



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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO DE BIOCOMPÓSITOS RÍGIDOS PARA
APLICAÇÃO COMO BIOMATERIAL**

RITA DE CÁSSIA ALVES LEAL

**CAMPINA GRANDE
Fevereiro/2012**



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

DESENVOLVIMENTO DE BIOCÓMPÓSITOS RÍGIDOS PARA
APLICAÇÃO COMO BIOMATERIAL

RITA DE CÁSSIA ALVES LEAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

Agência Financiadora: CAPES

Campina Grande

Fevereiro/2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

L435d Leal , Rita de Cássia Alves.
Desenvolvimento de biocompósitos rígidos para aplicação como biomaterial / Rita de Cássia Alves Leal. - Campina Grande, 2012.
69 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) –
Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia.
Orientador: Prof. Dr. Marcus Vínicius Lia Fook.
Referências.

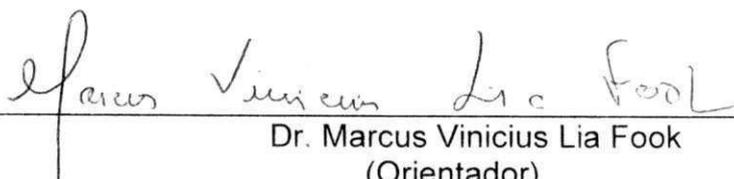
1. Biocompósito. 2. Hidroxiapatita. 3. Quitosana. I. Título.

CDU 678.7 (043)

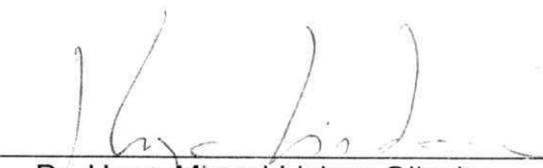
**DESENVOLVIMENTO DE BIOCAMPÓSITOS RÍGIDOS PARA APLICAÇÃO
COMO BIOMATERIAL.**

Rita de Cássia Alves Leal

Dissertação Aprovada em 15/02/2012 pela banca examinadora constituída dos seguintes membros:


Dr. Marcus Vinicius Lia Fook
(Orientador)
PPG-CEMat/UFCEG


Dra. Maria Roberta de Oliveira Pinto
(Examinadora Externa)
CCT/UEPB


Dr. Hugo Miguel Lisboa Oliveira
(Examinador Externo)
Pesquisador UAEMa/UFCEG

DEDICATÓRIA

Em primeiro lugar a Deus,

Que me deu força, perseverança, saúde e sabedoria para acreditar que tudo é possível... Basta pedir, acreditar e agir para sua glória, por intermédio de Nossa Senhora...

Aos meus pais, José Candido e Felícia Alves

Por me darem mais do que apoio, por me incentivarem a seguir em busca do melhoramento de minha formação acadêmica, por me mostrar que nada vence a dedicação e o trabalho honesto; pelo amor incondicional que nos une.

Mais uma vez este sonho realizado é nosso! Obrigada pela confiança... Acredito que vocês nunca imaginaram que eu chegaria tão longe... O amor de vocês foi o combustível para que eu realizasse mais este projeto, e mesmo com mais esse título continuo sendo o reflexo de vocês e dos valores que me ensinaram... Amo muito vocês.

Ao meu Esposo, Arley Jackson Cruz,

"E mesmo que eu viva para sempre e todos os meus sonhos sejam realizados, as minhas lembranças de amor sempre serão suas."(Perhaps love)

Obrigada pelo amor, pelo incentivo, por ser mais "razão" em alguns momentos e por ter vencido comigo mais esse desafio...

AGRADECIMENTOS

À Deus que sempre esteve presente em minha vida, ajudando-me a vencer todos os obstáculos e a alcançar os meus objetivos.

Aos meus pais, **José Candido e Felícia**, pelo amor, incentivo e dedicação para a concretização de mais um, entre tantos, projetos que devo a seus esforços e as suas presenças incessantes.

Aos meus familiares Kleber, Kleilton, Caline, Suelane, Kléber Filho, Camila, pelo carinho, amor, incentivo e dedicação ao longo dessa conquista.

Ao meu esposo, **Arley Jackson**, pelo amor, apoio, paciência, carinho e dedicação.

Aos meus sogros, **Alina e Jackson**, pelo apoio em toda jornada.

Ao Prof. Dr. Marcus Vinicius, pelo carinho, paciência e dedicação para comigo, com os quais aprendi grandes lições para a minha vida profissional. Com você aprendi que nunca devemos desistir de uma ideia, por mais que apareçam muitos obstáculos, pois eles servirão para enriquecer nosso trabalho.

A **Imarally Souza**, pela ajuda constante na elaboração deste trabalho.

A **Prof. Dr. Maria Roberta de Oliveira e ao Prof. Dr. Hugo Miguel Lisboa de Oliveira** por aceitar colaborar com este trabalho.

Aos amigos do Grupo de Biomateriais da UFCG, **Imarally Souza, Rossemberg Barbosa, Maria Eduarda, Márcio José, Roberta Meira, Camila, Ítalo, Hygo, Thiago Fidelis, Ana Carolina Brasil, Emanuel, Rosemary Cunha Lima, Waldênia, Adriana Holanda, Izabel, Carmen, Francisco Vieira, Greyce Sampaio, Glória, Wladymyr, Katilaine, Roberta, Eva, Anna Sylvia e João Paulo** pela participação neste trabalho.

Aos que admiro e gosto: **Roberta Leal, Maria Eduarda Moraes, Dalvanice Leal, Rosani Cristina e Eunice Leal**.

Aos funcionários de Engenharia de Materiais, em especial: **Márcia, Mila, Sérgio, Violeta, Emanuel, Adriana, André e Kátia**.

A **CAPES**, pela concessão da bolsa de estudos deste mestrado.

"Não conheço ninguém que conseguiu realizar seu sonho, sem sacrificar feriados e domingos pelo menos uma centena de vezes. Da mesma forma, se você quiser construir uma relação amigável com seus filhos, terá que se dedicar a isso, superar o cansaço, arrumar tempo para ficar com eles, deixar de lado o orgulho e o comodismo. Se quiser um casamento gratificante, terá que investir tempo, energia e sentimentos nesse objetivo.

O sucesso é construído à noite! Durante o dia você faz o que todos fazem. Mas, para obter um resultado diferente da maioria, você tem que ser especial. Se fizer igual a todo mundo, obterá os mesmos resultados. Não se compare à maioria, pois, infelizmente ela não é modelo de sucesso. Se você quiser atingir uma meta especial, terá que estudar no horário em que os outros estão tomando chope com batatas fritas.

Terá de planejar, enquanto os outros permanecem à frente da televisão. Terá de trabalhar enquanto os outros tomam sol à beira da piscina.

A realização de um sonho depende de dedicação, há muita gente que espera que o sonho se realize por magia, mas toda magia é ilusão, e a ilusão não tira ninguém de onde está, em verdade a ilusão é combustível dos perdedores pois...

Quem quer fazer alguma coisa, encontra um MEIO. Quem não quer fazer nada, encontra uma DESCULPA."

Roberto Shinyashiki

RESUMO

A Hidroxiapatita é um dos materiais biocompatíveis mais conhecidos, favorecendo o crescimento ósseo. Contudo, sua resistência mecânica é limitada. A fim de minimizar este problema, uma solução é potencializar sua ação com o biopolímero quitosana, indicado para aplicações como biomaterial. No presente trabalho obteve-se biocompósitos - hidroxiapatita/quitosana - para a aplicação como biomaterial. Para a obtenção dos biocompósitos, grânulos de hidroxiapatita foram adicionados sob agitação constante em uma solução de quitosana, em quantidades necessárias para a obtenção de um produto com uma razão 70:30 (HA/CS). Em seguida a pasta formada foi filtrada e prensada para obtenção do biocompósito rígido. A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do biocompósito HA/CS, indicou que houve uma boa dispersão das partículas de HA na quitosana com a presença de pequenos poros na superfície da amostra. Os resultados de DRX demonstraram que não houve alteração significativa do perfil da hidroxiapatita (HA) com a incorporação da quitosana. Observou-se na análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) bandas características da hidroxiapatita, como também bandas que caracterizam uma interação entre a quitosana e a hidroxiapatita. De acordo com a análise de absorção de água os biocompósitos HA/CS apresentaram uma absorção de água de aproximadamente 48,365%. A biocompatibilidade dos biocompósitos HA/CS foi confirmada com o ensaio de MTT, onde revelou a não toxicidade dos mesmos. Os biocompósitos apresentaram valores de resistência mecânicas menores do que os reportados em literatura para aplicação em osso cortical, a resistência mecânica obtida nas diversas condições de processamento permitem seu uso para substituição de osso esponjoso. De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que os biocompósitos obtidos apresentaram, do ponto de vista morfológico, características densas, não apresentaram toxicidade, mantiveram suas características cristalográficas, demonstraram interação entre os compostos e apresentaram propriedades mecânicas que se enquadram entre os valores reportados para osso cortical e esponjoso, no qual permite uma aplicação para substituição de osso esponjoso.

Palavras-chave: Biocompósito, hidroxiapatita, quitosana.

ABSTRACT

The hydroxyapatite is one of the most biocompatible materials known by encouraging bone growth. However, the main drawback it is the poor mechanical strength. A method to overcome this problem is the addition of the biopolymer chitosan, suitable for applications as biomaterials. In this study was obtained a hydroxyapatite – chitosan biocomposites for application as a biomaterial. To obtain the biocomposites, hydroxyapatite granules were added under constant stirring in a solution of chitosan in quantities necessary to obtain a product with a ratio 70:30 (HA/CS). Then the paste formed was filtered and pressed to obtain the biocomposite disk. The analysis of scanning electron microscopy (SEM) of the biocomposite HA/CS, indicated that there was a good dispersion of particles of HA chitosan in the presence of small pores on the surface of the sample. XRD results showed no significant change in the profile of hydroxyapatite (HA) with the incorporation of chitosan. It was observed in the analysis by Infrared Spectroscopy with Fourier Transform (FTIR) bands characteristic of hydroxyapatite, as well as bands that characterize the interaction between chitosan and hydroxyapatite. According with the analysis of water absorption the biocomposites HA/CS showed water absorption of approximately 48.365%. The biocompatibility of biocomposites HA/CS was confirmed with the MTT assay, where did not reveal a toxicity of same. The biocomposites presented mechanical strength values lower than those reported in literature for use in cortical bone, the mechanical strength obtained at different processing conditions allow its use in spongy bone replacement. According with results, we can concluded that the obtained had biocomposites, the morphological point of view, features dense showed no toxicity, they maintained their crystallographic features demonstrated interactions between the compounds and had mechanical properties which fall between the values reported for compact and spongy bone, which allows an application to replacement of spongy bone.

Key-words: Biocomposite, hydroxyapatite, chitosan.

PUBLICAÇÕES

LEAL, R. C. A., NASCIMENTO, I.V.S.R., FOOK, M.V.L., FURTADO, G.T.F.S.
Obtenção e Caracterização de Biomcompósito Quitosana/Hidroxiapatita para
Aplicação como Biomaterial In: 55 Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2011,
Porto de Galinhas.

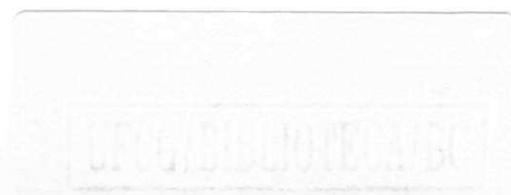
LEAL, R. C. A., FOOK, A. C. B .M., NASCIMENTO, I.V.S.R., FOOK, M.V.L.
Synthesis and Characterization of Chitosan Biocomposites/Hydroxyapatite
obtained by Reaction of Precipitation In: EIGHTH INTERNATIONAL LATIN-
AMERICAN CONFERENCE ON POWDER TECHNOLOGY, 2011,
FLORIANÓPOLIS - SC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação dos dois componentes da macroestrutura óssea. ...	21
Figura 2: Rede cristalina da hidroxiapatita.	28
Figura 3: Representação das estruturas primárias idealizadas de quitina e quitosana, onde n é o grau de polimerização.	32
Figura 4: Fluxograma da Metodologia do Trabalho.....	38
Figura 5: Esquema de uma gota sobre uma superfície durante medidas de ângulo de contato e o equilíbrio termodinâmico entre as três fases.	43
Figura 6: Corpos de Prova para ensaio de Flexão - ASTM C1161.	45
Figura 7: Corpos de Prova para ensaio de Compressão - ASTM F451-08.....	46
Figura 8: MEV do biocompósito HA/CS.	47
Figura 9: MEV da amostra calcinada a 900°C.	47
Figura 10: EDX do biocompósito HA/CS.....	48
Figura 11: Difratoograma de raios-X do pó de HA comparado com o padrão de referência.	48
Figura 12: Análise quantitativa dos picos do espectrograma de Raios X.....	49
Figura 13: Difratoograma de DRX: HA, CS, HA/CS.....	49
Figura 14: Espectro vibracional de IV da HA, CS e HA/CS.....	50
Figura 15: Gráfico de Tensão Superficial.	51
Figura 16: Porcentagem da absorção de água pelos biocompósitos HA/CS. ...	52
Figura 17: Viabilidade de macrófagos de camundongos Swis na presença dos biocompósitos. HA-CS, LPS – controle positivo, CN – controle negativo.	53
Figura 18: Gráfico Tensão x deformação.....	54
Figura 19: Gráfico Tensão x Deformação.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades mecânicas dos tecidos ósseos	22
Tabela 2: Propriedades Desejadas de Biocerâmicas Implantáveis.....	26
Tabela 3: Elementos Químicos da HA usada como implante.	29
Tabela 4: Polímeros naturais utilizados na engenharia do tecido ósseo.....	31
Tabela 5: Principais propriedades da quitosana e aplicações biomédicas.	33
Tabela 6: Valores obtidos nos ensaios de flexão.	55
Tabela 7: Valores obtidos nos ensaios de compressão.	56



LISTA DE SIGLAS

ASTM	American Society for Testing and Materials
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CPC	Cimento de Fosfato de Cálcio
CS	Quitossana
DRX	Difração de Raios X
FTIR	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de
Fourier	
GlcNAc	Acetil Glucosamina
HA	Hidroxiapatita
MEV	Microscopia Eletrônica de varredura
TCP	Fosfato Tricálcico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 Tecido Ósseo	20
3.2 Propriedades Mecânicas do Osso	21
3.3 Biomateriais	23
3.4 Biocerâmicas	25
3.4.1 Hidroxiapatita	27
3.5 Biopolímeros Polímeros Naturais	30
3.5.1 Quitosana	31
3.6 Biocompósito Cerâmica – Biopolímero	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Local da Pesquisa	37
4.2 Materiais	37
4.3 Preparação do Pó de Fosfato de Cálcio	37
4.4 Preparação da Solução de Quitosana 2g/100mL	38
4.5 Preparação dos Biocompósitos de Hidroxiapatita/Quitosana	38
4.6 Caracterização dos Materiais	40
4.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura	41
4.6.2 Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDX)	41
4.6.2 Difração de Raios X	42
4.6.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	42
4.6.4 Molhabilidade por Ângulo de Contato	42
4.6.5 Absorção de água (Swelling)	43
4.6.6 Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos	44
4.6.7 Ensaio de Flexão	44
4.6.8 Ensaio de Compressão	45

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDX).....	47
5.2 Análise por Difração de Raios X.....	48
5.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	50
5.4 Tensão Superficial.....	51
5.5 Absorção de água (<i>Swelling</i>).....	52
5.6 Avaliação da viabilidade celular dos Macrófagos.....	52
5.7 Ensaio de Flexão.....	54
5.8 Ensaio de Compressão.....	55
6 CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

Por séculos, quando tecidos ou órgãos tornavam-se danificados, a única alternativa de médicos e especialistas era a excisão da parte afetada, com limitações, estéticas e funcionais o que conduzia a somente uma ilusória melhora na qualidade de vida. Contudo, a expectativa de vida, decorrente destas intervenções, raramente ultrapassava a faixa etária da progressiva diminuição da qualidade dos tecidos, e dessa forma a necessidade de substituir as partes danificadas era pequena. Durante o último século a situação mudou acentuadamente (APARECIDA, 2006).

A magnitude desses problemas tem levado pesquisadores à procura por materiais que possam substituir de forma apropriada os ossos danificados. O desenvolvimento de biomateriais mostra-se, fundamentalmente, importante uma vez que representa um aumento na expectativa de vida, na saúde sistêmica e no bem estar da população. Entretanto, o biomimetismo ósseo é complexo, uma vez que os ossos apresentam estrutura hierárquica dinâmica e variada, classificando-se em duas macroestruturas: osso cortical denso e compacto e, osso trabecular que é uma teia de macroporos abertos (osso trabecular: poroso e esponjoso). Possui uma fração em escala nanométrica que consiste de uma matriz de fibras de colágeno que promove resistência à tração e tenacidade, algumas outras proteínas (~5%), e nanocristais de hidroxiapatita (RIBEIRO, 2009).

As cerâmicas de fosfato de cálcio têm merecido lugar de destaque entre as denominadas biocerâmicas por não apresentarem toxicidade local ou sistêmica (biocompatibilidade), ausência de respostas a corpo estranho ou inflamações e por apresentarem propriedades de osteocondução (BILLOTTE, 2000; FINISIE, JOSUÉ, FÁVERE et al., 2001; SANTOS, FLORENTINO, SAEKI et al., 2005).

As cerâmicas de fosfato de cálcio incluem uma variedade de cerâmicas, tais como a hidroxiapatita (HA), fosfato tricálcico (TCP), fosfato tetracálcico (TTCP), Fosfato Monocálcico (MCP)(MIAO, HU, LIU et al., 2004). As cerâmicas de fosfato de cálcio incluem uma variedade de apatitas, que dependem da razão Ca/P.

Devido à grande similaridade química da hidroxiapatita com a fase mineral dos tecidos ósseos, a HA é um dos materiais mais biocompatíveis conhecidos, favorecendo o crescimento ósseo para os locais em que ela se encontra (osteocondutor), estabelecendo ligações de natureza química com o tecido ósseo, permitindo a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas, sendo que as células não distinguem entre a hidroxiapatita e a superfície óssea (BILLOTTE, 2000; FINISIE, JOSUÉ, FÁVERE et al., 2001; SANTOS, FLORENTINO, SAEKI et al., 2005; RIBEIRO, 2009).

A hidroxiapatita têm sido largamente utilizada em aplicações em locais que requeiram baixas ou nenhuma sustentação. Em cirurgia ortopédica, a mesma é utilizada para preenchimento de defeitos ósseos em consequência de perdas ósseas. Em odontologia, as cerâmicas de fosfato de cálcio são utilizadas na reconstrução maxilar. Recobrimentos densos ou porosos de cerâmicas de fosfato de cálcio são frequentemente aplicados em materiais para fixação biológica ou osseointegração de implantes de quadril e implantes dentários (MIAO, HU, LIU et al., 2004).

Os biomateriais raramente apresentam todas as características fundamentais para serem considerados substitutos ósseos ideais, características como a biocompatibilidade, propriedades osteoindutivas e osteocondutivas (bioatividade) e a similaridade biomecânica com o osso. Estas características são raramente encontradas em um único material, e por isto os materiais compósitos estão se adequando às aplicações clínicas. A produção de compósitos de matriz polimérica dotados de uma fase bioativa é uma forma de se minimizar as desigualdades mecânicas entre materiais bioativos e tecidos vivos (SOUZA, FORTULAN, ANTUNES et al., 2006).

Existem algumas desvantagens específicas que ainda limitam o uso da HA cerâmica para substituição de tecidos duros, tais como sua natureza frágil, a realidade conflitante entre porosidade e resistência mecânica e o problema de migração das partículas (ANGELO, 2008).

Devido o osso ser um tecido que requer algum grau de tensão mecânica para manter sua vitalidade, a segurança a longo prazo de um implante permanente de HA é questionável. A fim de minimizar, ou até mesmo superar

estes problemas, uma solução seria misturá-la a um ligante adequado. Nesse sentido, têm sido empregados vários biopolímeros, tais como colágeno, cola de fibrila, gelatina, quitosana e o alginato (SIVAKUMAR, RAO, 2002).

Polímeros biodegradáveis e cerâmicas bioativas são combinadas numa grande variedade de materiais compósitos para serem usados na substituição e regeneração do tecido ósseo (ZIOUPOS, BARBENEL, FISHER, 1992; REZWAN, CHEN, BLAKER et al., 2006).

A quitosana é particularmente indicada para aplicações como biomaterial, devido à sua compatibilidade com organismos vivos. Além disso, é muito interessante economicamente por ser derivada do segundo biomaterial mais abundante na natureza, a quitina. Suas aplicações na área de biomateriais são: sistema de liberação controlada de fármacos, pele artificial, manufatura de lentes de contato, engenharia de tecidos, membranas artificiais, periodontais, ortopédicas, entre outras (CANELLA e GARCIA, 2001; ASSIS e SILVA, 2003).

Dentre as características como biocompatibilidade e a biodegradabilidade, foram encontradas diversas aplicações para quitosana, dentre elas na área médica aonde vem sendo empregada como bioadesivo, osseointegrador (LEE, NAM, IM et al., 2002), agente cicatrizador, agente microbiano e material de bandagem (SENEL e McCLURE, 2004), inibição de células tumorais, efeito antifúngico, atividade antiácida e antiúlcera, ação hemostática e hipocolesterolêmica (DAMIAN, BEIRÃO, FRANCISCO et al., 2005).

A quitosana é um polímero que pode oferecer grandes vantagens quando utilizado com fosfatos de cálcio, por suas propriedades elastoméricas (CHOW, 2009). No entanto, apesar de toda a sua potencialidade a obtenção de um biocompósito orgânico-mineral contendo quitosana e hidroxiapatita com características bioativas torna-se muito importante para o auxílio em operações de enxertia, em especial as que envolvem Regeneração Tecidual Guiada-RTG (FRAGA, MARTINS, RIGO et al., 2006).

A combinação hidroxiapatita-quitosana (HA/CS) pode ser utilizada para preparar compostos com atividade biológica controlada (Biodegradabilidade). A

Hidroxiapatita pode atuar como um agente modificador reticular (devido à presença de cálcio e fósforo) (FELÍCIO-FERNANDES e LARANJEIRA, 2000).

Torna-se de relevante importância o desenvolvimento de biocompósitos para reconstituição do tecido ósseo, que possa atender à crescente demanda desses materiais nas aplicações biológicas das diversas áreas da saúde.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Desenvolvimento e caracterização de biocompósitos hidroxiapatita/biopolímero, para reparação e regeneração óssea.

2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer condições de processamento das fases do biocompósito;
- Determinar condições de cura do biocompósito;
- Relacionar morfologia e propriedades mecânicas do biocompósito;
- Avaliar o potencial citotóxico;
- Avaliar as propriedades mecânicas dos biocompósitos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Tecido Ósseo

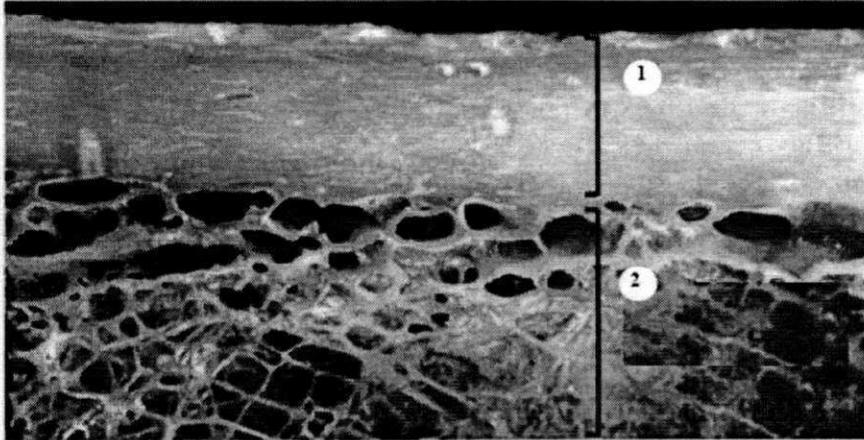
Para a compreensão do mecanismo de remodelação óssea é imprescindível o conhecimento da fisiologia óssea, que por sua vez, está fundamentada na composição bioquímica e molecular do tecido ósseo, bem como em suas propriedades físico-químicas (MORAES JÚNIOR, 2002).

O osso humano é um material compósito constituído de fase orgânica e inorgânica. A fase orgânica é composta principalmente de uma proteína denominada colágeno tipo I. A parte inorgânica do osso, que constitui cerca de 60% de seu peso seco, é composta principalmente por cálcio e fósforo, juntamente com outros componentes, incluindo bicarbonato, citrato, magnésio, sódio e potássio. O cálcio e o fósforo existem basicamente sob a forma de cristais de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, mas o fosfato tricalcico também está presente na forma amorfa (SINHA, INGLE, MUNIM et al., 2001; MURUGAN e RAMAHRISHNA, 2005). No entanto o osso também é composto por tecido vivo, cerca de 15% da matriz orgânica contem: Osteócitos (células achatadas na superfície do osso chamadas de células de revestimento); Osteoclastos (células de reabsorção que dissolvem os minerais e digerem a matriz óssea); Osteoblastos (células progenitoras de osso que produzem matriz óssea) (DOROZHKIN, 2007).

Os ossos variam na forma, tamanho e posição topográfica, havendo varias maneiras de classificá-los. A mais comum é aquela que divide o esqueleto em osso cortical e osso trabecular (VEDI, BELL, LOVERIDGE et al., 2003; BARROS, ABAD, KISS et al., 2008). De maneira geral, aproximadamente 80% do esqueleto consiste em osso compacto e 20% em osso esponjoso (Figura 1) (TORTORA e GRABOWSKI, 2002). Entre 75-95% do volume do osso esponjoso é constituído por poros interconectados e é preenchido com medula óssea. O osso esponjoso possui uma porosidade considerada alta, de 30 a 90%, sendo capaz de suportar tensões e pressões antes de fraturar quando submetido a um trauma (RODRIGUES, 2003).

A Figura 1 apresenta os dois componentes macroestruturais integrados em hierarquias macroestruturais distintas: osso cortical e osso esponjoso.

Figura 1: Representação dos dois componentes da macroestrutura óssea.



- 1) Osso cortical: forma 80% do esqueleto, denso e duro, parte externa e o corpo de ossos longos.
 2) Osso trabecular: forma os outros 20%, rede 3D de trabéculas, vértebras e diáfise de ossos longos.
FONTE: (HOLLINGER, BUCK, e BRUDER, 1999).

O tecido ósseo compacto consiste em ósteons com poucos espaços entre seus componentes rígidos. O tecido ósseo compacto se localiza sobre o tecido ósseo esponjoso, nas epífises, e constitui a maior parte do tecido ósseo da diáfise. Funcionalmente, o tecido ósseo compacto protege, sustenta e resiste às forças de tensão. Ao contrário do tecido ósseo compacto, o tecido esponjoso não contém ósteons. Ele consiste em trabéculas envolvendo muitos espaços preenchidos por medula óssea vermelha. Funcionalmente, as trabéculas do tecido ósseo esponjoso oferecem resistência ao longo das linhas de tensão, sustentam e protegem a medula óssea vermelha e tornam o osso mais leve, facilitando o movimento (TORTORA e GRABOWSKI, 2002).

3.2 Propriedades Mecânicas do Osso

O osso não é totalmente flexível e nem propriamente quebradiço, é uma combinação de ambos, com a parte mineral sendo mais rígida e a parte orgânica mais flexível. Visto que o osso demonstra características subordinadas ao tempo (mudanças nas propriedades mecânicas com índices

alterados e duração das aplicações de carga), é considerado um material viscoelástico. As propriedades mecânicas dos ossos dependem fundamentalmente da idade do osso. Estudos com o fêmur de 3, 5, e 35 anos mostraram que o módulo de elasticidade foi respectivamente de 7.0, 12.8 e 16.7 GPa. Geralmente após a maturação do osso, a resistência à tração e o módulo de elasticidade do osso cortical femoral diminui aproximadamente 2% a cada década (KARAGEORGIU e KAPLAN, 2005).

O tecido ósseo frequentemente é submetido a diversos tipos de solicitações mecânicas, que são as forças que atuam sobre ele. O osso raramente é sobrecarregado de uma única maneira, devido a sua estrutura geométrica ser irregular. As forças que atuam sobre um osso podem ser de compressão, de tração, de flexão, de torção e de cisalhamento, e a combinação dessas forças pode ocasionar diversos tipos de fratura quando a carga ao qual o osso é submetido supera a sua resistência (RODRIGUES, 2003).

As propriedades mecânicas do tecido ósseo podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1: Propriedades mecânicas dos tecidos ósseos

Propriedade	Osso Cortical	Osso Trabecular	Cartilagem articular	Tendão
Resistência à compressão (MPa)	100 – 230	2 – 12	-	-
Resistência à Flexão (MPa)	50 – 150	10 – 20	10 – 40	80 – 120
Deformação até a fratura	1 – 3	5 – 7	15 – 50%	10%
Módulo de elasticidade (GPa)	7 – 30	0,5 – 0,05	0,001 – 00,1	1
Tenacidade à fratura (MPa m ^{1/2})	2 – 12	-	-	-

Fonte: (HENCH; WILSON apud RAMALHO, 2006).

3.3 Biomateriais

Por séculos, quando tecidos tornavam-se doentes ou danificados, os médicos tinham poucos recursos e, portanto a remoção da parte afetada era a única alternativa, com óbvias limitações. A remoção de juntas, vértebras, dentes ou órgãos conduziam a uma insignificante melhora na qualidade de vida. Contudo, a expectativa de vida humana raramente excedia a diminuição progressiva na qualidade dos tecidos, logo a necessidade de substituir as partes danificadas era pequena. Durante o último século a situação mudou acentuadamente. A descoberta de anti-sépticos, penicilina e outros antibióticos, tratamento químico da água fornecida, melhora na higiene, e vacinação contribuíram para o aumento da expectativa de vida do homem em países desenvolvidos, podendo atualmente alcançar uma faixa de mais de oitenta anos (HENCH, 1998a).

Por definição, biomaterial é qualquer substância ou combinação de substâncias, naturais ou não, que não sejam drogas ou fármacos, utilizadas em aplicações biomédicas e que interagem com sistemas biológicos, que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo (GIL e FERREIRA, 2006).

A escolha de um material para ser utilizado como biomaterial depende da análise de uma série de requisitos que devem ser encontrados, como, a biocompatibilidade (efeito do ambiente orgânico no material e efeito do material no organismo), a biodegradabilidade (fenômeno em que o material é degradado ou solubilizado em fluidos tissulares, desaparecendo do sítio de implantação), e a velocidade de degradação do material, que são características desafiadoras para o desenvolvimento e fundamentais para a escolha de um biomaterial (PEREIRA, VASCONCELOS e ORÉFICE, 1999; TABATA, 2009).

Embora os biomateriais tenham propiciado um enorme impacto em todas as áreas da saúde e na melhoria da qualidade de vida das pessoas, existe ainda uma grande necessidade de aprimorar o desenvolvimento de novos biomateriais a partir de bases poliméricas, cerâmicas e/ou metálicas, em

todas suas fases desde a caracterização das propriedades físico-químicas até os testes clínicos (PATARRO, 2005).

As propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e tempo de degradação, conferem ao biomaterial uma interação benéfica com o organismo onde é implantado, desde que: O material não desencadeie resposta inflamatória sustentada ou tóxica na sua implantação *in vivo*; O tempo de degradação do material permita a ocorrência do processo de regeneração ou cura do sítio comprometido; O material apresente propriedades mecânicas adequadas à aplicação para que seja indicado e que qualquer variação das propriedades mecânicas decorrente da sua degradação *in vivo* seja compatível com o processo de regeneração ou restabelecimento do sítio de implantação; Sua degradação não gere produtos tóxicos e que sejam facilmente metabolizados e liberados do corpo (CAO e WANG, 2009).

Observando-se a evolução dos biomateriais, os conceitos de biocompatibilidade e biodegradabilidade fazem parte de uma segunda geração de biomateriais. Na primeira geração, foram desenvolvidos os materiais bioinertes, cujo foco para seu desenvolvimento era o de não provocar reação de corpo estranho no organismo (HENCH, 1980). Já a terceira geração, inclui os materiais capazes de estimular respostas celulares específicas no nível molecular (HENCH e POLAK, 2002). Essas três gerações são interpretadas de forma conceitual e não cronológica, visto que cada uma delas representa uma evolução nas propriedades dos materiais envolvidos, de acordo com as necessidades e exigências que surgiam (NAVARRO, MICHIARDI, CASTAÑO et al., 2008).

Os biomateriais são aplicados em dispositivo médico com intenção de interagir com sistemas biológicos. Eles são usados em Odontologia e em Medicina, sendo que, na ortopedia, vários tipos são utilizados para preenchimento e estabilização óssea (REYES, 2000).

Em geral, os biomateriais não devem estimular resposta inflamatória no hospedeiro devendo se assemelhar quimicamente ao mesmo. As características mais importantes associadas a um material que devesse substituir um tecido ósseo são a porosidade e a capacidade do material

implantado de promover íons para o ambiente vizinho. Estas características são especialmente encontradas em um tipo especial de biomaterial: as biocerâmicas (IKEGAMI, 2007).

Um grande desafio dos pesquisadores é a obtenção de biomateriais que substituam temporariamente o tecido alterado até que o mesmo se regenere. O material ideal para esta função deve ser biodegradável e deve estimular o crescimento do tecido, assim como possuir uma cinética de degradação de suas propriedades mecânicas compatíveis com a cinética do reparo tecidual. Desse modo, o implante será progressivamente substituído pelo novo tecido (PEREIRA, VASCONCELOS e ORÉFICE, 1999).

3.4 Biocerâmicas

O uso das cerâmicas com propriedades específicas para aplicações médicas vem expandindo desde 1970. As aplicações iniciais foram concentradas em superfícies cerâmicas lisas que geravam uma pequena reação com tecidos hospedeiros. Estas, assim chamadas cerâmicas bioinertes desfrutaram do sucesso clínico, particularmente na Europa. Pode-se dizer que, com o uso de cerâmicas bioinertes, iniciou-se uma revolução na indústria cerâmica (SANTOS, 2002a).

Nas últimas duas décadas, os avanços notáveis no campo dos biomateriais conduziram ao desenvolvimento dos biovidros e biocerâmicas de várias composições para o reparo ósseo e aplicações de próteses (SINHA, INGLE, MUNIM et al., 2001).

Biocerâmicas de fosfato de cálcio vem recebendo atenção especial como material de preenchimento ósseo por comportar-se semelhantemente aos constituintes minerais dos ossos (FELÍCIO-FERNANDES e LARANJEIRA, 2000). Esses materiais têm mostrado nenhuma toxicidade local ou sistêmica, nenhuma resposta de corpo estranho ou inflamação, além de aparente habilidade em se inserir aos tecidos do hospedeiro (KAWACHI, BERTRAN, REIS et al., 2000).

Para que as cerâmicas possam ser consideradas como biocerâmicas devem apresentar ou exceder as propriedades listadas na Tabela 2 (BILLOTTE, 2000).

Tabela 2: Propriedades Desejadas de Biocerâmicas Implantáveis.

1	Deve ser não-tóxica
2	Deve ser não-carcinógena
3	Deve ser não-alérgica
4	Deve ser não-inflamatória
5	Deve ser biocompatível
6	Deve ser biofuncional durante sua permanência no hospedeiro

Fonte: BILLOTTE, 2000.

São denominadas biocerâmicas a classe das cerâmicas usadas para o reparo e reconstrução de partes doentes ou danificadas do sistema esquelético do corpo humano, que é composto de tecidos duros e moles (THAMARASELVI e RAJESWARI, 2004). Elas também são usadas para substituir partes do sistema cardiovascular, especialmente válvulas cardíacas. Outras aplicações clínicas compreendem reparo cranial, implantes otolaringológicos, reconstrução maxilofacial, implantes dentários e ligamentos e tendões artificiais (SANTOS, 2002a).

São materiais biocompatíveis mono ou policristalinos, que apresentam fortes ligações químicas entre os átomos constituintes, que se traduzem em elevada dureza, elevada temperatura de fusão, com fraca resistência a forças de tração, mas moderada resistência a forças de compressão e boa resistência a desgaste. Estes materiais podem ser de ocorrência natural ou sintética e estão entre os mais promissores biomateriais para scaffolds de tecidos duros. Entre as biocerâmicas mais utilizadas destacamos a hidroxiapatita e o coral (RUHÉ, KROESE-DEUTMAN, WOLKE et al., 2004).

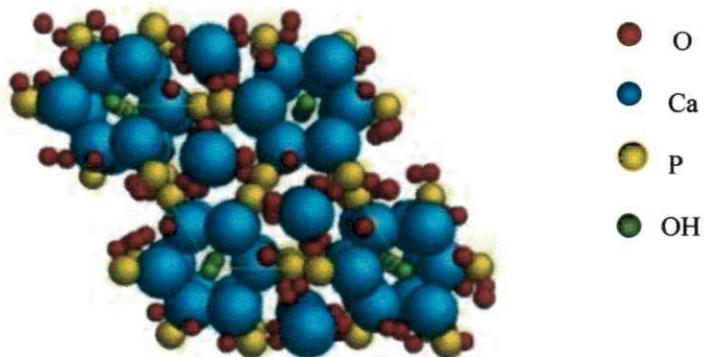
3.4.1 Hidroxiapatita

Nas últimas duas décadas as cerâmicas de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ têm sido extensamente estudadas como alternativa aos enxertos para reparar tecido ósseo danificado, por fraturas ou perdas ósseas. Esta alternativa tem sido analisada pelo fato da hidroxiapatita ser um fosfato de cálcio que tem ocorrência natural como constituinte mineral do osso, representando até 70% da massa dos ossos e dentes, conduzindo a boas propriedades de biocompatibilidade e osteointegração da HA sintética. A sua elevada cristalinidade assegura uma taxa de degradação lenta, garantindo que este irá manter a sua forma geométrica durante a regeneração do tecido ósseo. Este fato é relevante em aplicações de longo prazo. No entanto a HA sintética só pode ser obtida por tratamentos térmicos onde a sua cristalização acontece com temperaturas acima de 600-700°C, originando cristais de HA artificial mais ou menos solúveis comparados com os obtidos em HA biológica (BOHNER, 2000).

Devem ser considerados dois tipos de hidroxiapatita: as sintetizadas em altas temperaturas e que apresentam boa cristalinidade e cristais grandes, e as hidroxiapatitas sintetizadas em baixas temperaturas que apresentam baixa cristalinidade e cristais pequenos. A hidroxiapatita precipitada por via úmida possui características similares às do tecido ósseo e dentário, diferente da hidroxiapatita sintetizada a altas temperaturas (ARAÚJO, 2006).

A Figura 2 apresenta a rede cristalina da hidroxiapatita.

Figura 2: Rede cristalina da hidroxiapatita.



As propriedades da hidroxiapatita são fortemente dependentes do método de preparação. Valores da razão Ca/P e algumas substituições influenciam, dentre outros fatores, a estabilidade do material. Hidroxiapatitas estequiométricas, ou seja, com razão Ca/P igual a 1,667, apresentam boa cristalinidade e são estáveis até 1200°C (ELLIOTT, 1994). A solubilidade das apatitas é um fator importante para seu comportamento in vivo. Fatores como morfologia, composição, tamanho de cristal e cristalinidade, afetam a dissolução do material (BOHNER, 2000).

A principal diferença entre a hidroxiapatita sintetizada e o mineral do osso é a sua alta cristalinidade, a estequiometria e a ausência de carbonato. Isto resulta em uma taxa de biodegradação muito menor em comparação com o mineral ósseo nanocristalino (TADIC, BECKMANN, SCHWARZ et al., 2004). A fórmula geral para a apatita biológica é dada por: $(Ca, M)_{10}(PO_4, CO_3, Y)_6(OH, F, Cl)_2$, onde M representa alguns cátions tais como Mg^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} , Pb^{2+} e Y alguns ânions tais como HPO_4^{2-} , VO_4^{3-} (TADIC, PETERS e EPLLE, 2002; ELLIOTT, 1994).

Essa similaridade química com a fase mineral dos tecidos ósseos e a sua biocompatibilidade tornou a hidroxiapatita um dos materiais mais conhecidos, favorecendo o crescimento ósseo para os locais em que ela se encontra (osteocondutor), estabelecendo ligações entre a hidroxiapatita e o tecido ósseo (bioativo), permitindo a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas, sendo que as células não distinguem entre a

hidroxiapatita e a superfície óssea, o que indica a grande similaridade química superficial (SANTOS L. , 2002b; VOLKMER, 2006).

A hidroxiapatita pode apresentar-se em diferentes formas, porosidade, tamanho de cristal, cristalinidade, defeitos cristalinos, entre outros, o que interfere a solubilidade e capacidade de absorção do material pelo organismo. Assim, é possível obter-se hidroxiapatita desde praticamente não absorvível até totalmente absorvível em meio fisiológico em função dos diferentes métodos e condições de obtenção (MOREIRA, 2009).

As propriedades mecânicas da hidroxiapatita, como de qualquer material cerâmico, são fortemente influenciadas pela presença de defeitos ou porosidades. Com isso, sua aplicação é fortemente influenciada por esses fatores. Para aplicação como biomateriais porosos, são introduzidos poros (com diâmetro maior que 100µm) na matriz cerâmica visando possibilitar o crescimento de tecido ósseo (VOLKMER, 2006). Portanto, biomateriais a base de hidroxiapatita não podem ser utilizados em aplicações que requeiram sustentação, devido as suas baixas propriedades mecânicas (GALEA, BOHNER, LEMAITRE et al., 2008).

Para considerar o material obtido através dos diversos métodos de síntese como hidroxiapatita para implante cirúrgico, deve-se considerar as exigências químicas preconizadas na norma ASTM F 1185/03, principalmente no que se refere à composição mínima, que deve ser de 95% de hidroxiapatita apresentando apenas traços de alguns elementos. A Tabela 3 apresenta a concentração limite de elementos traços que podem estar presentes no biomaterial.

Tabela 3: Elementos Químicos da HA usada como implante.

Elementos	ppm, máximo
As	3
Cd	5
Hg	5
Pb	30
Total de metais pesados	50

Fonte: ASTM F 1185/03

Uma das principais restrições ao uso de biocerâmicas é a incerteza no tempo de vida útil quando submetidas aos estados de tensão, lento crescimento de trincas e a fadiga crítica resultante da maioria das aplicações clínicas. Duas maneiras de contornar estas limitações são o uso de cerâmica bioativa como revestimento de estruturas rígidas e como fase biologicamente ativa em compósitos, quando associada a metais, polímeros e outras cerâmicas. Como exemplo, as propriedades mecânicas de cerâmicas de hidroxiapatita podem ser melhoradas, aproximando-se do desempenho de ossos humanos, quando utilizadas em um compósito hidroxiapatita reforçado por colágeno em fibras. Um dos requisitos para estas aplicações é que a fase hidroxiapatita contenha microporos para circulação sanguínea (TANAKA, HIRATA e YOSHINAKA, 2003).

Estudos efetuados por longos períodos de tempo têm mostrado que a hidroxiapatita começa a ser reabsorvida gradualmente após 4 ou 5 anos de implante. A reabsorção é uma característica desejada para um biomaterial em alguns tipos de implantes, nos quais o processo de degradação é concomitante com a reposição do osso em formação (KAWACHI, BERTRAN, REIS et al., 2000).

3.5 Biopolímeros Polímeros Naturais

Dentre as diversas classes existentes no campo dos biomateriais, uma classe promissora vem despertando grande interesse científico e tecnológico nos últimos anos. São os materiais poliméricos, cujas aplicações nas áreas médicas e biotecnológicas tem apresentado um crescimento significativo. Inserido na vasta área dos materiais poliméricos, estão os biopolímeros de origem natural que podem ser biodegradável ou não (GRIGOLON, 2001; KHOR e LIM, 2003).

Os polímeros naturais, como alginato, colagenio, e quitosano promovem um maior crescimento celular, pois apresentam uma estrutura semelhante á matriz extracelular do tecido a regenerar. No entanto a sua taxa de regeneração não é controlável dificultando a sua utilização (FONTES, 2010).

As principais vantagens desses materiais são: induzirem baixas respostas imunológicas adversas, grande aptidão para ser quimicamente modificada e, sobretudo no caso do amido e da quitosana, a facilidade com que podem ser encontrados na natureza (SALGADO, COUTINHO, e REIS, 2004).

A Tabela 4 apresenta detalhes sobre a origem e as principais características de alguns dos polímeros anteriormente mencionados.

Tabela 4: Polímeros naturais utilizados na engenharia do tecido ósseo.

Material	Origem	Características
Colágeno	Natural	Baixa resposta imunológica Bom substrato para adesão das células.
Quitosana	Natural	Promove osteocondução e regeneração do tecido
Amido	Natural	Bom substrato para adesão das células Biocompatível e não-tóxico
Ácido Hialurônico	Natural	Baixa resposta imunológica <i>Scaffolds</i> com baixas propriedades mecânicas
Poli(hidroxi-butilato)	Natural	Osteocondutivo, embora de natureza frágil

Fonte: Adaptado SALGADO, 2004.

3.5.1 Quitosana

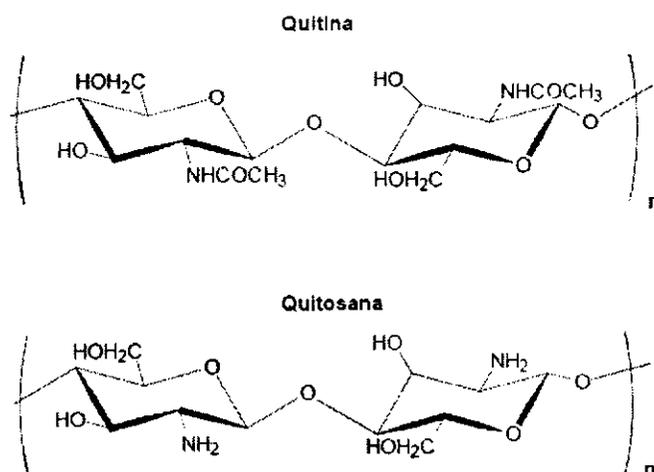
A quitosana foi descrita pela primeira vez em 1859, porém somente em 1894 o nome quitosana surgiu devido às características semelhantes entre ela e a quitina. Na época a quitosana foi caracterizada apenas como polímero insolúvel em água e como um excelente ligante (ANTONINO, 2007).

A quitosana é um aminopolissacarídeo derivado do processo de desacetilação da quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose. É usualmente obtida do descarte de processamento de alimentos provenientes do mar, principalmente das cascas

de caranguejos, camarões e lagostas (GUINESE, ESTEVES e CAVALHEIRO, 2007; JAYAKUMAR, PRABAHARAN, NAIR et al., 2010). Sua presença ocorre também em nematóides e na parede celular de fungos e leveduras (HSIEH, CHANG e LIN, 2007).

O que diferencia a quitina da quitosana é a porcentagem de unidades GlcNAc (grupos acetilados) em suas cadeias. De forma geral, quando o conteúdo médio de unidades GlcNAc é menor que 40% consideramos o polímero como quitosana, e quando a porcentagem é maior que 50% denominamos o polímero como quitina (PAVINATTO, 2009). A Figura 3 ilustra uma representação das estruturas idealizadas de quitina e quitosana.

Figura 3: Representação das estruturas primárias idealizadas de quitina e quitosana, onde n é o grau de polimerização.



Avaliando o grau de desacetilação e sua relação com algumas propriedades biológicas da quitosana, pode-se comprovar que o grau de desacetilação da quitosana influencia a adesão e o crescimento celular em filmes confeccionados com este material (CHATELET, DAMOUR e DOMARD, 2001).

Biomateriais baseados em quitosana constituem uma classe emergente com aplicação em vários campos biomédicos, tais como, regeneração tecidual, particularmente para cartilagem; dispositivos de liberação controlada de

fármacos e sistemas de imobilização de células em gel (LARANJEIRA e FÁVERE, 2009).

A quitosana pertence a uma extensa classe de materiais que tem recebido grande interesse para aplicações médicas e farmacêuticas listados na Tabela 5.

Tabela 5: Principais propriedades da quitosana e aplicações biomédicas.

APLICAÇÕES	PROPRIEDADES
Suturas	Biocompatível
Implantes Dentários	Biodegradável
Pele Artificial	Renovável
Reconstrução Óssea	Formação de Filme
Lentes de Contato	Não tóxico
Liberação Controlada de Fármaco	Hidrolisável por Lisozima
Encapsulamento	Antimicrobiano

Fonte: Rinaudo, 2006.

A quitosana é insolúvel em água, ácidos concentrados, álcalis, álcool e acetona, sendo completamente solúvel em soluções de ácidos orgânicos quando o pH da solução é menor do que seis. Alguns ácidos inorgânicos e diluídos, tais como o nítrico, perclórico ou fosfórico, podem ser utilizados no preparo de soluções de quitosana, entretanto, a solução deve ser mantida sob agitação e aquecimento durante um longo período para que ocorra a completa dissolução do polissacarídeo (DALLAN, 2005).

Todas as propriedades físico-químicas apresentadas pela quitosana (solubilidade, viscosidade, comportamento polietrolítico e outros) dependem do grau de acetilação, da distribuição de cargas ao longo da cadeia e da massa molar do polímero, que são propriedades que podem ser controladas durante a reação de desacetilação. As propriedades de retenção de água e a biodegradabilidade da quitosana podem ser controladas também por ligações cruzadas entre suas cadeias (OLIVEIRA R. , 2004).

A quitosana é biocompatível e bioabsorvível, possuindo ainda propriedades osteocondutoras (PARK, LEE, PARK et al., 2000). Estudos recentes demonstraram a sua não-toxicidade *in vivo*, sendo biodegradado pela lisozima, uma enzima presente em tecidos, órgãos e fluidos corporais de mamíferos, inclusive no fluido lacrimal (MI, TAN, LIANG et al., 2002).

3.6 Biocompósito Cerâmica – Biopolímero

Alguns pesquisadores acreditam que, para alcançar as propriedades similares às do osso é essencial mimetizar não somente a composição, como também sua estrutura (ANGELO, 2008).

Devido às limitações próprias de cada um dos biomateriais, têm sido investigada a combinação de materiais de diferentes características na construção de compósitos. Esta combinação tem como objetivo de melhorar as propriedades mecânicas, taxas de degradação e absorção, os índices de biocompatibilidade e biodegradabilidade. Por exemplo, a combinação de fosfatos de cálcio com polímeros combina boas propriedades mecânicas com boa biocompatibilidade dos compósitos (GUNATILLAKE e ADHIKARI, 2003). Algumas destas vantagens vêm sendo aproveitadas na produção de um compósito biodegradável. Sendo este um material constituído de matéria-prima natural, tem recebido grande atenção na área biomédica, onde são utilizados para substituir partes do organismo ou atuar como uma função específica para serem depois absorvidos pelo organismo. Esta nova aplicação despertou interesse no desenvolvimento de biocompósitos que apresentem a característica de biocompatibilidade (NASCIMENTO, 2009).

ROETHER, BOCCACCINI, HENCH et al. (2002), afirmam que a biodegradabilidade e bioatividade, quando combinadas, otimizam o uso de tecidos sintéticos de suporte. Os compósitos que apresentam estas propriedades permitem a criação de suportes bioreabsorvíveis e bioativos, com adaptação física e com propriedades mecânicas satisfatórias. Além de poderem ser aplicados em situações em que a taxa de reabsorção do polímero

(que promove suporte para o crescimento de células) seja compensada pela formação de novos tecidos.

De acordo com (HENCH, 1998b), as propriedades mecânicas de compósitos baseados em hidroxiapatita são as mais similares com as do tecido ósseo natural e, de acordo com IGNJATOVIC e USKOKOVIC (2004), a estrutura do compósito HA:polímero é a que mais se assemelha à estrutura do tecido ósseo natural, sendo que a matriz contínua do polímero com partículas dos cristais de hidroxiapatita finamente distribuídos seria similar ao componente colágeno.

Os compósitos, de um modo geral, têm atraído a atenção de muitos pesquisadores devido à possibilidade de se combinar as vantagens de diferentes materiais, onde os mesmos apresentam características essenciais a um biomaterial (SENA, 2004).

Nos últimos anos, vários autores recomendam a utilização de HA particulada com uma série de materiais, como elastina, quitosana, colágeno, entre outros, facilitando o manuseio e a adaptação adequada do material na medida em que minimiza o desalojamento das partículas (MOREIRA, 2009).

Os compósitos contendo fosfatos de cálcio e biopolímeros naturais são muito utilizados para a engenharia e reparo do tecido ósseo (DANILCHENKO, KALINKEVICH, POGORELOV et al., 2009; YAMAGUCHI, TOKUCHI, FUKUZAKI et al., 2001). A combinação entre polímeros e agentes de reforço específicos permite a produção de materiais com grande bioatividade e comportamento mecânico comparável ao de tecidos vivos. Os polímeros reforçados com HA têm uma aplicação clínica em potencial, incluindo seu uso como cimento ósseo, como polímero reforçado com biocerâmicas para o uso de recobrimento de próteses e implantes dentários como também para o preenchimento de defeitos ósseos seguidos pela remoção de tumores. Apesar das diversas aplicações existem poucas informações a respeito de sua biocompatibilidade (MOURSI, WINNARD, WINNARD et al., 2002).

A presença do polímero pode ser importante, já que à sua biodegradabilidade, faz com que inúmeros espaços sejam criados à medida que ele vai sendo absorvido pelo organismo, permitindo assim que na área

enxertada ocorra a formação de vários condutos que poderão ser colonizados por células formando uma rede nutridora na região de crescimento ósseo. Desta maneira facilita-se a penetração das células osteoprogenitoras no local, induzindo o crescimento de um novo tecido ósseo (ALMEIDA, 2003).

A união da quitosana com mineral cria um compósito com força e flexibilidade do polímero e resistência e dureza do mineral. Nos últimos anos, a comunidade científica adotou esses parâmetros para a criação de diversos compósitos baseados no sistema de ligação entre uma matriz polimérica e uma fase mineral com o intuito de substituição óssea. As vantagens desses compósitos provem a melhora da capacidade osteogênica dos derivados do cálcio e da característica da ligação da matriz polimérica (AMARAL, 2006).

Os compósitos são desenvolvidos a partir da junção de materiais cerâmicos com os materiais poliméricos, tais como compósitos de coral/quitosana (ZHANG, WANG, SHI et al., 2007a), HA/CS (ZHANG, CHENG, CHEN et al., 2007b; CHESNUTT, VIANO, YUAN et al., 2009), nano-HA/colágeno (CUNNIFFE, DICKSON, PARTAP, et al., 2010), β -TCP/quitosana (LIAO, CHEN, LI et al., 2010) e HA/PLA (YANAGIDA, OKADA, MASUDA et al., 2009). Estes compósitos tem demonstrado melhores propriedades biológicas e mecânicas quando comparados com os arcabouços fabricados apenas com cerâmica ou polímeros isoladamente (ZHANG, CHENG, CHEN et al., 2007b; CHESNUTT, VIANO, YUAN et al., 2009; YANAGIDA, OKADA, MASUDA et al., 2009; CUNNIFFE, DICKSON, PARTAP, et al., 2010; LIAO, CHEN, LI et al., 2010). Os compósitos de HA/quitosana apresentaram maior rugosidade e área, maior flexibilidade, maior proliferação de osteoblastos *in vitro* (CHESNUTT, VIANO, YUAN et al., 2009).

A combinação HA/CS pode ser utilizada para preparar compostos com atividade biológica controlada (Biodegradabilidade). A Hidroxiapatita pode atuar como um agente modificador reticular (devido à presença de cálcio e fósforo) (FELÍCIO-FERNANDES e LARANJEIRA, 2000).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local da Pesquisa

A parte da pesquisa relativa à obtenção e caracterização físico-química dos biocompositos, foi desenvolvida no Laboratório CERTBIO (Laboratório de Desenvolvimento e Avaliação de Biomateriais), localizada na Universidade Federal de Campina Grande – UFCG. O ensaio de viabilidade celular foi realizado no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, do Departamento de Análises Clínicas da UNESP, Araraquara. O ensaio de flexão, foi realizado no laboratório de reciclagem da UFCG e o ensaio de compressão no laboratório LaMMEA, do departamento de Engenharia Mecânica da UFCG.

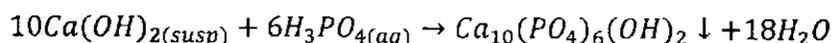
4.2 Materiais

Para a obtenção dos biocompósitos, foram utilizadas béquer de 500 mL, agitador magnético, funil de buchner, kitasato, bomba de vácuo e estufa de secagem de materiais. Quitosana na forma de pó, com grau de desacetilação 95% e alto peso molecular adquirida da empresa Polymar Indústria, Comércio, Importação e Exportação Ltda. Ácido Acético P.A., Hidróxido de Sódio P.A., Ácido Fosfórico P.A. e Hidróxido de Cálcio P.A. foram todos adquiridos da empresa Vetec Química Fina Ltda. Tampão fosfato Salino obtido pela Sigma Aldrich. A água destilada foi obtida no Laboratório de Materiais, da Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais/UFCG.

4.3 Preparação do Pó de Fosfato de Cálcio

O fosfato de cálcio foi obtido utilizando o método de precipitação por via úmida que envolve uma reação de neutralização entre as soluções de ácido fosfórico (H_3PO_4) e hidróxido de cálcio [$Ca(OH)_2$]. As quantidades das soluções são estequiometricamente determinadas de acordo com o valor da relação atômica entre os átomos de cálcio e fósforo da hidroxiapatita pura, Ca/P=1.67,

de acordo com a reação previamente reportado e adaptado pelo grupo de Biomateriais (FOOK, 2008).



O pó de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ foi adicionado a água deionizada e vigorosamente agitado e aquecido até atingir a temperatura de 80°C . Nesta solução foi adicionada lentamente a solução H_3PO_4 sob agitação constante. Após a completa mistura dos dois reagentes elevou-se a temperatura para 100°C e manteve-se a agitação até atingir a viscosidade de uma pasta. A pasta cerâmica obtida foi seca a 100°C por 24 horas e em seguida o produto foi desaglomerado, passado em peneira 170 mesh para obtenção do pó e tratado termicamente com uma taxa de aquecimento de 20°C por minuto e mantido a 1100°C por 2 horas.

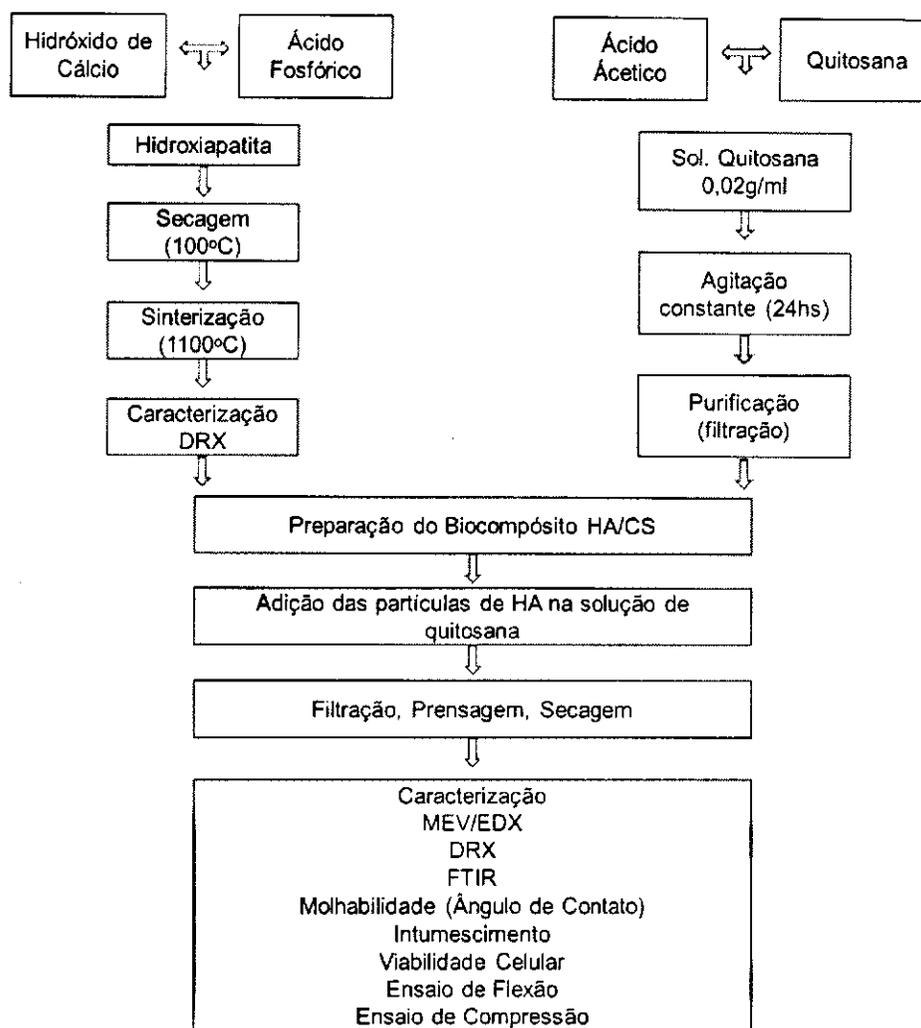
4.4 Preparação da Solução de Quitosana 2g/100mL

A solução de quitosana foi preparada através da dissolução do polímero em uma solução de ácido acético (1%v/v), para uma concentração final da solução polimérica 0,02g/mL, sob agitação magnética por 24 horas para garantir a dissolução e toda a quitosana. Após esse período, a solução final foi filtrada à vácuo para a remoção de resíduos.

4.5 Preparação dos Biocompósitos de Hidroxiapatita/Quitosana

O fluxograma contido na Figura 4 apresenta a metodologia e descreve as etapas e sequência de desenvolvimento da pesquisa.

Figura 4: Fluxograma da Metodologia do Trabalho.



Os biocompósitos foram obtidos a partir de três etapas:

1ª etapa: Consiste na síntese e caracterização da Hidroxiapatita, como citado no item 4.2. Após a obtenção da Hidroxiapatita a mesma foi peneirada em malha #325 (45 μ m).

2ª etapa: Consistiu na obtenção da solução polimérica, como citado no item 4.3.

3ª etapa: Esta etapa consistiu na obtenção dos biocompósitos. Primeiramente, a solução de quitosana foi neutralizada (pH=7,0), através da adição de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M. Em seguida grânulos de Hidroxiapatita foram adicionados a esta solução, sob agitação constante durante 30 minutos em temperatura ambiente e submetido ao processo de

filtração à vácuo para remoção da água, oriunda da reação entre o ácido acético (solução de quitosana) e o hidróxido de sódio. A massa retida foi colocada em molde sob pressão de 2,5 toneladas ($\approx 8,4$ MPa) por 30 minutos, em seguida desmoldada e colocada na estufa a 50°C por 20 horas.

Obtiveram compósitos de diversas proporções 50:50, 40:60 e 30:70 e objetivando-se um compósito com a menor proporção possível polímero/biocerâmica, entretanto sem perder as características mecânicas e a plasticidade, decidiu-se padronizar os compósitos na proporção de 30:70 (CS/HA).

Os biocompósitos preparados com a razão 50:50 apresentaram dificuldade na etapa de prensagem, devido a grande quantidade de água retida nos interstícios das cadeias poliméricas do polímero. Os biocompósitos preparados com a razão 40:60 apresentaram trincas após a etapa de secagem, o que pode ser um indicio de retração devido a retenção de água entre as cadeias, por estes motivos citados os biocompósitos foram preparados na razão 30:70, pois os mesmos apresentaram melhores propriedades de cura e processamento.

A razão da escolha dessa composição deve-se a tentativa de biomimetizar a composição do tecido ósseo que é descrita como um nanocompósito consistindo de 30% em massa de colágeno reforçado por uma fase mineral nanométrica finamente dispersa (70% em massa) de cristais apatíticos (CaP) (LEEUWENBURGH, ANA e JANSEN, 2010).

4.6 Caracterização dos Materiais

As análises das amostras foram realizadas após o tratamento térmico utilizando-se as técnicas: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDX), Difração de raios X (DRX), Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Análise de Molhabilidade por Ângulo de Contato, Absorção de Água, Avaliação da Viabilidade Celular, Ensaio de Flexão e Ensaio de Compressão.

4.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um equipamento capaz de produzir imagens de alta ampliação (até 300.000 X) e resolução. A microscopia eletrônica fornece informação morfológica e topográfica sobre superfícies de sólidos, necessária para se entender o comportamento de superfícies.

Os biocompósitos HA/CS foram caracterizados morfológicamente por microscopia eletrônica de varredura utilizando um microscópio eletrônico de bancada, modelo SUPERSCAN SSX-550 SHIMADZU (UAEMa/CCT/UFCG). As análises foram realizadas no laboratório de Caracterização de Materiais da UFCG.

4.6.2 Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDX)

O EDX é um acessório essencial no estudo de caracterização microscópica de materiais, no qual os elementos químicos presentes numa amostra podem ser identificados através do espectro de raios-X emitido pela amostra. Um detector instalado na câmara de vácuo do MEV mede a energia associada a esse elétron. Como os elétrons de um determinado átomo possuem energias distintas, é possível, no ponto de incidência do feixe, determinar quais elementos químicos estão presentes naquela amostra. O diâmetro reduzido do feixe permite a determinação da composição atômica em amostras de tamanhos muito reduzidos (<5 μm), permitindo uma análise quase que pontual.

Neste trabalho a análise química foi realizada no equipamento fabricado pela SHIMADZU. O detector está acoplado ao MEV SHIMADZU SSX-550 SUPERSCAN, instalado no Laboratório de Caracterização de Materiais da UFCG.

4.6.2 Difração de Raios X

As técnicas de difração de raios X são muito utilizadas na caracterização de materiais cristalinos, tais como metais, compostos intermetálicos, cerâmicas, minerais, polímeros, plásticos ou outros compostos orgânicos ou inorgânicos. As técnicas de difração podem ser usadas para identificar as fases presentes nas amostras de materiais inicialmente não-refinados a produtos acabados e fornecer informações sobre o estado físico das amostras, tais como o tamanho de grão, textura e perfeição cristalina. Muitas das técnicas de difração de raios X são rápidas e não destrutivas; alguns instrumentos são portáteis e podem ser transportados com as amostras (APARECIDA, 2006).

Neste trabalho utilizou-se um difratômetro SHIMADZU (modelo XRD 6000) com varredura angular entre 5° e 70°, na montagem de Bragg-Brentano, sistema θ -2 θ , utilizando-se radiação de Cu ($K\alpha_1$) com varredura no passo de 0,02 (2 θ).

4.6.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR em modo de absorbância foi utilizada para caracterizar os materiais de partida e a interação entre a fase inorgânica (HA) e a fase orgânica (quitosana).

A caracterização por espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier foi realizada em um espectrômetro modelo Spectrum 400 FT Mid-IR PerkinElmer com varredura de 4000 a 400 cm^{-1} . Para a obtenção do espectro de infravermelho do biocompósito, foi preparada uma pastilha de KBr, pois este sal apresenta transparência no IV a partir de 400 cm^{-1} .

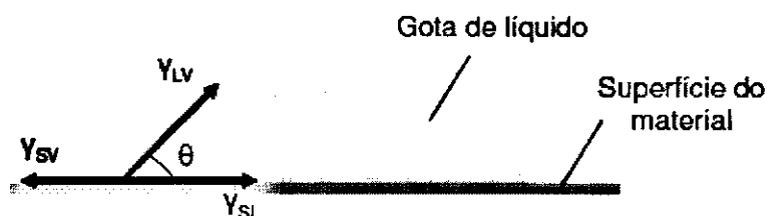
4.6.4 Molhabilidade por Ângulo de Contato

A energia superficial e o caráter hidrofílico/hidrofóbico foram avaliados pela medida da tensão superficial em equipamento desenvolvido e instalado no

laboratório de caracterização da UAEMA/CCT/UFCG. A imagem foi capturada por uma câmara digital e remetida a um microcomputador que através de um software fez a conversão do ângulo da interface líquido-material em unidade de tensão interfacial e essa medida do ângulo de contato foi utilizada para caracterizar a molhabilidade das superfícies.

O ângulo θ se forma entre o plano tangente da gota (Y_{LV} energia de superfície na interface líquido-vapor) e o plano contendo a superfície onde o líquido se encontra depositado (Y_{SL} - energia de superfície na interface sólido-líquido), conforme esquematizado Figura 5.

Figura 5: Esquema de uma gota sobre uma superfície durante medidas de ângulo de contato e o equilíbrio termodinâmico entre as três fases.



Fonte: MEIGA, 2010.

4.6.5 Absorção de água (Swelling)

O teste de absorção de água ou de *swelling*, neste trabalho, foi aplicado para verificar o grau de absorção de água pelas amostras.

A capacidade de um material absorver água para dentro de sua estrutura é uma característica importante para o desenvolvimento de um biocompósito adequado para regeneração de tecidos (OLIVEIRA, RODRIGUES, SILVA et al., 2006).

A absorção de água foi determinada pela equação:

$$I\% = \frac{m_f - m_i}{m_i} \times 100$$

Onde: I% é o grau de intumescimento em porcentagem, m_f é a massa final em gramas e m_i é a massa inicial em gramas (RODAS, 2004).

4.6.6 Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos

A análise de citotoxicidade dos compósitos é importante para a futura aplicação destes materiais em cultura de células, ou até mesmo, dentro do organismo.

O teste de citotoxicidade *in vitro* deve ser um dos ensaios iniciais para avaliar a biocompatibilidade de qualquer biomaterial. Algumas vantagens do teste de citotoxicidade incluem a rapidez, a sensibilidade (capacidade de distinguir entre materiais tóxicos e não tóxicos) e o baixo custo (TANGERINO, 2006).

O ensaio de citotoxicidade dos biocompósitos HA/CS foi realizado pelo teste de avaliação da viabilidade celular dos macrófagos por MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio] de acordo com a ISO 10993.

Para a concretização desta etapa, fez-se necessário a obtenção das células do exsudato peritoneal que foi realizada a partir do procedimento descrito a seguir.

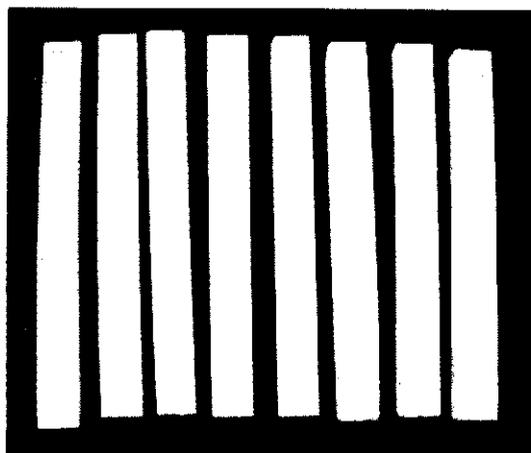
Para obtenção das células do exsudato peritoneal foram utilizados 5 camundongos Swiss, previamente estimulados pela inoculação intraperitoneal de 3,0 mL de tioglicolato de sódio (Difco Lab. LTDA) a 3,0 %, três dias antes da coleta de células. Após esse período, os animais foram eutanasiados por inalação em câmara de CO₂. Os macrófagos do exsudato peritoneal foram coletados para preparo da suspensão celular. O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany) em uma diluição 1:100 do Líquido de Lázarus. As células foram ajustadas à concentração de $5 \cdot 10^6$ células em meio RPMI-1640-C.

4.6.7 Ensaio de Flexão

O ensaio de flexão permite avaliar a contribuição de algum defeito na propagação crítica de uma trinca e é realizado em corpos-de-prova em forma de barra com seção retangular chanfrado ou arredondado, conforme a norma

ASTM C1161-08. As barras obtidas para o ensaio de flexão estão ilustradas na Figura 6.

Figura 6: Corpos de Prova para ensaio de Flexão - ASTM C1161.



Para o ensaio de flexão foram confeccionadas 08 barras densas. Os corpos de prova foram previamente submetidos a uma análise visual direta, com o intuito de verificar a sua integridade e acabamento superficial após sua extração dos moldes. Como critério de exclusão foram descartados os corpos de prova que apresentaram defeitos visíveis como quebras, bolhas ou falta de preenchimento do molde.

As amostras foram submetidas ao ensaio de flexão em três pontos, utilizando-se um equipamento AS-50kN, utilizando uma velocidade de carga de 0,5mm/min. O ensaio foi realizado no Laboratório de Reciclagem - UFCG.

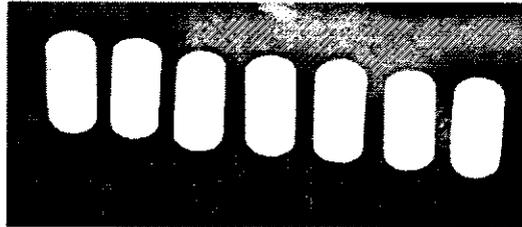
4.6.8 Ensaio de Compressão

O ensaio de compressão tem como objetivo adquirir a carga máxima suportada pelos biocompósitos.

Visto que não há uma norma específica para o ensaio de compressão em compósitos polímero/cerâmica, optou-se pelo ensaio de compressão de cimento acrílico ASTM F451-08.

Os cilindros obtidos para o ensaio de compressão estão ilustrados na Figura 7.

Figura 7: Corpos de Prova para ensaio de Compressão - ASTM F451-08.



Para o ensaio de compressão foram confeccionados 08 cilindros densos. Os corpos de prova foram previamente submetidos a uma análise visual direta, com o intuito de verificar a sua integridade e acabamento superficial após sua extração dos moldes. Como critério de exclusão foram descartados os corpos de prova que apresentaram defeitos visíveis como quebras, bolhas ou falta de preenchimento do molde.

As amostras foram submetidas ao ensaio de compressão, utilizando-se uma INSTRON 5582, com uma velocidade de carga de 1,3 mm/min e uma célula de carga de 5kN. O ensaio foi realizado no Laboratório do Departamento de Mecânica – LaMMEA (UFCG).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDX)

As imagens das análises de microscopia eletrônica de varredura do biocompósito HA/quitosana e da amostra calcinada a 900°C estão apresentadas nas Figuras 8 e 9.

Figura 8: MEV do biocompósito HA/CS.

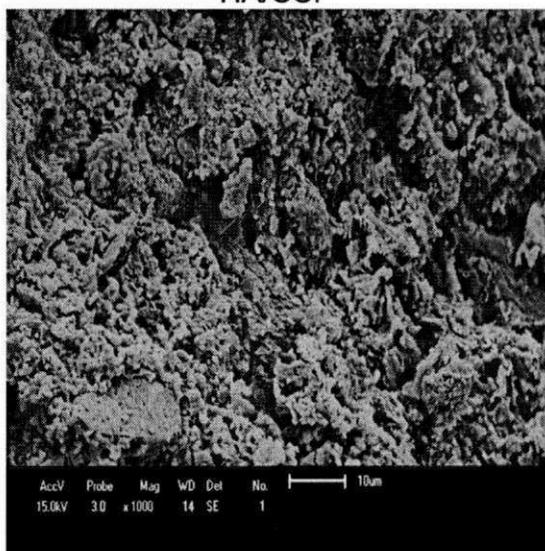
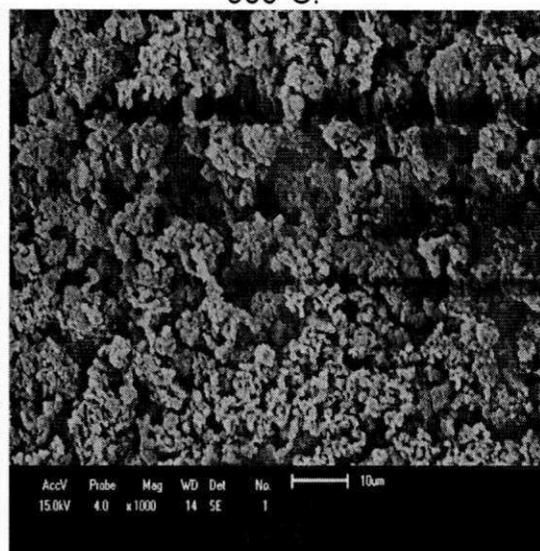


Figura 9: MEV da amostra calcinada a 900°C.

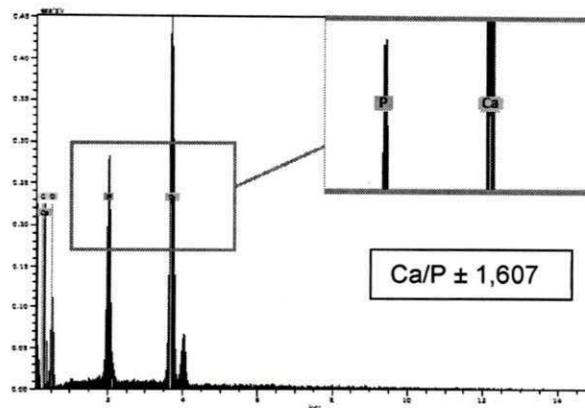


Observa-se na Figura 8 que houve uma boa dispersão das partículas de HA na quitosana com a presença de pequenos poros na superfície da amostra.

Para avaliar, como o material se comportaria após a degradação da quitosana, o material foi calcinado a 900°C, por 2 horas. Na Figura 9, verificou-se que após o tratamento térmico a 900°C a quitosana foi eliminada deixando espaços vazios na estrutura, resultando em um material poroso.

A Figura 10 apresenta o gráfico de EDX do biocompósito HÁ/CS.

Figura 10: EDX do biocompósito HA/CS.

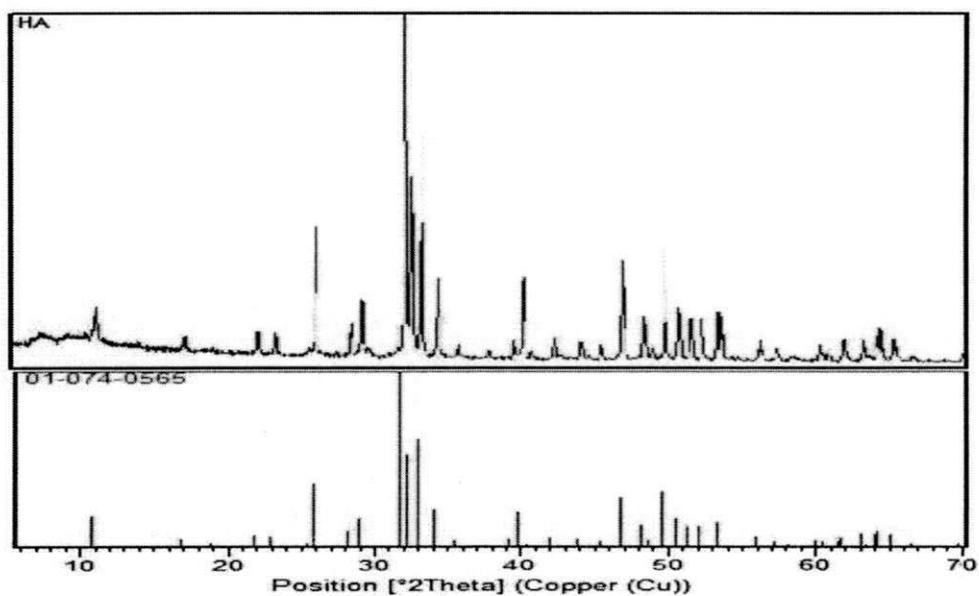


Analisando a Figura 10, podemos observar que a relação Ca/P determinada pela análise de EDX apresentou um pequeno desvio de estequiometria atribuído a provável incorporação de grupos carbonato nas células unitárias dos fosfatos de cálcio.

5.2 Análise por Difração de Raios X

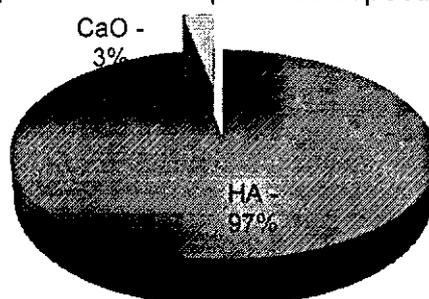
A Figura 11 apresenta o difratograma de raios-X do pó de HA comparado com o padrão de referência, identificando a fase cristalina da HA.

Figura 11: Difratograma de raios-X do pó de HA comparado com o padrão de referência.



Analisando a Figura 11, pode-se observar que os picos da Hidroxiapatita, sobrepõe os picos referentes ao padrão 01-074-0565.

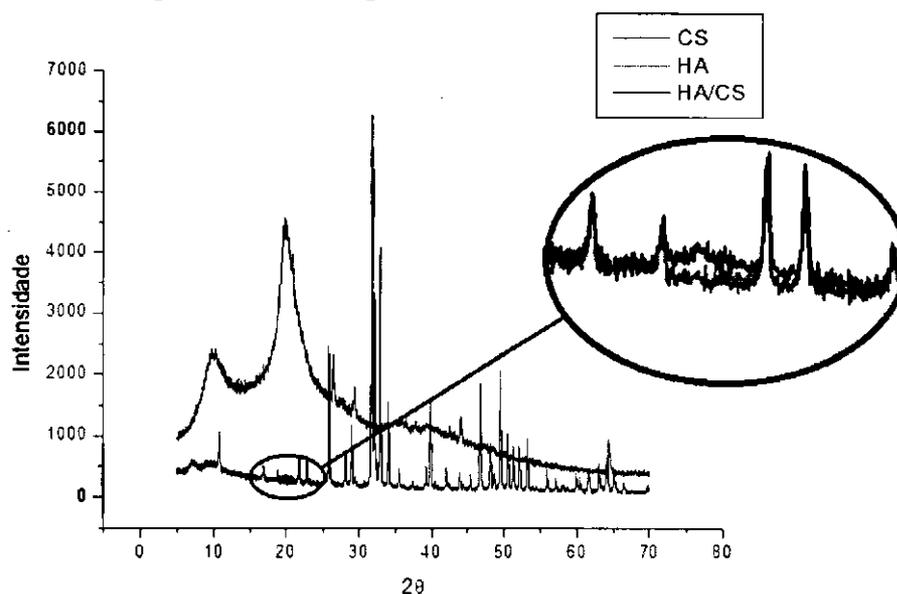
Figura 12: Análise quantitativa dos picos do espectrograma de Raios X.



Analisando as Figuras 11 e 12, pode-se perceber que 97% dos picos dos espectrogramas de Raios X, correspondem ao espectrograma de Raios X da hidroxiapatita, apresentando apenas 3% de impurezas na forma de Óxido de Cálcio e de acordo com a ASTM 1185/03, no que se refere à composição mínima, deve ser de 95% de Hidroxiapatita (NATTA e PASSERINI, 1929; TOMITA, KAWANO, SHIRAKI et al., 1996).

A Figura 13 apresenta o DRX da quitosana (CS), hidroxiapatita (HA) e do biocompósito (HA/CS).

Figura 13: Difratoograma de DRX: HA, CS, HA/CS.



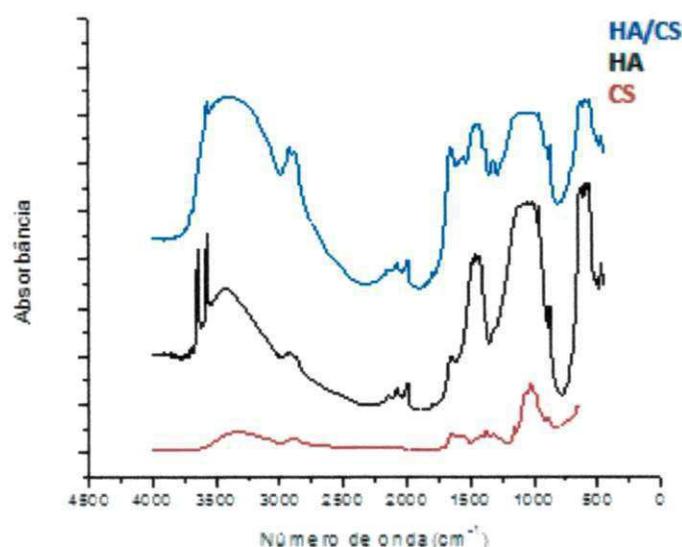
A análise do DRX, Figura 13, demonstra que a presença da quitosana não ocasionou mudanças significativas na fase da hidroxiapatita, pois todos os

picos correspondem a esta fase. Observa-se apenas um pequeno desvio do perfil da hidroxiapatita, referente ao pico da quitosana.

5.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 14 apresenta o espectro de FTIR dos biocompósitos desenvolvidos. As bandas na região de 478, 562 e 1100 cm^{-1} corresponde às vibrações de estiramentos e flexões dos grupos PO_4^{3-} (FINISIE, JOSUÉ, FÁVERE et al., 2001; MANJUBALA, et al., 2006; FOOK, 2008). As bandas em torno de 3400 e 3590 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento dos grupos hidroxila, OH^- , característicos da HA. As bandas entre 1550 – 1700 cm^{-1} são atribuídas a um possível sobreposição do grupo OH^- da hidroxiapatita e dos grupos da amida I e amida II da quitosana (JIANG, LI, WANG et al., 2008). As bandas em torno de 880 e 1457 cm^{-1} são atribuídas à incorporação de grupos CO_3^{2-} proveniente do ar, visto que as amostras foram produzidas em atmosfera aberta e em solução aquosa. As bandas na região 2000 cm^{-1} pode ser atribuído ao CO_2 absorvido do meio ambiente.

Figura 14: Espectro vibracional de IV da HA, CS e HA/CS.



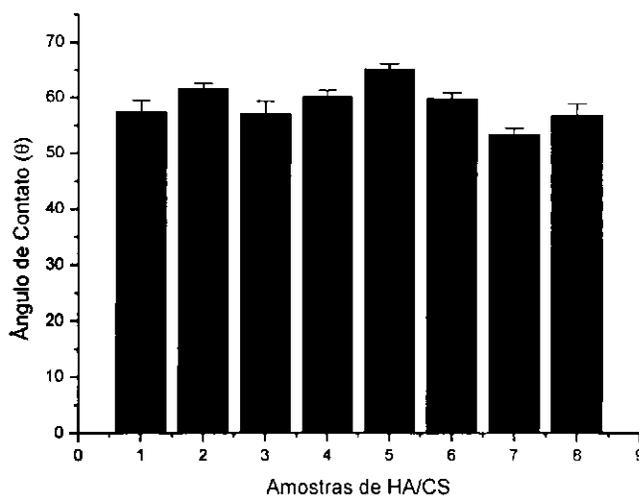
De acordo com o espectro apresentado na Figura 10, pode-se confirmar que a quitosana não é 100% desacetilada, confirmado através da banda encontrada na região de 1646 cm^{-1} , característica de uma amida I (O=C-NHR). A ampliação da banda em 1050 cm^{-1} reflete a presença de polímero e sua interação com os grupos fosfato (MANJUBALA, SCHELER, BOSSERT et al., 2006).

5.4 Tensão Superficial

As análises de ângulo de contato foram efetuadas com o gotejamento de água destilada na superfície do biocompósito, com posterior análise das medidas dos ângulos formados pela bolha de água no biocompósito, com software próprio do Grupo de Biomateriais.

A Figura 15 apresenta o gráfico das análises de ângulo de contato.

Figura 15: Gráfico de Tensão Superficial.

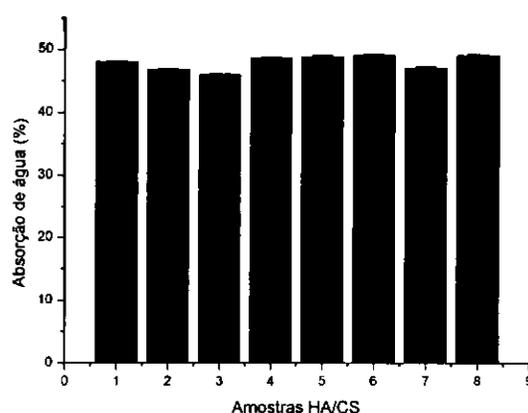


Analisando a Figura 15 podemos perceber que as amostras apresentaram valores médios de $58,887$. Estes resultados indicam que a amostra é parcialmente hidrofílica.

5.5 Absorção de água (*Swelling*)

A Figura 16 apresenta a capacidade de absorção de água dos biocompósitos. O ensaio de intumescimento tem por objetivo a avaliação da capacidade do material de absorver água, álcool, soluções ou outros tipos de solventes. Este ensaio foi realizado com tampão fosfato salina (PBS) pH 7,4, solução simuladora de fluido biológico (RODAS, 2004).

Figura 16: Porcentagem da absorção de água pelos biocompósitos HA/CS.



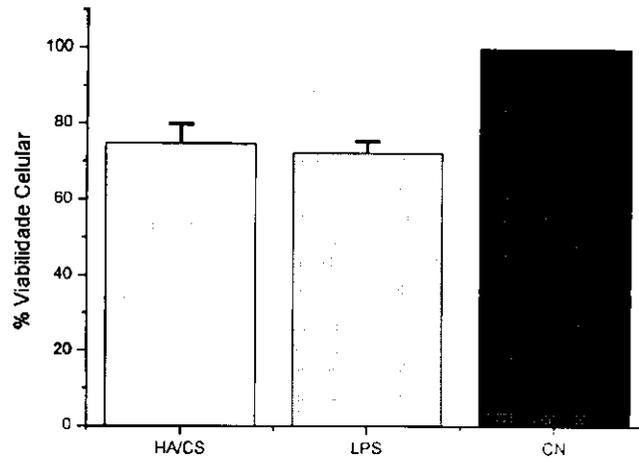
Os biocompósitos HA/CS apresentaram uma absorção de água de aproximadamente 48,365%. A absorção de água de um compósito pode interferir em suas propriedades sensoriais, no entanto, não percebeu-se nenhuma alteração significativa nos biocompósitos após este ensaio.

5.6 Avaliação da viabilidade celular dos Macrófagos

Este teste teve o objetivo de avaliar a viabilidade das células perante o material produzido para uso em organismos vivos.

Os biocompósitos testados apresentaram viabilidade celular acima de 70 % como observado na Figura 17.

Figura 17: Viabilidade de macrófagos de camundongos Swis na presença dos biocompósitos. HA-CS, LPS – controle positivo, CN – controle negativo.



As células em meio de cultura (RPMI-16400) foram utilizadas como controle, equivalendo a 100 % de viabilidade e estão representadas na última coluna (CN=controle negativo).

Os resultados observados na Figura 17 mostram que os biocompósitos analisados neste experimento apresentaram-se viáveis para serem utilizados como biomaterial, pois os valores obtidos estão acima de 70%. Para Bispo (2009), o valor mínimo requerido para o teste de biocompatibilidade é de 50%.

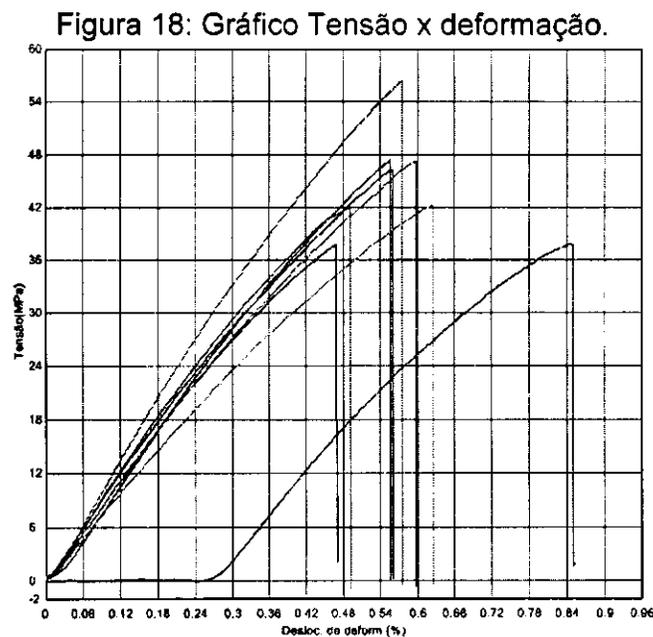
Os testes de citotoxicidade mostraram que os biocompósitos de hidroxiapatita/quitosana, podem ser aplicados sem causar reações adversas em tecidos celulares, ou seja, mesmo após o processo de fabricação dos biocompósitos, o material não se mostra citotóxico. Tal confirmação é importante, pois garante que o substrato pode passar pelo processo de moldagem sem que os tratamentos ácido e básico, ao qual é submetido, alterem sua biocompatibilidade.

De acordo com CAREY, XU, SIMON et al, (2005), fosfatos de cálcio não são tóxicos devido aos seus componentes individuais e seus produtos de reação. (YUASA, MIKAMOTO, ISHIKAWA et al., 2004), afirmaram que muitos compósitos de fosfato de cálcio mostraram adesão e proliferação celular. O mesmo pode ser dito para os compósitos HA/CS porque a quitosana e seus derivados são biopolímeros naturais e não tóxicos (MUZZARELLI, BIAGINI,

PUGNALONI et al, 1989; (LI, NAN, SHI et al., 2011)). CHEN, NAN, YIN et al., (2010) em seus estudos afirmaram que compósitos HA/CS apresentaram boa compatibilidade. Os compósitos HA/CS não apresentam citotoxicidade e comprovam crescimento e proliferação dos osteoblastos (DI MARTINO, SITTINGER, RISBUD, 2005; ZHANG, VENUGOPAL, EL-TURKI, 2008; XIANMIAO, YUBAO, YI, 2009; KONG, GAO E CAO et al., 2005; YUAN, CHEN, LÜ, 2008; MANJUBALA, SCHELER, BÖSSERT et al., 2006).

5.7 Ensaio de Flexão

A Figura 18 ilustra os resultados do ensaio de flexão dos biocompósitos HA/CS.



A Tabela 6 apresenta os valores obtidos no ensaio de flexão.

Tabela 6: Valores obtidos nos ensaios de flexão.

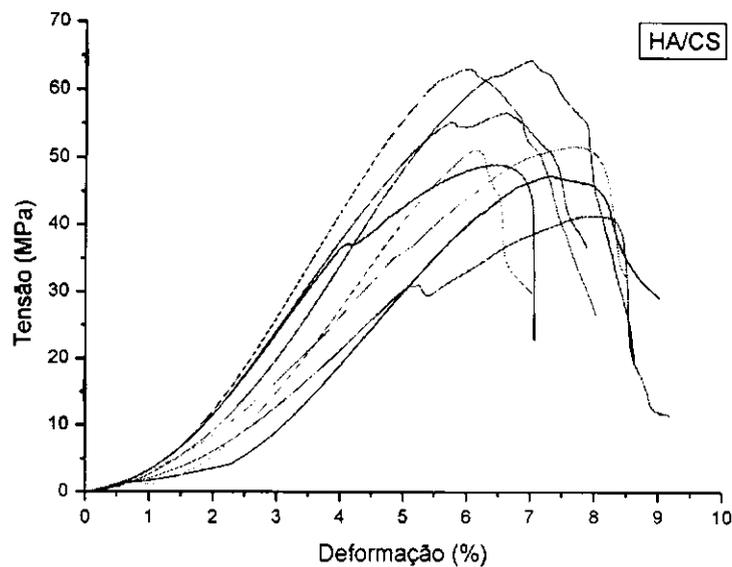
Amostra	Tensão Máxima (MPa)
HA/CS	37,8503
HA/CS	47,4009
HA/CS	46,3188
HA/CS	41,9902
HA/CS	37,7622
HA/CS	56,3476
HA/CS	47,3254
HA/CS	42,2418
Média	44,6547
Desvio Padrão	6,1049

Analisando a Figura 19 e a Tabela 6, podemos perceber que os biocompósitos apresentaram um valor médio para resistência a flexão de 44,65 MPa, aproximando-se do valor mínimo obtido em osso cortical o qual deve apresentar valores na faixa de 50 – 150 MPa (HENCH, WILSON, apud, RAMALHO, 2006). No entanto, se compararmos com o osso trabecular, que apresenta valores na faixa de 10 – 20 MPa, podemos dizer que os biocompósitos obtido apresentaram valores acima dos desejáveis para aplicação como substituinte para osso trabecular.

5.8 Ensaio de Compressão

A Figura 19 ilustra os resultados do ensaio de compressão dos biocompósitos HA/CS.

Figura 19: Gráfico Tensão x Deformação.



A Tabela 7 mostra os resultados dos ensaios mecânicos de compressão em todas as 08 amostras dos biocompósitos.

Tabela 7: Valores obtidos nos ensaios de compressão.

Amostra	Tensão Máxima (Mpa)
HA/CS	47,49589
HA/CS	51,33118
HA/CS	49,14216
HA/CS	64,52275
HA/CS	51,86507
HA/CS	41,43438
HA/CS	63,23772
HA/CS	56,75664
Média	51,59813
Desvio Padrão	6,548339

De acordo com os dados obtidos na Figura 20 e na Tabela 7, observa-se que os biocompósitos densos apresentaram resistência a compressão média

em torno de 51,59 MPa, menor que valores de resistência média encontrada no osso humano compacto citada por (YANG, LEONG, DU et al., 2001) entre 130 a 180MPa e, maior que o osso esponjoso com valores de resistência à compressão entre 4 a 12 MPa.

O tecido ósseo, segunda a literatura apresenta valores de resistência a compressão como segue: REILLY e BURSTEIN (1975) encontraram 105 Mpa em teste longitudinal e 131 Mpa em compressão e 131 Mpa em compressão transversal. Acredita-se que o método de manufatura pode ser ajustado para conseguir valores superiores de resistência à compressão, por exemplo, com o aumento da carga na prensagem isostática ou com o aumento da fase polimérica.

6 CONCLUSÕES

- Desenvolveu-se uma efetiva, técnica de manufatura de biocompósitos rígidos de HA/CS, baseada na prensagem isostática da massa obtida através da adição de pós de HA na solução de quitosana;
- Na análise de difração de raios X (DRX) observou-se que não houve alteração significativa do perfil da cristalinidade HA com a incorporação da quitosana;
- A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do biocompósito HA/CS, indicou que houve uma boa dispersão das partículas de HA na quitosana com a presença de pequenos poros na superfície da amostra. Na imagem do biocompósito calcinado, verificou-se que após o tratamento térmico a 900°C a quitosana foi eliminada deixando espaços vazios na estrutura, resultando em um material poroso;
- Observou-se na análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) bandas características da hidroxiapatita, como também bandas que caracterizam uma interação entre a quitosana e a hidroxiapatita, como a banda em torno de 1050cm^{-1} ;
- Os testes de citotoxicidade mostraram que os biocompósitos de hidroxiapatita/quitosana, podem ser aplicados sem causar reações adversas em tecidos celulares, ou seja, o processo de obtenção e moldagem não interferiu no potencial citotóxico do material;
- Os valores de resistência mecânicas estiveram entre os valores reportados em literatura de osso cortical e osso esponjoso. A resistência mecânica obtida nas diversas condições de processamento permite seu uso para substituição de osso esponjoso;
- Ao combinar as propriedades de ambos compostos, a cerâmica bioativa e o polímero reabsorvível, um biocompósito com estas propriedades pode ser considerado um produto promissor para utilização na reparação óssea.
- O método de manufatura pode ser ajustado para conseguir valores superiores de resistência a compressão e flexão, como por exemplo, o aumento na prensagem isostática.

- De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que os biocompósitos obtidos apresentaram, do ponto de vista morfológico, características densas, não apresentaram toxicidade, mantiveram suas características cristalográficas, demonstraram interação entre os compostos e apresentaram propriedades mecânicas que se enquadram entre os valores reportados para osso cortical e esponjoso, no qual permite uma aplicação para substituição de osso esponjoso.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, K. *Sistema Híbrido Macroporoso para Enxertos Ósseos Aloplásticos*. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais para Engenharia) - Departamento de Física e Química - Instituto de Ciências. Itajubá: Universidade Federal de Itajubá, 2003.
- AMARAL, M. *Citotoxicidade in vitro e Biocompatibilidade in vivo de compósitos a base de Hidroxiapatita, Colágeno e Quitosana*. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Instituto de Química de São Carlos. São Carlos: Universidade de São Paulo, 2006.
- ANGELO, L. *Síntese e Caracterização de Nanocompósitos Hidroxiapatita-Gelatina obtidos pelo método de Precipitação utilizando o método de Rietveld e Ivff*. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) - Departamento de Química. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2008.
- ANTONINO, N. *Otimização do Processo de Obtenção de Quitina e Quitosana de Exoesqueletos de Camarões oriundo da Indústria Pesqueira Paraibana*. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) - Departamento de Química. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba - UFPB/CCEN, 2007.
- APARECIDA, A. *Recobrimento de Apatitas empregando-se o método Biomimético: Estudo da Influência dos Íons K^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} e HCO_3^- na formação de Hidroxiapatita*. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2006.
- ARAÚJO, T. *Produção de Hidroxiapatita Pura e Dopada para Aplicação em Biosensores*. Dissertação (Mestrado em Física) - Departamento de Física. São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe, 2006.
- ASSIS, O., SILVA, V. Caracterização Estrutural e da Capacidade de Absorção de Água em Filmes Finos de Quitosana Processados em diversas concentrações. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 13, 223-228. 2003.
- ASTM C 1161. *Standard test method for flexural strength of advanced ceramics at ambient temperature*. American Society for Testing and Materials. 2002.
- ASTM F 1185. *Specification for Composition of Ceramic Hydroxyapatite for Surgical Implants*. American Society for Testing and Materials. 2009.
- ASTM F 451. *Standard Specification for acrylic Bone Cement*. American Society for Testing and Materials. American Society for Testing and Materials. 2008.

BARROS, R., ABAD, C., KISS, M., SERRÃO, J. Massa Óssea e Atividade Física na Infância e na Adolescência. *Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte*. 7, 109 - 118. 2008.

BILLOTTE, W. Ceramics Biomaterials. In: J. BRONZINO, *The Biomedical Engineering Handbook* (Vol. 1). CRC Press LLC. 2000.

BISPO, V. *Estudo do Efeito da Reticulação por Genipin em suportes biocompatíveis de Quitosana-PVA*. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

BOHNER, M. Calcium Orthophosphates in Medicine: From Ceramics to Calcium Phosphate Cements. *Injury, Int. J. Care Injured*, 2000.

CANELLA, K., GARCIA, R. Caracterização de Quitosana por Cromatografia de Permeação em Gel - Influência do Método de Preparação e do Solvente. *Quim. Nova*. 24, 13 - 17. 2001.

CAO, Y., WANG, B. Biodegradation of Silk Biomaterials. *International Journal of Molecular Sciences*. 10, 1514 - 1524.

CAREY, L., XU, H., SIMON, C., TAKAGI, S., CHOW, L. (2005). Premixed rapid-setting calcium phosphate composites for bone repair. *Biomaterials*. 26, 5002 - 5014. 2009.

CHATELET, C., DAMOUR, O., DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*. 22, 261 - 268. 2001.

CHEN, J., NAN, K., YIN, S., WANG, Y., WU, T., ZHANG, Q. Characterization and biocompatibility of nanohybrid scaffold prepared via in situ crystallization of hydroxyapatite in chitosan matrix. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 81, 640 - 647. 2010.

CHESNUTT, B., VIANO, A., YUAN, Y., YANG, Y., GUDA, T., APPLEFORD, M., et al. Design and characterization of a novel chitosan/nanocrystalline calcium phosphate composite scaffold for bone regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 88, 491 - 502. 2009.

CHOW, L. Next generation calcium phosphate-based biomaterials. *Dental Materials Journal*. 28, 1- 10. 2009.

CUNNIFFE, G., DICKSON, G., PARTAP, S., STANTON, K., O'BRIEN, F. Development and characterisation of a collagen nano-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med*, 21, 2293 - 2298. 2010.

DALLAN, P. *Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração da Pele*. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2005.

DAMIAN, C., BEIRÃO, L., FRANCISCO, A., ESPÍRITO SANTO, M., TEIXEIRA, E. Quitosana: Um amino polissacarídeo com características funcionais. *Alim. Nutr.* 16, 195 - 205. 2005.

DANILCHENKO, S., KALINKEVICH, O., POGORELOV, M., KALINKEVICH, A., SKLYAR, A., KALINICHENKO, T., et al. Chitosan-hydroxyapatite composite biomaterials made by a one step co-precipitation method: preparation, characterization and in vivo tests. 9, 119 - 126. *Journal of Biological Physics and Chemistry*. 2009.

DOROZHKIN, S. Calcium Orthophosphates. *J Mater Sci.* 42, 1061 - 1095. 2007.

ELLIOTT, J. *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*. Vol. 18. Elsevier Science B. V. 1994.

FELÍCIO-FERNANDES, G., LARANJEIRA, M. Calcium Phosphate Biomaterials from Marine Algae. Hydrothermal Synthesis and Characterization. *Química Nova.* 23, 441 - 446. 2000.

FINISIE, M., JOSUÉ, A., FÁVERE, V., LARANJEIRA, M. Synthesis of Calcium-Phosphate and Chitosan Bioceramics for Bone Regeneration. *An. Acad. Bras. Cienc.* 73, 525 - 532. 2001.

FONTES, R. *Fabrico e Caracterização de Scaffolds à base de Fosfatos de Cálcio*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Departamento de Engenharia Mecânica. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa, 2010.

FOOK, A. *Desenvolvimento de Biocerâmicas porosas para Regeneração Óssea*. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) - Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais. Campina Grande: Universidade Federal de Campina Grande, 2008.

FRAGA, A., MARTINS, F., RIGO, E., BOSCHI, A. Ensaio Mecânico de Membranas de Quitosana Recobertas com Hidroxiapatita: Efeito da Adição de Hidróxido de Sódio. In: 17º CBECIMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 15 a 19 de Novembro de 2006, Foz do Iguaçu, PR, Brasil.

GALEA, L., BOHNER, M., LEMAITRE, J., KOHLER, T., MULLER, R. (2008). Bone Substitute: Transforming b-tricalcium phosphate porous scaffolds into monetice. *Biomaterials.* 29, 3400-3407.

- GIL, M., FERREIRA, P. Polissacarídeos como Biomateriais. *Quimica 100*, 72 - 74. 2006.
- GRIGOLON, L. *Modificação de Quitina e Quitosana por Via Enzimática*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Processos Químicos. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2001.
- GUINESE, L., ESTEVES, A., CAVALHEIRO, E. Adsorção de íons cobre (II) pela quitosana usando coluna em sistema sob fluxo hidrodinâmico. *Quim. Nova*. 30, 809 - 814. 2007.
- GUNATILLAKE, P., ADHIKARI, R. Biodegradable Synthetic Polymers for Tissue Engineering. *European Cells and Materials*. 5, 1 -16. 2003.
- HENCH, L. Biomaterials. *Science*, v. 208, 826 - 831. 1980.
- HENCH, L. Biomaterials: A Forecast for the Future. *Biomaterials*. 19, 1419 - 1423. 1998a.
- HENCH, L. Bioceramics. 81, 1705 - 1728. 1998b.
- HENCH, L., POLAK, J. Third Generation Biomedical Materials. *Science*. 295, 1014 - 1017. 2002.
- HOLLINGER, J., BUCK, D., BRUDER, S. Biology of Bone Healing: Its Impact on Clinical Therapy. In: S. LYNCH, R. GENCO, R. MARX, *Tissue Engineering*. Quintessence Publishing Co, Inc. 1999.
- HSIEH, W., CHANG, C., LIN, S. Morphology and Characterization of 3D Microporous Structured Chitosan Scaffolds for Tissue Engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 57, 250 - 255. 2007.
- IGNJATOVIC, N., USKOKOVIC, D. Synthesis and application of hydroxyapatite/poly lactide composite biomaterial. *Applied Surface Science*. 238, 314 - 319. 2004.
- IKEGAMI, R. *Desenvolvimento de Corpos Cerâmicos compostos bioativos com estrutura de gradiente funcional*. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Escola de Engenharia de São Carlos. São Carlos: Universidade de São Paulo, 2007.
- JAYAKUMAR, R., PRABAHARAN, M., NAIR, S., TAMURA, H. Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. *Biotechnology Advances*. 28, 142 - 150. 2010.
- JIANG, L., LI, Y., WANG, X., ZHANG, L., WEN, J., GONG, M. Preparation and Properties of Nano-hydroxyapatite/Chitosan/Carboxymethyl Cellulose composite scaffold. *Carbohydrate Polymers*. 74, 680 - 684. 2008.

KARAGEORGIU, V., KAPLAN, D. Porosity of 3D Biomaterial Scaffolds and Osteogenesis. *Biomaterials*. 26, 5474 - 5491. 2005.

KAWACHI, E., BERTRAN, A., REIS, R., ALVES, O. Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de uma área interdisciplinar. *Quim. Nova*. 23, 518 - 522. 2000.

KHOR, E., LIM, L. Implantable Applications of Chitin and Chitosan. *Biomaterials*. 24, 2339 - 2348. 2003.

LARANJEIRA, M., FÁVERE, V. Quitosana: Biopolímero Funcional com Potencial Industrial Biomédico. *Quim. Nova*. 32, 672 - 678. 2009.

LEE, J., NAM, S., IM, S., PARK, Y., LEEB, Y., SEOLB, Y., et al. Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials. *Journal of Controlled Release*. 78, 187 - 197. 2002.

LEEUWENBURGH, S., ANA, I., JANSEN, J. Sodium citrate as an effective dispersant for the synthesis of inorganic-organic composites with a nanodispersed mineral phase. *Acta Biomaterialia*. 6, 836 - 844. 2010.

LI, X., NAN, K., SHI, S., CHEN, H. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/chitosan cross-linking composite membrane intended for tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 50, 43 - 49. 2011.

LIAO, F., CHEN, Y., LI, Z., WANG, Y., SHI, B., GONG, A., et al. A novel bioactive three-dimensional b-tricalcium phosphate/chitosan scaffold for periodontal tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 21, 4489 - 496. 2010.

MANJUBALA, I., SCHELER, S., BOSSERT, J., JANDT, K. Mineralisation of Chitosan Scaffolds with Nano-Apatite Formation by Double Diffusion Technique. *Acta Biomaterialia*. 2, 75 - 84. 2006.

MEIGA, T. *Avaliação de metodologias para imobilização covalente de fibronectina em arcabouços de poli(3-hidroxibutirato)*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) - Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

MI, F., TAN, Y., LIANG, H., SUNG, H. In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant. 23, 181 - 191. 2002.

MIAO, X., HU, Y., LIU, J., WONG, A. Porous calcium phosphate ceramics prepared by coating polyurethane foams with calcium phosphate cements. *Materials Letters*. 58, 397 - 402. 2004.

MORAES JÚNIOR, E. *Enxerto Autógeno para Aumento em Espessura e ou Altura do Processo Ósseo Alveolar, Transtornos de Técnica Cirúrgica, Complicações e Sobrevivência dos Implantes*. Tese (Doutorado em Odontologia) - Departamento de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista, 2002.

MOREIRA, J. *Hidroxiapatita Associada à Gentamicina: Um estudo da Influência da Gelatina no Meio de Precipitação e do Processo de Seagem na Inibição do Crescimento bacteriano*. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) - Departamento de Química. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2009.

MOURSI, A., WINNARD, A., WINNARD, P., LANNUTTI, J., SEGHI, R. Enhanced Osteoblast Response to a Polymethylmethacrylate–Hydroxyapatite Composite. *Biomaterials*. 23, 133 - 144. 2002.

MURUGAN, R., RAMAHRISHNA, S. Development of nanocomposites for bone grafting. *Composites Science and Technology*, 2385–2406. 2005.

MUZZARELLI, R., BIAGINI, G., PUGNALONI, A., FILIPPINI, O., BALDASSARRE, V. Reconstruction of parodontal tissue with chitosan. *Biomaterials*. 10, 598 - 603. 1989.

NASCIMENTO, W. *Preparação e Caracterização Físico-Mecânica, Microestrutural e Térmica de Compósitos à base de Nióbio e Hidroxiapatita*. Dissertação (Mestrado em Física) - Departamento de Física. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2009.

NATTA, G., PASSERINI, L. *Gazz. Chim. Ital.*, 59. 1929. *Revisada em 1997*.

NAVARRO, M., MICHIARDI, A., CASTAÑO, O., PLANELL, J. Biomaterials in Orthopaedics. *J. R. Soc. Interface*. 5, 1137 - 1158. 2008.

OLIVEIRA, J., RODRIGUES, M., SILVA, S., MALAFAYA, P., GOMES, M., VIEGAS, C., et al. Novel hydroxyapatite/chitosan bilayered scaffold for osteochondral tissue-engineering applications: Scaffold design and its performance when seeded with goat bone marrow stromal cells. *Biomaterials*. 27, 6123 - 6137. 2006.

OLIVEIRA, R. *Avaliação do efeito antimicrobiano in vitro de quitosana e da associação quitosana/clorexidina sobre Streptococcus mutans*. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia). São Carlos: Universidade de São Paulo, 2004.

PARK, Y., LEE, Y., PARK, S., SHEEN, S., CHUNG, C., LEE, S. Platelet derived growth releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration. *Biomaterials*. 21, 153 - 159. 2000.

PATARRO, A. *Avaliação Biológica de Compósitos de Polímeros Biodegradáveis em uma Matriz de Biocerâmica com Adição de Tetraciclina*. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2005.

PAVINATTO, A. *Efeito de Características Estruturais da Quitosana sobre sua Interação com Filmes de Langmuir como modelo de Biomembrana*. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) - Escola de Engenharia de São Carlos. São Carlos: Universidade de São Paulo, 2009.

PEREIRA, A., VASCONCELOS, W., ORÉFICE, R. Novos Biomateriais: Híbridos Orgânico-Inorgânicos Bioativos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 104 - 109. 1999.

RAVAGLIOLI, A., KRAJEWSKI, A. *Bioceramics: Materials, properties, applications*. London: Chapman & Hall. 1992.

REILLY, D., BURSTEIN, A. The elastic and ultimate properties of compact bone tissue. *J. Biomech.* 8, 393 - 405. 1975.

REYES, L. *Aplicação de um vidro Bioativo em Tíbias de Coelhos*. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Instituto de Química de São Carlos. São Carlos: Universidade de São Paulo, 2000.

REZWAN, Z., CHEN, Q., BLAKER, J., BOCCACCINI, A. Biodegradable and Bioactive Porous Polymer/Inorganic Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials*. 27, 3413 - 3431. 2006.

RIBEIRO, G. *Obtenção de Biomateriais Porosos utilizando Silica Coloidal como Aglutinante*. Trabalho de Diplomação (Grauação em Engenharia de Materiais) - Escola de Engenharia. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and Applications. *Progress in Polymer Science*. 31, 603 - 632. 2006.

RODAS, A. *Deseenvolvimento de membranas como compostos dermo-epidérmicos*. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear - Aplicações) - Instituto de Pesquisas energéticas e Nucleares. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2004.

RODRIGUES, M. *Análise do Risco de Fratura Óssea por Ultrassonometria e Ensaio Mecânico de Compressão*. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Escola de Engenharia de São Carlos. São Carlos: Universidade de São Paulo, 2003.

ROETHER, J., BOCCACCINI, A., HENCH, L., MAQUET, V. Development and in vitro characterisation of novel bioresorbable and bioactive composite

materials based on polylactide foams and Bioglasss for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 23, 3871 - 3878. 2002.

RUHÉ, P., KROESE-DEUTMAN, H., WOLKE, J., SPAUWEN, P., JANSEN, J. Bone Inductive Properties of rhBMP-2 Loaded Porous Calcium Phosphate Cement Implants in Cranial Defects in Rabbits. *Biomaterials*. 25, 2123 - 2132. 2004.

SALGADO, A., COUTINHO, O., REIS, R. Bone Tissue Engineering: state of the art and future trends. *Macromolecular Bioscience*. 4, 743 - 765. 2004.

SANTOS, J. Ceramics in Medicine. *Business Briefing: Medical Device Manufacturing e Technology*, 2. 2002a.

SANTOS, L. *Desenvolvimento de Cimento de Fosfato de Cálcio Reforçado pro Fibras para uso na Área Médico-Odontológica*. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Faculdade de Engenharia Mecânica. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2002b.

SANTOS, M., FLORENTINO, A., SAEKI, M., APARECIDA, A., FOOK, M., GUASTALDI, A. Síntese de Hidroxiapatita pelo Método Sol-Gel utilizando Precursores Alternativos: Nitrato de Cálcio e Ácido Fosfórico. *Eclética Química*. 30, 29 - 35. 2005.

SENA, L. *Produção e Caracterização Hidroxiapatita-Colágeno para Aplicações Biomédicas*. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) - Departamento de Ciências em Engenharia Metalúrgica e de Materiais. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

SENEL, S., McCLURE, S. Potential Applications of Chitosan in Veterinary Medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 56, 1467 - 1480. 2004.

SINHA, A., INGLE, A., MUNIM, K., VAIDYA, S., SHARMA, B., BHISEY, A. Deelopment of Calcium Phosphate Based Bioceramics. *Bull. Mater. Sci.* 24, 653 - 657. 2001.

SIVAKUMAR, M., RAO, K. Preparation, Characterization and In Vitro Release of Gentamicin from Coralline Hydroxyapatite-Gelatin Composite Microspheres. *Biomaterials*. 23, 3175 - 3181. 2002.

SOUZA, T., FORTULAN, C., ANTUNES, E., PURQUERIO, B. Projeto e Manufatura de uma Matriz Porosa do Compósito PMMA/Hidroxiapatita para implantes Bioativos. In: 17 CBECiMat - Congresso de Engenharia e Ciência dos Materiais. 2006.

TABATA, Y. Biomaterial Technology for Tissue Engineering Applications. *J. R. Soc. Interface*, 6, 311 - 324. 2009.

TADIC, D., BECKMANN, F., SCHWARZ, K., EPPLE, M. A Novel Method to Produce Hydroxyapatite objects with Interconnecting porosity that Avoids Sintering. *Biomaterials*, 25, 335 - 3340. 2004.

TADIC, D., PETERS, F., EPLLE, M. Continuous Synthesis of Amorphous Carbonated Apatites. *Biomaterials*, 23, 2553 - 2559. 2002.

TANAKA, Y., HIRATA, Y., YOSHINAKA, R. Synthesis and characteristics of Ultrafine Hydroxyapatite Particles. *Ceram. Process. Res.*, 4, 197 - 201. 2003.

TANGERINO, L. *Estudo das propriedades antimicrobianas de copolímeros derivados do eugenol*. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia) - Departamento de Física e Química. Itajubá: Universidade Federal de Itajubá, 2006.

THAMARAISELVI, T., RAJESWARI, S. Biological Evaluation of Bioceramic Materials - A Review. *Trends Biomater. Artif. Organs*, 18, 9 - 17. 2004.

TOMITA, K., KAWANO, M., SHIRAKI, K., OTSUKA, H. *J. Mineral. Petrol. Econ. Geol.*, 91. 1996.

TORTORA, G., GRABOWSKI, S. *Princípios de Anatomia e Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogans S. A. 2002.

VEDI, S., BELL, K., LOVERIDGE, N., GARRAHAN, N., PURDIE, D., COMPSTON, J. The Effects of Hormone Replacement Therapy on Cortical Bone in Postmenopausal women. A histomorphometric study. *Bone*, 33, 330 - 334. 2003.

VOLKMER, T. *Obtenção e Caracterização de Hidroxiapatita Porosa pelo Método Gelcasting de espumas para uso como Implantes*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Dissertação (Mestrado em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais) - Departamento de Materiais. 2006.

YAMAGUCHI, I., TOKUCHI, K., FUKUZAKI, H., KOYAMA, Y., TAKAKUDA, K., MONMA, H., et al. Preparation and Microstructure Analysis of Chitosan/Hydroxyapatite Nanocomposites. *J. Biomed. Mater. Res.*, 55, 20 - 27. 2001.

YANAGIDA, H., OKADA, M., MASUDA, M., UEKI, M., NARAMA, I., KITAO, S., et al. Cell adhesion and tissue response to hydroxyapatite nanocrystal-coated poly(L-lactic acid) fabric. *J. Biosci. Bioeng.*, 108, 235 - 243. 2009.

YANG, S., LEONG, K., DU, Z., CHUA, C. The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. *Tissue Engineering*, 7, 679 - 689. 2001.

YUASA, T., MIYAMOTO, Y., ISHIKAWA, K., TAKECHI, M., MOMOTA, Y., TATEHARA, S., et al. Effects of apatite cements on proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Biomaterials*, 25, 1159 - 1166. 2004.

ZHANG, Y., WANG, Y., SHI, B., CHENG, X. A platelet-derived growth factor releasing chitosan/coral composite scaffold for periodontal tissue engineering. *Biomaterials*, 28, 1515 - 1522. 2007a.

ZHANG, Y., CHENG, X., CHEN, Y., SHI, B., CHEN, X., XU, D., et al. Three-dimensional Nanohydroxyapatite/Chitosan Scaffolds as Potential Tissue Engineered Periodontal Tissue. *J. Biomater. Appl.*, 21, 333 - 349. 2007b.

ZIOUPOS, P., BARBENEL, J., FISHER, J. Mechanical and Optical Anisotropy of Bovine Pericardium. *Medical e Biological Engineering e Computing*, 1, 76 - 82. 1992.