UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

CARLA ROSANA GONZAGA DA SILVA CARDOSO

Desenvolvimento de Pastas de Fosfatos de Cálcio para Regeneração Óssea

São Carlos

2020

CARLA ROSANA GONZAGA DA SILVA CARDOSO

Desenvolvimento de Pastas de Fosfatos de Cálcio para Regeneração Óssea

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Cristina da Silva Rigo.

Versão Corrigida

São Carlos

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues
Fontes da EESC/USP

C268d	<p>Cardoso, Carla Rosana Gonzaga da Silva Desenvolvimento de pastas de fosfatos de cálcio para regeneração óssea / Carla Rosana Gonzaga da Silva Cardoso ; orientador Paulo Eliana Cristina da Silva Rigo. -- São Carlos, 2020.</p> <p>Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação Interunidades em Bioengenharia e Área de Concentração em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2020.</p> <p>1. Hidroxiapatita. 2. Beta fosfato tricálcico. 3. Fosfato de cálcio. 4. Pasta de fosfato de cálcio. 5. Regeneração óssea. I. Título.</p>
-------	--

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): Carla Rosana Gonzaga da Silva Cardoso

Título: "Desenvolvimento de Pastas de Fosfatos de Cálcio para Regeneração Óssea"

Data da defesa: 19/10/2020

Comissão Julgadora	Assinatura	Resultado
Prof(a). Dr(a). Eliana Cristina da Silva Rigo UNIFESP	<u>ECRigo</u>	<u>Não Votante</u>
Prof(a). Dr(a). Vera Lúcia Arantes EESC/USP	<u>pl ECRigo</u>	<u>aprovada</u>
Prof(a). Dr(a). Juliana Marchi UFABC	<u>pl ECRigo</u>	<u>aprovada</u>
Prof(a). Dr(a). Mariana Motisuke UNIFESP	<u>pl ECRigo</u>	<u>aprovada</u>

Dedico ao meu esposo Ricardo e minhas duas filhas Jennifer e Isabelle, aos meus pais Paulo e Fátima, meu irmão Miguel e minha sogra Cleuza pela compreensão, carinho e apoio incansável.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por ter me dado força, saúde e capacitação para realizar um grande sonho.

A prof^a. Dr^a. Eliana Cristina da Silva Rigo, minha orientadora, por sua atenção, dedicação em compartilhar conhecimento e experiências, ensinamentos, compreensão, amizade e confiança em meu trabalho.

A especialista de laboratório Luci Cristina de Oliveira Vercik, pela sua amizade, paciência, ajuda e toda atenção prestada a mim na fase de laboratório.

Ao prof. Dr. Andrés Vercik pela sua atenção, por compartilhar seu conhecimento e sua experiência.

A prof^a. Dr^a. Giovana Fumes Ghantous do Departamento de ciências básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, por compartilhar seu conhecimento, carinho e atenção.

Aos Técnicos de laboratório da USP de Pirassununga, Silvana e Marcio por toda atenção, ajuda e carinho.

A secretária da Bioengenharia Marcia Maria Hyppolito Geromini por sua atenção, ajuda, carinho e por sempre ser simpática e competente toda vez que a solicitei.

A prof^a. Dr^a. Simoni Gueno e o prof. Dr. Marcello Duarte por todo encorajamento, incentivo, ajuda e atenção dedicada a mim, quando ainda estava na faculdade de Engenharia Mecânica, por me fazer lutar pelo meu sonho que era e é a Bioengenharia.

Ao prof. Dr. José Marcos Alves pelo seu carinho, atenção e ajuda e por ter me aceito a princípio como aluna especial de USP em Bioengenharia e o incentivo para participar do processo seletivo do programa de pós-graduação de Bioengenharia da USP.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio e auxílio financeiro concedido durante o período da pesquisa.

RESUMO

CARDOSO, C.R.G.S. **Desenvolvimento de pasta de fosfato de cálcio para regeneração óssea**. 2020. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

Fosfatos de cálcio, como hidroxiapatita (HA) e beta fosfato tricálcico (β -TCP), são comumente utilizados como materiais para preenchimento ósseo. A utilização desses materiais na forma de partículas apresenta como dificuldade sua permanência no local de implantação e como consequência, pode ocorrer possíveis danos ao tecido hospedeiro. A possibilidade de utilização desses materiais na forma de pasta injetável pode ser uma solução para manter esses materiais no sítio de implantação, facilitando a colocação no local. Com este objetivo, neste trabalho desenvolveu-se pastas de fosfatos de cálcio utilizando soluções de quitosana e alginato de sódio. As pastas foram caracterizadas quanto às suas propriedades físicas e biológicas, com o interesse de assegurar uma aplicabilidade médica, a fim de promover a regeneração óssea. Os pós de hidroxiapatita (HA) e β - fosfato tricálcico (β -TCP) foram obtidos por precipitação química e reação do estado sólido, respectivamente. Para formação das pastas foram utilizadas soluções de quitosana (QS) e alginato de sódio (Alg) na forma de géis. As pastas obtidas foram denominadas de HA+QS, HA+Alg, β -TCP+QS, β -TCP+Alg. Os pós obtidos foram caracterizados por distribuição de tamanho de partícula, difração de raios X (DRX) e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), as pastas também foram caracterizadas por difração de raios X (DRX), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), além disso por microscopia eletrônica de varredura (MEV), medidas de pH, injetabilidade, tempo de pega, propriedade mecânica e para análise biológica o ensaio de citotoxicidade. O pó de HA obtido apresentou uma única fase, no entanto o pó de beta fosfato tricálcico apresentou uma mistura de β -TCP e HA. Os pós de HA e β -TCP apresentaram diâmetros médios de 8,2 e 6,9 μm , respectivamente. As pastas, independente da solução polimérica, foram obtidas com uma relação líquido/pó (L/P) de 0,75 mL/g para HA e de 0,67 mL/g para β -TCP. Os resultados de DRX e FTIR indicaram que não houve modificação de fase durante o processo de mistura e secagem, nos resultados por MEV observou-se a presença de cristais na forma de placas, apenas para a pasta de β -TCP+QS. Os valores de pH ficaram na faixa de $8,6 > \text{pH} > 7,1$ e a pasta de β -TCP+Alg solubilizou em alguns minutos na solução de PBS. Todas as formulações apresentaram excelente injetabilidade com valores superiores a 96%, o tempo de pega ficou em um

intervalo de 12 a 24h. A pasta que apresentou melhor resistência à compressão foi a pasta de HA+QS com 3,9 MPa. Os resultados de citotoxicidade indicaram, independente da formulação, que todas são biocompatíveis. Com os resultados apresentados, conclui-se que as pastas de fosfatos de cálcio com exceção da formulação β -TCP+Alg apresentam características promissoras para uma aplicação na forma injetável para regeneração óssea.

Palavras-chave: Hidroxiapatita. Beta fosfato tricálcico. Fosfato de cálcio. Pasta de fosfato de cálcio. Regeneração óssea.

ABSTRACT

CARDOSO, C.R.G.S. **Development of calcium phosphate paste for bone regeneration.**

2020. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

Calcium phosphates, such as hydroxyapatite (HA) and beta tricalcium phosphate (β -TCP), are commonly used as bone filling materials. The use of these materials in the form of particles presents difficulties in remaining at the implantation site and, as a consequence, possible damage to the host tissue may occur. The possibility of using these materials in the form of injectable paste can be a solution to keep these materials at the implantation site, facilitating the placement on the site. With this objective in mind, calcium phosphate pastes were developed using solutions of chitosan and sodium alginate. Pastes were characterized as to their physical and biological properties, with the interest of ensuring medical applicability, in order to promote bone regeneration. The hydroxyapatite (HA) and β -tricalcium phosphate (β -TCP) powders were obtained by chemical precipitation and solid state reaction, respectively. Chitosan solutions (QS) and sodium alginate (Alg) in the form of gels were used to form the pastes. The obtained folders were named HA + QS, HA + Alg, β -TCP + QS, β -TCP + Alg. The powders obtained were characterized by particle size distribution, X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), the pastes were also characterized by X-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy with transform Fourier (FTIR), in addition by scanning electron microscopy (SEM), pH measurements, injectability, setting time, mechanical properties and for biological analysis the cytotoxicity test. The HA powder obtained showed a single phase, however the beta tricalcium phosphate powder showed a mixture of β -TCP and HA. The HA and β -TCP powders had mean diameters of 8.2 and 6.9 μm , respectively. The pastes, regardless of the polymeric solution, were obtained with a liquid / powder (L / P) ratio of 0.75 mL / g for HA and 0.67 mL / g for β -TCP. The results of XRD and FTIR indicated that there was no phase change during the mixing and drying process, in the SEM results the presence of crystals in the form of plates was observed, only for the β -TCP + QS paste. The pH values were in the range of $8.6 > \text{pH} > 7.1$ and the β -TCP + Alg paste solubilized in a few minutes in the PBS solution. All formulations showed excellent injectability with values greater than 96%, the setting time was in an interval of 12 to 24 hours. The paste that showed the best resistance to compression was the HA + QS paste with 3.9 MPa. The cytotoxicity results indicated, regardless of the formulation, that all are

biocompatible. With the results presented, it is concluded that the calcium phosphate pastes with the exception of the formulation β -TCP + Alg have promising characteristics for an application in the injectable form for bone regeneration.

Keywords: Hydroxyapatite. Beta tricalcium phosphate. Calcium phosphate. Calcium phosphate paste. Bone regeneration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Imagem esquemática do osso, representando imagem geral e distribuição celular.	26
Figura 2 - Tipos de fraturas	28
Figura 3 – Osteoporose.....	29
Figura 4 – Osteomielite	30
Figura 5 - Fluxograma da metodologia adotada.....	53
Figura 6 - Difração de raios X.....	57
Figura 7 - Distribuição granulométrica do β -TCP.....	65
Figura 8 - Distribuição granulométrica da HA.....	66
Figura 9 - Distribuição granulométrica do β -TCP versus HA.....	67
Figura 10 – Difratoograma do pó da hidroxiapatita e β -TCP.....	69
Figura 11 – Difratoograma do pó: HA+Alg, HA+QS e HA	70
Figura 12 – Difratoograma do pó: β -TCP+Alg, β -TCP+QS e β -TCP.....	71
Figura 13 - FTIR dos polímeros quitosana e alginato	73
Figura 14 - FTIR: pasta de HA + QS, pasta de HA + Alg e pó de HA	74
Figura 15 - FTIR: pasta de β -TCP + Alg, pasta de β -TCP + QS e pó de β -TCP	76
Figura 16 - Imagens obtidas pelo MEV; a) HA + QS na superfície b) HA + QS na fratura, c) HA + Alg na superfície, d) HA + Alg na fratura.....	78
Figura 17 - Imagens obtidas pelo MEV do corpo de prova de β -TCP + QS; a) β -TCP + QS na superfície b) β -TCP + QS na fratura, c) β -TCP + Alg na superfície, d) β -TCP + Alg na fratura	79
Figura 18 - Comparação da HA + QS com o β -TCP + QS. a) HA + Qs superfície b) β -TCP + QS superfície	82
Figura 19 - Comparação da HA + QS com o β -TCP + QS. a) HA + QS fratura b) β -TCP + QS fratura.....	83
Figura 20 - Comparação da HA + Alg com o β -TCP + Alg. a) HA + Alg superfície b) β -TCP + Alg superfície	84
Figura 21 - Comparação da HA + Alg com o β -TCP + Alg. a) HA + Alg fratura b) β -TCP + Alg fratura.....	85
Figura 22 - Evolução do pH das pastas em solução tampão	87
Figura 23 - Preparação da pasta, a) pó de HA e a QS, b) gotejamento da QS na HA, c) pasta sendo colocada na seringa, d) pasta sendo injetada de forma homogênea	90

Figura 24 – Análise da injetabilidade no Texture Analyser TA-TXplus, a) seringa antes da injetabilidade, b) seringa após injetabilidade	91
Figura 25 - Análise da injetabilidade.....	92
Figura 26 - Pasta sendo injetada com pressão apenas do polegar	93
Figura 27 - Pasta em estado sólido. a) molde de silicone b) molde preenchido com a pasta c) cilindros secos retirados do molde.....	95
Figura 28 - Texturômetro TA.TX Plus com cilindro de fosfato de cálcio	96
Figura 29 - Ensaio de compressão no corpo de prova. a) contato da carga sobre corpo de prova; b) momento em que a ruptura do material, c) finalização do ensaio de compressão	96
Figura 30 - Análise de compressão	97
Figura 31 - Viabilidade Celular; a) Controle positivo (fenol) e Controle negativo (alumina); b) Viabilidade celular do pó e das pastas com HA; c) Viabilidade celular do pó e das pastas com β -TCP	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fase Inorgânica e Orgânica do Osso.	27
Tabela 2 - Propriedades mecânicas dos tecidos ósseos	28
Tabela 3 - Aplicações dos biomateriais.	36
Tabela 4 - Fosfato de cálcio, fórmula química e razão Ca/P.	39
Tabela 5 - Propriedades mecânicas da hidroxiapatita densa.	40
Tabela 6 - Formulações das pastas.	55
Tabela 7 - Descrição das bandas de associação da FTIR da quitosana.	73
Tabela 8 - Descrição das bandas de associação da FTIR do alginato.	74
Tabela 9 - Descrição das bandas de absorção em destaque FTIR da HA, HA + QS e HA + Alg.	75
Tabela 10 - Descrição das bandas de absorção em destaque FTIR do β -TCP, β -TCP + QS e β -TCP + Alg.	77
Tabela 11- Propriedades mecânicas da hidroxiapatita sinterizada.	98
Tabela 12 - Propriedades mecânicas de alguns tecidos duros.	98
Tabela 13- Comparação entre as médias dos grupos de HA.	101
Tabela 14- Comparação entre as médias dos grupos de β -TCP.	101
Tabela 15 - Comparação das médias entre os grupos. a) HA e β -TCP, b) HA + Alg e β -TCP + Alg e c) HA + QS e β -TCP + QS.	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnica
Alg	Alginato
Ca/P	Razão molar entre cálcio e fósforo
CaP	Fosfato de cálcio
GA	Grau de acetilação
DRX	Difração de raios X
DTS	Teste de resistência a tração diametral
FTIR	Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier
FZEA	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
HA	Hidroxiapatita
MCS	Meio de cultura suplementado
MEV	Microscopia eletrônica por varredura
PM	Peso molecular
QS	Quitosana
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
VC	Viabilidade celular
VN	Vermelho neutro
β -TCP	Beta fosfato tricálcico
α -TCP	Alfa fosfato tricálcico
PEG	Polietilenoglicol
PMMA	Poli-metilmetacrilato
PVA	Álcool polivinílico

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
Ca	Átomo de cálcio
cm ⁻¹	Unidade de frequência
<i>d</i>	Distância entre os planos
H ₂ O	Água
Kgf/cm ²	Quilograma força por centímetro quadrado
KV	Kilovolts
m/v	Massa por volume
mg	Miligramas
mg/g	Miligramas por grama
mg/mL	Miligramas por mililitro
min.	Minutos
mL	Mililitro
mL/g	Mililitro por grama
<i>n</i>	Número natural
λ	Comprimento de onda
θ	Ângulo de incidência
P	Átomo de fósforo
pH	Potencial hidrogeniônico
v/v	Volume por volume
µg/mL	Microgramas por mililitro
µL	Microlitro
µm	Micrometro
(C ₆ H ₇ (NaO) ₆) _n	Alginato de sódio
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	Hidroxiapatita

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1	TECIDO ÓSSEO	25
2.2	REGENERAÇÃO ÓSSEA	31
2.3	BIOMATERIAIS	34
2.4	BIOCERÂMICAS	37
2.5	BIOPOLÍMEROS	41
2.5.1	Quitosana.....	43
2.5.2	Alginato	44
2.6	PASTA DE FOSFATO DE CÁLCIO	45
3	OBJETIVOS.....	51
3.1	OBJETIVO GERAL	51
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
4.1	OBTENÇÃO DOS PÓS DE PARTIDA.....	53
4.1.1	Obtenção da Hidroxiapatita	53
4.1.2	Obtenção do β-TCP.....	54
4.2	OBTENÇÃO DAS SOLUÇÕES	54
4.2.1	Obtenção da solução de quitosana (QS)	54
4.2.2	Obtenção da solução de alginato de sódio	54
4.3	OBTENÇÃO DAS PASTAS.....	54
4.4	TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	55
4.4.1	Caracterização dos pós.....	55
4.4.2	Caracterização das soluções	55
4.4.3	Caracterização das pastas de fosfatos de cálcio	56
4.4.4	Área de superfície e distribuição de partículas.....	56
4.4.5	Difração de raios X.....	56
4.4.6	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)...	57
4.4.7	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	58
4.5	MEDIDAS DE pH	59
4.6	INJETABILIDADE	59

4.7	TEMPO DE PEGA INICIAL E FINAL	60
4.8	RESISTÊNCIA MECÂNICA À COMPRESSÃO	61
4.9	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS PASTAS	61
4.9.1	Cultura de células	62
4.9.2	Viabilidade celular - método de incorporação do vermelho neutro (VN) ...	62
4.9.3	Análise estatística do ensaio de citotoxicidade	63
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS	65
5.1.1	Distribuição de tamanho de partículas dos pós de partida.....	65
5.1.2	Difração de raios X dos pós e das pastas	69
5.1.3	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier dos polímeros, pós e das pastas	71
5.1.4	Microscopia eletrônica de varredura dos corpos de provas.....	77
5.2	MEDIDAS DE pH DOS CORPOS DE PROVAS EM SOLUÇÃO PBS	86
5.3	INJETABILIDADE DA PASTA.....	88
5.4	TEMPO DE PEGA INICIAL E FINAL	94
5.5	RESISTÊNCIA MECÂNICA À COMPRESSÃO	94
5.6	AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE DOS PÓS E DAS PASTAS.....	99
5.6.1	Análise estatística do ensaio de citotoxicidade.....	101
6	CONCLUSÕES	103
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	105
	REFERÊNCIAS	107

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo tem como funções: sustentação do corpo, proteção dos órgãos vitais e depósito de minerais importantes para o nosso metabolismo. Patologias como osteomielite, osteoporose, câncer nos ossos e fraturas afetam diretamente esse tecido, ocasionando descontinuidade e perda óssea. Em busca por soluções para esses problemas, os fosfatos de cálcio são compostos cerâmicos utilizados no desenvolvimento de biomateriais que passam a ser amplamente requisitados na substituição e regeneração do tecido ósseo (GOMES et al., 2012). Esses biomateriais apresentam um conjunto de propriedades físicas, químicas e biológicas, que estimulam respostas do tecido vivo, como formação de novo tecido ósseo, por apresentarem características de bioatividade e osteointegração (DOROZHKIN, 2015; O'NEILL et al., 2017).

A grande aceitação das biocerâmicas à base de fosfatos de cálcio deve-se, principalmente, ao seu alto grau de biocompatibilidade, que está relacionada com a sua similaridade química com o tecido ósseo. Além disso, os fosfatos de cálcio podem ser obtidos densos ou porosos, na forma de pó, esferas, grânulos, blocos, cimentos, pastas e etc, facilitando a aplicação (ALMEIDA, 2018; ALONSO, 2011; CAMARGO et al., 2010; CORRÊA, 2015; DALMÔNICO et al., 2012; DOROZHKIN, 2016; GOMES et al., 2012; KIM et al., 2018; PINTO, 2012).

O desenvolvimento de pastas de fosfatos de cálcio na forma injetável é bastante promissor, pois um grande número de pacientes necessita de enxertos, pelos mais diversos motivos, dentre eles, retirada de tumores, fraturas traumática, cirurgias ortopédicas e doenças metabólicas e que precisam passar por um processo cirúrgico. A utilização desse material na forma injetável, permite que o material seja colocado na região do enxerto, com mínima intervenção cirúrgica, facilitando o processo de aplicação da pasta e diminuição no tempo de recuperação do paciente (RENÓ, 2017).

As pastas bioativas injetáveis podem ser divididas em duas categorias diferentes: do tipo cimento e do tipo de não cimentícias. Em pastas do tipo cimento, existe uma reação química entre os ingredientes da pasta que resulta na formação de nova fase e rede, além de um aumento na viscosidade da pasta. Portanto, depois de um certo tempo, a pasta endurece e adquire resistência mecânica. No entanto, em pastas não cimentícias, não há reação química entre os componentes da pasta e nenhuma fase é formada. Para essas pastas, a viscosidade pode ser modificada pela interação física dos seus componentes, bem como pelo processo de secagem, as pastas feitas de fosfatos de cálcio não são reativas, como no caso das

biocerâmicas HA e β -TCP em soluções poliméricas (por exemplo, polissacarídeos), elas podem ser tratadas como pastas e não cimentos e são adequadas para fixação óssea e preenchimentos de lacunas de próteses ósseas (BORHAN; HESARAKI; NEZAFATI, 2016).

Uma pasta cerâmica obtida pela mistura de pós de fosfatos e soluções aquosas sem a ocorrência do processo de precipitação para o endurecimento, com a garantia de que não ocorra modificação dos reagentes de mistura. A pasta de fosfato de cálcio pode ser utilizada como meio de tratamento para lesões com perda ou descontinuidade óssea, dar suporte ao tecido, preencher espaços vazios ou acelerar a reparação biológica estimulando células a produzirem mais tecido e também pode ser utilizada como um meio para tratar algumas patologias que requerem estimulações farmacológicas. A cirurgia invasiva mínima tem sido habitualmente usada nas últimas três décadas, pois se utiliza de incisões menores e anestesia parcial, o que induz menos complicações e menos dor pós-operatória, além de uma rápida recuperação do paciente. Como resultado, pesquisas nessa área específica estão sendo levadas adiante, a fim de obter mais biomateriais que possam ser implantados na forma injetável (MANSOS, 2008; OLIVEIRA et al., 2010; VERLAAN; ONER, 2006).

Em resposta ao problema da descontinuidade óssea o presente trabalho buscou obter pastas de fosfatos de cálcio utilizando soluções de biopolímeros, e caracterizar suas principais propriedades físicas e biológicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TECIDO ÓSSEO

O osso é um tecido vivo natural composto, por uma parte inorgânica (65% representa a rigidez e resistência do osso), mas também por uma orgânica (35% representa a flexibilidade do osso). A junção da fase orgânica com a fase inorgânica como os cristais de cálcio. O osso em peso contém cerca de 30% de matriz orgânica, 60% mineral e 10% de água (ATHANASIOU et al., 2000; DRIESSENS, 1980; KNABE, 2000, RENÓ, 2017; SHEIKH et al., 2015).

O tecido ósseo juntamente com outros tecidos conjuntivos, constitui o esqueleto humano. As principais funções desse tecido, são (CORREA, 2015; TORTORA, DERRICKSON, 2012):

- Sustentação e fixação para os músculos;
- Proteger órgãos internos vitais;
- Auxiliar no movimento em conjunto com os músculos;
- Armazenar e liberar minerais (função metabólica – reservas de íons);
- Conter a medula óssea vermelha, produtora das células sanguíneas;
- Conter a medula óssea amarela, armazenamento de triglicerídeos (gordura – fonte de energia química potencial).

Ao se analisar a estrutura de um osso, observa-se duas partes: uma densa classificada como compacta (80% do osso) e uma outra região com muitos poros classificada como esponjosa (20% do osso), que se comunicam (TORTORA; DERRICKSON, 2012).

Esse tecido pode ser classificado em dois tipos: esponjoso e cortical, sendo que ambos apresentam os mesmos elementos quanto às células e matriz extracelular, porém com características e funções diferentes, o esponjoso possui trabéculas com 100 a 150 µm de espessura, constituídas por lamelas ósseas, a grande maioria paralelas entre si, delimitando amplas cavidades intercomunicantes ocupadas, no osso vivo, por medula óssea. Já o cortical é formado por uma coluna cilíndrica com 150 a 300 µm de diâmetro, onde o eixo maior é paralelo ao eixo do osso esponjoso com característica compacta (JUDAS et al., 2012).

De acordo com a figura 1, pode-se observar que o osso esponjoso (também conhecido como osso trabecular), é poroso, fornecendo suporte estrutural e disposição para medula óssea no seu interior. Em contraste, o osso cortical é o osso compacto que fica ao redor do espaço

medular, região onde o osso possui uma maior resistência mecânica. A camada externa que cobre a superfície dos ossos corticais é o periósteo, contendo principalmente vasos sanguíneos e osteoblastos, que são ativados durante o crescimento aposicional e reparo ósseo. A unidade funcional básica do osso cortical é a osteona (ou sistema haversiano) que contém células e matriz extracelular organizadas em um padrão lamelar, ao redor do canal haversiano, onde residem os nervos e vasos sanguíneos (BUCK; DUMANIAN, 2012; BAO et al, 2013).

Figura 1 - Imagem esquemática do osso, representando imagem geral e distribuição celular

Fonte: adaptado Bao et al. (2013).

O osso é formado por um tecido conjuntivo constituído por células e uma matriz extracelular, que possui uma função única de mineralizar. A mineralização da matriz confere a este tecido extrema dureza, permitindo-lhe desempenhar importantes funções de sustentação e proteção. Por outro lado, a matriz de colágeno proporciona-lhe uma certa maleabilidade fornecendo-lhe algumas possibilidades de extensão e flexão (JUDAS et al., 2012). O tecido ósseo, por sua vez, está em constante remodelação, em cima deste fator a massa total está diretamente relacionada ao equilíbrio existente entre a formação e a reabsorção óssea (SILVA et al., 2007). As funções de suporte estrutural e a de reserva metabólica estão, em condições fisiológicas, num equilíbrio estável. Porém, quando o equilíbrio fica alterado, a função

estrutural é sempre sacrificada em favor da metabólica, essa descompensação pode trazer sérios riscos ao indivíduo (JUDAS et al.,2012).

A parte inorgânica do osso corresponde a 60% de seu peso, é composta principalmente de cálcio e fósforo, juntamente com outros componentes como, bicarbonato, citrato, magnésio, sódio e potássio, sendo que o cálcio e o fósforo estão basicamente sob a forma de cristais de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, já a parte orgânica é composta que exclusivamente de colágeno, mas também com presença de várias glicoproteínas que estão presentes na matriz óssea, como a osteocalcina que está ligada a hidroxiapatita, informações essas que podem ser observadas na tabela 1 (GARTNER; HIATT, 2003).

Tabela 1 - Fase Inorgânica e Orgânica do Osso

Fase Inorgânica	% em massa	Fase Orgânica	% em massa
Hidroxiapatita	60	Colágeno	20
Carbonato	4	Água	9
Citrato	0,9	Proteínas não colágenas	3
Sódio	0,7		
Magnésio	0,5		
Outros traços: Cl^- , F^- , K^+ , Sr^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+}		Outros traços: polissacarídeos, lipídeos, ossos primário-células: osteoblastos, osteoclastos e osteócitos	

Fonte: Traduzido Murungan e Ramakrishna (2005).

O tecido ósseo está sempre submetido a diversos tipos de solicitações mecânicas no qual forças atuam sobre ele gerando esforços de compressão, de tração, de flexão e de cisalhamento. Sendo que a combinação dessas forças pode gerar uma carga excessiva ocasionando fraturas ósseas levando ao rompimento do tecido (OLIVEIRA, 2008). Na tabela 2 são apresentadas algumas propriedades mecânicas dos ossos, de acordo com o tipo de solicitação.

Tabela 2 - 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 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: Ramalho (2006).

Outro fator que também requer nossa atenção é a quantidade e os tipos de fraturas, conforme figura 2, isso se dá por vários motivos, podem ser eles por impactos, estresse, doenças metabólicas que afetam o crescimento, formação e o remodelamento ósseo (osteopenia, osteoporose, Paget), infecções (osteomielite) e tumores (câncer nos ossos) (SOUZA, 2018).

Figura 2 - Tipos de fraturas

Fonte: Radiologia patológica (2017).

Segundo Instituto de Medicina Molecular - IMEB (2018) existe uma grande variedade de fraturas, podendo ser elas múltiplas ou únicas, por um encurtamento violento ou por torção, com rompimento total ou incompleto do tecido ósseo, do tipo oblíquas, epifisárias, fechadas ou abertas. Elas podem ser classificadas segundo as suas causas, como:

Fraturas traumáticas: quando é aplicada sobre o osso uma tensão maior que sua resistência. Podem ocorrer no local do impacto ou à distância (fratura de clavícula quando se apoia com a

mão após uma queda). Podem ocorrer também por uma contração muscular excessiva devida à aplicação repetida e frequente de pequenas forças sobre um osso, enfraquecendo-o progressivamente.

Fraturas patológicas: elas podem ocorrer espontaneamente ou em razão de traumatismos mínimos sobre o osso previamente fragilizado por alguma patologia óssea.

Fraturas simples: apenas o osso é atingido e não há perfuração da pele ou lesão de outras estruturas adjacentes.

Fratura expostas: a pele é rompida e o osso fica exposto ao exterior. Nesse tipo de fratura, é comum ocorrer infecções bacterianas e mesmo que ela ainda não esteja presente, justifica-se o uso preventivo de antibióticos.

Fraturas complicadas: quando são atingidas outras estruturas além dos ossos, como vasos sanguíneos, nervos, músculos, etc.

Além disso, algumas patologias ósseas podem provocar descontinuidade óssea e ou perda desse tecido, como a osteoporose, doença que tem atingido milhões na população mundial, segundo a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia – Regional São Paulo (2017), isso se dá por perda excessiva do osso esponjoso aumentando assim suas lamelas, deixando os ossos mais frágeis, conforme figura 3:

Figura 3 – Osteoporose

Fonte: Sociedade Portuguesa de Reumatologia (2018).

A osteoporose é uma doença óssea metabólica, caracterizada por diminuição da massa óssea em decorrência da perda excessiva do osso esponjoso aumentando assim o tamanho de suas lamelas (figura 3) e ocasionando maior fragilidade óssea e maior suscetibilidade a

fraturas, principalmente, da cabeça do fêmur, coluna vertebral e punho, que constituem as suas complicações mais graves. Hoje sabe-se que o número destas fraturas aumenta exponencialmente com a idade e difere entre os sexos. Estudos europeus revelam que 8 em cada 20 mulheres e 3 em cada 20 homens irão sofrer uma ou mais fraturas osteoporóticas ao longo da sua vida. Após os 65 anos de idade, o risco de fratura aumenta exponencialmente e a frequência de fraturas nas mulheres é 2-3 vezes superior à dos homens (SOCIEDADE PORTUGUESA DE REUMATOLOGIA, 2018).

A osteomielite é uma infecção que atinge os ossos que podem ser causadas por bactérias ou mais raramente por fungos. Essa patologia pode ser classificada como aguda, subaguda e crônica. Aguda quando dura menos de um mês, subaguda quando tem duração maior que um mês e crônicas quando a infecção fica instalada por vários meses ou até mesmo anos, o que pode acarretar necrose e sequestro ósseo, conforme figura 4 (PEREIRA, 2012).

Figura 4 – Osteomielite

Fonte: Moura e Guarruço (2017).

Diversas são as patologias que atingem os ossos, fator preocupante, que requer uma busca pela cura ou até mesmo uma forma de controle e tratamento para que as mesmas não possam evoluir.

2.2 REGENERAÇÃO ÓSSEA

O osso é um tecido altamente dinâmico, que sofre constante remodelação ao longo da vida. A homeostase é alcançada através das ações combinadas de osteoprogenitores, osteoblastos, osteócitos, bem como osteoclastos. Osteoblastos, eventualmente diferenciam-se dos osteócitos maduros, formando redes essenciais que tem como função apoiar a estrutura óssea e o metabolismo. O osso sofre ativamente a remodelação em resposta aos estímulos ambientais, como influências fisiológicas ou forças mecânicas. Esse processo envolve um equilíbrio entre a formação óssea como descrito acima, bem como reabsorção óssea por meio dos osteoclastos, que é crucial para a renovação do osso, para manter a força óssea e a homeostase mineral. O osso é capaz de sofrer regeneração significativa em resposta a trauma e fraturas. A regeneração progride através das três fases da inflamação, reparo e remodelação (BAO et al., 2013).

Uma das maiores características do osso é sua capacidade peculiar de regeneração. No entanto, alguns problemas podem afetar esse tecido, como a perda óssea excessiva, que geralmente requer o uso de enxertos ósseos. No entanto, são regularmente aplicados materiais de enxerto originários do mesmo indivíduo (autoenxerto), doador (aloenxerto) ou de animal osso (xenoenxerto), materiais artificiais de enxerto, os chamados aloplastos, o aumento, causado pelos vastos avanços no campo da engenharia de tecidos (BAO et al., 2013).

A regeneração óssea é um dos processos de reparo mais importantes do corpo, o osso por ser um tecido extremamente dinâmico e por possuir a capacidade de sofrer regeneração quando lesionado; embora esta capacidade regenerativa seja limitada ao tamanho da lesão. Os defeitos ósseos extensos provocados por traumas, extirpação de tumores e outras patologias não se regeneram espontaneamente (FERNANDES, 2011).

Várias são as razões clínicas para o desenvolvimento de materiais ósseos, para reconstrução de tecido, isso inclui a necessidade de substituição de tecido lesionado, por implantes ortopédicos que sejam mais adequados ao ambiente biológico. Dentre os métodos mais tradicionais encontram-se os auto-enxertos e os aloenxertos (PEREIRA, 2000).

Embora estes sejam os tratamentos padrões, estes podem ser ineficientes, uma vez que os enxertos ósseos são avasculares e dependentes de difusão. Outro fator que influencia é o tamanho do defeito e a viabilidade do leito hospedeiro e isso pode limitar a sua aplicação. Além disso, a reabsorção óssea é um processo imprevisível; o enxerto pode ser reabsorvido pelo corpo antes da osteogênese ser completada (BROWN; CRUESS, 1982; ENNEKING et al., 1980; SANTOS, 2011).

Enxertos vascularizados necessitam de microcirurgias especializadas, o que requer uma infraestrutura sofisticada o que acaba limitando muito o tratamento. As técnicas de distração osteogênica, método esse cirúrgico, efetivo de alongamento ósseo para correções de deformidades, são muitas vezes processos trabalhosos e demorados aumentando com isso o risco de morte do paciente (ILIZAROV, 1989; SANTOS, 2011).

Diante desses desafios quatro aspectos importantes precisam ser analisados para que aconteça a regeneração óssea (CROTEAU et al., 1999; HAKAKAS, 1984):

- Um sinal morfogenético;
- Células hospedeiras sensíveis que respondem a este sinal;
- Um portador adequado deste sinal que pode envia-los a sítios específicos;
- Um leito hospedeiro vascularizado e viável.

Em situações de grande perda da integridade tecidual, resultante de traumas, deformidades e patologias, o grande desafio da bioengenharia tem sido buscar o desenvolvimento de biomateriais para recuperação de tecido ósseo (NAVARRO et al., 2008). Deste modo, a engenharia tecidual é uma ciência que visa criar e aprimorar novas terapias e/ou desenvolver novos biomateriais que restaurem, melhorem ou impeçam o agravamento da função tecidual comprometida (KAIGLER; MOONEY, 2001; MARINS et al., 2004; SACHLOS; CZERNUSZKA, 2003; SANTOS, 2011).

Langer e Vacanti (1993) foram os primeiros a descrever o conceito de engenharia tecidual como sendo um campo interdisciplinar que aplica princípios da engenharia, biologia e ciências clínicas para o desenvolvimento de substitutos biológicos que possam manter, restaurar ou melhorar a função de órgãos e tecidos. Em cima deste conceito, pesquisas vêm sendo desenvolvidas sobre a utilização dos biomateriais na regeneração óssea.

Com o avanço da pesquisa em engenharia de tecidos, Willians e Zhang (2018) descrevem o conceito da engenharia tecidual como o uso de células, biomateriais e fatores moleculares ou físicos adequados, sozinhos ou em combinação, para reparar ou substituir o tecido para melhorar os resultados clínicos.

Para isso, os biomateriais na regeneração óssea devem obedecer aos princípios biológicos que norteiam a cicatrização óssea normal. Para isso é preciso conhecer como funciona esse processo, entendendo que o tecido ósseo está em constante remodelação e sua massa total depende da relação de equilíbrio existente entre a formação e a reabsorção óssea (SILVA et al., 2007).

A aplicação de biomateriais sintéticos na regeneração do tecido ósseo tem sido uma das alternativas aos enxertos ósseos e esse processo tem demonstrado resultados relevantes, pois eles pouco danificam tecidos saudáveis, não aumentam os riscos de contaminações virais e bacterianas e podem, ainda, ser de fácil dissolução e absorção, ao mesmo tempo em que permite e estimula a formação óssea, um ponto positivo desse processo, é que esses materiais já estão sendo disponibilizados comercialmente (CHEN et al., 2009; WAN et al., 2006).

A regeneração óssea pode acontecer através da aplicação de biomateriais na região da implantação. Este crescimento pode agir por um destes três mecanismos de formação óssea: (BURCHARDT, 1983; CORREA, 2015; GARG, 1999; GAROFALO, 2007; MISCH, 1993):

- **Osteogênese:** Acontece quando células osteoblásticas vivas, fazem parte do enxerto ósseo, onde estas células adicionadas transplantadas, formam novos pontos de ossificação dentro do enxerto e somando-se com os osteoblastos já existentes no defeito ósseo, contribuem para a capacidade total de regeneração (formação) óssea (NEWMAN et al., 2012).
- **Osteoindução:** Quando o material transplantado provoca a formação do novo osso por meio da estimulação de células osteoprogenitoras presentes no defeito ósseo ou nos vasos sanguíneos destes, resultando-se em osteoblastos iniciando assim, a formação de um novo osso (NEWMAN et al., 2012).
- **Osteocondução:** A formação óssea se dá pelos osteoblastos presentes nas margens ou superfície do defeito ósseo sobre o material de enxerto. Estes biomateriais de enxerto, servem como base para o crescimento ósseo, não inibem e nem induzem o crescimento ósseo, apenas permitem a formação normal do osso pelos osteoblastos presentes na superfície de defeito junto a superfície de material de enxertia (NEWMAN et al., 2012).

Os fosfatos de cálcio dentre os biomateriais cerâmicos são os mais estudados e empregado como biomaterial para reposição e regeneração óssea, dentre suas principais características: está a semelhança com a fase mineral dos ossos, dentes e tecidos calcificados, excelente biocompatibilidade, biotividade, ausência de toxicidade, taxas de degradação variáveis e a osteocondutividade (GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

2.3 BIOMATERIAIS

Na busca por uma melhor qualidade de vida, o homem vem buscando artefatos ou processos que os facilitem em sua locomoção e os ajudem a vencer determinadas patologias, a busca e a utilização de biomateriais vêm sendo aperfeiçoados. Há mais de 2500 anos atrás os orientais vêm utilizando esses biomateriais como implantes de membros e dentes, essa busca aumentou depois do número de amputados e pessoas feridas que voltavam da guerra (RENÓ, 2017), dessa forma a pesquisa por materiais que sejam compatíveis ao nosso corpo tem sido sempre um grande desafio, isso se dá por três aspectos principais: o envelhecimento da população mundial, com aumento também na expectativa de vida; outro fator está associado ao aumento do poder aquisitivo e do padrão de vida nos países em desenvolvimento, que facilitam o acesso a tratamentos antes desconhecidos pela população e terceiro fator são as melhorias tecnológicas na abordagem de doenças anteriormente vistas como não tratáveis (PIRES et al., 2015).

Do ponto de vista dos materiais, eles são divididos em 4 grupos principais: metais, polímeros, cerâmicas e várias misturas dos mesmos, chamados compósitos. Da mesma forma os biomateriais sólidos, também são divididos em grupos: biometais, biopolímeros, biocerâmica e biocompósitos. Todos eles desempenham papéis muito importantes na substituição e regeneração de vários tecidos humanos (DOROZHKIN, 2015).

Segundo Willians e Zhang (2019) o biomaterial é um material projetado para assumir uma forma que pode conduzir, por meio de interações com sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico.

Dentre as características analisadas nos biomateriais, é importante que eles apresentem propriedades físicas e biológicas compatíveis com o tecido vivo hospedeiro, de maneira que possa trazer resposta adequada, de forma que o organismo não rejeite e nem traga um quadro inflamatório grave, a resposta positiva desse biomaterial caracteriza biocompatibilidade (KAWACHI et al., 2000).

Para que aconteça a adesão celular a um biomaterial, dois fenômenos diferentes podem acontecer para justificar esse comportamento: fase de anexação e fase de adesão. A fase de anexação ocorre rapidamente; é o movimento da célula em direção ao biomaterial recém implantado, nesta ocorrem alguns eventos como ligações físico-químicas, através de forças iônicas e forças de Van der Waals. Já a fase de adesão ocorre posteriormente e envolve ação de diversas moléculas biológicas como proteínas de matriz extracelular, proteínas de

membrana celular e do citoesqueleto, ao qual, interagem em conjunto para trazer uma melhor resposta na expressão gênica (ANSELME, 2000; BAXTER et al., 2002).

Segundo Cao e Wang (2009), é importante analisarmos se as propriedades dos biomateriais se conferem uma relação à interação benéfica com o organismo implantado. Para isso é preciso analisar se:

- O material não desencadeia uma 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 qual foi 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.

Segundo Willians (1986), alguns aspectos precisam ser observados para o sucesso clínico de um novo biomaterial, são elas:

Bioatividade: quando o material gera uma resposta interfacial sobre o tecido.

Biorreabsorção: remoção do material por um processo biológico.

Osteointegração: processo no qual o material implantado se integra ao tecido ósseo.

Osteocondução: processo pelo qual o material implantado serve de suporte para o crescimento do tecido ósseo, ou seja, o tecido ósseo é conduzido através do material.

A busca por um material que tenha uma resposta positiva pelo tecido hospedeiro tem sido uma grande preocupação na área biomédica e isso demonstra a evolução desse processo, mas até século passado a aplicação dos biomateriais era marcada por tentativas e erros, já nas proximidades da década de 50, a busca se voltou para os materiais bioinertes onde o foco estava no material em si, com o passar do tempo à busca passou a ser a bioatividade dos biomateriais, e mais recentemente, a busca tem sido pelo processo de regeneração de tecido funcional, ou seja, a princípio a busca era por materiais mais biocompatíveis que pudessem substituir um tecido danificado e promover um suporte mecânico, sem interesse por uma resposta biológica do paciente, com o passar do tempo o interesse passou a ser em aumentar a vida do implante, fez com que se buscasse materiais que interagissem com o tecido hospedeiro, o que levou a busca por materiais biodegradáveis, bioabsorvíveis, bioativos e

mais recentemente os biomiméticos (PIRES et al., 2015) que tem como características buscar materiais que sejam semelhantes aos da natureza ou dos seres vivos, a fim de uma resposta melhor quanto a propriedades mecânicas, características biológica e maior funcionalidade do tecido transplantado.

Dentre os materiais utilizados para este propósito, encontram-se os metais, as cerâmicas, os polímeros, os vidros e os compósitos (OLIVEIRA, 2008). Na tabela 3, observam-se algumas aplicações desses biomateriais (KAWACHI et al., 2000):

Tabela 3 - Aplicações dos biomateriais

Biomaterial	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
Polímeros	Elasticidade, fácil fabricação, baixa densidade	Baixa resistência mecânica, degradação dependente do tempo	Suturas, artérias, veias; maxilofacial (nariz, orelha, maxilar, mandíbula, dente); cimento, tendão artificial; oftalmologia.
Polietileno			
PTFE			
Poliéster			
Poliuretano			
PMMA			
Silicone			
Metais	Alta força de tensão, alta resistência a desgaste, energia de deformação alta	Baixa biocompatibilidade, corrosão em meio fisiológico, perda das propriedades mecânicas com tecidos conectivos moles, alta densidade	Fixação ortopédica (parafusos, pinos, placas, fios, hastes); implantes dentários
Ligas Aço inoxidável Liga de titânio			
Liga de cobalto-cromo			
Cerâmicas e vidros	Boa biocompatibilidade, resistência à corrosão, inércia, alta resistência à compressão	Baixa força de tensão, baixa resistência mecânica, baixa elasticidade, alta densidade	Ossos, juntas, dentes, válvulas, tendões, vasos sangüíneos e traqueias artificiais
Alumina			
Zircônia			
Carbono			
Fosfatos de cálcio Porcelana			
Vidros bioativos			
Compósitos	Boa biocompatibilidade, inércia, resistência à corrosão, alta força de tensão	Material de fabricação incompatível	Válvula cardíaca artificial (carbono ou grafite pirolítico), implantes de juntas de joelhos (fibra de carbono reforçada com polietileno de alta densidade)
Fibra de carbono Resina			
termo fixa Fibra de carbono			
Termoplástico Carbono-carbono Fosfato de cálcio-colágeno			

Fonte: Adaptado Kawachi et al. (2000).

2.4 BIOCERÂMICAS

O homem, há muitos milênios, após diversas experiências com o fogo, começa a transformar argila em cerâmica, período que envolvia trabalho no campo, a fim de melhorar seu habitat, porém com a evolução da pesquisa e busca por uma melhor qualidade de vida, o homem nas últimas décadas passa a utilizar de forma inovadora as cerâmicas, com finalidade de reparação de partes do corpo (ossos e dentes) e a cerâmica usada para este propósito é denominada biocerâmica (HENCH, 1991).

No entanto, os elementos químicos utilizados na fabricação da biocerâmica são pequenos conjuntos de elementos da tabela periódica. Ou seja, a biocerâmica pode ser preparada a partir de alumina, compostos de zircônia, magnésia, carbono, sílica e cálcio, além de compostos de um número limitado de outros materiais químicos. Todos esses compostos podem ser fabricados em formas densa ou porosa, bem como sob a forma de cristais, pós, partículas, grânulos, andaimes e / ou revestimentos (DOROZHKIN, 2015).

Os materiais biocerâmicos são classificados em subgrupos de acordo com a maneira como reage ao organismo, como bioinertes, bioativos e biorreabsorvíveis. As biocerâmicas bioinerte e bioativas se diferem na maneira de interagir com o tecido: na bioativa, a fixação acontece através de uma ligação química com o tecido e na bioinerte, a ligação não se dá diretamente com o osso ocorrendo primeiramente à formação de uma camada fibrosa (COSTA, 2014; LEGEROS et al., 2006).

As biocerâmicas podem ser utilizadas na forma porosa ou densa, sendo que a porosidade influencia fortemente a resistência, módulo de elasticidade, resistência à oxidação, resistência ao desgaste e outras propriedades importantes, porém esse aspecto pode favorecer o crescimento do tecido ósseo, fazendo com que ocorra um forte entrelaçamento do tecido como o implante, favorecendo com isso a resistência do material in vivo (ZAVAGLIA, 2003).

As propriedades mecânicas dos biomateriais são fortemente relacionadas ao tamanho e a disposição espacial dos grãos que constituem estes materiais; tendo como regra geral, quanto menor o tamanho dos grãos, mais duro pode ser o material correspondente (COSTA, 2014).

Quando se trata da aplicabilidade desse material ao tecido hospedeiro, devemos levar em consideração as reações que serão apresentadas pelo tecido após o implante. A leitura do comportamento do material no tecido hospedeiro tem como grande vantagem verificar o tipo de adesão desse material.

Os tipos de adesão entre tecido e implante de biocerâmicas, são (TURRER; MARTINS, 2008):

- **Fixação morfológica:** ocorre crescimento de tecido nas irregularidades da superfície (cerâmicas não-porosas);
- **Fixação biológica:** ocorrem crescimento e invasão celular através dos poros do implante, promovendo uma adesão mecânica (recobrimentos cerâmicos, aluminas);
- **Fixação bioativa:** ocorre adesão química específica promovida pelo material implantado (vidros, vitro-cerâmicas bioativas e hidroxiapatita). Esta adesão química ocorre devido à deposição de camadas de hidroxiapatita carbonatada na superfície do implante, criando uma interface contínua considerada “cola biológica”.

No campo da pesquisa, os biomateriais degradáveis têm requerido uma atenção especial para o reparo e a regeneração óssea, onde são procurados ativamente e geram muito interesse, pois sua biodegradabilidade a natureza permite evitar a segunda cirurgia e reduzir a dor e o custo para os pacientes. Esse comportamento das biocerâmicas implantados em tecido ósseo, mostram que elas se degradam e a reabsorção acontece *in vivo* por processos mediados por células e orientados por solução e demonstram substituição progressiva por osso verdadeiro (SHEIKH et al., 2015).

2.4.1 Fosfatos de Cálcio

Os fosfatos de cálcio são os principais materiais estudados e usados como biomaterial para reposição e regeneração do tecido ósseo, sua biocompatibilidade, bioatividade, ausência de toxicidade, remodelamento e osteocondutividade, têm desempenhado um papel importante para o reparo do tecido ósseo, isso indica um caminho para o crescimento ósseo, podendo ser ele através de uma superfície ou através de poros, formando com isso um novo tecido sobre o tecido hospedeiro, fator esse importantíssimo para reparo do tecido vivo (DOROZHKIN, 2015).

A descoberta da osteocondução das cerâmicas de fosfato de cálcio (Ca/P) fez com que pudesse conferir atividade regenerativa biológica em materiais com características estruturais cuidadosamente projetadas. A composição da fase única e as características estruturais das cerâmicas porosas de Ca/P osteocondutoras permitem que ela interaja com moléculas sinalizadoras e matrizes extracelulares no sistema hospedeiro, criando um ambiente local propício para a formação de novos ossos. Evidências crescentes indicam que agora a atividade osteocondutora da cerâmica Ca/P está ligada às suas propriedades físico-químicas e estruturas

tridimensionais. Inspirados por este avanço conceitual, muitos laboratórios têm demonstrado interesse em outros materiais que também podem ser atraídos para se juntar ao posto de biomateriais indutores de tecidos, e além dos ossos, outros tecidos como cartilagem, nervos e vasos sanguíneos também foram regenerados com a ajuda de biomateriais. (TANG et al., 2018).

O osso é composto de uma matriz orgânica fortalecida por uma fase mineral, que possui principalmente os fosfatos de cálcio. Na qual, dentre as fases minerais a que se destaca é a hidroxiapatita, cuja fórmula química é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, que é considerado o mais importante composto (ANDRADE; BASTOS; OGASAWARA, 2002).

Dentro da classe dos fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita é uma biocerâmica com características bioativa, biocompatível, osteocondutiva, muito semelhante estruturalmente, fisicamente e quimicamente com a matriz mineral óssea, sendo muito utilizada em substituições ósseas (CARRODEGUAS et al., 1999; LIU et al., 1997; MEIRA et al., 2012). Por sua similaridade com a fase mineral dos ossos, ela tem se destacado na preparação de matrizes para engenharia tecidual, no entanto apresenta como característica fragilidade e uma baixa resistência mecânica o que é comum nas cerâmicas (COSTA, 2013).

A hidroxiapatita continua sendo o material que mais tem sido utilizado nos últimos 30 anos pela área biomédica. Uma maneira de classificar os fosfatos de cálcio é através da razão molar entre os átomos de cálcio e fósforo (razão Ca/P), a qual varia de 0,5 a 2,0, e é através dessa que podemos identificar suas características mais próximas com o osso, conforme tabela 4 (DOROZHKIN, 2015; GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

Tabela 4 - Fosfato de cálcio, fórmula química e razão Ca/P

Fosfato de Cálcio	Fórmula química	Ca/P (continua)
Fosfato tetracálcico (TeCP)	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,0
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$\text{Ca}_{10-x}\text{H}_{2x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,5
Fosfato tricálcico (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Fosfato octacálcico	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Fosfato dicálcico dihidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1
Fosfato dicálcico (DCP)	CaHPO_4	1
Pirofosfato de cálcio (CPP)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1
Pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1
Continua		

Conclusão

Fosfato de Cálcio	Fórmula química	Ca/P (continua)
Fosfato heptacálcico (HCP)	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0,7
Fosfato dihidrógeno tetracálcico (TDHP)	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0,67
Fosfato monocálcico monohidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{O}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5
Metafosfato de cálcio (CMP)	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,5

Fonte: Guastaldi e Aparecida (2010).

Estudos têm mostrado que a formação de tecido ósseo a partir da hidroxiapatita tem sido um fator muito positivo para continuação da pesquisa em cima deste material. A caracterização mecânica dos biomateriais inclui a determinação dos parâmetros dureza, módulo de elasticidade (Young), tenacidade à fratura (K_{IC}), resistência à tração e à compressão. Todos estes parâmetros são importantes para identificarmos as cargas que essas cerâmicas suportam. As cerâmicas de hidroxiapatita suportam satisfatoriamente cargas não muito elevadas, mas em ambiente úmido, uma trinca já nucleada pode crescer sub-criticamente, isto é, com níveis de carregamento inferiores à necessária à propagação sem interferência do ambiente, fator importante para analisarmos tenacidade à fratura, o que pode acarretar por exemplo uma fratura na estrutura de um implante ortopédico. A tabela 5 apresenta as principais propriedades mecânicas da HA densa (ANDRADE; BASTOS; OGASAWARA, 2002).

Tabela 5 - Propriedades mecânicas da hidroxiapatita densa

Densidade teórica	3,156 g/cm ³
Dureza	500-800 HV, 2000-3500 Knoop
Resistência à tração	40-100 MPa
Resistência à flexão	20-80 MPa
Resistência à compressão	100-900 MPa
Módulo de elasticidade	70-120 GPa
Tenacidade à fratura	Aproximadamente 1 MPam ^{0,5}

Fonte: Ratner et al. (2004).

Os fosfatos de cálcio, principalmente a hidroxiapatita e o β - fosfato de tricálcico exercem uma função direta entre tecido adjacente/biomaterial. Esta interação do biomaterial com o tecido hospedeiro promove uma troca de íons na interface, favorecendo a reparação, a

reconstrução e a ósteo-integração do biomaterial (CAMARGO, 2014; DALMÔNICO, 2015; LEGEROS, 1988; WEBSTER, 2003).

O beta fosfato tricálcico (β -TCP) cuja fórmula química é β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, é resultante das três fases polimorfas do fosfato tricálcico (β , α e α'). Estas fases são normalmente obtidas por tratamento térmico em altas temperaturas, através da decomposição de fosfatos de cálcio hidratados ou pela decomposição da fase hidroxiapatita, quando submetida a temperaturas acima de 1180°C , por ser uma cerâmica que também apresenta uma composição química semelhante à composição do tecido ósseo, sendo por isso frequentemente é utilizado como biomaterial (GOUVEIA, 2008; PEREIRA et al., 2015).

Como implantes feitos de HA sinterizada tem sido utilizada em defeitos ósseos por muitos anos, as biocerâmicas feita de tipos mais solúveis de CaPO_4 tem sido mais preferível para fins biomédicos. Além disso, os resultados experimentais mostraram que o β -TCP tem uma maior capacidade de adsorver fibrinogênio, insulina ou colágeno do tipo I quando comparado com a HA (DOROZHKIN, 2015).

Hoje existe uma grande interação entre as biocerâmicas e os biopolímeros e isso se dá pela sua biodegradação e alguns deles por possuírem interação com células imunológicas (SOUZA et al., 2012).

2.5 BIOPOLÍMEROS

Polímeros são macromoléculas que são compostas por monômeros de repetição ligados covalentemente que podem ser iguais ou diferentes, isto é, homopolímeros e copolímeros respectivamente. Dentre os polímeros, os biodegradáveis são um dos biomateriais primários e comuns, mais usados para reparo de tecido e reparação óssea, muito utilizado na engenharia tecidual, quanto mais longas forem as cadeias poliméricas, maiores são os desmembramentos nas cadeias hidrolíticas para obter biodegradação (PIETRZAK; SARVER; VERSTYNNEN, 1997; SHEIKH et al., 2015).

Os polímeros biodegradáveis degradam principalmente por enzimólise e hidrólise de macromoléculas para moléculas menores e, eventualmente, para dióxido de carbono e água. Existem alguns critérios para polímeros biodegradáveis para serem utilizados com sucesso em aplicações de reparo ósseo e engenharia de tecidual (LLOYD, 2001; RAZAK; SHARIF; RAHMAN, 2012; SHEIKH et al., 2015):

- a superfície do polímero deve permitir a adesão e crescimento das células;
- pós-implantação in vivo, não deve haver resposta inflamatória ou tóxica ao polímero ou a seus produtos de degradação;
- possuam porosidade suficientemente alta que esteja interconectada;
- possuir alta área de superfície e espaço adequado para matriz extracelular;
- ser completamente degradável com tempo de reabsorção controlado;
- matriz (taxa de degradação que combina idealmente com o tecido ósseo em regeneração); e finalmente
- o polímero o material deve permitir o processamento reproduzível em estruturas tridimensionais (3D).

Os biomateriais poliméricos nos últimos anos são utilizados pela área médica, em decorrência da facilidade de fabricação, além das várias formas de obtenção e utilização, como: gel, partículas, filmes, fios e outros mais (PIRES et al., 2015). Os polímeros eles podem ser sintéticos ou naturais, essa classificação baseia-se à sua origem e a maneira como é produzido, eles podem ser reabsorvíveis ou não. Os polímeros sintéticos mais conhecidos são poliamidas, polietileno, polipropileno, poliacrilatos, fluorocarbonos, poliésteres, poliéters, poliuretanos, entre outros (HEATH; COOPER, 2013; TIAN et al., 2012).

Os polímeros sintéticos apesar das propriedades funcionais adequadas, eles podem apresentar grupos químicos não favoráveis à interação celular e isso pode provocar a liberação de subprodutos tóxicos na corrente sanguínea durante sua degradação, o que pode desencadear um quadro inflamatório no tecido hospedeiro (HEATH; COOPER, 2013). O processo de degradação dos polímeros sintéticos e naturais são diferentes, isso por meio da clivagem hidrolítica e enzimática de suas ligações químicas, com isso a utilização desse biomaterial deve estar bem elucidada para que haja segurança quanto ao seu contato com o tecido hospedeiro. Dentre os grupos funcionais mais sensíveis à hidrólise, incluem: os ésteres, carbonatos, amidas, uretanos, ureias e anidridos (NAIR; LAURENCIN, 2007).

Atualmente na área da Engenharia Tecidual os polímeros sintéticos mais utilizados são os biodegradáveis, como os poliésteres alifáticos saturados, o poli (ácido láctico) conhecido como PLA, o poli (ácido glicolítico) conhecido como PGA e os co-polímeros poli(ácido láctico co-ácido glicolítico) conhecido como PGLA, nos quais sofrem degradação através da desesterificação. Após serem degradados os componentes monoméricos de cada polímero são removidos por vias naturais, esse tem sido um dos motivos, nos quais os polímeros estão

sendo escolhidos para confecções de suportes tri-dimensionais para proliferação celular, suturas biodegradáveis, dispositivos absorvíveis de fixação óssea e matrizes para liberação de fármacos (PIRES et al., 2015).

Os polímeros naturais por serem de origens biológicas são abundantes e seus produtos de degradação são biocompatíveis e não-tóxicos, o que os torna seguros para utilização na constituição de biomateriais. Além disso, apresentam custo acessível e são obtidos de fontes renováveis. Porém o processo de purificação dessas matérias prima não são tão simples assim, devido a essa complexidade isso pode afetar o produto final, isso pode mudar um pouco as características do polímero de lote para lote, mesmos sendo extraídos de organismos vivos como algas, plantas, animais e microrganismos (ANGELOVA; HUNKELER, 1999).

Dentre os polímeros naturais que se destacam como biomateriais para aplicação na área biomédica estão as proteínas (como colágeno, elastina e fibroína da seda) e os polissacarídeos (como quitosana, alginato, goma xantana, ácido hialurônico e pectina) (PIRES et al., 2015). Apesar dos biopolímeros serem muito utilizados, eles apresentam algumas restrições físicas. Devido às essas restrições, a busca por um material que atenda a questão físico-química tem levado a formação de outros materiais os quais podem ser modificados com adição de outros compostos, formando blendas, que são misturas de dois ou mais compostos, sem mudanças químicas em suas composições, com a intenção de melhorar as propriedades como processabilidade, resistência mecânicas e térmicas, a permeabilidade a gases (BRITO et al., 2011). Devido a essa capacidade de mudança das características físico-químicas, mecânicas e biológicas, resultados melhores têm sido obtidos quando se comparado com os polímeros isolados (TONHI; PLEPIS, 2002; SIONKOWSKA, 2011).

O que vem se observando é que as misturas poliméricas melhoram as propriedades que possam dificultar a aplicação de um biomaterial, o que os levam a fazer combinações com outros tipos de biomateriais como exemplos: os metais, outros polímeros, substâncias químicas e cerâmicas (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

2.5.1 Quitosana

A quitosana é um biopolímero derivado da quitina, substancia essa encontrada nas carapaças dos crustáceos e nos exoesqueletos dos insetos e nas paredes celulares dos fungos. Para extrair a quitosana da quitina o processo se dá por tratamento com bases fortes ou por métodos microbiológicos onde a quitina na sua estrutura 2-acetamido-2-desoxi-D-

glicopirranose unidas por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) após tratamento produz uma estrutura β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose, conhecida como quitosana (DIAS et al., 2008).

A quitosana apresenta uma estrutura química única formando um polímero linear, com elevada densidade de carga e de grupos reativos assim como inúmeras ligações de hidrogênio, o que permite uma excelente biocompatibilidade e que seja facilmente processado. O termo “quitosana” refere-se a um grupo heterogêneo de polímeros que combinam com uma vasta gama de características físico-químicas e biológicas, e que permitem uma vasta gama de aplicações tão fascinantes. A constatação deste potencial e do valor industrial deste biopolímero conduziu à sua utilização em muitas aplicações de interesse tecnológico e, de uma forma acentuada, na área biomédica (TAVARIA et al., 2013).

Por ser um polissacarídeo linear derivado do processo de desacetilação da quitina, encontrada no exoesqueleto de crustáceos e na parede celular de fungos. Na área biomédica, a quitosana vem sendo amplamente estudada por suas interações específicas com componentes da matriz extracelular, o que tem levado ao aumento de sua utilização na área de engenharia tecidual, como no reparo da pele, osso e cartilagens (PIRES et al., 2015).

Um ponto importante a ser destacado é que a quitosana, pode ser caracterizada pelo seu peso molecular (PM) e grau de acetilação (GA). A quitosana disponível comercialmente tem grau de desacetilação $>85\%$ ($GA < 15\%$), e peso molecular compreendido entre 100-1000 kDa. É geralmente aceito que a quitosana de baixo peso tem $PM < 50$ kDa, a de médio peso molecular 50-150 kDa e a de alto peso molecular >150 kDa. A quitosana é uma base fraca insolúvel em água, mas solúvel em soluções ácidas diluídas abaixo do seu $pK_a = 6,3$ (GOY; BRITTO; ASSIS, 2009). No processo da engenharia tecidual a quitosana tem sido muito utilizada nos últimos anos devido as suas propriedades atóxicas, biodegradável, biocompatíveis, possui atividade antifúngica e além disso, a quitosana é antimicrobiana devido aos grupos amino carregados positivamente, que podem interagir com a membrana microbiana carregada negativamente (CROISIER; JÉRÔME, 2013; JABUR, 2018; KOVACH et al., 2015).

2.5.2 Alginato

O alginato é um polissacarídeo muito utilizado como biomaterial por apresentar uma alta massa molar e tem como principal fonte a parede celular de diversas espécies de algas marinhas marrons. Este biopolímero pode ser também sintetizado por algumas bactérias, como as espécies *Pseudomonas* e *Azotobacter*, originando um material de alta pureza e

biocompatibilidade, com características e estrutura polimérica padronizáveis, de grande interesse em aplicações na área biomédica. O alginato possui uma estrutura que consiste de resíduos do ácido α -L-gulurônico e ácido β -D-manurônico associados por ligações glicosídicas do tipo β (1 $\rightarrow$ 4) e distribuídos em diferentes proporções e combinações ao longo da cadeia. Devido à sua biocompatibilidade e à possibilidade de ajuste das propriedades por reticulação com íons divalentes como o cálcio, o alginato tem aplicações na forma de hidrogéis, membranas e micropartículas. Este polímero tem sido empregado em sistemas de liberação de fármacos e proteínas, na cicatrização de feridas, como matriz para cultivo celular e na engenharia tecidual visando à regeneração de ossos e vasos sanguíneos (PIRES et al., 2015).

2.6 PASTA DE FOSFATO DE CÁLCIO

Muitos materiais têm sido propostos para o uso em cirurgia ortopédica, quer na reparação de defeitos ósseos, quer em cirurgias feitas em articulações após a ocorrência de artroses em estado mais avançado, ou na coluna vertebral quando a pessoa sofre de osteoporose, ou defeitos ósseos causados por patologias como tumores ósseos ou osteomielite. Em todos os casos, o comportamento do material em contato direto com o osso é uma questão muito delicada, pois isso pode condicionar o sucesso de uma cirurgia (MANSOS, 2008).

Até final do século XX os materiais mais utilizados em cirurgias para substituição de articulações, consistiam em próteses feitas de titânio, ou liga de titânio fixa ao osso por cimento acrílico. Para além deste tipo de cirurgias que se efetuam desde 1940, este cimento também é utilizado como apoio interno da coluna vertebral e preenchimento e reconstrução de cavidades ósseas (CHANRLEY, 1970).

Apesar do polimetilmetacrilato (PMMA) ser o cimento para enxerto mais popularizado, por apresentar boa injetabilidade e desempenho de cimento, este apresenta algumas complicações. Sua reação de polimerização pode causar necrose do tecido ósseo ao redor da região do implante, devido à reação fortemente exotérmica e ausência de degradação. Ainda, depois de implantado não induz qualquer tipo de remodelação óssea, pois não é um material bioativo (KRETLOW et al., 2009; OLIVEIRA; MOTISUKE, 2019; SANTIN et al., 2004; TEMENOFF; MIKOS, 2000).

A ideia mais promissora é a substituição do cimento acrílico por um material composto essencialmente por fosfatos de cálcio, tais como a hidroxiapatita (HA) e o β -TCP

que são cerâmicas biocompatíveis, bioativos e osteocondutores. Propriedades essas muito importante que os caracterizam como biomateriais por excelência para implantação óssea (GRUNINGER et al., 1984; MANSOS, 2008).

Os fosfatos de cálcio (CaP) são os componentes inorgânicos mais importantes dos tecidos biológicos duros (KOVACH et al., 2015).

Em cima desse contexto, está acontecendo um avanço na pesquisa por biomateriais bioativos, devido à sua menor probabilidade de causar reações negativas por parte do tecido vivo, os fosfato de cálcio estão ganhando destaques por ter uma excelente osteocondutividade (ALVES et al., 2006; LIU et al., 2006).

Os compostos de fosfato de cálcio (CaP) começaram a ser investigados como materiais de reparo ósseo a partir de 1920. No entanto, eles viram pouco uso em aplicações clínicas até a década de 1970, quando os materiais CaP foram utilizados como substitutos ósseos na forma de blocos porosos e grânulos. A utilização clínica dos materiais CaP aumentou no início dos anos 80 com o desenvolvimento das pastas e cimento de fosfato de cálcio (CPC) (ALBEE, 1920; BROWN; CHOW, 1983; CAMERON; MACNAB; PILLIAR, 1977; O'NEILL et al., 2017; ROY; LINNEHAN, 1974).

Os cimentos de fosfatos de cálcio foram descobertos nos anos 80 pelos pesquisadores Brown e Chow, (1985). São biomateriais formados pela mistura de um pó contendo um ou mais compostos de fosfato de cálcio com água ou com solução aquosa de sais orgânicos ou inorgânicos formando uma pasta viscosa e moldável que reage à temperatura ambiente ou corpórea, endurecendo como resultado da reação de precipitação, esse processo pode acontecer em minutos ou horas (ALVES; BERGMANN; SANTOS, 2006; LEAL, 2006; LIU et al., 2006).

Os biocimentos a base de fosfato de cálcio já vem sendo desenvolvidos há mais ou menos 10 anos na França como também no Japão e nos Estados Unidos da América, suas principais características é a biocompatibilidade e a bioabsorção (ALMEIDA, 2018).

Os cimentos de fosfatos de cálcio são transitórios e mudam constantemente sua estrutura durante o processo da cura. Combinado com isso, está a complicação de que o processo de injeção pode destruir a estrutura em evolução e, assim, afetar as medições. Consequentemente, os resultados obtidos são difíceis de interpretar. Por outro lado, a vantagem da suspensão β -TCP é que nos permite remover o complexo processo de cura e focar nas propriedades importantes para a injetabilidade. Isto é especialmente verdade, pois a pasta de fosfato de cálcio ideal não deve reagir durante o período de injeção (HABIB et al., 2008).

Os cimentos de fosfatos de cálcio são biomateriais formados pela mistura de um pó contendo um ou mais compostos de fosfato de cálcio com água ou com solução aquosa de sais orgânicos ou inorgânicos formando uma pasta viscosa e moldável que reage à temperatura ambiente ou corpórea, endurecendo como resultado da reação de precipitação, esse processo pode acontecer em minutos ou horas (ALVES; BERGMANN; SANTOS, 2006; LEAL, 2006; LIU et al., 2006).

Nos cimentos de fosfatos de cálcio o processo de precipitação acontece à baixa temperatura, já nos cimentos de PMMA a precipitação acontece à alta temperatura o que se torna uma grande desvantagem, uma vez que alta temperatura no processo de precipitação pode provocar morte celular do tecido hospedeiro, nesse caso morte do tecido ósseo (MANSOS, 2008).

Segundo Vogel (1981) a precipitação é a formação de um sólido a partir de uma reação química. Isso se dá quando à mistura de dois ou mais materiais, formando outro material em estado sólido. A partir do momento que não ocorre precipitação dos materiais, apenas o endurecimento dos mesmos, pode-se considerar esse material como pasta e não cimento, pois o que caracteriza o cimento é a precipitação dos materiais.

Desde a descoberta do cimento fosfato de cálcio (CPC) por Brown e Chow em 1983, ele obteve sucesso clínico em muitas aplicações odontológicas e ortopédicas. Isto é devido ao potencial baseados em CPC por imitarem a natureza mineral do osso e consequentemente ser reabsorvido e substituído por tecido hospedeiro. Além disso, tem a capacidade de ser moldado em defeitos ósseos e locais de implantes, depois endurecer in situ para proporcionar estabilidade (O'NEILL et al., 2016). Em virtude disso, estudos sobre pastas de fosfato de cálcio passam a ser pesquisadas como meio de preenchimento ósseo.

Segundo Borhan et al. (2016) As pastas bioativas injetáveis podem ser divididas em duas categorias diferentes: do tipo cimento e do tipo de não cimentícias. Através dessa categoria dá para se entender o comportamento distinto dessas pastas. Em pastas do tipo cimento, existe uma reação química entre os ingredientes da pasta que resulta na formação de nova fase e rede, ou seja, acontece um processo de precipitação, além de um aumento na viscosidade da pasta. Portanto, depois de um certo tempo, a pasta endurece e fica dura em um período curto de tempo (2 a 8 minutos). No entanto, em pastas não cimentícias, não há reação química (não ocorre precipitação) entre os componentes da pasta e nenhuma fase é formada. Para essas pastas, a viscosidade pode ser modificada pela interação física dos seus componentes, bem como pelo processo de secagem em um período mais longo (até 24h), comparada com a pasta cimentícias. Cimentos de fosfatos de cálcio (CPCs) são reativos em

solução aquosa de sais de fosfato mais conhecidos como materiais bioativos cimentícios. Por outro lado, as pastas feitas de fosfatos de cálcio não são reativas, como HA e β -TCP em soluções poliméricas (por exemplo, polissacarídeos), elas podem ser tratadas como pastas não cimentícias, que são adequadas, fixação óssea e preenchimentos de lacunas de próteses ósseas.

Segundo Ito (1991), diversos trabalhos surgem nessa época, onde a hidroxiapatita em formato de pó passa a ser aplicada como substituto ósseo em tratamento dentário, devido a sua similaridade com o osso e por ser uma biocerâmica osteocondutora, porém o fato desse material estar na forma de pó ele migrava da região onde era implantado e se perdia, dessa forma vários estudos foram iniciados para melhorar os métodos para a implantação desse material, as primeiras propostas foram a utilização de tubos de colágeno reabsorvível para impedir a migração de partículas de hidroxiapatita, outra solução encontrada para o problema de entrega de HA foi o desenvolvimento de uma pasta de hidroxiapatita com quitosana o que poderia facilmente ser injetada no local do implante.

Segundo Kawakami et al. (1992), em seu estudo sobre a ação osteocondutora da pasta de hidroxiapatita com quitosana em experimento que envolviam 37 ratos fêmeas adultas da espécie japonesa, pode ser analisado que não houve sinal de necrose ou degeneração provocada pela pasta. A pasta incorporada diminuiu gradualmente em massa ao longo do tempo e um novo tecido foi formado sobre a pasta, isto foi considerado do histopatologicamente como a formação de tecido ósseo, outro fator que ganhou destaque foi a crescente formação de capilares na região que se estenderam após 20 semanas. O fato da pasta ter em sua formulação da quitosana que apresenta propriedades hemostáticas e cicatrizantes, pode ter auxiliado na formação óssea. Na presente investigação, não houve sinal de necrose ou degeneração. Esses dados, segundo os autores, sugerem que a pasta tem propriedades osteocondutiva e, portanto, podem ser clinicamente úteis como um substituto ósseo bioativo.

Segundo Murugan et al. (2004), foram realizadas várias tentativas de utilização do pó de hidroxiapatita com soro fisiológico e até mesmo com sangue do próprio paciente, porém nestes casos houve migração desse pó após cirurgia para os tecidos circundantes, para aliviar estes grandes problemas clínicos, compostos ósseos de biocerâmicas estão utilizando polímeros de colágeno, gelatina, quitosana e alginato para o desenvolvimento da pasta de fosfato de cálcio. Em seu trabalho Murugan et al. (2004) adotaram a quitosana com HA, por apresentar características viscoelásticas, o material não migrou da região da implantação, além de observar que a suavidade desse compósito, não foi capaz de danificar os tecidos moles que a pasta teve contato.

Segundo Habib et al. (2008), a principal diferença entre cimento de CaP e a pasta é o processo de cura. Os cimentos CaP são transitórios e mudam o comportamento constantemente devido a precipitação. Já nas pastas, o processo de endurecimento acontece de forma muito mais lenta o que acaba sendo uma vantagem, pois com isso se tem um tempo maior de manuseio, sem que haja transformação do material. Além disso, os resultados obtidos são mais reprodutíveis.

A pasta de hidroxiapatita (HA) com quitosana (QS) pode ser utilizada como suporte biocerâmico aplicável na osteointegração. Este compósito pode levar a uma biodegradabilidade controlada, onde a quitosana, mesmo sendo um polímero insolúvel em água e em ambiente fisiológico, junto com a hidroxiapatita que possui um alto teor de agentes modificadores de reticulado (cálcio e fósforo), podem ser usados na osteointegração do tecido ósseo (FINISIE, 2001; JONATHAN et al., 1999; PEREIRA et al., 1999).

Dentre as propriedades da pasta podemos citar a importância da reologia que incluem a capacidade de injetabilidade, coesão e viscosidade, entretanto nos últimos anos a capacidade de compreensão sobre a influência do tamanho das partículas dos pós na injetabilidade melhorou, o que pode acarretar uma separação de fases, durante a pressão da seringa, devido à mistura ser bifásica líquido-sólido, pois o líquido tem a tendência a fluir mais rápido, resultando em alterações da composição da pasta, porém esse efeito é corrigido quando diminui o tamanho das partículas do pó deixando a pasta mais coesa, e sem alteração na sua composição (VERNON, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é obter e caracterizar pastas de fosfatos de cálcio com biopolímeros em condições fisiológicas aplicáveis na regeneração óssea.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter pó de hidroxiapatita por precipitação química;
- Obter pó de beta fosfato tricálcico por reação no estado sólido;
- Obter soluções de quitosana e de alginato na forma de gel para serem utilizados na formação da pasta;
- Obter pastas de hidroxiapatita com quitosana e hidroxiapatita com alginato de sódio na forma injetável;
- Obter pastas de beta fosfato tricálcico com quitosana e beta fosfato tricálcico com alginato na forma injetável;
- Avaliar in vitro, utilizando meio celular o comportamento de biocompatibilidade das pastas obtidas;
- Avaliar a aplicabilidade das pastas mediante caracterizações das propriedades físico-químicas dos materiais de partida e das pastas obtidas;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A figura 5 apresenta o fluxograma da metodologia adotada, vale salientar que serão apresentados alguns resultados preliminares e que nos itens abaixo estarão identificados.

Figura 5 - Fluxograma da metodologia adotada

Fonte: autoria própria.

4.1 OBTENÇÃO DOS PÓS DE PARTIDA

4.1.1 Obtenção da Hidroxiapatita

A HA foi obtida por precipitação química mediante a reação entre H_3PO_4 e $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Foi preparada uma suspensão de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ na concentração de 0,5M, e gotejada uma solução de H_3PO_4 na concentração de 0,5M sob agitação constante a temperatura ambiente. Após o gotejamento, a suspensão foi mantida sob agitação constante por 6h. Em seguida o material

foi filtrado e seco em estufa a 100°C por 24h. O sólido formado foi desaglomerado em almofariz de ágata e calcinado a 800°C/3h.

4.1.2 Obtenção do β -TCP

O β -TCP foi obtido por reação estequiométrica com os pós de CaHPO_4 e $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, ambos livres de umidade e colocados em um moinho de bolas de alumina por 1 hora. Em seguida a mistura foi calcinada à temperatura de 1150°C por 8 h. Depois de resfriada essa amostra foi triturada e passada em uma peneira malha 80ABNT e finalmente homogeneizada em moinho de bolas por 1h.

4.2 OBTENÇÃO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS

4.2.1 Obtenção da solução de quitosana (QS)

Preparou-se uma solução de quitosana 2% (m/v) de peso molecular médio em ácido acético 1% (v/v), utilizando um agitador mecânico, até a completa solubilização da quitosana. Neste trabalho utilizou-se a quitosana Sigma-Aldrich®, de peso molecular médio, Lote: MKBF1336V.

4.2.2 Obtenção da solução de alginato de sódio

Preparou-se uma solução de alginato de sódio 2% (m/v) em água destilada, utilizando um agitador mecânico, até a completa solubilização. Neste trabalho utilizou-se o alginato de sódio Dinâmica®, Lote: 85393.

4.3 OBTENÇÃO DAS PASTAS

Os pós de HA e β -TCP foram usados nesse trabalho como fases sólidas e QS e Alg foram usados como fases líquidas, as pastas obtidas foram chamadas de HA+QS, HA+Alg, β -TCP+QS, β -TCP+Alg.

Para analisar as diferentes formulações de pastas, foram desenhados quatro sistemas: HA+QS, HA+Alg, β -TCP+QS, β -TCP+Alg. Cada amostra foi devidamente pesada (os componentes sólidos) e posteriormente misturada com a fase líquida. À relação líquido-pó

L/P utilizada foi escolhida em função da trabalhabilidade das pastas, afim de que a mesmas pudessem ser injetável e logo após foram colocados em um molde de silicone com as dimensões adequadas para os ensaios de compressão e estocadas em temperatura ambiente, após 24h os corpinhos depois de secos foram retirados do molde.

Para as amostras das pastas também foram analisadas a possibilidade de diferentes razões L/P, em busca de uma melhor trabalhabilidade, obtendo as razões descritas na tabela 6.

Tabela 6 - Formulações das pastas

Pasta	Solução (Pó)	Solução (Líquida)	Relação L/P (mL/g)
HA+QS	Hidroxiapatita	Quitosana	0,75
HA+Alg	Hidroxiapatita	Alginato	0,75
β -TCP+QS	β -fosfato tricálcico	Quitosana	0,67
β -TCP+Alg	β -fosfato tricálcico	Alginato	0,67

Fonte: autoria própria.

4.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

4.4.1 Caracterização dos pós

Os pós de hidroxiapatita e β - fosfato tricálcico foram caracterizados por meio de técnicas como análise da superfície e distribuição de partículas, difração de raios X (DRX) a fim de poder identificar as fases cristalinas, através da Espectroscopia no infravermelho analisou-se a distribuição dos grupamentos iônicos e pela microscopia eletrônica por varredura (MEV) foi analisado o processo morfológico do pó.

4.4.2 Caracterização das soluções

As soluções de quitosana e alginato foram preparadas em formatos de membranas e analisadas em faixa de frequência de 4.500 a 500 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} e um total de 32 acumulações (Espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier Spectrun One, Perkin Elmer, USA). Os dados foram coletados em *software* Spectrun One (versão 5.3) e plotados utilizando *software* OriginPro8. Os ensaios foram realizados no laboratório de Tecnologia de Alimentos da FZEA – USP, campus Pirassununga.

4.4.3 Caracterização das pastas de fosfatos de cálcio

Neste trabalho adotaram-se técnicas que são muito utilizadas para a caracterização dos fosfatos de cálcio, como: difração de raios X, que nos permite identificar as fases cristalinas presente no material; a Espectroscopia no Infra Vermelho, o qual avalia os grupos funcionais presentes no material; a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), que permite a análise da morfologia e determinação das partículas; a Medidas de pH, ao qual pode ser o analisado o tipo de resposta que essa pasta pode gerar ao organismo se tratando de uma acidose ou uma alcalose ou estabilidade química; a Injetabilidade, técnica ao qual utilizamos para sua aplicabilidade no organismo; o Tempo de Pega inicial e final, onde é possível observar o tempo de endurecimento da pasta e Propriedades Mecânicas, onde avaliamos a resistência do material.

4.4.4 Área de superfície e distribuição de partículas

A área da superfície dos pós hidroxiapatita e beta fosfato tricálcico foram determinados através da técnica de adsorção de nitrogênio utilizando o método BET em um analisador NOVA 1000. Enquanto que análise dos tamanhos de partículas foi determinada por difração de laser em um analisador de partículas CILAS 1180. A área de detecção deste equipamento situa-se entre 0,04 a 2500 μm , foi usado álcool isopropílico como dispersante e então o pó foi submetido a uma agitação por ultrassom durante 180 segundos para desaglomeração.

4.4.5 Difração de raios X

A técnica de difratometria nos permite identificar através da difração de raios X as fases cristalinas de uma amostra, isso se dá por meios de interferências causadas pelo espalhamento de radiações eletromagnéticas com pequeno comprimento de onda, feixes esses chamados de raios X que são monocromáticos e interage com os elétrons da rede cristalina da amostra, provocando as várias difrações, aos quais os feixes são analisados e caracterizados pelos seus comprimentos. Na figura 6 podemos observar os feixes incidentes representados pelos raios 1 e 2 e os feixes que são difratados representados pelos raios 1' e 2'.

Figura 6 - Difração de raios X

Fonte: Instituto de Física - UNICAMP (2018).

Assim, podemos descrever que:

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad \text{Equação (2)}$$

A Equação (2) é definida como Lei de Bragg, ao qual permite relacionar as distâncias dos planos cristalinos e o comprimento de onda do feixe incidente com o ângulo formado com o feixe difratado. Onde n é um número natural e λ é o comprimento de onda da radiação incidente, d é a distância entre os planos atômicos e θ é o ângulo de incidência em relação ao plano considerado (CALLISTER, 2008).

Os pós e as pastas foram analisados em um difratômetro Miniflex 600 da Rigaku com ângulos (2θ) de 10° a 60° e velocidade de varredura de $1^\circ/\text{min}$ localizado no Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais (MultMat/ZEB) da Universidade de São Paulo campus Pirassununga.

4.4.6 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização dos materiais utilizando a técnica de FTIR é utilizada para se detectar os grupos funcionais e a composição de uma amostra. O método é baseado na análise da frequência de vibrações específicas das ligações químicas correspondentes aos diversos níveis de energia que cada molécula apresenta. A molécula absorve a radiação infravermelha incidente convertendo em energia de vibração molecular gerando as bandas de vibrações. A detecção dessas bandas é necessária que ocorra variação no momento dipolar da molécula gerando espectros de absorção em decorrência da intensidade da luz transmitida ou absorvida

em função do comprimento de onda ou número de onda (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1994).

Neste trabalho foi utilizado FTIR com transmissão direta utilizando pastilha de KBr com os pós de partida e os pós das pastas. Os pós foram misturados com KBr na proporção de 0,5% (m/m), utilizando almofariz de ágata, na sequência a mistura foi prensada uniaxialmente (4,5 ton./5min.) para obtenção das pastilhas. Os materiais foram analisados em faixa de frequência de 4.500 a 500 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} e um total de 32 acumulações (Espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier Spectrun One, Perkin Elmer, USA). Os dados foram coletados em *software* Spectrun One (versão 5.3) e plotados utilizando *software* OriginPro8. Os resultados foram analisados por comparação com dados disponíveis na literatura.

Os ensaios serão realizados no laboratório de Tecnologia de Alimentos da FZEA – USP, campus Pirassununga.

4.4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para observação e análise de características micro estruturais que permitem visualizar a superfície do material através de feixes de elétrons. O princípio da técnica consiste na geração de feixes de elétrons obtidos de um filamento de tungstênio com aplicação de uma corrente elétrica dentro de uma coluna de alto vácuo. Os elétrons são acelerados por uma diferença de potencial e colimados por um conjunto de lentes eletromagnéticas que atuam como condensadores para diminuir o diâmetro do feixe. Dessa forma, o feixe passa por uma lente objetiva e realiza a varredura da amostra (MANNHEIMER, 2002). Materiais não condutores necessitam de uma fina camada de um material como carbono ou ouro, são obtidas imagens com formatos tridimensionais de superfícies polida ou não, com profundidade, alta resolução, visualizada pela diferença de tons de cinza (FONSECA, 2007; GOBBO, 2009). A técnica permite a utilização de um detector para emissão de raios X, denominado de espectrômetro de energia dispersiva (EDS), que fornece a composição química elementar de um ponto ou região da superfície da amostra (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006).

As amostras foram caracterizadas através do microscópio eletrônico marca HITACHI, modelo TM 3000, com o equipamento operando a uma tensão de aceleração de 15 KV e com magnitude de x100, x500, x1,0 k e x2,0k. Os ensaios foram realizados no laboratório de

Tecnologia de Alimentos do Departamento de Zootecnia e Engenharia de alimentos da USP em Pirassununga-SP.

4.5 MEDIDAS DE pH

Para análise do pH das pastas as mesmas após misturada, foram colocadas em um molde de silicone e após 24h, depois de secos em temperatura ambiente, os corpinhos foram retirados do molde e colocados em uma solução tampão fosfato (PBS), concentração salina similar à do corpo humano, nesta solução foram utilizados os seguintes reagentes NaCl, KCl, Na₂HPO₄ e KH₂PO₄, o pH da solução tampão foi ajustado com HCl, para apresentar um pH final de 7,4.

Por 14 dias foram analisadas a evolução do pH através de um pHmetro de bancada da marca Tecnal®, à temperatura ambiente (26°C ± 1°C). A pasta foi analisada no laboratório de Biomateriais e Biosensores da Universidade de São Paulo em Pirassununga.

4.6 INJETABILIDADE

Para análise da injetabilidade foi utilizado um texturômetro (Texture Analyser TA-TXplus). O processamento dos dados foi realizado através do software Texture Expert Exceed 2.64. A pasta foi colocada em seringas descartáveis da marca BD Luer Lock de 10 mL e para cada tipo de pasta o ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos como média e desvio padrão. As condições de ensaio foram as seguintes: a força (N) necessária para a injetabilidade da pasta foi determinada em 45N e uma taxa de velocidade de 10 mm/min. A injetabilidade se deu em um período aproximado de 5 seg. método adaptado segundo Cunha (2009).

Para cálculo da taxa de injetabilidade foi utilizado o método adaptado por Chen e Taguchi (2019). Neste método foi utilizada a pesagem como parâmetro para coleta dos dados. Foi utilizada uma quantidade de aproximadamente 5mL de pasta em cada seringa, cada ensaio foi iniciado depois de decorridos 1 min e 30 s da adição da pasta, e para cada amostra utilizou-se uma nova seringa. e para cada injeção foi realizada a pesagem (M_0) da seringa vazia, da seringa preenchida (M_1) e da seringa após a injeção (M_2) e calculada a injetabilidade através da Equação (3).

$$Injetabilidade (\%) = \left(\frac{(M_1 - M_0) - (M_2 - M_0)}{(M_1 - M_0)} \right) \quad \text{Equação (3)}$$

Para análise qualitativa da injetabilidade foi observado o comportamento da pasta durante o processo da injetabilidade através da pressão do polegar sobre a seringa descartável da marca BD Luer Lock de 5 mL, sem agulha. Neste processo foi observado se a pasta foi injetada completamente e se durante a injetabilidade ocorreu segregação do material, simulando aplicabilidade do material.

Para determinar a razão (L/P) da pasta foi analisada a consistência da massa se a mesma se manteve fluida, homogênea com brilho, seus elementos coesos após mistura, conforme ASTM C472, e se a mesma após ser inserida na seringa apresentava boa injetabilidade, isto é, a pasta é injetada pela seringa sem que ocorra separação de fase líquido/pó (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - ASTM, 2014).

Em relação aos pós utilizados todos foram passados em malha 80 ABNT, e os líquidos em formato de gel, as formulações foram testadas e otimizadas, a carga de sólidos na solução transportadora (L/P) foi quantificada em gramas por mililitro (mL/g). A estabilidade das pastas também foi avaliada imergindo-as em solução PBS por 24 horas.

O ensaio foi realizado no laboratório Multiusuário do FZEA, na Universidade de São Paulo, campus Pirassununga.

4.7 TEMPO DE PEGA INICIAL E FINAL

A análise do tempo de pega inicial e final desta pasta foi determinada através de medidas de tempo, utilizando como ferramenta as agulhas de Gillmore, de acordo com as normas ASTM C266 – 04 (ASTM, 2004).

A pasta foi preparada em temperatura ambiente, por se tratar de uma pasta e não de um cimento onde ocorre apenas uma mistura física. O tempo foi contado a partir do momento em que a mistura dos elementos da pasta apresentavam características homogênea sendo que para o tempo inicial utiliza-se uma agulha de massa de $113,4 \pm 0,5$ g e um diâmetro da ponta de $2,12 \pm 0,05$ mm, o tempo inicial é atingido quando a agulha para de marcar na pasta, então se passa a utilizar uma agulha com massa de $453,6 \pm 0,5$ g e um diâmetro da ponta de $1,06 \pm 0,05$ mm, sendo o tempo final determinado após o fim das marcações na pasta. A análise do tempo de pega foi realizada no Instituto de Ciências e Tecnologia, no laboratório de Biocerâmicas da UNIFESP, campus São José dos Campos.

4.8 RESISTÊNCIA MECÂNICA À COMPRESSÃO

Os testes de resistência mecânica foram realizados em pastilhas cilíndricas secas de acordo com a norma ABNT NBR ISO 5833 (ABNT, 2004), em seu Anexo E, onde determina que a resistência mecânica à compressão é analisada através da aplicação de uma força axial sobre cilindros de cimento com 6 mm de diâmetro e 12 mm de altura. Para cada formulação da pasta foram preparados 5 corpos de prova, para coleta dos dados foi utilizado um texturômetro (Texture Analyser TA-TXplus), com velocidade de 2 mm/min, de acordo com trabalho de Sionkowska e Kozłowska (2013), a carga foi quantificada à medida que o corpo de prova se rompia. Estes dados foram obtidos através do gráfico de tensão (MPa) x deformação (%).

Os testes foram realizados no Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais (MultMat/ZEB) da Universidade de São Paulo, campus Pirassununga.

4.9 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS PASTAS

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* de acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993-5 (ISO, 2009), é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de um material a fim de observar o comportamento desse material em tecido vivo e sua aplicabilidade em dispositivos biomédicos. A metodologia desse ensaio consiste em colocar o material direta ou indiretamente em contato com as células e analisar as possíveis alterações celulares, se o material for citotóxico ele irá gerar danos ou morte celular e através da incorporação de um corante vermelho neutro é possível observar quais células estão vivas ou mortas, pois ele que é capaz de atravessar a membrana celular e se fixar na matriz lisossomal (aniônica), através de ligações eletrostáticas. Observa-se que quando a célula é danificada, há uma diminuição na captura desse corante e como consequência, diminuição de ligação do vermelho neutro, sendo possível diferenciar células vivas ou danificadas/mortas, pela intensidade da cor da cultura celular (ROGERO et al., 2003; SCATOLINI, 2017).

Segundo Rogero et al. (2003) o ensaio de citotoxicidade com culturas celulares é bem eficaz para avaliarmos a biocompatibilidade do biomaterial, pois os testes com culturas celulares são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução do estudo de biocompatibilidade *in vitro*.

Todos os materiais utilizados no ensaio foram esterilizados por via úmida, utilizando autoclave à temperatura de 120°C e pressão de 1 Kgf/cm², durante 20 minutos. O meio de cultura suplementado (MCS) foi esterilizado utilizando membrana estéril de porosidade de 0,22 µm e as amostras (HA, HA+QS, HA+Alg, β-TCP, β-TCP+QS e β-TCP+Alg.) e controle negativo (alumina) foram esterilizadas sob radiação UV por 1 hora.

4.9.1 Cultura de células

O ensaio foi realizado, utilizando linhagem celular CHO-k1, células de ovário de Hamster chinês, conforme metodologia descrita por Zhang et al. (2011). As células foram cultivadas em placa de 150 mm de diâmetro, utilizando meio de cultura RPMI medium 1640 (GIBCO), suplementado com penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), anfotericina B (0,025 µg/mL), glutamina (2 mM) e soro fetal bovino (10%), a 37°C em atmosfera de CO₂ (5%), por 72 horas (Estufa incubadora CCL-170B-8, ESCO, USA). Para garantir um crescimento celular satisfatório, foram realizadas trocas do MCS no período de 48 hs. Após 72 horas, o meio suplementado foi retirado e as células removidas utilizando solução de tripsina (Tryple Express com vermelho de fenol Gibco 12605).

O processo de contagem das células foi realizado em câmara de Neubauer na qual foi utilizada uma diluição de corante azul de trypan 0,4% (1:5) (Microscópio óptico 8060A, BEL, Itália). Este método é baseado na observação de células viáveis, impermeáveis a esse tipo de corante, enquanto que as células não viáveis permitem a penetração do corante devido à formação de poros na membrana, exibindo a coloração azul (KONOPKA et al., 1996; SCATOLINI, 2017).

4.9.2 Viabilidade celular - método de incorporação do vermelho neutro (VN)

Os materiais foram preparados conforme norma ISO 10993-12 (ISO,2004). As amostras (HA, HA+QS, HA+Alg, β-TCP, β-TCP+QS e β-TCP+Alg.) e alumina foram adicionadas em microtubos e misturadas ao MCS na proporção 2% (m/v). Em seguida, os tratamentos foram incubados a 37°C em atmosfera de CO₂ (5%), por 24 horas (Estufa incubadora CCL-170B-8, ESCO, USA). Após esse período, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos (Microcentrifuga CT 14000, Cientec, Brasil) e o sobrenadante reservado para o ensaio. Foram utilizados três controles: 1) Alumina (controle negativo); 2) solução de fenol 0,2% (controle positivo); 3) MCS (branco).

Após as 24 horas, tanto as amostras como os controles foram submetidos a diluições seriadas, obtendo-se as concentrações 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%.

O ensaio de citotoxicidade utilizado neste trabalho foi realizado através do método indireto de incorporação do corante vermelho neutro, conforme norma ISO 10993-5 (ISO, 2009). As células (1×10^4 células/poço) foram cultivadas em MCS (200 μ L) e incubadas a 37°C em atmosfera de CO₂ (5%) (Estufa incubadora CCL-170B-8, ESCO, USA), por 24 horas, utilizando placa de 96 poços. Após esse período, o MCS foi retirado e os tratamentos (amostras e controles) e suas respectivas diluições (200 μ L) foram adicionados na placa contendo as células. A placa contendo os tratamentos foi novamente incubada a 37°C em atmosfera de CO₂ (5%) por 24 horas (Estufa incubadora CCL-170B-8, ESCO, USA). Após o tratamento, foi observada a morfologia celular (Microscópio óptico invertido PRIMO, CARL ZEISS, Alemanha) e o meio contendo os tratamentos foi retirado dos poços. Em seguida, as células foram lavadas com PBS (200 μ L). Após a retirada do PBS, adicionou-se 200 μ L da solução de vermelho neutro (50 μ g/mL) e a placa foi incubada a 37°C em atmosfera de CO₂ (5%) por 3 horas (Estufa incubadora CCL-170B-8, ESCO, USA), para incorporação do VN. Em seguida, a solução de VN foi retirada e os poços lavados com 200 μ L de PBS. Após a retirada do PBS, foram adicionados 200 μ L de solução de extração (50% Etanol: 1% Ácido acético: 49% Água destilada) e a placa submetida à agitação de 100 rpm por 10 minutos (Shaker TE-420, Tecnal, Brasil), para extração do VN das células. As leituras das absorbâncias foram realizadas em leitor de microplacas a 540 nm (Multiskan FC, Thermo Scientific, USA). Os resultados foram expressos em viabilidade celular (%VC), calculada conforme Equação (4).

$$\%VC = (Abs \text{ amostra} / Abs \text{ branco}) \times 100 \quad \textbf{Equação (4)}$$

Onde *Abs amostra* é a absorbância da amostra a 540 nm e *Abs branco* é a absorbância do branco a 540 nm. O ensaio foi realizado em triplicata para cada amostra.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Biomateriais e Biossensores da Universidade de São Paulo, campus Pirassununga.

4.9.3 Análise estatística do ensaio de citotoxicidade

Para os dados referentes à HA e β -TCP foram feitos testes para verificar se as pressuposições para a realização de uma Análise de Variância (ANOVA) para comparação

entre os tratamentos em cada grupo eram válidas. Depois de satisfeitas as pressuposições foram realizadas duas ANOVAs, cada uma considerando um delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos; no primeiro caso os tratamentos foram HA, HA+Alg e HA+QS e no segundo caso, os tratamentos foram β -TCP, β -TCP+Alg e β -TCP+QS, com 15 repetições para cada um deles. Para comparações múltiplas entre os tratamentos os testes foram feitos pelo teste de Tukey, adotando um nível de significância de 5%. Para as análises foi utilizado o programa R, versão 3.6.1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

5.1.1 Distribuição de tamanho de partículas dos pós de partida

A figura 7 apresenta os resultados do ensaio de granulometria por difração de laser para o pó de β -TCP. Nela é possível observar que é uma distribuição unimodal, onde o eixo x apresenta o valores em diâmetros do tamanho da partícula (μm), no eixo y (primário) a porcentagem em volume da quantidade de partícula, no eixo y (secundário), está a distribuição de volume acumulado total em porcentagem, tem-se que 10% das partículas possuem diâmetro de até 4,9 μm , 50% das partículas possuem diâmetro de até 6,5 μm e 90% das partículas possuem diâmetro de até 9,6 μm , as partículas possuem um diâmetro médio de 6,9 μm .

Figura 7 - Distribuição granulométrica do β -TCP

Fonte: autoria própria.

A figura 8 apresenta os resultados do ensaio de granulometria por difração de laser para o pó de HA, é possível observar que é uma distribuição unimodal, tem-se que de 10% das partículas possuem diâmetro de até 5,6 μm , 50% das partículas possuem diâmetro de até 7,5 μm e 90% das partículas possuem diâmetro de até 11,7 μm , as partículas possuem um diâmetro médio de 8,2 μm .

Figura 8 - Distribuição granulométrica da HA

Fonte: autoria própria.

A figura 9 apresenta os resultados do tamanho médio da partícula de β -TCP representado pela linha verde foi de 6,9 μm , e distribuição granulométrica entre 4,9 μm d(10) e 9,6 μm d(90); já a HA representado pela linha azul possui um tamanho médio de partícula de 8,2 μm , com distribuição granulométrica entre 5,6 μm d(10) e 11,7 μm d(90). Onde é possível observar que a curva verde que representa β -TCP está levemente deslocada para a esquerda, ou seja, possui tamanho das partículas menores, e também é mais estreita quando comparado com a curva azul que representa a HA, em relação a análise em ambos os pós HA e β -TCP o resultado encontrado mostra um volume maior do pó é formado por partículas menores que a mediana, em ambos, a distribuição foi estreita com características unimodal e que houve pequena diferença entre o diâmetro e o volume dos pós, essas pequenas diferenças justificam então a diferença na proporção L/P entre os polímeros. O pó do β -TCP é um pouco menor do que o da HA, isso justifica porque a proporção de L/P foi menor nas pastas com o β -TCP, pois quanto menor o tamanho do pó, menor é a região que precisa ser preenchida entre as partículas pelos polímeros para formação da pasta.

Figura 9 - Distribuição granulométrica do β -TCP versus HA

Fonte: autoria própria.

Os resultados dos tamanhos de partículas dos pós obtido foram um pouco maiores do encontrados em outros trabalho. Segundo O'Neill (2016) em seu trabalho o tamanho do β -TCP estudado tinha diâmetro médio de 2,3 μm d(50); Já Ginebra et al. (2004) em seu trabalho ela descreve o tamanho de partículas de pó que era 85% α -TCP e 15% β -TCP, com 2,22 μm d(50) ela chama de partículas finas e o pó que tinha tamanho de 10,88 μm d(50) de partículas grossas. Segundo Tadier et al. (2014) o pó β -TCP tinha uma distribuição monomodal de tamanho de partícula de $1,8 \pm 0,4$ μm d(50), Já Chen e Taguchi (2019) em seu trabalho utilizou α -TCP com tamanho médio de 3,2 μm d(50). Já Liu et al. (2005) em seu trabalho ele utiliza pó de TCP com 6,7 μm d(50) isso demonstra que o pó obtido neste estudo é um pouco maior do que do chamamos de partícula fina, Já Habib et al. (2008) em seu trabalho ele utiliza pó de β -TCP com 6,3 μm d(50) com distribuição monomodal, porém o tamanho encontrado neste trabalho está abaixo do que foi utilizado por Habib et al. (2008) e Liu et al. (2005), Já Murugan et al. (2005) em seu trabalho a distribuição monomodal de tamanho de partícula da HA foi de 20 μm d(50) com esses resultados, podemos afirmar que os tamanhos de pós encontrados neste trabalho, estão de acordo com os valores adequados reportados na literatura que sugerem a utilização do pós com tamanho de partículas médios inferiores aos 10 μm (GINEBRA et al., 2006).

A análise para a determinação do tamanho das partículas é essencial em muitos setores, pois é uma característica física fundamental que deve ser selecionada, monitorada e controlada a partir de uma fonte de matéria-prima para o produto acabado. Segundo a análise do tamanho do pó, existe o que chamamos de um tamanho ótimo de partícula ou pelo menos um menor e maior tamanho aceitável, para a maioria dos processos que envolvem partículas. Portanto, existem alguns estudos realizados para abordar a influência do tamanho das partículas e sua distribuição em cimentos e pastas (BAROUD et al., 2005; GREENWOOD et al., 1998; HABIB, 2010; OLHERO; FERREIRA 2004; SADLER; SIM 1991).

É importante observar que a formação e modelagem de qualquer produto cerâmico requer uma seleção adequada das matérias-primas em termos de tamanhos de partículas e distribuição de tamanhos. Consideravelmente as biocerâmicas resistentes e fortes consistem em microestruturas puras, finas e homogêneas (DOROZHKIN, 2015).

Alguns estudos afirmam que, em sistemas de relação líquido/pó, as interações tornam-se significativos quando os diâmetros das partículas fosfatos de cálcio são inferiores a 40 μm e muito significativo em diâmetros abaixo de 10 μm (HOLDICH, 2002; O'NEILL, et al., 2017).

Além disso, a distribuição do tamanho das partículas será importante na determinação da permeabilidade de uma pasta (YU et al., 1999; HABIB, 2010).

Segundo O'Neill, et al. (2017), a injetabilidade pode ser melhorada, alterando a permeabilidade do pó (tamanho de partículas) e a fração volumétrica máxima de sólidos (fator de empacotamento). Sabe-se que a fluidez da pasta é afetada pela distribuição de tamanhos de partículas, pois a fase líquida, deve primeiro preencher os espaços vazios dos componentes sólidos, líquido acima de uma quantidade ideal poderá aumentar a distância entre as partículas ocasionando a fluidez.

De acordo com a literatura, quanto menor o tamanho de partícula, em uma suspensão, a maior será a viscosidade (BAROUD et al., 2005; BUJAKE, 1965; GARCIA; LEBOLAY; FRANCES, 2003; KIM et al., 1987; KNOWLES; CALCUT; GEORGIOU, 2000).

Como apresentado por Ginebra et al. (2004), partículas finas α - TCP apresentam uma maior área superficial, ou seja, uma maior área para reagir, isso justifica a proporção maior de líquido para consistência da pasta. De acordo com Gbureck et al. (2005) as pastas de fosfatos de cálcio são semelhantes ao cimento Portland fresco, isso quando comparados ao tamanho das partículas e distribuição dos componentes, a relação líquido/pó e a carga superficial das partículas em contato com a fase líquida.

5.1.2 Difração de raios X dos pós e das pastas

A figura 10 apresenta os resultados de DRX dos pós de partida HA e β -TCP. Para a amostra de HA é possível observar que todos os picos correspondem apenas à fase da HA de acordo com os dados da ficha catalográfica. JCPDS 9-432. No entanto, para o pó de β -TCP, observa-se que além da fase majoritária β -TCP (ficha JCPDS 9-169) há sobreposição de picos do β -TCP com picos de HA, indicando que o pó é composto das duas fases cristalinas.

Figura 10 – Difratoograma do pó da hidroxiapatita e β -TCP

Fonte: autoria própria.

A análise dos pós das pastas de hidroxiapatita com quitosana e hidroxiapatita com alginato foi realizada após a etapa de secagem dos corpos de prova. Para o ensaio os corpos foram macerados em almofariz de ágata. Os resultados apresentados na figura 11 indicam que não houve nenhuma alteração da fase inicial, demonstrando que os polímeros utilizados

serviram apenas de veículo para dar consistência a pasta, e que não ocorreu transformação de fase.

Figura 11 – Difratoograma do pó: HA+Alg, HA+QS e HA

Fonte: autoria própria.

A análise dos pós das pastas de β -fosfato tricálcico com quitosana e β -fosfato tricálcico com alginato foi realizada após a etapa de secagem dos corpos de prova. Para o ensaio os corpos foram macerados em almofariz de ágata. Os resultados apresentados na figura 12 indicam que não houve nenhuma alteração da fase inicial, demonstrando que os polímeros utilizados serviram apenas de veículo para dar consistência a pasta, e que não ocorreu transformação de fase.

Figura 12 – Difratoograma do pó: β -TCP+Alg, β -TCP+QS e β -TCP

Fonte: autoria própria.

Segundo Habib et al. (2008) pasta e cimento diferem justamente pelo fato de que na pasta não ocorre o processo de cura (precipitação) que ocorre no cimento. Com os resultados apresentados pelos espectros de DRX, observou-se que os pós precursores das pastas não sofreram nenhum processo de alteração de fase após a mistura com os biopolímeros.

5.1.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier dos polímeros, pós e das pastas

As análises no FTIR foram realizadas com objetivo de identificar os grupos funcionais característicos dos polímeros quitosana e alginato, pós de hidroxiapatita e β -fosfato tricálcico e analisar o comportamento dos polímeros junto aos pós e investigar se os mesmos interferiam nos grupamentos moleculares.

A radiação infravermelha pode ser quantificada da região de 10000 a 100 cm^{-1} , no entanto a frequência está associada à massa relativa do átomo e para este trabalho foi adotada a frequência de 4000 a 450 cm^{-1} , região onde acontece o modo vibração-rotação dos elementos (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1994).

A figura 13 ilustra as bandas características dos polímeros utilizados nesse trabalho. No espectro de infravermelho para a quitosana apresentado na figura 13, podemos destacar os picos característicos em 1639 cm^{-1} do grupamento de amida aumentada, em 1060 cm^{-1} o resultado de um estiramento de C-O, em 1402 cm^{-1} o estiramento do anel da molécula (C=C), em 1540 cm^{-1} vibração devido o grupamento de amina, em 1375 cm^{-1} o estiramento do anel da amina heterocíclica e em 1153 cm^{-1} , o estiramento de C-O-C, com o objetivo de caracterizar a presença de grupos químicos específicos nos filmes obtidos foi observada semelhança na análise do filme de quitosana em FTIR com de outros autores o que demonstra que os filmes utilizados apresentam os mesmos grupamentos químicos característicos da quitosana (BISPO et al., 2009; COSTA JR.; MANSUR, 2007; MONTEIRO JR., 1999; WANG; TURHAN; GUNASEKARAN, 2011).

O espectro de infravermelho do filme de alginato, apresentado na figura 13, mostrou ampla banda de absorção em 1597 cm^{-1} e 1405 cm^{-1} , o que refere-se ao estiramento assimétrico de COO^- , em 1315 cm^{-1} ao estiramento assimétrico de C-O, em 1127 cm^{-1} , ao estiramento de C-O e 1088 cm^{-1} , ao estiramento de C-C, em 1022 cm^{-1} , ao estiramento de C-O-C e em 946 cm^{-1} , ao estiramento de C-O, esses valores são semelhantes aos valores encontrados em estudos de outros autores (FAN et al., 2006; LAIA, 2015; LOPES et al., 2017; NERY, 2014; OSTROWSKA-CZUBENKO; GIERSEWSKA-DRUZYNSKA, 2009; SOARES et al., 2004).

Figura 13 - FTIR dos polímeros quitosana e alginato

Fonte: autoria própria.

Na tabela 7 temos os principais grupos característicos da FTIR do filme da quitosana e na tabela 8 os principais grupos característicos da FTIR do filme do alginato encontrados neste ensaio.

Tabela 7 - Descrição das bandas de associação da FTIR da quitosana

Número de ondas (cm ⁻¹)	Grupo característico
1639	grupamento N-H
1540	estiramento N-H
1402	estiramento -CH ₂ (C=O)
1375	vibração C-N
1153	estiramento C-O-C
1060	estiramento C-O
1013	estiramento C-O
889	estiramento C-N

Fonte: autoria própria.

Tabela 8 - Descrição das bandas de associação da FTIR do alginato

Número de ondas (cm ⁻¹)	Grupo característico
1597	estiramento assimétrico de COO-
1405	estiramento assimétrico de COO-
1315	estiramento assimétrico de C-O
1127	estiramento de C-O
1088	estiramento de C-C
1022	estiramento C-O-C
946	estiramento C-O
902	estiramento C-H
807	estiramento C-H
778	estiramento C-H

Fonte: autoria própria.

Figura 14 - FTIR: pasta de HA + QS, pasta de HA + Alg e pó de HA

Fonte: autoria própria.

Os resultados de infravermelho para o pó de HA e as pastas de HA + QS e HA + Alg, estão apresentados na Figura 14. Para a HA, é possível verificar picos característicos dos grupos PO_4^{3-} (1094, 1040, 604, 565 e 471 cm^{-1}), grupo HPO_4^{2-} (962 cm^{-1}), grupo CO_3^{2-} (1457 e 962 cm^{-1}) característico de uma hidroxiapatita carbonatada, os picos (1636 e 1560 cm^{-1}) podem ser atribuídos a ligação de hidrogênio intracelular entre os grupos carbonila de amida I e II da quitosana, respectivamente; o grupo O-H (3571 cm^{-1}) e a presença de H_2O , caracterizada pelo pico em 3440 cm^{-1} . Outros autores já observaram a presença de H_2O adsorvida em HA, obtida via precipitação química, devido à umidade do ar, uma vez que o procedimento é realizado em sistema aberto (GUERRA-LOPEZ et al., 2015; HE; DONG; DENG, 2016; JAFARI et al., 2016; ROGINA et al., 2016; RIGO et al., 2001; SCATOLINI, 2017; SHAVANDI et al., 2016; SINGH, 2016; ZHANG et al., 2016.).

A Tabela 9 mostra os valores obtidos para cada banda de absorção para a amostra HA pura e das pastas de HA + QS e HA + Alg, onde pode se estimar os grupos característicos dessa frequência, caracterizando o material, uma vez que as bandas características de grupamentos químicos envolvem frequentemente vibrações acopladas (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1994). Portanto, os resultados encontrados indicam que as pastas apresentam características químicas da hidroxiapatita, demonstrando que as quantidades de polímeros não foram suficientes para causar interferência nos grupamentos moleculares e nem causar mudança de fase.

Tabela 9 - Descrição das bandas de absorção em destaque FTIR da HA, HA + QS e HA + Alg

Número de ondas (cm^{-1})	Grupo característico
3571	Vibração de OH de moléculas de água
3440	Estiramento - OH
1636	Deformação H-O-H de H_2O
1560	Deformação axial assimétrica do ânion carboxilato
1457	Deformação axial simétrico de CO_3^{2-}
1412	Deformação axial simétrico de CO_3^{2-}
1094	Estiramento assimétrico P-O
1040	Estiramento assimétrico P-O
962	Estiramento simétrico de P-O
870	Estiramento antissimétrico de CO_3^{2-}
632	Estiramento OH
604	Deformação O-P-O em HPO_4^{2-}
565	Deformação angular assimétrica O-P-O
471	Deformação axial PO_4^{3-}

Fonte: autoria própria.

A figura 15 ilustra os espectros de infravermelho das amostras das pastas de β -TCP + QS, β -TCP + alg e do pó de β -TCP. É possível verificar que as bandas características do β -TCP nas regiões de 3570, 3450, 1635, 1115, 1040, 968, 605 e 552 cm^{-1} são predominantes tanto para a pasta com quitosana quanto com alginato, banda na região de 1560 cm^{-1} característico de deformação axial assimétrica do anión carboxilato para HA+QS e β -TCP + QS e bandas nas regiões de 1260 e 803 cm^{-1} tanto para as pastas de β -TCP + QS e β -TCP + Alg. Na tabela 10 mostra os valores obtidos para cada banda de absorção para a amostra do β -TCP, β -TCP + QS e β -TCP + Alg onde pode se estimar os grupos característicos dessa frequência, caracterizando o material, uma vez que as bandas características de grupamentos químicos envolvem frequentemente vibrações acopladas (SHAVANDI et al., 2016; DALMÔNICO, 2015; PEREIRA; SANTOS; FERNANDES, 2015; CORRÊA, 2015; ESCOBAR; JARAMILLO, 2009).

Figura 15 - FTIR: pasta de β -TCP + Alg, pasta de β -TCP + QS e pó de β -TCP

Fonte: autoria própria.

Tabela 10 - Descrição das bandas de absorção em destaque FTIR do β -TCP, β -TCP + QS e β -TCP + Alg

Número de ondas (cm^{-1})	Grupo característico
3570	Vibração OH de moléculas de água
3450	Estiramento - OH
2960	Deformação axial de C-H
2925	Deformação axial de C-H
1635	Deformação H-O-H de H_2O
1560	Deformação axial assimétrica do ânion carboxilato
1260	Deformação axial assimétrico para C-O-C
1115	Grupamento PO_4
1040	Grupamento PO_4
968	Grupamento PO_4
605	Deformação O-P-O em HPO_4^{2-}
552	Deformação angular assimétrica PO_4^{3-}

Fonte: autoria própria.

5.1.4 Microscopia eletrônica de varredura dos corpos de provas

Com as imagens obtidas por microscopia (figura 16), é possível observar que a morfologia da pasta apresenta grãos de hidroxiapatita compactos e que não há diferença quando comparamos a superfície com a área da fratura; observam-se alguns poros, provavelmente pela presença de bolhas de ar durante a aplicação das pastas no molde, não foi possível observar a presença dos polímeros, pois a quantidade de polímeros foi pequena comparada com a quantidade de pó, isso comprova que esses polímeros apenas serviram como veículo para a formação da pasta.

Figura 16 - Imagens obtidas pelo MEV; a) HA + QS na superfície b) HA + QS na fratura, c) HA + Alg na superfície, d) HA + Alg na fratura

Fonte: autoria própria.

O processo de cura em um cimento de fosfato de cálcio ocorre em decorrência da precipitação química de uma nova fase distinta dos precursores, onde normalmente ocorre a formação de fosfatos de cálcio na forma de agulhas (VORNDRAN et al., 2013). Segundo Cunha (2010) a morfologia do pó da HA após calcinação é esférica e suas partículas podem estar agregadas. Através das imagens obtidas pelo MEV, conforme figura 16, é possível observar o pó da HA, com contornos esféricos regulares sem a formação de cristais na forma de agulhas, indicando que não houve precipitação na pasta de HA e quitosana (MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2003).

Na figura 17, temos as imagens do MEV, dos corpos de provas das pastas que utilizaram o β -TCP como pó e os polímeros quitosana e alginato, onde é possível observar

que o pó apresenta-se bem compacto nas pastas e que os mesmos não se diferem quando comparados a superfície com a área da fratura, observou-se uma quantidade maior de poros pela presença de bolhas de ar, provavelmente pelo processo de aplicação das pastas no molde, isso em comparação com as pastas a base de hidroxiapatita sendo que o processo de secagem se deu da mesma forma com a pasta em ambos os casos. Não foi possível observar detalhes a respeito dos polímeros, porém, para a formulação β -TCP+QS, é possível observar (figura 17a) presença de alguns cristais com formato de placas (setas) bem distintos da morfologia esférica no restante da superfície, lembrando que o pó de β -TCP é precursor da HA e neste caso é uma mistura e não 100% β -TCP, é possível que tenha ocorrido uma transformação de alguma fase de hidroxiapatita deficiente em cálcio, muito comum nos cimentos de fosfatos de cálcio e que apresentam essa morfologia na forma de placas ou agulhas (DOROZHKIN, 2015; YU et al., 2010).

Figura 17 - Imagens obtidas pelo MEV do corpo de prova de β -TCP + QS; a) β -TCP + QS na superfície b) β -TCP + QS na fratura, c) β -TCP + Alg na superfície, d) β -TCP + Alg na fratura

Fonte: autoria própria.

De acordo com Kelder et al. (2019) em seu estudo com hidroxiapatita deficiente em cálcio, com água para formação de pasta de fosfato de cálcio utilizada para criação de *scaffolds* usando uma impressora 3D, ao caracterizar o material CaP, através de um MEV. As partículas de CaP secas aparecem como microesferas irregulares com cristais em forma de placa.

Segundo Huang et al. (2020) em seu estudo com pó de α -fosfato tricálcico (α -TCP) que também é um precursor da HA, após ser solubilizado com quitosana, formando a pasta e após o período de secagem em análise da imagem feita pelo MEV, foi possível observar a formação de poucos cristais parecidos com flocos e à medida que se aumentava a concentração de quitosana na pasta, essas placas se apresentavam menores na imagem.

Geralmente, após a pega, é comum a formação de cristais em formato de agulhas ou pétalas, como característica da precipitação dos materiais, e com o tempo a microestrutura muda o formato para haste como resultado da cristalinidade, caracterizando esse resultado a pega do cimento (ALONSO, 2011; AMBARD; MEUNINGHOFF, 2006). Observa-se nas figuras 17 e 18 que houve formação dessas hastes descrita por alguns autores apenas para a formulação de β -TCP+QS.

Em todas as imagens realizadas pelo MEV das pastas analisadas é possível observar a presença de poros, fator esse que vem sendo discutido desde 1979, onde Holmes sugeriu em seu trabalho que o tamanho ideal dos poros em *scaffolds* de fosfatos de cálcio variaram de 200 a 400 μm levando em consideração o tamanho médio do osteônio humano que é de aproximadamente de 223 μm (HOLMES, 1979), enquanto em Tsuruga et al. (1997) sugeriram que o tamanho ideal de poros da biocerâmica que suportou osso ectópico, ou seja, região trabecular do osso, a formação foi de 300 a 400 μm , (TSURUGA et al., 1997). Segundo Dorozhkin (2015) a porosidade da cerâmica é um fator muito importante para que haja interconectividade do material com o tecido onde o material foi implantado (DOROZHKIN, 2015).

Atualmente, materiais de enxerto ósseo constituídos por pó granular do tamanho de 200 até 1500 micrômetros vem sendo usado (SEONG; RYU, 2020).

Segundo Villa et al. (2014) em seu estudo sobre *scaffolds* de compósitos de hidroxiapatita com metilcelulose, ele observou que as células penetraram dentro dos *scaffolds*, onde os poros apresentavam espessura geométrica de aproximadamente de 500 μm e que as células estavam totalmente ligadas ao biomaterial após 12 h.

Outro ponto importante a ser discutido é que não há necessidade de se criar materiais biocerâmico de fosfato de cálcio com poros muito grandes; o importante é que esses poros devam estar interconectados (DOROZHKIN, 2015; KARAGEORGIU; KAPLAN, 2005; LECOMTE et al., 2008; OMAE et al., 2006; YOSHIKAWA et al., 2009). A interconectividade desempenha um papel importante, pois através da profundidade é possível a penetração de células ou tecidos dentro do material biocerâmico, bem o que permite o desenvolvimento de vasos necessários para nutrir novos ossos e remover resíduos (DOROZHKIN, 2015; HING et al., 2005; O'NEILL et al., 2017; WOODARD JR. et al., 2007).

A porosidade em pasta de cimento de fosfato de cálcio está intimamente relacionada a quantidade de líquido/pó, pois é necessária uma medida mínima de líquido para o preenchimento dos espaços entre as partículas, usado como meio dispersante para produzir uma pasta viável e o endurecimento do material. Entretanto, o aumento da quantidade de líquido pode gerar um distanciamento entre as partículas, influenciando na viscosidade da pasta e aumento da porosidade do material após a secagem (O'NEILL et al., 2017).

Levando em consideração que o processo de secagem em cimentos de fosfatos de cálcio ocorre de camadas em camadas e de dentro para fora, a interconectividade tem sido um desafio. Estudos têm sido realizados com o propósito de gerar uma macroporosidade nos cimentos de fosfatos de cálcio, com a adição de agentes porogênicos, como manitol (MARKOVIC; TAKAGI, 2001) ou sacarose (TAKAGI; CHOW, 2001), o uso de compostos geradores de gás, como bicarbonato de sódio (REAL et al, 2002; TAKAGI; CHOW, 2001) ou o uso de agentes espumantes como albumina (GINEBRA et al., 2007; MIÑO-FARIÑA; MUÑOZ-GUZÓN, 2003), gelatina (MONTUFAR et al. 2010), combinações de gelatina de soja (KOVTON et al., 2015) ou surfactantes de baixo peso molecular (O'NEILL et al., 2017).

Na figura 18, temos a comparação entre a pasta de HA + QS na superfície com a pasta de β -TCP + QS na superfície, onde é possível observar que a pastas de HA + QS apresenta-se mais compacta, com uma presença menor de poros e de cristais, já na pasta de β -TCP +QS é possível observar bem a presença de cristais na forma de placas.

Figura 18 - Comparação da HA + QS com o β -TCP + QS. a) HA + Qs superfície b) β -TCP + QS superfície

Fonte: autoria própria.

Na figura 19, temos a comparação entre pasta de HA + QS e a pasta de β -TCP + QS na superfície de fratura, onde é possível observar que a pastas de HA + QS apresenta-se mais compacta, com uma presença menor de poros, já na pasta de β -TCP + QS é possível observar bem a presença de cristais na forma de placas.

Figura 19 - Comparação da HA + QS com o β -TCP + QS. a) HA + QS fratura b) β -TCP + QS fratura

Fonte: autoria própria.

Na figura 20, temos a comparação da pasta de HA + Alg e da pasta de β -TCP + Alg na superfície, é possível observar que a pastas de HA + Alg apresenta-se mais compacta, com uma presença menor de poros, já na pasta de β -TCP + Alg é possível observar bem a formação de alguns glóbulos maiores com presença de ar entre suas junções.

Figura 20 - Comparação da HA + Alg com o β -TCP + Alg. a) HA + Alg superfície b) β -TCP + Alg superfície

Fonte: autoria própria.

Na figura 21, temos a comparação da pasta de HA + Alg e da pasta de β -TCP + Alg na superfície de fratura, onde é possível observar que a pastas de HA + Alg apresenta-se mais compacta, com uma presença menor de poros e, já nesta imagem não se observa a presença de cristais, na pasta de β -TCP + Alg é possível observar bem a formação de alguns glóbulos maiores com presença de ar entre suas junções.

Figura 21 - Comparação da HA + Alg com o β -TCP + Alg. a) HA + Alg fratura b) β -TCP + Alg fratura

LTA - 3443 2019/09/30 N D4.1 x1.0k 100 um
HAAI_Frat

LTA - 3455 2019/09/30 N D5.2 x1.0k 100 um
BTCPAI_Frat

Fonte: autoria própria.

Segundo O'Neill et al. (2017), a forma dos grãos de fosfatos de cálcio pode influenciar na injetabilidade da pasta ou cimento. Em seu trabalho, ele descreve que grãos em formato de esferas tem um melhor empacotamento e aumento da permeabilidade para formação da pasta (ISHIKAWA, 2003). Segundo Wang et al. (2007) grãos com outras morfologias como cubos ou retângulos por não terem o mesmo empacotamento como os esferoidais, acabam dificultando uma interação de partícula-partícula. As interações partícula-partícula determinam a força do pó quanto a sua resistência em rede e, portanto, influenciará a fluidez das pastas.

Segundo Shavandi et al. (2016), concentrações superiores a 10% (m/v) de solução de quitosana podem acelerar o processo de secagem das pastas de fosfatos de cálcio, pois, de acordo com os autores ocorre precipitação do material.

Nas imagens da figura 19 (a e b) é possível observar que os pós se encontram empacotados com formação de poucos cristais na forma de placas para a mistura de β -TCP+QS características de uma hidroxiapatita deficiente em cálcio.

5.2 MEDIDAS DE pH DOS CORPOS DE PROVAS EM SOLUÇÃO PBS

Neste trabalho, foi analisada a evolução do pH das pastas em solução PBS por 14 dias, onde foi possível verificar, mediante a figura 22, que as soluções que continham as pastas atingiram valores dentro de uma margem de $8,6 > \text{pH} > 7,1$, valores considerados aceitáveis para implantação. Durante esse período, o comportamento dos corpos de prova na solução PBS se manteve íntegro sem desmanchar, exceto para a mistura de β -TCP com Alginato, que segundos após ser colocado na solução PBS, se desmanchou por completo. Porém, o material manteve-se no fundo do becker sem se solubilizar com o meio.

Figura 22 - Evolução do pH das pastas em solução tampão

Fonte: autoria própria.

Segundo Murugan e Ramakrishna (2004), em seus estudo sobre o comportamento da pasta de fosfato de cálcio, onde foi utilizada a HA com proporções diferentes de quitosana (5% em peso de quitosana e 10% em peso de quitosana), a pasta foi colocada em solução PBS e observou-se que o pH diminui à medida em que se aumentava a taxa de concentração da quitosana, valores esses de pH 7,6 à 7,1, respectivamente, no entanto esses valores ainda estavam dentro da margem considerada aceitável para implantação. Segundo Alves et al. (2006), materiais na faixa de pH 6,5 a 8,0 são considerados adequados para implantação.

De acordo com Gigliotti et al. (2018), em seu trabalho com pasta de HA mais ácido plurônico dissolvido em água deionizada, obtiveram como resultado uma taxa de pH de 9. Já Tak et al. (2018) em seu estudo com pastas de HA mais metilcelulose, por causa da eluição (processo de lavagem) da hidroxiapatita, a solução da pasta se tornou fortemente alcalina com um pH de 12, valores bem acima do que foi encontrado neste trabalho.

De acordo com Tak e Ryu (2020), em seu trabalho com pastas de HA mais água e HA mais metilcelulose, eles obtiveram pH 6,60 e 6,74, respectivamente. Valores um pouco menor do que o encontrado neste trabalho, análise feita em cima de pastas para regeneração óssea.

Segundo Alonso (2011), para a maioria das células humanas, uma exposição a longo prazo em meios ácido ($\text{pH} \leq 6,0$) ou básico ($\text{pH} \geq 9,0$), resultaria em um efeito adverso sobre

o crescimento e proliferação das células, o que seria extremamente prejudicial ao organismo, pois desencadearia um quadro um inflamatório ou até mesmo necrose do tecido.

5.3 INJETABILIDADE DA PASTA

Segundo O'Neill et al. (2017) definiram injetabilidade de uma pasta, como sendo a capacidade da pasta se manter homogênea durante a sua injeção. Em outras palavras, a pasta deve ser extrudada através de uma agulha, sem que ocorra separação de fases. Esta separação de fases pode ocorrer quando a fase líquida da mistura se encontra muito fluida. Neste caso, quando se pressiona, o líquido sai da seringa, enquanto a maioria das partículas de CaP permanecem na seringa funcionando como um filtro. Para uma boa injetabilidade é necessário estabelecer uma boa relação líquido/pó ideal, pois esse fator influencia diretamente na viscosidade da pasta. Uma quantidade mínima de líquido é necessária para o preenchimento dos espaços vazios entre as partículas, pois a quantidade inadequada (maior) de líquido pode influenciar na viscosidade da pasta, tempo de secagem e também interfere na quantidade de poros nos corpos de provas após secagem da pasta, devido ao distanciamento de partícula-partícula.

As razões líquido/sólido utilizadas para a obtenção das pastas, descritas na tabela 6, foram baseadas nas conformações das pastas, observou-se por exemplo, durante o processo de secagem que razões maiores que 0,75 ml/g, havia a formação de uma quantidade maior de poros na região inferior dos corpos de provas que estavam em contato com o molde, além disso também era necessário um tempo maior para secagem e os corpos se apresentavam mais frágeis quando comparados. Razões menores que 0,67 ml/g, as pastas se apresentaram mais espessas, dificultando sua compactação no molde e a injetabilidade.

Além disso, a estabilidade das pastas também foi avaliada imergindo-as em solução PBS por 24 horas. Os resultados indicaram que as pastas conservaram sua forma após esse período, exceto β -TCP + Alg, que se desmanchou em poucos segundos, as demais mantiveram sua forma ainda visível após 72h.

Os resultados encontrados em relação a razão (L/P) das pastas demonstraram que as mesmas apresentavam boa consistência e que se mantiveram fluidas, homogêneas com brilho, seus elementos coesos após mistura, conforme ASTM C472 (ASTM, 2014) e que após serem inseridas na seringa apresentavam boa injetabilidade.

Segundo Alves et al. (2006), para que haja sucesso na aplicação clínica de uma pasta óssea, não é suficiente que a mesma apenas possua boa injetabilidade, mas também uma

resistência mínima após a secagem. Assim, para que se atinja uma resistência mecânica pós-secagem aceitável é necessária uma baixa razão líquido/pó.

Segundo Baroud et al. (2005), aumentar o valor de viscosidade pode ser desejável durante a infiltração da pasta de forma injetável, pois uma solução mais diluída (viscosidade mais baixa) apresenta uma interação menor entre as partículas e elas podem se perder na região onde foi aplicada. A pasta deve ser injetada em um ambiente aquoso e para endurecer nessas condições, uma pasta mais viscosa deve ter um desempenho melhor do que uma pasta com baixa viscosidade. Outro fator a ser levado em consideração, é que existe uma interação química entre os aditivos. Quando unimos os grupos carboxilas as partículas de fosfato de cálcio, essas interações físico-química podem influenciar aumentando a taxa de viscosidade, melhorando as propriedades da pasta e sua injetabilidade (BOHNER; BAROUD, 2005).

Na figura 23, apresentamos a imagem da preparação das pastas, na figura 23 a) temos o pó e a solução polimérica, em b) temos o início da mistura, adicionando gota a gota a solução polimérica sobre o pó e o espatulamento para formação da pasta em c) preenchimento da seringa com a pasta e em d) teste da injetabilidade da pasta. A pasta foi injetada com a pressão de um polegar e durante esse experimento a pasta flui de forma homogênea e sem separação de fases.

Figura 23 - Preparação da pasta, a) pó de HA e a QS, b) gotejamento da QS na HA, c) pasta sendo colocada na seringa, d) pasta sendo injetada de forma homogênea

Fonte: autoria própria.

Segundo Ginebra et al. (2001), em seu teste de injetabilidade utilizou uma máquina servo-hidráulica a uma velocidade de 15 mm/min. com uma força máxima de 100N, para analisar a injetabilidade da pasta de fosfato de cálcio em uma seringa de 20 mL, com 7,5 g. de pasta. Já Cunha (2009) em seu teste de injetabilidade utiliza um Texture Analyser TA-XT2iHR da Stable microSystems, onde uma sonda com seringa é acoplada a máquina para extrusão da pasta. Neste teste, as pastas que estavam nas seringas eram pastas Bonelike® com sulfato de cálcio e Bonelike© com ácido hialurônico, pastas essas, também utilizadas para regeneração óssea.

Neste trabalho, as pastas foram preparadas conforme as formulações definidas e carregadas nas seringas de 10 mL, com aproximadamente 5 g, de pasta. Utilizou-se um texturômetro (Texture Analyser TA-TXplus) conforme figura 24, com uma força de 45N e uma taxa de velocidade de 10 mm/min. A injetabilidade se deu em um período de 5 seg.

Figura 24 – Análise da injetabilidade no Texture Analyser TA-TXplus, a) seringa antes da injetabilidade, b) seringa após injetabilidade

Fonte: autoria própria.

Para o ensaio utilizou-se uma seringa de 10 mL, sem agulha, cuja montagem aparece ilustrada na figura 24. Cada ensaio foi iniciado depois de decorridos 1 min e 30 s da adição da pasta, e para cada amostra utilizou-se uma nova seringa.

Com os resultados obtidos conforme figura 25, apesar dos comportamentos de injetabilidade não terem muita correlação entre tipo de pó e polímero, pois observa-se que os menores valores foram para as amostras de HA+QS e B-TCP+Alg, mesmo assim esses valores estão na faixa de 96% um excelente resultado.

Figura 25 - Análise da injetabilidade

Fonte: autoria própria.

Salehi et al. (2019) em seu trabalho, descreve seu teste de injetabilidade em pastas com gelatina, 1,2% de alginato e 67% de fosfato de cálcio (GA12HB) e a pasta com gelatina, 0,4% de CMC e 66% de cálcio fosfato (GC4HB), onde ele obteve como resultado uma taxa de injetabilidade 84% para GC4HB e 91% para GA12HB. Comparativamente ao trabalho de Salehi e colaboradores, os resultados de injetabilidade obtidos neste trabalho são superiores ao encontrado por eles.

Segundo Renó (2017), em seu trabalho, o teste de injetabilidade é semelhante ao que foi desenvolvido neste trabalho, porém com pastas de cimentos de fosfatos de cálcio, na fase sólida α -TCP e fase líquida ácido cítrico e PEG (polietilenoglicol), o resultado obtido de α -TCP mais ácido cítrico foi de $81,52\% \pm 5,17$ e α -TCP mais PEG foi de $85,39\% \pm 4,06$, taxa essas inferiores aos resultados encontrados neste trabalho.

Segundo Chen e Taguchi (2019), em seu trabalho com pastas de α -TCP e álcool polivinílico (PVA) em diferentes proporções, eles obtiveram resultados de injetabilidade superiores a 90%, utilizando a mesma metodologia deste trabalho para cálculo da injetabilidade, neste caso eles obtiveram um bom resultado para análise de injetabilidade de pastas de fosfatos de cálcio.

Segundo Neumann (2018), a força de pinçamento entre o dedo indicador e o polegar, em atividades funcionais é equivalente a 45N, por esse motivo adotamos a força de pinçamento em um primeiro momento para análise da injetabilidade. Na figura 26, podemos observar a pasta sendo injetada em uma solução para análise de pH. Neste caso, foi observado

que apenas as forças dos dedos polegar e o indicador foram suficientes para injetabilidade da pasta.

Figura 26 - Pasta sendo injetada com pressão apenas do polegar

Fonte: autoria própria.

Segundo Shavandi et al. (2016) a avaliação de desempenho da seringa é necessária de acordo ao *Food and Drug Administration (FDA)*, onde se analisa a força manual necessária para iniciar e manter o movimento do êmbolo até o final do cilindro da seringa para administração de materiais, no entanto em seu trabalho ele adotou o valor de 30N para a injetabilidade manual das pastas de quitosana com HA e β -TCP. Em geral, propriedades mecânicas superiores podem ser obtidas pela incorporação de maior concentração de quitosana e proporções mais elevadas de compostos fosfatos de cálcio, no entanto isso provavelmente prejudicaria a injetabilidade, porque aumentaria a força necessária para extrusão da pasta, devido ao aumento da viscosidade.

Na literatura, valores na faixa de 40 a 100 N foram encontrados como forças adequadas para realizar injeções de material (KREBS et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2010; XU et al., 2006). Com os resultados encontrados através do ensaio de injetabilidade tanto no texturômetro de forma quantitativa quanto o que foi analisado através da pressão do polegar,

demonstraram de forma qualitativa que a extrusão das pastas se deram sem perda de fase (líquido-pó) e que as mesmas podem ser utilizadas na forma injetável. As pressões utilizadas nestes ensaios foram baixas o suficiente para demonstrar que as pastas podem ser injetadas manualmente, sem a necessidade de um dispositivo especial para ajudar com a pressão do sistema.

5.4 TEMPO DE PEGA INICIAL E FINAL

O ensaio para análise do tempo de pega inicial e final desta pasta foi realizado através das agulhas de Gillmore, de acordo com as normas ASTM C266 – 04 (ASTM, 2004), adaptado, pois o ensaio é para cimentos e não pastas. As marcações não aconteceram conforme testes feitos em cimentos, durante o ensaio não ocorreu precipitação do material, mas secagem em estágio bem mais longo, entre 12 e 24h, de acordo com a umidade e temperatura ambiente.

Segundo O'Neill et al. (2017), apesar das pastas de fosfato de cálcio apresentarem muita similaridade como os cimentos de fosfato de cálcio, estas possuem um tempo muito maior de endurecimento, porque não ocorre cura do material.

Segundo Shavandi et al. (2016), para que ocorra um processo rápido de secagem em soluções que envolvam hidrógeis de quitosana com fosfatos de cálcio (HA e β -TCP), é necessário que a concentração de quitosana seja superior a 10% (m/v). Neste trabalho, o valor adotado foi de 2% (m/v) de peso molecular médio, o que justifica um tempo maior para que ocorra o processo de secagem.

Segundo Habib et al. (2008), em seu trabalho destaca a vantagem de se trabalhar com o β -TCP por não ter o processo da cura, ele tem muito mais tempo de manuseio, na qual as experiências podem ser realizadas sem restrições de tempo. Além disso, os resultados obtidos são mais reprodutíveis.

5.5 RESISTÊNCIA MECÂNICA À COMPRESSÃO

A pasta também foi injetada em um molde de silicone, conforme figura 27, os corpos de provas foram estabelecidos conforme norma da ABNT NBR ISO 5833 (ABNT, 2004) cilindros com 6 mm de diâmetro e 12mm de altura, após 24h os corpos foram retirados do molde, eles estavam secos (temperatura ambiente) e prontos para o ensaio mecânico, foram feitos 5 corpos para cada formulação da pasta.

Figura 27 - Pasta em estado sólido. a) molde de silicone b) molde preenchido com a pasta c) cilindros secos retirados do molde

Fonte: autoria própria.

Para o ensaio mecânico foi utilizado um texturômetro (Texture Analyser TA-TXplus), conforme figura 28, o equipamento foi programado no modo compressão, com velocidade de 2 mm/min. de acordo com trabalho de Sionkowska e Kozłowska (2013), a carga foi quantificada à medida que o corpo de prova se rompia. Estes dados foram obtidos através do gráfico de tensão (MPa) x deformação (%).

Figura 28 - Texturômetro TA.TX Plus com cilindro de fosfato de cálcio

Fonte: autoria própria.

Na figura 29 temos imagens do ensaio de compressão dos corpos de provas das pastas utilizadas neste trabalho.

Figura 29 - Ensaio de compressão no corpo de prova. a) contato da carga sobre corpo de prova; b) momento em que a ruptura do material, c) finalização do ensaio de compressão

Fonte: autoria própria.

A figura 30, apresenta os resultados obtidos no ensaio de compressão. Não foi possível estabelecer alguma correlação entre tipo de pó e polímero: 1,35 MPa para a pasta de β -TCP com QS, 2,16 MPa para HA com Alg, 3,08 MPa para β -TCP com Alg e 3,90 MPa para HA com QS. Esses valores estão muito abaixo de valores encontrados, por exemplo, para HA sinterizada e até mesmo para alguns tecidos duros conforme tabelas 11 e 12.

Para análise dos dados, o ponto de ruptura dos corpos foi marcado como sendo o ponto máximo de tensão e deformação, após esse ponto a amostra se rompe e equipamento continua marcando a compressão mesmo no material já rompido.

Figura 30 - Análise de compressão

Fonte: autoria própria.

De acordo com Dorozhkin (2010) biocerâmicas de fosfatos de cálcio possuem propriedades mecânicas frágeis que não permitem que eles sejam usados em áreas de suporte de carga, como dentes artificiais ou ossos, pois sua tenacidade à fratura não ultrapassa $1 \text{ MPa.m}^{1/2}$, valor esse considerado muito baixo.

A tenacidade à fratura é uma das mais importantes propriedades dos materiais cerâmicos. Ela mede a capacidade de um material resistir à propagação de uma trinca em uma peça pré-trincada (RIBEIRO; RIBEIRO; RODRIGUES, 2014).

Segundo Dorozhkin, (2015) em seu estudo sobre a tenacidade à fratura de HA pura prensada a quente com tamanhos de grão entre $0,2 - 1,2 \text{ }\mu\text{m}$, verificou que houve uma diminuição exponencial com o aumento da porosidade. Embora, alguns autores tenham encontrado duas tendências distintas, nas quais a resistência à fratura diminuiu com o aumento do tamanho do grão acima de aproximadamente $0,4 \text{ }\mu\text{m}$ e subsequentemente aumentou com a diminuição do tamanho do grão. A tenacidade máxima à fratura encontrada em seu trabalho foi de $1,20 \pm 0,05 \text{ MPa.m}^{1/2}$ com tamanho de grãos de aproximadamente de $0,4 \text{ }\mu\text{m}$. A tenacidade à fratura de um material de biocerâmica de HA não excede o valor de aproximadamente $1,2 \text{ MPa.m}^{1/2}$ (osso humano: $2 - 12 \text{ MPa.m}^{1/2}$).

Tabela 11- Propriedades mecânicas da hidroxiapatita sinterizada

Temperatura de Sinterização	Resistência à compressão (MPa)	Resistência a Flexão (MPa)	Resistência a Torção (MPa)	Módulo de Elasticidade (GPa)
1150° C	308 ± 46	61 ± 8	50 ± 7	44,3 ± 3,5
1200° C	415 ± 46	104 ± 11	62 ± 5	80,0 ± 6,4
1250° C	465 ± 58	106 ± 10	75 ± 4	85,1 ± 6,1
1300° C	509 ± 57	113 ± 12	76 ± 5	87,8 ± 6,0

Fonte: Adaptado Aoki (1991).

Tabela 12 - Propriedades mecânicas de alguns tecidos duros

Material	Resistência à compressão (MPa)	Resistência a Flexão (MPa)	Módulo de Elasticidade (GPa)
Osso cortical	88,3 - 163,8	88,9 - 113,8	3,88 - 11,7
Dentina	295	51,7	18,2
Esmalte Dentário	384	10,3	82,4

Fonte: Adaptado Aoki (1991).

Na tabela 11 temos os dados obtidos no estudo de Aoki (1991) onde ele analisa as propriedades mecânicas da HA sinterizada e na tabela 12 ele faz apresenta alguns resultados sobre as propriedades mecânicas de alguns tecidos duros.

O corpo humano é capaz de gerar concentrações de força bastante massivas e a variação dessas características entre os indivíduos pode ser enorme. Normalmente, os ossos são sujeitos a cargas de aproximadamente 4 MPa, enquanto tendões e ligamentos experimentam picos de tensão no faixa de 40 - 80 MPa. As articulações do quadril são submetidas a uma carga média de até três vezes o peso do corpo, cargas que podem chegar a 3.000 N e as cargas de pico experimentadas durante o salto podem atingir 10 vezes o peso do corpo. Essas informações são necessárias para estabelecermos a aplicação do biomaterial na região de implantação. Essas tensões são repetitivas e flutuantes, dependendo da natureza das atividades, que pode incluir em ficar de pé, sentado, correndo, alongando e escalando. Portanto, todos os tipos de implantes devem suportar ataques de uma grande variedade de condições agressivas. Lamentavelmente, atualmente, não há material artificial que atenda a todos esses requisitos (DOROZHUKIN, 2015).

5.6 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE DOS PÓS E DAS PASTAS

Em uma avaliação de biocompatibilidade dos biomateriais o primeiro teste é a análise da citotoxicidade *in vitro*, pois através desse método podemos reproduzir de maneira mais fácil obter resultados do comportamento do material em um meio biológico de forma mais rápida (ALONSO, 2011).

O ensaio de biocompatibilidade para as amostras foi realizado pela metodologia de incorporação do corante vermelho neutro que, além de determinar o possível efeito citotóxico do material, ainda indica o mecanismo de ação do mesmo frente à linhagem celular (LOPEZ et al., 2015). Neste sentido, o corante vermelho neutro indica uma variação na função da matriz lisossomal, uma vez que é capaz de atravessar a membrana e formar ligações eletrostáticas com a mesma. Assim, o comprometimento da matriz provoca uma diminuição da captura do corante (CIAPETTI et al., 1996; ROGERO et al., 2003, SCATOLINI, 2017).

As curvas de viabilidade celular para as amostras e controles são mostradas na Figura 31. É possível observar comportamento dos controles positivo (fenol) e negativo (alumina) em meio celular, conforme figura 31-a. Na figura 31-b é possível observar o comportamento celular com materiais à base de HA. Na figura 31-c é possível observar o comportamento celular com materiais à base de β -TCP. Para ambos não houve efeito citotóxico, exibindo viabilidade celular acima de 70%. Por outro lado, verifica-se apenas o controle positivo (fenol) inferior a 50%. Segundo a Norma ISO 10993-5 (ISO, 2009), quando a maior concentração de extrato (100%) apresenta viabilidade celular $\geq 70\%$, a amostra pode ser considerada não tóxica. Entretanto, quando a maior concentração (100%) apresenta viabilidade celular $\leq 70\%$, deve ser calculada a concentração que reflete 50% da viabilidade celular (IC_{50}).

Figura 31 - Viabilidade Celular; a) Controle positivo (fenol) e Controle negativo (alumina); b) Viabilidade celular do pó e das pastas com HA; c) Viabilidade celular do pó e das pastas com β -TCP

Fonte: autoria própria.

5.6.1 Análise estatística do ensaio de citotoxicidade

Na tabela 13 os resultados obtidos na Comparação entre as médias dos grupos HA, HA+Alg e HA+QS.

Tabela 13- Comparação entre as médias dos grupos de HA

Grupos	HA	HA+Alg	HA+QS
Média $\pm$ DP	103,19 $\pm$ 13,36 A	76,13 $\pm$ 16,58 B	69,18 $\pm$ 13,22 B

Fonte: autoria própria.

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Conclui-se que existiu diferença significativa entre a média do grupo HA em relação às médias dos grupos HA+Alg e HA+QS, e as médias desses dois grupos não apresentaram diferenças significativas entre si, ao nível de 5% de significância.

Na tabela 14 os resultados obtidos na comparação entre as médias dos grupos β -TCP, β -TCP+Alg e β -TCP+QS.

Tabela 14- Comparação entre as médias dos grupos de β -TCP

Grupos	β -TCP	β -TCP+Alg	β -TCP+QS
Média $\pm$ DP	96,65 $\pm$ 10,79 A	77,87 $\pm$ 13,01 B	76,59 $\pm$ 9,52 B

Fonte: autoria própria.

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Conclui-se que existiu diferença significativa entre a média do grupo β -TCP em relação às médias dos grupos β -TCP+Alg e β -TCP+QS, e as médias desses dois grupos não apresentaram diferenças significativas entre si, ao nível de 5% de significância.

Para comparação entre as médias dos grupos HA e β -TCP, HA +Alg e β -TCP+Alg e HA+QS e β -TCP+QS foram realizados testes t-Student para duas amostras independentes, cada uma com 15 observações. Para as análises foi utilizado o programa R, versão 3.6.1.

Na tabela 15 os resultados obtidos na comparação entre as médias dos grupos HA e β -TCP, HA +Alg e β -TCP+Alg e HA+QS e β -TCP+QS.

Tabela 15 - Comparação das médias entre os grupos. a) HA e β -TCP, b) HA + Alg e β -TCP + Alg e c) HA + QS e β -TCP + QS

a)	Grupos	Media $\pm$ DP	p-valor
	HA	103,19 $\pm$ 13,36	0,1516
	β -TCP	96,65 $\pm$ 10,79	
b)	Grupos	Media $\pm$ DP	p-valor
	HA+Alg	76,13 $\pm$ 16,58	0,7517
	β -TCP+Alg	77,87 $\pm$ 13,01	
c)	Grupos	Media $\pm$ DP	p-valor
	HA+QS	69,18 $\pm$ 13,22	0,0891
	β -TCP+QS	76,59 $\pm$ 9,52	

Fonte: autoria própria.

Conclui-se: Como o $p\text{-valor} > 0,05$, não se têm diferenças estatísticas entre os grupos estudados.

6 CONCLUSÕES

Os pós precursores obtidos por precipitação química foi hidroxiapatita e por reação do estado sólido, uma mistura de beta fosfato tricálcico com hidroxiapatita, neste caso a fase majoritária foi beta fosfato tricálcico.

As pastas foram obtidas utilizando soluções poliméricas de quitosana 2% (m/v) em solução de ácido acético 1% (v/v) e de alginato de sódio 2% (m/v). Utilizou-se a relação líquido/pó (L/P) de 0,75 mL/g para obter pasta de HA e 0,67 mL/g para pasta de β -TCP, independentemente das soluções poliméricas utilizadas.

Os resultados de DRX das pastas indicaram a presença das suas fases precursoras, a análise por FTIR apresentou os grupamentos referentes aos fosfatos de cálcio e da amida e através do MEV pode-se observar algumas formações de cristais na forma de placas para a pasta β -TCP+QS.

As pastas apresentaram valores de pH na faixa de $8,6 > \text{pH} > 7,1$ e a formulação de β -TCP e alginato não se manteve integra na solução tampão de PBS.

Foram realizados dois ensaios de injetabilidade, um quantitativo utilizando o texturômetro com carga de 45N e um qualitativo utilizando o método do pinçamento, para ambos os testes as pastas apresentaram características de injetabilidade. Com o ensaio quantitativo a porcentagem de injetabilidade calculada foi acima de 96% para todas as pastas.

A pasta de HA com QS apresentou um valor maior de resistência a compressão quando comparada com as demais.

Os resultados do ensaio de citotoxicidade indicaram que nenhuma formulação se apresentou citotóxica.

Com os resultados obtidos, pode-se concluir que as pastas de HA+QS; HA+Alg e β -TCP+QS apresentam características promissoras para serem utilizadas na área biomédica como material de enxertia injetável como material para regeneração óssea.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a possibilidade da utilização de outros polímeros para formação da pasta;
- Estudar o aumento ou diminuição na concentração dos polímeros para formação de um novo material;
- Investigar a microporosidade nas paredes do material (biocerâmicas) que será implantado para a regeneração óssea;
- Verificar outros aditivos para melhorar a resistência mecânica das pastas;
- Estudar a aplicabilidade da pasta na impressão 3D para formação de *scaffolds*;
- Estudar a incorporação de materiais antimicrobianos nas pastas;

REFERÊNCIAS

ALBEE, F.H, **Studies in bone growth**. Ann. Surg. v. 71, p. 32–39, 1920.

ALMEIDA, T. F. **Síntese e caracterização de biocimento de fosfato de cálcio usando resíduo de mármore**. Tese (doutorado), Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 2018.

ALONSO, L. M. **Avaliação de cimentos ósseos de Fosfatos de Cálcio com adições de Aluminato e Silicato de Cálcio**. Tese (doutorado). PPG - Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais – UFRGS. 155p, 2011.

ALVES, H.L.R., BERGMANN, C.P., SANTOS, L. A. dos. **Influência de Aditivos na Injetabilidade de Cimento Ósseo de Fosfato Tricálcico**. Revista Matéria, v. 11, n. 3, p. 324 – 331, 2006.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIAL. **ASTM C472**: Standard Test Methods for Physical Testing of Gypsum, Gypsum Plasters and Gypsum Concrete. 99, 2014.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIAL. **ASTM C266-04**: Standard Test Method for Time of Setting of Hydraulic-Cement Paste by Gillmore Needles. 2004.

ANDRADE, M.C.; BASTOS, I. N; OGASAWARA. **Resistência à compressão da hidroxiapatita densa**. CBECIMAT - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos materiais. Natal, 9 a 13 de novembro de 2002.

ANGELOVA, N.; HUNKELER, D. **Rationalizing the design of polymeric biomaterials**. Trends Biotechnol., v. 17, p. 409, 1999.

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

AOKI, H. **Science and medical applications of hydroxyapatite**. 1 ed. Tokyo: JAAS, 1991.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 5739**: Concreto - ensaios de compressão de corpos-de-prova cilíndricos. Rio de Janeiro, 2007.

ASSOCIAÇÃO DE BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 5833**: Implantes para cirurgia – Cimentos de resina acrílica. São Paulo, 2004.

ATHANASIOU K.A. et al. **Fundamentals of biomechanics in tissue engineering of bone**. Tissue Eng. v. 6, p. 361–381, 2000.

AZA, P. N.; AZA, S. **Biocerâmicas**. In: Biomateriales. 1ª ed. Faenza Editrice Iberica. p.41-64, 2004.

BAO, C.L.M. et.al. **Advances in bone tissue engineering**. Regen Med Tissue Eng Intech, p. 599–614, 2013.

BAROUD, G., CAYER, E. AND BOHNER M. **Rheological characterization of concentrated aqueous p-tricalcium phosphate suspensions:** The effect of liquid-to-powder ratio, milling time, and additives. *Acta Biomaterialia*, v. 1, p. 357-363, 2005.

BENS-NISSAN, B.; PEZZOTTI, G. **Bioceramics:** Processing Routes and Mechanical Evaluation. *Journal of the Ceramic of Japan*, v. 110, n. 7, p. 601- 608, 2002.

BETIOLI, A. M. et al. **Rheological characterization of cement paste: association of complementary techniques.** *Associação Nacional de Tecnologia do Ambiente Construído*. Porto Alegre, v. 9, n. 4, p. 37-48, out./dez. 2009.

BOHNER M, BAROUD G. **Injectability of calcium phosphate pastes.** *Biomaterials* v.26, p.1553–1563, 2005.

BOHNER, M. **Calcium orthophosphates in medicine:** from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury* 3, Supplement 4, p.37–47, 2000.

BORHAN, S.; HESARAKI, S.; NEZAFATI, N. **Synthesis and rheological evaluations of novel injectable sodium alginate/ chitosan- nanostructured hydroxyapatite composite bone pastes.** *Journal of The Australian Ceramic Society*. v. 52, p. 120 – 127, 2016.

BRITO, G. F. et al. **Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes.** *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 6, n. 2, p. 127–139, 2011.

BROWN, K. L.B.; CRUESS, R. L. **Bone and cartilage transplantation surgery.** *The Journal of Bone & Joint Surgery*. American volume, Boston, v. 64-A, p. 270-279, 1982.

BROWN, W; CHOW, L. **A new calcium-phosphate setting cement.** *J. Dent. Res.* v. 62 p. 672, 1983.

CAHYANTO, A. et al. **Mechanical strength improvement of apatite cement using hydroxyapatite/collagen nanocomposite.** *Key Engineering materials*. V.720, p. 167-172, 2016.

CALLISTER, W.D. **Ciência e Engenharia de Materiais:** Uma Introdução, LTC, Rio de Janeiro, 2008.

CAMARGO, N. H. A.; DE LIMA, S. A.; GEMELLI, E. **Síntese e Caracterização de Pós Nanocompositos de Hidroxiapatita/LiO2N para Aplicações na Reconstituição Óssea.** 6º Congresso Latino Americano de Biomateriais e Órgãos Artificiais, Gramado, 2010.

CAMERON, H.U.; MACNAB, I.; PILLIAR, R.M., **Evaluation of a biodegradable ceramic.** *J.Biomed. Mater. Res.* v. 11, p. 179–186, 1977.

CANILLAS M. et al. Calcium phosphates for biomedical applications. **Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio**, Madrid, v. 56, p. 91-112, 2017.

CAO, Y.; WANG, B. **Biodegradation of Silk Biomaterials.** *Int. J. Mol. Sci.*, v.10, p.1514-1524, 2009.

CHANRLEY, J. **Acrylic cement in orthopaedic surgery**. Edinburgh and London: E & S Livingstone, 1970.

CHEN, K. Y. et al. **Reconstruction of calvarial defect using a tricalcium phosphate-oligomeric proanthocyanidins cross-linked gelatin composite**. *Biomaterials*, Surrey, v.30, n.9, p.1682-1688, 2009.

CHEN, X.; TAGUCHI, T. **Injectable, Non-Diffusible, and Pre-Filled Bone Paste Composed of α -Tricalcium Phosphate and Hydrophobically Modified Poly(Vinyl Alcohol)**. *Adv. Eng. Mater.* 1900660, 2019.

CHEVALIER, J., GREMILLARD, A. **The tetragonal-monoclinic transformation in Zirconia: Lessons learned and future trends**. *Journal of the American Ceramic Society*. V.92, 1901-1920, 2009.

CORRÊA, T. H. A. **Obtenção de biocimento a base de fosfato de cálcio nanoestruturado a partir de casca de ovo galináceo**. Tese (mestrado). Engenharia e Ciência dos Materiais – UENF/CCT. Campos dos Goytacazes, 2015.

COSTA, A.A.M. **Aspectos Funcionais e Biocompatibilidade de Blendas de Poli (épsilon-caprolactona) Associada à Hidroxiapatita e Tetraciclina no Modelo de Falha Óssea na Calvária de Rato**. Tese (mestrado). Universidade Federal de Itajubá – Minas Gerais, 2013.

COSTA, C. M. **Efeito da adição de alumínia nas propriedades químicas e mecânicas de biocerâmicas de apatitas manométricas sintetizadas via sol-gel**. Tese (mestrado). Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de materiais, 2014.

COSTA JR., E. S.; MANSUR, H. **Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido**. *Quim. Nova*, v. 31, n. 6, p. 1460-1466, 2008.

CROISIER, F.; JÉRÔME, C. **Chitosan-based biomaterials for tissue engineering**. *European Polymer Journal*, v. 49, n. 4, p. 780–792, 2013.

CROTEAU, S. et al. **Bone morphogenetic proteins in orthopaedics: from basic science to clinical practice**. *Orthopedics*, Thorofare, v.22, n.7, p.689-695, 1999.

CUNHA, I. S. **Desenvolvimento de substituto ósseo injectável para regeneração óssea**. Tese (mestrado). Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. Mestrado Integrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais. Porto, 2009.

CUNHA, M. A. **Síntese e caracterização da hidroxiapatita nanoestruturada obtidos por aspersão de solução em chama**. Dissertação (graduação). Universidade Federal do Rio grande do Sul. Engenharia de Materiais. Rio Grande do Sul, 2010.

DALMÔNICO, G. M. L. **Elaboração e caracterização de biomateriais granulados microporosos de fosfatos de cálcio: teste *in vivo* em ovinos**. Tese (doutorado). Universidade do Estado de Santa Catarina. Engenharia de Materiais. Santa Catarina, 2015.

DALMÔNICO, G. M. L. et al. **Elaboração e caracterização de biomateriais nanoestruturados de fosfato de cálcio granulados para aplicações odontológicas.** COLAOB – Natal/RN, 2012. [S.l.:s.n.].

DIAS, F. S. et al. **Um sistema simples para preparação de microesferas de quitosana.** Química Nova, vol.31, nº.1, 160-163, 2008.

DIFRAÇÃO de raio X. Laboratório de Física Moderna. Instituto de Física “Gleb Wataghin”. UNICAMP, Campinas. Disponível em: <<https://sites.ifi.unicamp.br/lfmoderna/conteudos/difracao-de-raio-x/>>. Acesso em: 27 de novembro de 2018.

DOROZHKIN, S. V. **Bioceramics of calcium orthophosphates.** Biomaterials. V. 31, p. 1465–1485, 2010.

DOROZHKIN, S. V. **Self-Setting Calcium Orthophosphate Formulations: Cements, Concretes, Pastes and Putties.** International Journal of Materials and Chemistry. v. 1, p. 1 - 48, 2011.

DOROZHKIN, S. V. **Calcium orthophosphate bioceramics.** Ceramics International. N. 41 p.13913 – 13966, 2015.

DOROZHKIN, S. V. **Multiphasic calcium orthophosphate (CaPO₄) bioceramics and their biomedical applications.** Ceramics International. N. 42, p. 6529–6554, 2016.

DRIESSENS F.C. **Probable phase composition of the mineral in bone.** Z. Naturfor. Sect. C. v. 35, p. 357–362, 1980.

DRIESSENS, F.C.M. et al. **Calcium Phosphates and Ceramic Bone Cements vs. Acrylic Cements,** Anales de Quimica, Int. Ed., v. 93, p. S38 - S43, 1997.

ENNEKING, W. F.; EADY, J. L.; BURCHARDT, H. **Autogenous cortical bone grafts in the reconstruction of segmental skeletal defects.** The Journal of Bone & Joint Surgery. American volume, Boston, v.62, n.7, p.1039-1058, 1980.

ESCOBAR, D.M.; JARAMILLO, C. **Preparação e avaliação de uma pasta óssea para aplicações médicas.** Rev.fac.ing.uni. Antioquia n.49. Medellín, Jul./Set., 2009.

FERNANDES, J.T. **Síntese de hidroxiapatita manométrica com PVC: sinterização e absorção de albumina bovina.** 2011. Tese (mestrado) Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2011.

FINISIE, M. R. **Preparação de pastas de biocerâmicas a partir de fosfatos de cálcio e quitosana aplicáveis em osteointegração.** Tese (mestrado) Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.

FONSECA, F.M. **Biocerâmicas porosas bifásicas e trifásicas à base de hidroxiapatita produzida por gelcasting.** Tese (mestrado) Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2007.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GIGLIOTTI, C. M. et al. **Design of experiment optimization of artificial bone construct fabrication via direct ink writing of hydroxyapatite**. Ceramics in Biology, Medicine and Human Health. Proceedings of the 12th Pacific Rim Conference on Ceramic and Glass Technology: Ceramic Transactions, v. 264, 2018.

GILAPA, C. L. **Elaboração e caracterização de um material biocerâmico à matriz de fosfato de cálcio produzido a partir de pó biocerâmico reciclado**. Tese (mestrado) Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, 2001.

GINEBRA, M. P.; DRIESSENS, F. C. M.; PLANELL, J. a. **Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cement: a kinetic analysis**. Biomaterials, v. 25, n. 17, p. 3453–62, 2004.

GINEBRA, M. P. et al. **Mechanical and rheological improvement of a calcium phosphate cement by the addition of a polymeric drug**. J Biomed Mater Res. v.57, p. 113-118, 2001.

GOMES, L. C. et al. **Síntese e caracterização de fosfatos de cálcio a partir da casca de ovo de galinha**. Cerâmica (58), 448-452, 2012.

GOUVEIA, D. S. **Obtenção de Pós Nanométricos de Hidroxiapatita Sintetizados com Magnésio Utilizando Ultra-Som**. Tese (doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2008.

GOY, R.C.; BRITTO, D.; ASSIS, O.B.G. **A review of the antimicrobial activity of chitosan**. Polímeros. v.19, nº. 3, São Carlos, 2009.

GRUNINGER, S.E., et al. **Evaluation of the biocompatibility of a new calcium phosphate setting cemen**. J. Dent. Res, v. 63, p. 200, 1984.

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

GUERRA-LOPEZ, J. R. et al. **Synthetic hydroxyapatites doped with Zn (II) studied by X-ray diffraction, infrared, Raman and thermal analysis**. Journal of Physics and Chemistry of Solids, Kidlington, v. 81, p. 57-65, Jun. 2015.

HABIB, M. et al. **Mechanisms underlying the limited injectability of hydraulic calcium phosphate paste**. Acta Biomaterialia. V. 4, p. 1465–1471, 2008.

HABITZREUTER, F. **Avaliação das características físico-químicas e citotóxicas de membranas de gelatina/quitosana com hidroxiapatita obtidas por precipitação *in situ***. Tese (mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP, Pirassununga, 2016.

HARAKAS, N. K. **Demineralized bone-matrix-induced osteogenesis.** Clinical Orthopaedics and Related Research, Philadelphia, p.239-251, 1984.

HE, L. Y.; DONG, G.; DENG, C. L. **Effects of strontium substitution on the phase transformation and crystal structure of calcium phosphate derived by chemical precipitation.** Ceramics International, Kidlington, v. 42, n. 10, p. 11918-11923, 2016.

HEATH, D. E.; COOPER, S. L.; **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine:** Polymers: Basic Principles. Ratner, B. D.; Hoffman, A. S.; Schoen, F. J.; Lemons, J. E., eds.; Academic Press: Oxford, 2013.

HENCH, L.L. **Bioceramics:** From Concept to Clinic. J. Am. Ceram. Soc. V.74. p. 1487 – 1510, 1991.

HUANG, Y. et al. **Formulation of α -Tricalcium Phosphate Bone Cement Based on na Alginate–Chitosan Gel System.** Cryst. Growth Des. v. 20, p. 1400–1404, 2020.

ISHIKAWA, K., **Effects of spherical tetracalcium phosphate on injectability and basic properties of apatitic cement.** Key Eng. Mater. p. 240–242, 2003. 369–372.

ILIZAROV, G. A. **The tension –stress effect on the genesis and growth of tissues:** part 1. The influence of the rate and frequency of distraction. Clinical Orthopaedics and Related Research, Philadelphia, v.238, p.249-290, 1989.

INSTITUTO DE MEDICINA BIOMOLECULAR. **Saiba mais sobre:** Fratura óssea. Diagnóstico por Imagem e Medicina Nuclear. Disponível em: <<http://imeb.com.br/saiba-mais-sobre-fratura-ossea/>>. Acesso em: 13 de novembro de 2018.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-5:** 2009 Biological Evaluation of Medical Devices–Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity. International Organization for Standardization, Geneva, 2009.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-12:** 2004 Biological evaluation of medical devices - Part 12: Sample preparation and reference materials. International Organization for Standardization, Geneva, 2004.

ITO, M. **In vitro properties of a chitosan-bonded hydroxyapatite bone-filling paste.** Biomateriais. V. 12, January, 1991.

JABUR, A. R. **Antibacterial activity and heavy metal removal efficiency of electrospun medium molecular weight chitosan/nylon-6 nanofibre membranes.** Biomedical Materials (Bristol), v. 13, n. 1, 2018.

JAFARI, S. et al. **Methylprednisolone acetate-loaded hydroxyapatite nanoparticles as a potential drug delivery system for treatment of rheumatoid arthritis:** in vitro and in vivo evaluations. European Journal of Pharmaceutical Sciences, Amsterdam, v. 91, p. 225-235, Aug. 2016.

JONATHAN Z. et al. **Improved Mechanical Properties of Chitosan Fibers**. Journal of Applied Polymer Science, 72, p. 1721 - 1732, 1999.

JUDAS, F. et al. **Estrutura e dinâmica do tecido ósseo**. 2012. Tese (mestrado). Clínica Universitária de ortopedia dos HUC-CHUC. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, 2012.

KAIGLER, D.; MOONEY, D. **Tissue engineering's impact on dentistry**. Journal of Dental Education, Washington, v.65, n.5, p.456-462, 2001.

KAWACHI, E. Y. et al. **Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de uma área interdisciplinar**. Química Nova, v. 23, n. 4, p.518-522, 2000.

KAWAKAMI, T. et al. **Experimental study on osteoconductive properties of a chitosan-bonded hydroxyapatite self-hardening paste**. Biomaterials, v.13, n. 11, 1992.

KELDER, C. et al. **The 3D Printing of Calcium Phosphate with K-Carrageenan under Conditions Permitting the Incorporation of Biological Components—A Method**. Journal of Functional Biomaterials. v.9, p. 57- 66, 2018.

KHAIROUN, I. et al. **Some factors controlling the injectability of calcium phosphate bone cements**. J Mater Sci Mater Med, v.9, p. 425–428, 1998.

KIM, D. W.; AN, J. S.; CHOC, I. S. **Effects of Mg and Sr co-addition on the densification and biocompatible properties of calcium pyrophosphate**. Ceramics International, N 44, p. 9689-9695, 2018.

KNABE C, et al. **Evaluation of calcium phosphates and experimental calcium phosphate bone cements using osteogenic cultures**. J Biomed Mater Res. Dec 5;52(3), p. 498-508, 2000.

KNAUL, J. Z.; HUDSON, S. M.; CREBER, K. A. M. Improved mechanical properties of chitosan fibers. **Journal of Applied Polymer Science**, Vv72, p. 1721 - 1732, 1999.
DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19990624\)72:13<1721::AID-APP8>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19990624)72:13<1721::AID-APP8>3.0.CO;2-V)

KONOPKA, K. et al. **Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection increases the sensitivity of macrophages and THP-1 cells to cytotoxicity by cationic liposomes**. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research, Amsterdam, v. 1312, n. 3, p. 186-196, Jul. 1996.

KOVACH, I. et al. **Nano-porous calcium phosphate balls**. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. v. 132, p. 246 – 252, 2015.

KREBS, J. et al. **Clinical measurements of cement injection pressure during vertebroplasty**. Spine. v. 30, p. 118–22, 2005.

KRETLOW, J. et al. **Injectable biomaterials for regenerating complex craniofacial tissues**. Adv. Mater, v. 21, p. 3368–93, 2009.

KUMARI, T.V. et al. **Cell surface interactions in the study of biocompatibility.** Trends Biomater. Artif. Organs, v.15, n.2, p.37- 41, 2002.

LANGER, R. VACANTI, J. P. **Tissue engineering.** Science. Washington, v. 260, n. 5110, p. 920-926, 1993.

LEAL, C.V. **Desenvolvimento e Avaliação *In Vitro* de um Cimento de Fosfato de Cálcio.** 102f. Tese (mestrado) – UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

LEGEROS, R. Z. et al. **Consequences of Fluoride Incorporation on Properties of Apatites.** Key Engineering Materials. p. 697-700, 2006.

LEROUX, L. et al. **Effects of Various Adjuvants (Lactic acid, Glycerol, and Chitosan) on the Injectability of a Calcium Phosphate Cement.** Bone 25, v. 2, p. 31-34, 1999.

LIU, H. et al. **Novel injectable calcium phosphate/chitosan composites for bone substitute materials.** Journals Acta Biomaterialia, v.2, p. 557–565, 2006.

LOPES, S. et al. **Preparation and characterization of alginate and gelatin microcapsules containing *Lactobacillus rhamnosus*.** Annals of the Brazilian Academy of Sciences, n. 89, v.3, p. 1601-1613, 2017.

M. NEHDI, M.-A. RAHMAN. **Estimating rheological properties of cement pastes using various rheological models for different test geometry, gap and surface friction.** Cement and Concrete Research. v. 34, p. 1993-2007, 2004.

MALKIN, A.; ISAYEV, A. **Rheology: Concepts, Methods and Applications.** Toronto: ChemTec Publishing. p. 241, 2006.

MANSOS, P. A. O. **Produção de cimentos ósseos à base de fosfato de cálcio.** 2008. Tese (mestrado) – Escola de Engenharia Biomédica, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2008.

MARINS, L. V. et al. **Radiografic and histological study of perennial bone defect repair in rat calvaria after treatment with blocks of porous bovine organic graft material.** Journal of Applied Oral Science, Bauru, v.12, n.1, p. 62- 69, 2004.

MATAMOROS-VELOZA, A. et al. **Formulating injectable pastes of porous calcium phosphate glass microspheres for bone regeneration applications.** Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, v. 102, 2020.

MOURA, D. L.; GUARRUÇO, A.R.F. **Transformação maligna na osteomielite crônica.** Revista Brasileira de Ortopedia, v. 52, n. 2, p. 141-147, 2017.

MURUNGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. **Development of nanocomposites for bone grafting.** Composites Science and Technology, v. 65, p. 2385-2406, 2005.

MURUNGAN, R. et al. **Hydroxyl Carbonateapatite Hybrid Bone Composites Using Carbohydrate Polymer.** Journal of Composite Materials, v. 39, n. 13, 2005.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T.; **Polymers for biomedicine**: synthesis, characterization, and applications. Prog. Polym. Sci., v. 32, p. 762, 2007.

NAVARRO, M. et al. **Biomaterials in orthopaedics**. Journal of the Royal Society Interface, London, v.5, p. 1137-1158, 2008.

NEUMANN, D. A. **Cinesiologia do Aparelho Musculoesquelético**: Fundamentos para Reabilitação. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018.

NEWMAN, M. et al. **Carranza Periodontia Clínica**. Ed. 11, Brasil: Elsevier, p.882, 2012.

OLIVEIRA, F. P. **Influência do processamento na obtenção de biocerâmicas a base de hidroxiapatita**. Tese (mestrado) Programa de Pós-graduação em Química Aplicada. Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2008.

OLIVEIRA, R.; MOTISUKE, M. **Using round α -TCP granules for improving CPC injectability**. Mater. Res. Express, v. 6, n. 125407, 2019.

O'NEILL, R. et al. **Extent and mechanism of phase separation during the extrusion of calcium phosphate pastes**. J Mater Sci: Mater Med, p. 1-13, 2016.

O'NEILL, R. et al. **Critical review**: Injectability of calcium phosphate pastes and cements. Acta Biomaterialia, p. 50, p. 1–19, 2017.

PAVIA, D. et al. **Introdução à Espectroscopia**, Ed. Cengage Learning, 2010.

PEREIRA A. P. V., VASCONCELOS W. L. E ORÉFICE R L. **Novos biomateriais**: Híbridos Orgânico-Inorgânicos Bioativos. Polímeros: Ciência e Tecnologia 9, p. 104-109, 1999.

PEREIRA, C.I. **Osteomielite**: infecção no osso. MediFoco. Disponível em: <<https://medifoco.com.br/osteomielite-infeccao-no-osso/>>. Acesso em: 13 de novembro de 2018.

PEREIRA, T. C. S.; SANTOS, G. R.; FERNANDES, G. A. **Síntese de beta fosfato tricálcico, por reação de estado sólido, para uso biomédico**. XI Congresso de Engenharia Química em Iniciação Científica – UNICAMP-SP, Campinas, 2015.

PEREIRA, W.A. **Manual de transplante de órgãos e tecidos**. Medsi Editora Médica e Científica Ltda. 2ª.ed. c.19, 2000.

PINTO, P. G. **Comparação entre a estrutura porosa do ProOsteon® 200 e Hydroset™**. Tese (mestrado). Universidade Ibirapuera, São Paulo, 2012.

PIRES, A.L.R.; BIERHALZ, A.C.K.; MORAES, A.M. **Biomateriais**: tipos, aplicações e mercado. Quim. Nova. v. 38, nº. 7, p. 957-971, 2015.

QIAO, P. et al. **Injectable calcium phosphate–alginate–chitosan microencapsulated MC3T3-E1 cell paste for bone tissue engineering in vivo**. Department of Prosthodontics, Peking University School and Hospital of Stomatology, Beijing 100081, China, Materials Science and Engineering C. p. 4633-4639, 2013.

RADIOLOGIAPATOLÓGICA. 2017. Disponível em:
<https://radiologiapatologicablog.wordpress.com/2017/01/21/classificacao-das-fraturas/>
 Acesso em: 13 de novembro de 2018.

RAMALHO, E. G. **Obtenção de cerâmicas à base de tricálcio fosfatos utilizando óxido de manganês como aditivo**. 2006. 72f. Tese (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2006.

RATNER, R. D. et al. **Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine**. 2ªed. Elsevier, 2004.

RENÓ, C. O. **Grânulos de fosfato de cálcio co-dopado com silício e estrôncio: estudo da injetabilidade do cimento ósseo e aplicação na manufatura aditiva**. 2017. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia e Ciência de Materiais. Universidade Federal de São Paulo – São José dos Campos, 2017.

RIBEIRO, G. C.; RIBEIRO, J. A.; RODRIGUES, **Tenacidade à fratura de cerâmicas de carbetto de silício, alumina e argila vermelha pelos métodos IF e SEVNB**. Cerâmica, v. 60, p. 509-515, 2014.

RIGO, E.C.S. et al. **Melhoramento microestrutural de cimento ósseo de fosfato de cálcio de dupla-pegas**. Anais do 45º Congresso Brasileiro de Cerâmica, Florianópolis, 2001.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. **Teste *in vitro* de citotoxicidade**: Estudo comparativo entre duas metodologias. Materials Research, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

ROGINA, A. et al. **In situ hydroxyapatite content affects the cell differentiation on porous chitosan/hydroxyapatite scaffolds**. Annals of Biomedical Engineering, New York, v. 44, n. 4, p. 1107-1119, 2016.

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

SALEHI, G. et al. **Synergistic effects of carbohydrate polymers on the performance of hybrid injectable bone pastes**. European Polymer Journal, v.119, p. 523–530, 2019.

SANTANA, R.C. **Análise instrumental aplicada a polímeros**. Projeto EAD. UFRGS, 2009.

SANTIN, M. et al. **Effect of PMMA cement radical polymerisation on the inflammatory response**. Mater. Med., v. 5, p. 1175–80, 2004.

SANTOS, K.S. **Biomateriais na Regeneração Óssea**. Seminário (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Goiania, 2011.

SANTOS, L. A.; CARROUDÉGUAS, R. G.; ROGERO, S. O.; HIGA, O. Z.; BOSCHI, A. O.; ARRUDA, A. C. F. **α - Tricalcium phosphate cement: —in vitro cytotoxicity**. **Biomaterials**, v. 23, p. 2035-2042, 2002.

SCATOLINI, A.M. **Estudo de hidroxiapatita contendo própolis de origem brasileira: caracterização, atividade antimicrobiana e efeito citotóxico dos materiais.** Tese (mestrado) – faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

SHAVANDI, A. et al. **Injectable gel from squid pen chitosan for bone tissue engineering applications.** J Sol-Gel Sci Technol. v. 77, p. 675 – 687, 2016.

SHEIKH, Z. et al. **Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications.** Journal Materials, v. 8, p. 5744-5794, 2015.

SILVA, A.R.S. et al. **Análise da densidade óssea radiográfica de ratos submetidos ao alcoolismo crônico utilizando imagem digital.** Rev. Odonto Cienc., v.22, n.55, p.77-81, 2007.

SINGH, S. **Partial Oxidation of n-Pentane over Vanadium phosphorus oxide supported on hydroxyapatites.** South African Journal of Chemistry-Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Chemie, Pretoria, v. 69, p. 1-8, 2016.

SIONKOWSKA, A. **Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials:** Review. Progress in Polymer Science (Oxford), v. 36, n. 9, p. 1254–1276, 2011.

SIONKOWSKA, A; KOZLOWSKA, J. **Properties and modification of porous 3-D collagen/hydroxyapatite composites.** International Journal of Biological Macromolecules. V. 52, p. 250-259, 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA- REGIONAL SÃO PAULO. 16 de outubro de 2017. Acesso disponível em :<
<https://www.sbemsp.org.br/para-o-publico/noticias/116-conheca-os-numeros-da-osteoporose>>. Acesso em 09 de junho de 2020.

SOCIEDADE PORTUGUESA DE REUMATOLOGIA, **Jornal Aurinegra**, edição 13 de novembro, 2018.

SOLOMONS, T.W.G. **Química orgânica: espectrografia infravermelho.** 8ª ed. v.1. LTC: Rio de janeiro, 2005.

SOUZA, E. V. et al. **Caracterização de biomaterial à base de hidroxiapatita e biopolímeros para aplicação biomédica.** VII CONNEPI – Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação. Palmas - Tocantis, 2012.

SOUZA, P.A. **Patologia Óssea.** FAINOR - Faculdade Independente do Nordeste. Curso de Enfermagem, Vitória da Conquista, 2018.

TAK, W. S.; RYU, S. C. **The Methylcellulose/Hydroxyapatite composite for bone graft.** Advanced Composite Materials, 2020.

TANG, Z. et al. **The material and biological characteristics of osteoinductive calcium phosphate ceramics**. National Engineering Research Center for Biomaterials, Sichuan University, Chengdu 610064, P.R. China. *Regen Biomaterial*, v.5, n.1, p. 43-59, 2018.

TAVARIA, F.K. et al. **A quitosana como biomaterial odontológico: estado da arte**. *Rev. Bras. Eng. Biomed.* v. 29, nº.1, p. 110-120, 2013.

TEMENOFF, J. S.; MIKOS, A. G. **Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering**. *Biomaterials*, v. 21, p. 2405–12, 2000.

TIAN, H. et al. **Polymers for biomedicine: synthesis, characterization, and applications**. *Prog. Polym. Sci.*, v. 37, p. 237, 2012.

TONHI, E.; PLEPIS, A. M. de G. **Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana**. *Química Nova*, v. 25, n. 6, p. 943–948, 2002.

TORTORA, G. J.; GRABOWSKI, S. R. **Princípios de Anatomia e Fisiologia**. 9ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogans S.A., 2002.

TORTORA, G.J.; DERRICKSON, B. **Corpo Humano: Fundamentos de anatomia e fisiologia**. 8ªed. Artmed Editora, 2012.

TURRER, C.L.; FERREIRA, F.P.M. **Biomateriais em cirurgia craniomaxilofacial: princípios básicos e aplicações**. *Rev. Bras. Cir. Plást.* v.23, n.3, p. 234-239, 2008.

VERNON, B. **Injectable biomaterials: Science and applications**. 1sted. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2011.

VILLA, M. et al. **Bone tissue engineering with a collagen–hydroxyapatite scaffold and culture expanded bone marrow stromal cells**. *J Biomed Mater Res B*. p. 243–253, 2014.

VOGEL, A. **Química Analítica Qualitativa**. 5.^a ed. São Paulo: Mestre Jou, 1981.

WAN, D. C.; NACAMULI, R. P.; LONGAKER, M. T. **Craniofacial bone tissue engineering**. *Dental Clinics of North American*, Philadelphia, v.50, n.2, p.175-190, 2006.

WANG, X., YINONG, Y., HE, B. **Structural characterization of phosphorylated chitosan and their applications as effective additives of calcium phosphate cements**. *Biomaterials*, v. 22, p. 2247-2255, 2001.

WANG, X. et al. **Influence of anti-washout agents on the rheological properties and injectability of a calcium phosphate cement**. *J. Biomed. Mater. Res.* 81B, p. 410–418, 2007.

WILLIAMS, D. F. **Definitions in Biomaterials: proceedings of a consensus conference of European Society for Biomaterials**. 1ª ed. Amsterdã: Elsevier, 1986.

WILLIAMS, D. F. **On the nature of biomaterials**. *Biomaterials*. V. 30, p. 5897–5909. Elsevier, 2009.

WILLIAMS, D.; ZHANG, X. **Biomaterials for the Twenty-First Century** – Proceedings of a consensus conference. Elsevier, 2018.

WILLIAMS, D.; ZHANG, X. **Biomaterials for the Twenty-First Century** – A volume in Materials Today. Elsevier, 2019.

XU H. et al. **Injectable and macroporous calcium phosphate cement scaffold**. Biomaterils. V. 27, p. 4279–8, 2006.

YU, T. et al. **Synthesis and Drug Delivery Property of Calcium Phosphate Cement with Special Crystal Morphology**. J. Am. Ceram. Soc., n. 93, p. 1241–1244, 2010.

YUASA, T. et al. **Effects of cements on proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro**. Biomaterials, v. 25, p. 1159-1166, 2004.

ZAVAGLIA, F. C.; **Síntese, Caracterização e Processamento de Beta Fosfato Tricálcico para Manufatura de Implantes Personalizados**. Tese (mestrado) – Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2011.

ZHANG, C. Y. et al. **Nano-alumina/hydroxyapatite composite powders prepared by in-situ chemical precipitation**. Ceramics International, Kidlington, v. 42, n. 1, p. 279-285, 2016.