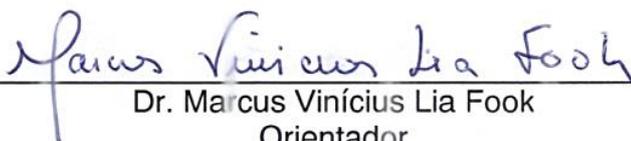
- Cirurgião Dentista pela Universidade Estadual da Paraíba - UEPB (2004)
- Especialista em Implantodontia pelo Centro Universitário Ingá - UNINGÁ (2007)
- Mestre em Bioquímica Aplicada pela Universidade da Madeira - UMa (2012)
- Especialista em Prótese Dentária pela Universidade Cruzeiro do Sul - UNICSUL (2014)

DANIEL BEZERRA DE LIMA

**RECONSTRUÇÕES DE TECIDOS ÓSSEOS: BIOMATERIAL INJETÁVEL À BASE
DE FOSFATOS DE CÁLCIO**

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

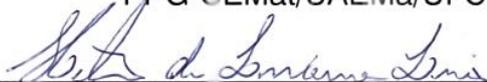
Aprovado em: 07/05/2018



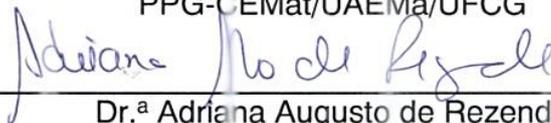
Dr. Marcus Vinícius Lia Fook
Orientador
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG



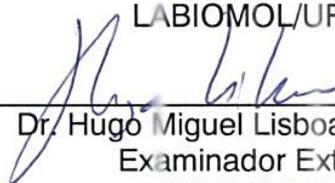
Dr. Romualdo Rodrigues Menezes
Examinador Interno
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG



Dr. Hélio de Lucena Lira
Examinador Interno
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG



Dr.ª Adriana Augusto de Rezende
Examinadora Externa
LABIOMOL/UFRN



Dr. Hugo Miguel Lisboa de Oliveira
Examinador Externo
UAELI/UFCG

*Aos meus padrinhos Almeida e Maria Edite
pelo carinho e amor de toda uma vida.*

“Escrever é um trabalho que se faz por paixão,
com muito sacrifício, com muitas olheiras.”

António Lobo Antunes

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente à minha família, especialmente à minha mãe, Vandira Nazarena, pelo apoio prestado, carinho, amor e sacrifícios a que se submeteu para que eu pudesse progredir na minha formação acadêmica, profissional e como homem.

A minha companheira de vida e de sonhos, Silvia Borges, que com amor me faz sorrir nos momentos difíceis.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook e ao Prof. Dr. Hugo Miguel Lisboa Oliveira pela orientação, amizade, conselhos, cobranças, confiança, e acima de tudo, encorajamento para a conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO, cada um com a sua contribuição diferenciada, agradeço a ajuda, o apoio, as palavras de amizade nos momentos mais difíceis e de desânimo, momentos estes que não foram poucos, durante a minha caminhada até à realização deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, especialmente ao Prof. Dr. Romualdo Rodrigues Menezes, José André da Costa e Lúcia Márcia Quirino por toda a ajuda e assistência prestada.

Ao Prof. Dr. Marcelo Sá e a pesquisadora Monica Adriana Araújo por terem realizado prontamente os estudos biológicos *in vivo* no Centro de Saúde e Tecnologia Rural - CSTR da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG.

Ao Prof. Dr. Miguel Rodríguez do Instituto de Cerámica y Vidrio – ICV (Madrid – Espanha) pelo apoio e caracterizações de amostras utilizadas neste trabalho.

Ao apoio do Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO, Laboratório de Tecnologia dos Materiais – LTM e Laboratório de Engenharia de Alimentos – LEA, localizados na Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, Campina Grande - PB, e ao Hospital Veterinário (HV) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) localizado na UFCG, Patos – PB por terem me acolhido e proporcionado os meios para a realização deste trabalho. Agradeço, ainda, o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Agradeço também aqueles que de forma silenciosa ou explícita, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os substitutos ósseos injetáveis (IBS) constituídos por fosfatos de cálcio (CaPs) são alvo de intensa e constante investigação. A injetabilidade destes compostos permite reduzir a duração das intervenções cirúrgicas, minimizar os efeitos secundários e as dores pós-operatórias para o paciente. Desta forma, há uma recuperação mais rápida do paciente e uma redução dos custos hospitalares. O presente trabalho teve como objetivo a preparação de um IBS composto por uma mistura de duas fases, uma fase sólida na forma de grânulos esféricos de CaPs de hidroxiapatita (HA) e beta fosfato tricálcico (β -TCP), e uma fase líquida na forma de um hidrogel composto por quitosana (CHI) e polietilenoglicol (PEG). Dos resultados obtidos, verificou-se que é possível obter grânulos na forma de esferas de CaPs, através de um atomizador, compostos por 26,9% de HA e 73,1% de β -TCP, de diâmetros médios abaixo de 600 μ m com superfície rugosa e microporosa. O hidrogel produzido pela mistura de CHI/PEG é miscível e a viscosidade da mistura polimérica é dependente da taxa de cisalhamento com um comportamento não newtoniano pseudoplástico. A conformação do IBS originou um biomaterial na forma de um aglomerado de consistência pastosa e sem perda de continuidade, o que favorece a sua aplicabilidade de forma injetável. Testes mecânicos e de injetabilidade revelaram que as forças necessárias para a remoção completa do interior de uma seringa comercial, tanto do hidrogel como do IBS 1-1 250-500 μ m, são constantes e estão numa faixa que não irão atrapalhar a precisão de injeção do produto no interior de um defeito ósseo no momento de seu uso. Os testes biológicos *in vitro* e *in vivo* não apresentaram efeitos citotóxicos e demonstraram resultados promissores no preenchimento de defeitos ósseos criados em tíbias de coelhos, no que diz respeito a osseointegração e neoformação óssea aos 30 e 60 dias de pós-operatório. Conclui-se que a partir dos resultados obtidos, é possível desenvolver um IBS com potencial aplicação na área de ortopedia e odontologia.

Palavras-Chave: Substituto Ósseo Injetável. Biomateriais. Fosfatos de Cálcio. Regeneração Óssea.

ABSTRACT

Injectable bone substitutes (IBS) consisting of calcium phosphates (CaPs) are the subject of intense and constant investigation. Injection of these compounds can reduce the duration of surgical interventions, minimize side effects and postoperative pain for the patient. Therefore, there is a faster recovery of the patient and reduction of hospital costs. The objective of the present work was to prepare an IBS composed of a mixture of two phases, a solid phase in the form of spherical granules of hydroxyapatite (HA) and beta-tricalcium phosphate (β -TCP), and a liquid phase in the form of a hydrogel composed of chitosan (CHI) and polyethylene glycol (PEG). From the obtained results, it was possible to obtain granules in the form of CaPs beads through an atomizer, composed of 26,9% HA and 73,1% β -TCP, with average diameters below 600 μm having rough and microporous surface. The hydrogel produced by CHI/PEG blend is miscible and the viscosity of the polymer blend is shear rate dependent with a non-Newtonian shear thinning behavior. The conformation of the IBS gave rise to a biomaterial in the form of an agglomerate of pasty consistency and without loss of continuity, which favors its applicability in an injectable form. Mechanical and injectability tests have shown that the forces required for the complete removal of the interior of a commercial syringe from both the hydrogel and the IBS 1-1 250-500 μm are constant and are in a range that will not disrupt the injection precision of the product within a bone defect at the time of its use. Biological tests *in vitro* and *in vivo* did not present cytotoxic effects and showed promising results in filling bone defects created in rabbit tibias, regarding osseointegration and bone neof ormation at 30 and 60 postoperative days. It is concluded that from the obtained results, it is possible to develop an IBS with potential application in the area of orthopedics and dentistry.

Keywords: Injectable Bone Substitutes. Biomaterial. Calcium Phosphates. Bone Regeneration.

PUBLICAÇÕES

LIMA, D. B.; ALMEIDA, R. D.; PASQUALI, M.; BORGES, S. P.; FOOK, M. L.; LISBOA, H. M. Physical characterization and modeling of chitosan/peg blends for injectable scaffolds. **Carbohydrate Polymers**, v. 189, p. 238-249, 2018.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação de biomateriais de acordo com sua bioatividade: (a) implante dental bioinerte de alumina, (b) implante dental metálico revestido de hidroxiapatita bioativa $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, (c) superfície de biovidro ativa, e (d) implante bioreabsorvível de fosfato tricálcio $[Ca_3(PO_4)_2]$ (Heness e Ben-Nissan, 2004).	27
Figura 2: Diagrama de fases CaO-P ₂ O ₅ (C = CaO e P = P ₂ O ₅) (Kreidler e Hummel, 1967).	34
Figura 3: Fórmula estrutural da quitosana (CHI) (Technology, 2012).	40
Figura 4: Fórmula estrutural do polietilenoglicol (PEG) (Commons, 2016).	42
Figura 5: Fórmula estrutural do alginato (ALG). (G) (1,4)- α -L-gulurato e (M) (1,4)- β -D-manurato (Hamman, 2010).	44
Figura 6: Fluxograma da produção e estudo do substituto ósseo injetável (IBS).	47
Figura 7: Sistema bomba de seringa para infusão única contendo pasta aquosa de polímeros e fosfatos de cálcio – FASE EXPERIMENTAL.....	50
Figura 8: Esquema do sistema bomba de seringa para infusão única e atomizador duplo fluido – PRODUTO FINAL.....	52
Figura 9: Gráfico e tabela das amostras em fatorial 2 ² com um ponto central.	53
Figura 10: Redução do MTT em Formazan.	58
Figura 11: Difratoograma da HA (SIGMA) após refinamento pelo método de Rietveld.	61
Figura 12: Difratoograma do β -TCP (CERTBIO) por refinamento pelo método de Rietveld.	62
Figura 13: Grânulos esféricos de fosfatos de cálcio após conformação.....	64
Figura 14: Amostras pós-sinterização. Amostra 1 - 300°C; amostra 2 - 600°C e amostra 3 - 900°C.	64
Figura 15: Difratoograma da amostra pós-sinterização a 900°C após refinamento pelo método de Rietveld.	66
Figura 16: Curvas de análise termogravimétrica e sua derivada (TG e DTG) para a amostra de polímeros e fosfatos de cálcio.....	67
Figura 17: Microscopia óptica das amostras sinterizadas a 300°C. (A) Aumento de 20X; (B) Aumento de 100X.	69

Figura 18: Microscopia óptica das amostras sinterizadas a 600°C. (A) Aumento de 20X; (B) Aumento de 100X.	70
Figura 19: Microscopia óptica das amostras sinterizadas a 900°C. (A) Aumento de 20X; (B) Aumento de 100X.	70
Figura 20: Microscopia óptica da amostra sinterizada a 900°C com aumento de 100X.....	70
Figura 21: Microscopia eletrônica das amostras pré (A) e pós-sinterização (B) com aumento de 2000X.....	71
Figura 22: Análise dilatométrica da amostra contendo polímeros e fosfatos de cálcio.	72
Figura 23: Difratoograma da amostra pós sinterização a 900°C após refinamento pelo método de Rietveld.	74
Figura 24: Distribuição granulométrica (50 mL/h) após etapa de sinterização a 900°C. Massa (g) e o acumulado (%) correspondente por faixas (μm).	75
Figura 25: Distribuição granulométrica (70 mL/h) após etapa de sinterização a 900°C. Massa (g) e o acumulado (%) correspondente por faixas (μm).	76
Figura 26: Distribuição granulométrica (90 mL/h) após etapa de sinterização a 900°C. Massa (g) e o acumulado (%) correspondente por faixas (μm).	76
Figura 27: Microscopia óptica das amostras 250-500 μm sinterizadas a 900°C (120X).	78
Figura 28: Microscopia óptica das amostras 500-710 μm sinterizadas a 900°C (120X).	78
Figura 29: Esquema geométrico da relação entre o raio do poro e o raio das esferas, considerando o centro do poro como centro do plano cartesiano (0,0) (Sampaio, 2016).....	80
Figura 30: Microscopia eletrônica das amostras de 250-500 μm pós sinterização com aumento de 1000X (A) e 2000X (B).	82
Figura 31: Microscopia eletrônica da amostra 250-500 μm pós-sinterização com um corte transversal aumento de 1000X.	83
Figura 32: Microscopia eletrônica das amostras de 500-710 μm pós-sinterização com aumento de 1000X (A) e 2500X (B).	83
Figura 33: Microscopia eletrônica da amostra 500-710 μm pós-sinterização com um corte transversal aumento de 1000X.	84

Figura 34: Comportamento reológico da mistura CHI/PEG a 5°C, 25°C e 37°C.....	85
Figura 35: Comportamento do fluxo de misturas de CHI/PEG e ajuste com o modelo de lei de potência a 5°C, 25°C e 37°C.	86
Figura 36: Representação esquemática da curva força-tempo obtida por análise textural adaptado de Senyigit <i>et al.</i> (2014).....	91
Figura 37: Viabilidade celular (%) das amostras de CHI/PEG	93
Figura 38: Mecanismo utilizado para o teste de injetabilidade.....	94
Figura 39: Força de compressão aplicada numa seringa de 3 mL para remover o hidrogel CHI1.5% PEG7.5% a três temperaturas diferentes.....	95
Figura 40: Aspecto do IBS após o seu processamento.	97
Figura 41: Força de compressão aplicada numa seringa de 3 mL em 4 tipos de amostras do IBS a temperaturas ambiente.....	98
Figura 42: Viabilidade celular (%) do IBS para a amostra 1-1 250-500 µm	99
Figura 43: (A) Defeitos ósseos de 3 mm criados na região da tíbea. (B) Imagem de raio-X dos defeitos ósseos preenchidos com o IBS logo após a cirurgia.....	100
Figura 44. Micrografia aos 30 dias de pós-operatório (10X) da interface entre biomaterial (b) e osso neoformado (O). Seta delgada indica osso trabecular e osseointegração.	102
Figura 45. Micrografia aos 60 dias de pós-operatório A (4X) e B (10X). Observa-se grande quantidade de tecido neoformado (O) e neovascularização intensa. Região de medula óssea (m) e biomaterial (b).....	103
Figura 46: Microscopia eletrônica do defeito ósseo (3 mm) criado na região da tíbia de coelhos preenchido com IBS após 60 dias de pós-operatório. (A) 60X e (B) 100X.	104
Figura 47: Microscopia eletrônica da interface do biomaterial e tecido ósseo 30 dias (A) e (B), e 60 dias pós-operatório (C) e (D).	105
Figura 48: Microscopia eletrônica da secção transversal da amostra 60 dias pós-operatório.	106
Figura 49: Microscopia eletrônica das amostras seccionadas transversalmente 30 dias (A e B) e 60 dias (C e D) pós-operatório (b = biomaterial, p = partículas de biomaterial degradadas, e o = neoformação óssea).....	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Índice de bioatividade (I_b) de diferentes materiais. (Guastaldi e Aparecida, 2010).....	27
Tabela 2: Razão Ca/P dos fosfatos de cálcio. Classificação através da razão molar entre os átomos de cálcio e fósforo, a qual varia de 0,5 a 2,0 (Filho <i>et al.</i> , 2007; Guastaldi e Aparecida, 2010).....	30
Tabela 3: Materiais utilizados na composição da fase sólida e fase líquida do biomaterial.....	46
Tabela 4: Composição da mistura dos fosfatos de cálcio (β -TCP e HA).	48
Tabela 5: Composição da pasta aquosa de polímeros e fosfatos de cálcio – FASE EXPERIMENTAL.....	49
Tabela 6: Composição da pasta aquosa de polímeros e fosfatos de cálcio – PRODUTO FINAL.	51
Tabela 7: Faixas de distribuição granulométrica em μm	55
Tabela 8: Dados da HA (SIGMA) obtidos por refinamento de Rietveld.	63
Tabela 9: Dados do β -TCP (CERTBIO) obtidos por refinamento de Rietveld.	63
Tabela 10: Perda de massa das amostras após sinterização (n = número de grânulos produzidos).....	65
Tabela 11: Dados da amostra pós-sinterização a 900°C obtidos por refinamento de Rietveld.	66
Tabela 12: Dados da amostra pós sinterização a 900°C obtidos por refinamento de Rietveld.	75
Tabela 13: Os parâmetros do modelo de lei de potência determinados para cada amostra.	87
Tabela 14: Valores da Energia de Ativação para todas as amostras a diferentes taxas de cisalhamento.....	89
Tabela 15: Medidas de textura das misturas poliméricas de CHI/PEG.....	91
Tabela 16: Variações de IBS submetidos ao ensaio de injetabilidade.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALG – Alginato

CaPs – Fosfatos de cálcio

Ca/P – Cálcio e Fósforo

CDHA – Hidroxiapatita deficiente em cálcio

CERTBIO – Laboratório de Desenvolvimento e Avaliação de Biomateriais do Nordeste

CHI – Quitosana

cm – centímetros

CSTR – Centro de Saúde e Tecnologia Rural

DIL – Dilatometria

DRX – Difração de raio x

EV – Endovenosa

g – Gramas

h – Horas

HA – Hidroxiapatita

HPC – Hidroxipropilcelulose

HV – Hospital Veterinário

I_b – Índice de bioatividade

ICV – Instituto de Cerâmica y Vidrio

IM - Intramuscular

IBS – Substitutos ósseos injetáveis

K – Índice de consistência

kV – Quilovolt

L – Litros

LEA – Laboratório de Engenharia de Alimentos

LTM – Laboratório de Tecnologia dos Materiais

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

M – Molar

m – Massa

min – Minutos

mm – Milímetros

mL – Mililitro

MO – Microscopia óptica de reflexão

MTT – [Brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]

n – Índice de comportamento de fluxo

nm - Nanometro

OHA – Oxihidroxiapatita

PBS – Tampão fosfato salino

PEAD – Polietileno de alta densidade

PEG – Polietilenoglicol

PEO – Óxido de polietileno

PMMA – Polimetilmetacrilato

PNiPAAm – Poli-(N-isopropil acrilamida)

TCP – Fosfato tricálcio

TeCP – Fosfato tetracálcio

TGA – Termogravimetria

U – Incerteza calculada

UFMG – Universidade Federal de Campina Grande

UHMWPE – Polietileno de ultra peso molecular

v - Volume

α -TCP – α fosfato tricálcio

α' -TCP – α' fosfato tricálcio

β -TCP – β fosfato tricálcio

γ -TCP – γ fosfato tricálcio

μ L – Microlitros

μ m – Micrometros

θ – Teta

% – Porcentagem

$^{\circ}$ C – Graus celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1	Tecidos ósseos e os biomateriais	24
2.2	Composição da matriz óssea	25
2.3	Bioatividade	25
2.4	Biomateriais para substituição óssea	27
2.5	Fosfatos de Cálcio (CaPs).....	29
2.5.1	A importância dos fosfatos de cálcio como biomateriais.....	29
2.5.2	Hidroxiapatita (HA)	32
2.5.3	Fosfato Tricálcio (TCP)	33
2.5.4	Substitutos Ósseos Injetáveis (IBS) a base de fosfatos de cálcio.....	35
2.6	Hidrogéis	38
2.6.1	Quitossana (CHI)	40
2.6.2	Polietilenoglicol (PEG).....	42
2.6.3	Alginato de Sódio (ALG).....	43
3	MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1	Materiais	46
3.2	Metodologia	47
3.2.1	Obtenção do β -TCP	47
3.2.2	Produção da Fase Sólida (Grânulos de Fosfatos de Cálcio) – FASE EXPERIMENTAL	48
3.2.3	Produção da Fase Sólida (Grânulos de Fosfatos de Cálcio) – PRODUTO FINAL.....	50
3.2.4	Produção da Fase Líquida (Hidrogel).....	52
3.2.5	Produção do IBS	53
3.3	Técnicas de Caracterização	54
3.3.1	Difração por raios X (DRX).....	54
3.3.2	Termogravimetria (TGA).....	54
3.3.3	Dilatometria (DIL)	55
3.3.4	Granulometria.....	55
3.3.5	Microscopia óptica de reflexão (MO).....	56

3.3.6	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	56
3.3.7	Viscosimetria	56
3.3.8	Perfil textuométrico	57
3.3.9	Injetabilidade	57
3.3.10	Citotoxicidade (Viabilidade Celular).....	57
3.3.11	Ensaio biológico <i>in vivo</i>	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1	Fase Sólida (Grânulos de Fosfatos de Cálcio) - FASE EXPERIMENTAL.....	61
4.1.1	Caracterização dos pós de fosfatos de cálcio por DRX	61
4.1.2	Caracterização das amostras de fosfatos de cálcio por DRX	64
4.1.3	Análise termogravimétrica (TGA)	67
4.1.4	Microscopia óptica de reflexão (MO).....	68
4.1.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	71
4.2	Fase Sólida (Grânulos de Fosfatos de Cálcio) - PRODUTO FINAL.....	71
4.2.1	Dilatometria (DIL)	72
4.2.2	Difração por raios X (DRX).....	73
4.2.3	Granulometria.....	75
4.2.4	Microscopia óptica de reflexão (MO).....	77
4.2.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	81
4.3	Fase Líquida (Hidrogel)	84
4.3.1	Preparação das amostras	84
4.3.2	Reologia	85
4.3.3	Energia de ativação.....	88
4.3.4	Propriedades mecânicas	90
4.3.5	Citotoxicidade (Viabilidade Celular).....	92
4.3.6	Injetabilidade	93
4.4	Processamento das Fases (IBS).....	96
4.4.1	Preparação das Amostras.....	96
4.4.2	Injetabilidade	97
4.4.3	Citotoxicidade (Viabilidade Celular).....	99
4.4.4	Ensaio biológico <i>in vivo</i>	100
4.4.4.1	Histologia	101
4.4.4.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	104

5	CONCLUSÃO	108
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	109
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem havido um crescente interesse nas aplicações de materiais direcionados para as áreas biomédicas – Biomateriais. Os biomateriais estão revolucionando muitos aspectos da saúde preventiva e terapêutica e têm sido influenciados, consideravelmente, pelos avanços em muitas áreas da biotecnologia e da ciência. Estes materiais fazem interface com entidades biológicas e desempenham um papel importante no desenvolvimento de novos dispositivos médicos, próteses, reparação tecidual, sistemas de distribuição de medicamentos e técnicas de diagnóstico (Park e Bronzino, 2003; Ratner *et al.*, 2004; Ratner e Bryant, 2004; Shi, 2006; Larsson *et al.*, 2007; Bártolo e Bidanda, 2008; Baino e Vitale-Brovarone, 2014).

Os biomateriais são materiais com propriedades que os tornam especialmente adequados para serem utilizados em contato com os tecidos vivos. O sucesso destes materiais no corpo humano depende de fatores, tais como as propriedades do material, o design e biocompatibilidade do material utilizado, além de outros fatores, incluindo a técnica cirúrgica utilizada para a implantação, a saúde e as atividades diárias do paciente (Park e Bronzino, 2003; Larsson *et al.*, 2007).

A diferença distintiva entre um biomaterial sobre outros materiais é a sua convivência benigna com o sistema biológico com o qual ele interage, não devendo causar irritações a estruturas vizinhas, resposta inflamatória anormal, reação alérgica ou imunológica. Deverá haver uma relação equilibrada na interface tecido e biomaterial, que não deve tornar-se patológica. (Park e Bronzino, 2003; Bordenave, 2005; Sharma, 2005; Wong e Bronzino, 2007; Bártolo e Bidanda, 2008). Este fenômeno é chamado de biocompatibilidade e é definido como “a capacidade de um material em realizar a sua aplicação específica com uma resposta do hospedeiro apropriada” (Williams, 1986; Wise, 2000).

Desta forma, a resistência mecânica e a natureza química do material, propriedades elétricas e físico-químicas da superfície do material, e atividades físicas em torno do material, bem como a ausência de mudanças na composição com potencial liberação de substâncias de degradação ou citotóxicas, influenciam a

resposta celular e condição de biocompatibilidade (Wise, 2000; Bordenave, 2005; Shackelford, 2005).

Um biomaterial é especificamente escolhido com base na sua compatibilidade com o tecido hospedeiro, integridade estrutural, processo de fabricação, efeito do ambiente sobre o organismo, assim como o efeito do material no organismo durante o seu tempo de vida (Ramsden *et al.*, 2007; Wong e Bronzino, 2007; Bártolo e Bidanda, 2008).

No que tange a regeneração óssea, o sucesso e a vida útil desses materiais dependem do tipo e região óssea, do método de fixação, estresse mecânico, das relações geométricas entre osso e implante, rugosidade, tamanho de grânulos, porosidade e a composição química dos biomateriais, que são muito importantes para a indução óssea e sucesso clínico. Deve-se salientar que a atividade de regeneração óssea pode diferir entre diferentes substitutos ósseos, mesmo quando eles são feitos do mesmo tipo de biomaterial, além do que a formação de uma camada intermediária de tecido fibroso, após o implante, rompe a integração do material com o osso local levando ao insucesso (Wise, 2000; Park e Bronzino, 2003; Condie *et al.*, 2007; Wong e Bronzino, 2007; León e Jansen, 2009; Damlar *et al.*, 2015).

Quando defeitos ósseos congênitos ou adquiridos não podem ser curados durante o processo de regeneração natural, devido a uma dimensão crítica do defeito, a aplicação de materiais de substituição óssea torna-se necessário. Estes materiais substituem o osso ausente no tecido hospedeiro e estimulam o processo de cicatrização, suporte mecânico e estrutural. Devido à disponibilidade limitada de osso autólogo e alógeno, combinado com o efeito colateral relacionado após a colheita, pesquisas intensas são realizadas para a obtenção de alternativas sintéticas (Heinemann *et al.*, 2013).

Como uma dessas alternativas sintéticas em forma de biomaterial, os fosfatos de cálcio (CaPs) cerâmicos são as principais matérias-primas utilizadas para a elaboração de blocos ou grânulos de substitutos ósseos. Essas cerâmicas estão sendo utilizadas cada vez mais como substitutos ósseos em cirurgias ortopédicas, cirurgias bucomaxilofaciais e em aplicações dentárias devido às suas propriedades bioativas. As cerâmicas de fosfatos de cálcio estão disponíveis como

pós, grânulos ou blocos. No entanto, estas formas são limitadas quando as cavidades cirúrgicas não são facilmente acessíveis ou quando seria preferível a realização de uma cirurgia percutânea micro invasiva, para além do que algumas conformações destas cerâmicas de fosfatos de cálcio serem muito densas não permitindo uma eficiente adesão e proliferação celular em toda a extensão do implante (Suchanek e Yoshimura, 1998; Schmitt *et al.*, 2002).

De forma a melhorar a eficiência de adesão e proliferação celular no biomaterial, são utilizados grânulos de fosfato de cálcio injetáveis. Estes grânulos funcionam como cerâmicas macroporosas interconectadas, onde os espaços entre os grânulos permitem a migração de fluídos corporais, células e tecidos, possibilitando a vascularização do local e a formação de novo osso (Trojani *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2014; Ebrahimi *et al.*, 2017). A incorporação de biopolímeros, como veículo para o transporte dos grânulos, torna estes substitutos de fácil aplicação, proporcionando estabilidade ao substituto ósseo, impedindo assim, a migração de partículas cerâmicas para os tecidos circundantes durante e após o implante (Gauthier *et al.*, 2005).

Portanto, este trabalho objetiva desenvolver um biomaterial que atenda no aspecto a racionalização da técnica de aplicação por ser de apenas um estágio e, no aspecto de composição com propriedade bioativas e de injetabilidade. O produto desenvolvido tem potencial de constituir-se no elemento diferencial e de potencial científico/tecnológico para fortalecimento do Complexo Industrial da Saúde no seguimento médico/odontológico da indústria nacional em consonância com as políticas do Ministério da Saúde.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tecidos ósseos e os biomateriais

Alguns tipos de biomateriais são utilizados especificamente na reposição de ossos e dentes. Dependendo das suas propriedades e funções no corpo humano, os materiais variam entre metais, cerâmicas e polímeros (León e Jansen, 2009).

O sucesso e a vida útil desses materiais dependem do tipo e região óssea, do método de fixação, do estresse mecânico, das relações geométricas entre osso e implante, a rugosidade, tamanho de grânulos, a porosidade e a composição química dos biomateriais. Deve-se salientar que a formação de uma camada intermediária de tecido fibroso, rompe a integração do material com o osso local, levando ao insucesso (Wise, 2000; Park e Bronzino, 2003; Condie *et al.*, 2007; Wong e Bronzino, 2007; León e Jansen, 2009).

Durante os primeiros minutos após o implante, apenas água, íons dissolvidos e biomoléculas livres (mas não as células locais) estão na proximidade da superfície do biomaterial. Ao longo das primeiras horas, dias e semanas, a composição deste biolíquido muda continuamente, assim como o processo inflamatório e de cicatrização. Além do que, a regeneração do tecido ósseo é orquestrado por vários tipos de células que estão presentes no tecido ósseo. Uma interação complexa entre os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos resulta na homeostase de tecido ósseo e é fundamental para os processos de remodelação que respondem a condições fisiológicas e estímulos ambientais (Wise, 2000; Kleinhans *et al.*, 2015).

O implante pode ser considerado fonte de irritação ou um estímulo para o tecido, em termos da resposta provocada por traumas ou infecções. Na verdade, a maioria das características da resposta dos tecidos a um implante tem uma estreita semelhança com as características clássicas de cicatrização ou da resposta celular e humoral a bactérias invasoras. Por conseguinte, a interação da superfície com as células e tecidos é, portanto, uma série de eventos acoplados, em desenvolvimento no espaço e no tempo, que de forma crucial é influenciada pelas propriedades da superfície do biomaterial (Wise, 2000).

2.2 Composição da matriz óssea

A matriz óssea é um compósito biológico formado na sua maioria por uma hidroxiapatita (HA) inorgânica (cerâmica) responsável pela rigidez e colágeno orgânico tipo I (polímero) natural responsável pela flexibilidade (Mano *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2011). É o único tecido capaz de sofrer regeneração espontânea para remodelar a sua macro e micro estrutura, podendo forças mecânicas e o ambiente bioquímico afetar o seu desenvolvimento. A regeneração é conseguida através de um delicado equilíbrio proporcionado entre o processo osteogênico (osteoblastos – formação de osso) e osteoclástico (osteoclastos – reabsorção de osso) (Patrick Jr. *et al.*, 1998; Park e Bronzino, 2003; Wong e Bronzino, 2007).

Os principais constituintes da parte mineral dos ossos e dentes são os CaPs, maioritariamente a HA. Esta porção inorgânica é responsável pelas propriedades mecânicas do tecido ósseo, como a rigidez e a resistência à compressão (Mano *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2008; Kokubo, 2008; León e Jansen, 2009).

Os CaPs, como HA e o beta fosfato tricálcio (β -TCP), quando utilizados sinteticamente como substituto ósseo, interagem com fluidos corporais, células e tecidos. Têm grande importância no campo dos biomateriais, em especial no tecido ósseo, devido às suas propriedades biológicas favoráveis apresentadas quando em contato direto com o osso, sendo considerados como materiais bioativos (Hench, 1998; Hench *et al.*, 2002; Heness e Ben-Nissan, 2004; León e Jansen, 2009).

2.3 Bioatividade

Em geral, um biomaterial quando usado clinicamente, pode ser descrito ou classificado de acordo com a resposta dos tecidos em três categorias: bioinerte, bioativo ou reabsorvível (Hench, 1998; Hench *et al.*, 2002; Heness e Ben-Nissan, 2004; Shackelford, 2005).

Um material é considerado bioinerte quando a interface material e tecido é estável, ou seja, não induz qualquer reação imunológica por parte do hospedeiro. O

material mantém a sua estrutura no organismo após o implante, e as propriedades físicas e mecânicas não são alteradas. Os componentes do tecido e material não reagem quimicamente uns com os outros, não possuindo efeitos positivos ou negativos sobre o crescimento ósseo (Wise, 2000; Dee *et al.*, 2002; Wong e Bronzino, 2007; Ballo, 2008).

Relativamente aos materiais bioativos, ao contrário dos bioinertes, podem permitir interações na interface com os tecidos circundantes, possuindo efeito positivo sobre o crescimento ósseo (Hickman, 1999). São definidos como materiais que provocam uma resposta biológica específica na interface do material, levando à formação de um vínculo natural entre tecido e material, e desenvolvimento de novo tecido ósseo mineralizado (Hench, 1998; Wise, 2000; Dee *et al.*, 2002; Hench *et al.*, 2002; Ratner *et al.*, 2004; Floroian *et al.*, 2007). Esse vínculo natural é definido como bioatividade, e consiste na comunicação espontânea de um material em um ambiente biológico, resultando em uma forte adesão entre o tecido e o material (Ballo, 2008; Vallet-Regí e Arcos, 2008). Uma vantagem importante desta fixação bioativa é que a ligação bioativa ao osso tem uma força igual ou maior do que o osso após 3-6 meses (Hench, 1998; Hench *et al.*, 2002).

A bioatividade dos materiais pode ser quantificada pelo índice de bioatividade (I_b) (1), que é descrito como o tempo, em dias, necessário para ocorrer 50% de ligação interfacial entre um biomaterial e o tecido ósseo. Materiais que apresentam índice maior que 8 são classificados como osteoprodutores ou classe A, promovem uma resposta intra e extracelular que permite a colonização de sua superfície por células mesenquimais. Materiais com índice entre 0 e 8 são classificados como osteocondutores ou classe B, propiciam o crescimento ósseo ao longo de sua superfície. Por fim, materiais cujo índice é 0, são considerados bioinertes. Na Tabela 1 encontram-se descritos os índices de bioatividade, bem como suas respectivas classificações (Guastaldi e Aparecida, 2010).

$$I_b = 100/t_{0,5bb} \quad (1)$$

Tabela 1: Índice de bioatividade (I_b) de diferentes materiais. (Guastaldi e Aparecida, 2010).

Biomaterial	I_b	Classe de Bioatividade	Ligação com o osso	Ligação com o tecido mole
Vidro bioativo (45S5)	12,5	A	Sim	Sim
Vidro bioativo (52S4)	10,5	A	Sim	Sim
Cerâmica bioativa (AW)	6,0	B	Sim	Sim
Hidroxiapatita (HA)	3,1	B	Sim	Não
Alumina	0	-	Não	Não

Por fim, os materiais reabsorvíveis, eventualmente, podem ser substituídos ou incorporados pelos tecidos. É importante salientar que pequenas mudanças na composição do material afetam a resposta tecidual, conseqüentemente a sua classificação (Hickman, 1999; Ratner *et al.*, 2004). Alguns exemplos de biomateriais quanto a sua classificação estão representados na Figura 1.

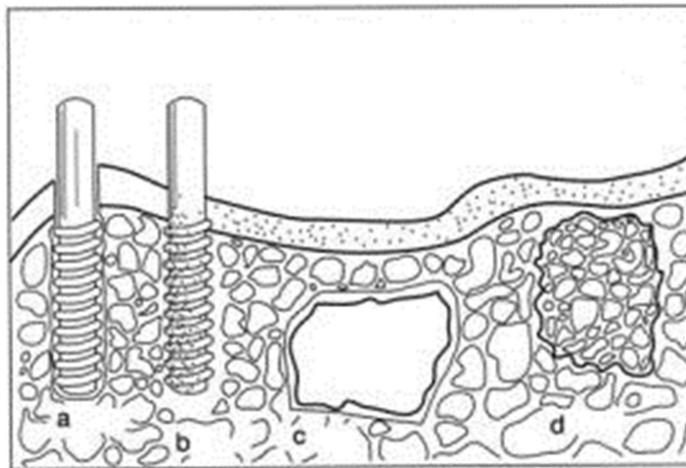


Figura 1: Classificação de biomateriais de acordo com sua bioatividade: (a) implante dental bioinerte de alumina, (b) implante dental metálico revestido de hidroxiapatita bioativa $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, (c) superfície de biovidro ativa, e (d) implante bioreabsorvível de fosfato tricálcio $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ (Henness e Ben-Nissan, 2004).

2.4 Biomateriais para substituição óssea

O implante cirúrgico ideal deveria ser feito a partir de um material com características semelhantes do tecido ósseo, além de ser bioativo. Matrizes de CaPs são fracas e quebradiças, mas são uma forma atraente para preenchimento ósseo

ou entrega de biosinais como sistemas injetáveis. Apesar de serem bioativos, apresentam limitações biomecânicas que os tornam impróprios para a substituição óssea em certas partes do corpo, como a região dos dentes ou articulações, que sofrem grande carga de compressão (León e Jansen, 2009; Nam *et al.*, 2011).

Os CaPs são escolhidos como material de implante pela sua compatibilidade inigualável com o osso humano. Por serem bioativos, têm demonstrado induzirem uma apropriada diferenciação osteoblástica de células estaminais *in vitro* e formação óssea *in vivo*, ou seja, dão início a uma rápida resposta biológica, melhoram a adesão entre osso e implante, e fornecem uma estrutura para o crescimento ósseo (León e Jansen, 2009; Nam *et al.*, 2011).

De forma a eliminar o problema da resistência mecânica, foi sugerido que os implantes de CaPs poderiam ser reforçados com titânio, combinando as propriedades biológicas anteriormente referidas do CaPs com a resistência mecânica do titânio. O titânio e as suas ligas são usados principalmente pela sua força, sendo que a fina camada de óxido que, naturalmente, se forma à superfície atue como uma barreira protetora passivante, conferindo a este metal a sua resistência à corrosão conhecido em condições fisiológicas (Floorian *et al.*, 2007; León e Jansen, 2009).

Os metais como o aço inoxidável, as ligas de titânio e de cromo-cobalto são utilizados na fabricação de implantes dentários (raízes artificiais), próteses de quadril e joelho, dispositivos de fixação de fraturas ósseas e coluna vertebral na forma de placas e parafusos. Mesmo assim, o titânio e ligas metálicas têm preferência sobre outros metais, devido às suas propriedades mecânicas e de resistência à corrosão no organismo (Wong e Bronzino, 2007; León e Jansen, 2009).

Entre as cerâmicas, a alumina (Al_2O_3), a zircônia (ZrO_2), e o carbono pirolítico são empregados como coroas dentárias artificiais, cabeças e inserções de próteses da articulação de quadril devido ao elevado grau de dureza e resistência à abrasão (Dee *et al.*, 2002; León e Jansen, 2009). Além dos materiais citados, existe ainda os polímeros polietileno de ultra alto peso molecular (UHMW PE) e polimetilmetacrilato (PMMA) que são aplicados em copos acetabular, próteses patelar, como cimentos para a fixação de próteses de quadril e articulações, e enchimentos em odontologia ou vertebroplastia (León e Jansen, 2009).

Dentre os inúmeros materiais e componentes disponíveis atualmente, biomateriais com ótimo desempenho para a substituição óssea são os dispositivos de titânio e CaPs, que podem ser utilizados de forma isolada ou associados, unindo as excelentes propriedades mecânicas dos metais com as propriedades biológicas dos CaPs.

Portanto, com o desenvolvimento e avanço dos biomateriais, e consequentemente da engenharia dos tecidos, que segundo a *National Science Foundation* (Viola *et al.*, 2003) define como “a aplicação dos princípios e métodos das ciências da vida e engenharia para a compreensão fundamental de relações estrutura/função em tecidos normais e patológicos de mamíferos, e o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função do tecido” ou segundo Langer e Vacanti (Langer e Vacanti, 1993) como “um campo interdisciplinar que aplica os princípios de engenharia e as ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função do tecido”, os biomateriais podem fornecer uma estratégia promissora para a engenharia de tecidos ao serem combinados com células estaminais mesenquimais e moléculas de sinais osseointutivos, mantendo a estabilidade fisiológica e favorecendo a melhora do desempenho dos papéis biológicos na entrega de células, e no processo de regeneração e substituição óssea (Bajada *et al.*, 2008; Willerth e Sakiyama-Elbert, 2008; Nam *et al.*, 2011).

2.5 Fosfatos de Cálcio (CaPs)

2.5.1 A importância dos fosfatos de cálcio como biomateriais

Os CaPs enquadram-se na categoria de materiais biocompatíveis para aplicações óssea e dentária, sendo utilizados sob a forma de osso artificial. Uma forma conveniente de classificar os CaPs é através da razão molar entre os átomos de cálcio e fósforo (Ca/P), a qual varia de 0,5 a 2,0 (Tabela 2). Esta razão é bastante explorada nas diversas aplicações dos CaPs e pode prever o seu comportamento *in vivo*, quanto a sua solubilidade em água, que de forma geral,

quanto maior a razão Ca/P, menor será a sua solubilidade (Filho *et al.*, 2007; Guastaldi e Aparecida, 2010).

São produzidos em diversas formas como pós e grânulos densos ou porosos, e utilizados para a fabricação e revestimento de várias formas de implantes e *scaffolds*. As propriedades mecânicas podem variar consideravelmente, devido ao processo de fabricação e variações na estrutura do produto final (Wong e Bronzino, 2007; León e Jansen, 2009; Ebrahimi *et al.*, 2017).

Tabela 2: Razão Ca/P dos fosfatos de cálcio. Classificação através da razão molar entre os átomos de cálcio e fósforo, a qual varia de 0,5 a 2,0 (Filho *et al.*, 2007; Guastaldi e Aparecida, 2010).

Fosfato de cálcio	Fórmula química	Ca/P
Fosfato tetracálcio (TeCP)	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,0
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,5
Fosfato tricálcio (α , α' , β , γ) (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Fosfato octacálcio (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Hidrogênio fosfato de cálcio (DCP)	CaHPO_4	1,0
Pirofosfato de cálcio (CPP)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,0
Pirofosfato de cálcio di-hidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Fosfato heptacálcio (HCP)	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0,7
Di-hidrogênio fosfato tetracálcico (TDHP)	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0,67
Fosfato monocálcico mono-hidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5
Metafosfato de cálcio (α , β , γ) (CMP)	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,5

Os CaPs apresentam-se como os principais materiais estudados e empregados como biomaterial para a reposição e regeneração do tecido ósseo, com foco principal para a HA e fosfato tricálcio (TCP) na forma de β -TCP, pois possuem como principais características: estrutura e composição semelhante à fase mineral do osso, dentes e tecidos calcificados; biocompatibilidade; bioatividade; não induzem reação imunológica ou tóxica; taxas de degradação variáveis; podem ser processados para ter propriedades osteocondutividade (permite o crescimento ósseo na superfície ou através dos poros do biomaterial); alta afinidade pela adsorção de proteínas e fatores de crescimento que por sua vez, influenciam a

osseointuidade (capacidade de estimular as células mesenquimais para se diferenciarem em osteoblastos e produzir tecido ósseo); além de não apresentarem riscos de transmissão de patologias infectocontagiosas, nem de degradação proteica, devido às suas características sintéticas (Giannoudis *et al.*, 2005; Aparecida *et al.*, 2007; Filho *et al.*, 2007; Guastaldi e Aparecida, 2010; Ebrahimi *et al.*, 2017).

No entanto, as biocerâmicas de CaPs, são materiais de solubilidade variada em fluidos corporais que dependendo da sua composição química, fase cristalina e microestrutura, podem dissolver-se ligeiramente promovendo a formação de apatita biológica, antes de se unir através de ligação química diretamente ao tecido ósseo ao nível atômico (Wong e Bronzino, 2007; Vallet-Regí e Arcos, 2008; Zhang *et al.*, 2008; León e Jansen, 2009; Ebrahimi *et al.*, 2017). A taxa de dissolução dos CaPs monofásicos a um pH 7,3 decresce na seguinte ordem: TeCP > α -TCP > β -TCP > OHA (oxihidroxiapatita) > CDHA (hidroxiapatita deficiente em cálcio) > HA. Porém, no caso dos CaPs bifásicos, trifásicos e multifásico, a biodegradação depende das proporções das fases (Ducheyne *et al.*, 1993; Canillas *et al.*, 2017).

O processo de biodegradação dos CaPs ocorre por dois mecanismos diferentes: reabsorção ativa, mediada pela atividade celular de macrófagos e osteoclastos ou por fagocitose; e reabsorção passiva, devido à dissolução ou à hidrólise química. No caso da biodegradação por reabsorção ativa, os osteoclastos são os principais responsáveis por este mecanismo e dissolvem os CaPs secretando a enzima anidrase carbônica ou ácido láctico, que decrescem o pH local para 4 e 5, enquanto os osteoblastos que estão diretamente envolvidos no processos de formação óssea, promovem um pH superior a 8,5 devido a excreção de amônia. Além disso, partículas nanodimensionais de CaP podem ser fagocitadas e, uma vez que elas são incorporadas no citoplasma, podem ser dissolvidas por ataque ácido e/ou processos enzimáticos. Esses acontecimentos ocorrem simultaneamente e em competição uns com os outros durante a biodegradação do CaPs (Dorozhkin, S. V., 2013; Dorozhkin, Sergey V, 2013; Canillas *et al.*, 2017).

2.5.2 Hidroxiapatita (HA)

Na área dos biomateriais, dentre as biocerâmicas de CaPs atualmente disponíveis comercialmente, a HA determinada pela sua fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e uma razão molar Ca/P de 1,67 apresentou-se como o material de referência durante as últimas décadas para a engenharia de tecido ósseo devido à sua estrutura química ser semelhante à parte mineral do osso e poder promover a formação de osso, como apatita, sobre a sua superfície (Aparecida *et al.*, 2007; Filho *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Guastaldi e Aparecida, 2010; Tanase *et al.*, 2011; Ramesh *et al.*, 2012). Presente em ossos e dentes dos vertebrados, representa 55% da composição de ossos, 96% da composição do esmalte dentário e 70% da dentina. Apesar do componente mineral do tecido ósseo não apresentar composição definida e mostrar variações entre os estágios de maturação e envelhecimento, a sua estrutura cristalina e razão Ca/P assemelham-se às da HA (Guastaldi e Aparecida, 2010).

A HA tem sido um material clinicamente aplicado em várias áreas da odontologia e ortopedia devido à sua biocompatibilidade, propriedades mecânicas e sua excelente propriedade bioativa e osseocondutora, adequadas para a aplicação no recobrimento de materiais, substituição ou reparação óssea (Aparecida *et al.*, 2007; Filho *et al.*, 2007; Wong e Bronzino, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Guastaldi e Aparecida, 2010; Tanase *et al.*, 2011; Ramesh *et al.*, 2012). Trata-se de um material que apresenta ausência de toxicidade e respostas inflamatórias, possuindo ainda habilidade de se ligar ao tecido hospedeiro, desta forma permitindo a proliferação de células como fibroblastos e osteoblastos. Alguns estudos demonstram que a HA induz a diferenciação osteogênica dos osteoblastos (Wang, 2004; Zhang *et al.*, 2008; Tsuchida *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Guastaldi e Aparecida, 2010).

Apesar de todas as vantagens exibidas pela HA, o seu uso clínico é limitado devido à sua lenta biodegradação, pois é uma biocerâmica muito estável em meio fluido. Além de que, o seu sucesso em aplicações biomédicas é largamente dependente da disponibilidade de uma HA de alta qualidade, que é caracterizada por uma microestrutura refinada e propriedades mecânicas otimizadas (Zhang *et al.*, 2008; Tanase *et al.*, 2011; Ramesh *et al.*, 2012).

2.5.3 Fosfato Tricálcio (TCP)

O TCP, determinado pela fórmula química $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e uma razão molar de Ca/P de 1,5, faz parte da família das biocerâmicas de CaPs e é classificado como um arcabouço temporário ideal usado para a reparação óssea/dental substituindo osso autógeno, por causa de sua semelhança química com a apatita biológica presente em tecidos duros humanos (Xie *et al.*, 2016).

Possui três polimorfos: β -TCP, α -TCP e α' -TCP, embora a literatura mencione um quarto polimorfo o γ -TCP. O β -TCP é estável à temperatura ambiente e abaixo de 1125°C, podendo ser transformado em α -TCP entre 1125 °C e 1430 °C, e α' -TCP acima de 1430 °C. De acordo com o diagrama de fases CaO-P₂O₅ (Figura 2), pode-se observar os polimorfos do TCP e suas transformações (Kreidler e Hummel, 1967; Ryu *et al.*, 2004; Carrodegua e De Aza, 2011; Xie *et al.*, 2016).

Dentre as formas polimórficas do TCP, o β -TCP e o α -TCP são utilizados em várias aplicações clínicas em odontologia, ortopedia e cirurgia maxilo-facial, e apesar de terem a mesma composição química, diferem consideravelmente na sua estrutura, densidade e solubilidade, que por sua vez determina as suas propriedades biológicas e aplicações clínicas. Entretanto, o β -TCP é preferido como uma biocerâmica devido a sua resistência mecânica, estabilidade química e taxa de bioreabsorção adequada (Ryu *et al.*, 2002; Ryu *et al.*, 2004; Carrodegua e De Aza, 2011).

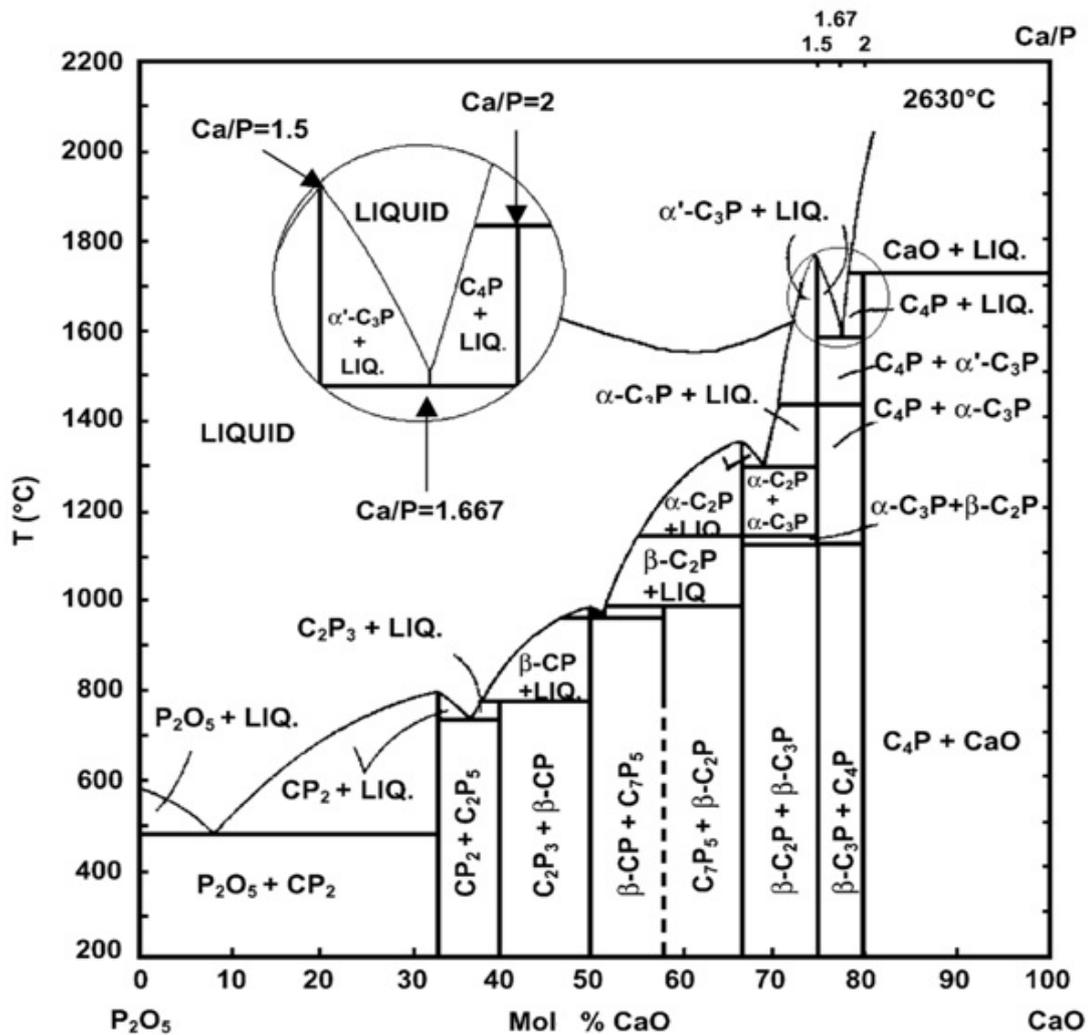


Figura 2: Diagrama de fases CaO-P₂O₅ (C = CaO e P = P₂O₅) (Kreidler e Hummel, 1967).

O β -TCP é usado principalmente para a preparação de biocerâmicas biodegradáveis em forma de blocos e grânulos densos e macro-poroso, enquanto o α -TCP é usado principalmente como um pó fino na preparação de cimentos de fosfato de cálcio, tendo suas aplicações biomédicas limitadas devido à sua alta reatividade e reabsorção. Relata-se que a taxa de solubilidade e/ou degradação do α -TCP são muito mais elevados do que os dos β -TCP (Carrodegas e De Aza, 2011; Xie *et al.*, 2016).

Biocerâmicas de β -TCP são comumente utilizadas na regeneração óssea, devido à sua excelente biocompatibilidade, bioreabsorção e efeitos de osteocondução; para além de apresentarem vantagens como a facilidade de disponibilidade do biomaterial, risco zero de transmissão de doenças infecciosas e a

não necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica em comparação com enxertos autógenos (Robert e Bucholz, 2002; Goel *et al.*, 2013; Damlar *et al.*, 2015).

Portanto, demonstra ser um biomaterial vantajoso, pois sua biodegradação ocorre em microambiente ácido, mediado por células como osteoclastos e macrófagos, e procede à mesma taxa da geração de um novo tecido duro, ou seja, permite a formação de osso e redução do risco de fratura (Wiesmann *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2014), sendo totalmente reabsorvido e substituído por tecido ósseo recém-formado dentro de 6 a 12 meses (Palti e Hoch, 2002; Damlar *et al.*, 2015; Xie *et al.*, 2016).

2.5.4 Substitutos Ósseos Injetáveis (IBS) a base de fosfatos de cálcio

Os substitutos ósseos injetáveis (IBS) são alvos de intensa investigação e caracterizam-se por serem um material cerâmico de preferência osseocondutor, combinados com um meio condutor composto por um hidrogel. A injetabilidade destes compostos permite reduzir a duração das intervenções cirúrgicas, minimizar os efeitos secundários e as dores pós-operatórias, o que possibilita uma recuperação mais rápida do paciente e uma redução dos custos hospitalares (Liu *et al.*, 2006; Larsson e Hannink, 2011; D'este e Eglin, 2013). Ademais, IBS compostos de biopolímeros combinados com aditivos e outras moléculas, são utilizados para melhorar as suas características e desempenho, tais como fármacos e fatores de crescimento que podem fornecer aumento da regeneração óssea e suprimir reações inflamatórias ou infecções bacterianas (Chang *et al.*, 2017; Mueller *et al.*, 2017).

As indicações para a sua aplicação clínica incluem defeitos irregulares no tecido ósseo, devido a fraturas, reabsorção óssea degenerativa ou suporte de fixação de dispositivos ósseos sintéticos. Além de aplicações minimamente invasivas, como as da coluna vertebral, como a vertebroplastia, preenchimento de cavidades ósseas em fraturas fechada e o reforço de ossos com osteoporose (Block e Thorn, 2000; Bohnert e Baroud, 2005; Bohnert *et al.*, 2005; Heinemann *et al.*, 2013).

Os CaPs, como a HA e o β -TCP, quando utilizados sinteticamente como substituto ósseo, interagem com fluidos corporais, células e tecidos. Têm grande

importância no campo dos biomateriais, em especial no tecido ósseo, devido às suas propriedades biológicas favoráveis apresentadas quando em contato direto com o osso, sendo considerados como materiais bioativos (Hench, 1998; Hench *et al.*, 2002; Heness e Ben-Nissan, 2004; León e Jansen, 2009; D'este e Eglin, 2013).

Os cimentos ósseos, à base de CaPs, constituem um dos mais importantes grupos de substitutos ósseos injetáveis. Estes compostos são totalmente biocompatíveis, apresentam uma razoável resistência mecânica e permitem uma fácil aplicação, com o adequado período de secagem (Liu *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2009). No entanto, por serem totalmente densos, não permitem uma eficiente adesão e proliferação celular em toda a extensão do implante. Estes compostos não permitem as trocas de nutrientes no seu interior, condição “sine qua non” para a formação de tecidos. A fraca resposta biológica e de ligação ao tecido destes materiais, influencia assim, de forma negativa a taxa de crescimento do tecido ósseo (Weiss *et al.*, 2007). Por isso, um substituto ósseo injetável ideal requer propriedades reológicas adequadas para assegurar a ligação da fase mineral *in situ* com boa permeabilidade celular, o que proporciona uma melhor formação óssea rápida e profunda. Contrariamente à utilização de materiais densos que não têm qualquer porosidade intrínseca (Schmitt *et al.*, 2002; Low *et al.*, 2010).

Para além dos fatores apresentados, geralmente os cimentos ósseos não são produtos prontos ao uso, ou seja, terão que ser preparados durante a cirurgia podendo contribuir para aumentar a duração da mesma e, conseqüentemente, ter efeitos secundários para o paciente. São normalmente aplicados como formulações de pó/líquido misturados durante a cirurgia para a produção de uma pasta de cimento (Low *et al.*, 2010). A pasta é modelada em um defeito aberto por meio de instrumentos cirúrgicos ou é (após a transferência para uma seringa) injetada utilizando técnicas minimamente invasivas de operação. O último procedimento apresenta problemas de manuseamento intrínsecos, desde o tempo de presa do cimento que começa imediatamente após a mistura do pó/líquido, o que resulta numa mudança contínua nas propriedades dos materiais, deixando apenas um pequeno período de tempo para a aplicação do cimento pelo cirurgião (Low *et al.*, 2010; Vorndran *et al.*, 2013).

De forma a melhorar a eficiência de adesão e proliferação celular no biomaterial, são utilizados grânulos de CaPs combinados com polímeros. Os grânulos funcionam como cerâmicas macroporosas interconectadas, onde os espaços entre os grânulos permitem a migração de fluídos corporais, células e tecidos, possibilitando a vascularização do local e a neoformação óssea (Trojani *et al.*, 2006; Low *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2014). A incorporação de biopolímeros, como veículo para o transporte dos grânulos, torna estes substitutos ósseos de fácil aplicação, proporcionando estabilidade ao biomaterial, impedindo assim, a migração de partículas cerâmicas para os tecidos circundantes durante e após o implante (Gauthier *et al.*, 2005). Esta adição de polímeros aos CaPs melhora a força mecânica do material e os grânulos de CaPs misturados com polímeros melhoram a sua resistência à compressão e o módulo, para além de aumentar as suas propriedades osteocondutoras (Low *et al.*, 2010).

Na patente PT104595 “Substituto Ósseo Injectável e Biocompatível” (Lisboa *et al.*, 2011), a produção do biomaterial envolve o desenvolvimento de duas fases, uma sólida e outra líquida, tendo o material em sua constituição final as duas fases misturadas, procurando apresentar ótimas características de injetabilidade e moldabilidade adequada. A fase sólida é constituída por grânulos com composição bifásica de CaPs a partir de uma mistura de 25% de HA e 75% β -TCP possuindo um diâmetro entre 38 μ m e 500 μ m, enquanto que a fase líquida é composta por um hidrogel, feito a partir de uma mistura homogênea de dois polímeros hidrofílicos a quitosana (CHI) e o polietilenoglicol (PEG). A fase sólida é a principal responsável pela osseointegração e a fase líquida é necessária para conferir à fase sólida as características de transporte e manuseabilidade.

No trabalho de Vo *et al.* (2015), os autores estudaram a capacidade de mineralização e de formação óssea usando um hidrogel injetável de poli (N-isopropil acrilamida) (PNiPAAm) em defeitos cranianos de ratos, tendo ao final de 12 semanas obtido resultados mínimos de formação de osso, mas aceitáveis em termos mineralização do hidrogel. Considera-se que presença de fosfatos de cálcio, como se pretende investigar no presente trabalho, poderá ser mais vantajosa para neoformação óssea em menor tempo.

Morais *et al.* (2013) produziram hidrogéis de alginato de sódio (ALG) combinados com HA, tendo estudado a injetabilidade conjuntamente com a reologia e taxa de intumescimento. Os autores concluíram que as formulações usadas seriam adequadas para o transporte de grânulos. Considera-se que seria mais interessante do ponto de vista biológico a utilização de CHI por conta da biocompatibilidade comprovada, ou um outro polissacarídeo como a hidroxipropilcelulose (HPC), por ser um produto não proveniente de animais e biocompatível com o corpo humano.

Ma *et al.* (2010) desenvolveram um IBS fotopolimerizável com o objetivo de fixar o material na cavidade óssea a ser restaurada. Os autores realizaram ainda ensaios de citotoxicidade *in vitro* obtendo resultados de não toxicidade para o material. Considera-se que a fotopolimerização produz materiais com menor capacidade de inchamento devido à reticulação provocada durante o processo de cura, o que resulta na redução da capacidade de substituição óssea. Para além, do que os materiais possuem certo grau de toxicidade que irá influenciar negativamente o tratamento.

2.6 Hidrogéis

Os hidrogéis são sistemas tridimensionais de cadeias poliméricas reticuladas, hidrofílicas, naturais ou sintéticas, aptos a absorver grandes quantidades de água com conseqüente intumescimento sem dissolução, podendo ser classificados em várias categorias dependendo do método de preparação, carga iônica e das características físicas (Marconi e Piozzi, 2002; Peppas, 2004).

São formados por ligações físicas cruzadas, geralmente por uma transição sol-gel, usualmente através de pontes de hidrogênios, interações eletrostáticas e hidrofóbicas, ou por ligações químicas cruzadas (ligações covalentes) entre as cadeias poliméricas, produzidas por uma simples reação de um ou mais monômeros. Geralmente intumescem em meio aquoso com preenchimento de até 95% de volume livre, podendo aumentar ou diminuir de volume em resposta a estímulos externos, como mudanças de temperatura, pH, presença de solventes,

corrente elétrica, campo magnético sendo chamados de “*smart*” hidrogéis (Peppas, 2004; Misra *et al.*, 2009).

Enquanto a maioria dos polímeros eventualmente são degradados em condições ambientais extremas (temperaturas altas e soluções ácidas), a degradação dos hidrogéis biodegradáveis é clinicamente observada numa escala de tempo e sob condições mais brandas (soluções aquosas, temperatura e pH fisiológico). Essa degradação elimina a necessidade da permanência dos materiais por longos períodos no corpo humano, já que os hidrogéis biodegradáveis irão ser quebrados em fragmentos de baixo peso molecular, podendo ser reabsorvidos e excretados, uma vez que a função do hidrogel seja cumprida, eliminando possíveis intervenções cirúrgicas (Metters e Lin, 2007).

Especificamente no caso de hidrogéis injetáveis, que podem ser definidos como uma rede tridimensional intumescida por um solvente com propriedades de diluição por cisalhamento e facilmente injetável através de uma agulha de pequeno calibre (Gutowska *et al.*, 2001), espera-se que um gel espesso seja formado *in situ* ao término da força de cisalhamento e seja um material pronto para uso em procedimentos cirúrgicos (Bencherif *et al.*, 2012).

Na engenharia de tecidos, utilizar géis injetáveis pode ser mais vantajoso do que *scaffolds* típicos, pois um material fluido pode preencher qualquer forma de um defeito e transportar outros constituintes como cerâmica ou fatores de crescimento por um simples passo de mistura, não contém solventes residuais que possam estar presentes em um *scaffold* pré-formado, e geralmente não requer procedimentos cirúrgicos complexos para a sua implantação (Bencherif *et al.*, 2012).

Para a conformação de hidrogéis injetáveis, a mistura de polímeros é um método comumente utilizado para proporcionar materiais poliméricos desejáveis com propriedades combinadas para aplicações particulares (Taravel e Domard, 1996). A modificação de polímeros misturando dois ou mais polímeros para obter misturas com propriedades melhoradas tem recebido interesse crescente devido ao seu forte potencial na substituição de polímeros sintéticos em muitas aplicações, além de serem recursos renováveis, não tóxicos, baratos e deixar resíduos biodegradáveis (Wood, 2001; Neto *et al.*, 2005). Na engenharia de tecidos, as misturas de biopolímeros são geralmente utilizadas para aumentar a

biocompatibilidade ou para aumentar as propriedades mecânicas, proporcionar um componente estrutural mais forte e para reduzir a hidrofobicidade (Zhang *et al.*, 2002).

2.6.1 Quitosana (CHI)

A quitosana (CHI) é um polímero catiônico linear semi-cristalino de base natural, obtido pela desacetilação alcalina da quitina que é um polissacarídeo de origem natural, sendo o segundo polímero mais abundante na natureza depois da celulose. A quitina pode ser encontrada no exoesqueleto de animais, especialmente em crustáceos, moluscos e insetos, ou na parede celular de alguns fungos e leveduras. A CHI tem sido amplamente utilizada em diversas áreas, que vão desde a gestão de resíduos ao processamento de alimentos, medicina e biotecnologia (Mi *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2002; Qin *et al.*, 2006; Alves e Mano, 2008; Anitha *et al.*, 2009; Aranaz *et al.*, 2009; Duarte *et al.*, 2009; Jayakumar *et al.*, 2010; Dash *et al.*, 2011; Tanase *et al.*, 2011; Rabisková *et al.*, 2012) (Figura 3).

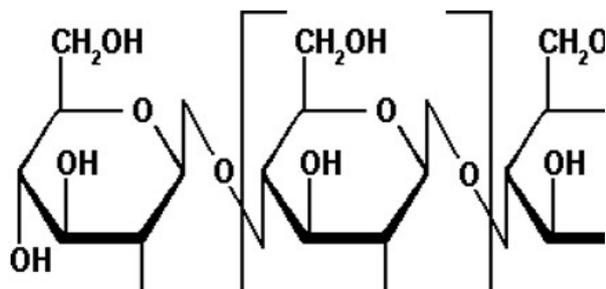


Figura 3: Fórmula estrutural da quitosana (CHI) (Technology, 2012).

Há importantes variáveis experimentais que se devem levar em conta ao trabalhar com soluções de CHI, tais como o grau de desacetilação, peso molecular e hidrofobicidade da CHI, bem como a natureza do solvente utilizado, o pH, e a força iônica da solução (Berger *et al.*, 2004; Wasikiewicz *et al.*, 2005; Aranaz *et al.*, 2009; Dash *et al.*, 2011; Tanase *et al.*, 2011). O grau de desacetilação, peso molecular, polidispersão e a cristalinidade constituem os principais parâmetros que condicionam o uso da CHI em diversas aplicações. Também a sua alta viscosidade

e baixa solubilidade a pH neutro limitam o seu uso (Berger *et al.*, 2004; Qin *et al.*, 2006; Aranaz *et al.*, 2009; Jayakumar *et al.*, 2010; Dash *et al.*, 2011).

A CHI é insolúvel na maioria dos solventes e em soluções aquosas acima do seu pK_a . A protonação dos grupos amina abaixo do seu pK_a faz o quitosana solúvel em soluções aquosas de ácidos orgânicos diluídos como: ácido acético, ácido fórmico, ácido succínico, ácido láctico e ácido málico (Qin *et al.*, 2006; Jayakumar *et al.*, 2007; Alves e Mano, 2008; Boddohi *et al.*, 2008; Anitha *et al.*, 2009; Jayakumar *et al.*, 2010; Dash *et al.*, 2011).

Com o objetivo de melhorar a sua solubilidade e ampliar as suas aplicações, a CHI tem sido processado de várias formas e havido um crescente interesse na sua modificação química (Qin *et al.*, 2006; Alves e Mano, 2008; Anitha *et al.*, 2009; Dash *et al.*, 2011). As propriedades biológicas apresentadas pela CHI são bastante interessantes, tais como, a biocompatibilidade; a não toxicidade; a biodegradabilidade com produtos de degradação não cancerígenos; a sensibilidade ao pH; a adesão a mucosas; a ação antibacteriana, analgésica, hemostática, antimicrobiana, antioxidante e imunológica (Mi *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2005; Qin *et al.*, 2006; Alves e Mano, 2008; Anitha *et al.*, 2009; Aranaz *et al.*, 2009; Sonaje *et al.*, 2009; Jayakumar *et al.*, 2010; Dash *et al.*, 2011; Tanase *et al.*, 2011; Rabisková *et al.*, 2012). Tais propriedades o tornam um excelente material, o que faz com que venha sendo processado por várias técnicas em forma de gel, membranas, suportes, fibras, nanofibras, esferas, filmes e esponjas, tendo aplicações concretas e perspectivas futuras de uso (Jayakumar *et al.*, 2010).

Devido à sua alta biocompatibilidade, a CHI tem sido empregado em aplicações biomédicas como sistemas de distribuição de medicamentos, fibras e malhas 3D, cosméticos, fios cirúrgicos, biosensores, membranas, sistemas implantáveis e injetáveis na forma de compósitos ortopédicos e periodontais, entrega de genes e biomoléculas, cicatrização de feridas e suportes para a regeneração tecidual (Mi *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2005; Qin *et al.*, 2006; Jayakumar *et al.*, 2007; Alves e Mano, 2008; Anitha *et al.*, 2009; Aranaz *et al.*, 2009; Duarte *et al.*, 2009; Sonaje *et al.*, 2009; Jayakumar *et al.*, 2010; Jayakumar *et al.*, 2011; Tanase *et al.*, 2011; Rabisková *et al.*, 2012).

Além de aplicações médicas, a CHI pode ser utilizado na indústria alimentícia na preservação de alimentos por deterioração microbiana, como aditivo ou fibra dietética, na formação de filmes biodegradáveis e recuperação de materiais após o descarte (Wasikiewicz *et al.*, 2005; Qin *et al.*, 2006; Jayakumar *et al.*, 2007; Aranaz *et al.*, 2009; Sonaje *et al.*, 2009; Jayakumar *et al.*, 2010; Jayakumar *et al.*, 2011). Outras aplicações são na biocatálise através da imobilização de enzimas e células por adsorção, ligações covalentes ou reticulação, e no tratamento de águas residuais, remoção de corantes, adsorção de íons metálicos, floculação, como estimulante de crescimento de plantas e na indústria têxtil (Ma *et al.*, 2003; Wasikiewicz *et al.*, 2005; Jayakumar *et al.*, 2007; Alves e Mano, 2008; Aranaz *et al.*, 2009; Jayakumar *et al.*, 2010; Jayakumar *et al.*, 2011).

2.6.2 Polietilenoglicol (PEG)

O polietilenoglicol (PEG) é um polímero sintético com fórmula química HO-(CH₂CH₂O)_n-H (n = número médio de grupos de óxido de etileno) de múltiplas utilizações industriais, composto por subunidades idênticas de óxido de etileno, com pesos moleculares variando entre 200g/mol e acima de 10.000 g/mol (Figura 4) (Fruijtner-Polloth, 2005; Pellegrini *et al.*, 2013; Kobayashi *et al.*, 2014).

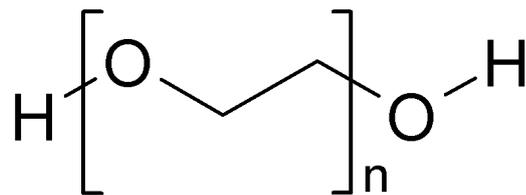


Figura 4: Fórmula estrutural do polietilenoglicol (PEG) (Commons, 2016).

Os PEGs podem ser produzidos com uma variedade de pesos moleculares, tendo como resultado a sua disposição em diferentes estados físicos, e conseqüentemente a variação de suas propriedades e aplicações. Os PEGs de peso molecular entre 200 e 600 g/mol são encontrados normalmente na forma de um líquido claro incolor, aqueles de 1000 g/mol e acima na forma de sólidos

semicristalinos à temperatura ambiente, e PEGs com graus de peso molecular mais elevado do que 20.000 g/mols são muitas vezes referidos como óxidos de polietileno (PEOs) (Gullapalli e Mazzitelli, 2015).

PEGs são compostos hidrofílicos, não voláteis, estáveis e não sofrem hidrólise ou, na ausência de oxigênio, se deterioram durante a armazenagem. Uma propriedade dos PEGs que deve-se destacar é a sua solubilidade em água e a sua capacidade de solubilizar outras substâncias em preparação. São miscíveis em água e podem solubilizar muitos compostos fracamente solúveis em água. Estas características são atribuídas aos grupos hidroxila terminais e a preponderância dos grupos éter na cadeia do polímero (Fruijtier-Polloth, 2005; Pellegrini *et al.*, 2013; Gullapalli e Mazzitelli, 2015).

Além das características já mencionadas, os PEGs são conhecidos por sua versátil gama de aplicações industriais, incluindo as áreas biomédicas e de biomateriais, e são candidatos ideais para o desenvolvimento solventes, veículos e agentes emulsionantes nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos (Fruijtier-Polloth, 2005; Pellegrini *et al.*, 2013). Outro fator importante a ser mencionado, é a peguilação (conjugação química com o PEG) de produtos terapêuticos que tornou-se uma ferramenta atraente e eficaz para modular as propriedades farmacológicas dos fármacos, tais como solubilidade, estabilidade e imunogenicidade, e para melhorar os seus perfis metabólicos e toxicológicos (Pasut e Veronese, 2012; Pellegrini *et al.*, 2013).

Devido à sua ampla utilização e do potencial de exposição crônica dos seres humanos através de diferentes rotas, a toxicidade dos PEGs e de produtos peguilados têm sido amplamente investigados e demonstram, e em geral, excelentes perfis de segurança, com uma toxicidade ocorrendo apenas com altas doses parenterais que excedem em muito as concentrações normalmente utilizadas na prática (Fruijtier-Polloth, 2005).

2.6.3 Alginato de Sódio (ALG)

O alginato de sódio (ALG) é um sal de sódio do ácido algínico, um polissacarídeo aniônico natural versátil presente em grande quantidade na natureza,

extraído principalmente a partir de algas castanhas. Tem sido usado na indústria de biotecnologia como um agente espessante e gelificante, e um estabilizador coloidal. O ALG também tem uma capacidade única para ser utilizada como uma matriz para o aprisionamento e/ou a entrega de uma variedade de moléculas ou partículas. Embora o ALG seja biocompatível, é conhecido por ser resistente à biodegradação (Pérez e Matos, 2001; Belalia e Djelali, 2014).

Considerado um copolímero linear, é formado pela repetição de dois monômeros distintos, o (1,4)- α -L-gulurato (unidade G) e o (1,4)- β -D-manurato (unidade M) arrumados de maneira alternada ou sequenciados em blocos ao longo da cadeia (Figura 5). As propriedades físicas e químicas do ALG são influenciadas pela massa molar, composição, extensão e sequência dos monômeros (George e Abraham, 2006; Masuelli e Illanes, 2014).

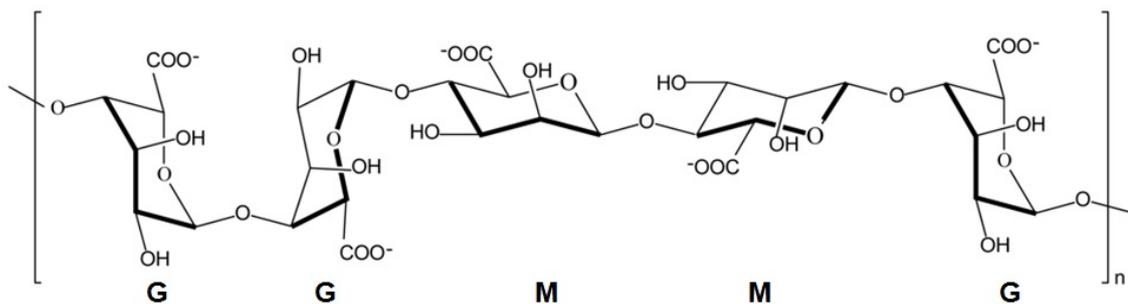


Figura 5: Fórmula estrutural do alginato (ALG). (G) (1,4)- α -L-gulurato e (M) (1,4)- β -D-manurato (Hamman, 2010).

O ALG é biocompatível, biodegradável, hidrofílico, tem alta bioadesividade, baixa toxicidade, baixo custo e possui diversas aplicações podendo ser utilizado na medicina, agricultura, indústria têxtil, alimentícia, farmacêutica, cosmética, e na engenharia de tecidos (George e Abraham, 2006).

A propriedade dos ALG de maior utilidade é a sua capacidade para reagir com cátions metálicos polivalentes, especificamente, os íons de cálcio, para produzir géis fortes ou polímeros insolúveis. A estrutura química, tamanho molecular, cinética da formação do gel e os cátions desempenham um papel significativo em diversas propriedades incluindo porosidade, intumescência, estabilidade, biodegradabilidade, solidez do gel, características imunológicas e biocompatibilidade. As propriedades estruturais e mecânicas da solução de ALG podem ser reguladas, ajustando a força

iônica do meio de gelificação ou da fonte de cálcio (George e Abraham, 2006; Belalia e Djelali, 2014; Masuelli e Illanes, 2014).

O ALG forma hidrogéis na presença de cálcio ou outros cátions multivalentes, e pode ser obtido através de um processo simples em condições ambientais amenas sem uso de reagentes tóxicos. Tipicamente, é usado na forma física de um hidrogel de pequenos poros (nm), o que se torna um problema dependendo do seu uso, pois não permite a movimentação de células para o interior ou exterior do material (Eiselt *et al.*, 2000). Os hidrogéis de ALG têm provado sua extensa utilidade como biomaterial, sendo usados como suporte na engenharia tecidual, transportadores de fármacos, células e fatores de crescimento (por permitir o encapsulamento de substâncias) e modelo de matriz extracelular em estudos biológicos (Augst *et al.*, 2006).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa para obtenção e caracterização do biomaterial proposto foi realizada no Laboratório de Desenvolvimento e Avaliação de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO, Laboratório de Tecnologia dos Materiais – LTM e Laboratório de Engenharia de Alimentos – LEA, localizados na Universidade Federal de Campina Grande – UFCG (Campina Grande – PB), no Instituto de Cerâmica y Vidrio – ICV (Madrid – Espanha), enquanto que os ensaios biológicos *in vivo* realizados no Hospital Veterinário (HV) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG (Patos – PB).

3.1 Materiais

Os materiais utilizados no presente trabalho estão na Tabela 3.

Tabela 3: Materiais utilizados na composição da fase sólida e fase líquida do biomaterial.

Material	Marca Comercial	Pureza	Características técnicas
Ácido Fosfórico	SYNTH	P.A.	-
Fosfato de Cálcio Tribásico	SYNTH	-	-
Alginato de Sódio	VETEC	Grau Farma	300-400 cps
Hidroxiapatita	SIGMA	-	≥90% Ca ₃ (PO ₄) ₂
Beta Fosfato Tricálcico	CERTBIO	-	100% Cristalinidade
Poliacrilato de Amônio	MIRACEMA- NUODEX	-	Médio Peso Molecular
Cloreto de Cálcio	VETEC	P.A.	-
Quitosana	CERTBIO	Grau Médico	DA=85%; 260 kDa
Ácido Acético	DINÂMICA	99,8% P.A.	-
Polietilenoglicol	NEON	Grau Farma	400

3.2 Metodologia

A metodologia a seguir corresponde a fase exploratória do estudo proposto, para a produção de um substituto ósseo injetável (IBS), que envolve o desenvolvimento de duas fases, uma sólida e uma líquida, com o posterior processamento dessas fases. A fase sólida é composta por grânulos na forma de esferas de fosfatos de cálcio abaixo de 1000μ , a partir de uma mistura de HA e β -TCP, e a fase líquida composta por um hidrogel de CHI e PEG. A geometria dos grânulos de CaPs deve ser esférica e microporosa, para que unidos ao hidrogel formem uma estrutura porosa entre os grânulos (Figura 6).

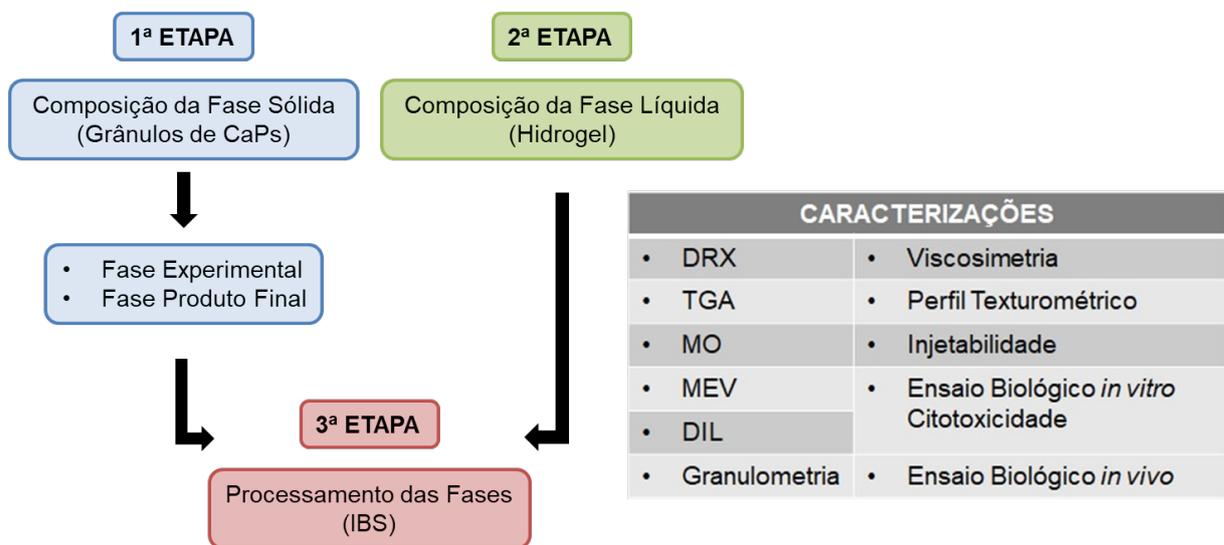


Figura 6: Fluxograma da produção e estudo do substituto ósseo injetável (IBS).

3.2.1 Obtenção do β -TCP

O β -TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) utilizado para a produção dos grânulos de CaPs foi obtido a partir da transformação do fosfato de cálcio tribásico ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) P.A. (SYNTH) por meio de reação química e tratamento térmico. A estequiometria da reação para obtenção do β -TCP.



Inicialmente, 100g de fosfato de cálcio tribásico foram adicionados em 200mL de água destilada e homogeneizados em agitador mecânico. Após a homogeneização foram adicionados 5,3mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) 85%, lentamente sob agitação mecânica durante 20 min. Posteriormente, a mistura foi vertida em um refratário de vidro e secada em estufa a 80°C durante 24hs. Após o período de 24hs, o material cerâmico foi triturado com o auxílio de um almofariz, peneirado, colocado em uma cápsula de alumina e levado ao forno a 1000°C durante 2hs. Após a sinterização, o material foi caracterizado por difração de raios X (DRX) com objetivo de identificar o perfil da fase cristalina do fosfato de cálcio obtido.

3.2.2 Produção da Fase Sólida (Grânulos de Fosfatos de Cálcio) – FASE EXPERIMENTAL

Inicialmente os pós dos fosfatos de cálcio HA (SIGMA) e β -TCP (CERTBIO) utilizados na preparação da fase sólida passaram por uma peneira de abertura de 44 μ m e foram caracterizados por DRX.

Após a etapa de caracterização dos pós de HA e β -TCP por DRX, deu-se continuidade aos trabalhos de desenvolvimento da fase sólida do biomaterial, que será composto por grânulos de CaPs com composição bifásica, a partir de uma mistura de 25% de HA e 75% de β -TCP (Tabela 4). Nesta fase do estudo, foram preparadas amostras em forma de grânulos esféricos com o objetivo de caracterizar o biomaterial e aperfeiçoar a técnica empregada na preparação das amostras, para posteriormente produzir amostras em forma de grânulos esféricos ideais para a produção do IBS.

Tabela 4: Composição da mistura dos fosfatos de cálcio (β -TCP e HA).

Fosfatos de Cálcio	Massa (g)	Massa (%)
β -TCP	9,375 g	75 %
HA	3,125 g	25 %
TOTAL	12,5 g	100 %

Para este fim, foi feita uma pasta aquosa sob agitação mecânica de solução final de 63,5 g contendo ALG, HA, β -TCP e poliacrilato de amônio (LIOSPERSE® 511) um dispersante (Tabela 5). A pasta foi introduzida em uma seringa com 12mm de diâmetro e agulha 22G que através da regulação do fluxo e do caudal da pasta em 40 mL/h, foi possível controlar o diâmetro das esferas, pois a saída da unidade de encapsulamento foi colocada acima de uma solução aquosa sob agitação de cloreto de cálcio 0,1M, de forma a coagular as esferas através de gotejamento (Figura 7). Posteriormente as esferas foram filtradas e secas em temperatura ambiente durante 24hs, separadas em grupos para serem sinterizadas por um período de 2hs a 300°C, 600°C e 900°C de forma a degradar e remover o ALG e o dispersante, e avaliar o comportamento dos mesmos nas amostras, para além de formar uma estrutura estável, porosa e constituída apenas por fosfatos de cálcio.

Tabela 5: Composição da pasta aquosa de polímeros e fosfatos de cálcio – FASE EXPERIMENTAL.

Composição	Massas (g)	Massas (%)
Água	50 g (50 mL)	78,74 %
ALG – Baixa Viscosidade	0,875 g	1,378 %
β -TCP	9,375 g	14,763 %
HA	3,125 g	4,921 %
(Liosperse® 511)	0,125 g (0,337 μ L)	0,196 %
TOTAL	63,5 g	100 %



Figura 7: Sistema bomba de seringa para infusão única contendo pasta aquosa de polímeros e fosfatos de cálcio – FASE EXPERIMENTAL.

A composição da pasta aquosa partiu de uma base que essa solução teria inicialmente uma composição final de 100 g, sendo 80 g de solução aquosa de ALG a 1,75% (m/v) e 20 g de fosfatos de cálcio, porém por limitação da quantidade dos componentes cerâmicos e por serem estudos iniciais, a composição da solução aquosa final foi de 63,5 g, sendo 50,875 g de solução aquosa de ALG a 1,75% (m/v) e 12,5 g de fosfatos de cálcio, com a adição de 0,125 g de dispersante. A quantidade de dispersante utilizado é de acordo com a quantidade de massa cerâmica presente na solução, que é de 1% da massa cerâmica total. O dispersante Liosperse® 511 apresenta uma concentração de sólido entre 36% à 38%, então levou-se em consideração uma concentração de 37% (37 g) em 100 mL de dispersante.

Portanto, aproximadamente 20% da massa total é formada por fosfatos de cálcio e o restante da massa composta por polímeros e água, que serão removidos e degradados após o processo de sinterização.

3.2.3 Produção da Fase Sólida (Grânulos de Fosfatos de Cálcio) – PRODUTO FINAL

Nesta etapa, foram utilizados os mesmos pós dos fosfatos de cálcio HA (SIGMA) e β -TCP (CERTBIO) utilizados na etapa experimental, e a proporção da

composição bifásica dos fosfatos de cálcio utilizada foi mantida, 25% de HA e 75% de β -TCP, para a preparação das amostras em formas de grânulos esféricos. Porém houve mudanças na composição da pasta aquosa utilizada e na técnica de preparação das amostras utilizada.

Para este fim, foi feita uma pasta aquosa sob agitação mecânica de solução final de 343,125 g contendo ALG, HA, β -TCP e LIOSPERSE® 511 (Tabela 6). A pasta foi introduzida em uma seringa com 18,8 mm de diâmetro interno conectada a uma mangueira de 3 mm de diâmetro e 20 cm de comprimento, possuindo no final um bico atomizador duplo fluido. O fluxo e o caudal da pasta foi regulando em 3 variações (50 mL/h, 70 mL/h e 90 mL/h), com o objetivo de avaliar a variação do diâmetro das amostras produzidas. A pasta aquosa foi atomizada por um bico com diâmetro de 0,6 mm e pressão fixa de 0,4 bar, colocado acima de um recipiente contendo uma solução de cloreto de cálcio 0,1M, de forma a coagular as esferas (Figura 8). Posteriormente as amostras foram filtradas, secas em temperatura ambiente durante 24hs e separadas em 3 grupos para serem sinterizadas e caracterizadas.

Tabela 6: Composição da pasta aquosa de polímeros e fosfatos de cálcio – PRODUTO FINAL.

Composição	Massas (g)	Massas (%)
Água	300 g (300 mL)	87,43 %
ALG – Baixa Viscosidade	5,25 g	1,53 %
β -TCP	28,125 g	8,19 %
HA	9,375 g	2,73 %
(Liosperse® 511)	0,375 g (1,011 μ L)	0,11 %
TOTAL	343,125 g	100 %

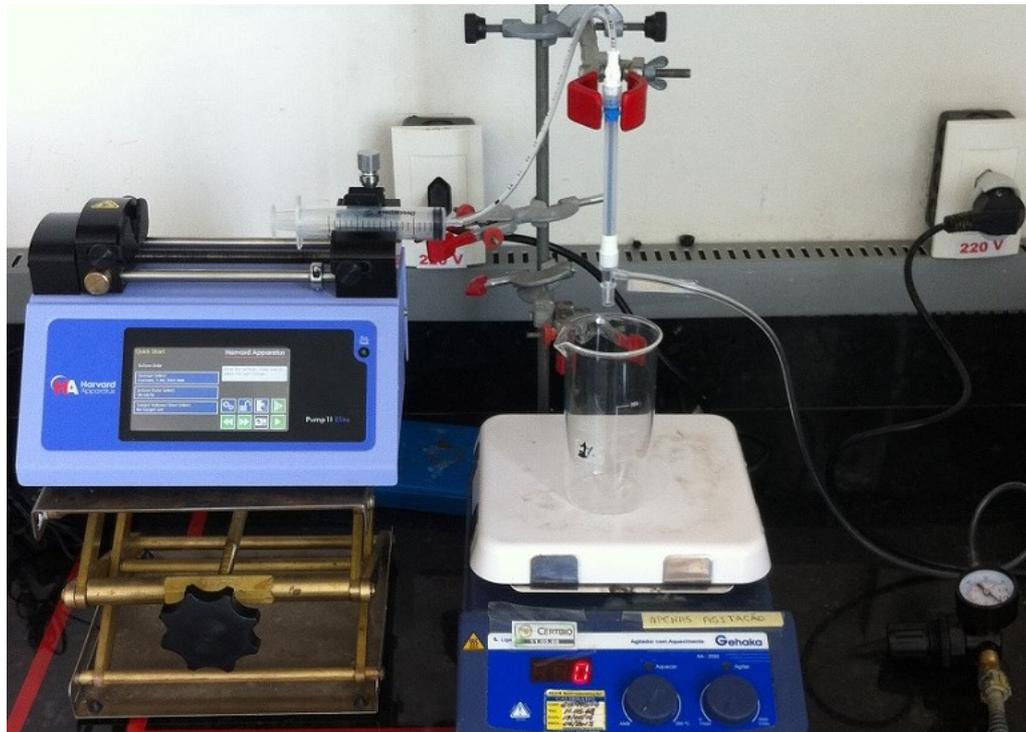


Figura 8: Esquema do sistema bomba de seringa para infusão única e atomizador duplo fluido – PRODUTO FINAL.

A composição da pasta aquosa, nesta fase do experimento, ficou mais fluida com o aumento da quantidade de água empregada devido a mudança da técnica para a produção das amostras, mantendo a proporção de ALG na solução aquosa de 1,75% (m/v) e a quantidade de LIOSPERSE® 511 empregada de 1% da massa cerâmica total.

Portanto, ocorreu uma queda de aproximadamente de 20% para 11% da massa total formada por fosfatos de cálcio e o restante da massa composta por polímeros e água, tornando-a mais fluida, que serão removidos e degradados após o processo de sinterização.

3.2.4 Produção da Fase Líquida (Hidrogel)

As amostras de CHI/PEG foram preparadas com variações de concentração (m/v) em solução aquosa de ácido acético de concentração molar variada, seguindo um fatorial 2^2 com um ponto central apresentado na Figura 9. Inicialmente

dissolveu-se a CHI em solução aquosa de ácido acético sob agitação magnética. Em seguida uma determinada quantidade de PEG foi adicionada à solução de CHI e deixou-se em agitação durante 1h à temperatura ambiente para completar a homogeneização. Através do procedimento referido, será obtida uma fase líquida homogênea determinante para o transporte da fase sólida (grânulos de fosfato de cálcio).

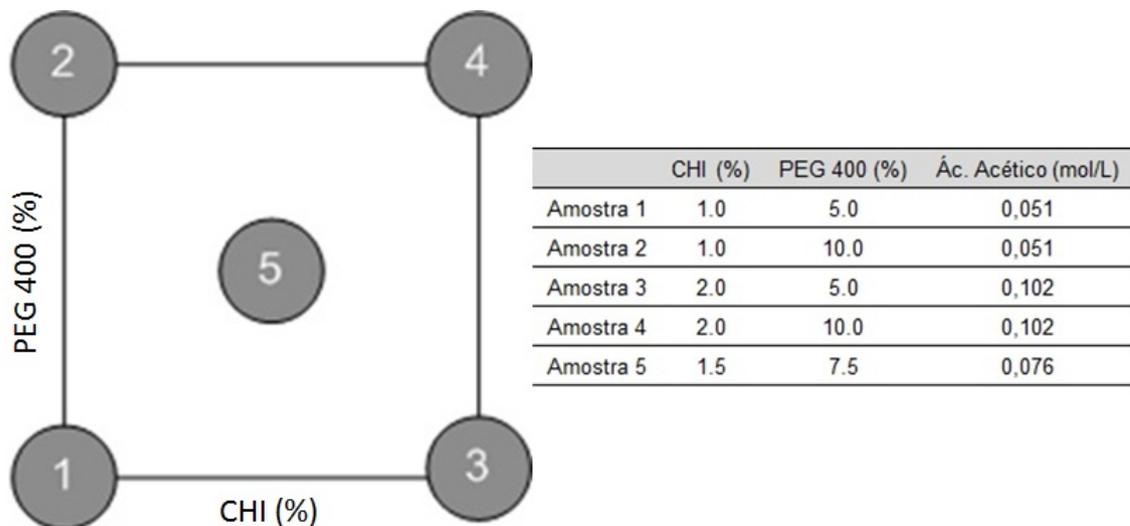


Figura 9: Gráfico e tabela das amostras em fatorial 2^2 com um ponto central.

3.2.5 Produção do IBS

A mistura das fases sólida e líquida foi efetuada de acordo com a razão de 0,8 a 1 g/g. Isto é, por 1 grama de fase sólida, foi adicionado entre 0,8g a 1g de fase líquida. Existe uma quantidade máxima de fase sólida transportável pela fase líquida sem perdas de propriedades de injetabilidade e consistência do material final. A mistura foi colocada em uma seringa para facilitar a sua aplicação, podendo permanecer no interior desta sem perder as características referidas anteriormente.

3.3 Técnicas de Caracterização

Foram realizadas 3 etapas de caracterização. A primeira etapa consistiu na caracterização dos materiais de partida e grânulos de CaPs (Fase Sólida), a segunda etapa a caracterização do hidrogel de CHI e PEG (Fase Líquida), e na terceira etapa foi realizada a caracterização do produto final (IBS).

Neste trabalho foram utilizadas as seguintes técnicas de caracterização: Difração de Raios X (DRX), Termogravimetria (TGA), Dilatometria (DIL), Granulometria, Microscopia Óptica de Reflexão (MO), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Viscosimetria, Perfil Texturométrico, Injetabilidade, Ensaios Biológicos *in vitro* (Citotoxicidade) e Ensaios Biológicos *in vivo*.

3.3.1 Difração por raios X (DRX)

A difração por raios X (DRX) é uma técnica simples, rápida e não destrutiva indicada para a identificação e caracterização do biomaterial com base no seu padrão de difração. Ao incidir um feixe de raios X na superfície da amostra, o mesmo interage com os átomos presentes originando o fenômeno de difração que, segundo a lei de Bragg, estabelece a relação entre o ângulo de difração e a distância entre os planos que a originam. As análises de difração de raios X foram conduzidas a temperatura ambiente utilizando um difratômetro de raios X XRD 7000 Shimadzu, utilizando radiação $K\alpha$ do cobre (1,5418 Å), tensão de 40kV e corrente 30mA, examinados com um intervalo de 2θ entre 10,0 e 80,0 graus a uma velocidade de $2\theta/\text{min}$.

3.3.2 Termogravimetria (TGA)

A termogravimetria baseia-se no estudo da variação de massa de uma determinada amostra, resultante de uma transformação química (decomposição, degradação, oxidação) ou física (evaporação, condensação, sublimação) em função da temperatura ou tempo. Para a obtenção da curva de TGA a amostra foi colocada em um suporte de alumínio no equipamento TGA PYRIS 1, em atmosfera dinâmica

de nitrogênio com uma vazão de 20mL/min⁻¹, a uma razão de aquecimento de 10°C/min⁻¹, partindo da temperatura de 30°C até 900°C.

3.3.3 Dilatometria (DIL)

A dilatometria (DIL) é uma técnica termoanalítica para a medição de expansão ou contração de um material quando submetida a um programa de temperatura e tempo controlado, onde a quantidade de expansão ou contração depende das características do próprio material. Para a obtenção da curva de DIL, o biomaterial foi prensado a 1000Kg/cm² e submetido a um aquecimento sob uma taxa de 5°C/min, partindo da temperatura de 0°C até 1500°C, utilizando o equipamento SETARAM SETSYS 16/18.

3.3.4 Granulometria

Granulometria é uma técnica para avaliar a distribuição percentual dos diversos tamanhos de grãos de uma amostra, considerando a quantidade de material, em massa, retido em peneiras. Para a análise granulométrica do material, foi utilizado um agitador eletromagnético com peneiras para separar os grânulos de fosfatos de cálcio, nas faixas granulométricas desejadas. A abertura das peneiras utilizadas foram 150, 250, 500, 710 e 1000 µm.

Seguem, na Tabela 7, as faixas de distribuição granulométrica obtidas pelo agitador eletromagnético.

Tabela 7: Faixas de distribuição granulométrica em µm.

Faixas de Distribuição Granulométrica (µm)
0 – 150
150 – 250
250 – 500
500 – 710
710 – 1000
↑1000

3.3.5 Microscopia óptica de reflexão (MO)

A técnica de microscopia óptica (MO) foi utilizada para ampliar as imagens e permitir a diferenciação das amostras produzidas nas diferentes etapas de produção do biomaterial. O biomaterial foi caracterizado por meio de MO, com o auxílio do Microscópio Advanced 3D Digital, Hirox – KH 1300, que permite reflexão e transmissão, e possui profundidade de campo estendida com medições 2D e 3D. Este microscópio, além de ampliar as estruturas, pode fazê-lo capturando imagens tridimensionais de estrutura interna do material, estando acoplado a uma estação de análise de imagens.

3.3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite obter imagens com grandes ampliações, originadas pelo mapeamento das interações que ocorrem entre o feixe colimado de elétrons produzido pelo microscópio e a superfície da amostra. O biomaterial foi caracterizado morfologicamente por MEV, utilizando dois tipos de equipamentos, o modelo Phenom Prox para caracterizar os grânulos de CaPs produzidos durante a pesquisa, enquanto que o FE-SEM S-4700 HITACHI, um MEV com emissão de campo para caracterizar as amostras dos testes biológicos *in vivo*.

3.3.7 Viscosimetria

A viscosimetria é um método simples, útil e apropriado para fornecer informações sobre o tamanho e a forma das cadeias macromoleculares em solução, e está associada à resistência que um fluido oferece para deformar-se por cisalhamento. As medidas reológicas foram realizadas utilizando o equipamento Brookfield DV-II + Pro com um recipiente cilíndrico revestido para todas as soluções em 3 diferentes temperaturas (5°C, 25°C e 37°C). Os “spindles” foram utilizados de acordo com as amostras e as medições a velocidades de corte compreendidas entre 50 e 200 rpm.

3.3.8 Perfil texturométrico

O Texturômetro é um instrumento científico imitativo que mede com absoluta precisão a resposta de uma amostra às forças de tensão, compressão, penetração, flexão e extrusão. As medições de textura instrumentais foram pré-formadas utilizando um penetrômetro (TA-TX plus, Stable Micro Systems, UK) equipado com uma célula de carga de 50 N. Uma sonda A/BE-d35 foi comprimida duas vezes contra cada mistura polimérica até uma profundidade definida (20 mm) a uma taxa de 2,0 mm/s. Com o resultado destas experiências foram construídas e analisadas curvas de tempo-força para determinar alguns parâmetros mecânicos (dureza, adesividade, coesão e elasticidade).

3.3.9 Injetabilidade

Através de ensaios de injetabilidade é avaliada a força necessária para remover o biomaterial injetável do interior de uma seringa, com velocidade e intervalo de injeções predeterminadas. O equipamento utilizado foi uma máquina de ensaio mecânico universal Instron 3366, ajustada no modo de compressão com uma velocidade de 20mm/min da cruzeta, o conjunto de percurso da cruzeta para 20 mm e uma célula de carga de 500 N. A garra de compressão pressiona o êmbolo da seringa, com o material no seu interior. O tempo e a carga necessária para esvaziar a seringa foram registrados e analisados de acordo com a composição do material. As amostras foram testadas em triplicada.

3.3.10 Citotoxicidade (Viabilidade Celular)

O ensaio de avaliação da viabilidade celular do IBS foi realizado de acordo com a norma BS EN ISO 10993-5: 2009 (*Biological evaluation of medical devices – Part5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods*) (BS EN ISO Iso, 2009), através da determinação da porcentagem da viabilidade celular, utilizando o método de redução do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], que estabelece uma correlação entre a atividade metabólica celular e o número de

células viáveis em cultura *in vitro*. Este teste baseia-se na redução de sal amarelo de Tetrazólio, o MTT, por desidrogenases celulares para cristais azul/violeta de Formazan (Figura 10);

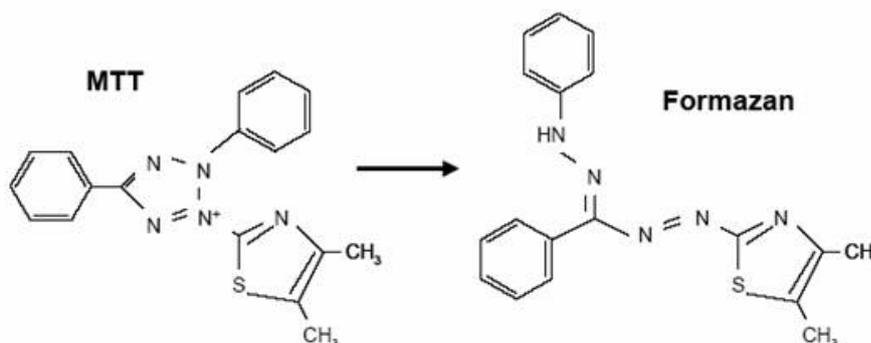


Figura 10: Redução do MTT em Formazan.

Para avaliação da citotoxicidade do hidrogel e do IBS, foi utilizada a linhagem celular de fibroblastos L929 (ATCC NCTC clone 929) obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro - BCRJ cultivadas em meio de cultura RPMI (RPMI 1640 Medium, Gibco® - Invitrogen Corporation, Grad Island, USA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco®, by Life Technologies) e 1% de Antibiótico - Antimicótico (Gibco®, by Life Technologies), mantidas em estufas de CO₂, em atmosfera de 5%, a 37°C. As células utilizadas neste experimento seguiram as recomendações de utilização para o teste de citotoxicidade *in vitro* que constam na norma BS EN ISO 10993-5: 2009.

Foi utilizada uma concentração celular de 5×10^5 células/mL em meio de cultura RPMI, e adicionados 100 μ L por poço em uma placa de cultura celular de 96 poços. A placa foi transferida para a estufa de CO₂ (5%) a 37°C e incubada por 24hs. Após este período, o meio de cultura é aspirado de todos os poços, e posteriormente são adicionados 170 μ L de meio de cultura RPMI e 30 μ L da amostra (extrato) em cada poço. A obtenção dos extratos utilizados no ensaio foi de acordo com a norma ISO 10993-12: 2012 (*Biological evaluation of medical devices – Part 12: Sample preparation and reference materials*) (ISOIso, 2012). A placa foi incubada novamente em estufa de CO₂ (5%) a 37°C por 24hs. Após as 24hs, o meio de cultura é aspirado de todos os poços e foram adicionados 100 μ L de solução de MTT (1mg/mL) em PBS (Tampão fosfato-salino). Novamente, as placas foram

incubadas em estufa de CO₂ (5%) a 37°C por 3 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e adicionado 100 µL de álcool isopropílico por poço. A leitura da densidade ótica foi determinada em um leitor de microplacas (VictorX3 – PerkinElmer), a 570 nm com filtro de referência de 650 nm. A viabilidade celular foi calculada em porcentagem pelo método estatístico teste z-Score modificado para a detecção de *outliers*. Como controle negativo foi utilizado o polietileno de alta densidade (PEAD) e o como controle positivo o látex natural.

3.3.11 Ensaio biológico *in vivo*

O experimento foi realizado no Hospital Veterinário (HV) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), no setor de Cirurgia de Pequenos Animais e no Laboratório de Histopatologia Animal, com o número de protocolo CEP – Protocolo Nº 16/2016 junto ao Comitê de Ética em Pesquisa desta instituição.

Foram utilizados 12 coelhos adultos Nova Zelândia, pesando em média 2,5 Kg, divididos de forma aleatória em 2 grupos experimentais de 6 animais cada, e submetidos à cirurgia de implantação do biomaterial. Os animais foram anestesiados com o uso de xilazina a 2% na dose de 5 mg/Kg e cetamina a 10% na dose de 30 mg/Kg, ambos pela via intramuscular (IM), após 15 min realizou-se a anestesia epidural com lidocaína a 2% na dose de 0,3 mL/Kg. Após a assepsia da pele com clorexidina e proteção da área com campo cirúrgico estéril, foram realizadas duas incisões de 2 cm na parte medial da tíbia, sendo uma na diáfase proximal e outra na distal, e divulsão dos tecidos subcutâneo e muscular. Posteriormente, defeitos ósseos não críticos de 3 mm de diâmetros foram criados com o auxílio de uma broca cirúrgica esférica conectada a uma motor de baixa rotação, sob irrigação salina contínua para evitar danos térmicos ao osso.

Em seguida, os defeitos ósseos produzidos foram preenchidos com o biomaterial (IBS), com uma diferença que no membro esquerdo dos animais, além do biomaterial preparado para o estudo, foi utilizado uma membrana de colágeno de origem bovina sob os defeitos ósseos preenchidos com o intuito de impedir o inicial crescimento de tecido fibroso sobre o biomaterial, para agir como um grupo controle

em relação aos implantes do membro direito. Em seguida, as incisões foram fechadas com fio vycril 3.0 em ponto X, na região do músculo, e na pele com fio nylon 2.0 em ponto *Wolff*.

Os animais foram eutanasiados aos 30 e 60 dias de pós-operatório com administração de xilazina na dose de 5 mg/Kg e cetamina na dose de 40 mg/Kg via IM, seguidos 15 min por propofol 1% na dose de 5 mg/Kg e logo após a perda dos reflexos cloreto de potássio a 19,1% na dose de 1 mL/Kg via endovenosa (EV). Posteriormente, os fragmentos ósseos do implante foram coletados para avaliação histológica e por MEV.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fase Sólida (Grânulos de Fosfatos de Cálcio) - FASE EXPERIMENTAL

4.1.1 Caracterização dos pós de fosfatos de cálcio por DRX

A caracterização por DRX foi realizado com objetivo de identificar o perfil e as fases cristalinas presente nos fosfatos de cálcio utilizados na preparação das amostras. A partir dos dados fornecidos pela análise de DRX, é possível extrair informações com base nos picos presentes no padrão de difração, que são característicos de cada material. A Figura 11 e Figura 12 ilustram os difratogramas dos fosfatos de cálcio HA (SIGMA) e β -TCP (CERTBIO).

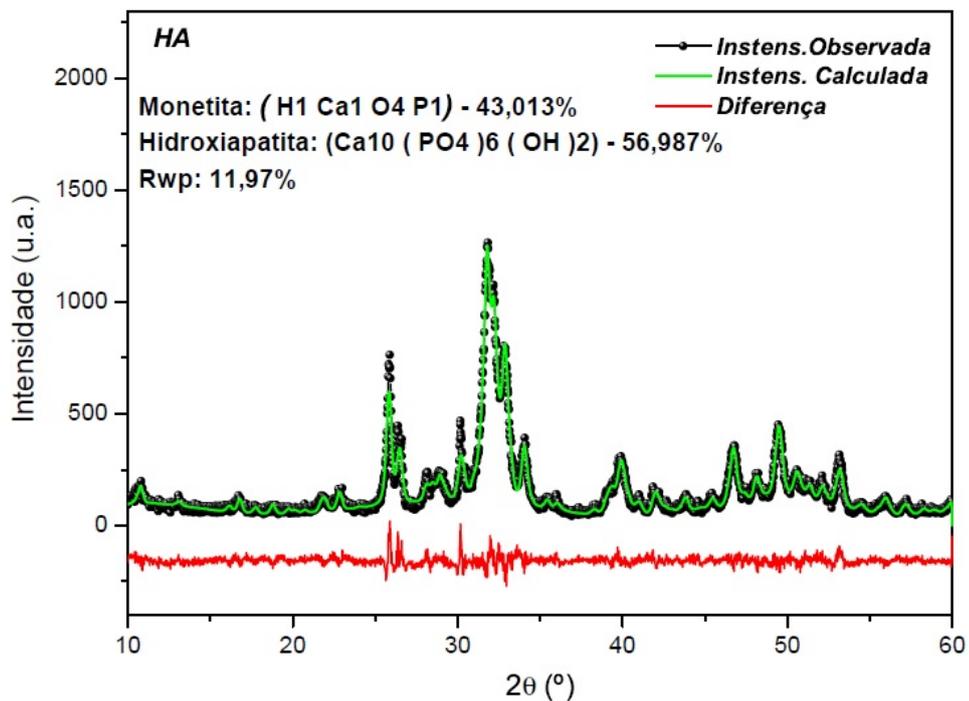


Figura 11: Difratograma da HA (SIGMA) após refinamento pelo método de Rietveld.

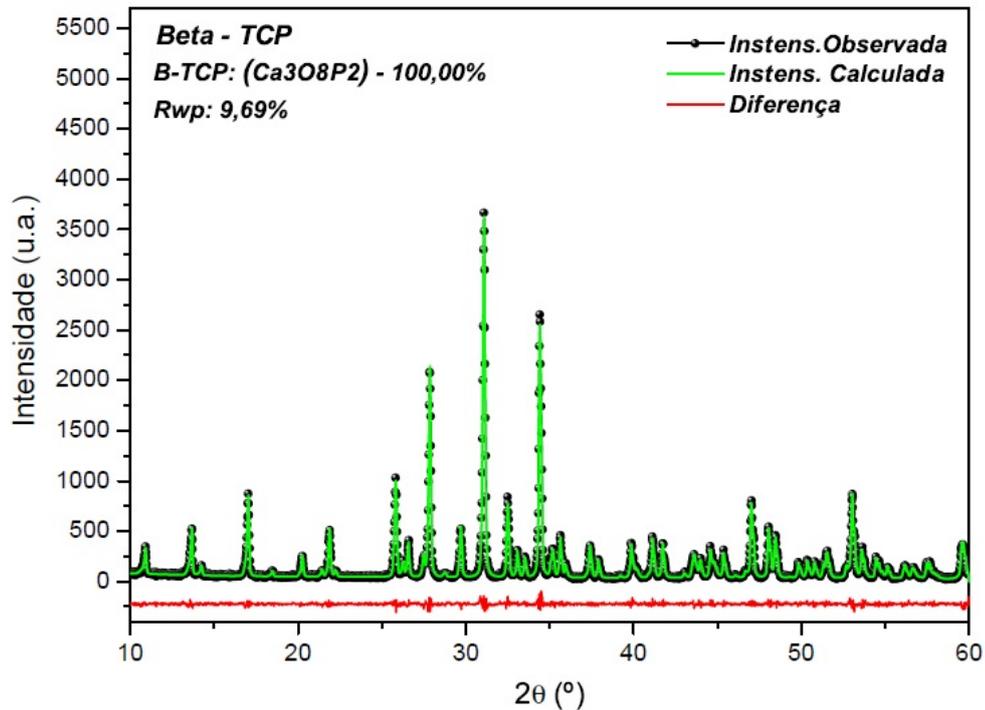


Figura 12: Difratograma do β -TCP (CERTBIO) por refinamento pelo método de Rietveld.

De acordo com o refinamento e o banco de dados do programa *X'Pert High Score Plus*, para a identificação do material através da sobreposição de picos, foram obtidas duas fases no pó da HA (SIGMA) (Figura 11), a fase monetita (43,013%) e a fase HA (56,987%), e não uma fase 100% de HA como desejado, porém na própria descrição do material consta uma composição de $\geq 90\%$ de TCP, ou seja, uma HA deficiente em cálcio por isso o aparecimento de 2 fases cristalinas. Também foi possível identificar, a partir do arquivo de saída após o refinamento, as respectivas estruturas cristalinas, além das informações sobre os parâmetros refinados e o fator de confiança do refinamento que foi de $R_{wp} = 11,97\%$, conforme apresentado na Tabela 8 (Palache *et al.*, 1951; MacLennan e Beevers, 1955; De Wolff, 1957).

Tabela 8: Dados da HA (SIGMA) obtidos por refinamento de Rietveld.

	Monetita	Hidroxiapatita
Sistema Cristalino	Triclínico	Hexagonal
Grupo Espacial	P-1	P63
a [Å]	6.91105	9.40247
b [Å]	6.61373	9.40247
c [Å]	6.98700	6.87471
α [°]	96.230	90.000
β [°]	104.046	90.000
γ [°]	88.341	120.000
Volume [Å³]	307.981	526.343
Percentual de Fase Cristalina	43,013%	56,987%

O mesmo estudo foi realizado para o pó do β -TCP e de acordo com o refinamento e o banco de dados do programa X'Pert High Score Plus foi obtido apenas uma fase no pó de β -TCP como desejado, a fase β -TCP (100%) (Figura 12). Este resultado obtido demonstra que o processo de obtenção do β -TCP pela transformação do fosfato de cálcio tribásico ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) por meio de reação química e tratamento térmico foi realizado com êxito. Também foi possível identificar, a partir do arquivo de saída após o refinamento, a respectiva estrutura cristalina, além das informações sobre os parâmetros refinados e o fator de confiança do refinamento que foi de $R_{wp} = 9,69\%$, conforme apresentado na Tabela 9 (De Wolff, 1957; Calvo e Gopal, 1975).

Tabela 9: Dados do β -TCP (CERTBIO) obtidos por refinamento de Rietveld.

	B – TCP
Sistema Cristalino	Trigonal
Grupo Espacial	R3C
a [Å]	10.42195
b [Å]	10.42195
c [Å]	37.36558
α [°]	90.000
β [°]	90.000
γ [°]	120.000
Volume [Å³]	3514.799
Percentual de Fase Cristalina	100,0%

4.1.2 Caracterização das amostras de fosfatos de cálcio por DRX

Após o processo de conformação dos grânulos em forma de esferas (Figura 13), as amostras foram separadas em 3 grupos, secas em temperatura ambiente durante 24hs, pesadas e submetidas ao processo de sinterização por um período de 2hs a 300°C, 600°C e 900°C de forma a queimar os polímeros e avaliar o comportamento dos mesmos nas amostras, para além de remover a água residual no interior das amostras e formar uma estrutura estável, porosa e constituída apenas por fosfatos de cálcio (Figura 14).



Figura 13: Grânulos esféricos de fosfatos de cálcio após conformação.



Figura 14: Amostras pós-sinterização. Amostra 1 - 300°C; amostra 2 - 600°C e amostra 3 - 900°C.

Após o processo de sinterização, observa-se uma diferença visual entre as amostras quanto a sua coloração, variando de uma coloração castanha escura na

amostra 1 (300°C), o que demonstra a presença de material polimérico e a sua não degradação completa a esta temperatura, a uma coloração branco claro na amostra 3 (900°C), devido a total degradação dos polímeros tendo apenas os fosfatos de cálcio presentes na amostra.

Cada grupo de amostra corresponde a cerca de 10 mL da pasta aquosa composta por polímeros e fosfatos de cálcio. O número de amostras e a perda de massa de cada grupo após a sinterização encontram-se na Tabela 10. Observa-se que a maior perda de massa ocorreu no 3º grupo de amostras que foram submetidas a uma sinterização a 900°C com perda de 8,902 % de massa. Esse resultado demonstra uma coerência com o resultado apresentado na Figura 14, já que quanto maior for a temperatura que as amostras são submetidas maior a tendência da degradação do material polimérico, permanecendo apenas a fase cerâmica da amostra. Deve-se salientar que, anteriormente ao processo de sinterização, já ocorreu uma pequena perda de massa durante o processo de secagem em estufa a 50°C durante 24hs.

Tabela 10: Perda de massa das amostras após sinterização (n = número de grânulos produzidos).

Amostra	n	Temperatura	Massas (g)	Perda de Massa (%)
1	550	300°C	Inicial = 2,4800 g Final = 2,3648 g	4,605 %
2	482	600°C	Inicial = 2,7467 g Final = 2, 5184 g	8,311 %
3	478	900°C	Inicial = 2,7755 g Final = 2, 5284 g	8,902 %

Posteriormente ao processo de sinterização, foi realizado a caracterização por DRX dos grânulos do grupo 3 (grupo de amostras com maior perda de massa) com objetivo de identificar o perfil das fases cristalinas dos fosfatos de cálcio submetidas a uma sinterização de 900°C.

De acordo com o refinamento e o banco de dados do programa *X'Pert High Score Plus*, para a identificação do material através da sobreposição de picos, foram obtidas as duas fases cerâmicas propostas no estudo, a fase HA (22,891%) e a fase β -TCP (77,109%), porém não na proporção de 25% HA e 75% β -TCP como desejado (Figura 15), mas próximo do objetivo, o que pode ser considerado um êxito

por se ter obtido as fases cristalinas desejadas com apenas uma pequena diferença nas proporções. Essa diferença pode ser atribuída a presença de fase amorfa nos CaPs, além dos ajustes matemáticos do refinamento pelo método Rietveld. Também foi possível identificar, a partir do arquivo de saída após o refinamento, as respectivas estruturas cristalinas, além das informações sobre os parâmetros refinados e o fator de confiança do refinamento que foi de $R_{wp} = 10,85\%$, conforme apresentado na Tabela 11 (Palache *et al.*, 1951; De Wolff, 1957; Calvo e Gopal, 1975; Ebrahimi e Botelho, 2017; Ebrahimi *et al.*, 2017).

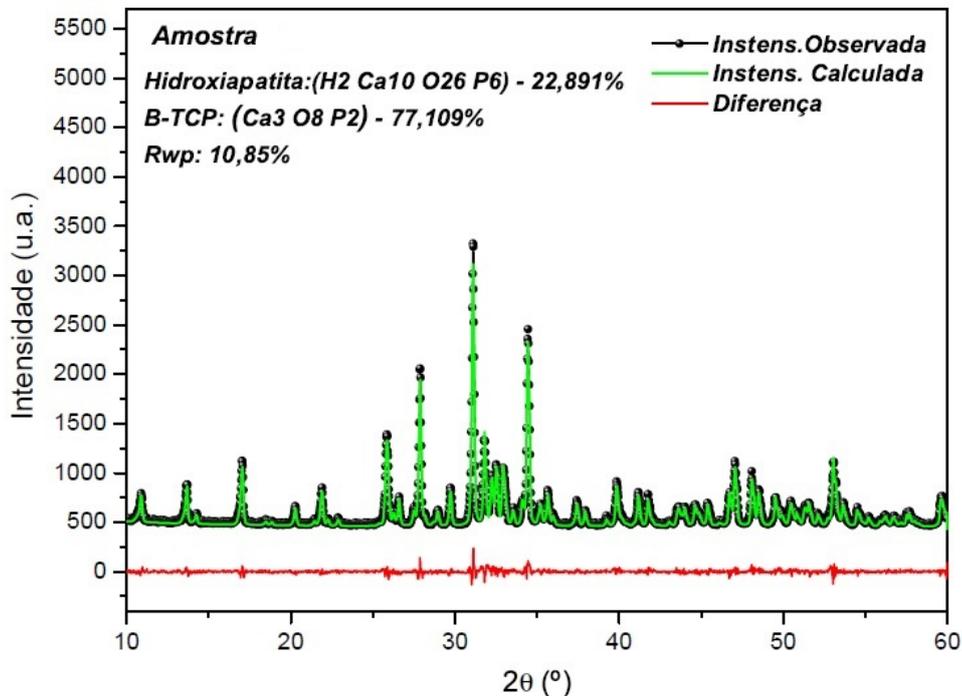


Figura 15: Difratograma da amostra pós-sinterização a 900°C após refinamento pelo método de Rietveld.

Tabela 11: Dados da amostra pós-sinterização a 900°C obtidos por refinamento de Rietveld.

	Beta – TCP	Hidroxiapatita
Sistema Cristalino	Trigonal	Hexagonal
Grupo Espacial	P-1	P63/m
a [Å]	10.41779	9.42634
b [Å]	10.41779	9.42634
c [Å]	37.36557	6.87868
α [°]	90.000	90.000
β [°]	90.000	90.000
γ [°]	120.000	120.000
Volume [Å³]	3511.990	529.324
Percentual de Fase Cristalina	77,109%	22,891%

4.1.3 Análise termogravimétrica (TGA)

A Figura 16 apresenta a curva termogravimétrica da amostra composta por água, polímeros e fosfatos de cálcio antes do processo de sinterização.

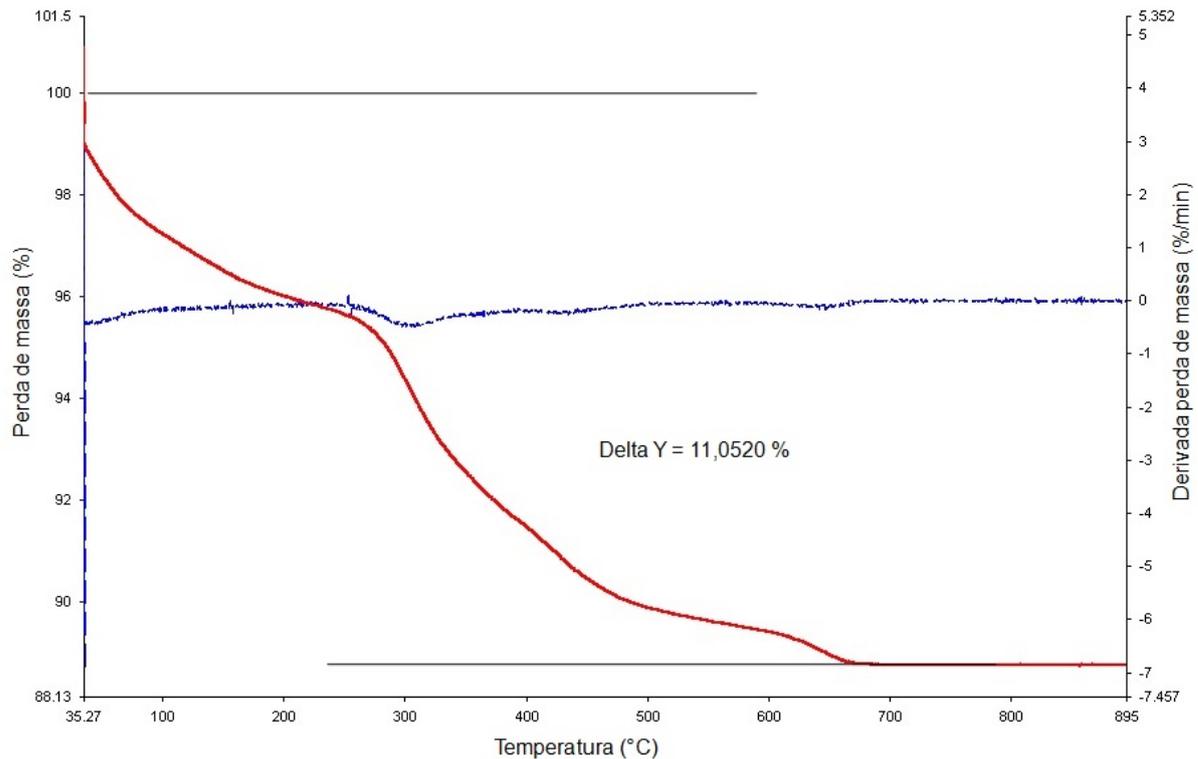


Figura 16: Curvas de análise termogravimétrica e sua derivada (TG e DTG) para a amostra de polímeros e fosfatos de cálcio.

A análise termogravimétrica (TGA) da amostra teve como resultado uma perda de massa total de 11,0520%, que corresponde primeiramente a uma perda inicial de água residual aprisionada no interior da amostra, ou seja, uma desidratação do material, e posteriormente a perda da massa polimérica da amostra tanto o ALG como o poliacrilato de amônio, sendo o remanescente apenas a fase cerâmica da amostra que corresponde a 88,948%. Segundo a base de dados da *World of Chemicals* (Worldofchemicals, 2016b) a temperatura de fusão do ALG é acima de 300°C, semelhante ao resultado apresentado pela amostra, já que a mesma apresentou uma perda de massa mais significativa entre 300°C e 490°C, e após os 490°C observa-se a diminuição da massa polimérica até a sua completa degradação em torno de 680°C e 700°C.

Este resultado corrobora com o apresentado por Belalia e Djelali (2014) e Ostrowska-Czubenko e Gierszewska-Druzynska (2009), onde mostram em seus estudos que a perda de massa do ALG ocorre primeiramente devido a desidratação, seguido de decomposição que está associada a degradação do ALG em carbonato de sódio (Na_2CO_3), e posteriormente pela decomposição do carbonato de sódio (Na_2CO_3) em óxido de sódio (Na_2O) com liberação de dióxido de carbono (CO_2), ou seja, o ALG é decomposto por desidratação, seguido por degradação e um material carbonizado que se decompõe lentamente a partir dos 500°C até sua total eliminação em atmosfera de N_2 .

4.1.4 Microscopia óptica de reflexão (MO)

As imagens obtidas através da técnica de MO foram empregadas para a avaliação morfológica dos grânulos de CaPs pós-sinterização a 300°C , 600°C e 900°C . A Figura 17, mostra resquícios da presença de material polimérico a 300°C , especificamente manchas e uma coloração castanha escura proveniente da degradação dos polímeros ainda presentes na amostra a esta temperatura, especificamente do ALG e não do dispersante LIOSPERSE®511 já que o seu ponto de ebulição é de 141°C , segundo a base de dados da *World of Chemicals* (Worldofchemicals, 2016a). Porém as imagens das Figura 18 e Figura 19, mostram uma pequena variação de coloração entre as amostras sinterizadas a 600°C e 900°C . Ambas demonstram uma coloração branca, porém mais claras nas amostras sinterizadas a 900°C , provavelmente devido a total degradação dos polímeros presentes nas amostras a esta temperatura, restando apenas à fase cerâmica nas amostras.

Além da diferença de coloração apresentada nas imagens, pode-se observar uma geometria esférica das amostras, uma superfície rugosa e alguns pontos escuros a 600°C e 900°C (provavelmente impurezas na superfície da amostra) com um aumento de 20X. A Figura 20 mostra o diâmetro da amostra após sinterização de 900°C , porém o diâmetro médio ficou em torno dos $1900\mu\text{m}$ para todos os grupos de amostras e muito acima do proposto pelo estudo. Para a obtenção desta média foram selecionados 12 grânulos aleatórios de cada grupo de

amostra e mensurados. Este número de amostras mensuradas é considerado muito baixo para se obter uma média concreta, porém satisfatória para esta etapa do estudo. Não ocorreu diminuição significativa deste diâmetro médio, com o aumento da temperatura aplicada nas amostras nesta fase do estudo experimental.

Os resultados apresentados pela técnica de MO corroboram com os resultados obtidos pela análise de TGA e perdas de massas apresentados anteriormente. A análise de MO mostra na superfície das amostras a 300°C resquícios de massa polimérica a serem degradados devido a coloração castanha escura, enquanto que na técnica de TGA foi observado uma perda de massa polimérica mais significativa entre 300°C e 490°C, o que demonstra que a esta temperatura há polímero a ser degradado. Este fato é confirmado ao confrontar as imagens de MO das amostras a 900°C com a TGA na mesma faixa de temperatura, que mostra a completa degradação da massa polimérica a 900°C, e esta degradação evidenciada pela coloração branca muito clara das amostras, o que isenta a presença de material polimérico e sim, apenas, material cerâmico.

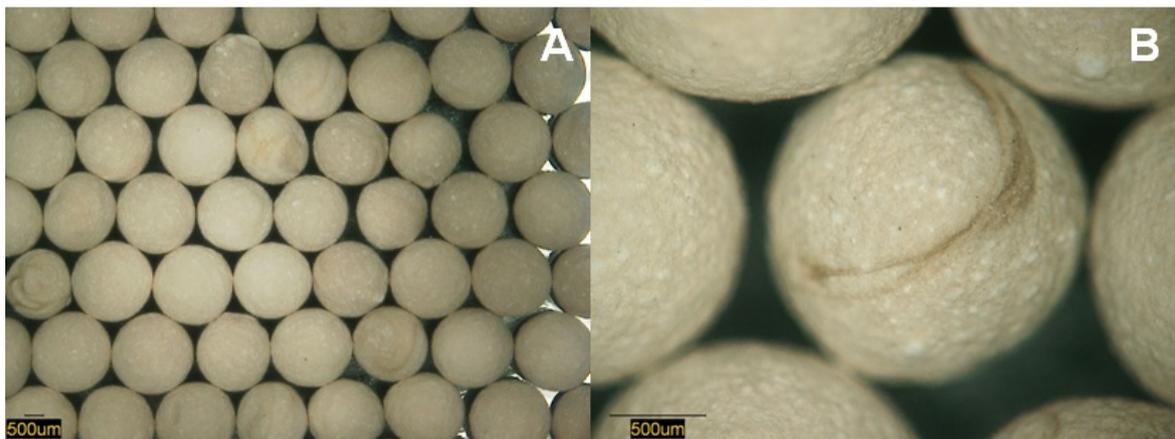


Figura 17: Microscopia óptica das amostras sinterizadas a 300°C. (A) Aumento de 20X; (B) Aumento de 100X.

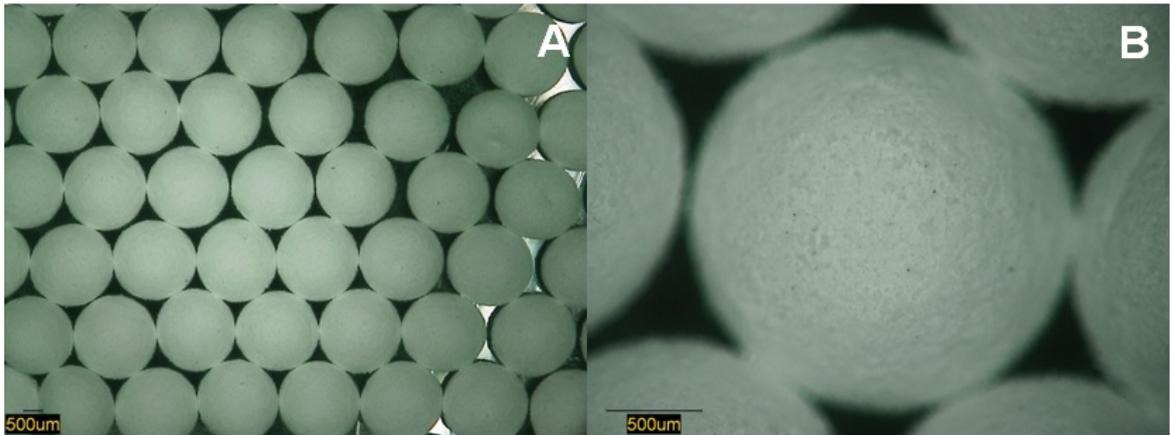


Figura 18: Microscopia óptica das amostras sinterizadas a 600°C. (A) Aumento de 20X; (B) Aumento de 100X.

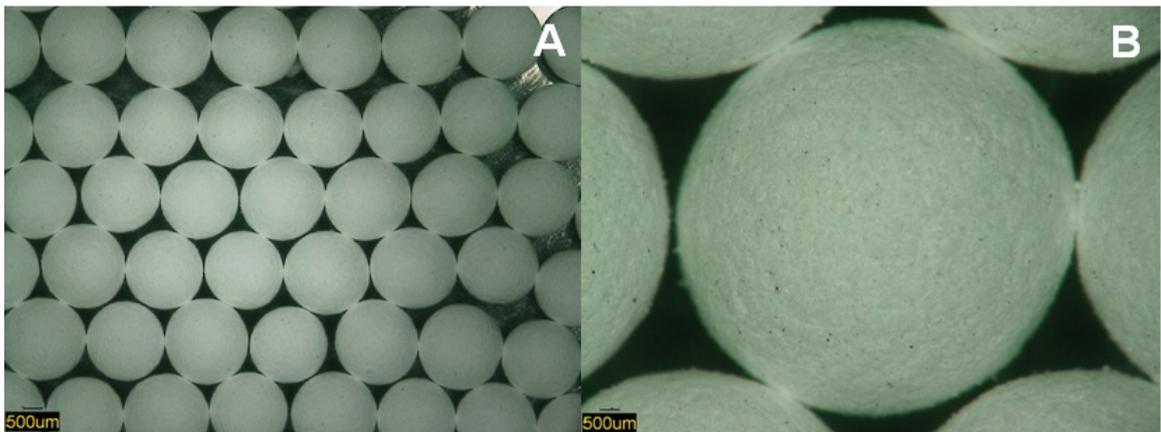


Figura 19: Microscopia óptica das amostras sinterizadas a 900°C. (A) Aumento de 20X; (B) Aumento de 100X.

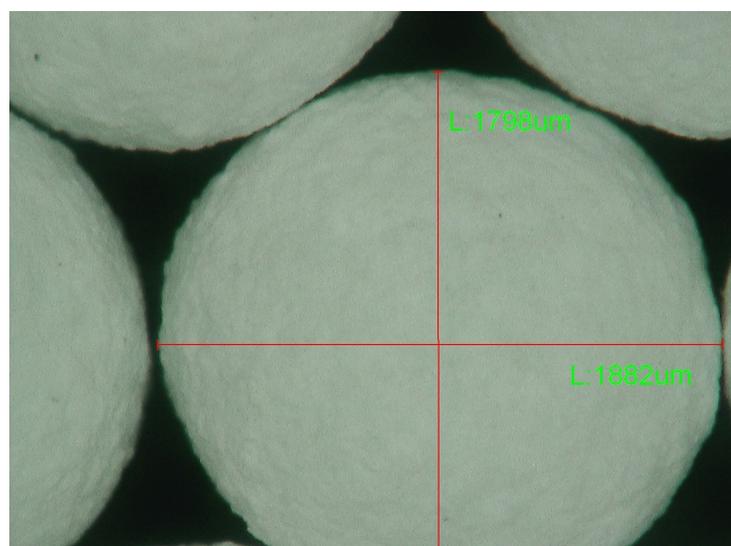


Figura 20: Microscopia óptica da amostra sinterizada a 900°C com aumento de 100X.

4.1.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) também foi empregada para avaliação dos grânulos de fosfatos de cálcio, obtendo imagens com maiores ampliações e definições da superfície das amostras. A Figura 21 mostra as imagens obtidas através da técnica de MEV da superfície das amostras pré e pós-sinterização a 900°C com um aumento de 2000X. Observa-se em ambas as imagens uma superfície compacta e rugosa, com microporosidades e a presença de 2 tipos de grânulos de fosfatos de cálcio de morfologia e diâmetros diferentes antes e após a sinterização. Não se identificam grandes diferenças na morfologia da superfície de ambas as imagens, quanto menos a presença de polímeros na superfície da área da amostra da imagem A, porém esta possibilidade não pode ser descartada.

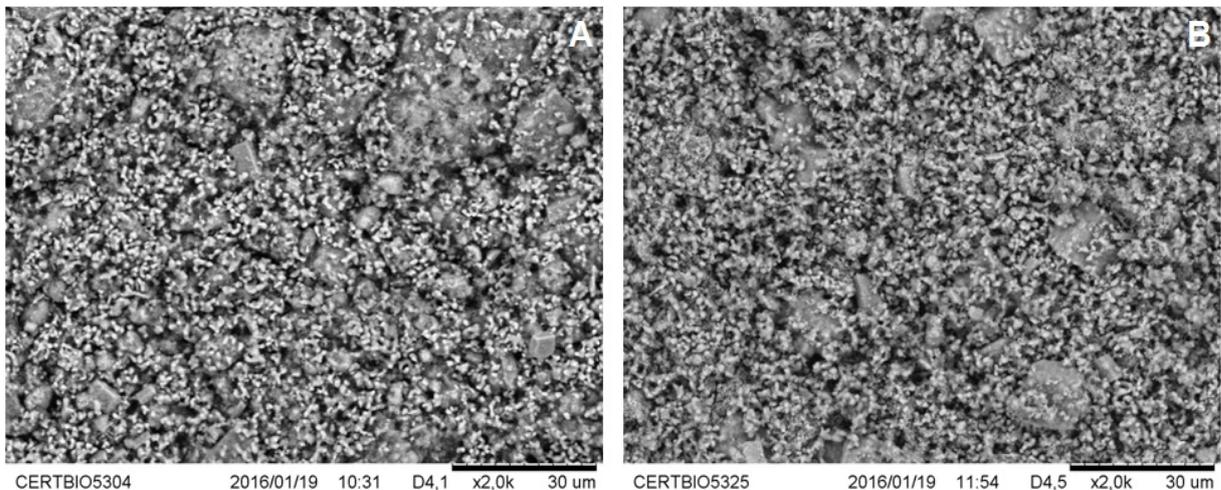


Figura 21: Microscopia eletrônica das amostras pré (A) e pós-sinterização (B) com aumento de 2000X.

4.2 Fase Sólida (Grânulos de Fosfatos de Cálcio) - PRODUTO FINAL

Finalizada a parte experimental quanto à produção dos grânulos de CaPs que teve como propósito caracterizar e aperfeiçoar a técnica de conformação do biomaterial, a técnica empregada na produção dos grânulos foi modificada com a finalidade de diminuir o tamanho das amostras, mantendo a sua forma esférica, e

realizar as devidas caracterizações para comprovar a sua eficácia, já que na fase experimental obteve-se um diâmetro médio de 1900 μ m bem acima do proposto.

Após o processo de conformação das amostras, através de um bico atomizador duplo fluido, foram gerados 3 grupos de amostras a serem avaliados devido ao fluxo e o caudal da pasta ter sido regulado em 3 variações (50 mL/h, 70 mL/h e 90 mL/h) com a pressão do ar fixada em 0,4 bar. Posteriormente, as amostras foram separadas, secas em temperatura ambiente durante 24hs, pesadas, preparadas a serem submetidas ao processo de sinterização e caracterizadas. Porém, uma fração de amostra formada por uma parte de cada um dos 3 grupos, foi submetida a uma análise dilatométrica antes do processo de sinterização.

4.2.1 Dilatometria (DIL)

A Figura 22 apresenta a curva dilatométrica da amostra composta por água, polímeros e fosfatos de cálcio antes do processo de sinterização.

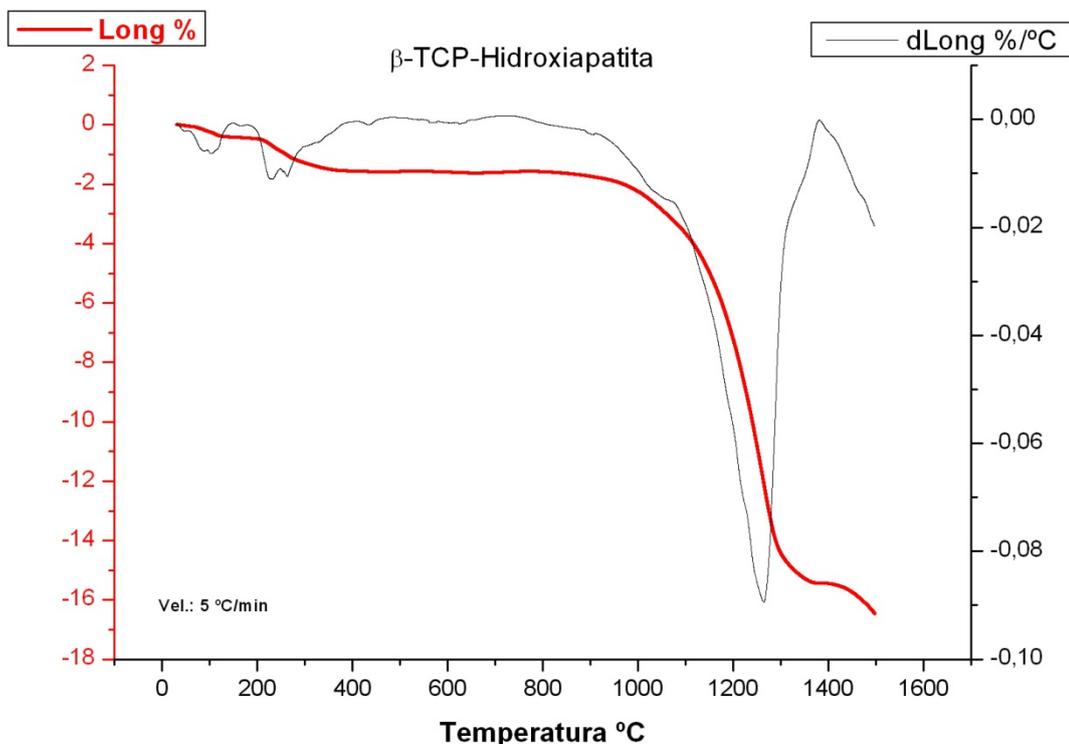


Figura 22: Análise dilatométrica da amostra contendo polímeros e fosfatos de cálcio.

A DIL foi empregada com o objetivo de avaliar os fenômenos que ocorrem na amostra, submetida a um programa de temperatura e tempo controlado, mas principalmente avaliar com segurança a que temperatura a amostra deverá ser sinterizada sem que haja mudança de fase do material, por se tratar de uma amostra que contem fosfatos de cálcio.

A análise dilatométrica da amostra teve como resultado uma série de comportamentos, na faixa de temperatura de 0°C até 1500°C. Observando a derivada ($d\text{Log\%/}^\circ\text{C}$), primeiramente ocorre uma contração devido à secagem da amostra em torno dos 100°C, tendo o efeito completo entre 220°C e 400°C devido à eliminação dos polímeros. Entre 900°C e 950°C dá-se o início do processo de densificação, observa-se uma mudança brusca na inclinação da curva dilatométrica, com um pico negativo correspondente a máxima velocidade de sinterização aos 1260°C. Este resultado é também observado por Ghosh e Sarkar (2016) ao avaliar o comportamento da densificação do β -TCP. Entre 1300°C e 1350°C ocorre uma parada aparente da sinterização, provavelmente devido à decomposição da HA, porém o processo de densificação retorna aos 1380°C. Aos 1500°C observa-se uma contração de 17% da amostra, próximo de finalizar a completa densificação.

Ao término da análise por DIL, concluiu-se que para o processo de sinterização do produto final, as amostras seriam submetidas a uma temperatura de 900°C durante 2hs com uma taxa de aquecimento de 5°C/min, a mesma temperatura utilizada na fase experimental. A esta temperatura de 900°C, as amostras estão no início da temperatura do processo de densificação que se inicia entre 900°C e 950°C, e abaixo dos 1125°C quando ocorre a transformação de fase de β -TCP para α -TCP, ou seja, uma faixa de temperatura de trabalho segura, o que permite a produção de um material rígido, poroso, mantendo as fases cerâmicas desejadas no produto final.

4.2.2 Difração por raios X (DRX)

As amostras, após serem submetidas ao processo de sinterização 900°C, foram caracterizadas por DRX com objetivo de identificar o perfil das fases cristalinas dos fosfatos de cálcio do produto final.

De acordo com o refinamento e o banco de dados do programa *X'Pert High Score Plus*, foram obtidas as duas fases cerâmicas propostas no estudo, a fase HA (26,878%) e a fase β -TCP (73,122%), próximo a proporção desejada de 25% HA e 75% β -TCP (Figura 23). Observa-se que as amostras do produto final, em comparação com as amostras da fase experimental, tiveram uma diminuição da fase β -TCP e conseqüentemente um aumento da fase HA. Também foi possível identificar, a partir do arquivo de saída após o refinamento, as respectivas estruturas cristalinas, as informações sobre os parâmetros refinados e o fator de confiança do refinamento que foi de $R_{wp} = 15,10\%$, conforme apresentado na Tabela 12 (Palache *et al.*, 1951; Calvo e Gopal, 1975; Ebrahimi e Botelho, 2017; Ebrahimi *et al.*, 2017).

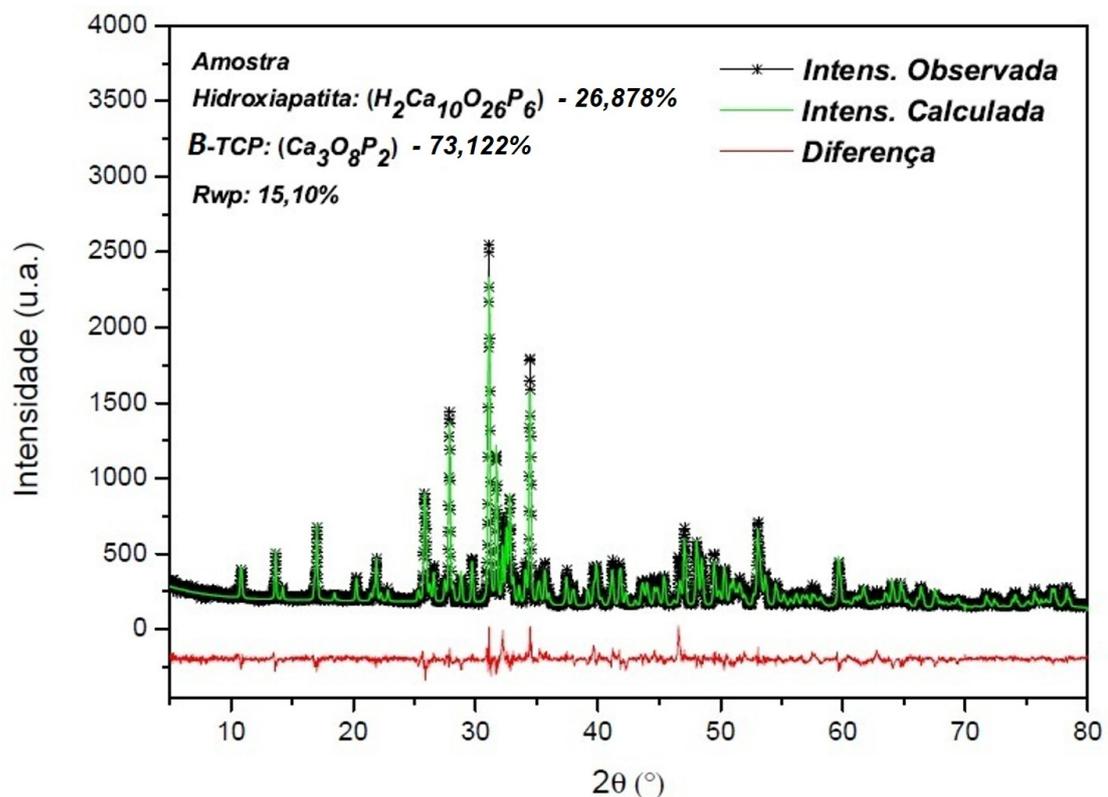


Figura 23: Difratoograma da amostra pós sinterização a 900°C após refinamento pelo método de Rietveld.

Tabela 12: Dados da amostra pós sinterização a 900°C obtidos por refinamento de Rietveld.

	Beta – TCP	Hidroxiapatita
Sistema Cristalino	Trigonal	Hexagonal
Grupo Espacial	R3C	P63/m
a [Å]	10.41323	9.45871
b [Å]	10.41323	9.45871
c [Å]	37.33889	6.86625
α [°]	90.000	90.000
β [°]	90.000	90.000
γ [°]	120.000	120.000
Volume [Å³]	3506.410	532.004
Percentual de Fase Cristalina	73,122%	26,878%

4.2.3 Granulometria

Os grânulos de CaPs dos 3 grupos, após o processo de sinterização, foram separados em um agitador eletromagnético de peneiras nas faixas de 0-150, 150-250, 250-500, 500-710, 710-1000 e 1000 μm . A distribuição do tamanho dos grânulos, massa e o acumulado, produzidos de acordo com as variações do fluxo e caudal da pasta, estão apresentadas nas Figura 24, Figura 25 e Figura 26.

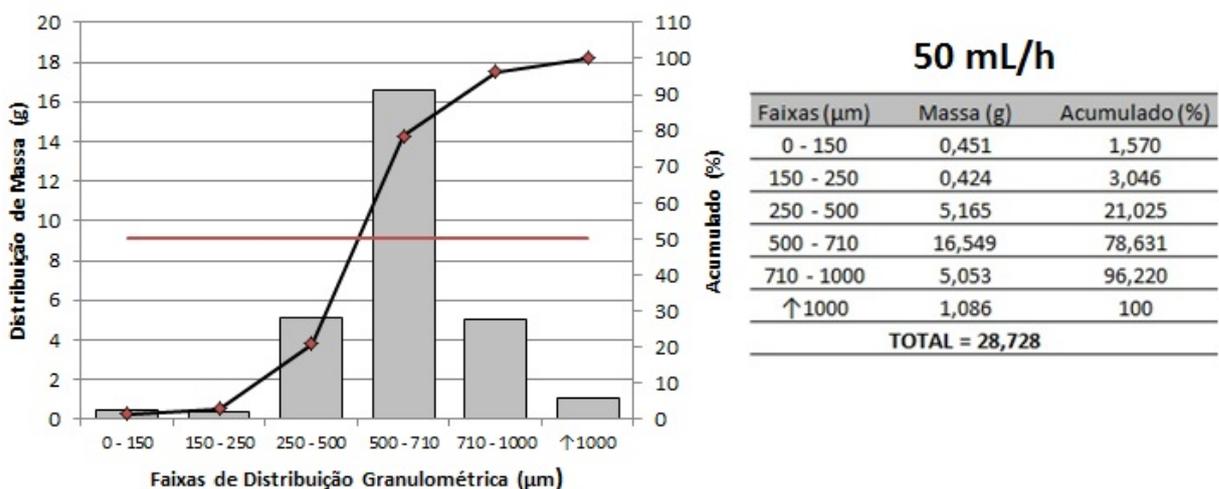


Figura 24: Distribuição granulométrica (50 mL/h) após etapa de sinterização a 900°C. Massa (g) e o acumulado (%) correspondente por faixas (μm).

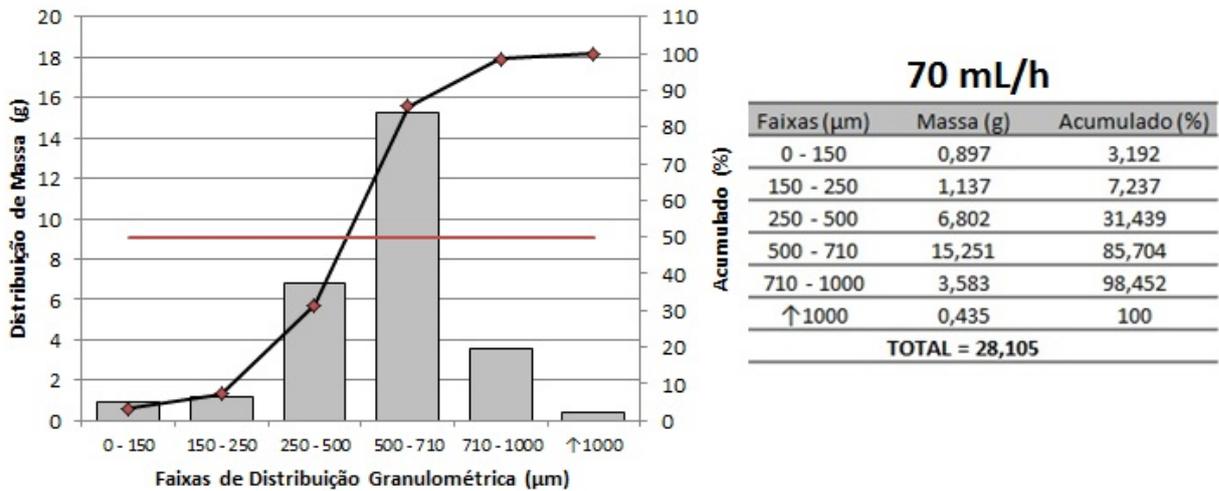


Figura 25: Distribuição granulométrica (70 mL/h) após etapa de sinterização a 900°C. Massa (g) e o acumulado (%) correspondente por faixas (μm).

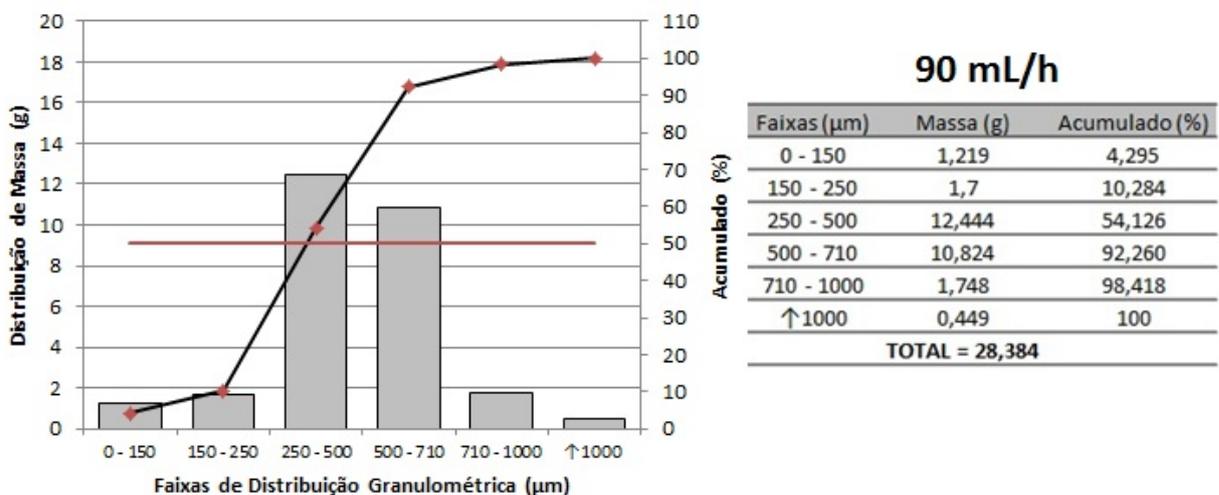


Figura 26: Distribuição granulométrica (90 mL/h) após etapa de sinterização a 900°C. Massa (g) e o acumulado (%) correspondente por faixas (μm).

O comportamento da distribuição granulométrica variou de acordo com o fluxo e o caudal da pasta empregado para a produção dos grânulos de CaPs. Observa-se que utilizando um fluxo e caudal de 50 mL/h, houve uma maior distribuição dos grânulos de CaPS e massa na faixa de 500-710 μm , porém com o aumento desse fluxo para 70 mL/h e 90 mL/h, ocorreu uma migração gradativa de maior distribuição granulométrica da faixa 500-710 μm para a faixa 250-500 μm , o

mesmo ocorrendo para a massa, sendo a faixa 250-500 μm um pouco maior do que a da faixa 500-170 μm aos 90 mL/h. Consequentemente, o mesmo ocorreu para o acumulado, já que pode-se constatar uma tendência na diminuição do tamanho médio dos grânulos de CaPs (50%) ao analisar os 3 gráficos.

Estes resultados mostram que, quanto maior o fluxo e caudal usado na produção dos grânulos de CaPS, ocorre uma propensão para a produção de grânulos de menor diâmetro. Deve-se salientar que não houve variação da pressão utilizada neste estudo, fato este relevante, pois havendo uma variação neste parâmetro haverá mudanças na distribuição granulométrica.

4.2.4 Microscopia óptica de reflexão (MO)

As imagens obtidas através da técnica de MO foram empregadas para a avaliação morfológica dos grânulos de CaPs pós sinterização a 900°C. Foram analisados 2 grupos de amostras consoante a faixa granulométrica, 250-500 μm e 500-710 μm . A escolha desses grupos foi devido a dois fatores principais, a maior produção de grânulos dentro dessas faixas granulométricas através da técnica empregada e, amostras nessas dimensões proporcionam poros entre grânulos favoráveis ao crescimento celular especialmente osteoblastos.

A Figura 27 e Figura 28 apresentam amostras com uma coloração branca clara, devido a total degradação dos polímeros presentes nas amostras a 900°C, restando apenas à fase cerâmica nos grânulos. Além da coloração das amostras apresentada nas imagens, pode-se observar uma superfície rugosa com alguns pontos escuros (provavelmente impurezas na superfície da amostra) e uma geometria esférica. O padrão do tamanho e formato das amostras é mais homogêneo nas amostras da faixa de 500-710 μm , do que nas amostras da faixa 250-500 μm , o que leva a crer que quanto menor o tamanho do grânulo, maior a dificuldade no controle do padrão das amostras, quanto a sua forma, para o sistema de produção das amostras empregado neste estudo.

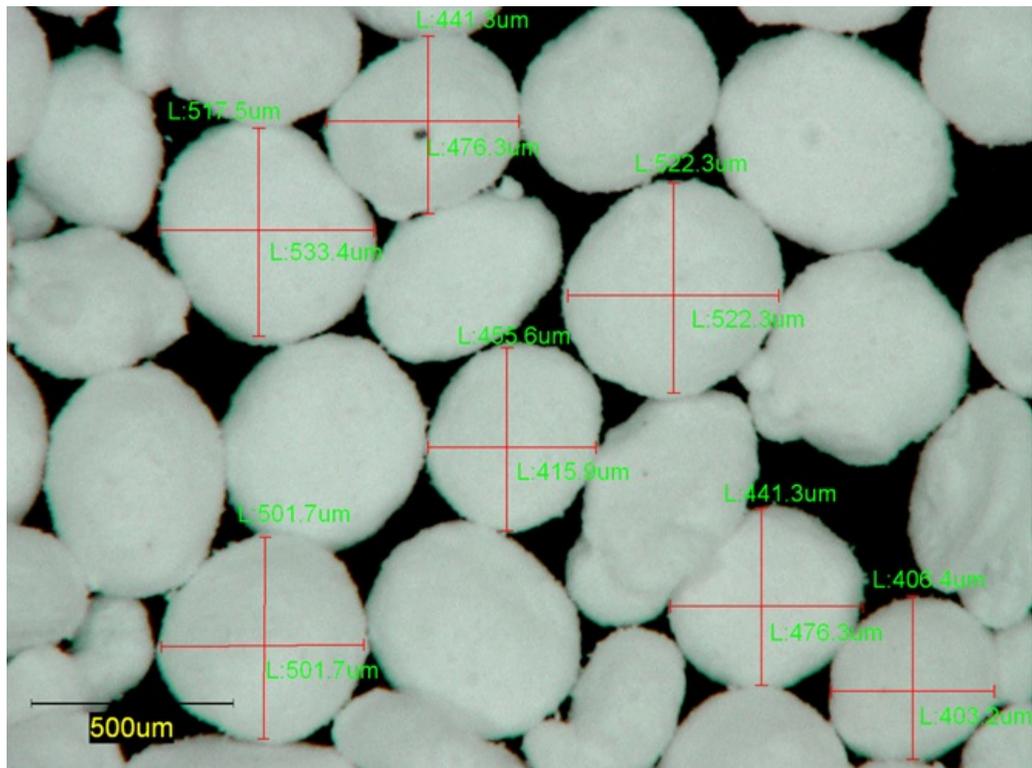


Figura 27: Microscopia óptica das amostras 250-500 µm sinterizadas a 900°C (120X).

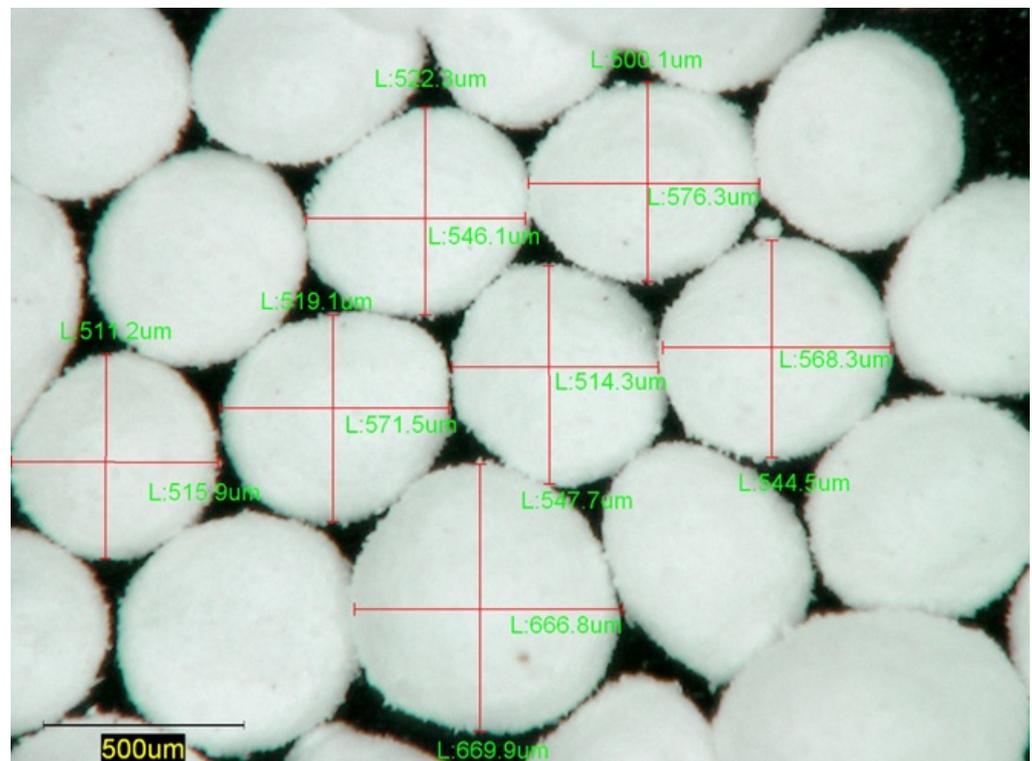


Figura 28: Microscopia óptica das amostras 500-710 µm sinterizadas a 900°C (120X).

Estas evidências vão de encontro com os estudos de Dorozhkin (2010) e Ebrahimi *et al.* (2017), que embora as biocerâmicas de CaPs tenham inúmeras vantagens, elas podem apresentar presença de impurezas, difícil controle de porosidade e, tamanho e forma de grânulos não homogêneos. Além disso, os tamanhos dos poros estão diretamente relacionados com a formação óssea, uma vez que proporcionam superfície e espaço para a adesão celular e crescimento ósseo.

Para além da análise morfológica, foram mensurados os diâmetros dos grânulos (Figura 27 e Figura 28), tendo as amostras do grupo correspondente à faixa de 250-500 µm um diâmetro médio de 472,5 µm, enquanto que as amostras compreendidas na faixa de 500-710 µm um diâmetro médio de 583,8 µm. Para a obtenção destas médias foram selecionados 7 grânulos aleatórios de cada grupo de amostra e mensurados. Este número de amostras mensuradas é considerado baixo para se obter uma média concreta, porém satisfatória para esta etapa do estudo.

Com o auxílio da análise de MO, foram obtidos o diâmetro médio das amostras, e conseqüentemente, foi possível calcular o tamanho médio dos poros entre os grânulos, considerado um sistema teórico de empacotamento compacto, regular e de esferas idênticas não sobrepostas, no qual há um mínimo desperdício de espaço.

Por geometria, é possível determinar o raio da esfera contida no espaço vazio com relação ao raio da esfera principal, uma representação do raio dos poros e do raio do grânulo de CaPs, respectivamente. Conforme a Figura 29, considerando um plano cartesiano, onde o centro do poro é o centro do plano (0,0), e os três centros das esferas têm a mesma distância (D) ao centro do poro, tem-se:

$$\mathbf{D = R + r \rightarrow r = D - R} \quad (2)$$

Onde: D é a distância do centro da esfera 01 ao centro da esfera 02, R é o raio da esfera 01 e r é o raio da esfera 02.

Unindo os centros das esferas 01 pela menor distância entre eles, tem-se um triângulo equilátero com lado (L) igual a duas vezes o raio da esfera 01 (2R). Circunscrito a esse triângulo tem-se um círculo de raio igual a D. Por geometria, é sabido que:

$$\mathbf{D = \frac{\sqrt{3}}{3} L; Logo: D = \frac{\sqrt{3}}{3} 2R} \quad (3)$$

Substituindo (3) em (2):

$$\mathbf{r = 2R \frac{\sqrt{3}}{3} - R} \quad (4)$$

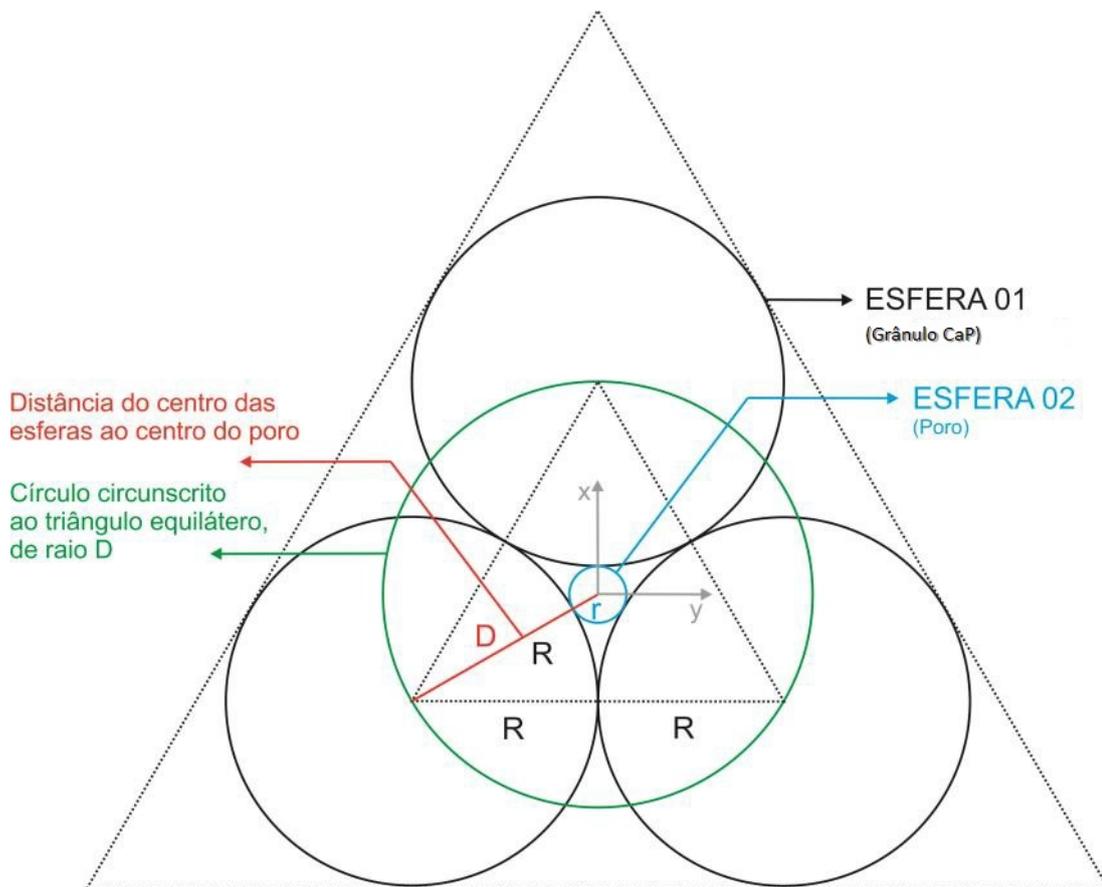


Figura 29: Esquema geométrico da relação entre o raio do poro e o raio das esferas, considerando o centro do poro como centro do plano cartesiano (0,0) (Sampaio, 2016).

Desta forma, a partir da equação (4) foram estimados os diâmetros médios das duas amostras utilizadas, sendo 72,765 μm para a faixa de grânulos entre 250-500 μm e 89,90 μm para a faixa de 500-710 μm .

Os estudos de Dorozhkin (2010), Lu *et al.* (1999), Okii *et al.* (2001), Hong *et al.* (2013) e dentre outros, mostram que o tamanho mínimo de poro requerido é de aproximadamente 100 μm devido ao tamanho e migração de células. Além disso, o tamanho de poro necessário para aumentar a taxa de crescimento óssea e a formação de capilares é considerado superior a 300 μm , e os tamanhos de poros na faixa de 300-500 μm promove o transporte em massa de nutrientes e vascularização.

Baseado nestes estudos, os poros obtidos em ambas as amostras estão abaixo dos 100 μm , porém um tamanho bem acima e suficiente para a acomodação dos osteoblastos que estão na faixa de 20-30 μm de diâmetro. Foi considerado para a determinação do diâmetro médio dos poros um sistema teórico de empacotamento compacto, regular e de esferas idênticas não sobrepostas, porém deve-se lembrar que o biomaterial produzido em questão é um IBS e não um *scaffold*, e que os grânulos de CaPS estão envolvidos por um hidrogel, o que pode proporcionar um aumento do diâmetro médio do poro (aumento do espaço entre os grânulos de CaPs) pela presença do polímero.

4.2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A técnica de MEV também foi empregada para avaliação dos grânulos de CaPs, obtendo imagens com maiores ampliações e definições da superfície das amostras. A Figura 30 e Figura 32 apresentam imagens da superfície das amostras de 250-500 μm e 500-710 μm pós sinterização a 900°C. Observa-se em todas as imagens uma superfície compacta e rugosa, com microporosidades e a presença de 2 tipos de CaPs de morfologia e diâmetros diferentes. Não se identificam grandes diferenças na morfologia da superfície de ambas as amostras. As mesmas características são evidenciadas nas análises de seções transversais das amostras 250-500 μm e 500-710 μm , Figura 31 e Figura 33.

Importante salientar que as rugosidades serão importantes para a adesão celular inicial ao implantar o biomaterial em defeitos ósseos, bem como as microporosidades para penetração de fluidos extracelulares contribuindo para a sua bioreabsorção. Hing *et al.* (2005) e Dorozhkin (2010) afirmam que a microporosidade em biocerâmicas, que é definida pela sua capacidade de ser impregnada por fluidos biológicos, resulta do processo de sinterização, enquanto que as dimensões dos poros dependem principalmente da composição do material, do ciclo térmico e do tempo de sinterização.

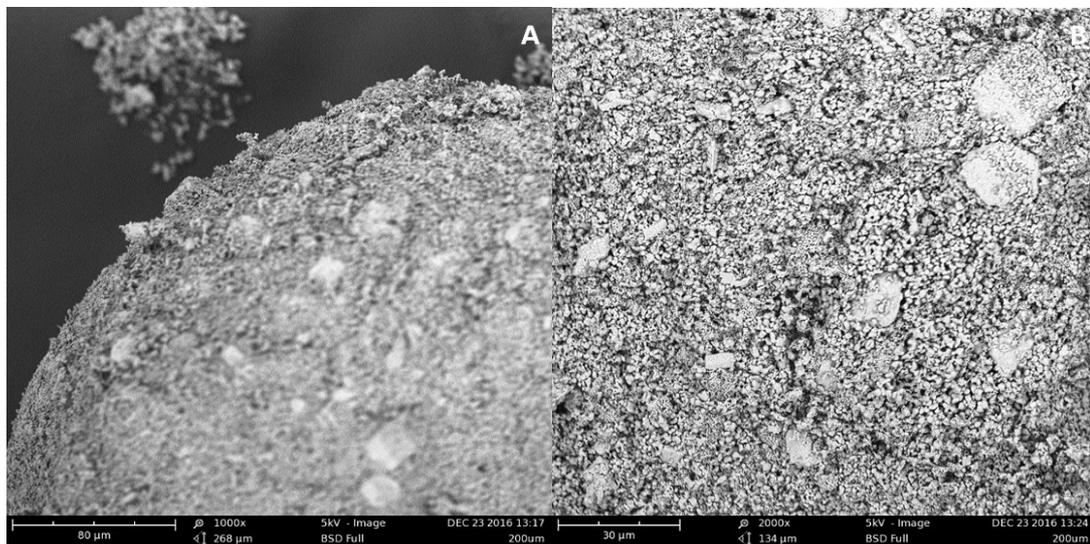


Figura 30: Microscopia eletrônica das amostras de 250-500 µm pós sinterização com aumento de 1000X (A) e 2000X (B).

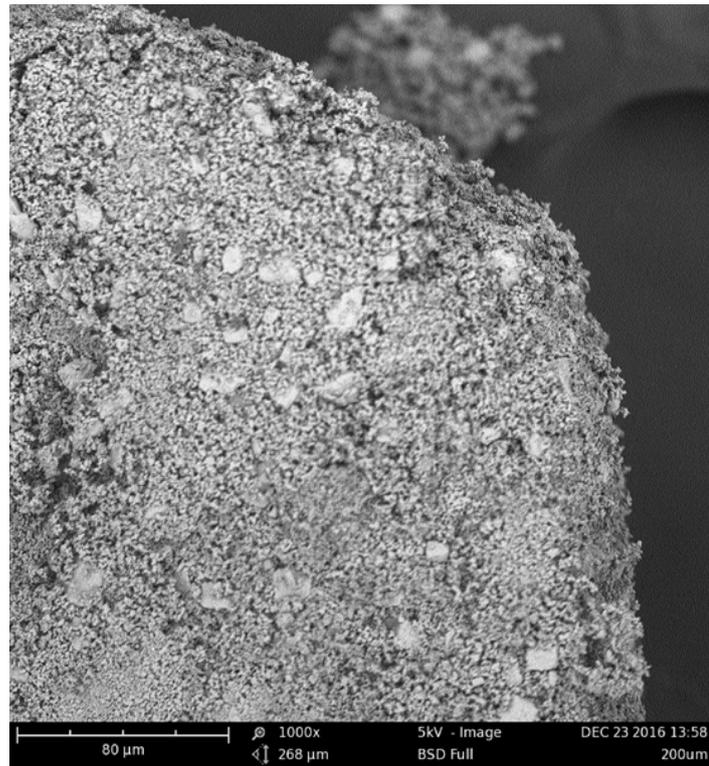


Figura 31: Microscopia eletrônica da amostra 250-500 μm pós-sinterização com um corte transversal aumento de 1000X.

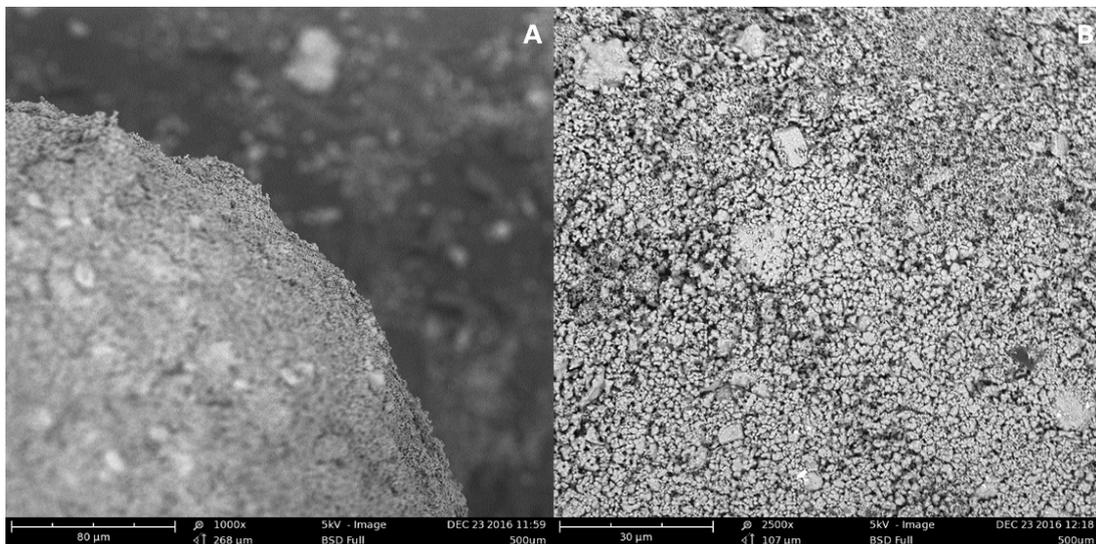


Figura 32: Microscopia eletrônica das amostras de 500-710 μm pós-sinterização com aumento de 1000X (A) e 2500X (B).

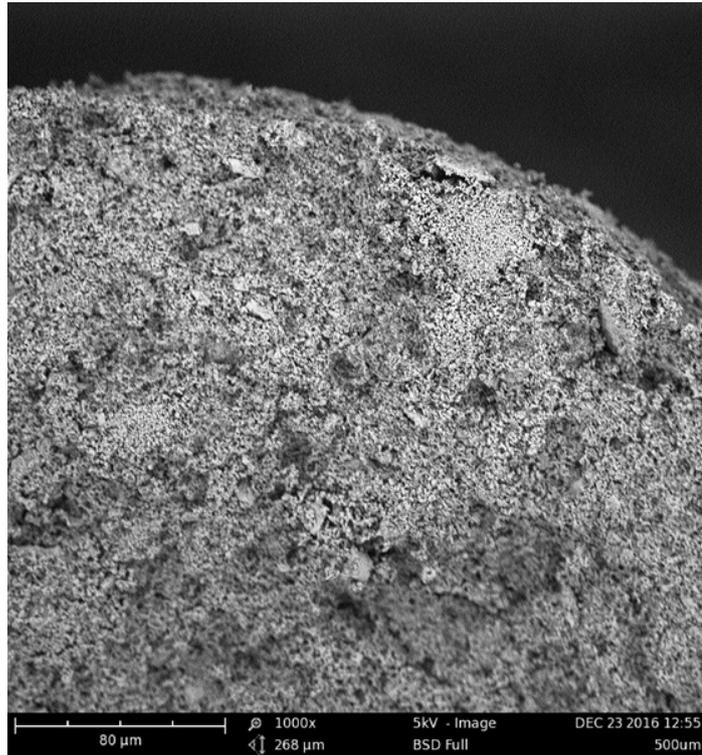


Figura 33: Microscopia eletrônica da amostra 500-710 μm pós-sinterização com um corte transversal aumento de 1000X.

4.3 Fase Líquida (Hidrogel)

4.3.1 Preparação das amostras

O resultado da mistura de ambos os polímeros apresentou uma solução limpa e transparente indicando que ambos os polímeros nas concentrações e temperaturas preparadas são miscíveis. Teoricamente é esperado que a CHI e o PEG formem interações fortes entre cadeias por complexação iônica entre a amina CHI e o grupo hidroxila com o grupo éter PEG explicando a miscibilidade de ambas as fases poliméricas. Isto está de acordo com resultados relatados por Zhang *et al.* (2002) e Kolhe e Kannan (2003).

4.3.2 Reologia

Como mencionado, os sistemas de substituição óssea injetável têm várias vantagens em relação aos implantes pré-formados. Portanto, as propriedades reológicas das blendas polimérica CHI/PEG dissolvidas em solução aquosa de ácido acético são importantes. É desejável um comportamento pseudoplástico, permitindo que a blenda seja mais viscosa a baixas taxas de cisalhamento e facilmente injetada, aplicando uma tensão de cisalhamento constante com qualquer seringa comercial. A Figura 34 apresenta a viscosidade em função da taxa de cisalhamento de blendas CHI/PEG a temperaturas de 5°C, 25°C e 37°C.

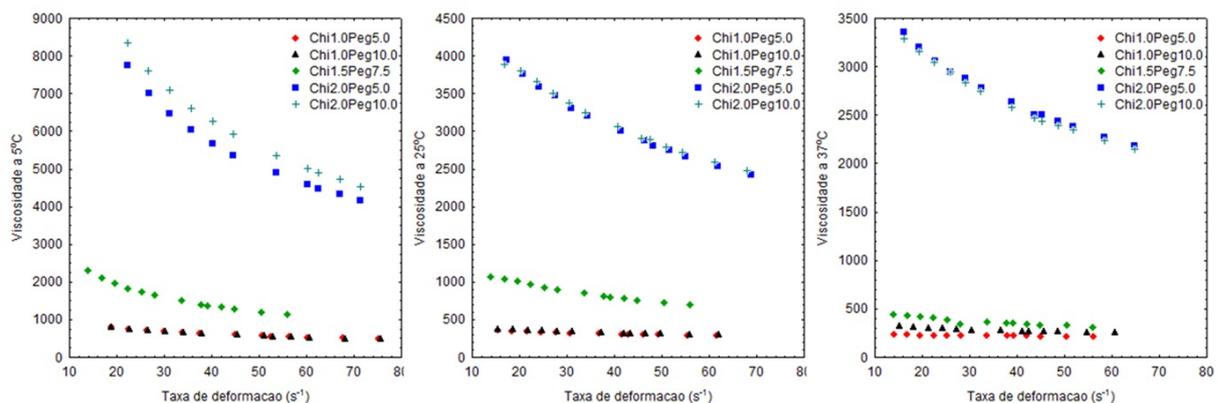


Figura 34: Comportamento reológico de blendas de CHI/PEG a 5°C, 25°C e 37°C.

A análise da Figura 34 revela que os valores de viscosidade diminuem com o aumento progressivo da taxa de cisalhamento, uma vez que todas as soluções apresentam um comportamento pseudoplástico a todas as temperaturas. Este fenômeno é mais evidente em concentrações mais elevadas de CHI e temperaturas mais baixas. Análises adicionais mostram que a CHI é o fator principal que aumenta a viscosidade das soluções, enquanto que PEG tem um menor efeito nessa propriedade. Um comportamento pseudoplástico é usualmente encontrado em soluções compostas por polímeros de elevado peso molecular dissolvidos em solventes com pesos moleculares menores como é o caso do presente trabalho. Considerando uma dada concentração de mistura polimérica injetável, o emaranhado das cadeias poliméricas ocupa grandes volumes de solução a baixo

cisalhamento, resultando em grande resistência ao movimento ou fluxo, enquanto que ao aumentar o cisalhamento, as cadeias poliméricas tendem a estar mais alinhadas com a direção do corte resultando em menor resistência ao movimento. Os resultados obtidos estão de acordo com outros estudos sobre reologia de CHI como os trabalhos de Mucha (1997) e Desbrieres (2002).

A diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento pode também ser atribuída à interrupção das interações moleculares e dos emaranhados, ou seja, a taxa de ruptura excede a velocidade à quais novas associações de emaranhamento podem ser refeitas, aumentando assim a mobilidade das cadeias poliméricas e diminuindo a viscosidade da solução. As curvas de fluxo das blendas de CHI/PEG são apresentadas na Figura 35. A equação de Ostwald-Waelle (lei de potência) foi usada para ajustar os dados (Macosko e Larson, 1994).

$$\tau = K \times \dot{\gamma}^n \quad (5)$$

$$\mu = K \times \dot{\gamma}^{n-1}$$

Onde, τ é a tensão de cisalhamento (Pa), K o índice de consistência (Pa.sⁿ), $\dot{\gamma}$ é a velocidade de cisalhamento (s⁻¹), n o índice de comportamento do fluxo e μ a viscosidade aparente (Pa.s).

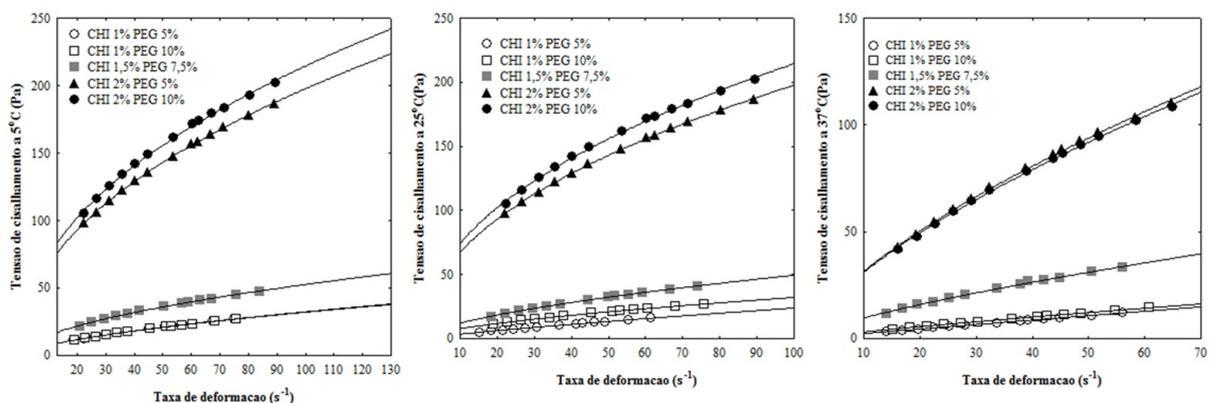


Figura 35: Comportamento do fluxo das blendas de CHI/PEG e ajuste com o modelo de lei de potência a 5°C, 25°C e 37°C.

As amostras apresentaram o comportamento de fluxo típico de soluções não-newtonianas pseudoplásticas com aumentos na tensão de cisalhamento para aumentos na taxa de cisalhamento. Esta tendência é mais notável a temperaturas mais baixas e concentrações mais elevadas de CHI. Este fato é geralmente atribuído ao aumento do emaranhado das cadeias que resultará em uma maior resistência das cadeias do polímero ao se moverem e, portanto, exigindo maior tensão de cisalhamento. A Tabela 13 apresenta os valores dos parâmetros (K) e (n). Bem como o coeficiente de correlação para a equação 5. Os resultados mostram que o modelo de lei de potência descreve o comportamento de fluxo da mistura de polímero injetável com precisão.

Tabela 13: Os parâmetros do modelo de lei de potência determinados para cada amostra.

Amostras	K (Pa.s ⁿ)			n			R ²		
	5°C	25°C	37°C	5°C	25°C	37°C	5°C	25°C	37°C
CHI1% PEG5%	1.79	0.51	0.26	0.62	0.84	0.95	99.88	99.99	99.99
CHI1% PEG10%	1.82	0.55	0.43	0.62	0.82	0.86	99.91	99.98	99.98
CHI1.5% PEG7.5%	4.21	2.9	1.58	0.54	0.61	0.73	99.94	99.91	99.92
CHI2% PEG5%	22.90	8.69	6.60	0.47	0.63	0.68	99.98	99.80	99.88
CHI2% PEG10%	25.62	8.66	6.53	0.46	0.64	0.67	99.83	99.75	99.87

Para qualquer concentração dada, quando a temperatura aumenta, o valor n aumenta, o que significa que as soluções se aproximam do comportamento newtoniano. A explicação pode estar associada ao aumento da flexibilidade das cadeias de CHI associado a uma maior energia cinética a temperaturas mais elevadas. Este aumento do movimento das cadeias poliméricas resulta em resistência ao fluxo semelhante, a baixa ou altas taxas de cisalhamento e, portanto, o coeficiente n tende a 1. Resultados semelhantes foram identificados por Torres *et al.* (2006). Outra explicação pode ser a solubilidade aumentada de CHI em temperaturas mais altas levando a uma solução tipo mais newtoniano (Mucha, 1997).

Além disso, com o aumento da concentração de CHI e conseqüentemente mais interações entre cadeias, o valor n tende a diminuir, confirmando que a

flexibilidade desempenha um fator importante para o comportamento do fluxo. Embora a CHI seja o principal fator que influencia as propriedades de fluxo, a influência do PEG pode ser detectada pela redução do valor n com o aumento da concentração. Esta influência é aumentada pela temperatura, mas diminuiu para concentrações mais elevadas de CHI, sugerindo que as porções de PEG podem criar espaços vazios que facilitam o movimento das cadeias de CHI a concentrações mais baixas, mas essas porções tornam-se menos relevantes quando a concentração de CHI aumenta. Os valores do índice de consistência aumentam com o aumento da concentração de CHI e PEG, mas diminuem com a temperatura. Novamente, a interação em cadeia e a mobilidade são fatores importantes que afetam esse parâmetro, uma vez que menor interação entre cadeias e maior mobilidade leva a valores mais baixos de K e, portanto, menor valor de tensão.

4.3.3 Energia de ativação

Como o fluxo do polímero é controlado cineticamente, descobriu-se que este é dependente da temperatura e assim a equação da lei de Arrhenius poderia ser usada para estimar a viscosidade a qualquer temperatura dada desde que a energia de ativação fosse determinada. A equação 6 é termodinamicamente derivada e assume a teoria do volume livre, podendo esta ser explicada pela barreira de energia para uma molécula ou um grupo de moléculas, tal como uma cadeia, movendo-se de uma posição antes de fluir, para outra depois de fluir.

$$\eta_{app} = A \exp \left(\frac{Ea}{RT} \right) \quad (6)$$

Onde η_{app} é a viscosidade aparente (Pa.s), A é um termo pré-exponencial, Ea é a energia de ativação, R é a constante de gás perfeita ($J.K^{-1}.mol^{-1}$) e T é a temperatura absoluta (K). Como Ea está expressando a dificuldade de uma cadeia se mover de uma posição para a outra, a intensidade da interação entre cadeias, o volume e a rigidez das cadeias laterais são parâmetros que realmente influenciam o Ea .

Tabela 14: Valores da Energia de Ativação para todas as amostras a diferentes taxas de cisalhamento.

Amostra	Energia de Ativação (kJ/mol)			R ² (%)		
	1 (s ⁻¹)	10 (s ⁻¹)	100 (s ⁻¹)	1 (s ⁻¹)	10 (s ⁻¹)	100 (s ⁻¹)
CHI1% PEG5%	43.18	26.12	9.06	100,0	99,98	99,56
CHI1% PEG10%	33.41	20.61	7.79	96,36	96,45	96,83
CHI1.5% PEG7.5%	30,97	19.04	7.11	99,46	99,27	98,4
CHI2% PEG5%	31.45	20.18	8.92	98,05	97,73	96,03
CHI2% PEG10%	28.54	17.48	6.43	97,62	98,6	99,98

Os coeficientes de determinação são todos acima de 95%, o que significa que a equação do tipo Arrhenius fornece um bom ajuste para os dados apresentados. Os valores de energia de ativação determinados variaram de 43,18 kJ/mol e a 28,54 kJ/mol e para uma taxa de cisalhamento de 1s⁻¹, enquanto que para taxas de cisalhamento de 100s⁻¹ os valores de energia de ativação variaram de 9,06 kJ/mol a 6,43 kJ/mol. Esses valores de energia de ativação são semelhantes aos valores relatados por Desbrieres (2002) para soluções de CHI com taxa de cisalhamento zero. A energia de ativação é a energia necessária para formar uma cavidade molecular onde uma determinada molécula "salta" deixando sua posição temporária de equilíbrio. Com o aumento da taxa de cisalhamento observa-se uma redução na energia de ativação, sugerindo que um maior esforço de cisalhamento ajuda a mover as macromoléculas de CHI na forma de energia cinética. Este aumento de energia ajuda as moléculas a passar através da barreira energética e alcançar um nível de equilíbrio mais fácil.

Assim, para os fluidos não newtonianos, quanto maior a taxa de cisalhamento aplicada, maior é a tensão de cisalhamento observada, conduzindo a uma barreira de energia de ativação mais baixa. A concentração de CHI teoricamente crescente deve resultar na formação de grandes estruturas por combinação de grupos polares formando ligações secundárias e assim com uma maior viscosidade e energia de ativação. Além disso, os enredos crescentes devem requerer uma barreira de energia mais elevada para o movimento de moléculas. No

presente sistema o que se observa é uma redução na energia de ativação para aumentar as concentrações de CHI, significando que a barreira de energia é menor para concentrações mais altas. Sabe-se também que a CHI torna-se menos solúvel a concentrações crescentes, de modo que uma possível explicação para os presentes resultados poderia ser a diminuição dos emaranhados de CHI e assim seria necessária menos energia de ativação. Estes resultados são consistentes com outros trabalhos onde uma redução da energia de ativação foi observada para concentrações de CHI (Mucha, 1997).

A presença de PEG também reduz a energia de ativação, mas é mais notável em concentrações mais baixas de CHI do que em concentrações mais elevadas de CHI. A participação de moléculas de PEG pode resultar como um espaçador entre as cadeias de CHI resultando em menor energia de ativação porque há mais cavidades para o movimento, sugerindo que o PEG não oferece muita resistência para o movimento das cadeias de CHI.

4.3.4 Propriedades mecânicas

A Figura 36 apresenta uma curva típica de força-tempo esquematizada para ajudar a entender como os valores foram determinados. Dureza é a força necessária para atingir uma determinada deformação e é dada pela altitude do primeiro pico. Coesão é a razão entre a área sob a curva força-tempo produzida na primeira e segunda compressão. Compressibilidade é o trabalho para deformar o produto durante a primeira penetração e é dada pela área sob a curva. Adesividade é o trabalho necessário para superar as forças de atração entre a superfície da amostra e a superfície da sonda, e é dada pela área na região de forças negativas, o que significa que a sonda já não penetra na mistura polimérica e está a empurrá-la de volta .

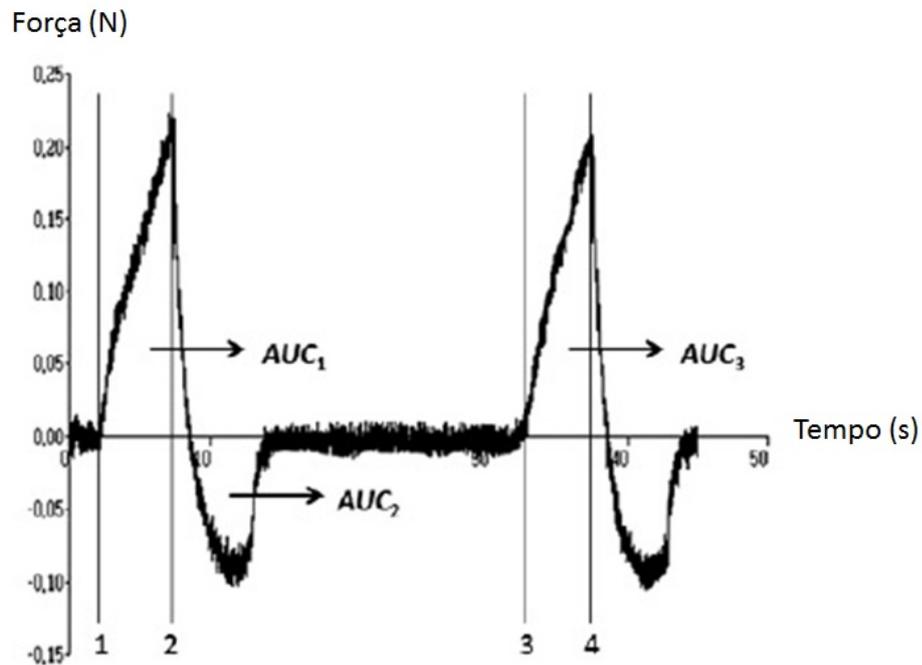


Figura 36: Representação esquemática da curva força-tempo obtida por análise textural adaptado de Senyigit *et al.* (2014).

O objetivo do presente ensaio foi determinar parâmetros associados com as propriedades mecânicas da mistura polimérica injetável. As misturas poliméricas injetáveis devem ter propriedades mecânicas apropriadas, tais como facilidade de aplicação, adesividade, baixa dureza e boa retenção no local de aplicação. As medidas de textura foram determinadas para todas as amostras e os resultados estão resumidos na Tabela 15.

Tabela 15: Medidas de textura das misturas poliméricas de CHI/PEG.

Amostras	Dureza (N)	Coesão (N.s / N.s)	Compressibilidade (N.s)	Adesividade (N.s)
CHI1% PEG5%	0.159 ± 0.003	0.116 ± 0,003	2.583 ± 0,015	0.256 ± 0.017
CHI1% PEG10%	0.159 ± 0.006	0.116 ± 0.001	2.571 ± 0.034	0.376 ± 0.012
CHI1.5% PEG7.5%	0.210 ± 0.002	0.143 ± 0.003	1.650 ± 0.016	0.694 ± 0.021
CHI2% PEG5%	0.326 ± 0.004	0.205 ± 0.002	4.046 ± 0.091	2.084 ± 0.049
CHI2% PEG10%	0.323 ± 0.004	0.203 ± 0.001	4.030 ± 0.092	2.117 ± 0.025

A dureza está relacionada com a força necessária para deformar a mistura, e aumenta com a concentração de CHI, enquanto que o PEG não apresenta qualquer influência neste parâmetro. Um comportamento semelhante pode ser observado para coesão e compressibilidade, uma relacionada com a capacidade da mistura de permanecer no local de aplicação e a outra relacionada com a facilidade de aplicação ou remoção da seringa. Aumentos de emaranhados e diminuição de vazios entre cadeias poliméricas podem explicar os dois resultados. A adesividade representa o trabalho necessário para remover a sonda do material e pode estar relacionada com a adesão do material ao local de aplicação. Neste caso, a concentração de CHI é ainda o fator principal, mas os aumentos na concentração de PEG resultam em aumento da adesividade.

4.3.5 Citotoxicidade (Viabilidade Celular)

Os testes de viabilidade celular são utilizados com o intuito de medir a proporção de células viáveis após um procedimento potencialmente traumático. A maioria destes testes baseia-se na disrupção da integridade da membrana celular, medida pela captação de um corante ao qual a célula é usualmente impermeável, ou pelo contrário, pela libertação de um corante normalmente retido por células viáveis.

O teste biológico *in vitro* empregado baseia-se na redução de sal amarelo de Tetrazólio, o MTT, por desidrogenases celulares para cristais azul/violeta de Formazan, e no princípio de que a quantidade de Formazan produzido é diretamente proporcional ao número de células vivas durante o tempo de exposição da cultura celular ao MTT (Page *et al.*, 1988). Por ser lipossolúvel, o Formazan produzido pode posteriormente ser solubilizado em solventes orgânicos como o álcool isopropílico, e estimado por espectrofotometria (Stockert *et al.*, 2012). Desta forma, um aumento ou diminuição do número de células viáveis pode ser detectado medindo-se a concentração de Formazan pela leitura da densidade ótica em espectrofotômetro em UV/visível.

A Figura 37 apresenta os resultados para viabilidade celular das amostras de CHI/PEG.

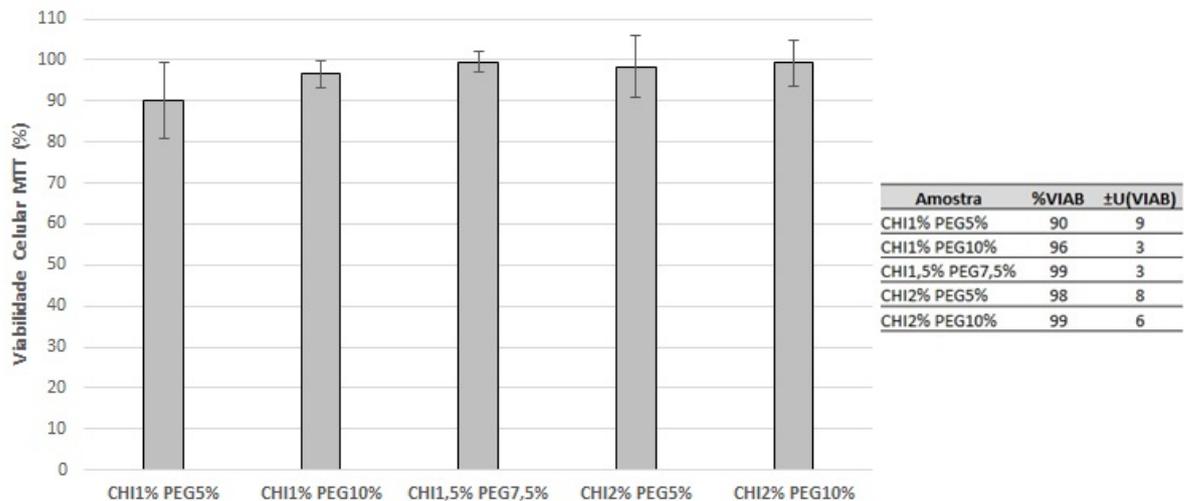


Figura 37: Viabilidade celular (%) das amostras de CHI/PEG.

A partir do resultado apresentado pela Figura 37, todas as amostras apresentam uma viabilidade acima de 70%, que de acordo com a BS EN ISO 10993-5: 2009, materiais que apresentem uma viabilidade celular acima que 70% são considerados não citotóxicos.

Portanto tem-se que as amostras, apresentam viabilidade celular acima do índice de citotoxicidade (70%), mesmo levando em conta a incerteza calculada (U), indicando que as amostras não exibem um efeito citotóxico em contato com a linhagem celular utilizada. O cálculo de incerteza foi desenvolvido com base no método estatístico z-Score modificado para identificar *outliers*.

4.3.6 Injetabilidade

A força necessária para remover completamente a mistura polimérica injetável de uma seringa com ponta metálica, foi determinada utilizando uma máquina de Ensaio Mecânico Universal Instron 3366. A Figura 38 apresenta o mecanismo utilizado no teste de injetabilidade. Os testes foram realizados em triplicata para uma amostra de mistura polimérica injetável CHI1.5% PEG7.5% em três diferentes temperaturas (5°C, 25°C e 37°C). A escolha da amostra específica, para o teste de injetabilidade, foi devido as conclusões obtidas após as caracterizações realizadas nas amostras de CHI/PEG.



Figura 38: Mecanismo utilizado para o teste de injetabilidade.

Quando se utiliza um sistema injetável, é importante determinar a força necessária para extrair o material de uma seringa. A força determinada pode ser correlacionada com a injetabilidade desse material. Na Figura 39 são apresentadas as forças de compressão necessárias para mover o material da seringa da amostra de mistura polimérica injetável CHI1.5% PEG7.5% a 3 temperaturas diferentes.

Pode-se observar a evolução da força de compressão ao longo do movimento do material ao longo do interior da seringa. No início são necessárias forças máximas para todas as 3 amostras, mas então as forças de extrusão diminuem atingindo um valor constante para o resto do processo de injeção, o que é um resultado desejado.

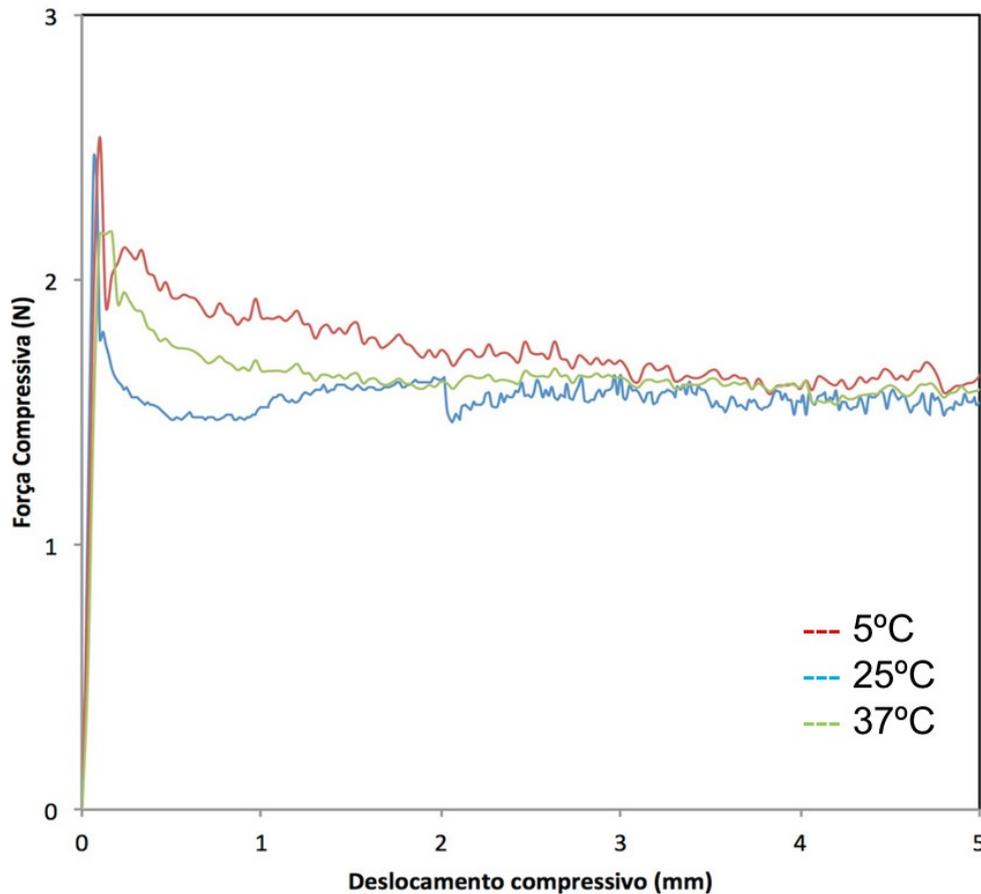


Figura 39: Força de compressão aplicada numa seringa de 3 mL para remover o hidrogel CHI1.5% PEG7.5% a três temperaturas diferentes.

A força de compressão máxima exigida no início do movimento depende da temperatura e é de 2,67 N para 5°C, 2,43 N para 25°C e 2,17 N para 37°C. As forças de compressão final são constantes e similares com valores aproximados de 1,5N. A força mais elevada no início do movimento é devida a forças de atrito estáticas entre a mistura de polimérica injetável e a parede da seringa. A 5°C o material requer forças maiores para iniciar o movimento e isso pode ser associado com maiores forças de atrito estático devido à maior viscosidade a essa temperatura. A viscosidade pode ser vista como uma força de arrasto e é uma medida das propriedades do fluido de fricção, de modo que o fluido menos viscoso é o mais fácil de começar a deslocar-se no interior da seringa. A força necessária para mover o material depois que ele é ajustado para movimento é determinada pela força de atrito dinâmico que é menor do que a força de atrito estática levando a valores mais baixos e estáveis. Os valores da força de compressão são

semelhantes aos relatados por Morais *et al.* (2013) para um sistema injetável de ALG com forças máximas de 8N no início e forças de compressão final em torno de 1,5N.

4.4 Processamento das Fases (IBS)

4.4.1 Preparação das Amostras

O processamento das fases sólida (grânulos CaPs) e líquida (hidrogel CHI/PEG) originou o produto final IBS. A mistura das fases foi efetuada de acordo com uma razão que poderia ir dos 0,8 a 1 g/g, ou seja, 0,8 a 1 g de fase líquida foi adicionado a 1 g de fase sólida. Esta faixa estabelecida para a mistura das fases permite que a fase sólida seja transportada pela fase líquida, sem perdas de propriedades de injetabilidade e consistência do material final.

Os tipos de grânulos de CaPs, bem como a concentração do hidrogel CHI/PEG utilizados para o processamento do IBS, foram escolhidos de acordo com os resultados apresentados anteriormente. Os grânulos de CaPs escolhidos foram os das faixas granulométricas de 250-500 μm e 500-710 μm , e o hidrogel CHI1.5% PEG7.5%.

O resultado da mistura de ambas as faixas de grânulos com o hidrogel, originou um aglomerado de consistência pastosa, moldável e sem perda de continuidade, o que favorece a sua aplicabilidade de forma injetável (Figura 40).



Figura 40: Aspecto do IBS após o seu processamento.

4.4.2 Injetabilidade

A força necessária para remover o IBS de uma seringa, sem ponta metálica, foi determinada utilizando uma máquina de Ensaio Mecânico Universal Instron 3366. A Figura 38 apresentou o mecanismo utilizado no teste de injetabilidade. Os testes foram realizados em 4 tipos de amostras (Tabela 16), com variações da razão de mistura fase líquida e fase sólida utilizando duas faixas granulométricas de grânulos de CaPs, com uma concentração fixa do hidrogel CHI1.5% PEG7.5% em temperatura ambiente (25°C).

Tabela 16: Variações de IBS submetidos ao ensaio de injetabilidade.

Amostras	Tipos de IBS
1	0,8-1 250-500 μm
2	1-1 250-500 μm
3	0,8-1 500-710 μm
4	1-1 500-710 μm

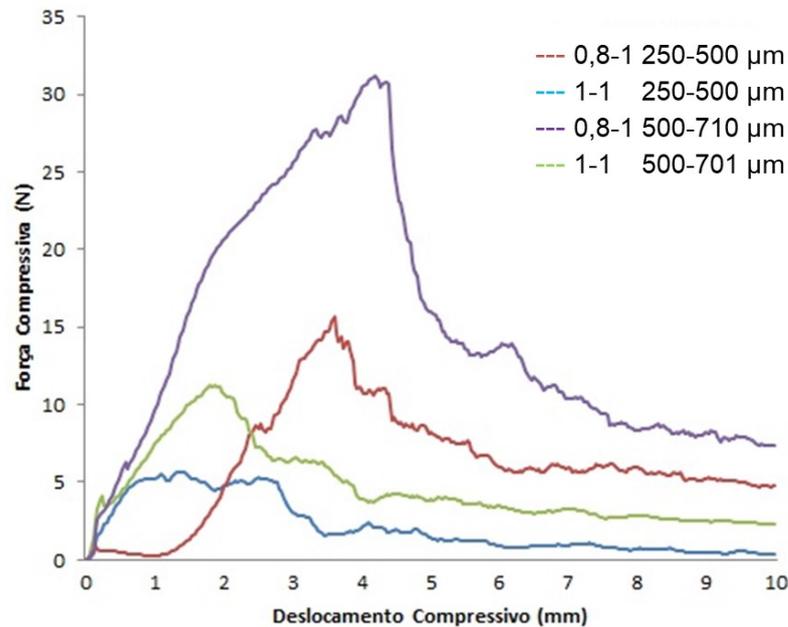


Figura 41: Força de compressão aplicada numa seringa de 3 mL em 4 tipos de amostras do IBS a temperaturas ambiente.

A Figura 41 apresenta as forças de compressão necessárias para mover o IBS ao longo do interior da seringa de 4,65 mm de diâmetro a temperatura ambiente (25°C). Pode-se observar a evolução da força de compressão ao longo do movimento do material. No início são necessárias forças máximas para todas as amostras, mas então as forças de extrusão diminuem atingindo um valor constante para o resto do processo de injeção, o que é um resultado desejado. A força de compressão máxima exigida no início do movimento, até atingir um patamar de força de extrusão constante, depende principalmente da razão da mistura fase líquida e fase sólida, e posteriormente do tamanho de grânulos utilizados. Quanto menor a quantidade de hidrogel utilizado na mistura, maior os valores de força compressiva observada para a extrusão do IBS. Em relação ao diâmetro dos grânulos, quanto menor o diâmetro, menor a força compressiva observada.

A força mais elevada no início do movimento é devida a força necessária para vencer a resistência do material, com uma consequente compactação do material, e o atrito entre o IBS e a parede da seringa. Após a etapa inicial do movimento, as forças de extrusão diminuem atingindo um valor constante para o

resto do processo de injeção. Observou-se que a amostra 1-1 250-500 μm detem as menores forças de compressão no decorrer do processo de injetabilidade, tendo um pico máximo de 5,5 N e estabilizando em torno de 0,5 N, com a manutenção da coesão do material, demonstrando ser um potencial candidato para ser um IBS nesta conformação.

4.4.3 Citotoxicidade (Viabilidade Celular)

A avaliação da citotoxicidade do IBS foi realizada, especificamente, na amostra 1-1 250-500 μm em decorrência das conclusões obtidas no ensaio de injetabilidade realizado nas 4 amostras do IBS. O teste biológico *in vitro* empregado para a avaliação da citotoxicidade foi descrito anteriormente na alínea 4.3.5. A Figura 42 apresenta o resultado para viabilidade celular da amostra 1-1 250-500 μm .

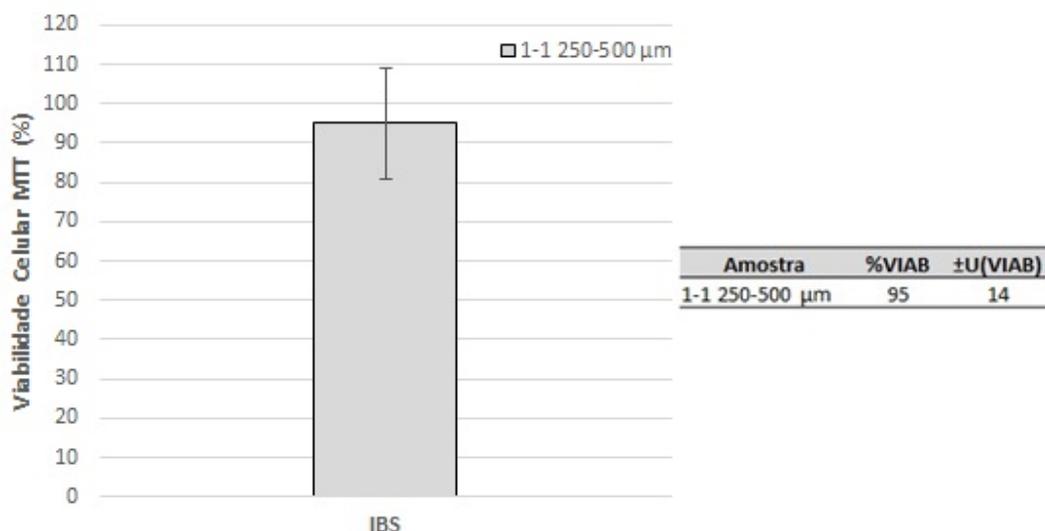


Figura 42: Viabilidade celular (%) do IBS para a amostra 1-1 250-500 μm

O resultado apresenta uma viabilidade celular da amostra de $95\% \pm 14$. De acordo com a BS EN ISO 10993-5: 2009, materiais que apresentem uma viabilidade celular acima que 70% é considerado não citotóxico.

Portanto tem-se que a amostra apresenta uma viabilidade celular acima do índice de citotoxicidade (70%), mesmo descontando a incerteza calculada (U),

indicando que a amostra não exibe um efeito citotóxico em contato com a linhagem celular utilizada.

4.4.4 Ensaio biológico *in vivo*

O ensaio biológico *in vivo* foi realizado com o objetivo de avaliar o desempenho da osseointegração do IBS, nos períodos de 30 e 60 dias em coelhos da raça Nova Zelândia, pois fornecem um modelo rápido e reprodutível para testar materiais de bioengenharia (Sagar *et al.*, 2013; De Aza *et al.*, 2014). Os animais foram submetidos à cirurgia de implantação do biomaterial em defeitos ósseos não críticos de 3 mm criados na região medial da tíbia (membros direito e esquerdo) que foram preenchidos com o IBS (1-1 250-500 μm) (Figura 43). Para além da implantação do biomaterial, foi introduzido uma membrana de colágeno de origem bovina cobrindo o defeito ósseo e o biomaterial, nos membros esquerdos dos animais como controle para a avaliação pós-cirúrgica.



Figura 43: (A) Defeitos ósseos de 3 mm criados na região da tíbia. (B) Imagem de raio-X dos defeitos ósseos preenchidos com o IBS logo após a cirurgia.

Após o período de 30 e 60 dias os segmentos da tíbia, contendo os implantes juntamente com os tecidos circundantes, foram coletados para avaliação histológica e por MEV. A metade das amostras coletadas, foram destinadas a avaliação histológica e fixadas em solução de formalina tamponada a 10% por 10 dias, sendo posteriormente descalcificados em soluções de ácido nítrico a 5% e coradas pela técnica de hematoxilina-eosina, para o estudo por microscopia ótica. O restante das amostras, foram destinadas a avaliação pela técnica de MEV, sendo fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5%, e em seguida desidratadas em uma série graduada de álcool.

Porém, parte dessas amostras destinadas a avaliação por MEV foram submetidas a uma fratura transversal na região onde o biomaterial foi implantado e metalizadas para melhorar a visualização e o contraste topográfico. Enquanto que o restante, foram embutidas em resina transparente epóxi, utilizando um dispositivo conectado a uma bomba de vácuo antes do endurecimento da resina, para preencher as micro porosidades e evitar o aparecimento de bolhas. Após 24h, as amostras foram cortadas transversalmente, polidas e metalizadas.

4.4.4.1 Histologia

A análise histológica está relacionada ao local do defeito ósseo cortical produzido (3mm) e preenchido com o IBS. A Figura 44 apresenta a avaliação histopatológica aos 30 dias de pós-operatório em que verifica-se perda da continuidade óssea na região do implante com formação de delgadas trabéculas ósseas, irregularidade do endóstio e perióstio. Observa-se também discreta neovascularização, grande quantidade de osteoblastos e osteócitos, e tecido ósseo imaturo emergindo das bordas do defeito. Havia quantidade considerável de biomaterial na região do defeito em associação a osteoclastos, o que é sugestivo de reabsorção. É também visualizável um material levemente eosinofílico, irregular e finamente granular, compatível com o IBS.

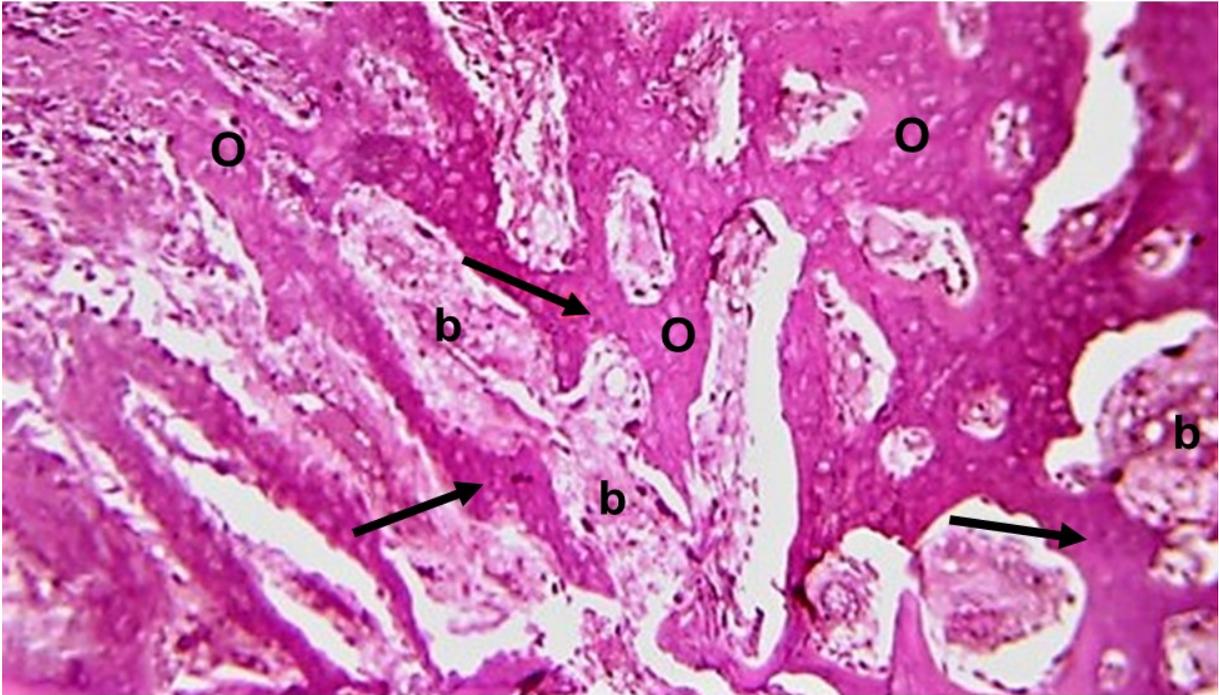


Figura 44. Micrografia aos 30 dias de pós-operatório (10X) da interface entre biomaterial (b) e osso neoformado (O). Seta delgada indica osso trabecular e osseointegração.

A Figura 45 apresenta aos 60 dias de pós-operatório os mesmos achados que aos 30 dias, porém em maior intensidade. O defeito ósseo encontra-se preenchido por trabéculas ósseas mais compactas e tecido ósseo imaturo em maior quantidade. Observa-se tecido ósseo maduro na região cortical, com osso trabecular em direção à região medular, além da presença da fase cerâmica do IBS aos 60 dias de pós-operatório em processo de reabsorção. Resultado semelhante foi relatado por Costa *et al.* (2015) que observaram uma lenta reabsorção de um biomaterial bifásico composto por HA/ β -TCP (60/40) em tíbia de ovino, porém com uma neoformação óssea de boa qualidade após 60 dias de pós-operatório. O que vem a corroborar com Linde *et al.* (1993), que relatam em seus estudos que um período de 60 dias pode não ser suficiente para completa regeneração óssea. Porém deve-se salientar que a conformação do biomaterial tem influência direta no período de degradação e reabsorção após a sua implantação.

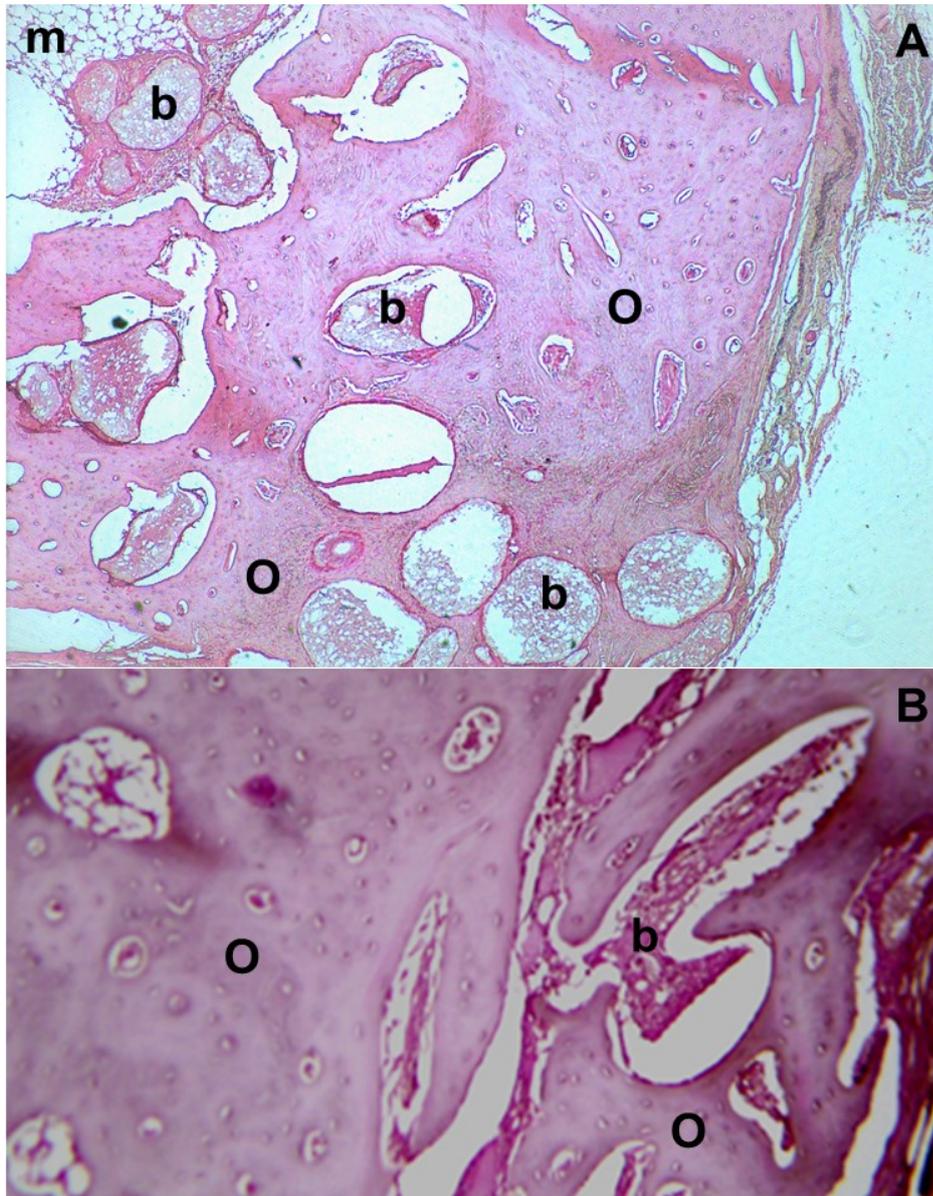


Figura 45. Micrografia aos 60 dias de pós-operatório A (4X) e B (10X). Observa-se grande quantidade de tecido neoformado (O) e neovascularização intensa. Região de medula óssea (m) e biomaterial (b).

Tanto aos 30 como aos 60 dias de pós-operatório, pode-se observar o contato do biomaterial com o tecido ósseo recém-formado sem a interposição de tecido fibroso, demonstrando osseointegração, semelhante aos resultados apresentados por Aristizabal *et al.* (2017) ao implantarem um biomaterial a base de fosfatos de cálcio em rádio de coelhos. Não foram observadas diferenças significativas no processo de neoformação óssea entre as amostras de 30 e 60 dias após a implantação do biomaterial, bem como nos implantes recobertos com

membrana de colágeno com o intuito de evitar a imediata penetração de tecido fibroso na loja cirúrgica.

4.4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens obtidas através da técnica de MEV estão relacionadas ao local do defeito ósseo cortical produzido (3mm) e preenchido com o IBS. A Figura 46 apresenta amostras submetidas a uma fratura na área de inserção do implante, onde pode ser observado a região em que a broca cilíndrica penetrou no osso cortical (a), a presença dos grânulos de CaPs do biomaterial no interior das amostras (b), e região da medula óssea (c).

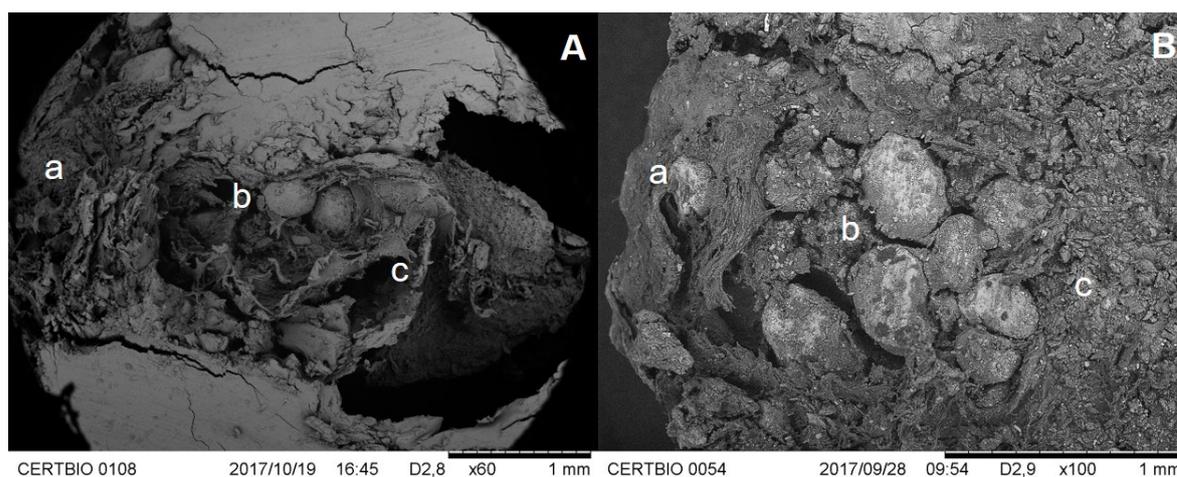


Figura 46: Microscopia eletrônica do defeito ósseo (3 mm) criado na região da tíbia de coelhos preenchido com IBS após 60 dias de pós-operatório. (A) 60X e (B) 100X.

As micrografias obtidas a partir das amostras de 30 e 60 dias do pós-operatório apresentam neoformação óssea na interface dos grânulos de CaPS e tecido ósseo (Figura 47A e Figura 47C). A Figura 46B apresenta uma separação do tecido ósseo e biomaterial, provavelmente devido a força empregada para fraturar a amostra, mesmo assim é possível visualizar modificações na superfície do grânulo de CaPs resultante da biomineralização gerada por células osteoblásticas, o que pode-se afirmar ser o resultado de uma boa osseointegração. As Figura 47B e 47D mostram projeções de células osteoblásticas que realizam a biomineralização e depósito do tecido ósseo sob a superfície do biomaterial. Isto está de acordo com

resultados de estudos *in vivo* relatados por Dalmonico *et al.* (2017), Hwang *et al.* (2012) e Park *et al.* (2010).

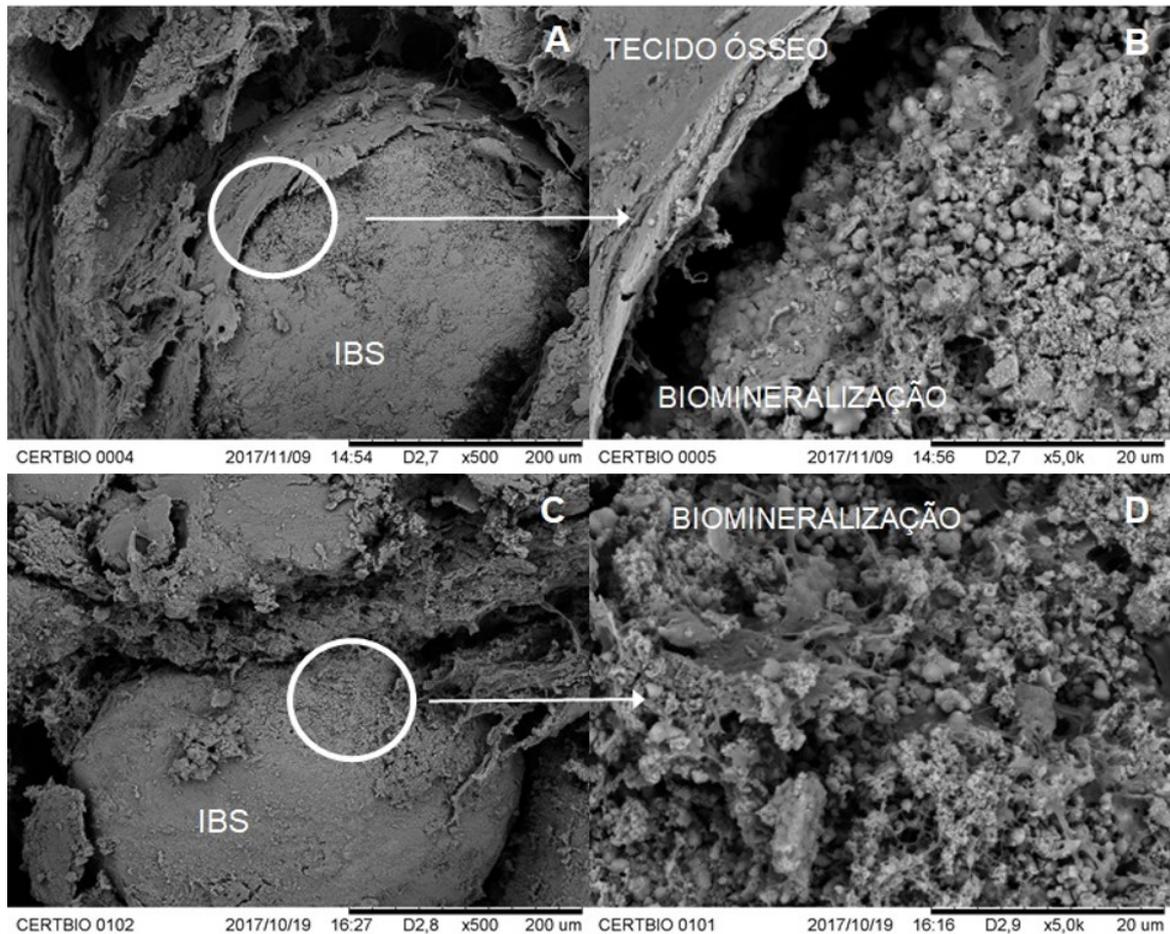


Figura 47: Microscopia eletrônica da interface do biomaterial e tecido ósseo 30 dias (A) e (B), e 60 dias pós-operatório (C) e (D).

A Figura 48 e Figura 49 apresentam as amostras que foram seccionadas transversalmente e polidas aos 30 e 60 dias de pós-operatório. A Figura 48 apresenta um corte transversal da área do defeito ósseo preenchido pelo biomaterial, aos 60 dias do pós-operatório, da região cortical a medular. Observa-se que o material não está bem compactado no defeito ósseo, o que não vem a ser um problema dependendo do objetivo da utilização do biomaterial. Porém em princípio, caso os grânulos de CaPs possuísem tamanhos de poros maiores, permitiria uma maior colonização e avanço de osteoblastos ao seu interior, consequentemente maior biodegradação do biomaterial e neoformação óssea ao redor do biomaterial.

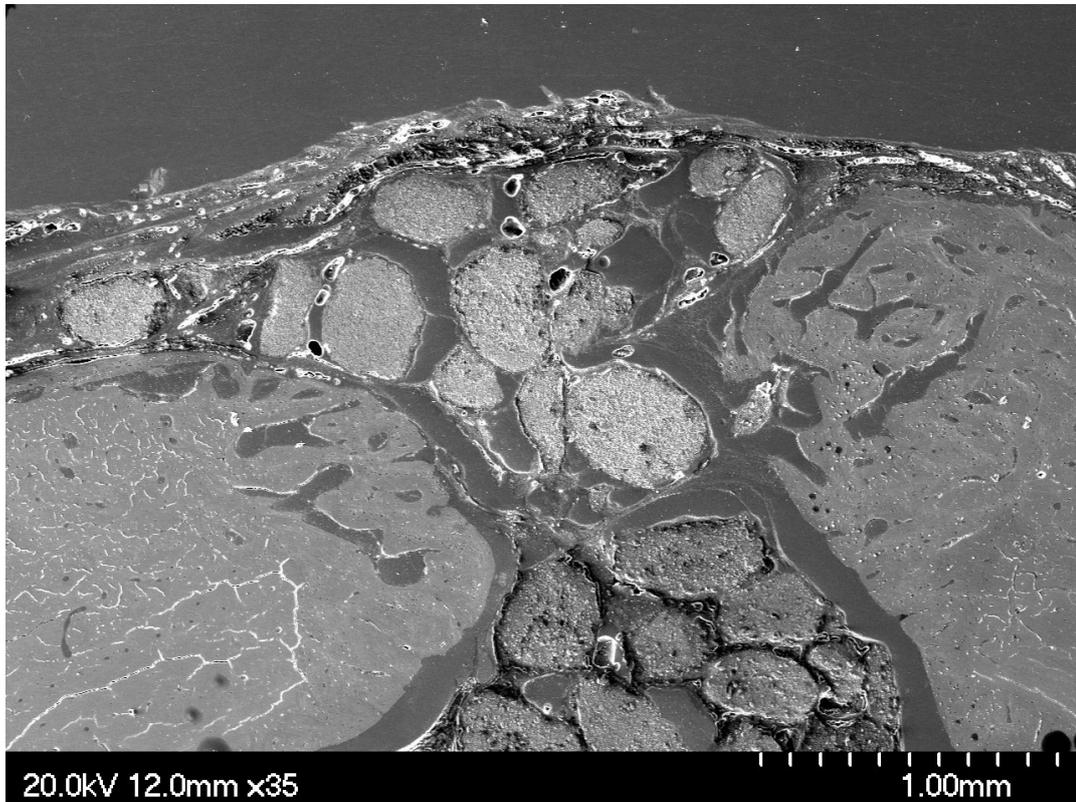


Figura 48: Microscopia eletrônica da secção transversal da amostra 60 dias pós-operatório.

A Figura 49 apresenta, com mais detalhes, as amostras seccionadas transversalmente aos 30 e 60 dias de pós-operatório. As imagens apresentam os grânulos de CaPs integrados ao tecido hospedeiro, porém não tão compactados no defeito ósseo, com uma superfície irregular devido a sua biodegradação. Essa biodegradação, que faz parte do processo de reabsorção do material, leva ao aparecimento de partículas do biomaterial em meio a neoformação óssea, que serão incorporadas no novo tecido ósseo. Projeções de ossos recém-formados, são observados nas micrografias, atingindo o biomaterial que caracteriza a interface osso neoformado e biomaterial. Em todas as amostras, a integração óssea foi bem avançada com penetração óssea áreas centrais profundas. Resultados semelhantes foram identificados por De Aza *et al.* (2017) em estudos realizados em tíbias de coelhos.

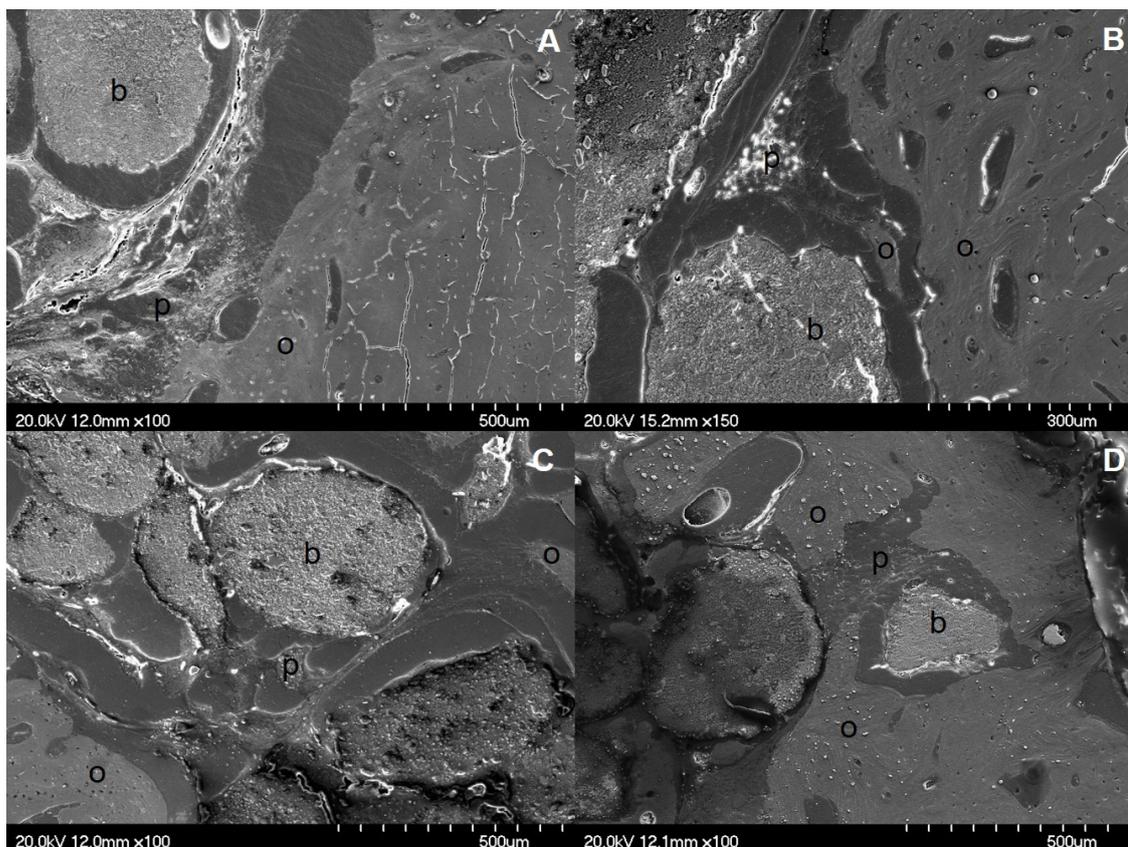


Figura 49: Microscopia eletrônica das amostras seccionadas transversalmente 30 dias (A e B) e 60 dias (C e D) pós-operatório (b = biomaterial, p = partículas de biomaterial degradadas, e o = neoformação óssea).

Não foram observadas diferenças significativas no processo de neoformação óssea através da técnica de MEV, entre as amostras de 30 e 60 dias após as cirurgias de implantação do biomaterial, bem como nos implantes recobertos com a membrana de colágeno bovino, tal como observado na avaliação histopatológica. Uma das causas pode ser atribuída ao tamanho dos grânulos de CaPs, como também a densidade dos grânulos com pouca porosidade utilizados nesse estudo. Grânulos de CaPS menores e com maior poros interconectados podem vir a contribuir para uma maior reabsorção e neoformação óssea nos períodos de 30 e 60 dias.

Estudos semelhantes de De Aza *et al.* (2017) e Dalmonico *et al.* (2017) demonstraram em períodos de tempos semelhantes, uma neoformação óssea densa ao redor e no interior do implante através dos seus poros e dissolução gradual da estrutura. É importante salientar que um período de tempo maior para a reabsorção do biomaterial possa ser interessante e necessário, dependendo do seu propósito.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que o processo de transformação do fosfato de cálcio tribásico ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) em β -TCP por meio de reação química e tratamento térmico foi efetivo, e que é possível obter grânulos de CaPs compostos por 26,9% de HA e 73,1% de β -TCP em diversas faixas granulométricas, possuindo diâmetros médios abaixo dos 600 μm . Das metodologias aplicadas para obtenção dos grânulos de CaPs a escolhida foi por atomização.

O hidrogel produzido pela mistura de CHI/PEG é miscível nas concentrações e temperaturas utilizadas e a viscosidade da mistura polimérica é dependente da taxa de cisalhamento com um comportamento pseudoplástico não newtoniano conforme desejado, além de não ser citotóxico.

A conformação do IBS originou um aglomerado de consistência pastosa, moldável e sem perda de continuidade, o que favorece a sua aplicabilidade de forma injetável. Testes mecânicos de injetabilidade apresentaram que a força necessária para a remoção completa do interior de uma seringa, está numa faixa que não irá atrapalhar a precisão de injeção no defeito ósseo no momento de seu uso. Além do que, o IBS 1-1 250-500 μm mostrou-se não ter efeitos citotóxicos e apresentou resultados promissores em testes *in vivo* em defeitos ósseos criados e preenchidos com o biomaterial em tíbias de coelhos, no que diz respeito a osseointegração e neoformação óssea, aos 30 e 60 dias de pós-operatório.

Conclui-se que a partir dos resultados do estudo, é possível desenvolver, do ponto de vista de processamento, um substituto ósseo injetável de apenas um estágio com potencial aplicação em reconstrução de tecidos ósseos no seguimento médico/odontológico.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

No presente trabalho foi desenvolvido um substituto ósseo injetável, que a partir das discussões e conclusões obtidas nessa pesquisa faz-se necessário outros procedimentos experimentais, afim de alcançar melhores resultados. Logo, sugere-se como objetos de estudo para trabalhos futuros:

- Produção de microporos interconectados nos grânulos de CaPs;
- Correlacionar os microporos nos grânulos de CaPs e a porosidade intergrânulos com a osseointegração e neoformação óssea;
- Realizar estudos *in vivo* com animais de maior porte como ovinos ou caprinos;
- Avaliar o comportamento *in vivo* do biomaterial pós-cirúrgico, com a preparação de lâminas delgadas polidas, entre osso neoformado e região cortical utilizando microscopia óptica de luz polarizada;
- Realizar estudos adicionando ao biomaterial biomoléculas envolvidas na regeneração óssea ou fármacos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, N. M.; MANO, J. F. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p. 401-414, 2008.

ANITHA, A.; RANI, V. V. D.; KRISHNA, R.; SREEJA, V.; SELVAMURUGAN, N.; NAIR, S. V.; TAMURA, H.; JAYAKUMAR, R. Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carboxymethyl and N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 672-677, 2009.

APARECIDA, A. H.; FOOK, M. V. L.; SANTOS, M. L.; GUASTALDI, A. C. Estudo da influência dos íons K^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} E CO_3^{2-} na cristalização biomimética de fosfato de cálcio amorfo (ACP) e conversão a fosfato octacálcico (OCP). **Química Nova**, v. 30, p. 892-896, 2007.

ARANAZ, I.; MENGÍBAR, M.; HARRIS, R.; PAÑOS, I.; MIRALLES, B.; ACOSTA, N.; GALED, G.; HERAS, A. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. **Current Chemical Biology**, v. 3, p. 203-230, 2009.

ARISTIZABAL, O. L. P.; CASTRO, J. A. V.; VARGAS, M. I. V.; REZENDE, C. M. F. Avaliação histológica e por microscopia eletrônica de varredura da biocerâmica de fosfato de cálcio nano-estruturada micromacro porosa em grânulos em defeito crítico de rádio de coelhos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 69, p. 15539-15550, 2017.

AUGST, A. D.; KONG, H. J.; MOONEY, D. J. Alginate hydrogels as biomaterials. **Macromolecular Bioscience**, v. 6, p. 623-633, 2006.

BAINO, F.; VITALE-BROVARONE, C. Mechanical properties and reliability of glass-ceramic foam scaffolds for bone repair. **Materials Letters**, v. 118, p. 27-30, 2014.

BAJADA, S.; MAZAKOVA, I.; RICHARDSON, J. B.; ASHAMMAKHI, N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 2, p. 169- 183, 2008.

BALLO, A. M. **Fiber-reinforced composite as oral implant material - Experimental studies of glass fiber and bioactive glass *in vitro* and *in vivo***. 2008. 69 Department of Prosthetic Dentistry and Biomaterials Science, University of Turku, Turku.

BÁRTOLO, P.; BIDANDA, B. **Bio-Materials and Prototyping Applications in Medicine**. 1. New York: Springer, 2008.

BELALIA, F.; DJELALI, N.-E. Rheological properties of sodium alginate solutions. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 59(2), p. 135-145, 2014.

BENCHERIF, S. A.; SANDS, R. W.; BHATTA, D.; ARANY, P.; VERBEKE, C. S.; EDWARDS, D. A.; MOONEY, D. J. Injectable preformed scaffolds with shape-memory. **PNAS**, v. 109, n. 48, p. 19590-19595, 2012.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; GURNY, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 35-52, 2004.

BLOCK, J. E.; THORN, M. R. Clinical indications of calcium-phosphate biomaterials and related composites for orthopedic procedures. **Calcified tissue international**, v. 66, n. 3, p. 234-238 ISSN 0171-967X, 2000.

BODDOHI, S.; KILLINGSWORTH, C. E.; KIPPER, M. J. Polyelectrolyte multilayer assembly as a function of pH and ionic strength using the polysaccharides chitosan and heparin. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 2021-2028, 2008.

BOHNER, M.; BAROUD, G. Injectability of calcium phosphate pastes. **Biomaterials**, v. 26, n. 13, p. 1553-1563 ISSN 0142-9612, 2005.

BOHNER, M.; GBURECK, U.; BARRALET, J. E. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: a critical assessment. **Biomaterials**, v. 26, n. 33, p. 6423-6429 ISSN 0142-9612, 2005.

BORDENAVE, L. Nuclear medicine serving prostheses and biomaterials. **ITBM-RBM**, v. 26, p. 206-211, 2005.

CALVO, C.; GOPAL, R. The crystal structure of Whitlockite from the Palermo Quarry. **American Mineralogist**, v. 60, p. 120-133, 1975.

CANILLAS, M.; PENA, P.; DE AZA, A. H.; RODRÍGUEZ, M. A. Calcium phosphates for biomedical applications. **Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio**, v. 56, n. 3, p. 91-112, 2017.

CARRODEGUAS, R. G.; DE AZA, S. alpha-Tricalcium phosphate: synthesis, properties and biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 10, p. 3536-46, Oct 2011.

CHANG, B.; AHUJA, N.; MA, C.; LIU, X. Injectable scaffolds: Preparation and application in dental and craniofacial regeneration. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 111, p. 1-26, Jan 2017.

CHEN, Q.-Z.; BRETCANU, O.; BOCCACCINI, A. R. Inorganic and composite bioactive scaffolds for bone tissue engineering. In: CHU, P. K. e LIU, X. (Ed.). **Biomaterials Fabrication and Processing Handbook**. 1. Boca Raton: CRC Press, 2008. cap. 3-44,

CHEN, Q.; BAINO, F.; SPRIANO, S.; PUGNO, N. M.; VITALE-BROVARONE, C. Modelling of the strength–porosity relationship in glass-ceramic foam scaffolds for bone repair. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 34, n. 11, p. 2663-2673, 2014.

COMMONS, W. **PEG Structural Formula**. 2016 2016.

CONDIE, R.; BOSE, S.; BANDYOPADHYAY, A. Bone cell–materials interaction on Si microchannels with bioinert coatings. **Acta Biomaterialia**, v. 3, p. 523-530, 2007.

COSTA, B. D.; CAMARGO, N. H.; OLESKOVICZ, N.; GAVA, A.; DALLABRIDA, A. L.; REGALIN, D.; LIMA, M. P. A.; MORAES, A. N. Neoformação óssea e osteointegração de biomateriais micro e nanoestruturados em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 2, p. 177-187, 2015.

D'ESTE, M.; EGLIN, D. Hydrogels in calcium phosphate moldable and injectable bone substitutes: Sticky excipients or advanced 3-D carriers? **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 3, p. 5421-5430, 2013.

DALMONICO, G. M. L.; FRAN CZAK, P. F.; LEVANDOWSKI, N., JR.; CAMARGO, N. H. A.; DALLABRIDA, A. L.; DA COSTA, B. D.; GIL, O. G.; CAMBRA-MOO, O.; RODRIGUEZ, M. A.; CANILLAS, M. An in vivo study on bone formation behavior of microporous granular calcium phosphate. **Biomaterials Science**, v. 5, n. 7, p. 1315-1325, Jun 27 2017.

DAMLAR, I.; ERDOGAN, O.; TATLI, U.; ARPAG, O. F.; GORMEZ, U.; USTUN, Y. Comparison of osteoconductive properties of three different beta-tricalcium phosphate graft materials: a pilot histomorphometric study in a pig model. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v. 43, n. 1, p. 175-80, Jan 2015.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 981-1014, 2011.

DE AZA, P.; RODRÍGUEZ, M.; GEHRKE, S.; MATÉ-SÁNCHEZ DE VAL, J.; CALVO-GUIRADO, J. A Si- α TCP Scaffold for Biomedical Applications: An Experimental Study Using the Rabbit Tibia Model. **Applied Sciences**, v. 7, n. 7, p. 706, 2017.

DE AZA, P. N.; PENA, J. I.; LUKLINSKA, Z. B.; MESEGUER-OLMO, L. Bioeutectic((R)) Ceramics for Biomedical Application Obtained by Laser Floating Zone Method. In vivo Evaluation. **Materials (Basel)**, v. 7, n. 4, p. 2395-2410, Mar 25 2014.

DE WOLFF, P. Technisch Physische Dienst Delft (The Netherlands). **ICDD Grant-in-Aid**, 1957.

DEE, K. C.; PULEO, D. A.; BIZIOS, R. **An introduction to tissue-biomaterial interactions**. 1. New Jersey: Wiley-Liss, 2002. 248.

DESBRIERES, J. Viscosity of Semiflexible Chitosan Solutions: Influence of Concentration, Temperature, and Role of Intermolecular Interactions. **Biomacromolecules**, v. 3, n. 2, p. 342-349, 2002.

DOROZHKIN, S. V. Bioceramics of calcium orthophosphates. **Biomaterials**, v. 31, n. 7, p. 1465-85, Mar 2010.

DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphate-based bioceramics. **Materials**, v. 6, n. 9, p. 3840-3942, 2013.

DOROZHKIN, S. V. Self-setting calcium orthophosphate formulations. **Journal of functional biomaterials**, v. 4, n. 4, p. 209-311, 2013.

DUARTE, A. R. C.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Preparation of chitosan scaffolds loaded with dexamethasone for tissue engineering applications using supercritical fluid technology. **European Polymer Journal**, v. 45, p. 141-148, 2009.

DUCHEYNE, P.; RADIN, S.; KING, L. The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. I. Dissolution. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 27, n. 1, p. 25-34, 1993.

EBRAHIMI, M.; BOTELHO, M. Biphasic calcium phosphates (BCP) of hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP) as bone substitutes: Importance of physicochemical characterizations in biomaterials studies. **Data Brief**, v. 10, p. 93-97, Feb 2017.

EBRAHIMI, M.; BOTELHO, M. G.; DOROZHKIN, S. V. Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. **Materials Science and Engineering. C, Materials for Biological Applications**, v. 71, p. 1293-1312, Feb 01 2017.

EISELT, P.; YEH, J.; LATVALA, R. K.; SHEA, L. D.; MOONEY, D. J. Porous carriers for biomedical applications based on alginate hydrogels. **Biomaterials**, v. 21, p. 1921-1927, 2000.

FILHO, E. A.; ASSIS, C. M.; VERCIK, L. O.; GUASTALDI, A. C. Biomateriais: deposição de hidroxiapatita sobre superfície de ti-cp modificada por aspersão térmica. **Química Nova**, v. 30, p. 1229-1232, 2007.

FLOROIAN, L.; SAVU, B.; SIMA, F.; MIHAILESCU, I. N.; TANASKOVIC, D.; JANACKOVIC, D. Synthesis and characterization of bioglass thin films. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures** v. 2, p. 285 - 291, 2007.

FRUIJTIER-POLLOTH, C. Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products. **Toxicology**, v. 214, n. 1-2, p. 1-38, Oct 15 2005.

GAUTHIER, O.; MÜLLER, R.; VON STECHOW, D.; LAMY, B.; WEISS, P.; BOULER, J. M.; AGUADO, E.; DACULSI, G. *In vivo* bone regeneration with injectable calcium phosphate biomaterial: a three-dimensional micro-computed tomographic, biomechanical and SEM study. **Biomaterials**, v. 26, p. 5444-5453, 2005.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan - a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, p. 1-14, 2006.

GHOSH, R.; SARKAR, R. Synthesis and characterization of sintered beta-tricalcium phosphate: A comparative study on the effect of preparation route. **Materials Science and Engineering. C, Materials for Biological Applications**, v. 67, p. 345-52, Oct 01 2016.

GIANNOUDIS, P. V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: an update. **Injury**, v. 36, n. 3, p. S20-S27, 2005.

GOEL, S. C.; SINGH, D.; RASTOGI, A.; KUMARASWAMY, V.; GUPTA, A.; SHARMA, N. Role of tricalcium phosphate implant in bridging the large osteoperiosteal gaps in rabbits. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 51, p. 375-380, 2013.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, v. 33, p. 1352-1358, 2010.

GULLAPALLI, R. P.; MAZZITELLI, C. L. Polyethylene glycols in oral and parenteral formulations-A critical review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, n. 2, p. 219-39, Dec 30 2015.

GUTOWSKA, A.; JEONG, B.; JASIONOWSKI, M. Injectable gels for tissue engineering. **The Anatomical Record**, v. 263, n. 4, p. 342-9, Aug 01 2001.

HAMMAN, J. H. Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. **Marine Drugs**, v. 8, n. 4, p. 1305-22, 2010.

HEINEMANN, S.; ROSSLER, S.; LEMM, M.; RUHNOW, M.; NIES, B. Properties of injectable ready-to-use calcium phosphate cement based on water-immiscible liquid. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 4, p. 6199-207, Apr 2013.

HENCH, L. L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials**, v. 19, p. 1419-1423, 1998.

HENCH, L. L.; JONES, J. R.; SEPULVEDA, P. Future strategies for tissue and organ replacement. In: (Ed.). **Bioactive materials for tissue engineering scaffolds**. 1: World Scientific Publishing Company, 2002. p.3-24.

HENESE, G.; BEN-NISSAN, B. Innovative bioceramics. **Materials Forum**, v. 27, p. 104-114, 2004.

HICKMAN, K. **Bioceramics**: ProQuest CSA 1999.

HING, K. A.; ANNAZ, B.; SAEED, S.; REVELL, P. A.; BUCKLAND, T. Microporosity Enhances Bioactivity of Synthetic Bone Graft Substitutes. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 16, p. 467– 475, 2005.

HONG, M.-H.; KIM, S.-M.; HAN, M.-H.; KIM, Y. H.; LEE, Y.-K.; OH, D. S. Evaluation of microstructure effect of the porous spherical β -tricalcium phosphate granules on cellular responses. **Ceramics International**, v. 40, n. 4, p. 6095-6102, 2014.

HONG, M.-H.; KIM, S.-M.; KIM, K.-M.; LEE, Y.-K. Development and in vitro assays of porous calcium polyphosphate granules. **Ceramics International**, v. 39, n. 5, p. 4991-4997, 2013.

HWANG, J. W.; PARK, J. S.; LEE, J. S.; JUNG, U. W.; KIM, C. S.; CHO, K. S.; LEE, Y. K.; CHOI, S. H. Comparative evaluation of three calcium phosphate synthetic block bone graft materials for bone regeneration in rabbit calvaria. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 100, n. 8, p. 2044-2052, 2012.

ISO. 10993-12, Biological Evaluation of Medical Devices-Part 12, Sample Preparation and Reference Materials. **British Standards Institution, UK**, 2012.

ISO, B. E. 10993-5. Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. **Geneva: International Organization for Standardization**, 2009.

JAYAKUMAR, R.; NWE, N.; TOKURA, S.; TAMURA, H. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, p. 175-181, 2007.

JAYAKUMAR, R.; PRABAHARAN, M.; KUMAR, P. T. S.; NAIR, S. V.; TAMURA, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 322-337, 2011.

JAYAKUMAR, R.; PRABAHARAN, M.; NAIR, S. V.; TAMURA, H. Novel chitin and chitosan nano fibers in biomedical applications. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 142-150, 2010.

KHAN, T. A.; PEH, K. K.; CH'NG, H. S. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** v. 5, p. 205-212, 2002.

KLEINHANS, C.; SCHMID, F. F.; SCHMID, F. V.; KLUGER, P. J. Comparison of osteoclastogenesis and resorption activity of human osteoclasts on tissue culture

polystyrene and on natural extracellular bone matrix in 2D and 3D. **Journal of Biotechnology**, v. 205, p. 101-10, Jul 10 2015.

KOBAYASHI, M.; KOIDE, T.; HYON, S. H. Tribological characteristics of polyethylene glycol (PEG) as a lubricant for wear resistance of ultra-high-molecular-weight polyethylene (UHMWPE) in artificial knee joint. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 38, p. 33-8, Oct 2014.

KOKUBO, T. **Bioceramics and their clinical applications**. 1. CRC Press; Woodhead Publishing, 2008. 760.

KOLHE, P.; KANNAN, R. M. Improvement in Ductility of Chitosan through Blending and Copolymerization with PEG: FTIR Investigation of Molecular Interactions. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 1, p. 173-180, 2003.

KREIDLER, E. R.; HUMMEL, F. A. Phase relations in the system SrO-P₂O₅ and the influence of water vapor on the formation of Sr₄P₂O₉. **Inorganic Chemistry**, v. 6, n. 5, p. 884-891, 1967.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, p. 920-926, 1993.

LARSSON, S.; HANNINK, G. Injectable bone-graft substitutes: Current products, their characteristics and indications, and new developments. **Injury (Bone Substitutes: A Comprehensive Overview)**, v. 42, p. S30-S34, 2011.

LARSSON, T. F.; MARTÍNEZ, J. M. M.; VALLÉS, J. L. **Biomaterials for healthcare - A decade of EU-funded research**. GENERAL FOR RESEARCH, I. T. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities 2007.

LEÓN, B.; JANSEN, J. A. **Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants**. 1. Springer, 2009. 328.

LINDE, A.; THORÉN, C.; DAHLIN, C.; SANDBERG, E. Creation of New Bone by an Osteopromotive Membrane Technique: An Experimental Study in Rats. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 51, p. 892-897, 1993.

LISBOA, H. M.; PRATA, S.; BORGES, J. P.; NOVO, C.; CORREIA, I. J.; RAMOS, A. M. **Patente 104595 - Substituto ósseo injetável e biocompatível**. Portugal: 21 p. 2011.

LIU, H.; LI, H.; CHENG, W.; YANG, Y.; ZHU, M.; ZHOU, C. Novel injectable calcium phosphate/chitosan composites for bone substitute materials. **Acta Biomaterialia**, v. 2, p. 557-565, 2006.

LOW, K. L.; TAN, S. H.; ZEIN, S. H. S.; ROETHER, J. A.; MOURIÑO, V.; BOCCACCINI, A. R. Calcium phosphate-based composites as injectable bone

substitute materials. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 94, n. 1, p. 273-286, 2010.

LU, J.; FLAUTRE, B.; ANSELME, K.; HARDOUIN, P.; GALLUR, A.; DESCAMPS, M.; THIERRY, B. Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 10, n. 2, p. 111-120, 1999.

MA, G.; YANG, D.; LI, Q.; WANG, K.; CHEN, B.; KENNEDY, J. F.; NIE, J. Injectable hydrogels based on chitosan derivative/polyethylene glycol dimethacrylate/N,N-dimethylacrylamide as bone tissue engineering matrix. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 3, p. 620-627, 2010.

MA, L.; GAO, C.; MAO, Z.; ZHOU, J.; SHEN, J.; HU, X.; HAN, C. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, p. 4833-4841, 2003.

MACLENNAN, G.; BEEVERS, C. A. The Crystal Structure of Dicalcium Phosphate, CaHPO_4 **Acta Crystallographica** v. 8, p. 579-583, 1955.

MACOSKO, C. W.; LARSON, R. G. **Rheology: principles, measurements, and applications**. 1. Wiley-VCH, 1994.

MANO, J. F.; SOUSA, R. A.; BOESEL, L. F.; NEVES, N. M.; REIS, R. L. Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent development. **Composites Science and Technology**, v. 64, p. 789-817, 2004.

MARCONI, W.; PIOZZI, A. Structure and properties of polymeric materials. In: (Ed.). **Integrated Biomaterials Science**: Springer, 2002. cap. 2, p.25-68. ISBN 0306466783.

MASUELLI, M. A.; ILLANES, C. O. Review of the characterization of sodium alginate by intrinsic viscosity measurements. Comparative analysis between conventional and single point methods. **International Journal of BioMaterials Science and Engineering**, v. 1, p. 1-11, 2014.

METTERS, A. T.; LIN, C. Biodegradable hydrogels: tailoring properties and function through chemistry and structure. In: (Ed.). **Biomaterials**: New York: CRC Press, 2007. cap. 5, p.5.1-5.44.

MI, F.-L.; SHYU, S.-S.; WU, Y.-B.; LEE, S.-T.; SHYONG, J.-Y.; HUANG, R.-N. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. **Biomaterials**, v. 22, p. 165-173, 2001.

MISRA, G. P.; GIL, E. S.; LOWE, T. L. In the biomedical arena. In: (Ed.). **Polymer grafting and crosslinking**: Wiley, 2009. cap. 6, p.145.

MORAIS, D. S.; RODRIGUES, M. A.; SILVA, T. I.; LOPES, M. A.; SANTOS, M.; SANTOS, J. D.; BOTELHO, C. M. Development and characterization of novel alginate-based hydrogels as vehicles for bone substitutes. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 134-42, Jun 5 2013.

MUCHA, M. Rheological characteristics of semi-dilute chitosan solutions. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 198, n. 2, p. 471-484, 1997.

MUELLER, B.; TRECCANI, L.; REZWAN, K. Antibacterial active open-porous hydroxyapatite/lysozyme scaffolds suitable as bone graft and depot for localised drug delivery. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 31, n. 8, p. 1123-1134, Mar 2017.

NAM, S.; WON, J.-E.; KIM, C.-H.; KIM, H.-W. Odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells stimulated by the calcium phosphate porous granules. **Journal of Tissue Engineering**, v. 2011, p. 1-10, 2011.

NETO, C. G. T.; GIACOMETTI, J. A.; JOB, A. E.; FERREIRA, F. C.; FONSECA, J. L. C.; PEREIRA, M. R. Thermal Analysis of Chitosan Based Networks. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, p. 97-103, 2005.

OKII, N.; NISHIMURA, S.; KURISU, K.; TAKESHIMA, Y.; UOZUMI, T. In Vivo Histological Changes Occurring in Hydroxyapatite Cranial Reconstruction. Case Report. **Neurologia medico-chirurgica**, v. 41, n. 2, p. 100-104, 2001.

OSTROWSKA-CZUBENKO, J.; GIERSZEWSKA-DRUZYNSKA, M. Effect of ionic crosslinking on the water state in hydrogel chitosan membranes. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 590-598, 2009.

PAGE, M.; BEJAOU, N.; CINQ-MARS, B.; LEMIEUX, P. Optimization of the tetrazolium-based colorimetric assay for the measurement of cell number and cytotoxicity. **International journal of immunopharmacology**, v. 10, n. 7, p. 785-793, 1988.

PALACHE, C.; BERMANN, H.; FRONDEL, C. Dana's system of mineralogy. In: (Ed.): John Wiley & Sons Inc., New York, London, v.2, 1951. p.879-889.

PALTI, A.; HOCH, T. A Concept for the Treatment of Various Dental Bone Defects. **Implant Dentistry**, v. 11, p. 73-78, 2002.

PARK, D.-J.; CHOI, B.-H.; ZHU, S.-J.; HUH, J.-Y.; KIM, B.-Y.; LEE, S.-H. Injectable bone using chitosan-alginate gel/mesenchymal stem cells/BMP-2 composites. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 33, p. 50-54, 2005.

PARK, J. B.; BRONZINO, J. D. **Biomaterials : Principles and applications**. 1. Boca Raton: CRC Press, 2003. 250.

PARK, J. W.; KIM, E. S.; JANG, J. H.; SUH, J. Y.; PARK, K. B.; HANAWA, T. Healing of rabbit calvarial bone defects using biphasic calcium phosphate ceramics made of submicron-sized grains with a hierarchical pore structure. **Clinical oral implants research**, v. 21, n. 3, p. 268-276, 2010.

PASUT, G.; VERONESE, F. M. State of the art in PEGylation: the great versatility achieved after forty years of research. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 461-72, Jul 20 2012.

PATRICK JR., C. W.; MIKOS, A. G.; MCINTIRE, L. V. **Frontiers in tissue engineering**. 1. Pergamon, 1998.

PELLEGRINI, G.; STARKEY LEWIS, P. J.; PALMER, L.; HETZEL, U.; GOLDRING, C. E.; PARK, B. K.; KIPAR, A.; WILLIAMS, D. P. Intraperitoneal administration of high doses of polyethylene glycol (PEG) causes hepatic subcapsular necrosis and low-grade peritonitis with a rise in hepatic biomarkers. **Toxicology**, v. 314, n. 2-3, p. 262-6, Dec 15 2013.

PEPPAS, N. Hydrogels. In: (Ed.). **Biomaterials science: An introduction to materials in medicine**. 2: Elsevier, 2004. cap. 2, p.100-107.

PÉREZ, J. M. M.; MATOS, M. V. Efecto del ion calcio en el comportamiento reológico de soluciones de alginato de sodio. **Tecnología Química**, v. 21, p. 46-51, 2001.

QIN, C.; LI, H.; XIAO, Q.; LIU, Y.; ZHU, J.; DU, Y. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, p. 367-374, 2006.

RABISOVÁ, M.; BAUTZOVÁ, T.; GAJDZIOK, J.; DVORÁCKOVÁ, K.; LAMPRECHT, A.; PELLEQUER, Y.; SPILKOVÁ, J. Coated chitosan pellets containing rutin intended for the treatment of inflammatory bowel disease: In vitro characteristics and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 422, p. 151-159, 2012.

RAMESH, S.; TAN, C. Y.; TOLOUEI, R.; AMIRIYAN, M.; PURBOLAKSONO, J.; SOPYAN, I.; TENG, W. D. Sintering behavior of hydroxyapatite prepared from different routes. **Materials & Design**, v. 34, p. 148-154, 2012.

RAMSDEN, J. J.; ALLEN, D. M.; STEPHENSON, D. J.; ALCOCK, J. R.; PEGGS, G. N.; FULLER, G.; GOCH, G. The design and manufacture of biomedical surfaces. **CIRP Annals - Manufacturing Technology**, v. 56, p. 687-711, 2007.

RATNER, B.; HOFFMAN, A.; SCHOEN, F.; LEMONS, J. **Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine**. 2. London: Elsevier Academic Press, 2004. 851.

RATNER, B. D.; BRYANT, S. J. Biomaterials: where we have been and where we are going. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 6, p. 41-75, 2004.

ROBERT, W.; BUCHOLZ, M. Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 202, p. 44-52, 2002.

RYU, H.-S.; HONG, K. S.; LEE, J.-K.; KIM, D. J.; LEE, J. H.; CHANG, B.-S.; LEE, D.-H.; LEE, C.-K.; CHUNG, S.-S. Magnesia-doped HA/ β -TCP ceramics and evaluation of their biocompatibility. **Biomaterials**, v. 25, n. 3, p. 393-401, 2004.

RYU, H.-S.; YOUN, H.-J.; HONG, K. S.; CHANG, B.-S.; LEE, C.-K.; CHUNG, S.-S. An improvement in sintering property of β -tricalcium phosphate by addition of calcium pyrophosphate. **Biomaterials**, v. 23, n. 3, p. 909-914, 2002.

SAGAR, N.; PANDEY, A. K.; GURBANI, D.; KHAN, K.; SINGH, D.; CHAUDHARI, B. P.; SONI, V. P.; CHATTOPADHYAY, N.; DHAWAN, A.; BELLARE, J. R. In-vivo efficacy of compliant 3D nano-composite in critical-size bone defect repair: a six month preclinical study in rabbit. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77578, 2013.

SAMPAIO, G. Y. H. **Produção de Matrizes Tridimensionais Porosas de Policaprolactona-Nanohidroxiapatita**. 2016. 170 (PhD). Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande

SCHMITT, M.; WEISS, P.; BOURGES, X.; AMADOR DEL VALLE, G.; DACULSI, G. Crystallization at the polymer/calcium-phosphate interface in a sterilized injectable bone substitute IBS. **Biomaterials**, v. 23, p. 2789–2794, 2002.

SENYIGIT, Z. A.; KARAVANA, S. Y.; ERAC, B.; GURSEL, O.; LIMONCU, M. H.; BALOGLU, E. Evaluation of chitosan based vaginal bioadhesive gel formulations for antifungal drugs. **Acta Pharmaceutica**, v. 64, n. 2, p. 139-56, Jun 2014.

SHACKELFORD, J. F. **Bioceramics (Advanced Ceramics, 1)**. Taylor & Francis e-Library, 2005. 82.

SHARMA, C. P. Biomaterials and artificial organs: few challenging areas. **Trends in Biomaterials & Artificial Organs**, v. 18, p. 148-157, 2005.

SHI, D. **Introduction to Biomaterials**. 1. Beijing: World Scientific Pub Co, 2006. 253.

SONAJE, K.; LIN, Y.-H.; JUANG, J.-H.; WEY, S.-P.; CHEN, C.-T.; SUNG, H.-W. In vivo evaluation of safety and efficacy of self-assembled nanoparticles for oral insulin delivery. **Biomaterials**, v. 30, p. 2329-233, 2009.

SONG, H. Y.; ESFAKUR RAHMAN, A. H.; LEE, B. T. Fabrication of calcium phosphate-calcium sulfate injectable bone substitute using chitosan and citric acid. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, p. 935-941, 2009.

STOCKERT, J. C.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A.; CAÑETE, M.; HOROBIN, R. W.; VILLANUEVA, Á. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the

formazan product is in lipid droplets. **Acta histochemica**, v. 114, n. 8, p. 785-796, 2012.

SUCHANEK, W.; YOSHIMURA, M. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. **Journal of Materials Research**, v. 13, n. 01, p. 94-117, 1998.

TANASE, C. E.; POPA, M. I.; VERESTIUC, L. Biomimetic bone scaffolds based on chitosan and calcium phosphates. **Materials Letters**, v. 65, p. 1681-1683, 2011.

TARAVEL, M. N.; DOMARD, A. Collagen and its interactions with chitosan: III. Some biological and mechanical properties. **Biomaterials**, v. 17, n. 4, p. 451-455, 1996.

TECHNOLOGY, F. P. **Structural formula of chitosan**. 2012 2012.

TORRES, M. A.; BEPPU, M. M.; ARRUDA, E. J. Viscous and viscoelastic properties of chitosan solutions and gels. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 2, p. 101-108, 2006.

TROJANI, C.; BOUKHECHBA, F.; SCIMECA, J. C.; VANDENBOS, F.; MICHIELS, J. F.; DACULSI, G.; BOILEAU, P.; WEISS, P.; CARLE, G. F.; ROCHET, N. Ectopic bone formation using an injectable biphasic calcium phosphate/Si-HPMC hydrogel composite loaded with undifferentiated bone marrow stromal cells. **Biomaterials**, v. 27, p. 3256-3264, 2006.

TSUCHIDA, T.; KUBO, J.; YOSHIOKA, T.; SAKUMA, S.; TAKEGUCHI, T.; UEDA, W. Influence of preparations factors on Ca/P ratio and surface basicity of hydroxyapatite catalyst. **Journal of the Japan Petroleum Institute**, v. 52, p. 51-59, 2009.

VALLET-REGÍ, M.; ARCOS, D. **Biomimetic Nanoceramic in Clinical Use From Materials to Applications**. 1. RSC Publishing, 2008. 173.

VIOLA, J.; LAL, B.; GRAD, O. **The emergence of tissue engineering as a research field - chapter 3**: The National Science Foundation. Virginia USA 2003.

VO, T. N.; EKENSEAIR, A. K.; SPICER, P. P.; WATSON, B. M.; TZOUANAS, S. N.; ROH, T. T.; MIKOS, A. G. In vitro and in vivo evaluation of self-mineralization and biocompatibility of injectable, dual-gelling hydrogels for bone tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 205, p. 25-34, May 10 2015.

VORNDRAN, E.; GEFFERS, M.; EWALD, A.; LEMM, M.; NIES, B.; GBURECK, U. Ready-to-use injectable calcium phosphate bone cement paste as drug carrier. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 12, p. 9558-67, Dec 2013.

WANG, M. Bioactive materials and processing. In: SHI, D. (Ed.). **Biomaterials and Tissue Engineering**. 1. Berlin: Springer, 2004. cap. 1-82, p.257.

WASIKIEWICZ, J. M.; YOSHII, F.; NAGASAWA, N.; WACH, R. A.; MITOMO, H. Degradation of chitosan and sodium alginate by gamma radiation, sonochemical and ultraviolet methods. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 73, p. 287-295, 2005.

WEISS, P.; LAYROLLE, P.; CLERGEAU, L. P.; ENCKEL, B.; PILET, P.; AMOURIQ, Y.; DACULSI, G.; GIUMELLI, B. The safety and efficacy of an injectable bone substitute in dental sockets demonstrated in a human clinical trial. **Biomaterials**, v. 28, p. 3295-3305, 2007.

WIESMANN, H. P.; JOOS, U.; MEYER, U. Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering. Part II. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 33, n. 6, p. 523-30, Sep 2004.

WILLERTH, S. M.; SAKIYAMA-ELBERT, S. E. **Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery**. The Stem Cell Research Community StemBook HSCI - Harvard Stem Cell Institute: StemBook HSCI - Harvard Stem Cell Institute: 1-18 p. 2008.

WILLIAMS, D. F. Definitions in Biomaterials. Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, 1986, Chester, England. Elsevier, March, 3-5.

WISE, D. L. **Biomaterials and Bioengineering Handbook**. 1. CRC, 2000.

WONG, J. Y.; BRONZINO, J. D. **Biomaterials**. 1. Boca Raton: CRC Press, 2007. 296.

WOOD, D. European patents for biotechnological inventions-past, present and future. **World Patent Information**, v. 23, p. 339, 2001.

WORLD OF CHEMICALS. **Ammonium Polyacrylate 2016a**.

_____. **Sodium Alginate 2016b**.

XIE, L.; YU, H.; DENG, Y.; YANG, W.; LIAO, L.; LONG, Q. Preparation, characterization and in vitro dissolution behavior of porous biphasic alpha/beta-tricalcium phosphate bioceramics. **Materials Science and Engineering: C Materials for Biological Applications**, v. 59, p. 1007-15, Feb 1 2016.

XU, C.; SU, P.; CHEN, X.; MENG, Y.; YU, W.; XIANG, A. P.; WANG, Y. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic Bioglass-Collagen-Phosphatidylserine composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 32, p. 1051-1058, 2011.

ZHANG, L.; CHEN, Y.; RODRIGUEZ, J.; FENNIRI, H.; WEBSTER, T. J. Biomimetic helical rosette nanotubes and nanocrystalline hydroxyapatite coatings on titanium for improving orthopedic implants. **International Journal of Nanomedicine**, v. 3, p. 323-333, 2008.

ZHANG, L.; HANAGATA, N.; MAEDA, M.; MINOWA, T.; IKOMA, T.; FAN, H.; ZHANG, X. Porous hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate ceramics promote ectopic osteoblast differentiation from mesenchymal stem cells. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 10, p. 1-9, 2009.

ZHANG, M.; LI, X. H.; GONG, Y. D.; ZHAO, N. M.; ZHANG, X. F. Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG. **Biomaterials**, v. 23, n. 13, p. 2641-2648, 2002.