

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MINAS,  
METALÚRGICA E DE MATERIAIS**

**MÔNICA BEATRIZ THÜRMER**

**ALFA-FOSFATO TRICÁLCICO OBTIDO POR REAÇÃO VIA ÚMIDA PARA  
APLICAÇÃO EM CIMENTOS ÓSSEOS E CIMENTOS COMPÓSITOS**

**Porto Alegre  
2014**

**MÔNICA BEATRIZ THÜRMER**

**ALFA-FOSFATO TRICÁLCICO OBTIDO POR REAÇÃO VIA ÚMIDA PARA  
APLICAÇÃO EM CIMENTOS ÓSSEOS E CIMENTOS COMPÓSITOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais - PPGE3M da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia.

Área de Concentração: Ciências dos Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Luís Alberto dos Santos

Porto Alegre

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Reitor: Carlos Alexandre Netto

Vice-Reitor: Rui Vicente Oppermann

ESCOLA DE ENGENHARIA

Diretor: Luiz Carlos Pinto da Silva Filho

Vice-Diretora: Carla Schwengber ten Caten

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

Coordenador: Telmo Roberto Strohaecker

Vice-Coordenador: Carlos Pérez Bergmann

Thürmer, Mônica Beatriz  
ALFA-FOSFATO TRICÁLCICO OBTIDO POR REAÇÃO VIA  
ÚMIDA PARA APLICAÇÃO EM CIMENTOS ÓSSEOS E CIMENTOS  
COMPÓSITOS / Mônica Beatriz Thürmer. -- 2014.  
167 f.

Orientador: Luís Alberto dos Santos.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Escola de Engenharia, Programa de Pós-  
Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de  
Materiais, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Poli (N-vinil-2-pirrolidona). 2. poli (Ácido  
acrílico). 3. poli (N-vinil-2-pirrolidona-co-ácido  
acrílico). 4. cimentos de fosfato de cálcio. 5.  
biomateriais compósitos. I. dos Santos, Luís Alberto,  
orient. II. Título.

**MÔNICA BEATRIZ THÜRMER**

**ALFA-FOSFATO TRICÁLCICO OBTIDO POR REAÇÃO VIA ÚMIDA PARA  
APLICAÇÃO EM CIMENTOS ÓSSEOS E CIMENTOS COMPÓSITOS**

Esta Tese foi analisada e julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Engenharia, área de concentração em Ciência dos Materiais, e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora designada pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Luís Alberto dos Santos

Aprovada em: 03/10/2014.

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof. Dr. José Ramon Jurado Egea

Profa. Dra. Mariana Motisuke

Prof. Dr. Tiago Moreno Volkmer

Aos meus pais, por todo amor, apoio e dedicação, na  
minha formação e na minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meu caminho e me dar forças.

Aos meus queridos pais pelo amor e apoio incondicionais e sem os quais não teria sido possível a chegada até esta etapa de minha vida acadêmica.

À minha família pelo amor, apoio e compreensão nos momentos de ausência.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Minas, Metalúrgica e de Materiais pelo excelente ensino e oportunidade de realização deste trabalho.

Ao CNPq e à CAPES pelo suporte financeiro e pela bolsa de doutorado sanduíche que permitiu minha estadia em Portugal.

Ao Prof. Dr. Luís Alberto dos Santos pela orientação, ensinamentos, apoio, confiança, amizade e pelo incentivo e motivação para nunca desistir perante as dificuldades e desafios.

Ao Carlos Eduardo Diehl por toda sua dedicação durante a realização deste trabalho, pelo apoio incondicional, incentivo, compreensão, cumplicidade, companheirismo e também pela grande amizade.

Aos colegas e amigos do LABIOMAT, do PPGE3M e da UFRGS pela troca de experiências, pela ajuda, pelos momentos de descontração e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Rui L. Reis e ao Dr. Ricardo A. Pires pela oportunidade e orientação em Portugal.

Aos colegas e amigos do Grupo de Pesquisas 3B's pela recepção, apoio, amizade, companheirismo e ensinamentos, pelos momentos de descontração, pelas aventuras e por terem tornado minha jornada menos árdua durante minha estadia no exterior.

Aos amigos e pessoas especiais que esta jornada de vida permitiu encontrar.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

*“Não fiquem maravilhados diante do novo, nem assustados pelo que ontem vos era desconhecido...  
Não recuem diante do mistério, mas procurem enfrentá-lo e desvendá-lo...  
Não se considerem os únicos donos da verdade e do conhecimento, pois um diploma não faz o cientista.  
Somente assim poderão cumprir sua missão, ser úteis ao próximo...  
E façam tudo com amor, pois será um dia esplêndido aquele em que, dos progressos da ciência, participará também o coração”*

Louis Pasteur (1822 – 1895)

## RESUMO

Nos últimos anos, intensos estudos vêm sendo realizados no que se refere a substitutos ósseos biocompatíveis e absorvíveis, notadamente os cimentos ósseos de fosfato de cálcio, para cirurgias de reconstrução e em engenharia de tecidos. Porém os cimentos de fosfato de cálcio desenvolvidos apresentam baixa resistência mecânica quando comparados com os ossos do corpo humano. Neste contexto, a busca por alternativas para minimizar esse problema tem se intensificado. A obtenção de alfa-fosfato tricálcico por outras rotas de síntese, bem como o desenvolvimento de compósitos de fosfatos de cálcio e hidrogéis têm se destacado nesse ramo. O preparo destes compósitos permite combinar excelentes propriedades como: i) osteocondutividade e capacidade de formar ligações com o tecido ósseo proporcionado pelos fosfatos de cálcio e ii) facilidade de adesão e distribuição de células no interior de *scaffolds*, proporcionado pelo hidrogel. O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de uma nova metodologia de obtenção de alfa-fosfato tricálcico, o preparo de composições de cimentos de fosfato de cálcio e de hidrogéis, bem como a obtenção e caracterização de compósitos destes, visando o melhoramento das propriedades para aplicação como biomaterial. Foi possível sintetizar alfa-fosfato tricálcico com elevado grau de pureza, utilizando-se o método de reação via úmida. Após estudos da ordem de adição e concentração dos reagentes foi possível definir os melhores parâmetros de síntese. Com isso verificou-se a influência do tempo de moagem nas propriedades dos cimentos, sendo constatado que para o fosfato de cálcio preparado pela metodologia proposta, não há necessidade de moagem adicional. Foram testadas formulações de hidrogéis utilizando N-vinil-2-pirrolidona e/ou ácido acrílico, utilizando três iniciadores: azobisisobutironitrila, persulfato de amônio e 1-hidroxiclohexil fenil cetona. Pela adição de formulações de hidrogéis ao cimento foi possível obter compósitos com maior absorção de água, mantendo as propriedades mecânicas, o que pode permitir uma melhor adesão celular ao implante sem comprometer sua estrutura. O ensaio de citotoxicidade *in vitro* demonstrou que o cimento sintetizado neste trabalho não apresentou efeito tóxico para as células. Mostrando, ainda, a adesão e proliferação de células-tronco mesenquimais e de uma linhagem de osteoblastos.

**Palavras-chave:** Poli (N-vinil-2-pirrolidona); poli (Ácido acrílico); poli (N-vinil-2-pirrolidona-co-ácido acrílico); reação via úmida; fosfato de cálcio; cimentos de fosfato de cálcio; biomateriais compósitos.

## ABSTRACT

In the last years, intensive studies have been conducted regarding the biocompatible and resorbable bone substitutes, notably calcium phosphate bone cements, for reconstructive surgery and tissue engineering. However, the calcium phosphate cements developed exhibit low mechanical strength when compared with the bones of the human body. In this context, the search for alternatives to minimize this problem has intensified. The obtaining of alpha-tricalcium phosphate by others synthesis routes, as well as development of calcium phosphate and hydrogels composites has been prominent in this branch. The preparation of these composites allows to combine excellent properties such as: i) osteoconductivity and ability to form bonds with bone tissue, afforded by calcium phosphate and ii) ease of adhesion and distribution of cells in the scaffolds inside, provided by hydrogel. The aim of this work was the development of a new methodology to obtaining alpha-tricalcium phosphate, the preparation of calcium phosphate cements and hydrogels compositions, as well as the obtaining and characterization of composites of these, intended to improve the properties for application as biomaterial. It was possible to synthesize alpha-tricalcium phosphate with high purity using the wet method reaction. After studies of the addition order and reagents concentration was possible to define the best synthesis parameters. With that it was verified the influence of milling time on the cements properties to being noted that for the calcium phosphate prepared by the proposed method, there is no need additional milling. Were tested hydrogel formulations using N-vinyl-2-pyrrolidone and/or acrylic acid, using three initiators: azobisisobutyronitrile, ammonium persulfate and 1-hydroxycyclohexyl phenyl ketone. By the addition of the hydrogel formulations to the cement was possible to obtain composites with higher water absorption by keeping the mechanical properties, which may permits better vascularization of the implant without compromising its structure. The *in vitro* cytotoxicity assay demonstrated that the cement synthesized in this work does not show any toxic effect on the cells. Also, showing the adhesion and proliferation of mesenchymal stem cells and an osteoblast line.

**Keywords:** Poly (N-vinyl-2-pyrrolidone); poly (acrylic acid); poly (N-vinyl-2-pyrrolidone-co-acrylic acid); wet method reaction; calcium phosphate; calcium phosphate cements; composite biomaterials.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1. Concentrações das espécies iônicas formadas no equilíbrio triprótico para soluções de ácido fosfórico em função do pH. Figura adaptada de Lynn e colaboradores (LYNN <i>et al.</i> , 2004). .....	34
Figura 3.2. Diagrama de fases do sistema CaO-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (C=CaO, P=P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) a elevadas temperaturas (por exemplo: C <sub>7</sub> P <sub>5</sub> representa 7CaO.5P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ). Cada linha representa um limite de fase (DOROZHKIN, 2012). .....	37
Figura 3.3. Estrutura do osso longo com uma ampliação do osso cortical (LIFE, 2002). .....	38
Figura 3.4. Modelo representativo das estruturas dos hidrogéis (MOREIRA, 2011). .....	41
Figura 3.5. Estrutura da PVP. ....	44
Figura 3.6. Alguns monômeros multifuncionais para reticular polímeros de PVP. ....	45
Figura 3.7. Estrutura do AA .....	47
Figura 3.8. A influência da arquitetura do <i>scaffold</i> na adesão e proliferação celular. Figura adaptada de Stevens e George (2005). .....	50
Figura 4.1. Fluxograma das etapas utilizadas para obtenção dos cimentos. ....	58
Figura 4.2. Fluxograma das etapas utilizadas para obtenção dos cimentos. ....	59
Figura 5.1. Difratomogramas de raios X para os pós obtidos pelo método 1, calcinados nas diferentes temperaturas, sendo $\alpha$ para $\alpha$ -TCP. ....	81
Figura 5.2. Difrátograma de raios X para o pó obtido pelo método 2, calcinado a temperatura de 1300°C (FT-04), sendo $\alpha$ para $\alpha$ -TCP e $\gamma$ para pirofosfato de cálcio. ....	82
Figura 5.3. Difratomogramas de raios X para os pós obtidos pelo método 3, calcinados nas diferentes temperaturas, sendo $\alpha$ para $\alpha$ -TCP e $\beta$ para $\beta$ -TCP. ....	82
Figura 5.4. Espectros de infravermelho das amostras obtidas após calcinação. ....	83
Figura 5.5. Morfologia do pós obtido (FT-03): a) aumento de 500X e b) aumento de 1000X. ....	84
Figura 5.6. Difratomogramas de raios X para os pós obtidos, sendo $\alpha$ para $\alpha$ -TCP e $\theta$ para oxiapatita. ....	85
Figura 5.7. Micrografias da superfície de fratura das amostras a) FT-10, b) FT-11, c) FT-12 e d) FT-13, e) FT-14 e f) FT-15, com aumento de 5000X. ....	87
Figura 5.8. Padrão de difração de raios X para amostra FT-15-00. ....	88
Figura 5.9. Micrografias da superfície de fratura das amostras (a) FT-15-00, (b) FT-15-05, (c) FT-15-1, (d) FT-15-2, (e) FT-15-4, (f) FT-15-8 e (g) FT-15-16. ....	92
Figura 5.10. Curva termogravimétrica (a) e derivada da curva termogravimétrica (b) obtida para os hidrogéis, em nitrogênio. ....	94

Figura 5.11. Termogramas dos hidrogéis obtidos por calorimetria exploratória diferencial. .	95
Figura 5.12. Espectros de infravermelho dos hidrogéis.....	96
Figura 5.13. Possível estrutura para hidrogéis de NVP reticulados em presença de MBAM. .....	100
Figura 5.14. Estrutura de hidrogéis de ácido acrílico reticulados em presença de MBAM...	101
Figura 5.15. Estrutura de hidrogéis de PVP/PAA reticulados em presença de MBAM.....	102
Figura 5.16. Quociente de equilíbrio de inchamento em água. ....	103
Figura 5.17. Micrografias da superfície de fratura das amostras (a) FT-a, (b) FT-H1, (c) FT-H2, (d) FT-H3 e (e) FT-H4, respectivamente.....	109
Figura 5.18. Padrões de difração de raios X obtidos para amostras após imersão em SBF. .	110
Figura 5.19. Micrografia da superfície de fratura das amostras FT-b (a) e FT-c (b).....	113
Figura 5.20. Micrografias da superfície de fratura das amostras (a) FT-H5, (b) FT-H6 e (c) FT-H7.....	114
Figura 5.21. Micrografias da superfície de fratura das amostras (a) FT-H8, (b) FT-H9 e (c) FT-H10.....	114
Figura 5.22. Micrografias da superfície de fratura das amostras (a) FT-H11, (b) FT-H12 e (c) FT-H13.....	115
Figura 5.23. Resistência mecânica à compressão do cimento de fosfato de cálcio.....	118
Figura 5.24. Micrografias de superfície das amostras preparadas com $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,5% imersas em SBF por: a) 0 dias, b) 1 dia, c) 7 dias, d) 14 dias, e) 21 dias e f) 28 dias. ....	119
Figura 5.25. Micrografias de superfície das amostras preparadas com $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5,0% imersas em SBF por: a) 0 dias, b) 1 dia, c) 7 dias, d) 14 dias, e) 21 dias e f) 28 dias. ....	120
Figura 5.26. Padrões de difração de raios X obtidos para amostras preparadas com $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,5% , após imersão em SBF, sendo $\alpha$ : alfa-TCP e H: hidroxiapatita. ....	123
Figura 5.27. Padrões de difração de raios X obtidos para amostras preparadas com $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5,0% , após imersão em SBF, sendo $\alpha$ : alfa-TCP e H: hidroxiapatita. ....	123
Figura 5.28. Concentração de cálcio na solução de SBF contendo as amostras, em função do tempo de imersão. ....	124
Figura 5.29. Concentração de fósforo na solução de SBF contendo as amostras, em função do tempo de imersão. ....	125
Figura 5.30. Resistência mecânica das amostras imersas em PBS.....	128
Figura 5.31. Morfologia da superfície das amostras preparadas com $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,5%, submetidas ao ensaio de degradação por: a) 3 dias, b) 7 dias, c) 14 dias, d) 30 dias, e) 60 dias e f) 90 dias. ....	129
Figura 5.32. Morfologia da superfície das amostras preparadas com $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5,0%,	

submetidas ao ensaio de degradação por: a) 3 dias, b) 7 dias, c) 14 dias, d) 30 dias, e) 60 dias e f) 90 dias. ....	130
Figura 5.33. Tamanho médio de poro das amostras submetidas ao ensaio de degradação....	133
Figura 5.34. Porosidade das amostras submetidas ao ensaio de degradação. ....	133
Figura 5.35. Interconectividade dos poros. ....	134
Figura 5.36. Concentração de cálcio na solução de PBS contendo as amostras, em função do tempo de imersão. ....	135
Figura 5.37. Concentração de fósforo na solução de PBS contendo as amostras, em função do tempo de imersão. ....	135
Figura 5.38. Atividade metabólica (viabilidade) das células L929 cultivadas em contato direto com as amostras, durante diferentes tempos de cultivo. ....	136
Figura 5.39. Quantificação da taxa de proliferação das células L929 cultivadas em contato direto com as amostras, após diferentes períodos de cultivo. ....	137
Figura 5.40. Disposição espacial das células L929 após diferentes períodos de cultivo, sendo a) 1 dia, b) 3 dias, c) 7 dias do controle (células), d) 1 dia, e) 3 dias, f) 7 dias submetidas às amostras preparadas com $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,5% e g) 1 dia, h) 3 dias e i) 7 dias submetidas às amostras preparadas com $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5,0% . ....	138
Figura 5.41. Atividade metabólica (viabilidade) das células MSC's, após diferentes períodos de cultivo. ....	140
Figura 5.42. Atividade metabólica (viabilidade) das células SAOS-2, após diferentes períodos de cultivo. ....	140
Figura 5.43. Quantificação da taxa de proliferação de células MSC's, após diferentes períodos de cultivo. ....	141
Figura 5.44. Quantificação da taxa de proliferação de células SAOS-2, após diferentes períodos de cultivo. ....	142
Figura 5.45. Micrografias das células MSC's fixadas nas amostras em diferentes períodos de cultivo celular <i>in vitro</i> : a) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,5% - 1 dia, b) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5,0% - 1 dias, c) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,5% - 3 dias, d) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5,0% - 3 dias, e) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,5% - 7 dias e f) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5,0% - 7 dias. ....	144
Figura 5.46. Micrografias das células SAOS-2 fixadas nas amostras em diferentes períodos de cultivo celular <i>in vitro</i> : a) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,5% - 1 dia, b) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5,0% - 1 dia, c) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,5% - 3 dias, d) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5,0% - 3 dias, e) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,5% - 7 dias e f) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5,0% - 7 dias. ....	145
Figura 5.47. Morfologia e distribuição das células MSC's na superfície das amostras, sendo: a) 1 dia, c) 3dias, e) 7 dias, das amostras preparadas com $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,5% e b) 1 dia, d)	

3dias, f) 7 dias, das amostras preparadas com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5,0%..... 146

Figura 5.48. Morfologia e distribuição das células SAOS-2 na superfície das amostras, sendo:

a) 1 dia, c) 3dias, e) 7 dias, das amostras preparadas com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2,5% e b) 1 dia, d)

3dias, f) 7 dias, das amostras preparadas com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5,0%..... 147

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Compostos de fosfato de cálcio (adaptado de DOROZHKIN, 2011).....	32
Tabela 3.2. Propriedades mecânicas dos ossos (KOKUBO, 2003).....	39
Tabela 3.3. Aplicações de hidrogéis em engenharia de tecidos (adaptado de SLAUGHTER <i>et al.</i> , 2009). .....	42
Tabela 3.4. Crescimento tecidual, para células ósseas, de acordo com o tamanho dos poros (KARAGEORGIU & KAPLAN, 2005; WHANG <i>et al.</i> , 1999).....	52
Tabela 4.1. Metodologias de precipitação química. ....	58
Tabela 4.2. Tempo de moagem e identificação das amostras. ....	60
Tabela 4.3. Razão líquido/pó empregada para o preparo dos cimentos.....	60
Tabela 4.4. Composição iônica do SBF, baseada na norma ISO 23317.....	60
Tabela 4.5. Composição percentual, em massa, dos hidrogéis. ....	62
Tabela 4.6. Composição percentual, em massa, dos hidrogéis. ....	62
Tabela 4.7. Composição percentual, em massa, da fase líquida utilizada na preparação dos cimentos. ....	63
Tabela 4.8. Composição percentual, em massa, da fase líquida utilizada na preparação dos cimentos. ....	64
Tabela 5.1. Distribuição e tamanho médio de partículas (TMP) dos pós .....	84
Tabela 5.2. Resistência mecânica dos corpos de prova, após imersão em SBF.....	86
Tabela 5.3. Tamanho médio de partículas dos pós obtidos.....	89
Tabela 5.4. Resistência à compressão, porosidade e densidade aparente dos corpos de prova. ....	90
Tabela 5.5. Características térmicas dos hidrogéis.....	95
Tabela 5.6. Propriedades dos hidrogéis.....	100
Tabela 5.7. Parâmetros da rede polimérica, determinados através do estudo do inchamento dos hidrogéis.....	104
Tabela 5.8. Porosidade aparente, densidade aparente e absorção de água das amostras. ....	107
Tabela 5.9. Resistência mecânica à compressão das amostras.....	108
Tabela 5.10. Porosidade aparente, densidade aparente e absorção de água das amostras preparadas com AIBN.....	110
Tabela 5.11. Porosidade aparente, densidade aparente e absorção de água das amostras preparadas com AP ou HCPK. ....	111
Tabela 5.12. Resistência mecânica à compressão das amostras úmidas, preparadas com AIBN. ....	112

Tabela 5.13. Resistência mecânica à compressão das amostras úmidas, preparadas com AP ou HCPK. ....	112
Tabela 5.14. Influência da concentração da solução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , no tempo de pega dos cimentos. ....	116
Tabela 5.15. Porcentagem atômica de cálcio e fósforo na superfície das amostras e relação Ca/P. ....	122
Tabela 5.16. Absorção de água e perda de massa das amostras imersas em PBS. ....	127
Tabela 5.17. Microtomografia das amostras preparadas com $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,5%, submetidas ao ensaio de degradação. ....	131
Tabela 5.18. Microtomografia das amostras preparadas com $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5,0%, submetidas ao ensaio de degradação. ....	132

## LISTA DE ABREVIACOES

$\alpha$ -TCP - fase alfa do fosfato tricálcico;  
 $\beta$ -TCP - fase beta do fosfato tricálcico;  
/- comprimento da ligação C-C;  
 $\rho$  - densidade do fluido;  
AA - absorção de gua;  
AAc - cido Acrílico;  
ACP - fosfato de cálcio amorfo;  
AIBN - azobisisobutironitrila;  
AO - oxiapatita;  
AP - persulfato de amônio;  
ATG - análise termogravimétrica;  
CDHA - hidroxiapatita deficiente em cálcio;  
CFC - cimento de fosfato de cálcio;  
CMP - metafosfato de cálcio;  
 $C_n$  - razão característica dos monômeros;  
 $C_p$  - capacidade calorífica dos produtos  pressão constante;  
CPP - pirofosfato de cálcio;  
DA - densidade aparente;  
DCPA ou DCP - hidrogenofosfato de cálcio anidro;  
DCPD - hidrogenofosfato de cálcio dihidratado;  
DMAEMA - dimetilaminoetil metacrilato;  
DNA - cido desoxiribonucleico;  
DRX - difração de raios X;  
EDS - espectroscopia por energia dispersiva;  
EGDMA - etileno glicol dimetacrilato;  
ESR - *equilibrium swelling rate* ou quociente de inchamento no equilíbrio;  
ET - engenharia de tecidos;  
FA - fluorapatita;  
FTIR - espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier;  
FTIR-ATR - espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier -  
Reflectância total atenuada;  
 $G'$  - módulo elástico;  
HA -  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  - hidroxiapatita;

HAC - hidroxiapatita carbonatada;  
HAP - hidroxiapatita porosa;  
HEMA - hidroxietil metacrilato;  
HCPK - 1-hidroxiciclohexil fenil cetona;  
ICDD - *International Center for Diffraction Data*;  
kg - quilograma;  
 $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  - metro quadrado por grama;  
MBAM - N,N' metilenobisacrilamida difuncional;  
 $M_c$  - peso molecular entre ligações cruzadas;  
MCPA ou MCP - fosfato monocálcico anidro;  
MCPM - fosfato monocálcico monohidratado;  
 $m_e$  - massa do hidrogel no equilíbrio de inchamento;  
MET - microscopia eletrônica de transmissão;  
MEV - microscopia eletrônica de varredura;  
MIST - *minimally invasive surgery techniques*;  
mL - mililitro;  
 $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$  - mililitro por grama;  
mm - milímetro;  
 $\text{mm}^2$  - milímetros quadrados;  
MPa - Mega Pascal;  
 $M_r$  - massa molar da unidade repetitiva;  
 $m_s$  - massa do criogel seco;  
MSC's - células-tronco mesenquimais;  
N - Newton;  
n - número de moles;  
NA - número de Avogrado;  
NVP - N-vinil-2-pirrolidona;  
 $\emptyset$  - funcionalidade do agente entrecruzante;  
OCP - Fosfato octacálcico;  
OHA - oxiapatita;  
Pa - Pascal;  
PA - porosidade aparente;  
PAA - poli (ácido acrílico);  
PBS - *Phosphate Buffered Solution* (solução tampão fosfato salino);  
PDF - *Powder Diffraction File*;

PDMAEMA - poli(dimietlamino etil metacrilato);  
PE - polietileno;  
PEG - polietilenoglicol;  
PEGDA - polietilenoglicol diacrilato;  
PEGDMA - poli(etileno glicol) dimetacrilato;  
PEO - poli (óxido de etileno);  
PET - politereftalato de etileno;  
PEUAM - polietileno de ultra alto peso molecular;  
PHEMA - poli (hidroxietil metacrilato);  
PLA - poli (ácido láctico);  
PLGA - copoli(ácido) láctico-glicólico;  
PMMA - poli(metilmetacrilato);  
PP - polipropileno;  
PVA - poli (álcool vinílico);  
PVC - cloreto de polivinila;  
PVP - poli (N-vinil-2-pirrolidona);  
Q - quociente de equilíbrio de inchamento;  
RPM - rotações por minuto;  
SAOS-2 - linhagem de osteoblastos;  
SBF - *Simulated body fluid* (fluido corpóreo simulado);  
TCP - fosfato tricálcico;  
TeCP - fosfato tetracálcico;  
TEMED - N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina;  
TMP - tamanho médio de partícula;  
TMPTA - trimetilol propano;  
TTCP - fosfato tetracálcico;  
UV - ultravioleta;  
 $V_1$  - volume molar da água;  
 $V_{2r}$  - fração volumétrica do polímero no estado relaxado, porém antes do inchamento;  
 $V_{2s}$  - fração volumétrica do polímero inchado;  
 $v_x$  - densidade de ligações cruzadas;  
 $W_d$  - massa do polímero antes do inchamento;  
 $W_s$  - massa do polímero depois do inchamento;  
 $\mu\text{m}$  - micrômetro;  
 $v$  - volume específico do polímero;

$\rho_{ap}$  - densidade aparente;

$\rho_L$  - densidade do meio líquido;

$\rho_p$  - densidade do polímero;

$\rho_r$  - densidade real;

$\rho_s$  - densidade do solvente;

$\chi$  - Flory-Huggins de interação polímero/solvente.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	23
2. OBJETIVOS .....	25
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	26
3.1 Biomateriais .....	26
3.2 Biocerâmicas.....	30
3.3 Fosfatos de Cálcio .....	31
3.4 Cimentos ósseos.....	34
3.5 Fosfatos tricálcicos.....	36
3.6 Osso .....	37
3.7 Hidrogéis.....	40
3.7.1 Poli ( <i>N</i> -vinil-2-pirrolidona) .....	43
3.7.2 Poli ( <i>ácido acrílico</i> ).....	46
3.7.3 Poli ( <i>N</i> -vinil-2-pirrolidona- <i>ácido acrílico</i> ) .....	47
3.8 Suportes para cultura celular (scaffolds) .....	48
3.8.1 <i>Scaffolds</i> porosos.....	52
3.9 Compósitos fosfato de cálcio/hidrogéis.....	53
3.10 Testes biológicos .....	54
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
4.1 Obtenção de alfa-fosfato tricálcico por reação via úmida .....	57
4.1.1 <i>Estudo da ordem de adição dos reagentes e temperatura de calcinação</i> .....	57
4.1.2 <i>Estudo da influência da concentração dos reagentes</i> .....	59
4.1.3 <i>Avaliação da influência do tempo de moagem nas propriedades do cimento de fosfato de cálcio</i> .....	59
4.2 Obtenção dos hidrogéis .....	61
4.2.1 <i>Hidrogéis – Avaliação 1</i> .....	61
4.2.2 <i>Hidrogéis – Avaliação 2</i> .....	62
4.3 Obtenção dos compósitos .....	63
4.3.1 <i>Compósitos: Cimento de fosfato de cálcio e hidrogéis da avaliação 1</i> .....	63
4.3.2 <i>Compósitos: Cimento de fosfato de cálcio e hidrogéis da avaliação 2</i> .....	64
4.4 Avaliação da bioatividade, degradação e citotoxicidade do cimento de fosfato de cálcio .....	64
4.5 Adesão e proliferação de células .....	65
4.6 Caracterização dos pós obtidos por reação via úmida.....	66

4.6.1 Estudo da ordem de adição dos reagentes e temperatura de calcinação .....	66
4.6.1.1 Difração de raios X .....	66
4.6.1.2 Espectroscopia de Infravermelho .....	66
4.6.1.3 Microscopia eletrônica de varredura .....	66
4.6.1.4 Difração de laser .....	66
4.6.2 Estudo da influência da concentração dos reagentes .....	67
4.6.2.1 Difração de raios X .....	67
4.6.2.2 Resistência mecânica à compressão.....	67
4.6.2.3 Microscopia eletrônica de varredura .....	67
4.6.3 Avaliação da influência do tempo de moagem nas propriedades do cimento de fosfato de cálcio .....	67
4.6.3.1 Difração de laser .....	67
4.6.3.2 Técnica de adsorção de gás de Brunauer-Emmet-Teller .....	67
4.6.3.3 Densidade e porosidade aparente .....	68
4.6.3.4 Resistência mecânica à compressão.....	68
4.6.3.5 Microscopia eletrônica de varredura .....	68
4.7 Caracterização dos hidrogéis .....	68
4.7.1 Hidrogéis – Avaliação 1 .....	68
4.7.1.1 Análise termogravimétrica (TGA).....	68
4.7.1.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	68
4.7.1.3 Espectroscopia de Infravermelho .....	68
4.7.1.4 Inchamento dos hidrogéis .....	68
4.7.2 Hidrogéis – Avaliação 2 .....	69
4.7.2.1 Densidade Aparente.....	69
4.7.2.2 Densidade Real.....	69
4.7.2.3 Porosidade Total .....	69
4.7.2.4 Inchamento .....	70
4.8 Caracterização dos compósitos .....	72
4.8.1 Compósitos: Cimento de fosfato de cálcio e hidrogéis da avaliação 1.....	72
4.8.1.1 Porosidade e densidade aparente .....	72
4.8.1.2 Resistência mecânica à compressão.....	72
4.8.1.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	72
4.8.1.4 Difração de raios X .....	72
4.8.1.5 Bioatividade .....	72
4.8.2 Compósitos: Cimento de fosfato de cálcio e hidrogéis da avaliação 2.....	72

4.8.2.1	<i>Porosidade e densidade aparente</i>	72
4.8.2.2	<i>Resistência mecânica à compressão</i>	72
4.8.2.3	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	72
4.9	<i>Avaliação da bioatividade, degradação e citotoxicidade do cimento de fosfato de cálcio</i>	73
4.9.1	<i>Tempo de pega das amostras</i>	73
4.9.2	<i>Bioatividade</i>	73
4.9.2.1	<i>Resistência mecânica à compressão</i>	73
4.9.2.2	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	73
4.9.2.3	<i>Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)</i>	74
4.9.2.4	<i>Difração de raios X</i>	74
4.9.2.5	<i>Espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES)</i>	74
4.9.3	<i>Degradação</i>	74
4.9.3.1	<i>Absorção de água</i>	74
4.9.3.2	<i>Perda de massa</i>	75
4.9.3.3	<i>Resistência mecânica à compressão</i>	75
4.9.3.4	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	75
4.9.3.5	<i>Microtomografia de raios X (micro-CT)</i>	75
4.9.3.6	<i>Espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES)</i>	76
4.9.4	<i>Citotoxicidade</i>	76
4.9.4.1	<i>Teste MTS</i>	76
4.9.4.2	<i>Quantificação de DNA</i>	77
4.9.4.4	<i>Distribuição celular</i>	78
4.9.5	<i>Adesão e proliferação de células</i>	78
4.9.5.1	<i>Teste MTS</i>	78
4.9.5.2	<i>Quantificação de DNA</i>	78
4.9.5.3	<i>Quantificação de fosfatase alcalina (ALP)</i>	78
4.9.5.4	<i>Distribuição celular</i>	79
4.9.5.5	<i>Morfologia celular</i>	79
5.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	80
5.1	<i>Obtenção de alfa-fosfato tricálcico por reação via úmida</i>	80
5.1.1	<i>Estudo da ordem de adição dos reagentes e temperatura de calcinação</i>	80
5.1.2	<i>Estudo da influência da concentração dos reagentes</i>	85

5.1.2.1	<i>Difração de raios X</i> .....	85
5.1.2.2	<i>Resistência mecânica à compressão</i> .....	86
5.1.2.3	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i> .....	87
5.1.3	<i>Avaliação da influência do tempo de moagem nas propriedades do cimento de fosfato de cálcio</i> .....	88
5.2	<i>Obtenção dos hidrogéis</i> .....	93
5.2.1	<i>Hidrogéis – Avaliação 1</i> .....	93
5.2.1.1	<i>Análise termogravimétrica (TGA)</i> .....	93
5.2.1.2	<i>Calorimetria exploratória diferencial (DSC)</i> .....	94
5.2.1.3	<i>Espectroscopia de infravermelho</i> .....	96
5.2.1.4	<i>Inchamento dos hidrogéis</i> .....	97
5.2.2	<i>Hidrogéis – Avaliação 2</i> .....	98
5.3	<i>Obtenção dos compósitos</i> .....	107
5.3.1	<i>Compósitos: Cimento de fosfato de cálcio e hidrogéis da avaliação 1</i> .....	107
5.3.1.1	<i>Densidade aparente, porosidade aparente e absorção de água</i> .....	107
5.3.1.2	<i>Resistência à compressão de amostras</i> .....	107
5.3.1.3	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i> .....	108
5.3.1.4	<i>Difração de raios X (DRX)</i> .....	109
5.3.2	<i>Compósitos: Cimento de fosfato de cálcio e hidrogéis da avaliação 2</i> .....	110
5.3.2.1	<i>Densidade aparente, porosidade aparente e absorção de água</i> .....	110
5.3.2.2	<i>Resistência à compressão de amostras</i> .....	111
5.3.2.3	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i> .....	113
5.4	<i>Estudo da bioatividade, degradação e citotoxicidade do cimento de fosfato de cálcio</i> 116	
5.4.1	<i>Tempo de pega das amostras</i> .....	116
5.4.2	<i>Bioatividade</i> .....	117
5.4.2.1	<i>Resistência mecânica à compressão</i> .....	117
5.4.2.2	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i> .....	118
5.4.2.3	<i>Difração de raios X</i> .....	122
5.4.2.4	<i>Espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES)</i> .....	124
5.4.3	<i>Degradação</i> .....	126
5.4.3.1	<i>Absorção de água e perda de massa</i> .....	126
5.4.3.2	<i>Resistência mecânica à compressão</i> .....	127
5.4.3.3	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i> .....	128
5.4.3.4	<i>Microtomografia de raios X (micro-CT)</i> .....	130

5.4.3.5 Espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) .....	134
5.4.4 Citotoxicidade .....	136
5.4.4.1 Teste MTS.....	136
5.4.4.2 Quantificação de DNA.....	137
5.4.4.3 Distribuição espacial.....	138
5.4.5 Adesão e proliferação de células .....	138
5.4.5.1 Teste MTS.....	139
5.4.5.2 Quantificação de DNA.....	141
5.4.5.3 Quantificação de fosfatase alcalina (ALP).....	142
5.4.5.4 Distribuição celular.....	143
5.4.5.5 Morfologia celular.....	145
CONCLUSÕES .....	148
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	152
REFERÊNCIAS .....	153

## 1. INTRODUÇÃO

A necessidade de enxertos ósseos está em constante crescimento em decorrência de traumas, doenças e degeneração de tecidos. Atualmente, os melhores resultados em termos de integração e formação de osso novo são obtidos utilizando enxertos autógenos, com capacidades osteoindutoras e osteogênicas. As limitações destes enxertos consistem principalmente em dor no local explante e da morbidade, e disponibilidade limitada (PAPE *et al.*, 2010). Enxertos alógenos e xenógenos podem contornar essas limitações, mas o risco de reações imunológicas e, em alguns países, a disponibilidade limitada de bancos de tecidos, a adesão do paciente e restrições regulatórias são os maiores obstáculos atualmente (MARX, 2007). Assim, substitutos ósseos sintéticos baseados em fosfato de cálcio são alternativas válidas para os transplantes de tecidos, visto as suas respectivas datas de uso clínico, de mais de um século (D'ESTE & EGLIN, 2013).

Os cimentos a base de fosfatos de cálcio tem sido utilizados como enxerto ósseo com crescente sucesso nesta última década. Um cimento desse tipo pode ser preparado misturando-se um sal de fosfato de cálcio com uma solução aquosa para que se forme uma pasta que possa reagir em temperatura ambiente ou corpórea dando lugar a um precipitado que contenha um ou mais fosfatos de cálcio. A cura deste material ocorre pelo entrecruzamento dos cristais deste precipitado (GRUNINGER *et al.*, 1984). O poli(metilmacrilato) (PMMA) apresenta-se como o cimento para fixação óssea mais utilizado para as cirurgias de coluna e quadril, porém apresenta certos inconvenientes. A reação de polimerização deste material pode causar necrose do tecido ósseo ao redor da região do implante, devido à reação fortemente exotérmica (SANTOS, 2002). Este material, depois de implantado, não induz qualquer tipo de remodelação óssea, pois não é um material bioativo. Neste contexto, cimentos ósseos de materiais bioativos tem sido alvo de inúmeros trabalhos de pesquisa, devido à sua menor probabilidade de causar reações negativas por parte do tecido vivo.

O desenvolvimento de cimentos de fosfato de cálcio é imprescindível para o avanço tecnológico no campo dos biomateriais. Entretanto, os cimentos de fosfato de cálcio (CFC) desenvolvidos, apresentam baixa resistência mecânica quando comparados com os ossos do corpo humano. Assim, um sistema compósito apresenta grande potencial de utilização em ortopedia e odontologia. Um importante trabalho realizado nesta área foi desenvolvido por Santos (2002), o qual realizou um estudo destinado a elevar a resistência mecânica dos cimentos de fosfato de cálcio, obtendo um aumento de até 148% na resistência mecânica à

compressão com a adição de microfibras de náilon, carbono e polipropileno a uma composição contendo hidrogel de poliacrilamida. Neste contexto a utilização de hidrogéis biocompatíveis também se apresenta como uma alternativa promissora no desenvolvimento de um sistema compósito. Na literatura internacional existem ainda, poucos trabalhos publicados utilizando hidrogéis biocompatíveis como reforço de cimentos de fosfato de cálcio.

A disponibilidade de cimentos de fosfato de cálcio, com resistência mecânica próxima da resistência dos ossos humanos, estenderia, consideravelmente, o campo de aplicações potenciais, atualmente limitado às cirurgias odontológicas e craniomaxilofaciais. Composições mais resistentes destes cimentos encontrariam aplicações em ortopedia e neurocirurgia, como alternativa para a consolidação de fraturas múltiplas de ossos longos, fixação de próteses articulares cimentadas e substituição de discos intervertebrais e corpos vertebrais.

Quando se trata da expectativa e qualidade de vida, busca-se estender pelo maior tempo possível as propriedades e funcionalidades dos tecidos, os quais são mais propensos a falhas e desenvolvimento de doenças. A osteoporose, a mais comum das doenças metabólicas ósseas, é um dos maiores problemas de saúde pública da população senil, causando frequentes casos de morbidez e mortalidade. Ao mesmo tempo, o elevado número de acidentes automobilísticos provoca uma demanda suplementar de substitutos ósseos.

A realidade atual tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas que visam à produção de materiais sintéticos que possam suprir a demanda cada vez maior de biomateriais. Além disso, os avanços da tecnologia e dos materiais têm proporcionado o aumento da expectativa e da qualidade de vida de pessoas que, por motivo de doença degenerativa ou trauma por acidente, ficariam incapacitadas de manter o mesmo nível de atividade e produtividade.

Os materiais comerciais utilizados para o reparo ou substituição de tecidos não conseguem atender todas as exigências químicas e estruturais da área médico-odontológica, estimulando o desenvolvimento de novos biomateriais. A proposta deste trabalho foi o desenvolvimento de uma nova metodologia de obtenção de alfa-fosfato tricálcico de elevada pureza e também de compósitos à base de cimento de fosfato de cálcio/hidrogel para utilização como substitutos ósseos na Engenharia de Tecidos. Hidrogéis serão utilizados com o intuito de fornecer a estrutura necessária para adesão e distribuição uniforme de células no interior do material.

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho foi a síntese de alfa-fosfato tricálcico por reação via úmida, utilizando nitrato de cálcio e ácido fosfórico, método ainda não estudado para sua obtenção, e a sua utilização como cimentos de fosfato de cálcio e como matriz no preparo de compósitos com hidrogéis.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Biomateriais

O desenvolvimento de novos biomateriais têm sido fundamental para a melhoria da qualidade e expectativa de vida das pessoas, proporcionando uma melhora na saúde em geral e no bem estar da população. Dessa forma, nos últimos anos, maior esforço tem sido feito, no intuito de se produzir novos sistemas compósitos que possam ser utilizados como biomateriais.

Segundo a Conferência de Consenso em Biomateriais para aplicações clínicas de 1982, um biomaterial pode ser definido como: “Toda substância (com exceção de drogas) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que durante um período de tempo indeterminado é empregada como um todo ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais” (WILLIAMS, 1987). Isto significa que no sentido mais amplo são enquadrados nesta categoria todos os materiais empregados na medicina, odontologia, medicina veterinária e farmacologia, além daqueles que entram na forma de implantes em contato direto com o tecido do corpo (SANTOS, 2002). Segundo Williams (1987), “biomaterial é uma substância que foi projetada para assumir uma forma, a qual sozinha ou como parte de um sistema complexo é usado para direcionar, pelo controle das interações com os componentes dos sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento diagnóstico ou terapêutico, em medicina veterinária ou humana”.

Para a utilização de biomateriais em organismos vivos, algumas características são fundamentais como: ser biocompatível; não ser tóxico nem carcinogênico; ser quimicamente estável; ter estabilidade mecânica adequada; ter peso, forma e densidade adequados; ser relativamente barato; ser biofuncional, desempenhar a função para o qual foi fabricado com a máxima eficiência (SILVER & DOILLON, 1989).

Um biomaterial pode ser escolhido, para uma determinada aplicação, em função da similaridade química ou física do material com o tecido a ser substituído. Assim, é necessário o entendimento e o domínio, não apenas da obtenção do biomaterial, mas também de suas respostas celulares. Logo, um biomaterial tem como principal função, por exemplo, não só o preenchimento de um espaço vazio originado pela perda do tecido, como também promover resposta celular adequada (WILLIAMS, 1987).

Para um biomaterial ser considerado adequado para uma dada aplicação, ele deve ser biocompatível e não deve causar danos locais ou sistêmicos (tóxicos, carcinogênicos ou radioativos) (WILLIAMS, 1987; ROGERO *et al.*, 2003).

Os biomateriais podem ser classificados em função de sua origem, da reação tecidual que geram ao organismo ou de sua natureza química. Com relação a sua origem, os biomateriais podem ser autógenos, alógenos, xenógenos e aloplásticos.

Os materiais *autógenos*, os quais são provenientes do próprio organismo, têm como vantagens a biocompatibilidade, não apresentam potencial imunogênico e não oferecem risco de transmissão de doenças, além do grande potencial osteogênico das células transplantadas (TOTH *et al.*, 1995). As desvantagens são a disponibilidade limitada do material do local doador e a morbidade e desconforto para o paciente (SCARANO *et al.*, 2006).

Os *alógenos*, que são provenientes de outros indivíduos da mesma espécie, possuem a vantagem de poderem ser obtido a partir de cadáveres e de serem processados e armazenados em bancos, como por exemplo, os ossos (BUCK & MALININ, 1994). Porém seu uso envolve certo risco em relação à antigenicidade, mesmo que, usualmente, sejam pré-tratados por congelamento, radiação ou agentes químicos, visando evitar reação de corpo estranho (OGATA *et al.*, 2006).

Os *xenógenos*, os quais são obtidos de indivíduos de outras espécies, são muito empregados devido à facilidade de obtenção, como por exemplo, a partir de osso bovino (BAUER & MUSCHLER, 2000). Entretanto, a utilização dos enxertos de origem bovina, apresentam como desvantagens a possibilidade de transmissão de doenças e a reação imune do hospedeiro ao material enxertado, em casos onde o enxerto apresente remanescentes de matriz orgânica, o que diminui a aceitação da utilização desses materiais pelos pacientes e pelos profissionais (CALLAN & ROHRER, 1993).

Os *aloplásticos* compreendem biomateriais exclusivamente sintéticos e biocompatíveis encontrados comercialmente, podendo ser de natureza metálica, cerâmica ou plástica (OKAMOTO *et al.*, 1994).

Em relação à reação tecidual, os biomateriais podem ser classificados em biotolerável, bioinerte, bioativo e bioabsorvível/biodegradável.

Biotoleráveis são materiais apenas tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes por meio da formação de uma camada envoltória de tecido fibroso, a qual é induzida pela liberação de compostos químicos, íons, produtos de corrosão e outros por parte do material implantado. Quanto maior a espessura da camada de tecido fibroso

formado, menor a tolerabilidade dos tecidos ao material. Praticamente todos os polímeros sintéticos assim como a grande maioria dos metais, são exemplos de materiais biotoleráveis (HENCH & WILSON, 1993).

Bioinertes são também materiais tolerados pelo organismo, mas em que a formação do tecido envoltório fibroso é mínima ou praticamente inexistente. O material não libera nenhum tipo de componente ou, mais realisticamente, em quantidades mínimas. A quantidade de células fagocitárias na interface é mínima, a resposta fagocítica será passageira e uma fina cápsula tomará lugar após o implante. Em alguns casos esta camada é praticamente imperceptível. Os materiais bioinertes mais utilizados são alumina, zircônio, titânio, ligas de titânio e carbono (HENCH & WILSON, 1993).

Bioativos são materiais que favorecem a interação no local de implante. No caso de substituição do tecido ósseo, este deve favorecer a osteointegração, sem a presença de invólucros fibrosos. Em função da similaridade química entre tais materiais e a parte mineral óssea, os tecidos ósseos se ligam a eles, permitindo a osteocondução por meio de seu recobrimento por células ósseas. Quando o material bioativo é implantado no corpo, uma série de reações bioquímicas e biofísicas ocorre na interface implante/tecido. Essas reações eventualmente resultam em uma ligação interfacial de natureza química, e não física (WILLIAMS, 1987; HENCH & WILSON, 1993). Os materiais bioativos podem ainda ser classificados em: osteoindutores e osteocondutores. Os osteoindutores apresentam a capacidade de estimular a formação óssea (BOHNER *et al.*, 2012). Os materiais osteocondutores promovem a formação de uma superfície biocompatível no local do implante, a qual favorece o desenvolvimento de células ósseas, devido à resposta extracelular adequada na interface. A hidroxiapatita sintética é um exemplo de biomaterial desta classe (CAO & HENCH, 1996).

Reabsorvíveis/biodegradáveis são materiais que podem ser degradados por um processo mediado por atividade celular, diretamente por fagocitose, ou indiretamente por ação enzimática e/ou por dissolução por difusão iônica contínua do biomaterial quando colocado em meios biológicos. Tais materiais são extremamente interessantes em aplicações clínicas em função de não ser necessária uma nova intervenção cirúrgica para retirada do material implantado (RAVAGLIOLI & KRAJEWSKI, 1992; HENCH, 1991).

Além das classificações fundamentadas no comportamento na interface tecido-implante, um biomaterial pode ser classificado pela sua natureza química em naturais ou sintéticos (DAVIS, 2003).

Os biomateriais naturais são derivados de origem animal ou vegetal. Um exemplo de biomaterial natural amplamente utilizado é o colágeno puro ou em misturas com outros compostos. Podendo-se citar ainda: ossos retirados do mesmo indivíduo ou de outra fonte animal, como o osso bovino.

Os sintéticos podem ser metálicos, cerâmicos, poliméricos, compósitos e nanocompósitos. São exemplos de biomateriais sintéticos: policaprolactona, poliácido láctico, ligas de magnésio, ligas de aço inoxidável, ligas de titânio, cerâmicas vítreas, fosfatos de cálcio, entre outros (BOHNER *et al.*, 2012). Metais como titânio, nióbio, tântalo e vanádio são considerados biomateriais e têm sido utilizados puros ou em ligas na recuperação das funções do esqueleto. As ligas dentais geralmente constituídas de mercúrio, prata e estanho, possuem elevada condutividade térmica, além de alta tenacidade, dureza, elasticidade, ductilidade, resistência à abrasão, à fratura e à fadiga e têm sido usadas para a reconstituição de dentes (SOARES, 2005).

Entre as primeiras cerâmicas utilizadas em próteses ortopédicas pode-se destacar a alfa alumina, que apresenta boa biocompatibilidade e alta resistência mecânica (KAWACHI *et al.*, 2000). A utilização de fosfato de cálcio para reparo ósseo foi descrita pela primeira vez por Albee e Morrison (1920), porém, somente cinquenta anos após foram intensificados os estudos de cerâmicas à base de apatitas em aplicações médicas e dentárias (LEVITT *et al.*, 1969; MONROE *et al.*, 1971). A partir da década de 1970, novos métodos de preparo de cerâmicas de fosfatos de cálcio vêm sendo descritos, a partir de reagentes químicos comerciais (PONOMAREVA *et al.*, 2010; KAWAI *et al.*, 2010; YOKOI *et al.*, 2010; MAKAROV *et al.*, 2010; FATIMI *et al.*, 2010).

A hidroxiapatita (HA) tem se destacado entre os biomateriais, apresentando boa biocompatibilidade e alta resistência à compressão. Hidroxiapatita vem sendo utilizada em reparos de ossos, juntas, dentes etc., apresentando como desvantagens o baixo limite de resistência mecânica, baixo módulo de elasticidade e alta densidade, quando comparada aos polímeros.

Os biomateriais poliméricos também têm encontrado várias aplicações biomédicas tais como: na confecção de próteses maxilofaciais, na construção de coração artificial e de válvulas cardíacas, de membranas de dialisadores e de oxigenadores, assim como suturas, dispositivos de administração de drogas, lentes de contato, cateteres, veias, entre outras aplicações. Materiais poliméricos apresentam como vantagens a resiliência, a fácil fabricação e a baixa densidade. Como desvantagens, apresentam a baixa resistência mecânica e a degradação com o tempo (PARK, 1980; PARK, 1990).

Os materiais compósitos são constituídos pela combinação adequada de no mínimo dois componentes, elemento de reforço e matriz, unidos por uma interface, diferindo em forma e/ou composição, resultando em materiais com propriedades superiores às dos componentes individuais (MATHEWS & RAWLING, 1994). Esses materiais podem apresentar como vantagens: boa biocompatibilidade, inércia química, resistência à corrosão, elevado módulo de elasticidade e boa resistência mecânica. Como desvantagens pode-se destacar a falta de reprodutibilidade na fabricação, por serem heterogêneos e pelo fato de apresentarem propriedades que dependem de muitas variáveis (HENCH & WILSON, 1993; PICONI & MACCAURO, 1999; LEE *et al.*, 2001).

Vários compósitos têm sido descritos, podendo ser citados: resina termofixa reforçada com fibras de carbono, polímero termoplástico reforçado com fibras de carbono, matriz de carbono vítreo reforçada com fibras de carbono (carbono-carbono), colágeno reforçado com fosfato de cálcio etc. Alguns destes compósitos têm sido utilizados em válvulas cardíacas artificiais, em juntas de joelho etc. Nanocompósitos são materiais nos quais a fase dispersa apresenta pelo menos uma dimensão de tamanho nanométrico (PAVLIDOU & PAPASPYRIDES, 2008). Vários nanocompósitos têm sido estudados como biomateriais (ALVES *et al.*, 2010).

### **3.2 Biocerâmicas**

As cerâmicas utilizadas como biomateriais são consideradas biocompatíveis e geralmente são frágeis. Em alguns casos poder ser duras, com excelente resistência à compressão, alta resistência ao desgaste e baixo coeficiente de atrito, o que é interessante para aplicação em articulações, principalmente no caso de próteses de quadril (BENNISSAN, 2003).

Em termos gerais, as biocerâmicas podem ser classificadas como bioinertes ou bioativas (VALLET-REGÍ *et al.*, 2004). Porém, a Conferência da Sociedade Europeia para Biomateriais não considera o termo bioinerte adequado, visto que, quando um material é posto em contato com o corpo humano, induz algum tipo de resposta, mesmo que mínima (KAWACHI *et al.*, 2000). No entanto, o termo é amplamente utilizado, e sua definição mais aceita é de um material que apresenta uma resposta interfacial mínima que não resulta na ligação ou na rejeição do tecido hospedeiro, pela formação, por exemplo, de uma cápsula fibrosa ao redor do material. Já uma biocerâmica bioativa, termo bem aceito na comunidade científica, é conceituada como aquela que induz uma determinada atividade

biológica por parte do tecido hospedeiro frente à presença do material.

A primeira biocerâmica que teve intenso uso foi a alumina, que é considerada bioinerte. Além da alumina, outras cerâmicas como a zircônia, o dióxido de titânio, os fosfatos de cálcio e as vitrocerâmicas de sílica/fosfato de cálcio, apresentam uso muito difundido atualmente (KAWACHI *et al.*, 2000).

Existem basicamente três tipos de implantes biocerâmicos: inerte como, por exemplo, a alumina e a zircônia; bioativo, como os biovidros, vitrocerâmicas e a hidroxiapatita; e os reabsorvíveis, como os fosfatos tricálcicos e alguns tipos de biovidro (HENCH, 1998).

Nesse trabalho atenção será dado ao desenvolvimento de implantes absorvíveis, que são projetados para se degradarem gradativamente com o tempo, sendo substituídos por tecidos naturais. O cumprimento de tal condição pode levar à regeneração dos tecidos ao invés da sua substituição. A taxa de reabsorção deve ser combinada com a taxa de reparação dos tecidos. Alguns materiais dissolvem muito rápido, enquanto outros muito devagar. Alguns exemplos de implantes absorvíveis são as cerâmicas de fosfato tricálcico (TCP) que se degradam em cálcio e sais de fosfatos e podem ser utilizados para preencher espaços do osso.

### 3.3 Fosfatos de Cálcio

Os fosfatos de cálcio são os substitutos ósseos mais utilizados ao redor do mundo, na engenharia de tecidos, devido à sua similaridade química com a parte mineral dos ossos (DOROZHKIN, 2011; BHATT *et al.*, 2012) e sua excelente biocompatibilidade, caracterizada pela sua osteocondutividade (YUAN *et al.*, 2005). Nos últimos anos, os fosfatos de cálcio, especialmente fosfatos tricálcicos e hidroxiapatita, tem atraído interesse significativo como substitutos ósseos, além de novas aplicações e interesses, como o uso na entrega controlada de fármacos, ampliando ainda mais sua faixa de aplicação. Os fosfatos de cálcio são mais biocompatíveis que muitas outras biocerâmicas e partículas inorgânicas. Sua biocompatibilidade e ampla faixa de relação cálcio fósforo (Ca/P) os tornam aplicáveis a uma série de situações distintas devido a diferentes propriedades superficiais, funcionalidade e taxas de dissolução. Eles podem ser usados como coberturas de implantes metálicos, cimentos, blocos, *scaffolds*, entre outros (BOSE & TARAFDER, 2012).

Os compostos de fosfato de cálcio são substâncias similares quimicamente às que ocorrem nos processos biológicos, podendo ou não ser utilizadas como biomaterial em

decorrência de sua resposta biológica.

Fosfatos de cálcio compreendem uma classe ampla de compostos e estão presentes em tecidos como, por exemplo, nos ossos e nos dentes. Dentre os fosfatos mais importantes para uso na área biomédica, estão o hidrogenofosfato de cálcio diidratado (DCPD), o hidrogenofosfato de cálcio anidro (DCPA), o fosfato de cálcio amorfo (ACP), o fosfato de octacálcio (OCP), a hidroxiapatita (HA) e o fosfato tricálcico (TCP). Na Tabela 3.1 encontram-se a relação Ca/P e a fórmula dos principais fosfatos de cálcio (ELLIOTT, 1994; DOROZHKIN, 2011).

Pode-se notar através da Tabela 3.1, que o fosfato tricálcico apresenta relação Ca/P similar à hidroxiapatita, demonstrando-se como constituinte mais provável de aceitação na resposta biológica.

**Tabela 3.1.** Compostos de fosfato de cálcio (adaptado de DOROZHKIN, 2011).

Relação Ca/P	Composto	Fórmula
0,5	Fosfato monocálcico monohidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
0,5	Fosfato monocálcico anidro (MCPA ou MCP)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$
1,0	Fosfato dicálcico diidratado (DCPD), brushita mineral	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1,0	Fosfato dicálcico anidro (DCPA ou DCP), monetita mineral	$\text{CaHPO}_4$
1,33	Fosfato octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
1,5	$\alpha$ -Fosfato tricálcico ( $\alpha$ -TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1,5	$\beta$ -Fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1,2 – 2,2	Fosfatos de cálcio amorfos (ACP)	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ $n = 3 - 4,5; 15 - 20\% \text{ H}_2\text{O}$
1,5 – 1,67	Hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA)	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ( $0 < x < 1$ )
1,67	Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
1,67	Fluorapatita (FA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$
1,67	Oxiapatita (OA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$
2,0	Fosfato tetracálcico (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$

Combinações destes fosfatos de cálcio têm sido utilizadas como biomateriais. São os chamados fosfatos de cálcio multifásicos, aplicados principalmente em defeitos ósseos maxilofaciais, dentários e aplicações ortopédicas. Normalmente, utiliza-se um composto multifásico com o intuito de se obter, em um único material, as vantagens de uma fase mais estável (normalmente hidroxiapatita) com uma mais biorreabsorvível (normalmente fosfatos tricálcicos). A proporção, além da escolha dos materiais, depende da sua aplicação. As formulações já avaliadas apresentam propriedades importantes, como biocompatibilidade, osteocondutividade e bom desempenho *in vitro* e *in vivo* (DOROZHKIN, 2012).

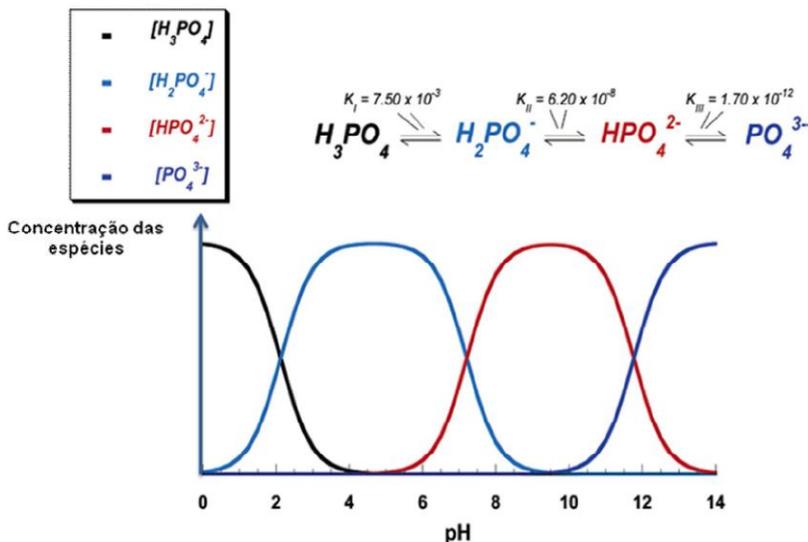
A razão cálcio/fósforo (Ca/P) é um parâmetro importante a ser considerado em fosfatos de cálcio, pois a partir dela é possível sugerir a fase de fosfato presente num determinado material, bem como estimar sua solubilidade (ELLIOTT, 1994).

O tipo de fosfato de cálcio formado num sistema depende das condições do meio, tais como: temperatura, pH, concentração de íons, razão molar Ca/P, dentre outros. As propriedades das soluções de fosfatos refletem fortemente as condições do pH do meio. Devido ao equilíbrio triprótico do ácido fosfórico, as variações do pH alteram as concentrações relativas das quatro espécies de fosfatos possíveis provenientes da dissociação do ácido fosfórico (Figura 3.1) e, assim, influenciam tanto a composição química quanto a razão Ca/P promovida pela precipitação direta de fosfatos de cálcio. Este equilíbrio permite o controle e a previsão para a formação dos diferentes fosfatos de cálcio num determinado meio (LYNN *et al.*, 2004).

Como indicado na Figura 3.1, no pH fisiológico de ~7,4 as espécies  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $\text{HPO}_4^{2-}$  são as predominantes e estão presentes no equilíbrio em concentrações próximas.

O pH do meio desempenha um papel importante na determinação das propriedades das partes orgânica e inorgânica que estão presentes nesses sistemas, durante a formação de fosfatos de cálcio em sistemas vivos. Além de determinar a natureza dos íons presentes no meio e, portanto, a composição do fosfato de cálcio, variações no pH induzem, também, modificações na fase orgânica que alteram a absorção de água, a conformação e até a organização a longa distância. O pH também pode afetar a solubilidade das espécies inorgânicas durante a sua formação, a qual é uma propriedade particularmente importante, não apenas para a distinção entre os fosfatos de cálcio, mas também para a composição orgânica/inorgânica do sistema (KIKUCHI *et al.*, 2001).

**Figura 3.1.** Concentrações das espécies iônicas formadas no equilíbrio triprótico para soluções de ácido fosfórico em função do pH. Figura adaptada de Lynn e colaboradores (LYNN *et al.*, 2004).



A obtenção de compósitos sintéticos de fosfatos de cálcio/componente orgânico ocorre, geralmente, pela técnica de precipitação simultânea dos componentes inorgânico e orgânico, chamada de coprecipitação. Esta técnica resulta em materiais com tamanhos de cristaltos de fosfatos de cálcio da ordem de nanômetros (KIKUCHI *et al.*, 2001).

Entre os fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita é a fase menos solúvel e, conseqüentemente, a mais estável, na faixa de pH 4,5-13. Já, quando o pH da solução é inferior a 4,5, as fases com maiores estabilidades são DCPA ( $CaHPO_4$ ) e DCPD, ( $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ ), as quais predominam em baixos pH (ELLIOTT, 1994).

A hidroxiapatita,  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ , é um dos principais componentes do tecido ósseo. A hidroxiapatita biológica apresenta menor cristalinidade e propriedades de biocompatibilidade e osteointegração (EANES, 1980), favorecendo o crescimento ósseo nos locais em que se encontra (ostecondutividade) e estabelecendo interações químicas com o tecido ósseo (bioatividade). Permitindo, dessa forma, a proliferação das células ósseas (osteoblastos, fibroblastos e outras), as quais não a distinguem da superfície óssea, devido à similaridade química superficial da hidroxiapatita com o osso.

### 3.4 Cimentos ósseos

Dentre os cimentos mais popularizados para enxerto ósseo destaca-se o poli-metil-metacrilato (PMMA), utilizado principalmente na fixação de próteses articulares e em

cirurgias de coluna. Conceitualmente, esta resina não deveria ser chamada de cimento, visto que sua reação de cura não envolve reações de hidratação. O uso de PMMA como biomaterial apresenta uma série de inconvenientes. Sua reação de polimerização pode causar necrose do tecido ósseo ao redor da região do implante devido à reação fortemente exotérmica que ocorre, além da resposta inflamatória, que traz como resultado a formação de células gigantes e a encapsulação fibrosa do implante (SANTOS, 2002). Além disso, o PMMA, depois de implantado não induz qualquer tipo de remodelação óssea, pois não é um material bioativo.

Cimentos a base de fosfatos de cálcio tem sido utilizados como enxerto ósseo com um percentual de sucesso muito grande nesta última década. Assim sendo, é promissora a sua utilização nas áreas de odontologia, cirurgia bucomaxilofacial e ortopedia como substituinte da sua antecessora, a hidroxiapatita, em função de sua característica de cura que torna desnecessária a utilização de barreiras para impedir a migração do material. No entanto, deve-se ter em mente que as melhorias impostas às propriedades dos materiais devem favorecer ao cirurgião a utilização de técnicas cirúrgicas minimamente invasivas (MIST – *minimally invasive surgery techniques*) (VOLKMER, 2011).

Dos sistemas de CFC estudados, somente aquele baseado no  $\alpha$ -TCP cumpre com o requisito referente ao pH (entre 6,5 e 8,0) (DRIESSENS *et al.*, 1997).

Poucos estudos têm sido realizados com o intuito de otimizar o desempenho mecânico dos CFC baseados no  $\alpha$ -TCP. A adição de hidroxiapatita precipitada a esses cimentos em níveis de até 4 % tem sido relatada como favorável à resistência à compressão do material, ao mesmo tempo que, adições de CaO de até 3 % tem um efeito prejudicial sobre a resistência (BERMUDEZ *et al.*, 1994).

Ginebra *et al.* (1995a) estudaram o efeito da temperatura e diferentes aditivos sobre diversas propriedades do cimento de  $\alpha$ -TCP. À temperatura do corpo, há um aumento da resistência mecânica durante a pega, comparadas às obtidas à temperatura ambiente, o que foi explicado pelo aumento da velocidade da reação de pega. As adições de carbonatos solúveis, pirofosfatos e, sobretudo de sais de magnésio retardam a pega e pioram a resistência do cimento. A presença de outras biocerâmicas, como  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ,  $\beta$ -TCP ou hidroxiapatita sinterizada, em quantidade de até 10 %, não teve efeito sobre a resistência. Enquanto que o sulfato de cálcio di-hidratado ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) age como controlador de porosidade, aumentando a resistência mecânica.

Como cimentos ósseos de fosfato de cálcio comerciais, que utilizam alfa-TCP em sua fórmula, pode-se citar: *Cementek*<sup>®</sup> (Teknimed S.A., França), *Mimix*<sup>®</sup> (Biomet, USA), *Calcibon*<sup>®</sup> (Biomet, Europa), *Norian SRS*<sup>®</sup> (Norian, USA), *Biopex*<sup>®</sup> (Mitsubishi Materials Co., Japão), *MCPC* (Biomatlane, França) e *Callos*<sup>™</sup> (Skeletal Kinetics, USA) (CARRODEGUAS & AZA, 2011).

### 3.5 Fosfatos tricálcicos

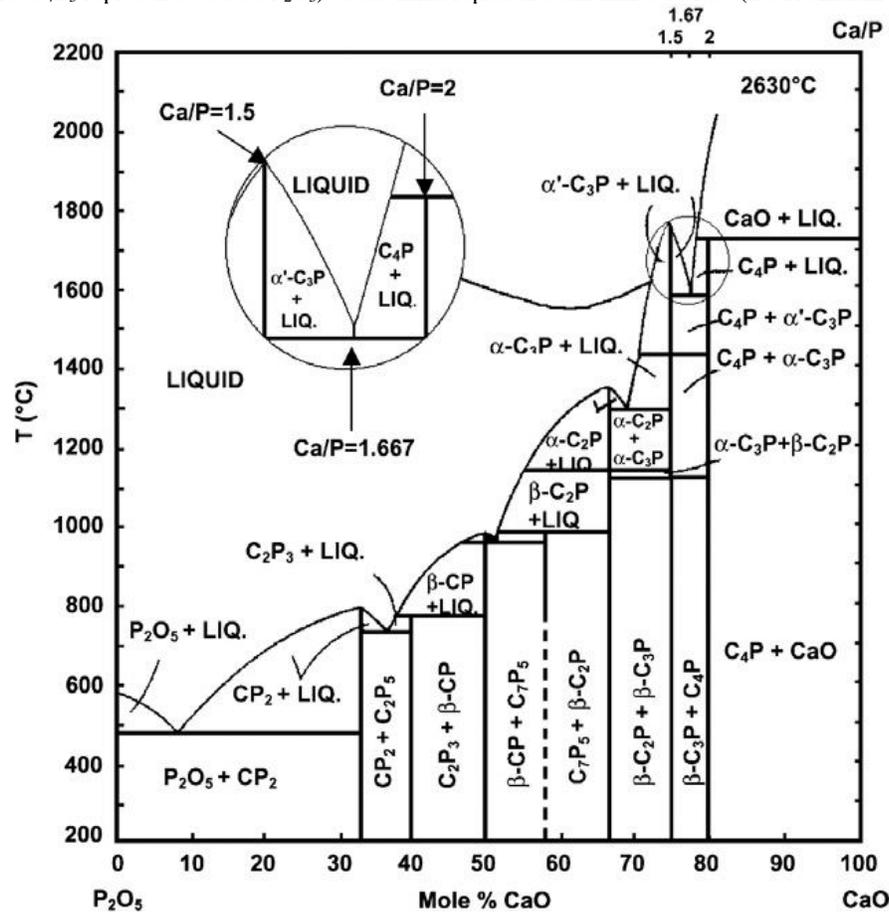
Atualmente, o fosfato tricálcico (TCP) é um dos fosfatos de cálcio mais utilizados como biomateriais devido à sua biocompatibilidade, bioatividade *in vivo*, biorreabsorbilidade e osteocondutividade (ESLAMINEJAD *et al.*, 2013; LEUCHT *et al.*, 2013; STEFANIC *et al.*, 2013). Os fosfatos tricálcico podem se apresentar em três fases polimórficas, o de baixa temperatura  $\beta$ -TCP e os de alta temperatura,  $\alpha$ -TCP e  $\alpha'$ -TCP (AZA *et al.*, 2005; AZA & AZA, 2004). O  $\alpha'$ -TCP não atrai interesse para usos práticos por ser uma fase metaestável, que só existe a temperaturas acima de 1430°C, aproximadamente, e reverte à fase  $\alpha$ -TCP durante o resfriamento. O  $\beta$ -TCP é estável à temperatura ambiente e se transforma em  $\alpha$ -TCP a partir de, aproximadamente, 1165°C, que pode ser retido durante o resfriamento até a temperatura ambiente. Essas transformações podem ser observadas no diagrama de fases do sistema CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (Óxido de cálcio – Pentóxido de fósforo), apresentando na Figura 3.2.

Tanto o  $\beta$ -TCP como o  $\alpha$ -TCP já são utilizados em aplicações clínicas nas áreas de odontologia, reconstruções maxilofaciais e ortopedia. O  $\beta$ -TCP é o componente de vários blocos cerâmicos mono ou bifásicos e alguns compósitos, já o  $\alpha$ -TCP é o componente principal de vários cimentos ósseos hidráulicos (CARRODEGUAS *et al.*, 2011).

Os mecanismos de síntese de  $\alpha$ -TCP ainda não são completamente dominados (CARRODEGUAS *et al.*, 2011). A literatura é contraditória quanto às temperaturas e tempos utilizados para calcinação. Também não existe consenso quanto à necessidade ou não de choque térmico na obtenção da fase  $\alpha$ -TCP.

A forma mais simples e usual de se obter o TCP é via reação de estado sólido, em que o carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>) e o hidrogenofosfato de cálcio (CaHPO<sub>4</sub>) são utilizados como reagentes precursores. A obtenção se dá pela mistura dos dois reagentes em proporções específicas levando o material para a calcinação em temperaturas pré-determinadas (JINLONG *et al.*, 2002).

**Figura 3.2.** Diagrama de fases do sistema CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (C=CaO, P=P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) a elevadas temperaturas (por exemplo: C<sub>7</sub>P<sub>5</sub> representa 7CaO.5P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). Cada linha representa um limite de fase (DOROZHKIN, 2012).

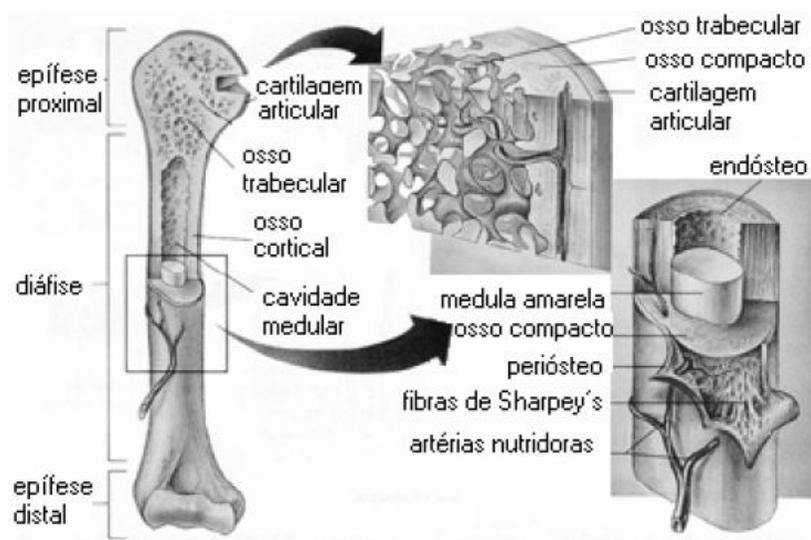


### 3.6 Osso

O esqueleto humano é constituído por mais de 200 ossos de tamanho, forma e composição variáveis. Além de sua função estrutural, que dá forma e rigidez ao corpo, os ossos são responsáveis pela proteção de órgãos vitais, como o cérebro e órgãos sensoriais; pela fabricação de células sanguíneas, que ocorre na medula óssea vermelha situada no tecido esponjoso; e pela homeostase que ajuda manter constante o nível de cálcio no sangue. Além disso, atuam como suporte e fornecem apoio para a fixação de músculos, auxiliando a locomoção. Os ossos também representam um reservatório de cálcio, fosfatos e outros íons importantes para a renovação tecidual (TEMENOFF & MIKOS, 2000; SIKAVITSAS *et al.*, 2001).

Didaticamente, o esqueleto pode ser dividido anatomicamente em dois tipos de tecidos ósseos: osso cortical ou compacto e osso trabecular ou esponjoso. O osso cortical corresponde à cerca de 85% da massa óssea e um terço do volume do esqueleto. Consiste de uma camada compacta e densa que se localiza na região externa dos ossos longos apresentando diversas lamelas intensamente empacotadas (ósteons), na forma de dutos cilíndricos, dispostos paralelamente ao eixo principal nos ossos longos. É encontrado como revestimento de todos os ossos do organismo possuindo uma camada de espessura variável. O osso cortical é envolvido externamente por um tecido conjuntivo chamado perióstio rico em colágeno e células osteoprogenitoras (Figura 3.3). Possui baixas porosidade e relação superfície/volume e remodela-se anualmente cerca de 2-3% (SENA, 2004).

**Figura 3.3.** Estrutura do osso longo com uma ampliação do osso cortical (LIFE, 2002).



Segundo Simões *et al.* (1995), o osso trabecular corresponde à cerca de 15% da massa óssea e dois terços do volume total do esqueleto. É encontrado principalmente nas epífises dos ossos longos e nos ossos chatos, sendo revestido por uma camada unicelular chamada endóstio. Possui elevada porosidade e elevada relação área/volume, o que acarreta uma maior atividade metabólica, e remodela-se anualmente cerca de 24%.

As propriedades mecânicas dos ossos (cortical e trabecular) estão apresentadas na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2.** Propriedades mecânicas dos ossos (KOKUBO, 2003).

Propriedades	Osso cortical	Osso trabecular
Resistência à compressão (MPa)	100 – 230	2-12
Resistência à flexão (MPa)	50 - 150	-
Módulo elástico (GPa)	7 - 30	0,05 – 0,5

O osso é um material nanoestruturado, formado por uma matriz orgânica constituída de colágeno, proteínas etc., e uma matriz inorgânica a hidroxiapatita (HA) que é formada por um processo conhecido por biomineralização, no qual a matriz orgânica é a base e fornece a orientação para a deposição do material inorgânico (ALMQVIST *et al.*, 1999; AVNIR *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2006). Para que o processo de biomineralização seja bem sucedido, é necessário haver uma boa adesão na interface entre o componente orgânico e inorgânico, já que defeitos na interface conduzem a falhas na formação do osso (ZHANG *et al.*, 2006).

A atividade anabólica do osso (formação) é mediada pelos osteoblastos, que derivam das células-tronco do tecido conjuntivo e são responsáveis pela síntese dos constituintes orgânicos do osso (colágeno) e, conseqüentemente, pela mineralização do tecido ósseo. A atividade catabólica (reabsorção) é mediada pelos osteoclastos, que são células gigantes multinucleadas da linhagem dos macrófagos, as quais produzem um grande número de enzimas. Os osteócitos são células maduras de osteoblastos responsáveis pela manutenção da integridade da matriz óssea, os quais sintetizam a parte orgânica da matriz óssea e concentram fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz (MARINHO, 1995).

O osso é um exemplo de bionanocompósito possuindo uma composição variada em função da idade e do tipo de osso, podendo ser formado por aproximadamente 80% de hidroxiapatita e 20% de material orgânico (KAFLAK *et al.*, 2006). Além dos principais componentes citados, o osso possui ainda em sua composição outros elementos em pequenas quantidades, como o silício, o qual tem um papel importante na sua formação. Carlisle (1970) observou, em uma série de experimentos *in vivo*, a presença de silício (~0,5% em massa) na região de mineralização da tíbia de osso removido de ratos jovens. Neste estudo o autor também propôs que o silício é um dos constituintes fundamentais para

a formação do colágeno e, conseqüentemente, o silício influenciaria não só a formação da fase inorgânica como também da fase orgânica do osso (PÉREZ-GRANADOS & VAQUERO, 2002). Porter (2004) confirmou a presença de silício, em diversas concentrações, tanto na matriz inorgânica como na orgânica dos ossos. Enquanto a estrutura dos ossos está razoavelmente bem definida, a sua formação ainda não é claramente descrita.

Como a importância do Si no processo de desenvolvimento do tecido ósseo é ainda pouco explorada, autores têm descrito que grupos Si-OH são sítios favoráveis para a nucleação de hidroxiapatita. Biomateriais contendo SiO<sub>2</sub> são bioativos, como por exemplo, o Bioglass®, que tem sido utilizado clinicamente pela habilidade de ligação com o tecido ósseo (ALVES *et al.*, 2010). Além disso, tem sido descrito o efeito de íons silicatos na substituição parcial de íons fosfatos na hidroxiapatita (Si-HA) em materiais para aplicações em implantes ósseos. O Si-HA, quando comparado à hidroxiapatita pura, apresenta propriedades mais favoráveis à indução da formação de tecidos ósseos (PORTER, 2004).

### 3.7 Hidrogéis

Hidrogel é um material polimérico reticulado que retém uma significativa fração de água em sua estrutura, sem se dissolver. Hidrogéis são constituídos por uma rede tridimensional formada por ligações cruzadas de homopolímeros ou copolímeros. Estes polímeros intumescem e retêm água, e têm sido amplamente utilizados em aplicações biomédicas (SLAUGHTER *et al.*, 2009).

Em geral, a estrutura reticulada dos hidrogéis é caracterizada por ligações cruzadas que podem ser formadas por ligações covalentes, iônicas ou por interações mais fracas como a formação de ligações de hidrogênio (SLAUGHTER *et al.*, 2009).

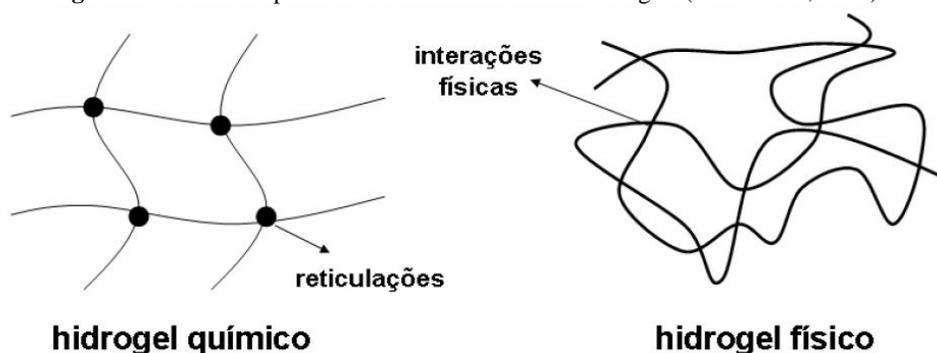
Caracterizam-se por apresentarem hidrofiliçidade e insolubilidade. A hidrofiliçidade é devido à presença de grupos hidrofílicos tais como: -OH, -COOH, -CONH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub>H, entre outros, e a insolubilidade e estabilidade de forma são devidos à rede tridimensional (HOFFMAN, 2002).

Hidrogéis podem ser obtidos por reticulações covalentes ou interações físicas entre as cadeias poliméricas. Podendo, dessa forma, ser do tipo químico ou do tipo físico (Figura 3.4). Essa classificação se deve à diferença na síntese do hidrogel. Hidrogéis do tipo químico, conhecidos também como hidrogéis permanentes, são formados por reações químicas. As reticulações covalentes podem ser formadas a partir da reação entre

monômeros vinílicos e monômeros bifuncionais, por métodos de radiação de energia (radiação  $\gamma$ , radiação ultravioleta), e outros. Os hidrogéis do tipo físico, conhecidos também como hidrogéis temporários, são formados através de interações físicas. As reticulações físicas são obtidas a partir da interação de forças eletrostáticas, formação de ligações de hidrogênio e cristalitas, interações hidrofóbicas, e etc. (HOFFMAN, 2002).

A importância dos hidrogéis como biomateriais se deve à semelhança de suas propriedades físicas com os tecidos vivos, tais como elevado conteúdo de água, consistência macia e elástica.

**Figura 3.4.** Modelo representativo das estruturas dos hidrogéis (MOREIRA, 2011).



Por serem de consistência muito flexível, permeáveis, não-abrasivos e com capacidade de absorver/trocar fluidos com organismos vivos, encontram amplo emprego como biomateriais. Os principais usos de hidrogéis como biomateriais são como lentes de contato, substratos para engenharia de tecidos, membranas para liberação controlada de fármacos em tratamentos de diferentes tipos de doenças, além de aplicações em ortodontia, implantes, oftalmologia, curativos para ferimentos e queimaduras, etc. (RAZZAK *et al.*, 1999).

Hidrogéis podem ser naturais (ágar, ácido hialurônico, alginato, quitosana), semi-sintéticos (polímeros naturais modificados, por exemplo, dextrana reticulada, galactomanana) e sintéticos (poliacrilamida, poli(hidroxietil metacrilato), policloreto de vinila, etc.). Podem ser classificados como neutro ou iônico, dependendo da natureza dos grupos lateralmente ligados às cadeias poliméricas. A rede pode ser formada por homopolímeros ou copolímeros (PEPPAS *et al.*, 2000b). Os hidrogéis podem ser ambientes responsivos, ou seja, podem variar seu intumescimento dependendo do pH, força iônica e temperatura (KHARE & PEPPAS, 1995).

Dentre as vantagens que tornam os hidrogéis interessantes para a utilização em aplicações médicas, destacam-se:

- a capacidade de intumescer em água, que os assemelha a muitos tecidos vivos;
- a sua consistência elastomérica minimiza o atrito entre tecidos e hidrogel;
- a permeabilidade: permite o fluxo de fluidos corpóreos pelo material, pois hidrogéis apresentam porosidade;
- facilidade de obtenção em diferentes formas;
- permite a incorporação e liberação controlada de fármacos.

A Tabela 3.3 apresenta alguns exemplos de hidrogéis sintéticos que têm sido utilizados com sucesso na engenharia de tecidos (SLAUGHTER *et al.*, 2009).

**Tabela 3.3.** Aplicações de hidrogéis em engenharia de tecidos (adaptado de SLAUGHTER *et al.*, 2009).

<b>Tipo de implante</b>	<b>Tipos de células estudadas</b>	<b>Tipos de hidrogéis</b>	<b>Função</b>
Osso	Osteoblastos	PEG-PLA	Encapsulamento; liberação controlada de droga
Osso	Fibroblastos	PEG	<i>Scaffold</i>
Cardiovascular	Células de medula óssea	Fibrina	Liberação de células, <i>scaffold</i>
Cartilagem	Condrócitos	PVA	Encapsulamento
Olhos	-	PHEMA	<i>Scaffold</i>
Facial	Condrócitos	Alginato	Encapsulamento; implante
Intraperitoneal	-	PEG	Liberação controlada de droga
Pele	-	Colágeno	Liberação controlada de droga
Pele	Fibroblastos	Ácido hialurônico	<i>Scaffold</i>
Vascular	-	Gelatina	Liberação controlada de droga
Cordas vocais	-	Colágeno, alginato	<i>Scaffold</i>

Em termos de cargas iônicas, hidrogéis podem ser neutros, catiônicos, aniônicos, ou anfóteros, em função da natureza de seus grupos funcionais.

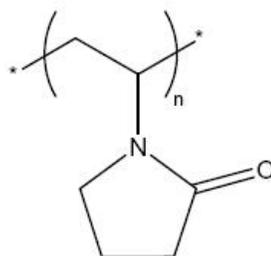
Para aplicações na engenharia de tecidos, os hidrogéis carregados, tendem a facilitar a proliferação de células e promover uma melhor adesão destas quando comparado aos hidrogéis não carregados ionicamente (SLAUGHTER *et al.*, 2009).

Há várias aplicações na medicina regenerativa em que os hidrogéis têm encontrado utilidade. Hidrogéis vêm sendo utilizados como *scaffolds*, para promover suporte mecânico e/ou auxiliar/guiar a organização celular, e também para atuar como estrutura para preenchimento de vazios entre tecidos e bioadesivo. Os hidrogéis também podem ser utilizados como depósito ativo de fármacos e agente de liberação de drogas, em situações que estimulam o processo de regeneração de tecido, além de encapsulante/liberador de células (SLAUGHTER *et al.*, 2009).

### **3.7.1 Poli (*N*-vinil-2-pirrolidona)**

Poli (*N*-vinil-2-pirrolidona) (PVP) é um polímero sintético, solúvel em água, biocompatível, hemocompatível e há muitos anos tem sido aplicado como biomaterial. O PVP destaca-se por sua capacidade de interagir com uma grande variedade de materiais hidrofílicos e hidrofóbicos, e apresenta propriedades semelhantes às de uma proteína devido à sua estrutura de pirrolidona. Este material apresenta pouca imunogenicidade e antigenicidade, toxicidade muito baixa e tem capacidade favorável na utilização no campo de liberação de fármacos. O PVP é utilizado em uma ampla gama de aplicações, onde materiais revestidos com este polímero podem ser usados como dispositivos médicos destinados à implantação no corpo humano (HASSOUNA *et al.*, 2009).

Poli (*N*-vinil-2-pirrolidona) (Figura 3.5) é o nome dado ao polímero resultante da polimerização radicalar de *N*-vinil-2-pirrolidona. Após seu desenvolvimento na Alemanha, em meados dos anos de 1930, foi proposto como componente de plasma sanguíneo artificial. Devido a propriedades como a não toxicidade, alta biocompatibilidade, relativa inércia química, possibilidade de formação de filmes e resistência à degradação, o PVP encontrou usos em vários ramos industriais, principalmente nos da indústria farmacêutica, cosmética, de alimentos (ROBINSON, 1990). Na área médica, hidrogéis de PVP, possuem aplicações como hidrogéis compatíveis ao sangue, lentes de contato, fígado artificial e outros (PEPPAS *et al.*, 2000a).

**Figura 3.5.** Estrutura da PVP.

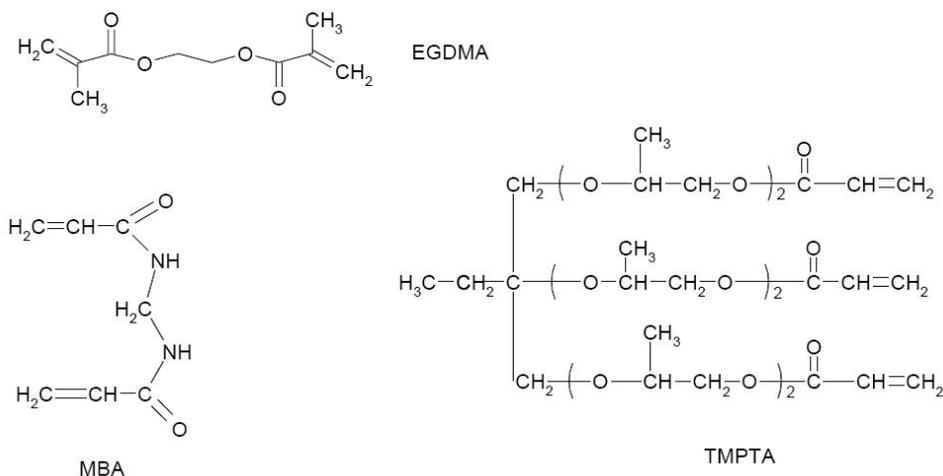
PVP também apresenta característica anfótera, ou seja, além da dissolução em água, também é capaz de se dissolver em alguns solventes orgânicos, tais como ácido acético, ácido fórmico, etanol, etilenoglicol, metanol, cloreto de metileno, entre outros. Na indústria farmacêutica, seu principal uso tem sido em revestimentos de comprimidos, retardando e, conseqüentemente, controlando a liberação do fármaco.

Charlesby e Alexander (1955) foram os primeiros pesquisadores a relatar que o PVP forma ligações cruzadas quando soluções aquosas do polímero são submetidas à radiação  $\gamma$ . Posteriormente, muitos pesquisadores investigaram a formação de gel a partir das soluções irradiadas de PVP.

O efeito da massa molecular, da dose de radiação, da concentração polimérica e da influência de solventes na reticulação de PVP, foi estudado por Chapiro e Legris (1985). Estudos foram focados também na conversão de monômeros de N-vinil-2-pirrolidona em hidrogel, na reticulação de PVP na presença de outros materiais como ágar e poli(óxido de etileno) (HILMY *et al.*, 1993), no preparo de hidrogéis de PVP utilizando monômeros multifuncionais tais como o etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) e trimetilol propano (TMPTA) (Figura 3.6). Foram estudadas também, várias características do processo e dos hidrogéis como a dose de radiação, o grau de intumescimento, a elongação na ruptura, a resistência à tensão, o comportamento de difusão, entre outros.

Um dos processos de produção de hidrogel de PVP mais comum, é o uso de radiação ionizante. Em um estudo sobre o comportamento de intumescimento do hidrogel de PVP por sistemas binários (PVP/água) e ternários (PVP/persulfato de potássio/água) em soluções de uréia, foi possível verificar que, dependendo da quantidade de persulfato, pode haver cisão e reticulação da cadeia polimérica (KAPLAN E GÜNER, 2000). Yu *et al.* (2006) avaliaram a síntese do hidrogel de PVP, poli(álcool vinílico) (PVA) e quitosana por radiação  $\gamma$  como alternativa no uso de curativos.

**Figura 3.6.** Alguns monômeros multifuncionais para reticular polímeros de PVP.



Lopes e Felisberti (2003) estudaram a aplicabilidade de hidrogéis de PVP-gelatina usando persulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) e glutaraldeído como agentes de reticulação, para aplicação na área de liberação de drogas transdérmicas.

Com o intuito de melhorar as propriedades dos hidrogéis de PVP e aumentar a aplicabilidade deste material, há na literatura vários estudos de produção destes hidrogéis por radiação ionizante na presença de aditivos, tais como: sais, polímeros, monômeros e etc.

Na área de hidrogéis sensíveis a estímulos externos, El-Rehim *et al.* (2007) estudaram a irradiação de PVP na presença de ácido acrílico para tornar o material sensível a estímulos de pH, sendo proposto como gel carregador de drogas. Ravichandran *et al.* (1997) estudaram a síntese de hidrogéis (IPN) de copolímeros de ácido acrílico e N-vinil-2-pirrolidona polymerizados na presença de polietilenoglicol e N,N'-metileno bisacrilamida (MBAM), para aplicação como gel liberador de drogas em fluidos gástricos.

No tratamento oncológico, lipossomos encapsulados por PVP têm seu tempo de circulação *in vivo* efetivamente prolongado (GAUR *et al.*, 2000). Sabe-se que o PVP, quando utilizado em sistemas de liberação de drogas, aumenta o tempo de circulação da droga no plasma. Guowei *et al.* (2007) avaliaram a síntese de nanoesferas de hidrogéis de PVP e PVA contendo partículas magnéticas de ferro. Este sistema exibe uma passiva liberação de droga que pode aumentar a eficácia do tratamento terapêutico em câncer.

Hidrogéis podem ser sintetizados também por interações eletrostáticas, como por exemplo, ligações de hidrogênio, força iônica e etc. Yu *et al.* (2007) avaliaram a produção

de nanopartículas de nitrato de prata em curativos de PVP e PVA para evitar a contaminação e infecção. O hidrogel é reticulado por ciclos de congelamento e descongelamento de soluções de PVP com PVA. Além das ligações de hidrogênio entre as cadeias do PVP e PVA há também a formação de cristalitos, o que torna o hidrogel mais estável. Hidrogéis de PVP também podem ser preparados pela ação de agentes reticulantes. Kharlampieva *et al.* (2007) avaliaram a produção de um material sensível ao estímulo de pH sintetizado com PVP e poli(ácido metacrílico) (PMAA), na presença de etilenodiamina (EDA) como agente reticulante. Este hidrogel pode ser utilizado como controlador da liberação de drogas.

A síntese de géis de PVP a partir dos seus monômeros, na presença de monômeros multifuncionais como agente reticulantes, é muito comum. Güven *et al.* (1991) estudaram o comportamento de hidrogéis de PVP, sintetizados a partir do seu monômero (N-vinil-2-pirrolidona) na presença de EGDMA e TMPTA sob radiação  $\gamma$ , para avaliar potenciais sistemas de imobilização enzimática. Çaykara e Kantoglu (2004) estudaram a síntese hidrogéis de copolímeros de N-vinil-2-pirrolidona e ácido crotônico, sensíveis a estímulos térmicos, na presença do agente reticulante EGDMA por radiação  $\gamma$ . Bajpai *et al.* (2006) estudaram a síntese de um hidrogel sensível a pH, a partir de N-vinil-2-pirrolidona com ácido acrílico na presença de N,N'-metileno bisacrilamida (MBAM), como liberador de vitamina B12.

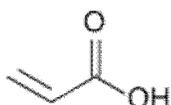
A síntese por radiação ultravioleta (UV) é outro processo utilizado na produção de hidrogéis. Devine *et al.* (2006) estudaram a polimerização de N-vinil-2-pirrolidona e ácido acrílico por radiação UV na presença do agente reticulante EGDMA, na produção de um material multifuncional para aplicações biomédicas. Chen *et al.* (2005) estudaram a reticulação via radiação UV de N-vinil-2-pirrolidona e ácido itacônico na presença do monômero bifuncional MBAM, para produção de hidrogéis sensíveis à variação do pH, os quais podem ser utilizados na liberação de fármacos.

### **3.7.2 Poli (ácido acrílico)**

O poli (ácido acrílico) (PAA), cuja estrutura é apresentada na Figura 3.7, é um polímero sintético, solúvel em água, dioxano, etanol, metanol e álcool isopropílico (bons solventes polares), e insolúvel em benzeno, acetona e outros (NEMEC & BAUER, 1985). É obtido por polimerização via radicais livres do ácido acrílico. Possui em sua estrutura

grupos carboxílicos terminais que conferem um caráter polianiônico à sua molécula, rendendo-lhe habilidade de trocas iônicas e complexação com íons de carga positiva (ALPATOVA, 2004). Há grande interesse na utilização de poli (ácido acrílico) em diversas aplicações e, dentre os usos, os mais interessantes são a fabricação de olhos artificiais, lentes de contato e dentaduras artificiais, uma vez que não causa irritação nem sensibilização à pele e aos olhos (DITTOGEN *et al.*, 1997).

**Figura 3.7.** Estrutura do AA



O caráter aniônico do poli (ácido acrílico) em valores de pH alto ( $\text{pH} \geq 6$ ) torna este polímero adequado para a cobertura de sistemas de liberação oral, tendo sido investigado como agente que prolonga o tempo de residência e aumenta o tempo de contato com a mucosa no local de absorção da droga (LUESSEN *et al.*, 1994). Contudo, sua alta solubilidade, limita seu uso como sistema de liberação de droga transmucosa, visto que pode ser dissolvido antes do tempo desejado de permeação da droga através da membrana (NEEDLEMAN & SMALES, 1995). Seu caráter aniônico favorece a sua capacidade de se complexar com álcool polivinílico (PVA), poli (vinil pirrolidona) (PVP), poli (óxido de etileno) (PEO) e quitosana, entre outros, através de pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas, originando, assim, misturas de aspectos homogêneos que possuem baixa solubilidade em água (TORRADO *et al.*, 2004; KACZMAREK & SZALLA, 2006; WU *et al.*, 2006).

O poli (ácido acrílico) pertence à classe dos polímeros responsíveis, ou seja, muda suas características devido à mudança de algum parâmetro externo (HUANG *et al.* 2006). Ele responde ao pH do meio, expandindo ou encolhendo devido aos grupos funcionais de ácido carboxílico que variam sua ionização de acordo com o pH. Possuindo uma característica eletroativa, o poli (ácido acrílico) já foi usado na síntese de músculos artificiais (MOSCHOU *et al.*, 2004).

### **3.7.3 Poli (N-vinil-2-pirrolidona-ácido acrílico)**

Polímeros a base de vinilpirrolidona tem sido utilizados na fabricação de lentes de

contacto por vários anos e apresentam-se como promissores em sistemas de liberação de drogas, enquanto que reticulados com poli (ácido acrílico) são conhecidos por apresentarem excelentes propriedades mucoadesivas e por aumentarem a biodisponibilidade ocular (LEE *et al.*, 2000; WOODLEY, 2001). Combinações de PVP e PAA têm sido relatadas por exibirem características de baixa viscosidade e elevado índice de mucoadesão (OECHSNER & KEIPERT, 1999).

Recentemente estudos sobre complexos interpoliméricos têm indicado que estas misturas resultam em materiais promissores para uso em sistemas de liberação de drogas oftálmicas. Suas vantagens sobre os homopolímeros incluem liberação controlada, associação prolongada com a córnea (daí, uma maior biodisponibilidade da droga colocada), conforto e transparência (CHUN *et al.*, 2002; TAN *et al.* 2001).

Poli (ácido acrílico) e seus copolímeros têm sido utilizados frequentemente como transportadores em sistemas de liberação de drogas, devido as suas propriedades específicas, natureza multifuncional e boa biocompatibilidade (BARBU *et al.*, 2005; DEVINE *et al.*, 2006). Hidrogéis copoliméricos constitutivos de unidades repetitivas de vinilpirrolidona e ácido acrílico foram avaliados quanto à sua capacidade para atuar como veículo para liberação controlada de droga oftálmica. Experimentos realizados *in vitro* mostraram que alguns destes materiais podem ser utilizados na entrega de drogas como a pilocarpina ou cloranfenicol, enquanto que em estudos *in vivo*, utilizando coelhos, confirmaram o seu elevado potencial para a entrega controlada ocular, de cloridrato de pilocarpina (BARBU *et al.*, 2005).

### **3.8 Suportes para cultura celular (*scaffolds*)**

Qualquer tecido do organismo vivo consiste de uma matriz com um ou mais tipos de células. A matriz é, *in vivo*, um alojamento para as células, e providencia para elas uma arquitetura específica e ambiente tecidual apropriado. Assim, ela serve como um reservatório de água, nutrientes, citosinas (grupo de células que têm como função regular respostas inflamatórias), fatores de crescimento etc. Neste sentido, para restaurar funções ou regenerar tecidos, muitas vezes há necessidade de um *scaffold* (suporte) que atue como uma matriz temporária para auxiliar na proliferação celular e deposição da matriz extracelular, para a troca progressiva por uma estrutura regenerada e reconstituída.

A função do *scaffold* é proporcionar tanto um suporte mecânico e estrutural do tecido original enquanto o novo tecido é formado, quanto uma superfície para o crescimento celular (BARBANTI *et al.*, 2005). Este suporte proverá, durante a regeneração tecidual, o ambiente necessário para a diferenciação celular e definirá a forma final do tecido regenerado (HOKUGO *et al.*, 2006). Estas estruturas provêm um suporte biomecânico inicial para o tecido implantado até que as células produzam a matriz extracelular adequada. Durante a formação, deposição e organização da nova matriz, o ideal é que o *scaffold* degrade e seja metabolizado, deixando que o órgão vital ou tecido seja reestabelecido, mantenha ou melhore sua função tecidual (STOCK & VACANTI, 2001).

Os *scaffolds* funcionais são essenciais para algumas soluções da bioengenharia. Em muitos casos, o *scaffold* ideal deve ser biodegradável numa velocidade proporcional ao crescimento do tecido a ser reconstruído, para garantir a integridade estrutural do mesmo (STEVENS & GEORGE, 2005).

As propriedades mecânicas dos *scaffolds* como a resistência à flexão, tração e compressão, ductilidade (propriedade de suportar a deformação sem romper ou fraturar) e módulo de Young (razão entre tensão e deformação no regime elástico) são determinadas tanto pelas propriedades do material quanto pela estrutura do mesmo (macro, micro e nanoestrutura). A combinação das propriedades mecânicas do *scaffold* com o ambiente do enxerto é de crucial importância para que a progressão da recuperação tecidual não seja limitada por falhas mecânicas do *scaffold*, e para que haja a promoção da regeneração tecidual (MUSCHLER *et al.*, 2004).

O suporte fornecido pelos biomateriais, como *scaffolds*, pode facilitar a restauração da função e da estrutura de tecidos danificados, tanto em terapias baseadas em células, como as que comportam células transplantadas ou matrizes que induzem a morfogênese em tecidos bioengenhierados construídos *ex vivo*, quanto em terapias sem células, como aquelas onde há materiais indutores de migração, crescimento e diferenciação das células em tecidos sadios *in situ* (LUTOLF & HUBBELL, 2005). Estes materiais devem fornecer um suporte tridimensional provisório para interagir biomolecularmente com as células e assim, controlar suas funções, guiando espacialmente os processos multicelulares complexos de formação e regeneração tecidual (LUTOLF & HUBBELL, 2005). Cabe salientar que a estrutura química do material e o seu processamento determinam as propriedades funcionais e a interação das células com o *scaffold* (HOLLISTER, 2005). As estruturas podem ser projetadas de duas formas: não porosos ou densos, de maneira a

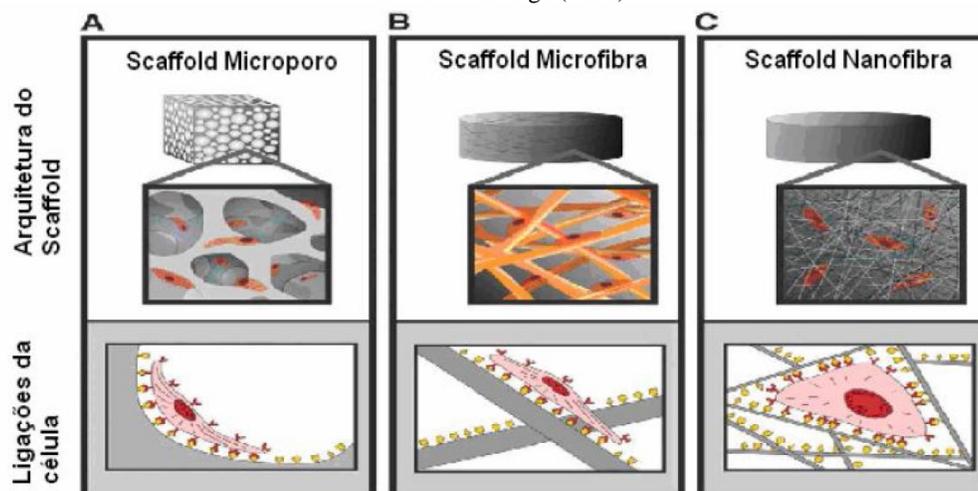
proteger as células implantadas do sistema imunológico; ou porosos, de forma a permitir a incorporação de novas células no corpo (WILLIAMS *et al.*, 1999).

Os *scaffolds* cerâmicos de fosfatos de cálcio, desenvolvidos nos últimos anos, foram idealizados para contribuir na reconstrução do tecido ósseo e no controle da reposição celular. A Figura 3.8 ilustra a influência da arquitetura do *scaffold* na adesão, e, conseqüentemente, na sinalização e na proliferação celular. Os receptores celulares são ativados de modos diferentes nas estruturas A, B e C, sendo a resposta da célula aderida também diferente. Células distintas também podem ser sensibilizadas pelo mesmo conjunto codificado do *scaffold*, mas de maneiras diferentes, dependendo das características dos seus receptores (STEVENS & GEORGE, 2005).

Pode-se observar que as células aderem de forma diferente em *scaffolds* com arquiteturas diferentes. Em ambos os *scaffolds*, microporosos ou microfibrados, a área superficial é menor, tornando as células menos aderidas ao material, enquanto que em *scaffolds* nanofibrados a área superficial é maior, refletindo em uma melhor adesão celular.

Com o objetivo de desenvolver *scaffolds* com potencial para engenharia de tecido, pesquisadores vêm utilizando materiais que proporcionam o controle da estrutura porosa (ZHANG *et al.*, 2003; AUSTIN, 2007; CHENG *et al.*, 2009; LU *et al.*, 2010).

**Figura 3.8.** A influência da arquitetura do *scaffold* na adesão e proliferação celular. Figura adaptada de Stevens e George (2005).



Parte do sucesso de um *scaffold* depende da adesão e crescimento das células de interesse na sua superfície. A superfície química do material pode definir a resposta celular ao material e, de certa forma, afetar a adesão celular, proliferação, migração e função das

células (BOYAN *et al.*, 1996; DEE *et al.*, 1998; LAUFFENBURGER & HORWITZ, 1996). Não é apenas necessária a biocompatibilidade ou biodegradabilidade do arcabouço, mas também é essencial que a sua superfície possibilite a adesão celular e o subsequente crescimento tecidual. O ideal é que seja capaz de se ajustar as propriedades de superfície para atender à aplicação desejada, geralmente sem alterar outras propriedades deste *scaffold*, como sua resistência mecânica ou suas propriedades térmicas.

Para que o *scaffold* forneça um ambiente apropriado, através do qual o novo tecido será formado (MUSCHLER *et al.*, 2004), a química das estruturas deve incluir interações específicas com os componentes de matriz extracelular como, fatores de crescimento e receptores celulares de superfície (MADHALLY & MATTHEW, 1999). Modificações úteis de superfície incluem mudanças no grupo químico funcional, carga de superfície, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade e molhabilidade (WILLIAMS *et al.*, 1999). Desta forma, as características de superfície irão determinar o comportamento celular (ANSELME, 2000) e definirão o grau de sucesso do implante.

Atualmente, a variedade de biomateriais disponíveis para uso na engenharia de tecidos, como substrato para culturas celulares ou arcabouços tridimensionais temporários com propriedades específicas, ainda é limitada (WILLIAMS *et al.*, 1999).

Entretanto, progressos recentes têm sido relatados no campo de materiais biomédicos, que utilizam tanto polímeros naturais quanto sintéticos e que podem ser utilizados em diversas aplicações, incluindo curativos, sistemas de liberação de fármacos, enxertos vasculares ou *scaffolds* para engenharia de tecidos *in vitro* e *in vivo* (CZAJA *et al.*, 2007).

A biocompatibilidade destes biomateriais está relacionada com o comportamento das células que estão em seu contato e particularmente à adesão celular à sua superfície (ANSELME, 2000). Para servir ao seu propósito com maior eficiência e maior biocompatibilidade, os biomateriais e biopolímeros podem sofrer modificações e serem incrementados com compostos que promovam a regeneração tecidual (CZAJA *et al.*, 2007).

As características de superfície dos biomateriais determinarão quais moléculas biológicas serão adsorvidas. De acordo com as biomoléculas adsorvidas no biomaterial e sua orientação na superfície, haverá um comportamento celular característico, com consequências diretas na adesão, proliferação e diferenciação das células, sendo que estes eventos dependem de diversos fatores químicos e biológicos para ocorrer. Além disso,

deve-se levar em conta que as células usam a morfologia do suporte para sua orientação e migração (BOYAN *et al.*, 1996).

O conhecimento dos mecanismos básicos de interação célula-material e um melhor entendimento dos processos em níveis celulares, durante a interação das células dependentes de ancoragem, que só proliferam após a adesão ao substrato, podem ajudar no desenvolvimento de novos biomateriais (KUMARI *et al.*, 2002; WATANABE *et al.*, 1993).

### 3.8.1 Scaffolds porosos

A razão para a utilização de cerâmicas porosas é fornecer local para o tecido ósseo crescer e fixar o implante biologicamente. Para o crescimento ocorrer, o tamanho do poro deve ser grande o bastante para acomodar as células, juntamente com o sistema de irrigação sanguínea, ficando por volta de 150-200  $\mu\text{m}$  de diâmetro. O tecido responde diferentemente ao diâmetro do poro do material e é resumido na Tabela 3.4.

**Tabela 3.4.** Crescimento tecidual, para células ósseas, de acordo com o tamanho dos poros (KARAGEORGIU & KAPLAN, 2005; WHANG *et al.*, 1999).

Tamanho dos poros	Resposta imunológica
Menor que 5 $\mu\text{m}$	Permite a neovascularização
Entre 5 e 15 $\mu\text{m}$	Crescimento de fibroblastos
Entre 10 e 75 $\mu\text{m}$	Penetração apenas de tecido fibroso (ajuda na fixação mecânica)
Entre 75 e 100 $\mu\text{m}$	Formação de tecido osteóide
Acima de 100 $\mu\text{m}$	Crescimento/regeneração óssea

Existe, no entanto, alguns problemas inerentes ao uso de materiais porosos. Em razão da comparável grande área superficial interfaciando o tecido, a estabilidade e limite de toxicidade necessárias ao material são mais severas. Além disso, a porosidade tende a degradar as propriedades mecânicas dos materiais. É conhecido que a resistência mecânica dos materiais cerâmicos decresce quase que exponencialmente com a fração volumétrica da porosidade. Além disso, devido à maior área superficial é exposta, o efeito do ambiente fisiológico na diminuição da resistência mecânica do material, torna-se mais acentuado do que para materiais densos. Os materiais cerâmicos porosos são obtidos tanto para materiais

bioativos (hidroxiapatita, fosfatos de cálcio) como para bioinertes (alumina, zircônia), e são utilizados em locais em que o carregamento sobre o implante é reduzido, procurando-se ainda uma resposta biológica e fixação do material mais rápida.

### 3.9 Compósitos fosfato de cálcio/hidrogéis

Ainda existem algumas desvantagens específicas que limitam o uso de fosfatos de cálcio para a substituição de tecidos duros, tais como: sua natureza frágil, a realidade conflitante entre porosidade e resistência mecânica e o problema de migração das partículas. Devido ao fato do osso ser um tecido que requer algum grau de tensão mecânica para manter sua vitalidade, a segurança a longo prazo de um implante permanente de fosfatos de cálcio é questionável. A fim de minimizar, ou até mesmo superar estes problemas, uma solução seria misturá-la a um ligante adequado. Nesse sentido, têm sido empregados vários biopolímeros, tais como colágeno, cola de fibrila, gelatina, quitosana e o alginato (HSU *et al.*, 1999; DU *et al.*, 2000; SIVAKUMAR & RAO, 2002).

Os compósitos, de um modo geral, têm atraído a atenção de muitos pesquisadores devido à possibilidade de se combinar as vantagens de diferentes materiais. No osso, a interação fosfato de cálcio/hidrogel possui papel importante na determinação das suas propriedades mecânicas.

Um aspecto fundamental na síntese do compósito fosfato de cálcio/hidrogel é o crescimento do fosfato de cálcio em meio aquoso de forma semelhante ao osso natural, estruturalmente e composicionalmente. Alguns estudos mostram que as propriedades mecânicas dos compósitos produzidos são de menor alcance que os valores obtidos para o osso (KANNAN *et al.*, 2001).

Como materiais compósitos, as biocerâmicas são normalmente combinadas com polímeros. Um exemplo é a aplicação conjunta com hidrogéis, entre eles carboximetilcelulose, polivinil álcool, quitosana e alginato. A combinação com diferentes polímeros levam a diferentes tempos de degradação e a diferentes propriedades mecânicas, aumentando ainda mais a aplicação e as propriedades dos fosfatos de cálcio (BARBIERI *et al.*, 2014).

A rigidez do compósito e o perfil de degradação não influenciam só a vascularização, o fluxo de células ou a reação tecidual. Em um recente estudo, com o objetivo de entender a influência do *scaffold* degradável no reparo ósseo, Patterson *et al.* (2010) preparou um hidrogéis com degradação ajustável a partir de derivados

metacrilatados de ácido hialurônico fotoquimicamente reticulados. Curiosamente, eles relataram que a taxa de degradação do *scaffold* pode também controlar a morfologia do tecido ósseo recém-formado, que afetando especificamente a organização da matriz de colágeno com orientação melhorada.

Os hidrogéis caracterizados por excessiva rigidez e falta de degradação, inibem a colonização celular, impedindo a vascularização e o rápido crescimento ósseo. O equilíbrio entre a estabilidade mecânica e o fluxo de células tem de ser otimizada em função da aplicação específica (D'ESTE & EGLIN, 2013).

### 3.10 Testes biológicos

Assim como a caracterização física, química e mecânica de biomateriais, a caracterização biológica por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo* é extremamente necessária para a avaliação do potencial para o uso na engenharia de tecidos (TMIHATA & IKADA, 1997; KHAN *et al.*, 2000; RISBUD *et al.*, 2000; MA *et al.*, 2001; MI *et al.*, 2001).

Estudos *in vitro* utilizando cultura de células são usados rotineiramente para determinação de biocompatibilidade e para investigar a interação entre células e biomaterial. Osteoblastos, células responsáveis pela formação de tecido ósseo, são as mais frequentemente utilizadas (LEGEROS, 2002). Células mesenquimais isoladas da medula óssea também podem ser utilizadas uma vez que se diferenciam em osteoblastos quando estímulos certos são fornecidos (SIEBERS *et al.*, 2005). Os fenômenos envolvidos na interação célula-material são adsorção, adesão, espalhamento e diferenciação.

Quando um material é inserido num defeito tecidual (*in vivo*) ou em meio de cultura (*in vitro*), entra em contato imediatamente com os componentes do fluido biológico ou meio de cultura. A superfície do material é envolvida por componentes do sangue ou por proteínas do soro que é adicionado ao meio de cultura. Portanto, seja *in vivo* ou *in vitro*, as células nunca estabelecem contato direto com a superfície do material, mas sim com a camada proteica que se forma sobre a superfície. Para que haja formação do tecido ósseo é necessário que ocorra uma série de eventos que envolvem a mineralização de proteínas da matriz extracelular (colágeno) mediada por osteoblastos com funções específicas de manter a integridade do tecido. As moléculas envolvidas nesse processo de adesão celular são as integrinas, que podem passar informações da matriz extracelular para as células e vice-versa. Esse caminho de sinalização que regula o comportamento celular será definido pelo material a ser utilizado (LEGEROS, 2002; SIEBERS *et al.*, 2005). Após a fase de adesão, a

fase de espalhamento estabelece o primeiro contato entre a célula e material. A partir desse momento a célula passa a expressar seu fenótipo, sintetizando proteínas da matriz extracelular e adquirindo forma específica (CHESMEL *et al.*, 1995).

A primeira técnica *in vitro* utilizada neste trabalho é a imersão do material em solução de fluido corpóreo simulado (*Simulated Body Fluid* - SBF). A utilização de soluções que simulam o fluido corpóreo acelular tem se intensificado nos últimos anos, principalmente depois que Kokubo e Takadama (2006) definiram como critério de bioatividade para implantes ósseos a capacidade que materiais, com potencial para serem usados para regeneração óssea, têm de desenvolverem uma camada de apatita sobre sua superfície após imersão nesta solução. Esta camada de apatita formada pode atuar como sinalizadora para as células que se proliferam e se diferenciam para produzir colágeno e hidroxiapatita. Desde então, várias soluções, que diferem entre si pela composição química, têm sido propostas com esta finalidade (RESENDE *et al.*, 2007).

A facilidade de execução e a boa correlação entre a resposta positiva dos materiais no teste de imersão em solução de SBF faz deste teste a primeira escolha para a avaliação da bioatividade de um biomaterial. Os materiais que respondem positivamente ao teste da imersão são geralmente submetidos a testes (*in vivo*) mais refinados como a cultura celular.

A cultura de células de mamíferos constitui-se em uma ferramenta muito útil para a avaliação biológica dos biomateriais, seja na determinação de possíveis efeitos citotóxicos ou da influência destes no processo de adesão, proliferação e diferenciação celular (SANTOS JR, 2001).

Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, houve a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que avaliam a toxicidade de dispositivos para uso em seres humanos (ROGERO *et al.*, 2000; ROGERO *et al.*, 2003). A norma ISO 10993 (*International Standard Organization*) fornece uma série de procedimentos e padrões para a avaliação biológica de dispositivos médicos e o documento ASTM F 813-83 fornece um método de contato direto para avaliação de materiais e dispositivos médicos frente à cultura de células, enquanto que o documento ASTM F 895-94 descreve o método de difusão em Agar de cultura de células para seleção de materiais por citotoxicidade. A norma ISO 10993 é dividida em dezesseis partes compreendendo a fabricação, a esterilização, a caracterização e a resposta biológica local e sistêmica do biomaterial. Pela norma ISO, os testes de toxicidade consistem em colocar o biomaterial direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes métodos. Além de aspectos referentes

ao procedimento, há também especificação quanto à linhagem celular, ao meio de cultura e às técnicas para avaliação da citotoxicidade. Além disso, a norma ISO 10993 especifica os materiais que podem ser utilizados como controle positivo (substância que apresenta efeito citotóxico de maneira reprodutível) e negativo (substância que não produz efeito citotóxico).

Deste modo, os testes *in vitro* permitem com que se faça uma rápida pré-seleção de materiais, os quais serão posteriormente avaliados por testes *in vivo*, diminuindo o número de amostras com potencialidade de serem estudadas.

Os testes de citotoxicidade representam a fase inicial de ensaios de avaliação da biocompatibilidade de um material com potencial para aplicações médicas. Assim, são utilizados em uma pré-seleção para a detecção se o material em questão promove a morte das células ou outros efeitos negativos nas funções celulares (BLACK, 1992). Para que um biomaterial seja considerado não citotóxico, este, necessariamente, não deve causar a morte de células e nem mesmo afetar suas funções. A avaliação da citotoxicidade pode ser realizada por análise da morfologia celular, da integridade da membrana celular, da proliferação celular e da atividade biossintética, dentre outros métodos (FRESHNEY, 1989).

Um resultado negativo de citotoxicidade indica que o material está livre de componentes danosos ou que os têm em quantidade insuficiente para causar efeitos agudos em células isoladas, sob condições extremas. Por outro lado, um resultado positivo indica que o material contém uma ou mais substâncias tóxicas que são extraídas e que podem promover efeitos indesejáveis *in vivo* (CIAPETTI *et al.*, 1996).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido em quatro etapas principais. Primeiramente sintetizou-se a fase alfa do fosfato tricálcico por reação via úmida e determinaram-se os melhores parâmetros de síntese. Em seguida sintetizaram-se algumas formulações de hidrogéis e foram avaliados alguns de seus parâmetros. Na terceira etapa, avaliou-se a incorporação dos hidrogéis ao cimento de fosfato de cálcio preparado. Como última etapa desse trabalho foi realizada a avaliação de bioatividade *in vitro* e citotoxicidade do cimento de fosfato de cálcio baseado em alfa-fosfato tricálcico (etapa realizada junto ao grupo de pesquisas 3B's em Portugal).

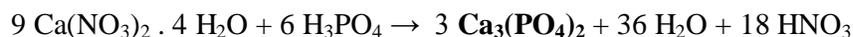
### 4.1 Obtenção de alfa-fosfato tricálcico por reação via úmida

Nitrato de cálcio tetra-hidratado,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, Alemanha) e ácido fosfórico,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Dinâmica, Brasil) foram utilizados como reagentes para a obtenção dos pós de fosfato tricálcico. Os pós foram sintetizados por reação via úmida e a relação Ca/P de 1,5 foi mantida. Para preparo dos cimentos foi utilizado fosfato de sódio dibásico dodecahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) (Synth, Brasil) como acelerador de pega do cimento.

#### 4.1.1 Estudo da ordem de adição dos reagentes e temperatura de calcinação

Nesta etapa avaliou-se a influência de três metodologias de precipitação química e a utilização de três temperaturas de calcinação, nas propriedades do pó obtido.

O alfa-TCP foi sintetizado em laboratório utilizando-se nitrato de cálcio ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) e ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), ambos com concentração de 0,5 M, conforme a seguinte reação:



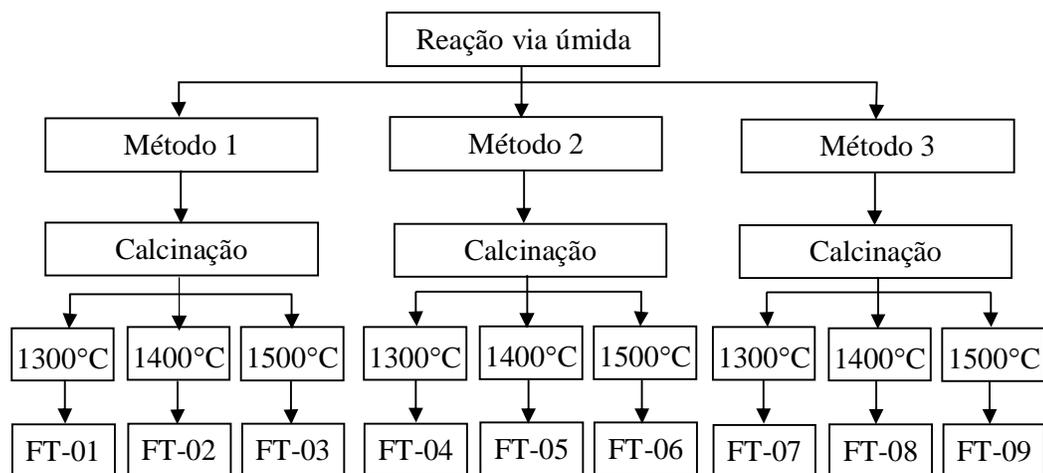
A relação Ca/P foi mantida em 1,5, com o intuito de obter-se fosfato tricálcico. As metodologias de precipitação química estão descritas na Tabela 4.1:

**Tabela 4.1.** Metodologias de precipitação química.

	<b>Método 1</b>	<b>Método 2</b>	<b>Método 3</b>
Titulante	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O
Titulado	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
Correção do pH<4,0	-	NH <sub>4</sub> OH	-

O pH inicial das soluções ficou em torno de 2,0. Assim, na metodologia 2 foi avaliada a influência de uma pequena correção do pH até 4,0, buscando-se assim evitar a formação de hidroxiapatita. De acordo com Ferreira *et al.* (2003) em experimentos realizados em valores de pH maiores do que 4,2 é esperado que a fase precipitada seja hidroxiapatita.

A solução foi mantida na temperatura de 90°C ± 2, por 24 horas. Após este período a solução foi seca em estufa a 120°C ± 2 por 24 horas e então calcinada em diferentes temperaturas por 1 hora, conforme fluxograma abaixo (Figura 4.1).

**Figura 4.1.** Fluxograma das etapas utilizadas para obtenção dos cimentos.

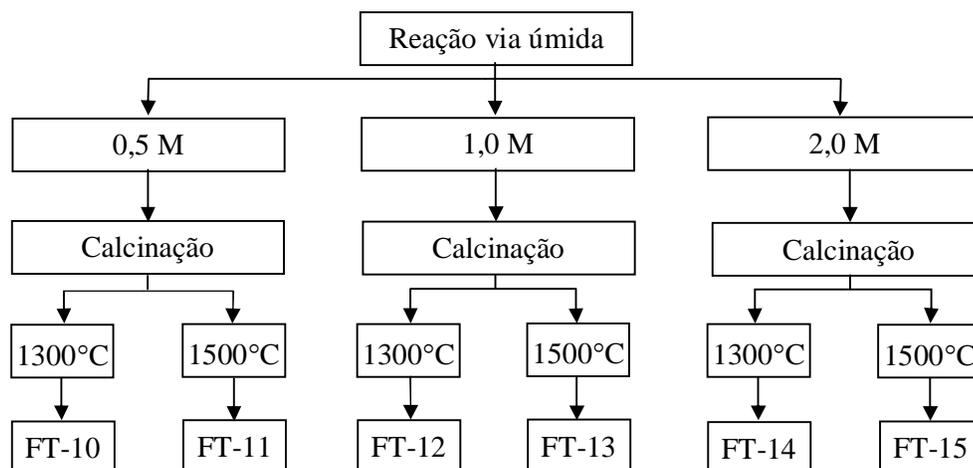
Após a calcinação das amostras nas diferentes temperaturas, o produto da reação, na forma de uma espuma quebradiça, foi facilmente desaglomerado utilizando-se almofariz e pistilo até obtenção de um pó fino o qual foi passado por peneira #325. A partir deste momento, o pó de alfa-fosfato tricálcico passa a ser chamado de cimento de fosfato de cálcio (CFC). Em seguida foi realizada a caracterização das amostras.

#### 4.1.2 Estudo da influência da concentração dos reagentes

Nesta etapa avaliou-se a influência da concentração dos reagentes na obtenção da fase alfa-TCP, utilizando o método de precipitação número 1, conforme descrito item anterior.

O fluxograma abaixo (Figura 4.2) descreve as concentrações dos reagentes, sendo que foi mantida a relação Ca/P em 1,5.

**Figura 4.2.** Fluxograma das etapas utilizadas para obtenção dos cimentos.



Após a calcinação das amostras nas diferentes temperaturas, por 1 hora, o produto da reação, na forma de uma espuma quebradiça, foi facilmente desaglomerado utilizando-se almofariz e pistilo até obtenção de um pó fino o qual foi passado por peneira #325. Após foi realizada a caracterização das amostras.

Para a obtenção de corpos de prova, os pós obtidos via reação úmida foram misturados com uma solução aquosa de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2,5%, mantendo a razão líquido/pó (L/P) de  $0,29 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ .

#### 4.1.3 Avaliação da influência do tempo de moagem nas propriedades do cimento de fosfato de cálcio

O alfa-TCP foi sintetizado utilizando-se o método 1, com temperatura de calcinação de  $1500^\circ\text{C}$  e concentração dos reagentes de 2,0 M, visto que foi possível obter a fase alfa-TCP nessa concentração, com maior rendimento de reação. As amostras foram moídas em

moinho de bolas utilizando como meio de moagem bolas de alumina de 10,80 milímetros de diâmetro. Para cada grama de pó foi utilizado quatro bolas de alumina com 2,0 ml de álcool etílico anidro (Dinâmica, Brasil), para a moagem. Os tempos de moagem utilizados estão descritos na Tabela 4.2.

A solução resultante (alfa-TCP + álcool) foi então peneirada apenas para se separar os meios de moagem e permaneceu 72h em estufa a 70°C para promover a evaporação total do álcool, restando apenas o pó obtido para posterior caracterização.

**Tabela 4.2.** Tempo de moagem e identificação das amostras.

Amostra	FT-15-00	FT-15-05	FT-15-1	FT-15-2	FT-15-4	FT-15-8	FT-15-16
Tempo de moagem (h)	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0

Para a obtenção dos corpos de prova, os pós obtidos via reação úmida foram misturados com uma solução aquosa de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 2,5%. A razão líquido/pó (L/P) empregada variou com o pó utilizado, como mostrado na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3.** Razão líquido/pó empregada para o preparo dos cimentos.

Amostra	FT-15-00	FT-15-05	FT-15-1	FT-15-2	FT-15-4	FT-15-8	FT-15-16
L/P (mL.g <sup>-1</sup> )	0,29	0,29	0,30	0,31	0,32	0,33	0,34

Foram preparados 10 corpos de prova para cada tempo de moagem estudado e determinaram-se as propriedades físicas e mecânicas destes. Os corpos de prova foram conformados no formato cilíndrico nas dimensões de 12 ± 0,2 mm de altura e 6 ± 0,2 mm de diâmetro, conforme norma ASTM F 451-95. As amostras foram desmoldadas e mantidas em ambiente com 100% de umidade, durante 24 horas, e, em seguida, imersas em plasma sanguíneo simulado (SBF) por sete dias a 37°C, para avaliação *in vitro*.

O SBF utilizado apresenta a composição encontrada na Tabela 4.4. O pH final da solução foi mantido em 7,4.

**Tabela 4.4.** Composição iônica do SBF, baseada na norma ISO 23317.

	Concentração de íons (mM)							
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5

## 4.2 Obtenção dos hidrogéis

Foram avaliadas diferentes formulações de hidrogéis com o objetivo de comparar as propriedades obtidas e assim verificar qual formulação apresenta características mais promissoras para incorporação ao cimento.

Os hidrogéis foram preparados por polimerização via radical livre utilizando N-vinil-2-pirrolidona (NVP) (Merck, Alemanha) e Ácido Acrílico anidro (AAc) (Sigma-Aldrich, Alemanha). Como iniciador foi utilizado Azobisisobutironitrila (AIBN) (Sigma-Aldrich, Alemanha) ou Persulfato de Amônio (AP) (Merck, Brasil) ou 1-Hidroxíciclohexil Fenil Cetona (HCPK) (Sigma-Aldrich, Alemanha), como fotoiniciador. O composto bifuncional N,N'-Metileno Bisacrilamida (MBAM) (Sigma-Aldrich, Alemanha) foi utilizado agente de reticulação e N,N,N',N'-Tetrametiletenodiamina (TEMED) (Acros, Bélgica) foi utilizado como catalizador da reação. A N-vinil-2-pirrolidona foi previamente destilada em rotavapor, utilizando polietilenoglicol como líquido no banho, em temperatura de 135-140°C.

Gáscue *et al.* (2008) variaram a concentração do agente reticulante de 0,5 a 3,0%, obtendo assim diferentes intumescimentos. Assim, para ambos os estudos realizados, optou-se por utilizar uma concentração intermediária de MBAM, sendo esta mantida em 2,0%.

### 4.2.1 Hidrogéis – Avaliação 1

As formulações testadas nesta primeira avaliação estão mostradas na Tabela 4.5, e foram baseadas nas formulações testadas por Ravichandran *et al.* (1997), na qual prepararam hidrogéis interpoliméricos de Poli [N-vinilpirrolidona-ácido acrílico]-polietilenoglicol por polimerização via radical livre utilizando AAc e NVP na razão molar de 1:2,6. Os autores avaliaram formulações utilizando o iniciador AIBN nas concentrações de 2,75%, 3,25% e 3,75% e o agente de reticulação MBAM nas concentrações de 1,75%, 2,0% e 2,25% e verificaram que as condições dos hidrogéis foram otimizadas com a variação na concentração do iniciador e agente de reticulação. Assim optou-se por avaliar neste trabalho concentrações intermediárias de iniciador e agente de reticulação. Visto que persulfato de potássio também era bastante utilizado como iniciador, optou-se por testar as formulações utilizando persulfato de amônio, já que este estava disponível no laboratório.

**Tabela 4.5.** Composição percentual, em massa, dos hidrogéis.

Amostra	NVP	AAc	MBAM	TEMED	AIBN	AP
<b>H1</b>	29,0	-	2,0	0,2	3,0	-
<b>H2</b>	29,0	7,2	2,0	0,2	3,0	-
<b>H3</b>	29,0	-	2,0	0,2	-	6,0
<b>H4</b>	29,0	7,2	2,0	0,2	-	6,0

As soluções foram aquecidas a 80°C em uma estufa para polimerização. Após, as amostras foram lavadas e liofilizadas para subsequente caracterização.

#### 4.2.2 Hidrogéis – Avaliação 2

Após avaliação dos resultados obtidos, procurou-se modificar as formulações para se alcançar resultados mais promissores à aplicação desejada. Assim, optou-se por aumentar a concentração de AAc, buscando aumentar a absorção de água e/ou melhorar as propriedades dos hidrogéis e compósitos. As formulações anteriores não permitiram uma maior absorção de água pelos compósitos, característica que é buscada visto que o objeto é aumentar a adesão e distribuição de células no interior do material.

A concentração de AP foi reduzida, em relação à série anterior, visto que Gáscue *et al.*, (2008) obtiveram resultados de polimerização com menores teores de AP. A composição da nova série de hidrogéis está mostrada na Tabela 4.6. As soluções (H5 a H10) foram aquecidas a 80°C em uma estufa para polimerização. As soluções H11, H12 e H13 foram expostas a luz UV por 20 minutos para polimerização. Após, as amostras foram lavadas e liofilizadas para subsequente caracterização.

**Tabela 4.6.** Composição percentual, em massa, dos hidrogéis.

Amostra	NVP	AAc	MBAM	TEMED	AIBN	AP	HCPK
<b>H5</b>	30,0	-	2,0	0,2	3,0	-	-
<b>H6</b>	-	15,0	2,0	0,2	3,0	-	-
<b>H7</b>	30,0	15,0	2,0	0,2	3,0	-	-
<b>H8</b>	30,0	-	2,0	0,2	-	0,5	-
<b>H9</b>	-	15,0	2,0	0,2	-	0,5	-
<b>H10</b>	30,0	15,0	2,0	0,2	-	0,5	-
<b>H11</b>	30,0	-	2,0	0,2	-	-	0,5
<b>H12</b>	-	15,0	2,0	0,2	-	-	0,5
<b>H13</b>	30,0	15,0	2,0	0,2	-	-	0,5

### 4.3 Obtenção dos compósitos

Foi avaliada a incorporação das formulações de hidrogéis ao cimento de fosfato de cálcio que não passou por moagem adicional (FT-15-00). Foram testadas todas as formulações de hidrogéis, inclusive as que não polimerizaram nos sistemas propostos, para verificar seu comportamento frente ao cimento de fosfato de cálcio e sua influência nas propriedades finais dos cimentos. A razão líquido/pó foi mantida em  $0,3 \text{ mL.g}^{-1}$  para todas as formulações, sendo essa a quantidade necessária para se obter a consistência de pasta cimentícia.

#### 4.3.1 Compósitos: Cimento de fosfato de cálcio e hidrogéis da avaliação 1

Amostras de cimento de dupla pega foram preparadas utilizando o cimento de fosfato de cálcio sintetizado (FT-15-00) e as formulações de hidrogéis utilizadas no item Hidrogéis – Avaliação 1. A composição da fase líquida (solução aquosa) utilizada na preparação dos cimentos de dupla pega está descrita na Tabela 4.7. Foi incluído o  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  como acelerador de pega, o qual já era utilizado nas formulações sem hidrogéis.

**Tabela 4.7.** Composição percentual, em massa, da fase líquida utilizada na preparação dos cimentos.

Amostras	NVP	AAc	MBAM	TEMED	AIBN	AP	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$
FT-a	-	-	-	-	-	-	2,5
FT-H1	29,0	-	2,0	0,2	3,0	-	2,5
FT-H2	29,0	7,2	2,0	0,2	3,0	-	2,5
FT-H3	29,0	-	2,0	0,2	-	6,0	2,5
FT-H4	29,0	7,2	2,0	0,2	-	6,0	2,5

Foram preparados 10 corpos de prova para cada amostra e determinaram-se as propriedades físicas e mecânicas destes. Os corpos de prova foram conformados no formato cilíndrico nas dimensões de  $12 \pm 0,2$  mm de altura e  $6 \pm 0,2$  mm de diâmetro, conforme norma ASTM F 451-95. O molde com as amostras foi mantido por uma hora em uma estufa a  $80 \pm 2$  °C para polimerização dos hidrogéis. As amostras foram desmoldados e mantidas em ambiente com 100% de umidade, durante 24 horas, e, em seguida, imersas em plasma sanguíneo simulado (SBF) por sete dias a 37°C, para avaliação *in vitro*.

#### 4.3.2 Compósitos: Cimento de fosfato de cálcio e hidrogéis da avaliação 2

Amostras de cimento de dupla pega foram preparadas utilizando o cimento de fosfato de cálcio sintetizado (FT-15-00) e as formulações de hidrogéis utilizadas no item Hidrogéis – Avaliação 2. A composição da fase líquida (solução aquosa) utilizada na preparação dos cimentos de dupla pega está descrita na Tabela 4.8.

**Tabela 4.8.** Composição percentual, em massa, da fase líquida utilizada na preparação dos cimentos.

Amostra	NVP	AAc	MBAM	TEMED	AIBN	AP	HCPK	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
FT-b/FT-c	-	-	-	-	-	-	-	2,5
FT-H5	30,0	-	2,0	0,2	3,0	-	-	2,5
FT-H6	-	15,0	2,0	0,2	3,0	-	-	2,5
FT-H7	30,0	15,0	2,0	0,2	3,0	-	-	2,5
FT-H8	30,0	-	2,0	0,2	-	0,5	-	2,5
FT-H9	-	15,0	2,0	0,2	-	0,5	-	2,5
FT-H10	30,0	15,0	2,0	0,2	-	0,5	-	2,5
FT-H11	30,0	-	2,0	0,2	-	-	0,5	2,5
FT-H12	-	15,0	2,0	0,2	-	-	0,5	2,5
FT-H13	30,0	15,0	2,0	0,2	-	-	0,5	2,5

Foram preparados 10 corpos de prova para cada amostra e determinaram-se as propriedades físicas e mecânicas destes. Os corpos de prova foram conformados no formato cilíndrico nas dimensões de  $12 \pm 0,2$  mm de altura e  $6 \pm 0,2$  mm de diâmetro, conforme norma ASTM F 451-95. O molde com as amostras de FT-H5 a FT-H10 foram mantidos por uma hora em uma estufa a  $80 \pm 2$  °C para polimerização dos hidrogéis. O molde com as amostras de FT-H11 a FT-H13 foram expostas a luz UV por 30 minutos para polimerização. As amostras foram desmoldados e mantidas em ambiente com 100% de umidade, durante 24 horas, e, em seguida, imersas em plasma sanguíneo simulado (SBF) por sete dias a 37°C, para avaliação *in vitro*.

#### 4.4 Avaliação da bioatividade, degradação e citotoxicidade do cimento de fosfato de cálcio

O cimento de fosfato de cálcio sintetizado (FT-15-00) foi avaliado quanto a sua bioatividade, degradação e citotoxicidade com o intuito de verificar a viabilidade de uso do mesmo como substituto ósseo. Esta etapa do trabalho foi realizada junto ao Grupo de Pesquisas 3B's (Biomateriais, Biodegradáveis e Biomiméticos) da Universidade do Minho

em Portugal.

Foram preparados corpos de prova utilizando solução aquosa de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, Portugal) 2,5% e 5,0% e determinou-se as propriedades físicas e mecânicas destes. Os corpos de prova foram conformados no formato cilíndrico nas dimensões de  $12 \pm 0,2$  mm de altura e  $6 \pm 0,2$  mm de diâmetro, conforme norma ASTM F 451-95. Esses corpos de prova foram utilizados nos ensaios de compressão mecânica. Foram preparados também discos nas dimensões de  $1 \pm 0,2$  mm de altura e  $6 \pm 0,2$  mm de diâmetro, para as demais caracterizações. As amostras foram desmoldadas e mantidas em ambiente com 100% de umidade, durante 24 horas.

Para avaliação da bioatividade, as amostras foram imersas em fluido corpóreo simulado (SBF) na proporção de 1:10 (g:mL), porém ficaram suspensas por um fio de náilon por diferentes períodos (0, 1, 7, 14, 21 e 28 dias) a  $37^\circ\text{C}$ , tentando manter as amostras conforme norma ISO 23317. Foram utilizadas cinco amostras cilíndricas e três discos, de cada composição, para cada tempo de imersão. Não foi realizada troca da solução.

Para avaliação da degradação, as amostras foram imersas em tampão fosfato-salino (PBS) (Sigma-Aldrich, Portugal) na proporção de 1:10 (g:mL), por diferentes períodos (0, 3, 7, 14, 30, 60 e 90 dias) a  $37^\circ\text{C}$  e 60 rpm, sem troca da solução. Foram utilizadas cinco amostras cilíndricas e três discos, de cada composição, para cada tempo de imersão.

Para avaliação da citotoxicidade foi utilizado uma linhagem imortalizada de fibroblastos de camundongos (NCTC Clone 929) adquiridos da “European Collection of Cell Cultures”.

#### **4.5 Adesão e proliferação de células**

Para ensaio de adesão e proliferação de células foi utilizado células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana (MSC's) e linhagem celular de osteoblastos derivados de osteossarcoma humano (SAOS-2).

## 4.6 Caracterização dos pós obtidos por reação via úmida

### 4.6.1 Estudo da ordem de adição dos reagentes e temperatura de calcinação

#### 4.6.1.1 Difração de raios X

A avaliação da composição de fases dos pós obtidos, após calcinação, foi feita utilizando difração de raios X. A análise foi executada em um equipamento Philips X'Pert MPD com tubo de cobre (radiação  $K\alpha = 1,5418 \text{ \AA}$ ) e a análise dos difratogramas foi realizada com a ferramenta X'pert Highscore, sobre a base de dados da *International Centre for Diffraction Data* (ICDD). As varreduras para análise das fases foram executadas com velocidade de varredura de  $0,05^\circ/\text{s}$  e intervalo de varredura de  $10$  a  $40^\circ$ . A tensão e a corrente utilizadas no tubo foram de  $40 \text{ KV}$  e  $40 \text{ mA}$ , respectivamente, para a obtenção dos difratogramas.

#### 4.6.1.2 Espectroscopia de Infravermelho

A técnica de espectroscopia de infravermelho foi utilizada como complemento à técnica de difração de raios X, sendo que esta detecta as frequências de vibração das ligações químicas no sólido. Nesta técnica, as amostras foram caracterizadas num intervalo de  $400$  a  $4000 \text{ cm}^{-1}$  em um espectrômetro *Spectrum 1000*. Para tanto, fez-se necessária a confecção de uma pastilha envolvendo o pó em questão e uma porcentagem de brometo de potássio (KBr) de grau espectroscópico na proporção de  $0,3 \text{ mg}$  de pó para  $300 \text{ mg}$  de KBr.

#### 4.6.1.3 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia do pó de cimento de fosfato de cálcio sintetizado (FT-15-00), foi avaliada utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura (MEV) Jeol JSM-6060. A amostra seca recebeu um recobrimento de ouro e foi então analisada.

#### 4.6.1.4 Difração de laser

A análise granulométrica foi realizada utilizando-se difração de laser. Tal técnica analisa a maneira como o laser difrata quando uma partícula o atravessa, calculando assim, o tamanho da partícula. Para uma medição correta as partículas devem estar bem dispersas, sendo a escolha do fluido para a análise muito importante. A faixa de detecção do aparelho é de  $0,04$  a  $2500 \text{ \mu m}$ . As medidas foram feitas em um difratômetro de laser *Cilas 1180*.

Para uma melhor dispersão, se utilizou baixa concentração de amostra e foi utilizado ultrassom por 60 segundos para sua dispersão.

#### ***4.6.2 Estudo da influência da concentração dos reagentes***

##### *4.6.2.1 Difração de raios X*

A análise foi realizada conforme item 4.6.1.1.

##### *4.6.2.2 Resistência mecânica à compressão*

Após imersão dos corpos de prova em SBF por sete dias, a resistência mecânica à compressão das amostras úmidas foi determinada utilizando uma máquina universal de ensaios (Instron, 3369) a temperatura ambiente. As amostras foram comprimidas com taxa de deformação de 1,0 mm/min. Os resultados representam uma média de pelo menos cinco amostras.

##### *4.6.2.3 Microscopia eletrônica de varredura*

A morfologia da superfície de fratura das amostras, utilizadas no ensaio de compressão, foi avaliada utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura (MEV) Jeol JSM-6060. As amostras secas receberam um recobrimento de ouro e foram então analisadas.

#### ***4.6.3 Avaliação da influência do tempo de moagem nas propriedades do cimento de fosfato de cálcio***

##### *4.6.3.1 Difração de laser*

A análise foi realizada conforme item 4.6.1.4.

##### *4.6.3.2 Técnica de adsorção de gás de Brunauer-Emmet-Teller*

Para a determinação da área superficial específica dos pós foi utilizado o método de adsorção de nitrogênio/hélio desenvolvida por Brunauer, Emmett e Teller (BET), a partir das isotermas de adsorção de gases sobre os pós. O equipamento utilizado foi um Quantachrome Nova 1000.

#### 4.6.3.3 Densidade e porosidade aparente

Após obtenção dos corpos de prova, os mesmos foram secos e tiveram sua porosidade e densidade determinadas pelo método de Arquimedes, utilizando a massa da amostra seca, e depois de imersas por 24 horas em água, sua massa úmida e sua massa imersa em água, de acordo com a ASTM C20-00.

#### 4.6.3.4 Resistência mecânica à compressão

A análise foi realizada conforme item 4.6.2.2.

#### 4.6.3.5 Microscopia eletrônica de varredura

A análise foi realizada conforme item 4.6.2.3.

### 4.7 Caracterização dos hidrogéis

#### 4.7.1 Hidrogéis – Avaliação 1

##### 4.7.1.1 Análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica dos hidrogéis foi avaliada utilizando um analisador termogravimétrico (TGA) TA Instruments TGA 2050. As amostras foram aquecidas até 970 °C a uma taxa de 10 °C.min<sup>-1</sup>, com fluxo de nitrogênio de 20 ml.min<sup>-1</sup>.

##### 4.7.1.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As avaliações por DSC foram desenvolvidas utilizando DSC Q20 (TA Instruments) a uma taxa de 10 °C.min<sup>-1</sup>. A análise foi realizada utilizando fluxo de nitrogênio de 50 mL.min<sup>-1</sup>. Foi utilizada a segunda corrida para determinar a Tg dos hidrogéis.

##### 4.7.1.3 Espectroscopia de Infravermelho

Espectros de infravermelho dos hidrogéis foram obtidos utilizando um espectrômetro PerkinElmer Spectrum 1000, entre 400-4000 cm<sup>-1</sup> utilizando pastilhas de KBr.

##### 4.7.1.4 Inchamento dos hidrogéis

O inchamento dos hidrogéis foi determinado através absorção de água dos hidrogéis previamente liofilizados, até atingirem o equilíbrio, a temperatura ambiente. Foram

utilizadas três amostras de cada hidrogel para se determinar a absorção de água.

O peso das amostras de hidrogéis no equilíbrio foi determinado pela pesagem das amostras de tempos em tempos até o equilíbrio ser atingido. A porcentagem de inchamento foi calculada através da equação (4.1).

$$\text{Inchamento}(\%) = \frac{m_e - m_i}{m_i} \times 100 \quad (4.1)$$

onde:  $m_i$  é a massa inicial e  $m_e$  é a massa final, após o equilíbrio ser atingido.

#### 4.7.2 Hidrogéis – Avaliação 2

##### 4.7.2.1 Densidade Aparente

Para o cálculo da densidade aparente utilizou-se a Equação 4.2. Assim como para os cimentos de fosfato de cálcio, utilizou-se o método de Arquimedes para medir a densidade aparente dos hidrogéis, porém ao invés de utilizar água como meio líquido, utilizou-se etanol. Para cada cálculo foram utilizados três corpos-de-prova. A massa seca foi determinada antes da imersão.

$$DA = \frac{P_s}{P_u - P_i} \times \rho_L \quad (4.2)$$

onde:  $P_s$  é o peso seco,  $P_u$  é o peso úmido,  $P_i$  é o peso imerso em água e  $\rho_L$  é a densidade do meio líquido.

##### 4.7.2.2 Densidade Real

A densidade real foi determinada utilizando-se a técnica de picnometria de hélio, utilizando-se um equipamento Micromeritics Accupyc 1330. Para tal, os hidrogéis foram triturados na forma de pó para possibilitar a medida.

##### 4.7.2.3 Porosidade Total

Para a medição dos valores de porosidade total dos hidrogéis sintetizados utilizou-se o valor da densidade aparente,  $\rho_{\text{aparente}}$ , e dividiu-se pelo valor da densidade real,  $\rho_{\text{real}}$ , (medido por picnometria de hélio), como mostrado na Equação 4.3.

$$P = \left( \frac{\rho_{ap}}{\rho_r} \right) \times 100 \quad (4.3)$$

#### 4.7.2.4 Inchamento

As medidas de inchamento dos hidrogéis foram determinadas conforme item 4.7.1.4.

A partir dos resultados de inchamento, foi possível calcular diversos parâmetros de rede estruturais dos hidrogéis como o quociente de equilíbrio de inchamento (ESR – *Equilibrium Swelling Rate*), mostrado na Equação 4.4.

$$Q = \frac{m_e}{m_s} \quad (4.4)$$

Onde, Q é o quociente de equilíbrio de inchamento,  $m_e$  é a massa do hidrogel no equilíbrio de inchamento e  $m_s$  é a massa do criogel seco.

Outro parâmetro de rede que pode ser calculado a partir das medidas de inchamento é o valor médio de peso molecular entre ligações entrecruzadas (Mc), o qual pode ser expresso pela equação de Flory – Rehner, mostrada na Equação 4.5.

$$Mc = - \frac{(1 - 2/\phi)V_1(V_{2s})^{2/3}(v_{2r})^{1/3}}{v(\ln(1 - V_{2s}) + V_{2s} + \chi V_{2s}^2)} \quad (4.5)$$

Já a fração volumétrica do polímero inchado foi calculada a partir da Equação 4.6.

$$V_{2s} = \frac{1}{\left[1 + \frac{\rho_p}{\rho_s} \left(\frac{W_s}{W_d} - 1\right)\right]} \quad (4.6)$$

Nas Equações 4.5 e 4.6  $\rho_p$  e  $\rho_s$  são as densidades dos polímeros e do solvente, respectivamente. A densidade dos polímeros foi determinada por picnometria de hélio e a densidade do solvente foi utilizada a densidade da água (1,0 g/ml).  $W_s$  e  $W_d$  são as massas do polímero antes e depois do inchamento.  $V_1$  é o volume molar do solvente (18,0 ml/mol) e  $v$  é o volume específico do polímero e  $V_{2r}$  é a fração volumétrica do polímero no estado relaxado, porém antes do inchamento.  $\phi$  corresponde a funcionalidade do agente entrecruzante, o MBAM possui quatro grupos funcionais que permitem a formação de ligações entrecruzadas (PENICHE *et al.*, 1997).  $\chi$  é o parâmetro Flory-Huggins de interação polímero/solvente, cuja equação utilizada para o cálculo é mostrada na Equação 4.7.

$$\chi = \frac{1}{2} + \frac{V_{2s}}{3} \quad (4.7)$$

Mais um parâmetro a ser considerado é o  $M_r$ , massa molar da unidade repetitiva, o qual é definido pela Equação 4.8 (UZUN *et al.*, 2003).

$$M_r = \frac{m_{NVP}M_{NVP} + m_{AA}M_{AA}}{m_{NVP} + m_{AA}} \quad (4.8)$$

Aqui,  $m_{NVP}$  e  $m_{AA}$  são as massas dos monômeros, enquanto que  $M_{NVP}$  e  $M_{AA}$  correspondem à massa molar dos monômeros utilizados.

Outro parâmetro significativo para a caracterização de polímeros entrecruzados é a densidade de ligações entrecruzadas,  $V_x$ , que pode ser calculada relacionando-se o peso molecular entre ligações entrecruzadas com a densidade do polímero, através da Equação 4.9 (GARLAND *et al.*, 2011).

$$v_x = \frac{\rho_p N_A}{M_c} \quad (4.9)$$

Onde  $\rho_p$  é a densidade do polímero,  $N_A$  é o número de Avogrado ( $6,023 \times 10^{23}$ ) e  $M_c$  é o peso molecular entre ligações entrecruzadas.

O Tamanho da rede,  $\xi$ , o qual é um termo que descreve o espaço disponível para o transporte de soluto entre a rede polimérica, também é um parâmetro importante para a análise de polímeros entrecruzados e é calculado de acordo com a Equação 4.10 (UZUN *et al.*, 2003).

$$\xi = v_{2s}^{-1/3} \left( \frac{2M_c}{M_r} \right)^{1/2} C_n^{1/2} \ell \quad (4.10)$$

Onde  $C_n$  é a razão característica dos monômeros e corresponde a 12,3 para o NVP (CARR & PEPPAS, 2009) e 6,7 para o AA (THAKUR *et al.*, 2011), já  $\ell$  corresponde ao comprimento da ligação C-C, 1,54Å.

É possível relacionar o valor calculado de peso molecular entre ligações entrecruzadas com o módulo elástico do hidrogel em seu estado de equilíbrio,  $G'$ , através da Equação 4.11.

$$G' = \frac{(1 - 2/\phi) \rho R T V_{2r}^{2/3} V_{2s}^{1/3}}{M_c} \quad (4.11)$$

## **4.8 Caracterização dos compósitos**

### ***4.8.1 Compósitos: Cimento de fosfato de cálcio e hidrogéis da avaliação 1***

#### *4.8.1.1 Porosidade e densidade aparente*

A porosidade e a densidade aparente dos corpos de prova foram determinadas conforme item 4.6.3.3.

#### *4.8.1.2 Resistência mecânica à compressão*

A resistência mecânica à compressão foi determinada conforme item 4.6.2.2.

#### *4.8.1.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)*

A morfologia das amostras foi avaliada conforme descreve item 4.6.2.3.

#### *4.8.1.4 Difração de raios X*

A análise foi realizada conforme item 4.6.1.1, com o objetivo de verificar a formação de hidroxiapatita nas amostras, após imersão em SBF.

#### *4.8.1.5 Bioatividade*

A superfície das amostras foi observada por MEV, após imersão em SBF, para verificar se houve precipitação de hidroxiapatita, conforme norma ISO 23317, para verificação da bioatividade das amostras.

### ***4.8.2 Compósitos: Cimento de fosfato de cálcio e hidrogéis da avaliação 2***

#### *4.8.2.1 Porosidade e densidade aparente*

A porosidade e a densidade aparente dos corpos de prova foram determinadas conforme item 4.6.3.3.

#### *4.8.2.2 Resistência mecânica à compressão*

A resistência mecânica à compressão foi determinada conforme item 4.6.2.2.

#### *4.8.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)*

A morfologia das amostras foi avaliada conforme descreve item 4.6.2.3

## **4.9 Avaliação da bioatividade, degradação e citotoxicidade do cimento de fosfato de cálcio**

### ***4.9.1 Tempo de pega das amostras***

Para a determinação das medidas de tempo de pega dos cimentos hidráulicos à base de fosfato de cálcio utilizou-se um aparato com as dimensões e pesos propostos pela norma ASTM C266 – 89 – *Standard Test Method for Time of Setting of Hydraulic – Cement Paste by Gillmore Needles*. Para as medidas de tempo de pega preparou-se uma pasta com razão líquido/sólido de 0,29 mL/g para as amostras preparadas com Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 2,5% e 5,0%. O tempo inicial de pega é o tempo necessário para que a primeira agulha de Gillmore, com massa de 113,4 gramas, penetre na amostra sem deixar marca considerável. Já o tempo final de pega é o tempo necessário para que a segunda agulha de Gillmore, com massa de 453,6 gramas, penetre na amostra sem deixar marca considerável.

### ***4.9.2 Bioatividade***

A bioatividade foi avaliada através da formação de hidroxiapatita na superfície das amostras. Este ensaio influencia várias características dos cimentos, os quais foram determinados pelos seguintes métodos:

#### ***4.9.2.1 Resistência mecânica à compressão***

Após imersão dos corpos de prova em SBF, nos diferentes períodos de tempo, a resistência mecânica à compressão das amostras úmidas foram determinadas utilizando máquina universal de ensaios (Instron, 5543) a temperatura ambiente. As amostras foram comprimidas com taxa de deformação de 1,0 mm/min. Os resultados representam uma média de pelo menos cinco amostras.

#### ***4.9.2.2 Microscopia eletrônica de varredura***

A morfologia da superfície das amostras (discos), foi avaliada utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura (MEV) Jeol JSM-6010LV. A superfície das amostras secas recebeu um recobrimento de ouro e foi então analisada.

#### 4.9.2.3 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

O espectrômetro de energia dispersiva é um instrumento que determina semi-quantitativamente os elementos presentes em uma determinada amostra. Tal análise teve como objetivo calcular a razão cálcio/fósforo na superfície das amostras, após imersão em SBF.

Para essa análise não foi realizado recobrimento das amostras e utilizou-se um EDS Oxford Instruments INCAx-Act, PentaFET Precision, com precisão de 5,9 keV – 129 eV.

#### 4.9.2.4 Difração de raios X

Por meio desta técnica foi possível analisar as fases cristalinas obtidas. A avaliação da composição de fases dos pós obtidos, após trituração das amostras utilizadas no ensaio de bioatividade, foi feita utilizando difração de raios X. A análise foi executada em um equipamento Bruker D8 Discover e a análise dos difratogramas foi realizada com o software EVA, sobre a base de dados da *International Centre for Diffraction Data* (ICDD). As varreduras para análise das fases foram executadas com velocidade de varredura de 0,05° com tempo de aquisição e 3s e intervalo de varredura de 10 a 40°. A tensão e a corrente utilizadas no tubo foram de 40 KV e 40 mA, respectivamente, para a obtenção dos difratogramas.

#### 4.9.2.5 Espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES)

A determinação química elementar das soluções de SBF que armazenaram as amostras pelos diferentes períodos de tempo foi realizada por ICP-OES utilizando um equipamento HORIBA JOBIN YVON, Inc, modelo JY 2000 2. Foi determinada a quantidade de cálcio e fósforo nas soluções.

### 4.9.3 Degradação

A degradação das amostras foi avaliada pelos seguintes métodos:

#### 4.9.3.1 Absorção de água

Para essa determinação foi avaliado três amostras de cada composição, para os diferentes períodos de tempo. Esse ensaio foi realizado concomitante com o ensaio de degradação das amostras. As amostras ficaram imersas em PBS, a 37°C e 60 rpm, e após o

período estipulado foram colocadas entre dois papéis filtro para remoção do excesso de água, para então serem pesadas ( $m_w$ ). As amostras foram lavadas com água destilada e colocadas em estufa a vácuo para secagem a 60°C, para então novamente ser determinada sua massa ( $m_f$ ). O percentual de água absorvida foi determinado pela equação 4.12.

$$\text{Absorção de água (\%)} = \frac{m_w - m_f}{m_f} \times 100 \quad (4.12)$$

#### 4.9.3.2 Perda de massa

Para avaliação da perda de massa das amostras, estas foram previamente secas e sua massa determinada ( $m_i$ ). Para essa determinação foi avaliado três amostras de cada composição, para os diferentes períodos de tempo. Após, as amostras foram retiradas do PBS, lavadas e colocadas em estufa a vácuo a 60 °C para secagem, até massa constante. A massa das amostras secas ( $m_f$ ) foi determinada e a perda de massa percentual foi calculada pela equação 4.13.

$$\text{Perda de massa (\%)} = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (4.13)$$

#### 4.9.3.3 Resistência mecânica à compressão

A resistência mecânica foi determinada conforme item 4.9.2.1.

#### 4.9.3.4 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia das amostras foi avaliada conforme item 4.9.2.2.

#### 4.9.3.5 Microtomografia de raios X (micro-CT)

A estrutura das amostras antes e após o ensaio de degradação foi avaliada por microtomografia de raios X, utilizando um equipamento SKYSCAN, modelo SKYSCAN 1072. Com isso foi possível avaliar a tamanho, disposição e interconectividade dos poros.

As amostras utilizaram radiação com 40kV, 248  $\mu$ A e com um passo de 0,45° a cada avanço. A reconstrução escolhida foi de 180°.

O funcionamento do microtomógrafo de raios-X baseia-se na propriedade dos materiais em absorver a radiação de forma diferenciada dependendo de sua composição química e densidade. A tomografia computadorizada (TC) é uma técnica que permite a visualização de seções transversais (cortes internos) de um objeto de forma não destrutiva.

Os parâmetros físicos para análise da densidade e a porosidade são mapeados pelo equipamento através da análise das fatias geradas em forma de figura bidimensionais e quando juntas se obtém objetos 3D através de algoritmos de computador. Esta técnica é muito utilizada na engenharia tecidual e na produção de próteses através da prototipagem rápida.

A interconectividade das amostras foi determinada pela Equação 4.14 (Duarte *et al.* 2012).

$$I = \left( \frac{V_{total\ de\ poros} - V_{total\ de\ poros\ desconectados}}{V_{total\ de\ poros}} \right) \times 100 \quad (4.14)$$

onde o volume de poros desconectados representa o volume de poros desconectados que foram definidos para ser menor do que 50  $\mu\text{m}$ . Assim poros desconectados são poros menores que 50  $\mu\text{m}$ , que foram atribuídos como fechados, pelo programa.

#### 4.9.3.6 Espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES)

A determinação química elementar das soluções de PBS que armazenaram as amostras pelos diferentes períodos de tempo foi realizada por ICP-OES utilizando um equipamento HORIBA JOBIN YVON, Inc, modelo JY 2000 2. Foi determinada a quantidade de cálcio e fósforo nas soluções.

#### 4.9.4 Citotoxicidade

Para a avaliação da citotoxicidade do material foi utilizado a linhagem de fibroblastos originada do pulmão de ratos (L929). O teste de citotoxicidade utilizado baseia-se na norma ISO 10993 – *Biological Evaluation of Medical Devices*, porém optou-se por utilizar o teste MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] ao invés do MTT [(brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)], por este ser menos tóxico e apresentar a mesma confiabilidade. As amostras utilizadas nesse ensaio foram previamente esterilizadas com óxido de etileno e então foram reidratadas em meio de cultura estéril.

##### 4.9.4.1 Teste MTS

As células foram previamente expandidas em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich, Portugal), suplementado com 10% de soro fetal bovino

inativado por calor (FBS) e 1% de solução antibiótica (com concentração final de penicilina 100 unidades.mL<sup>-1</sup> e estreptomicina 100 mg.mL<sup>-1</sup>). As células foram cultivadas a 37°C numa atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram semeadas em discos inseridos no fundo de placas de cultura, em densidade 4,9x10<sup>4</sup> células.cm<sup>-2</sup>. O sistema foi incubado por 24 horas para então as amostras serem colocadas no topo destas. Poços contendo células em meio de cultura, porém sem amostra, foram utilizados como controle negativo. As amostras foram colocadas no topo das células e incubadas durante mais 1, 3 e 7 dias. As amostras foram avaliadas em triplicata para cada período de tempo.

O efeito das substâncias liberadas pelo cimento sobre o metabolismo celular foi avaliado pelo método colorimétrico que utiliza o composto tetrazólio [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] (Promega, USA), o qual permite determinar a viabilidade celular. Este processo é realizado por enzimas mitocondriais e a mudança de coloração do meio reflete diretamente a atividade celular, podendo ser medida em termos de absorvância (490 nm).

Os sistemas foram caracterizados após os diferentes períodos de cultura. As células foram lavadas duas vezes em PBS e imersas numa mistura que consiste em meio de cultura celular isento de soro e o reagente MTS na proporção de 5:1 e incubadas durante 3 h a 37°C em uma atmosfera húmida contendo 5% CO<sub>2</sub>. A densidade óptica (OD) foi medida num leitor de microplacas (Synergy HT, BioTek Instruments, EUA), utilizando uma absorvância de 490 nm.

#### 4.9.4.2 *Quantificação de DNA*

A proliferação foi determinada através da quantificação de DNA utilizando um kit quantificação PicoGreen (Life Technologies, USA) após lise celular, conforme instruções do fabricante. O estudo foi realizado por um, três e sete dias, onde as células foram lavadas duas vezes com uma solução de PBS estéril e conservados em 1 ml de água ultrapura a -80°C para posterior análise. As amostras foram então descongeladas e foram preparados padrões com concentrações que variam entre 0 e 2 mg.mL<sup>-1</sup>. A placa foi incubada durante 10 min no escuro e a fluorescência foi medida num leitor de microplacas (Synergy HT, BioTek Instruments, EUA) utilizando um comprimento de onda de excitação de 480 nm e um comprimento de onda de emissão de 528 nm. Triplicatas foram feitas para cada amostra e por cada tempo de cultura.

#### *4.9.4.4 Distribuição celular*

A distribuição espacial de células vivas também foi avaliada, sendo observadas seções representativas dos discos nos quais foi realizada a cultura de células e que ficaram expostas às amostras. A análise foi realizada através de um microscópio óptico de luz transmitida e refletida Zeiss, modelo Axio Imager Z1m, após coloração com calceína-AM/DAPI (4',6-Diamidina-2-fenindole) (Life Technologies, Escócia/Sigma-Aldrich, Portugal) o qual é um marcador de células membrana-permeante. Essa coloração faz com que as células vivas apareçam com uma cor verde brilhante as mortas como vermelhas brilhante. Como as amostras foram lavadas, as células não aderidas (mortas) não foram observadas.

#### *4.9.5 Adesão e proliferação de células*

O ensaio de adesão e proliferação foi realizado com células-tronco mesenquimais derivada de medula óssea humana (MSC's) e de uma linhagem celular de osteoblastos derivados de osteossarcoma humano (SAOS-2). As células foram expandidas em meio  $\alpha$ -MEM, foram semeadas sobre os discos em densidade 30.000 células por disco (amostra) e caracterizadas por:

##### *4.9.5.1 Teste MTS*

A viabilidade celular foi determinada conforme item 4.9.4.1.

##### *4.9.5.2 Quantificação de DNA*

A proliferação das células foi avaliada conforme item 4.9.4.2.

##### *4.9.5.3 Quantificação de fosfatase alcalina (ALP)*

Fosfatase alcalina é um marcador bioquímico de formação óssea osteoblástica. Medições de fosfatase alcalina são de particular interesse na investigação de doenças hepatobiliares e ósseas. Nos distúrbios ósseos, indica aumento da atividade de formação óssea. Assim, o aumento dos níveis de fosfatase alcalina pode ser utilizado como indicativo da formação de tecido ósseo novo.

A atividade de ALP é avaliada através de ensaio p-nitrofenol (Sigma-Aldrich, Portugal). Fosfato de paranitrofenil, que é incolor, é hidrolisado pela fosfatase alcalina em

pH 10,5 e 37 °C para formar paranitrofenol livre, que apresenta coloração amarela. A reação é parada pela adição de NaOH e a absorvância foi lida a 405 nm.

#### 4.9.5.4 Distribuição celular

A integração e distribuição das células nas amostras, nos diferentes períodos de cultura, foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), Jeol JSM-6010LV, após a fixação das células com glutaraldeído (Sigma-Aldrich, Portugal) 2,5% por uma hora. Após a fixação as amostras foram lavadas com PBS (*Phosphate Buffered Saline*), desidratadas com uma série de diluições de etanol (40%, 60%, 70%, 80%, 90% e 99%) e secas a temperatura ambiente.

#### 4.9.5.5 Morfologia celular

A morfologia e distribuição espacial das células vivas integradas às amostras foi avaliada, sendo observadas a superfície das amostras através de microscópio óptico de luz transmitida e refletida Zeiss, modelo Axio Imager Z1m. Após os diferentes períodos de cultura, as amostras foram lavadas com PBS e as células foram fixadas com formaldeído (Bio-optica Milano, Itália) 4% por 20 minutos. As amostras foram lavadas novamente com PBS e, em seguida, tornadas permeáveis com o uso de Triton X-100 [4-(1,1,3,3-Tetrametilbutil)fenil-polietilenoglicol] (Sigma-Aldrich, Portugal) 0,1% em PBS por 10 minutos. As amostras foram coradas com faloidina (Tetrametilrodamina B isotiocianato) (Life Technologies, USA) 25  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  em PBS com albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich, Portugal) 1%, por 30 minutos, para evidenciar o citoesqueleto. As amostras foram lavadas 5 vezes com PBS para então ser realizada a coloração do núcleo, com 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich, Portugal) 1  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ , por 5 minutos. Em seguida as amostras foram lavadas com Tween 20 (Monolaurato de polioxietileno sorbitano - Polissorbato 20) (Biorad, Holanda) 0,05% em PBS e após foram lavadas somente com PBS, para então serem observadas em microscópio. A coloração permite que o núcleo das células seja visualizado com uma coloração azulada e o citoesqueleto com uma coloração avermelhada. Como as amostras foram lavadas as células não aderidas (mortas) não foram observadas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Obtenção de alfa-fosfato tricálcico por reação via úmida

#### 5.1.1 Estudo da ordem de adição dos reagentes e temperatura de calcinação

Pós de alfa fosfato tricálcico foram sintetizados pelo processo de reação via úmida a partir de nitrato de cálcio e ácido fosfórico. Não foi necessária a realização de choque térmico, nem utilização de elevado tempo de calcinação. Esse fato contradiz algumas literaturas que descrevem o alfa-TCP como sendo uma fase metaestável, que só pode ser obtido por rápido resfriamento após atingir temperaturas superiores a 1200°C (DOROZHKIN, 2009).

A forma mais simples e comumente utilizada para se obter o TCP é via reação de estado sólido, utilizando carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) e o hidrogenofosfato de cálcio, a monetita, ( $\text{CaHPO}_4$ ) como reagentes precursores. A obtenção se dá pela mistura dos dois reagentes em proporções específicas com calcinação em temperaturas pré-determinadas (JINLONG, et. al., 2002). Esta metodologia já é bastante conhecida, porém ainda não há um consenso sobre como conduzir esta reação. Normalmente se utilizam temperaturas de calcinação maiores do que 1300°C, sendo que, pelo diagrama de fases, a temperatura indicada seria em torno de 1165°C, e os tempos de patamar utilizados variando de 4 horas a dias. Também não há um consenso sobre a necessidade de realização de choque térmico durante o resfriamento (CAMIRÉ *et al.*, 2005; JINLONG *et al.*, 2002; MARTÍNEZ *et al.*, 2012a; MARTÍNEZ *et al.*, 2012b; MATE-SANCHEZ DE VAL *et al.*, 2012). Contudo, mesmo em todos estes cenários, a presença de  $\beta$ -TCP como fase contaminante é uma constante.

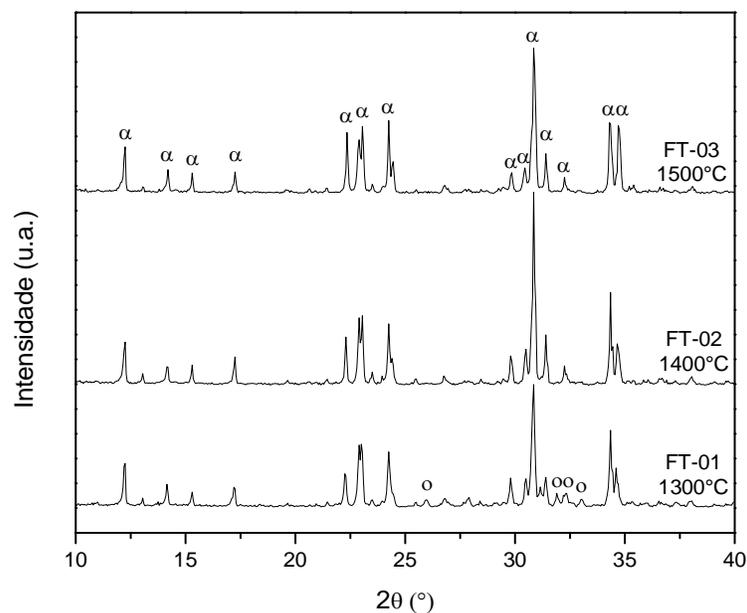
Duncan et al. (2014) analisaram a presença de magnésio na monetita, a qual foi obtida em laboratório sem a presença de magnésio e então utilizada para a obtenção do  $\alpha$ -TCP. O resultado foi a obtenção de  $\alpha$ -TCP sem a contaminação de  $\beta$ -TCP (100% de pureza). Concluiu-se que o choque térmico não é necessário para reter a fase  $\alpha$ -TCP, que o resfriamento controlado até a temperatura ambiente é suficiente. Neste estudo, foi utilizada temperatura de 1300°C para calcinação por, pelo menos, 24h de forno.

Pelas rotas de sínteses propostas para obtenção das amostras FT-05 e FT-06, não foi possível obter TCP nem realizar a caracterização destas amostras, pois ao serem calcinadas em temperatura superior a 1300°C, ocorreu a fusão e absorção pelo refratário das amostras

no interior do forno.

O ensaio de difração de raios X (DRX) mostra que, dependendo da metodologia de precipitação química utilizada, diferentes fases de fosfato de cálcio podem ser obtidas. Os picos assinalados nos difratogramas das Figuras 5.1, 5.2 e 5.3 correspondem às fichas de padrão de difração de número 00-009-0348 e 00-029-0359 ( $\alpha$ -TCP); 01-089-6495 (oxiapatita); 00-009-0169 ( $\beta$ -TCP) e 01-073-0440 (pirofosfato de cálcio) do *International Centre for Diffraction Data (ICDD)*.

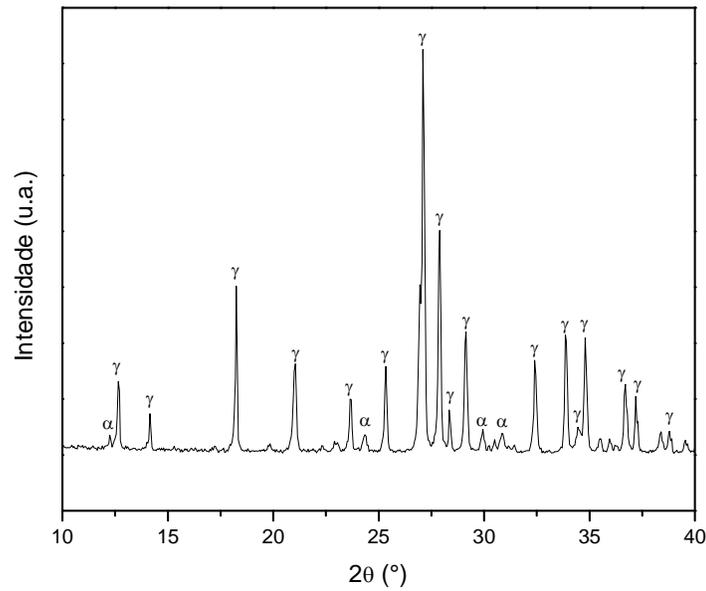
**Figura 5.1.** Difratogramas de raios X para os pós obtidos pelo método 1, calcinados nas diferentes temperaturas, sendo  $\alpha$  para  $\alpha$ -TCP.



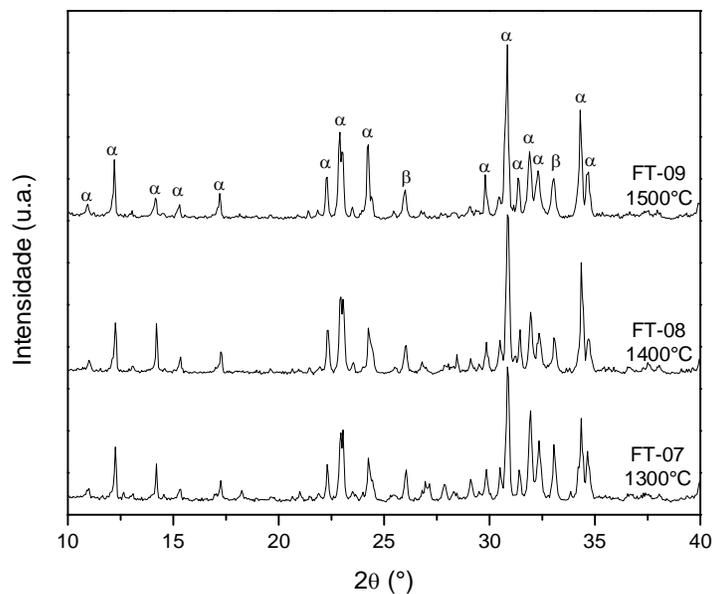
Analisando a Figura 5.1 nota-se principalmente a presença da fase  $\alpha$ -TCP, para as amostras FT-01, FT-02 e FT-03. Contudo a utilização de maior temperatura de calcinação (1500°C) aparentemente resultou na obtenção de alfa-TCP com maior pureza. Pela Figura 5.2 pode-se perceber que, para a amostra FT-04, a fase majoritária obtida foi o pirofosfato de cálcio, com pequenos picos referentes à fase  $\alpha$ -TCP. Como dito anteriormente, ocorreu a fusão e absorção das amostras FT05 e FT-06, no interior do forno com temperaturas de calcinação superiores a 1300°C, o que pode ser verificado também pelo diagrama de fases do sistema  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ , devido à possível formação de pirofosfato de cálcio, pela metodologia utilizada. Já a Figura 5.3 mostra os difratogramas das amostras FT-07, FT-08

e FT-09. Para ambas as amostras, nota-se a presença da fase  $\alpha$ -TCP como fase majoritária, acrescida de uma quantidade de  $\beta$ -TCP, como fase indesejável.

**Figura 5.2.** Difratoograma de raios X para o pó obtido pelo método 2, calcinado a temperatura de 1300°C (FT-04), sendo  $\alpha$  para  $\alpha$ -TCP e  $\gamma$  para pirofosfato de cálcio.



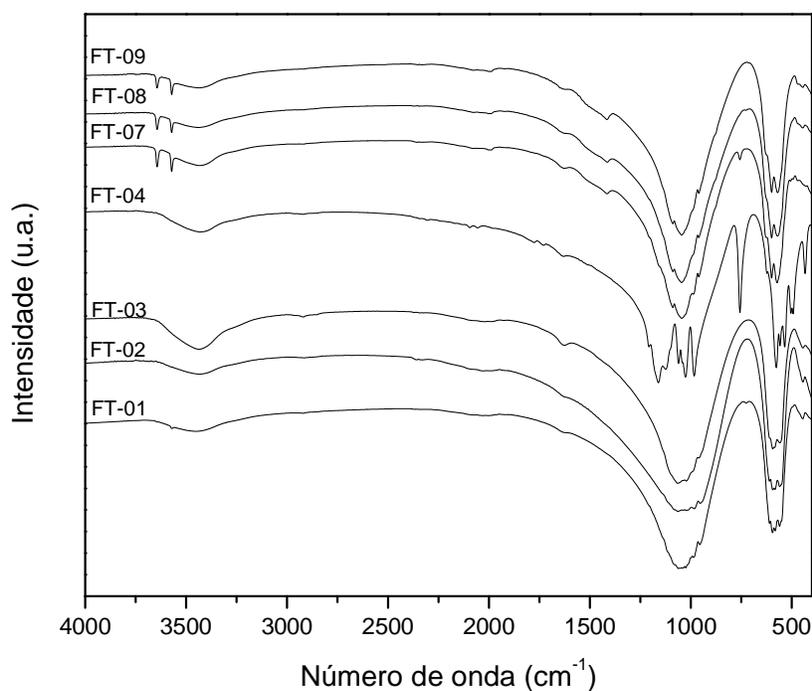
**Figura 5.3.** Difratoogramas de raios X para os pós obtidos pelo método 3, calcinados nas diferentes temperaturas, sendo  $\alpha$  para  $\alpha$ -TCP e  $\beta$  para  $\beta$ -TCP.



Geralmente a transformação de  $\beta$ -TCP em  $\alpha$ -TCP é lenta e reversível, sendo exigida, para a obtenção do  $\alpha$ -TCP de maior pureza, a utilização de tempos de patamar elevados a temperaturas superiores a 1200 °C, visando assegurar a máxima conversão, e resfriamento brusco para preservar a fase  $\alpha$ -TCP à temperatura ambiente. Neste trabalho não foi necessária a utilização de elevados tempos de patamares, nem a realização do resfriamento brusco, para obtenção da fase  $\alpha$ -TCP.

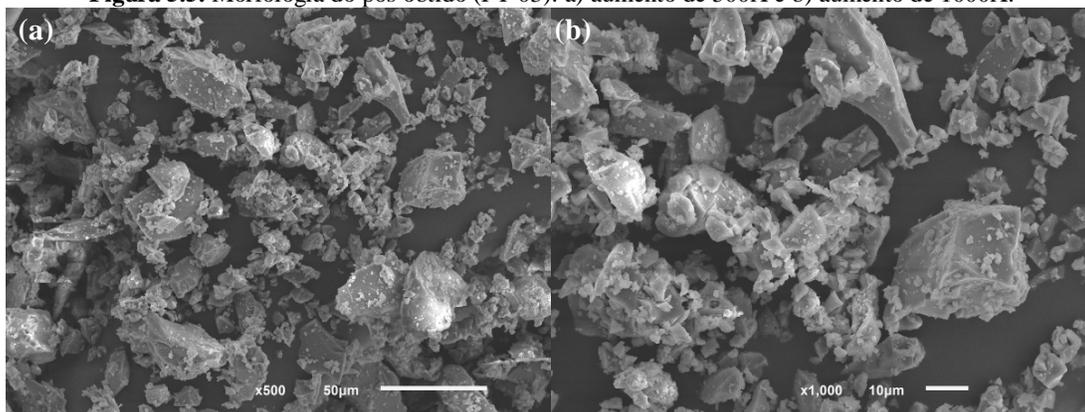
A análise por espectroscopia de infravermelho, que é mostrado na Figura 5.4, apresenta os grupos químicos, presentes no material obtido. Pode-se observar bandas largas, o que demonstra baixa cristalinidade dos pós obtidos. Os picos contidos nos comprimentos de onda 549, 600 e 1030  $\text{cm}^{-1}$  são referentes à ligação P-O ou grupos  $\text{PO}_4$ , em 1626  $\text{cm}^{-1}$  referente à  $\text{H}_2\text{O}$  adsorvida, 3623  $\text{cm}^{-1}$  referente à ligação O-H de grupos OH e o pico no intervalo de 3280 – 3700  $\text{cm}^{-1}$  referente à  $\text{H}_2\text{O}$  adsorvida. Para a amostra FT-04, as bandas se mostram mais definidas e identificam nitidamente bandas de absorção dos grupos fosfato  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  e bandas de absorção correspondentes à deformação H-O-H de  $\text{H}_2\text{O}$ .

**Figura 5.4.** Espectros de infravermelho das amostras obtidas após calcinação.



Na Figura 5.5 pode-se verificar a morfologia do pó obtido para a amostra FT-03. Os demais pós apresentaram morfologia similares, não sendo possível verificar diferenças por microscopia eletrônica de varredura.

**Figura 5.5.** Morfologia do pós obtido (FT-03): a) aumento de 500X e b) aumento de 1000X.



A análise de difração de laser foi utilizada para verificar o tamanho de partícula dos pós, obtido pela reação e calcinação dos pós. Os resultados obtidos pela análise granulométrica das diferentes amostras são apresentados na Tabela 5.1.

Pode-se observar, a partir dos valores expostos, que o tamanho médio de partículas apresentou valor compatível com os encontrados na literatura, isto é, distribuição de tamanho de partículas entre 2 a 20µm.

Sabe-se que a distribuição de tamanho das partículas do alfa-TCP pode influenciar a quantidade de líquido necessário para a obtenção do material em consistência de pasta. Santos (2002) e Driessens *et al.* (1994) concluíram que a quantidade de líquido com 2,5% de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  utilizada para a obtenção de uma pasta com consistência adequada é 0,32mL/g.

**Tabela 5.1.** Distribuição e tamanho médio de partículas (TMP) dos pós

Até	Diâmetro (µm)						
	FT-01	FT-02	FT-03	FT-04	FT-07	FT-08	FT-09
10%vol	1,03	1,21	1,30	1,24	0,92	0,96	1,36
50%vol	9,67	12,52	11,09	12,71	7,63	7,69	11,55
90%vol	31,03	29,63	30,24	36,83	30,23	32,49	34,25
TMP	13,24	14,26	13,73	16,62	12,05	12,70	15,22

Houve uma pequena variação no tamanho de partículas, pois por tal técnica mede-se também o tamanho dos aglomerados. Estes aglomerados tendem a ser formados devido ao fato de as partículas possuírem pequeno volume, resultando em área superficial maior e sendo mais estável para o particulado se aglomerar (VOLKMER, 2011).

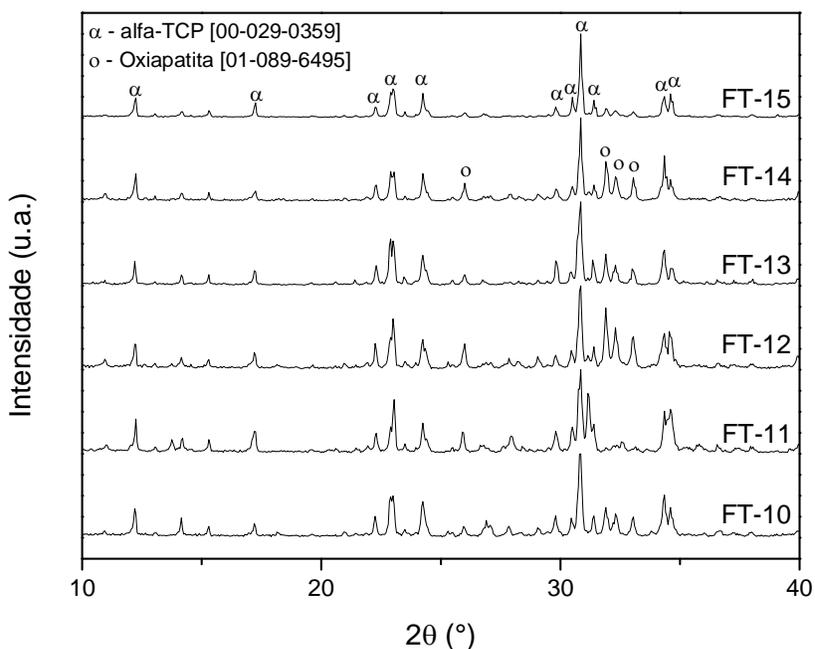
Com o presente estudo, se obteve um método de síntese rápido, de baixo custo e que permite a obtenção de  $\alpha$ -TCP de elevada pureza (conforme dados de difração de raios X) com potencial para uso como cimento ósseo, podendo apresentar valores elevados de resistência mecânica.

### 5.1.2 Estudo da influência da concentração dos reagentes

#### 5.1.2.1 Difração de raios X

Em uma nova avaliação a respeito da obtenção de alfa-TCP, a análise por difração de raios X dos pós obtidos, demonstrou que a concentração dos reagentes e a temperatura de calcinação, influenciam no produto obtido. Os picos assinalados no difratograma da Figura 5.6 correspondem às fichas de padrão de difração de número 00-029-0359 ( $\alpha$ -TCP) e 01-089-6495 (oxiapatita) do *International Centre for Diffraction Data* (ICDD).

**Figura 5.6.** Difratogramas de raios X para os pós obtidos, sendo  $\alpha$  para  $\alpha$ -TCP e o para oxiapatita.



Analisando a Figura 5.6 nota-se a presença de picos referentes a fase  $\alpha$ -TCP e a oxapatita para todas as amostras, com exceção da amostra FT-15, onde nota-se apenas picos referentes à fase alfa. Atualmente ainda não são conhecidos registros sobre a obtenção de  $\alpha$ -TCP puro pela metodologia proposta. Além disso, geralmente são utilizados temperaturas acima de 1300°C, porém com tempo de patamares não menores do que 4 horas. Contudo, ao que as análises indicam, foi possível obter a fase alfa-TCP com elevada pureza com tempos menores de calcinação, representando um ganho energético relevante.

#### 5.1.2.2 Resistência mecânica à compressão

Pelo ensaio de resistência mecânica à compressão, mostrados na Tabela 5.2, pode-se observar que a amostra FT-15 apresentou valor médio de resistência ligeiramente maior que as outras amostras, porém o acréscimo não foi significativo. A amostra FT-12 apresentou a menor resistência mecânica em relação às demais amostras, sendo ainda observada ligeira dissolução dos corpos de prova, quando imersos por sete dias em SBF.

**Tabela 5.2.** Resistência mecânica dos corpos de prova, após imersão em SBF.

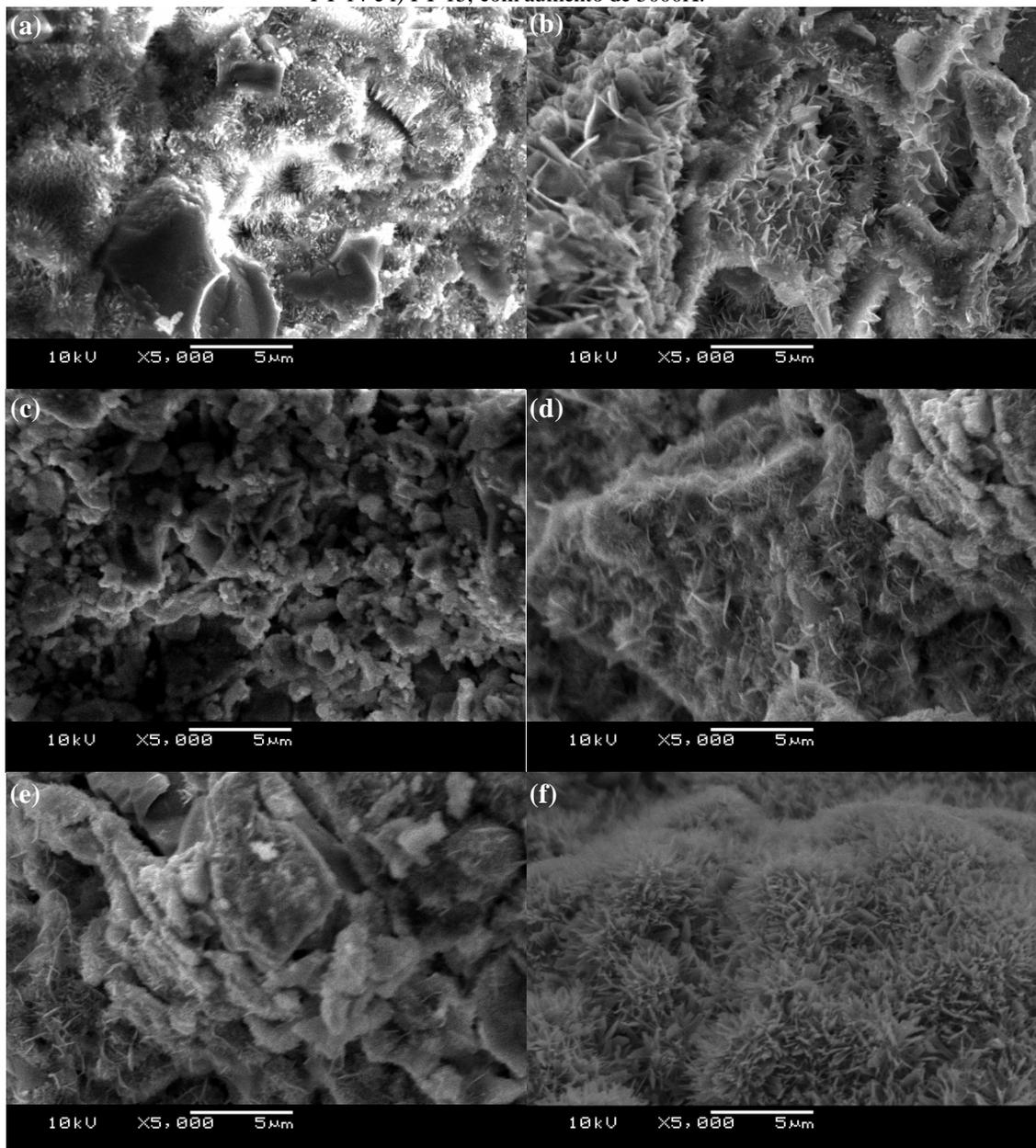
Amostras	Resistência mecânica à compressão (MPa)
FT-10	25,00 $\pm$ 4,60
FT-11	30,22 $\pm$ 4,52
FT-12	9,51 $\pm$ 3,49
FT-13	21,66 $\pm$ 2,95
FT-14	19,54 $\pm$ 3,76
FT-15	34,24 $\pm$ 3,02

O valor mais alto de resistência mecânica obtido neste estudo foi de 34,24  $\pm$  3,02 MPa para a amostra preparada com reagentes em concentração de 2,0M e temperatura de calcinação de 1500°C. Este valor é maior do que o encontrado por Oda *et al.* (2008), que utilizando o cimento comercial Biopex® obteve valores de resistência mecânica entre 8 e 10 MPa empregando uma razão líquido/pó de 0,33mL.g<sup>-1</sup>. Os valores de resistência mecânica encontrados neste estudo também são superiores aos encontrados por Santos (2002) para o cimento de fosfato tricálcico obtidos via reação no estado sólido. Em sua tese a resistência mecânica a compressão ficou ao redor de 11 MPa, valor similar ao encontrado por Oda *et al.* (2008) em seu trabalho utilizando o cimento comercial Biopex®.

### 5.1.2.3 Microscopia eletrônica de varredura

A Figura 5.7 apresenta as micrografias obtidas por MEV da superfície de fratura das amostras, após imersão em SBF por sete dias.

**Figura 5.7.** Micrografias da superfície de fratura das amostras a) FT-10, b) FT-11, c) FT-12 e d) FT-13, e) FT-14 e f) FT-15, com aumento de 5000X.



Pelas micrografias das amostras FT-10 e FT-11 pode-se observar que houve formação agulhas de hidroxiapatita e de grãos de Hadley (HADLEY *et al.*, 2000). Na

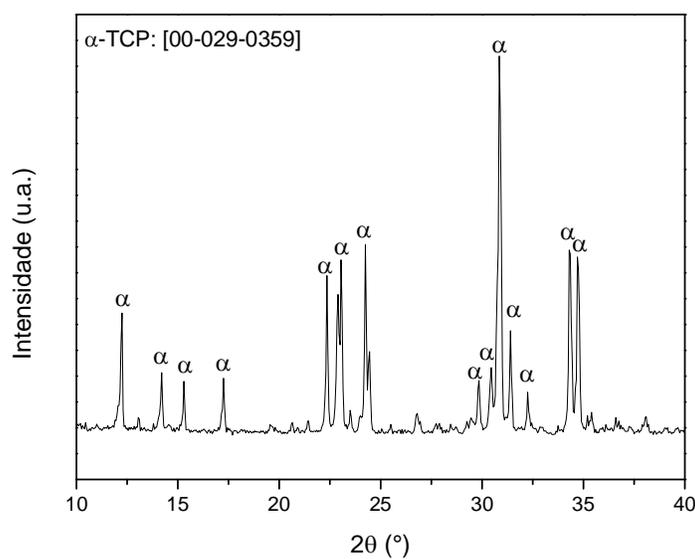
micrografia da superfície de fratura dos corpos de provas da amostra FT-12 não se observa a precipitação de agulhas características da formação de hidroxiapatita. Nas micrografias das amostras FT-13 e FT-14 pode-se notar o ligeiro aparecimento de cristais de hidroxiapatita. Já na micrografia da superfície de fratura dos corpos de provas da amostra FT-15 pode ser observada a precipitação de agulhas em rosáceas de hidroxiapatita deficiente em cálcio.

Com base nos resultados obtidos, será adotada a metodologia de síntese 1, com temperatura de calcinação de 1500°C e utilizando reagentes na concentração de 2,0M com o intuito de obter o maior rendimento de reação, visto que o aumento da concentração dos reagentes não influenciou de forma negativa a obtenção da fase alfa do fosfato tricálcico.

### 5.1.3 Avaliação da influência do tempo de moagem nas propriedades do cimento de fosfato de cálcio

O método de síntese por reação via úmida, utilizando o Método 1, temperatura de calcinação de 1500°C e concentração dos reagentes de 2,0M, permitiu a obtenção da fase alfa-TCP com elevado grau de pureza. Os picos destacados no difratograma da Figura 5.8, correspondem ao padrão de difração ICDD 00-029-0359, referente à fase alfa-TCP, apresentado novamente com maiores detalhes do que na figura 5.6.

**Figura 5.8.** Padrão de difração de raios X para amostra FT-15-00.



Pelo padrão de difração de raios X, é possível comprovar a presença de alfa-TCP como fase majoritária na amostra, conforme descrito anteriormente. Esta amostra foi submetida aos diferentes tempos de moagem. Segundo Volkmer (2011) o processo de moagem utilizado não altera a fase presente no material, assim como não ocasiona variação significativa na cristalinidade do pó.

A Tabela 5.3 mostra a influência do tempo de moagem no tamanho de aglomerados medidos por difração a laser e a área superficial específica determinados por BET. O erro relacionado ao tamanho de partícula é o erro intrínseco ao equipamento. A área superficial foi determinada pela média de três medições na mesma amostra. Pode ser observados valores de área superficial inferiores aos encontrados por Volkmer *et al.* (2013).

**Tabela 5.3.** Tamanho médio de partículas dos pós obtidos.

Amostra	Tamanho médio de partículas ( $\mu\text{m}$ )	Área superficial ( $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ )
FT-15-00	21,94	$3,40 \pm 0,65$
FT-15-05	16,80	$3,98 \pm 0,17$
FT-15-1	13,33	$3,53 \pm 0,27$
FT-15-2	9,07	$3,73 \pm 0,54$
FT-15-4	7,19	$4,10 \pm 0,80$
FT-15-8	6,19	$4,42 \pm 0,46$
FT-15-16	3,61	$4,62 \pm 0,47$

O tamanho de partículas determinado por difração de laser, diminui cerca de 24% após 0,5 hora de moagem, em relação a amostra de FT-15-00. Com 16 horas de moagem a redução foi de aproximadamente 83%. Esta mudança no tamanho de partículas influenciou a resistência de compressão das amostras, tal como é mostrado a seguir. Após moagem de 16 horas pode-se verificar um aumento de quase 36% área superficial específica das partículas em relação ao pó de partida.

Segundo Chow *et al.*, (1991), o tamanho médio de partículas, necessário para cimentos de fosfato de cálcio injetáveis é  $\leq 10 \mu\text{m}$ . Santos *et al.* (2002), obtiveram tamanho médio de partícula de  $8 \mu\text{m}$ , depois de cinco horas de moagem para alfa-TCP obtidos a partir de reação em estado sólido dos reagentes. Não existem estudos publicados de cimento de fosfato de cálcio a partir de pós obtidos por reação via úmida.

A Tabela 5.4 apresenta resultados de densidade aparente e porosidade aparente dos corpos de provas, preparados com a pasta cimentícia, os quais foram determinados pelo

método de Arquimedes. Também são mostrados os resultados de resistência à compressão das amostras preparadas para cada tempo de moagem.

**Tabela 5.4.** Resistência à compressão, porosidade e densidade aparente dos corpos de prova.

Amostra	Porosidade aparente (%)	Densidade aparente (g.cm <sup>-3</sup> )	Resistência à compressão (MPa)
FT-15-00	30,43 ± 1,87	1,82 ± 0,02	25,73 ± 2,74
FT-15-05	31,54 ± 3,50	1,75 ± 0,04	20,82 ± 3,08
FT-15-1	32,89 ± 1,83	1,75 ± 0,02	22,42 ± 2,86
FT-15-2	36,05 ± 2,45	1,69 ± 0,03	23,67 ± 2,25
FT-15-4	38,02 ± 2,32	1,66 ± 0,03	20,19 ± 2,63
FT-15-8	38,54 ± 1,72	1,67 ± 0,02	24,17 ± 2,81
FT-15-16	39,68 ± 1,51	1,66 ± 0,02	19,20 ± 2,49

Utilizando amostras com maior tempo de moagem se obteve corpos de prova com maior porosidade aparente. Esse resultado é contrário ao esperado, reportado em literatura por Volkmer *et al.* (2013), em estudo semelhante. Possivelmente o método de síntese para a preparação do pó resultou em um pó mais reativo, sendo desnecessária moagem subsequente, o que pode resultar o aumento da porosidade aparente dos corpos de prova.

Contudo, os valores de resistência mecânica à compressão são menores do que o encontrado por Gbureck *et al.* (2004), que após moagem de alta energia por 240 minutos conseguiu obter 63,3 MPa para o  $\alpha$ -TCP moído em etanol e de 82,0 MPa para o pó moído à seco. Para o preparo destas amostras, as mesmas foram confeccionadas em molde de aço inoxidável, onde ambas as extremidades foram fechadas com êmbolos de aço inoxidável adequados, o qual foi pré-comprimido por um dispositivo cantilever a uma pressão de 9 MPa, durante 5 segundos seguidos por uma carga constante de 700 kPa. Um grande número de fatores pode influenciar a resistência mecânica dos cimentos de  $\alpha$ -TCP, como a cristalinidade do pó, o projeto do molde e a técnica de mistura (GBURECK *et al.*, 2004). Neste estudo, outro fator que pode ser inserido é a pressão exercida no momento da confecção dos corpos de prova, visto que seu preparo não foi mecanizado.

Os melhores resultados de resistência mecânica à compressão foram observados para a amostra sem moagem adicional em moinho de bolas e para a amostra com oito horas de

moagem. Com estes resultados, podemos concluir que não é necessário realizar a moagem do alfa-TCP preparado por reação via úmida com os reagentes propostos, para se obter melhores resultados de resistência mecânica à compressão. Outro fator que pode ter influenciado na maior resistência mecânica à compressão da amostra FT-15-00 é a menor quantidade de líquido necessária para a obtenção da pasta cimentícia (como mostrado na Tabela 4.3).

A Figura 5.9 mostra as micrografias da superfície de fratura das amostras imersas em solução de SBF por sete dias.

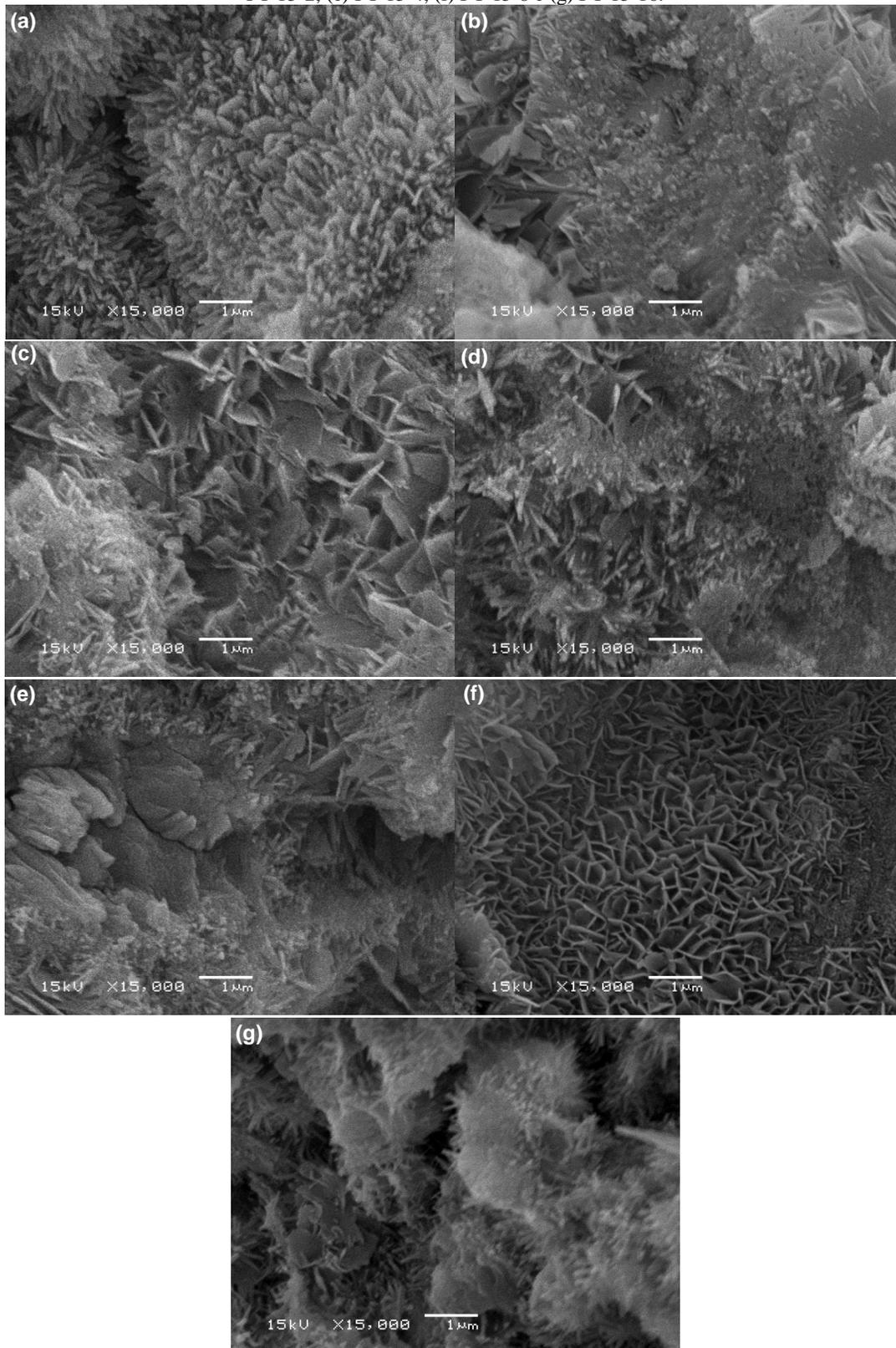
Nas micrografias (Fig. 5.9) pode ser observada a formação de agulhas hidroxiapatita em todas as amostras, no entanto, em diferentes quantidades e tamanhos. Nas amostras FT-15-00 e FT-15-8 pode ser observado que as agulhas hidroxiapatita são maiores do que nas outras amostras.

O aumento da resistência mecânica de cimentos de fosfato de cálcio, após imersão em solução de SBF, é atribuído à hidratação do alfa-TCP, que resulta na formação de hidroxiapatita. Cristais de hidroxiapatita são nucleados na superfície das partículas de  $\alpha$ -TCP pela solução supersaturada de Ca e P, que rodeia as partículas após a dissolução inicial das partículas. A subsequente dissolução de partículas de alfa-TCP e o crescimento dos cristais de hidroxiapatita são controlados pelo processo de difusão, através da camada de cristais de hidroxiapatita. As características de endurecimento do cimento dependem da formação de uma rede de cristais inter cruzados, formados por meio do processo de difusão. Assim, o aumento da resistência mecânica de algumas amostras pode ser associado ao maior entrecruzamento dos cristais de hidroxiapatita (FERNANDEZ *et al.*, 1998).

O aumento na resistência mecânica observada para as amostras FT-15-00 e FT-15-8 ocorre como resultado da formação de agulhas hidroxiapatita entrecruzadas, que precipitam após solubilização do alfa-TCP, quando imerso em solução de SBF (CARRODEGUAS *et al.*, 2008). A resistência mecânica observada para os espécimes desenvolvidos pode ser considerada baixa se for consideradas as exigências relacionadas com osso cortical, em que a exigência principal é a compressão. No entanto, deve-se ter em mente que o comportamento observado *in vitro* pode não corresponder ao comportamento *in vivo*, uma vez que o osso tem pouca irrigação e que deve ocorrer osteocondução para o local do implante de cimento. Estes fatores podem provocar um aumento da resistência mecânica do implante *in vivo*.

Frente aos resultados obtidos optou-se por utilizar o pó de alfa-TCP sem moagem adicional para as próximas etapas do trabalho.

**Figura 5.9.** Micrografias da superfície de fratura das amostras (a) FT-15-00, (b) FT-15-05, (c) FT-15-1, (d) FT-15-2, (e) FT-15-4, (f) FT-15-8 e (g) FT-15-16.



## 5.2 Obtenção dos hidrogéis

### 5.2.1 Hidrogéis – Avaliação 1

Os hidrogéis são constituídos polivinilpirrolidona que deve apresentar como característica a lenta degradação e elevada temperatura de transição vítrea (PEPPAS *et al.*, 2000b). Ácido acrílico foi adicionado ao sistema com intuito de aumentar a absorção de água e também contribuir para o aumento a taxa de degradação dos hidrogéis (DITTFEN *et al.*, 1997; DEVINE *et al.*, 2006). Não foi possível polimerizar a formulação H3 com o método proposto. Possivelmente a elevação da temperatura não foi suficiente para ocasionar a reticulação da amostra com o persulfato de amônio, logo essa amostra não foi caracterizada. Kaplan e Güner (2000) obtiveram hidrogéis de PVP reticulados com persulfato de potássio através da aplicação de radiação ionizante.

#### 5.2.1.1 Análise termogravimétrica (TGA)

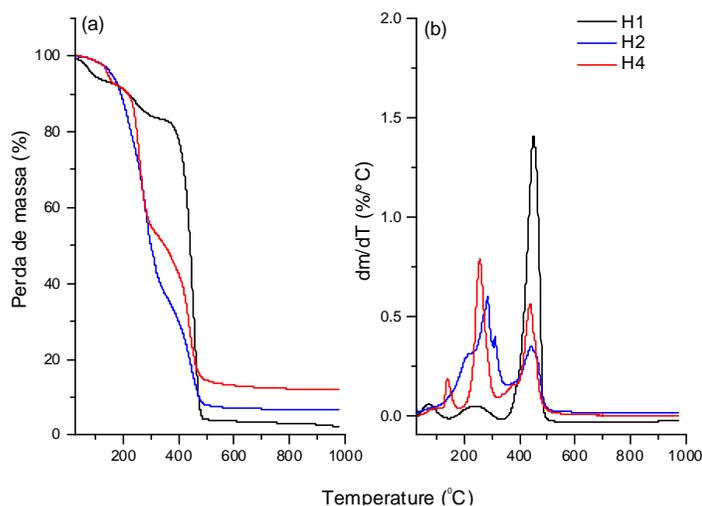
Segundo Abd Alla *et al.*, 2007, pode-se assumir que a formação de redes baseadas em NVP e AA resultará em hidrogéis com estabilidade térmica intermediária (entre a dos hidrogéis individuais), dependendo da composição. Uma vez que a estabilidade térmica dos hidrogéis, durante a sua utilização, é importante para aplicações práticas, a análise térmica foi utilizada para investigar a estabilidade térmica dos hidrogéis.

A análise térmica dos hidrogéis (Fig. 5.10) demonstra a estabilidade da matriz polimérica até praticamente 100°C. Para a amostra H1, houve perda de massa inicial (60-120°C), possivelmente referente à perda de umidade remanescente do hidrogel. A curva de TGA descontínua, com patamares de perda de massa, indica a não formação de uma matriz interpolimérica.

Pode-se notar que tanto o hidrogel H1 que utilizou apenas um monômero, como os hidrogéis H2 e H4 preparados com dois monômeros, apresentam múltiplas fases de decomposição térmica. No entanto, a maior perda de massa ocorre entre as temperaturas de 200-450 ° C. Os hidrogéis de PVP/AAc exibem uma estabilidade térmica menor do que o hidrogel de PVP puro.

As derivadas das curvas termogravimétricas estão mostradas na Figura 5.10b. As temperaturas às quais os valores máximos da decomposição ( $T_{dmax}$ ) ocorrem estão apresentados na Tabela 5.5. Estes dados mostram a decomposição térmica em múltiplos estágios.

**Figura 5.10.** Curva termogravimétrica (a) e derivada da curva termogravimétrica (b) obtida para os hidrogéis, em nitrogênio.



O primeiro pico de decomposição pode ser atribuído à evaporação das moléculas de água combinados aos hidrogéis, enquanto que os outros picos são relativos à decomposição dos hidrogéis. Pode-se verificar que a presença de ácido acrílico ocasionou uma redução na temperatura de decomposição dos hidrogéis. Esses resultados estão de acordo com os resultados encontrados por Abd Alla *et al.*, 2007, o qual atribui esse fenômeno ao fato de a energia necessária para dissociar termicamente o anel cíclico da pirrolidona ser muito maior do que a energia necessária para dissociar cadeias lineares.

Uma vez que o sistema de hidrogel proposto destina-se a ser utilizado como reforço no desenvolvimento de biomateriais compósitos, e atuará normalmente em temperatura fisiológica de 37°C, podemos afirmar que o polímero é estável nesta temperatura.

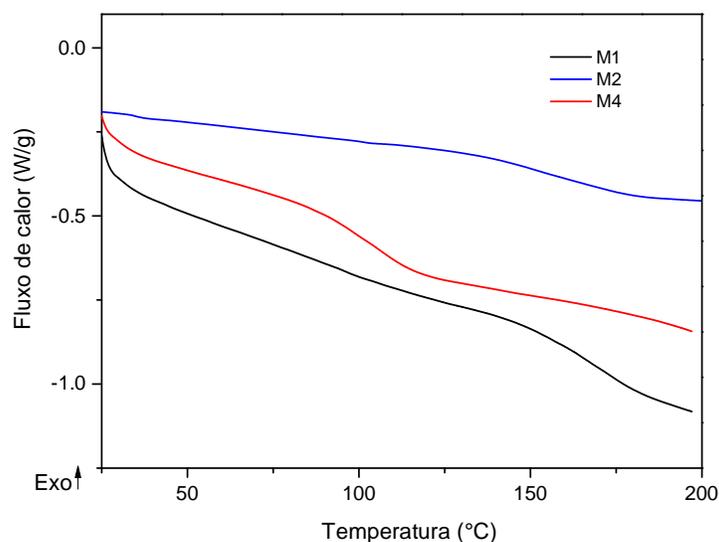
#### 5.2.1.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A Fig. 5.11 mostra os termogramas obtidos por calorimetria exploratória diferencial e na Tabela 5.5 são mostradas as características térmicas dos hidrogéis preparados. A análise foi realizada em triplicata, para cada uma das amostras. A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) de cada amostra foi determinada pela média dos valores obtidos. Segundo a literatura, a  $T_g$  da PVP, com  $M_w$  de  $1.2 \times 10^6$ , é 178°C (MARK, 1999) e o valor experimental de amostra H1 (sem AAc) é 173,51°C, o qual está de acordo com o valor da literatura. Wu e Freeman (2009) descobriram que, na gama de temperaturas de 0 - 350°C, não é observado  $T_g$  para amostras polimerizadas com MBAM, provavelmente devido à sua

elevada densidade de reticulação. Geralmente, nos polímeros altamente reticulados, pode ser difícil ou impossível de observar a  $T_g$ , devido à restrição de movimento da cadeia principal pelas ligações cruzadas.

Com base nestes resultados e a grande diferença de reatividade entre NVP e MBAM (regiões ricas em NVP e ricas em MBAM), duas regiões são formadas durante a polimerização. Devido à densa reticulação das regiões ricas em MBAM, não há  $T_g$  relacionada com o MBAM reticulado na rede de polímero, e apenas uma  $T_g$ , correspondente às regiões ricas em NVP, foi observada.

**Figura 5.11.** Termogramas dos hidrogéis obtidos por calorimetria exploratória diferencial.



Analisando as características térmicas dos hidrogéis, pode-se verificar que as amostras apresentaram uma única  $T_g$  e esta é influenciada pela presença do AAC e do iniciador utilizado. A presença de AAC resultou na diminuição de  $T_g$ , em ambos os casos. A redução foi mais significativa quando utilizado persulfato de amônio como iniciador.

**Tabela 5.5.** Características térmicas dos hidrogéis.

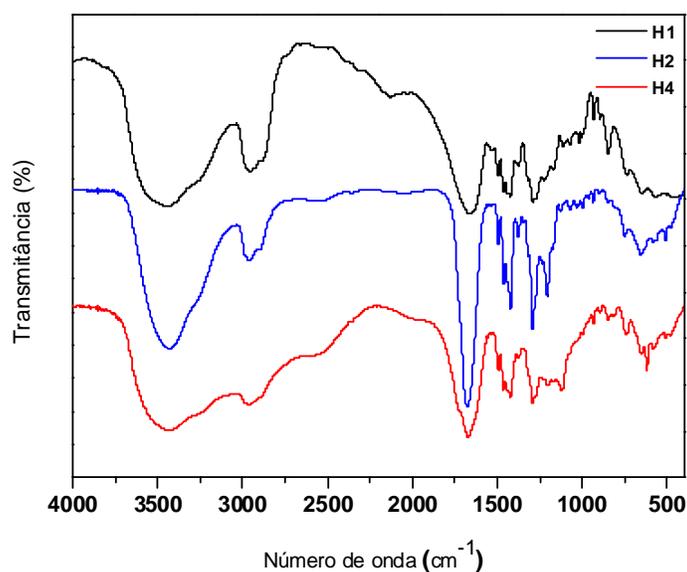
Amostra	$T_{dmax}$ (°C)	$T_g$ (°C)
<b>H1</b>	450,41	173,51
<b>H2</b>	441,33	151,67
<b>H4</b>	437,49	106,21

### 5.2.1.3 Espectroscopia de infravermelho

Os hidrogéis foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho, como mostrado na Fig. 5.12. Száraz e Forsling (2000) relataram duas bandas fortes em espectros do monômero NVP líquido. A primeira, a  $1629\text{ cm}^{-1}$ , foi atribuída ao estiramento da ligação C=C. A segunda, atribuída ao estiramento do grupo carbonila (C=O), localizado em  $1706\text{ cm}^{-1}$ . Greever *et al.*(2005) também identificou absorções de infravermelho característicos para NVP em  $1623\text{ cm}^{-1}$  (C=C) e  $1700\text{ cm}^{-1}$  (C=O). O não aparecimento dessas bandas indica a polimerização do monômero de NVP, e uma ampla ligação C=O aparecem em  $1650\text{ cm}^{-1}$  para a polivinilpirrolidona (PVP). A absorção de infravermelho característica em  $1630\text{ cm}^{-1}$  é atribuído à vibração de estiramento da ligação C=C do MBAM (ROEGES , 1994). A região do infravermelho de  $3800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento OH referente à água.

Consistente com a literatura discutida acima, o desaparecimento das absorções características de NVP e MBAM nos espectros FTIR das amostras reticuladas de NVP, bem como o aparecimento de uma banda absorção ampla C=O a  $1650\text{ cm}^{-1}$ , característica de PVP, sugerem que as condições de polimerização foram suficientes para reagir completamente as ligações duplas da NVP e MBAM. O aparecimento de uma absorção na região de  $1550\text{ cm}^{-1}$  (banda de Amida II) sugere que o MBAM foi reticulado com sucesso com a NVP durante a polimerização.

**Figura 5.12.** Espectros de infravermelho dos hidrogéis.



De acordo com Devine e Higginbotham (2005), o grupo carbonila do PVP apresenta um banda de vibração de estiramento entre  $1650$  e  $1680\text{ cm}^{-1}$  e o grupo carbonila do grupo ácido carboxílico na cadeia do PAA exibe um banda em aproximadamente  $1750\text{ cm}^{-1}$ . Quando o grupo carbonila forma ligação intermolecular (tais como ligação de hidrogênio), há uma mudança negativa exibida nos espectros FTIR, a qual pode ser observada na amostra H4. Também há evidências do aparecimento de um pequeno ombro na amostra, em torno de  $1730\text{ cm}^{-1}$ , correspondente à vibração de estiramento do grupo carbonila do grupo ácido carboxílico na cadeia de PAAc. Isto sugere que, para a amostra H4, pode ter ocorrido a formação de uma rede semi-interpenetrante. No entanto, isto não ocorreu nesta amostra, pois houve a formação de uma única Tg com diminuição desta e a amostra se dissolveu totalmente em água logo após a imersão, como mostrado a seguir.

#### 5.2.1.4 Inchamento dos hidrogéis

No estudo de inchamento dos hidrogéis foi possível observar diferentes capacidades de absorção de água, sendo esta influenciada pela composição dos hidrogéis. A amostra H1 apresentou uma capacidade de inchamento maior do que os outros hidrogéis, cerca de  $490 \pm 30\%$ , no entanto a integridade do hidrogel foi perdida com o tempo. A amostra H2 apresentou  $90 \pm 2\%$  de inchamento no equilíbrio, indicando maior grau de reticulação. Sabe-se que o aumento da densidade de ligações cruzadas resulta em menor inchamento no equilíbrio (SEN & YAKAR, 2005). A amostra H4 mostrou menor grau de reticulação, e dissolveu-se em contato com a água. Isto pode estar relacionado com a formação de produtos oligoméricos, devido à menor eficiência de iniciação, em comparação com o AIBN.

Segundo Abd Alla *et al.* (2007), a presença de ácido acrílico no hidrogel resultaria em maior grau de intumescimento em relação ao hidrogel de PVP baseado no polímero puro. Este comportamento seria atribuído ao maior carácter hidrofílico do AAc, em relação ao polímero ao PVP.

No entanto, verificamos efeito contrário nos hidrogéis preparados, o que pode ser resultado de uma maior densidade de ligações cruzadas, resultante das formulações e reagente utilizados.

Já o trabalho de Lakouraj *et al.* (2005), no qual foi preparado hidrogéis de PVP/PVA por reticulação em meio aquoso, utilizando persulfato de potássio, foi observado que a absorção de água tende a aumentar com o aumento da proporção de PVP no

copolímero. Os autores sugerem que a ligação de hidrogênio de grupos hidroxila do PVA tendem a cristalizar as cadeias de PVA através de ligação cruzada física. E que, por outro lado, o impedimento estérico dos grupos volumosos da pirrolidona restringem as cadeias e diminui a cristalinidade dos segmentos de PVA. Além disso, a PVP é mais hidrofílico do que PVA. E assim, a natureza amorfa do PVP e a sua maior afinidade com a água faz com que a rede rica em PVP apresente maior inchamento.

Segundo a literatura, os hidrogéis contendo NVP requerem concentrações elevadas (5-20% em peso) de agente de reticulação para produzir um material com melhores propriedades mecânicas (PEPPAS *et al.*, 2000b). Normalmente, concentrações mais elevadas do agente de reticulação leva à uma maior densidade de reticulação e, portanto, à melhores propriedades mecânicas e menores capacidades de inchamento.

### 5.2.2 Hidrogéis – Avaliação 2

Com as formulações propostas nesta avaliação foi possível obter hidrogéis com diferentes propriedades. Não foi possível polimerizar as formulações H6 e H8 pelo método proposto, logo estas amostras não foram caracterizadas. As amostras H5, H11 e H12, apresentaram algumas trincas após polimerização e lavagem. Já as amostras H7, H9, H10 e H13 apresentaram melhor aspecto e integridade física.

Os monômeros utilizados para o preparo das formulações são conhecidos por sua reputação não tóxica e biocompatível (AMEYE *et al.*, 2002). A proporção dos monômeros, do agente de reticulação e do catalizador, foi mantida. A concentração dos iniciadores variou e foi determinada por testes preliminares de polimerização, sendo necessário utilizar valores ligeiramente maiores aos sugeridos pela literatura. Jin *et al.* (2013) utilizou 1% de AIBN em relação à massa de monômero, já os autores Shantha e Harding (2000) utilizaram 3,5% de AIBN em relação à massa de monômero. Neste estudo, a concentração do iniciador AIBN necessária para polimerização dos hidrogéis foi de 3,0% em relação à massa total de hidrogel. Jin *et al.* (2009) prepararam hidrogéis de Poli(Ácido acrílico-co-N-vinil-2-pirrolidona) utilizando 1% de persulfato de potássio como iniciador, em relação à quantidade de ácido acrílico. Já Bajpai e Dubey (2005) prepararam hidrogéis de Poli(N-Vinil-2-pirrolidona-co-Ácido acrílico) utilizando 1% de persulfato de potássio em relação à quantidade total de monômero. Neste estudo, foi necessária a utilização de 0,5% de AP em relação à massa total de hidrogel, independente da concentração de monômeros. Wu *et al.* (2010) prepararam filmes de PVP reticulados com MBAM utilizando 1% de HCPK

(baseado na massa de monômero e agente reticulante) por fotopolimerização por UV e os autores Geever *et al.* (2006) prepararam hidrogéis de 1-vinil-2-pirrolidona com N-isopropilacrilamida utilizando 3% do fotoiniciador HCPK em relação à massa de monômero, utilizando luz UV. Neste trabalho, foi utilizado 0,5% do fotoiniciador HCPK em relação à massa total de hidrogel, independente da concentração de monômero empregada. Foi adotada a liofilização como método de secagem para os hidrogéis.

O inchamento dos hidrogéis em água foi avaliado, com o decorrer do tempo, e o inchamento máximo dos hidrogéis está apresentado na Tabela 5.6. Novamente o comportamento é contrário ao sugerido pela literatura, conforme descrito anteriormente. A presença de ácido acrílico nos hidrogéis ocasionou uma redução no grau de intumescimento dos hidrogéis, sugerindo que a presença deste aumentou o grau de reticulação das amostras.

O primeiro grupo de hidrogéis foi preparado por polimerização via radical livre utilizando AIBN como iniciador. A utilização deste iniciador resultou em menor grau de intumescimento dos hidrogéis. Assim, além da composição química, o iniciador utilizado também influenciou nas propriedades dos hidrogéis. Sendo que este permitiu a obtenção de hidrogéis mais reticulados.

O segundo grupo de hidrogéis também foi preparado por polimerização via radical livre, porém utilizando AP como iniciador. Entre os três iniciadores utilizados este foi o que apresentou menor grau de reticulação das amostras.

O terceiro grupo de hidrogéis foi preparado por fotopolimerização, e utilizou HCPK como iniciador. Analisando os resultados, o grau de reticulação destes hidrogéis foi intermediário aos obtidos pelos outros dois iniciadores.

A densidade aparente dos hidrogéis está apresentada na Tabela 5.6. Os menores valores absolutos de densidade aparente foram obtidos para as amostras preparadas somente com NVP. Valores ligeiramente superiores a estes foram obtidos para os hidrogéis preparados somente com AAc. Os hidrogéis preparados com NVP e AAc apresentaram maiores valores de densidade aparente e esses resultados vão de encontro aos resultados de grau de intumescimento das amostras, o qual foi menor para essas formulações.

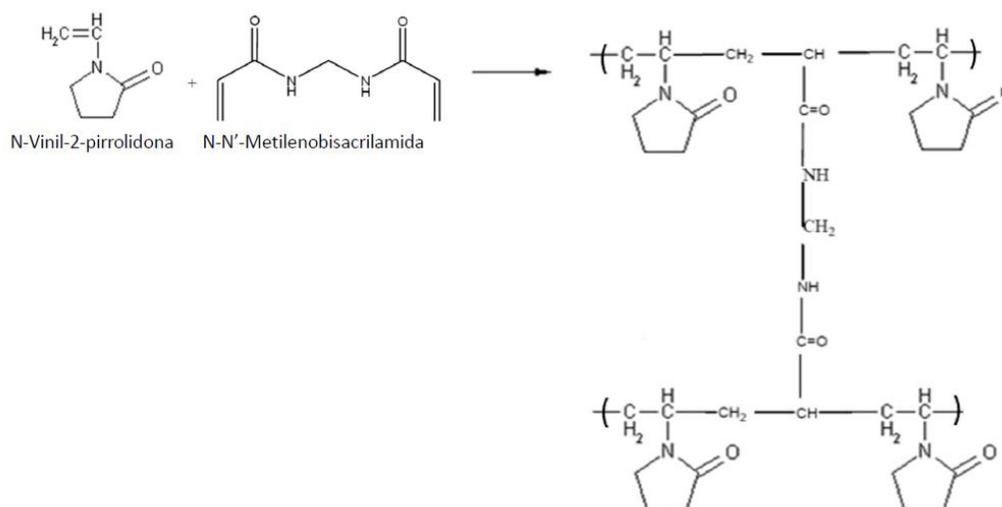
A porosidade das composições sintetizadas, também é mostrada na Tabela 5.6. A porosidade dos hidrogéis preparados com NVP e AAc foi maior, comparada aos hidrogéis preparados com os monômeros puros. Apesar de apresentarem maior densidade aparente e menor grau de intumescimento, essas formulações permitiram a formação de maiores espaços vazios na estrutura dos hidrogéis.

**Tabela 5.6.** Propriedades dos hidrogéis.

Amostra	Densidade aparente (g.cm <sup>-3</sup> )	Densidade real (g.cm <sup>-3</sup> )	Porosidade total (%)	Grau de Intumescimento (%)
H5	0,35 ± 0,02	1,33 ± 0,01	26,72 ± 1,15	204,57 ± 41,04
H7	0,70 ± 0,05	1,35 ± 0,00	51,72 ± 3,54	58,91 ± 3,17
H9	0,31 ± 0,03	1,35 ± 0,00	22,94 ± 2,59	170,26 ± 4,73
H10	0,79 ± 0,07	1,27 ± 0,01	62,44 ± 5,80	71,41 ± 6,47
H11	0,17 ± 0,00	1,28 ± 0,01	13,13 ± 0,12	600,43 ± 36,09
H12	0,37 ± 0,01	1,43 ± 0,01	25,99 ± 0,71	118,51 ± 4,69
H13	0,85 ± 0,04	1,29 ± 0,00	65,59 ± 3,13	66,44 ± 2,02

Wu *et al.* (2010) prepararam filmes de NVP reticulado com MBAM por fotopolimerização de UV, utilizando HCPK como fotoiniciador. Os autores verificaram que a quantidade de MBAM utilizada influencia na absorção de água pelos filmes. A absorção de água variou de 350% para filmes com razão NVP/MBAM de 85/15 a 220% para filmes com 70/30. A quantidade de MBAM utilizada neste trabalho foi significativamente inferior, logo o grau de reticulação também foi menor, ocasionando a maior absorção de água por parte dos hidrogéis preparados somente com NVP.

A possível estrutura para hidrogéis de NVP reticulados em presença de MBAM está apresentada na Figura 5.13.

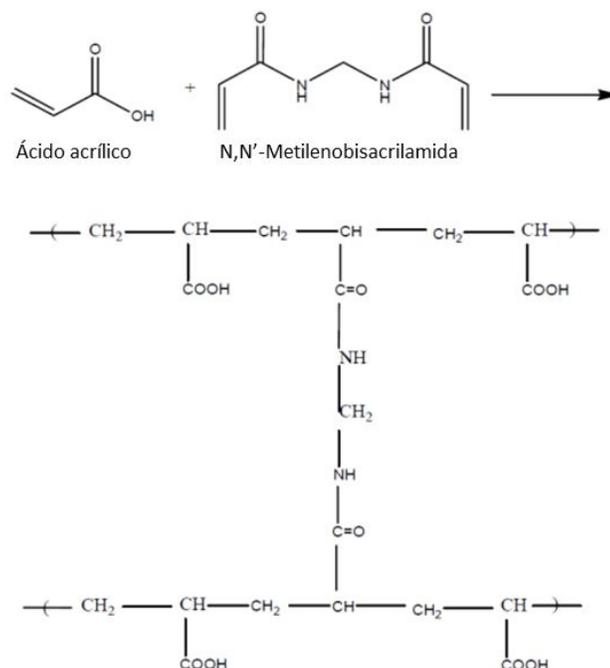
**Figura 5.13.** Possível estrutura para hidrogéis de NVP reticulados em presença de MBAM.

O Poli (ácido acrílico) contém partes hidrofílicas (grupos carboxílicos que podem estabilizar a solução aquosa através da formação de ligações de hidrogênio com as moléculas de água vizinhas, bem como com outras substâncias doadoras de hidrogênio) e partes hidrofóbicas (cadeia vinílica que podem desestabilizar a solução aquosa através da sua agregação e liberação das moléculas de água que a rodeiam). Estes dois efeitos competem entre si, dando ao polímero um comportamento de fase especial (JIN *et al.*, 2005).

Jin *et al.*, 2005 prepararam PAA e PVP por polimerização via radical livre, utilizando AIBN como iniciador, em metanol anidro para PAA e em água destilada para PVP, bem como fizeram a complexação entre PAA e PVP. Os autores fizeram um estudo da absorção de água com a variação do pH e observaram que, para polímeros de ácido acrílico, quando a variação do pH passa de 3,00 para 9,80, o invólucro protetor de moléculas de água é destruído por causa da dissociação de grupos carboxílicos, e assim a interação hidrofóbica é relativamente mais forte do que a interação hidrofílica. No entanto, para PVP praticamente não há dependência com o pH, indicando que o PVP pode adotar uma conformação relativamente mais estável dentro de uma vasta gama de pH.

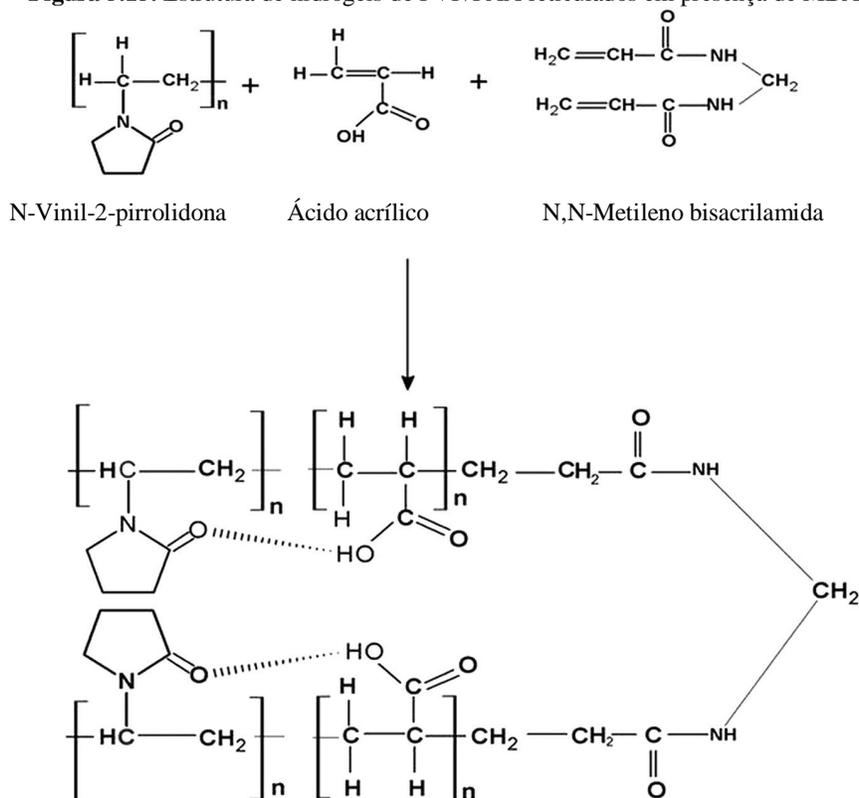
Segundo Mutar e Radia (2012), a possível estrutura para hidrogéis de ácido acrílico, reticulados em presença de MBAM é apresentada na Figura 5.14.

**Figura 5.14.** Estrutura de hidrogéis de ácido acrílico reticulados em presença de MBAM.



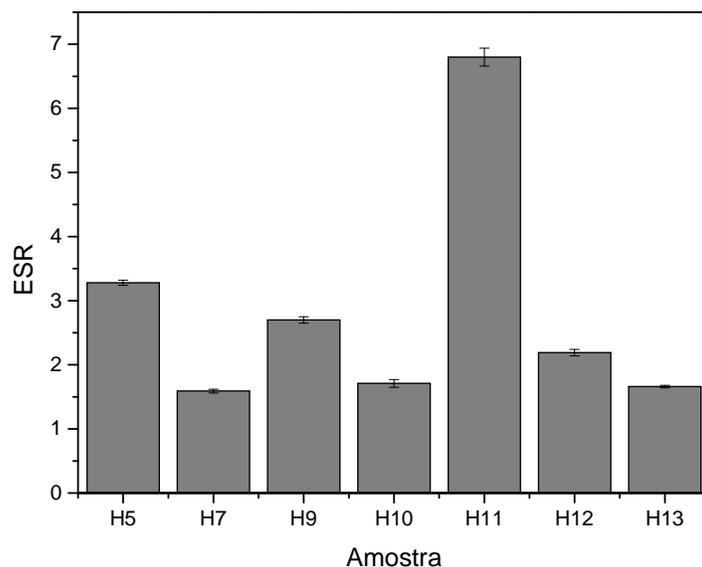
Segundo Sohail *et al.* (2014), a possível estrutura para hidrogéis de polivinilpirrolidona/ácido acrílico (PVP/AA), reticulados em presença de N,N-metileno bisacrilamida é a apresentada na Figura 5.15.

**Figura 5.15.** Estrutura de hidrogéis de PVP/PAA reticulados em presença de MBAM.



O inchamento pode ser considerado como uma técnica barata e simples para se caracterizar um polímero (YARIMKAYA & BASAN, 2007). O equilíbrio de inchamento da rede de um hidrogel é determinado pelo balanço de três forças primárias: (1) A retração elástica da rede; (2) a pressão osmótica da rede, resultado dos grupos iônicos do meio ao redor dos grupos contendo cargas iônicas da cadeia polimérica; (3) A energia livre de mistura das redes poliméricas com o solvente (ZHAI *et al.*, 2004). Quando estes parâmetros se encontram em estado de equilíbrio, o equilíbrio de inchamento é alcançado. O quociente de inchamento no equilíbrio (ESR – *Equilibrium Swelling Rate*) é calculado a partir da Equação 4.4.

A Figura 5.16 mostra o valor do quociente de equilíbrio de inchamento (ESR – *Equilibrium Swelling Rate*), em água.

**Figura 5.16.** Quociente de equilíbrio de inchamento em água.

Nota-se que o quociente de equilíbrio de inchamento é maior para os hidrogéis preparados somente com NVP e significativamente maior para hidrogéis de NVP utilizando como fotoiniciador o HCPK.

Visto que o processo de inchamento de um hidrogel se dá por difusão das moléculas do líquido, alguns fatores como concentração total de monômeros, densidade de entrecruzamentos na cadeia e espessura das paredes dos poros são importantes (JAIN *et al.*, 2009). Assim seria de se esperar que a porosidade exercesse um papel importante na cinética de difusão dos hidrogéis visto que estes, por possuírem poros grandes e interconectados, permitem o transporte mais rápido das moléculas do solvente através das paredes finas entre os poros. Porém a densidade de entrecruzamentos na cadeia também é um fator a ser considerado.

Um dos parâmetros mais importantes que caracteriza a estrutura de um hidrogel entrecruzado é o peso molecular entre ligações entrecruzadas,  $M_c$  (YARIMKAYA & BASAN, 2007). Tal propriedade determina o quanto as cadeias da rede polimérica podem expandir para acomodar as moléculas do solvente. Um polímero com um alto valor de  $M_c$  é capaz de inchar e obter um maior ESR do que um polímero com um valor baixo de  $M_c$  (YARIMKAYA & BASAN, 2007). O valor médio de peso molecular entre ligações entrecruzadas pode ser expresso pela equação de Flory – Rehner (PEPPAS & PEPPAS, 1991; UZUN *et al.*; 2003, LIN & METTERS, 2006, YARIMKAYA & BASAN, 2007). A

equação supracitada foi mostrada na Equação 4.5. Já a fração volumétrica do polímero inchado, um dos parâmetros necessários para a obtenção do peso molecular entre ligações entrecruzadas foi calculada a partir da Equação 4.6.

Outro parâmetro significativo para a caracterização de polímeros entrecruzados é a densidade de ligações entrecruzadas,  $V_x$ , que pode ser calculada relacionando-se o peso molecular entre ligações entrecruzadas com a densidade do polímero, utilizando-se a Equação 4.9 (GARLAND *et al.*, 2011).

O Tamanho da rede,  $\xi$ , é um termo que descreve o espaço disponível para o transporte de soluto entre a rede polimérica, também é um parâmetro importante para a análise de polímeros entrecruzados e é calculado de acordo com a Equação 4.10 (UZUN *et al.*, 2003).

A Tabela 5.7 mostra em resumo as propriedades estruturais, densidade de entrecruzamento e tamanho da rede, calculados com a utilização nas Equações 4.5 a 4.11, para as composições sintetizadas neste estudo.

**Tabela 5.7.** Parâmetros da rede polimérica, determinados através do estudo do inchamento dos hidrogéis.

Amostra	Mc (g.mol <sup>-1</sup> )	Mr (g.mol <sup>-1</sup> )	$v_x$ (mol.cm <sup>-3</sup> x 10 <sup>20</sup> )	$\xi$ (nm)	G' (MPa)
H5	3233 ± 154	111,4	2,48 ± 0,11	25,84 ± 0,50	0,23 ± 0,01
H7	173 ± 18	98,28	47,2 ± 4,7	7,68 ± 0,34	7,14 ± 0,75
H9	2123 ± 154	72,05	3,86 ± 0,27	20,50 ± 0,61	0,51 ± 0,04
H10	229 ± 42	98,28	34,1 ± 5,80	8,64 ± 0,66	5,31 ± 0,92
H11	49219 ± 8718	111,4	0,16 ± 0,03	77,86 ± 5,44	0,01 ± 0,00
H12	960 ± 96	72,05	9,03 ± 0,95	14,77 ± 0,63	1,18 ± 0,11
H13	204 ± 12	98,28	38,0 ± 2,29	8,26 ± 0,21	6,00 ± 0,36

Como visto na Tabela 5.7, os valores de peso molecular entre ligações entrecruzadas,  $M_c$ , é maior para os hidrogéis preparado apenas com NVP e significativamente mais quando HCPK é utilizado como fotoiniciador. Em parte este resultado pode ser explicado pelo fato de que as cadeias de NVP possuem maior valor de  $M_r$ , peso molecular da unidade repetitiva, como mostrado na Tabela 5.7.

Por outro lado, os resultados levam a crer que o agente entrecruzante utilizado forma ligações mais efetivamente quanto em presença dos dois monômeros NVP e AAc do que com o NVP puro, de forma que as composições contendo NVP e AAc possuam uma

maior proporção de entrecruzamentos, o que resultaria em um menor peso molecular entre ligações entrecruzadas.

O peso molecular entre ligações entrecruzadas pode ser considerado como o peso molecular médio das cadeias entre cada ligação entrecruzada. Dessa forma, quanto maior o valor dessa propriedade, maior será o valor do quociente de equilíbrio de inchamento, pois o hidrogel terá um menor número de pontos de entrecruzamento de ligações para maiores teores de cadeia flexível. Na literatura, Yarimkaya e Basan (2007) estudaram os parâmetros da rede de copolímeros de hidroxietil metacrilato com ácido acrílico e acrilato de sódio (HEMA-co-AA-co-NaAc) e verificaram que para maiores valores de inchamento, maior era o valor do peso molecular entre ligações entrecruzadas. Neste caso, estudou-se a influência do pH, sendo que para pH 2,0 obteve-se um ESR de 1,5 e um Mc de 2667 g/mol, enquanto que para o pH 8,0 obteve-se um ESR de aproximadamente 5 e um Mc de 209 g/mol. A mesma tendência foi seguida por hidrogéis compostos pelo monômero DMAEMA e pequenas quantidades do agente entrecruzante Etileno Glicol Dimetilacrilato (EGDMA), no qual o inchamento de 3380% (ESR de aproximadamente 33,8) levou à um peso molecular entre ligações entrecruzadas de 10000 g/mol, enquanto que um inchamento de 1296% (ESR igual a aproximadamente 14) correspondeu a um Mc de apenas 475 g/mol (UZUN *et al.*, 2003). O que indica que o peso molecular entre ligações entrecruzadas, além de ser afetado pelo pH, também é influenciado pela composição, principalmente pelo teor de agente entrecruzante utilizado na reação de polimerização (VOLKMER, 2011). Benamer *et al.* (2006) prepararam hidrogéis de PVP/PAAc que foram reticulados por meio de uma técnica de irradiação gama. Foi constatado que a expansão de gel pode ser ajustada através do aumento da concentração de AAc, enquanto é utilizado uma concentração específica de agente de reticulação e de polímero

O conhecimento da densidade de ligações entrecruzadas é um fator de grande importância na caracterização de hidrogéis devido à seus efeitos nas propriedades físicas e mecânicas e em sua influência nas aplicações práticas (GARLAND *et al.*, 2011). A densidade de ligações entrecruzadas pode ser definida como a fração molar de unidades monoméricas que são pontos de entrecruzamentos. A densidade de ligações entrecruzadas diminuiu com o aumento do peso molecular entre ligações entrecruzadas, o que pode ser explicado pelo fato de que o Mc é inversamente proporcional à densidade de ligações entrecruzadas como mostra a Equação 4.9. Logo, quanto maior o número de ligações entrecruzadas maior o valor de  $V_x$ .

Esse comportamento pode ser observado nos resultados expostos na Tabela 5.7. O mesmo comportamento foi verificado por Garland *et al.* (2011) para hidrogéis a base de poli(metil vinil éter – co – ácido maleico) entrecruzado com poli(etileno glicol), o qual obteve  $V_x$  de  $3,99 \times 10^{20} \text{ mol.cm}^{-3}$ , para composições cujo  $Mc$  foi de  $2630 \text{ g.mol}^{-1}$ . Valores consideravelmente similares aos obtidos neste trabalho para o hidrogel H9.

O tamanho de rede é outro fator importante para determinar as propriedades físicas dos hidrogéis como propriedades mecânicas, degradabilidade e a difusividade de moléculas. Tal parâmetro foi calculado utilizando-se a Equação 4.10 e os resultados mostram que hidrogéis preparados somente com NVP apresentam maiores tamanhos de rede. De acordo com Lin e Metters (2006), o tamanho de rede é afetado por: (1) grau de reticulação do hidrogel; (2) estrutura química da composição do monômero; e (3) estímulos externos, como temperatura, pH e força iônica. Assim, quanto maior a densidade de ligações entrecruzadas, menor será o comprimento das cadeias livres (menor  $Mc$ ), e conseqüentemente, menor o tamanho dos espaços vazios que permitem o carregamento de cargas e fármacos pelo polímero.

Para aplicações biomédicas, o tamanho de rede típico varia entre 5 e 100 nm, quando inchadas. Esta faixa de tamanho é muito maior do que o tamanho da maioria dos fármacos e, portanto, a difusão desses fármacos não é afetada em hidrogéis no seu estado inchado. Entretanto, a liberação de macromoléculas como peptídeos, proteínas e oligonucleotídeos pode ser sustentada por hidrogéis em seu estado inchado devido ao seu significativo raio hidrodinâmico (LIN & METTERS, 2006). No caso dos hidrogéis preparados neste trabalho, as amostras preparadas com NVP e AAc possuem maior densidade de ligações entrecruzadas, logo possuem um menor tamanho de rede. No entanto, as amostras preparadas somente com NVP, além de possuírem menor  $V_x$ , possuem anéis de pirrolidona, o que também pode influenciar no fato de tais amostras possuírem maior tamanho de rede. O que nos permite supor que os hidrogéis preparados somente com NVP seriam mais efetivos no carregamento de fármacos. Entretanto, apresentariam uma menor estabilidade química, por possuírem maior espaçamento entre as moléculas, permitindo que o solvente agrida mais facilmente as ligações químicas da cadeia, o que diminuiria o tempo de degradação do implante.

Utilizando-se a Equação 4.11 calculou-se o módulo de elasticidade dos hidrogéis a partir do seu estado de inchamento (Tabela 5.7). Assim, como seria de se esperar, cadeias mais livres e menos entrecruzadas, apresentaram menores valores de resistência elástica, os quais foram observados para hidrogéis preparados somente com NVP.

Cabe salientar que, com o tempo, devido ao método de secagem utilizado, os hidrogéis perderam a integridade estrutural. Assim seria válida a repetição do experimento, utilizando outro método de secagem.

Como continuidade do trabalho as formulações de hidrogéis foram incorporadas ao cimento de fosfato cálcio preparado, com o intuito de verificar a influência destes nas propriedades dos cimentos.

### 5.3 Obtenção dos compósitos

Os compósitos foram preparados pelo método de dupla pega. O cimento de dupla pega é resultado da adição de sistema de polimerização *in situ* ao cimento tradicional. A resistência mecânica inicial é dada pela reação de polimerização e a final, pela reação hidráulica do cimento (SANTOS *et al.*, 2003).

#### 5.3.1 Compósitos: Cimento de fosfato de cálcio e hidrogéis da avaliação 1

##### 5.3.1.1 Densidade aparente, porosidade aparente e absorção de água

Na Tabela 5.8, são apresentados os resultados de absorção de água, densidade e porosidade aparente das amostras.

**Tabela 5.8.** Porosidade aparente, densidade aparente e absorção de água das amostras.

Amostra	Porosidade aparente (%)	Densidade aparente ( $\text{g.cm}^{-3}$ )	Absorção de água (%)
FT-a	$32,26 \pm 0,57$	$1,87 \pm 0,03$	$17,21 \pm 0,19$
FT-H1	$29,13 \pm 0,73$	$1,88 \pm 0,03$	$15,51 \pm 0,64$
FT-H2	$32,95 \pm 0,54$	$1,83 \pm 0,01$	$18,04 \pm 0,33$
FT-H3	$29,69 \pm 1,46$	$1,88 \pm 0,04$	$15,78 \pm 1,17$
FT-H4	$30,82 \pm 1,53$	$1,83 \pm 0,06$	$16,88 \pm 1,40$

A partir dos resultados obtidos pode-se verificar que não houve variação significativa nos valores dos compósitos em relação à amostra FT-a (sem hidrogel), indicando que a presença dos hidrogéis não afetou de forma negativa, a estrutura física do material.

##### 5.3.1.2 Resistência à compressão de amostras

Os resultados de resistência mecânica, das amostras úmidas, são mostrados na Tabela 5.9. Os valores de resistência mecânica à compressão dos compósitos são similares

(considerando o erro de medição), porém são ligeiramente menores do que o da amostra FT-a (sem hidrogel). No entanto, a incorporação do hidrogel ao cimento ósseo tem como objetivo melhorar a adesão celular do material implantado e os resultados mostraram que essa incorporação ocasionou uma pequena redução nas propriedades mecânicas do material.

**Tabela 5.9.** Resistência mecânica à compressão das amostras.

<b>Amostra</b>	<b>Resistência mecânica (MPa)</b>
FT-a	34,24 ± 3,02
FT-H1	23,68 ± 6,82
FT-H2	28,31 ± 8,80
FT-H3	26,07 ± 3,70
FT-H4	17,23 ± 3,13

A menor resistência mecânica à compressão, com redução de 50%, foi obtida para a amostra FT-H4. O hidrogel preparado com a formulação H4 teve sua integridade física perdida após algum tempo de imersão em água. Possivelmente esse fator tenha afetado também o compósito. O hidrogel que apresentou menor absorção de água, na avaliação 1, foi o H2. Esse fator por ter ocasionado a maior resistência mecânica à compressão, quando misturado ao cimento de fosfato de cálcio. A formulação H3, que não polimerizou, ao ser misturada ao cimento de fosfato de cálcio não teve influência tão negativa à resistência mecânica do compósito, comparado aos outros compósitos.

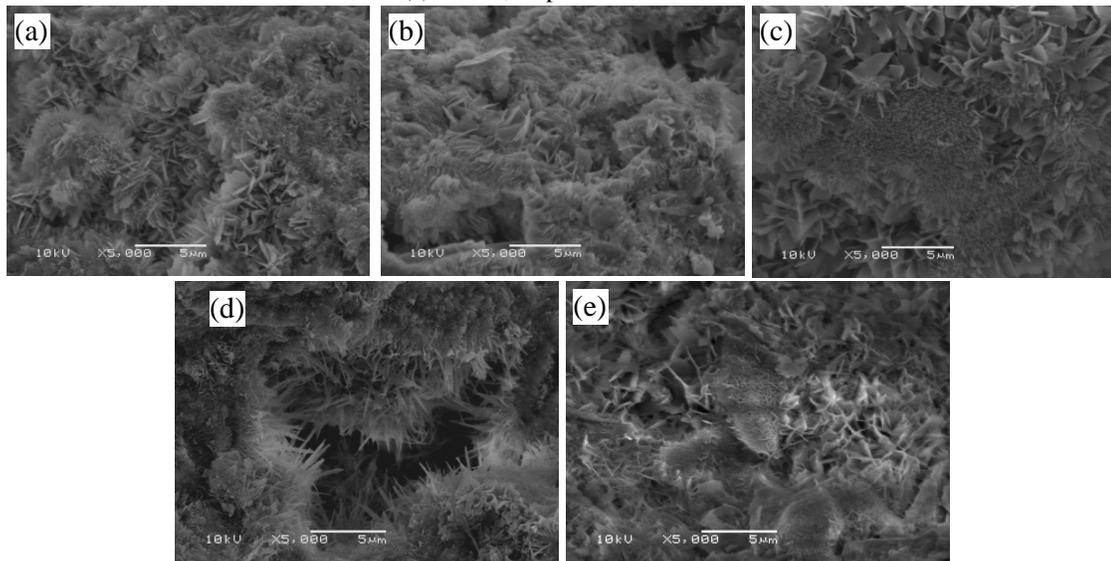
### 5.3.1.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Fig. 5.17 mostra as micrografias de fratura das amostras após imersão em SBF durante sete dias.

Analisando as morfologias encontradas para as amostras, podemos notar a presença de cristais de hidroxiapatita na forma de placas, formando um entrecruzamento cristalino, responsável pelo aumento da resistência mecânica dos cimentos (GRUNINGER *et al.*, 1984). Microestruturas semelhantes foram obtidas para o cimento alfa-TCP por Ginebra *et al.* (1995b).

Em geral, a resistência mecânica à compressão dos cimentos de fosfato de cálcio aumenta com o aumento do tempo de imersão em SBF, assim possivelmente melhores resultados de resistência mecânica seriam obtidos com maiores tempos de imersão. A presença de aceleradores de pega do cimento, como de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , pode resultar na diminuição das propriedades mecânicas (GINEBRA *et al.*, 1995a), porém nesse estudo o acelerador esteve presente em todas as formulações.

**Figura 5.17.** Micrografias da superfície de fratura das amostras (a) FT-a, (b) FT-H1, (c) FT-H2, (d) FT-H3 e (e) FT-H4, respectivamente.



Possivelmente a menor resistência mecânica à compressão das composições com hidrogéis, comparado à amostra FT-a, seja devido à separação dos cristais de hidroxiapatita promovida pela presença de hidrogel polimérico na estrutura compósita.

Existe uma diferença visual no tamanho dos cristais, o que demonstra a influência do polímero utilizado, na precipitação de hidroxiapatita. Este fato pode ter ocasionado a redução da resistência mecânica da amostra FT-H4. Seriam necessários estudos mais amplos para se entender melhor esse processo e sua influência sobre a resistência mecânica do cimento.

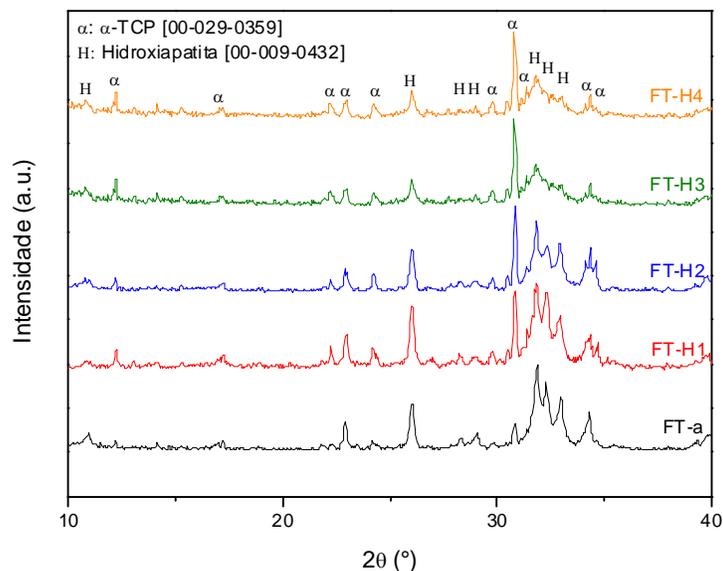
#### 5.3.1.4 Difração de raios X (DRX)

A Figura 5.18 mostra os padrões de difração de raios X obtidos a partir de amostras que foram imersas em SBF e submetidas aos ensaios de resistência mecânica, após moagem. As amostras apresentaram em sua composição alfa-fosfato tricálcico e hidroxiapatita.

Os difratogramas mostram que a presença e o tipo de hidrogel empregado, influenciam no produto final, após imersão em SBF. Os picos identificados nos difratogramas da Fig. 5.18 correspondem ao padrão de difração do alfa-TCP (ICDD 00-029-0359) e da hidroxiapatita (ICDD 00-009-0432). Os resultados mostram que todas as amostras apresentaram a formação de hidroxiapatita após imersão em SBF, mas nem todo alfa-TCP foi convertido em hidroxiapatita, durante os sete dias de imersão, o que

demonstra que o hidrogel dificulta a transformação de do alfa-TCP em hidroxiapatita.

**Figura 5.18.** Padrões de difração de raios X obtidos para amostras após imersão em SBF.



### 5.3.2 Compósitos: Cimento de fosfato de cálcio e hidrogéis da avaliação 2

#### 5.3.2.1 Densidade aparente, porosidade aparente e absorção de água

Na Tabela 5.10, são apresentados os resultados de absorção de água, densidade e porosidade aparente das amostras preparadas com o iniciador AIBN.

**Tabela 5.10.** Porosidade aparente, densidade aparente e absorção de água das amostras preparadas com AIBN.

Amostra	Porosidade aparente (%)	Densidade aparente ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ )	Absorção de água (%)
FT-b	$32,40 \pm 1,18$	$1,80 \pm 0,05$	$17,99 \pm 0,63$
FT-H5	$36,20 \pm 1,46$	$1,79 \pm 0,02$	$20,27 \pm 0,95$
FT-H6	$33,50 \pm 1,32$	$1,82 \pm 0,04$	$18,38 \pm 1,06$
FT-H7	$35,83 \pm 0,92$	$1,80 \pm 0,02$	$19,86 \pm 0,61$

Pode-se verificar que a incorporação destas formulações de hidrogel ao alfa-TCP, ocasionou uma absorção de água ligeiramente maior, comparado à amostra sem hidrogel. A formulação FT-H5, assim como o hidrogel H5, apresentou maior absorção de água. Não foi possível polimerizar o hidrogel H6 pelo método proposto e nota-se que para este compósito a absorção de água foi menor.

A partir dos resultados obtidos, pode-se verificar que a presença e o tipo de hidrogel utilizado, influenciam nas propriedades das amostras, porém a presença de hidrogéis não afetou de forma negativa a estrutura física do material, ou seja, o empacotamento das amostras se manteve.

Na Tabela 5.11, são apresentados os resultados de absorção de água, densidade e porosidade aparente das amostras preparadas com o iniciador AP ou HCPK.

**Tabela 5.11.** Porosidade aparente, densidade aparente e absorção de água das amostras preparadas com AP ou HCPK.

Amostra	Porosidade aparente (%)	Densidade aparente (g.cm <sup>-3</sup> )	Absorção de água (%)
FT-c	34,52 ± 0,54	1,70 ± 0,02	20,31 ± 0,51
FT-H8	38,83 ± 1,52	1,41 ± 0,05	27,58 ± 1,53
FT-H9	37,32 ± 0,37	1,43 ± 0,04	26,21 ± 0,92
FT-H10	34,28 ± 0,70	1,56 ± 0,01	21,98 ± 0,55
FT-H11	38,22 ± 1,42	1,42 ± 0,05	27,07 ± 1,87
FT-H12	31,46 ± 2,38	1,69 ± 0,04	18,67 ± 1,91
FT-H13	31,89 ± 1,89	1,56 ± 0,08	20,89 ± 1,63

Assim como nos hidrogéis, os compósitos preparados utilizando apenas NVP como monômero apresentaram maior absorção de água. Em seguida estão os hidrogéis preparados com apenas AAc como monômero e após os copolímeros. Essa tendência não foi observada para os compósitos preparados com HCPK como iniciador, visto o elevado erro nas medições.

As formulações de hidrogéis utilizadas nesta etapa resultaram em maior absorção de água, em relação à amostra sem hidrogel. Possivelmente esses compósitos permitiriam uma melhor adesão de células ao material, quando implantado. Contudo é necessário buscar um equilíbrio entre a estabilidade mecânica e a absorção de água a qual deve ser otimizada em relação a aplicação específica.

### 5.3.2.2 Resistência à compressão de amostras

Os resultados de resistência mecânica determinado para as amostras úmidas, após sete dias de imersão em SBF, são mostrados nas Tabelas 5.12 e 5.13. Os valores de resistência mecânica à compressão dos compósitos variam significativamente considerando o tipo de hidrogel incorporado. A maioria das formulações resultaram em amostras com resistência mecânica menor, comparado às amostras FT-b e FT-c (sem hidrogel).

Para as formulações preparadas com AIBN, o ensaio de resistência mecânica à compressão, mostrou que os compósitos apresentaram resistência mecânica similares

(dentro dos valores do erro medidos), demonstrando que a adição dos hidrogéis não tiveram influência significativa sobre esta propriedade. Não foi possível polimerizar o hidrogel H6 pelo método proposto, assim possivelmente esse fato tenha ocasionado uma redução nas propriedades mecânicas de seu compósito.

**Tabela 5.12.** Resistência mecânica à compressão das amostras úmidas, preparadas com AIBN.

<b>Amostra</b>	<b>Resistência mecânica (MPa)</b>
FT-b	50,59 ± 12,20
FT-H5	46,88 ± 9,75
FT-H6	38,94 ± 4,19
FT-H7	46,71 ± 3,99

Para as formulações preparadas com AP, os compósitos apresentaram redução significativa nos valores de resistência mecânica à compressão, principalmente para as amostras que utilizaram apenas um monômero. A maior resistência mecânica da amostra FT-H10, em relação aos demais preparados com este iniciador, possivelmente está relacionada à menor absorção de água, tanto do hidrogel como do compósito.

Para as formulações preparadas com HCPK a redução na resistência mecânica à compressão foi maior para a amostra que utilizou só NVP como monômero. Sendo esta a amostra de hidrogel que teve maior absorção de água e maior peso médio entre ligações cruzadas. A composição de hidrogel que permitiu manter as propriedades mecânicas do material mais próxima ao cimento sem hidrogel foi a FT-H13.

**Tabela 5.13.** Resistência mecânica à compressão das amostras úmidas, preparadas com AP ou HCPK.

<b>Amostra</b>	<b>Resistência mecânica (MPa)</b>
FT-c	20,57 ± 3,73
FT-H8	1,53 ± 0,97
FT-H9	2,13 ± 0,86
FT-H10	10,22 ± 0,71
FT-H11	1,76 ± 0,50
FT-H12	16,46 ± 3,56
FT-H13	20,55 ± 3,46

Todas as formulações testadas apresentaram valores de resistência mecânica à compressão inferiores aos valores obtidos por Santos (2002). Em seu trabalho realizou modificações na composição de cimento através da adição de um sistema de polimerização *in situ* baseado em acrilamida e em redutor de líquido, poliacrilato de amônia, permitindo a obtenção de um novo tipo de cimento de fosfato de cálcio, o cimento de fosfato de cálcio

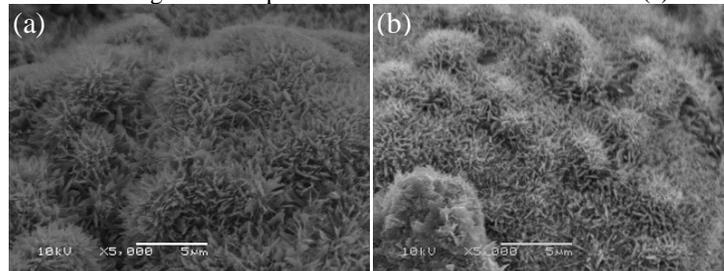
de dupla-pega, alcançando valores de resistência à compressão 149% superiores à composição sem o sistema de polimerização. Em algumas das medições de resistência mecânica à compressão foram obtidos valores de até 68 MPa, valor este extremamente próximo ao limite mínimo exigido em normas internacionais e nacionais para cimento ósseo baseado em polimetilmetacrilato (PMMA), extensamente utilizado em ortopedia, o que demonstra que o uso de redutor de líquido para o sistema dupla pega é de fundamental importância na obtenção de elevados valores de resistência mecânica.

Bigi *et al.* (2004) conseguiram melhorar as propriedades mecânicas de cimentos de fosfato de cálcio através da adição de gelatina (18% de gelatina e 82% de alfa-fosfato tricálcico obtido por reação em estado sólido). Foi possível obter valores de resistência à compressão de até 10,7-14,0 MPa para os cimentos com gelatina, enquanto que as amostras de controle apresentam 2,5-2,8 MPa.

### 5.3.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Figura 5.19 apresenta as micrografias da superfície de fratura das amostras FT-b e FT-c, após permanecerem em SBF, por sete dias.

**Figura 5.19.** Micrografia da superfície de fratura das amostras FT-b (a) e FT-c (b).

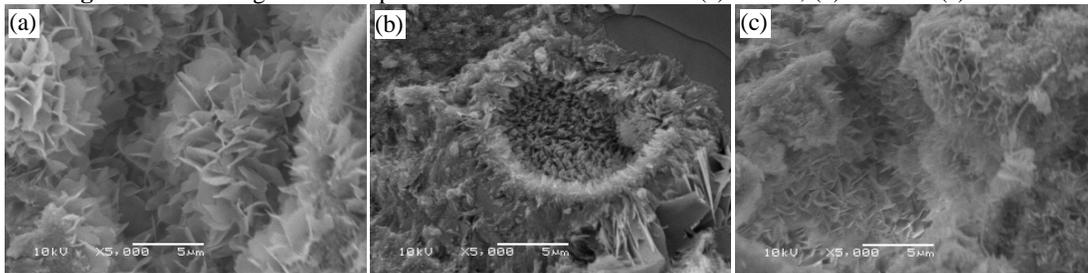


Pode ser observada a formação de agulhas hidroxiapatita na amostra. Possivelmente a presença dos cristais de hidroxiapatita tenha contribuído para o aumento da resistência mecânica de amostra, tanto nas amostras FT-b e FT-c, como também na amostra FT-H13 (Fig. 5.22).

A Figura 5.20 apresenta as micrografias da superfície de fratura das amostras preparadas com AIBN, após permanecerem em SBF, por sete dias. Pelas micrografias pode-se observar a presença de cristais de hidroxiapatita nas três amostras. A presença dos cristais de hidroxiapatita parece ter contribuído para o aumento da resistência mecânica de amostra, tanto na amostra FT-b, como também nos compósitos. Possivelmente a redução na resistência mecânica à compressão dos compósitos se deve à separação dos cristais de

hidroxiapatita, ocasionada pela presença do hidrogel.

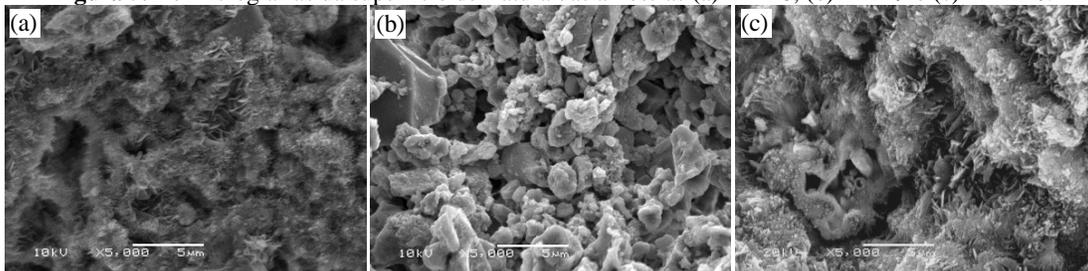
**Figura 5.20.** Micrografias da superfície de fratura das amostras (a) FT-H5, (b) FT-H6 e (c) FT-H7.



A reação de pega começa com a dissolução das partículas de  $\alpha$ -TCP na fase líquida do cimento. A fase líquida passa a receber íons Ca e P até se tornar sobresaturada nestes íons precipitando assim a fase mais estável, CDHA, sobre a superfície das partículas de  $\alpha$ -TCP, por ser o local de maior concentração de íons e também o de menor energia superficial. As partículas de  $\alpha$ -TCP continuam a solubilizar, entretanto os íons têm agora de vencer a barreira de CDHA precipitada, que se torna mais espessa à medida que a reação de pega evolui. No final da reação, quando praticamente todo  $\alpha$ -TCP foi consumido, haverá uma casca de hidroxiapatita (CDHA) com um vazio em seu interior no local onde originalmente se encontrava a partícula de  $\alpha$ -TCP totalmente solubilizada (HADLEY *et al.*, 2000). Essa estrutura é conhecida como grãos de Hadley e pode ser observada na amostra FT-H6. A presença de grão de Hadley tem influência negativa sobre as propriedades mecânicas dos cimentos ósseos, o que pode ser verificado na Tabela 5.12.

A Figura 5.21 apresenta as micrografias da superfície de fratura das amostras preparadas com persulfato de amônio (AP), após permanecerem em SBF, por sete dias.

**Figura 5.21.** Micrografias da superfície de fratura das amostras (a) FT-H8, (b) FT-H9 e (c) FT-H10.

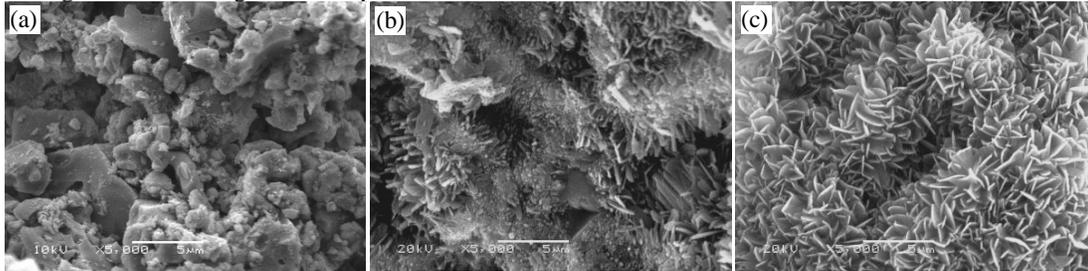


Pelas micrografias da superfície de fratura das amostras, pode-se observar que para a amostra FT-H9 praticamente não houve a formação de hidroxiapatita. Essa formação está

mais evidenciada para a amostra FT-H8 e FT-H10.

A Figura 5.22 apresenta as micrografias da superfície de fratura das amostras preparadas com 1-hidroxiciclohexil fenil cetona (HCPK), após permanecerem em SBF por sete dias.

**Figura 5.22.** Micrografias da superfície de fratura das amostras (a) FT-H11, (b) FT-H12 e (c) FT-H13.



A amostra FT-H11 praticamente não apresentou cristas de hidroxiapatita, sendo estes mais evidentes nas amostras FT-H12 e FT-H13.

A adição dos hidrogéis H5, H6, H7, H12 e H13, não interferiu no produto final da reação, ou seja, formação de hidroxiapatita deficiente em cálcio. A formação de cristais de CDHA na forma petalóide, que formam uma rede cristalina interligada, pode ser observada. Este emaranhamento cristalino é responsável pela resistência mecânica do cimento. Estruturas semelhantes foram descritos para cimentos de alfa-TCP (GINEBRA *et al.* 1995b).

A influência de matrizes poliméricas sobre a nucleação e a mineralização de HA tem sido objeto de investigações. Está bem estabelecido que os grupos carregados negativamente, tais como o grupo carboxila atraem íons  $\text{Ca}^{2+}$ , direcionando a nucleação e crescimento dos cristais de HA (HUNTER & GOLDBERG, 1994; SONG *et al.*, 2005; DU *et al.*, 2005). Hidrogéis contendo cargas positivas exibem efeito semelhante, atraindo ânions como o carbonato e fosfato (SHI *et al.*, 2008). A partir da perspectiva de solução química, fosfatos de cálcio são praticamente insolúveis em água e quimicamente inerte sobre uma ampla gama de condições. Estas características permitem a sua inclusão dentro de matrizes comuns de hidrogéis, evitando o rompimento da rede de polímero (D'ESTE & EGLIN, 2013).

## 5.4 Estudo da bioatividade, degradação e citotoxicidade do cimento de fosfato de cálcio

Este estudo foi realizado com o cimento de fosfato de cálcio (FT-15-00).

### 5.4.1 Tempo de pega das amostras

O tempo de pega, determinado pelo método das agulhas de Gillmore, para as amostras preparadas com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2,5% e 5,0% está apresentado na Tabela 5.14.

**Tabela 5.14.** Influência da concentração da solução de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , no tempo de pega dos cimentos.

Concentração de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	Tempo de pega inicial (min)	Tempo de pega final (min)
2,5%	$21 \pm 1$	$30 \pm 1$
5,0%	$16 \pm 1$	$20 \pm 1$

O tempo durante o qual a pasta de cimento se comporta eminentemente em forma tixotrópica, denominado tempo de pega, está estritamente relacionado ao tempo de trabalho, isto é, ao tempo disponível para se preparar e fazer a colocação definitiva do cimento. O método utilizado para se medir esse tempo de pega, considerado como o tempo a partir do qual a agulha do aparelho usado não penetra completamente a massa do cimento, é realizado por um aparelho denominado Vicat (NEVILLE, 1997).

O  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e a adição de hidroxiapatita precipitada atuam como aceleradores da reação de pega, sendo utilizados como controladores da reação de transformação do alfa-TCP em CDHA (BERMUDEZ *et al.*, 1994; GINEBRA *et al.*, 1995a). Deve-se levar em consideração que no nosso caso não houve a adição de hidroxiapatita precipitada à composição, cujas similares reportadas na literatura contem 2% em massa (GINEBRA *et al.*, 1995a).

A utilização de acelerador de reação nas composições de cimento de fosfato de cálcio se faz em virtude do elevado tempo de pega das composições de cimento de fosfato de cálcio baseadas no alfa-fosfato tricálcico. Ele atua por meio do favorecimento da solubilização dos cristais de fosfato de cálcio (ISHIKAWA *et al.*, 1994), permitindo a saturação do líquido em Ca e P e a precipitação do composto mais estável, no caso a

CDHA. Isso ocorre, pois na faixa de pH de aproximadamente 4,2 e acima, a hidroxiapatita é o composto de fosfato de cálcio mais estável (menos solúvel) (CHOW *et al.*, 1991). Na ausência de solução acrescidas de acelerador, o alfa-TCP possui pH elevado em água, 9,3, que diminui lentamente para valores próximos a 7,0 (BERMÚDEZ *et al.*, 1994), em função da reação de transformação:  $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$ . Esta redução é gradual e foi relacionada ao processo de hidratação do alfa-TCP (FERNÁNDEZ *et al.*, 1999).

Os valores sugeridos por Driessens *et al.*, 1997, para cimento de fixação de endopróteses são de tempo de pega inicial de não menos que 5 minutos e tempo de pega final de não menos de 15 a 20 minutos. Foi possível alcançar esses valores com ambas as soluções.

O tempo de pega foi influenciado pela concentração do aditivo de pega ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ). A utilização de maior concentração de aditivo resultou na redução do tempo de pega dos cimentos. O resultado obtido com maior concentração de aditivo foi similar ao tempo médio de pega dos cimentos, obtidos por Oda *et al.* (2008) que obteve tempo médio de pega de  $19,4 \pm 0,55$  minutos, utilizando o cimento comercial da marca Biopex®, quando utilizado com o mesmo aditivo de pega (hidrogeno fosfato de sódio).

#### **5.4.2 Bioatividade**

Visando avaliar o comportamento *in vitro* do cimento de fosfato de cálcio obtido por reação via úmida, o material foi imerso em solução de fluido corpóreo simulado por 1, 7, 14, 21 e 28 dias e avaliou-se sua microestrutura e propriedades físico-químicas. A bioatividade das amostras foi avaliada pelos seguintes métodos:

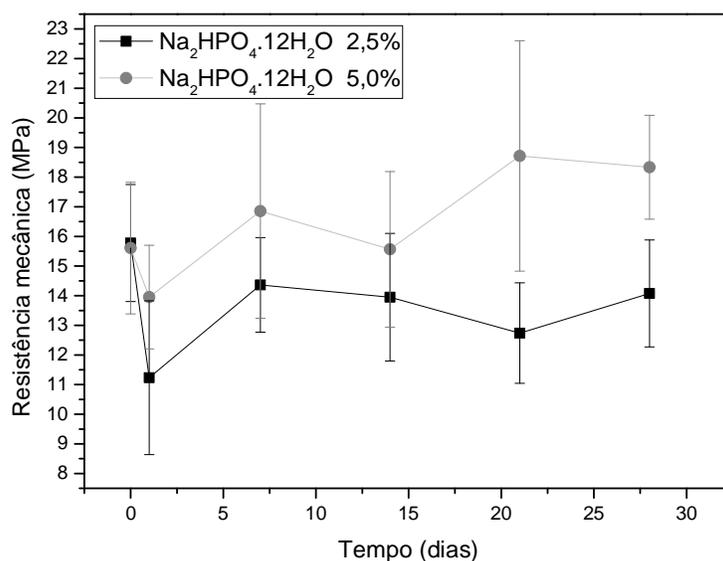
##### **5.4.2.1 Resistência mecânica à compressão**

Após imersão dos corpos de prova em SBF, nos diferentes períodos de tempo, a resistência mecânica à compressão das amostras úmidas foi determinada e está apresentada na Figura 5.23 para as amostras preparadas com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2,5% e com 5,0%.

No primeiro estágio da imersão, após apenas 1 dia, é possível observar uma queda na resistência mecânica à compressão do cimento, para a amostra preparada com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2,5%, de 15,8 MPa para 11,2 MPa, representando uma diminuição de 30% do valor inicial. Para a amostra  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5,0% a queda foi menor, passando

de 15,6 MPa para 14 MPa, representando uma diminuição de 10%. Esta perda inicial da resistência mecânica possivelmente é causada pela solubilização do alfa-TCP, sendo este um processo necessário para a precipitação da HA (CARDENAS *et al.*, 2008). O fosfato tricálcico reage com a água do meio e se transforma em hidroxiapatita. Sabe-se que os precipitados de CDHA na forma de agulhas ou glóbulos são responsáveis pelo aumento das propriedades mecânicas, porém a solubilização do alfa-fosfato tricálcico, ocasiona um aumento da porosidade, o que pode explicar o fato de os cimentos obtidos não terem apresentado melhores valores de resistência mecânica após a imersão em solução de fluido corpóreo simulado, como esperado (VOLKMER, 2011).

**Figura 5.23.** Resistência mecânica à compressão do cimento de fosfato de cálcio.

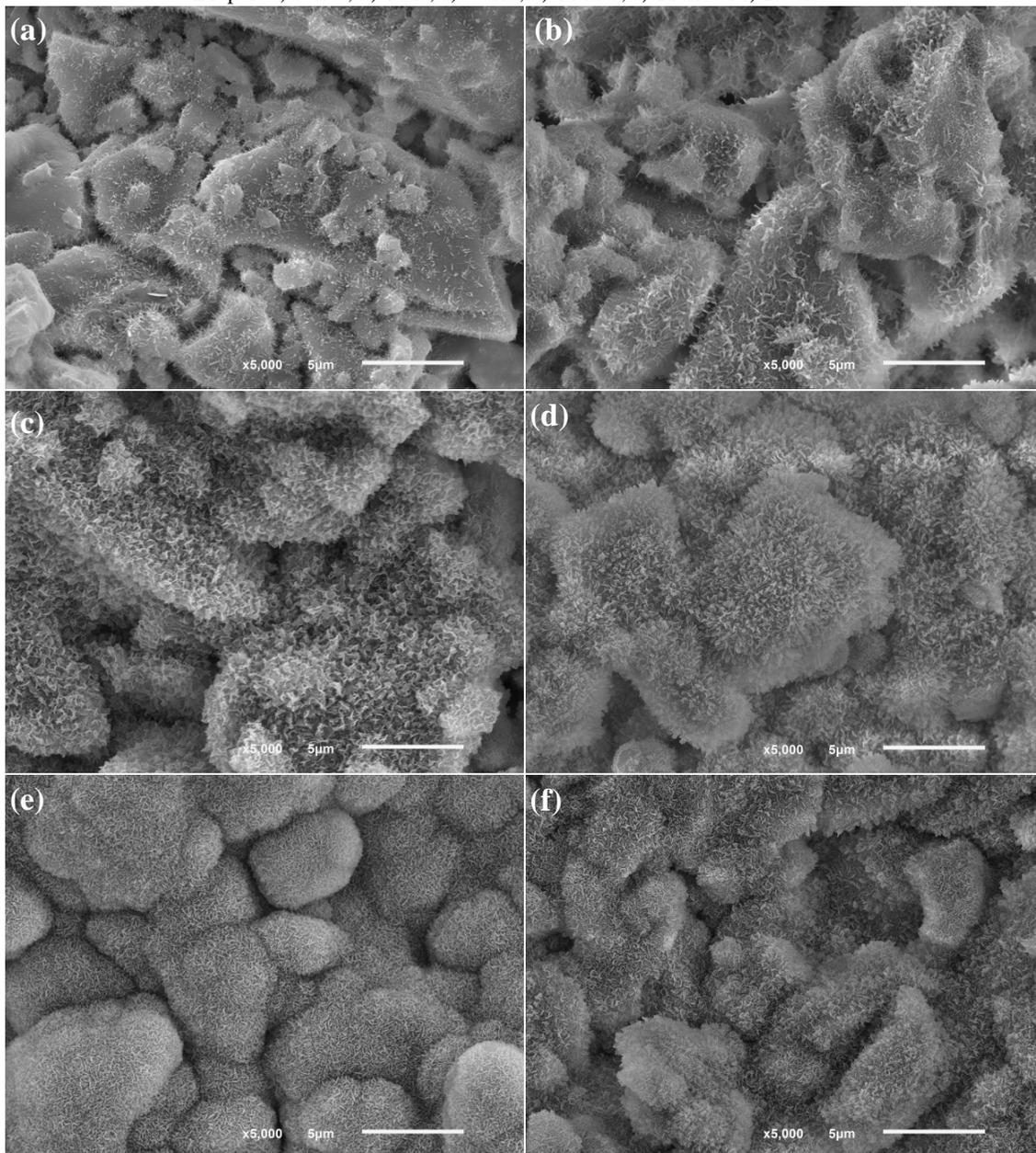


Após 7 dias de imersão, os valores apresentaram pouca variação. Possivelmente com o aumento da quantidade de agulhas de hidroxiapatita precipitadas, há a formação de uma camada e com isso ocorre uma estabilização estatística no valor de resistência mecânica. As amostras preparadas com Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 5,0% apresentaram valores ligeiramente maiores de resistência mecânica, comparada as amostras preparadas com Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 2,5%.

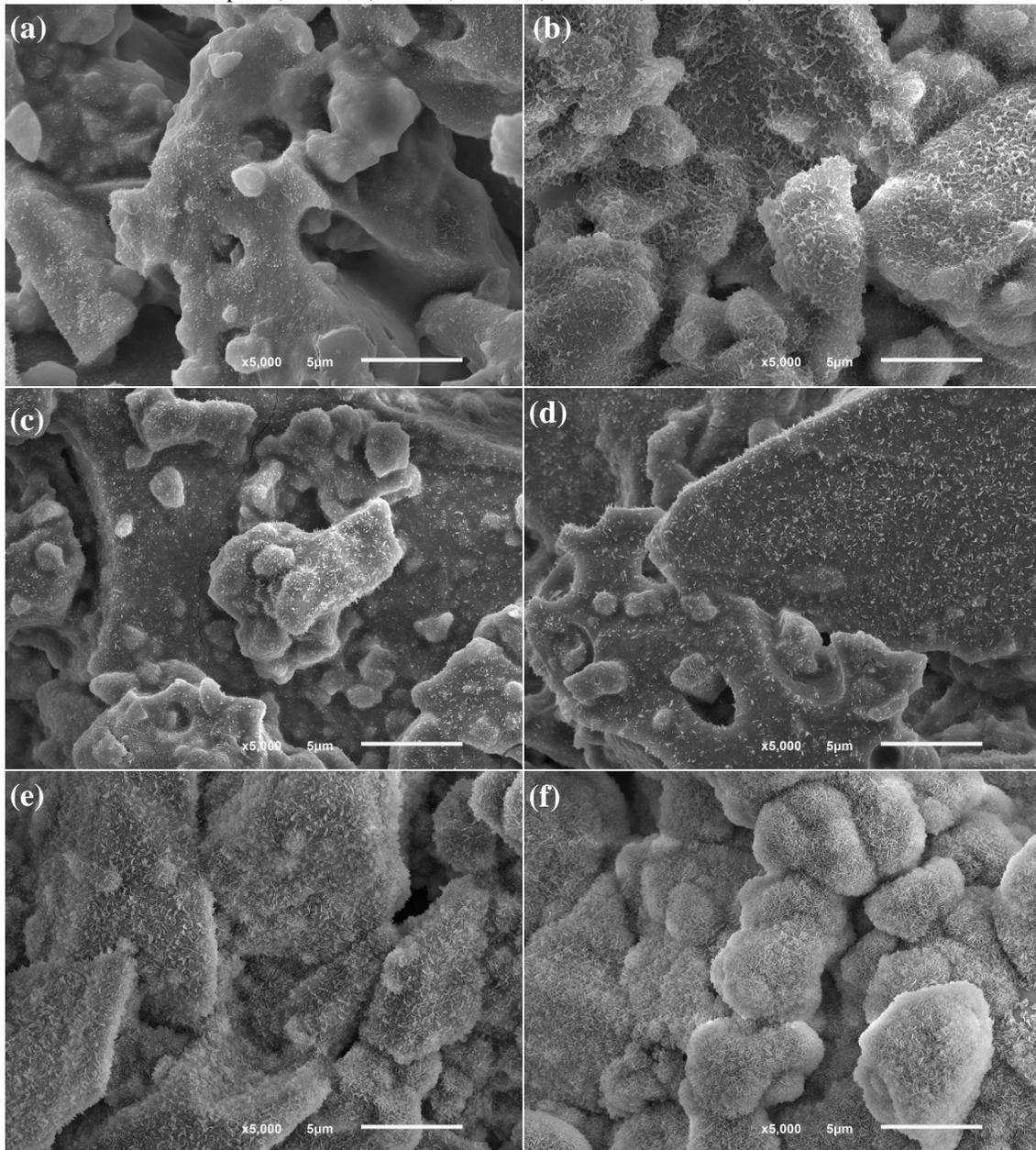
#### 5.4.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia da superfície das amostras preparadas com Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 2,5% e 5,0% estão apresentadas nas Figuras 5.24 e 5.25, respectivamente.

**Figura 5.24.** Micrografias de superfície das amostras preparadas com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2,5% imersas em SBF por: a) 0 dias, b) 1 dia, c) 7 dias, d) 14 dias, e) 21 dias e f) 28 dias.



**Figura 5.25.** Micrografias de superfície das amostras preparadas com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5,0% imersas em SBF por: a) 0 dias, b) 1 dia, c) 7 dias, d) 14 dias, e) 21 dias e f) 28 dias.



As micrografias da superfície dos cimentos reagidos em diferentes condições mostram que, para o material apenas mantido por 24 h a 100% de umidade (0 dias), não se pode observar o aparecimento de estruturas de CDHA, como seria de se esperar devido à reação de pega do cimento. O aparecimento de agulhas ou placas petalóides é característico dos cimentos de fosfato de cálcio baseados no alfa-TCP (GRUNINGER *et al.*, 1984; YU *et al.*, 1992; DRIESSENS *et al.*, 1997). A não observação de agulhas ou placas petalóides na

microestrutura pode ser devido ao tempo insuficiente para a nucleação e crescimento da CDHA, além do tempo e condições insuficientes para a reação total do material. Com maiores tempos de imersão, observa-se facilmente a presença destas microestruturas características do cimento de alfa-fosfato tricálcico reagido. É pelo entrecruzamento destes cristais que ocorre o aumento da resistência mecânica do material (GRUNINGER *et al.*, 1984).

Em relação à concentração do acelerador de pega, pode-se dizer que a utilização de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5,0% retardou e ocasionou a redução da precipitação de agulhas de hidroxiapatita na superfície dos cimentos, comparado aos cimentos que utilização 2,5% do acelerador. Porém não se pode descartar a precipitação de agulhas de hidroxiapatita no interior do material, visto que ocorreu a redução das concentrações de cálcio e fósforo na solução de SBF com o decorrer do tempo, conforme será mostrado a seguir.

No intuito de descobrir maneiras alternativas para testar a bioatividade de um material, não utilizando experimentos em animais, Kokubo propôs em 1991, que o principal requisito para que um material artificial se ligue com o tecido ósseo vivo é a formação de uma camada de hidroxiapatita na sua superfície quando implantado em organismos vivos e, também, propôs que a formação de apatita *in vivo* pode ser reproduzida em uma solução simulada de fluidos corpóreos (SBF) cuja concentração é quase a mesma do sangue humano (KOKUBO, 2006).

Pode-se dizer que um material no qual ocorra a formação de HA em sua superfície, pode se ligar ao tecido ósseo quando implantado. Tal afirmação é amplamente aceita e respaldada pela norma ISO 23317, de 2007 “Implants for surgery — In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials”, que utiliza estes mesmos critérios para considerar um material biocompatível em tecido ósseo.

Assim pode-se afirmar que, devido à maior e mais rápida formação de HA na superfície dos cimentos preparados com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2,5%, estes apresentam maior bioatividade ou facilidade de ligação com o tecido ósseo.

A partir dos dados obtidos por espectroscopia por energia dispersiva (EDS) foi possível avaliar a relação Ca/P na superfície das amostras. A Tabela 5.15 apresenta os resultados encontrados.

A relação Ca/P inicial das amostras é de 1,5, valor igual ao valor teórico do alfa-TCP. Com o decorrer do tempo a relação aumenta um pouco e ocorre a formação de CDHA, a qual apresenta relação Ca/P entre 1,5 e 1,67 (DOROZHKIN, 2009).

**Tabela 5.15.** Porcentagem atômica de cálcio e fósforo na superfície das amostras e relação Ca/P.

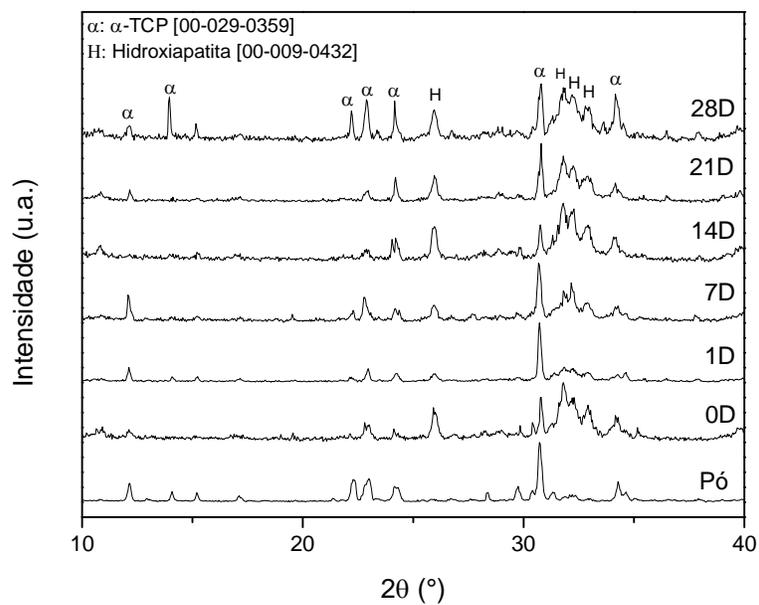
	<b>Tempo de imersão</b>	<b>Ca</b>	<b>P</b>	<b>Relação Ca/P</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O 2,5%	0 dias	17,80	11,90	1,50
	1 dia	17,90	11,70	1,53
	7 dias	16,40	11,00	1,49
	14 dias	18,30	11,80	1,55
	21 dias	17,50	11,40	1,54
	28 dias	16,30	10,50	1,55
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O 5,0%	0 dias	17,90	11,90	1,50
	1 dia	17,50	11,10	1,58
	7 dias	17,60	11,80	1,49
	14 dias	17,00	11,60	1,47
	21 dias	17,30	11,20	1,54
	28 dias	17,80	11,40	1,56

#### 5.4.2.3 Difração de raios X

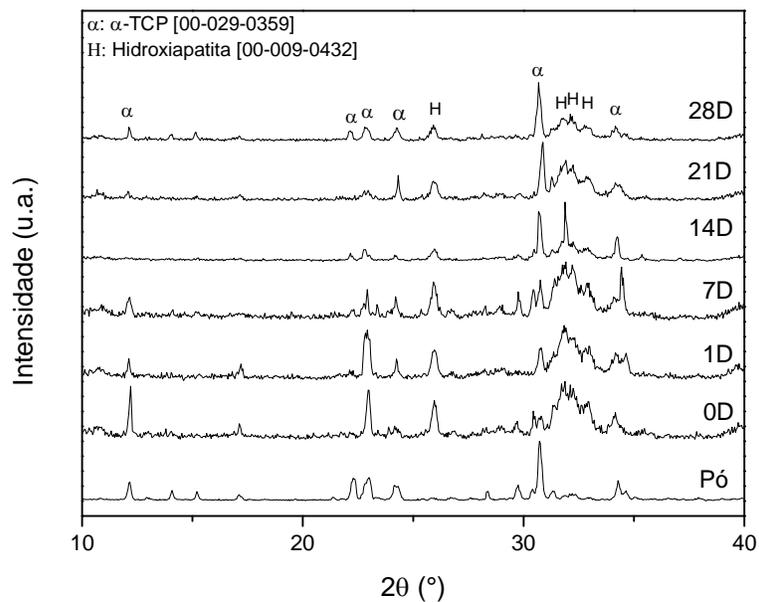
A Figura 5.26 e 5.27 apresentam os difratogramas de raios X, obtidos para as amostras, submetidas a diferentes períodos de imersão em SBF, preparadas com Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 2,5% e 5,0% , respectivamente. As fases identificadas nas amostras foram alfa-TCP e hidroxiapatita, conforme está representado nas Figuras.

Nos difratogramas de ambas as séries de amostras é possível observar, já para as amostras sem imersão em SBF, a formação de uma quantidade de hidroxiapatita. Essa formação inicial se deve à reação do alfa-TCP com o acelerador de pega, conforme descrito anteriormente. Esta alta velocidade de precipitação de hidroxiapatita encontrada no  $\alpha$ -TCP obtido por reação via úmida é consequência de sua elevada pureza e reatividade.

**Figura 5.26.** Padrões de difração de raios X obtidos para amostras preparadas com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2,5% , após imersão em SBF, sendo  $\alpha$ : alfa-TCP e H: hidroxiapatita.



**Figura 5.27.** Padrões de difração de raios X obtidos para amostras preparadas com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5,0% , após imersão em SBF, sendo  $\alpha$ : alfa-TCP e H: hidroxiapatita.

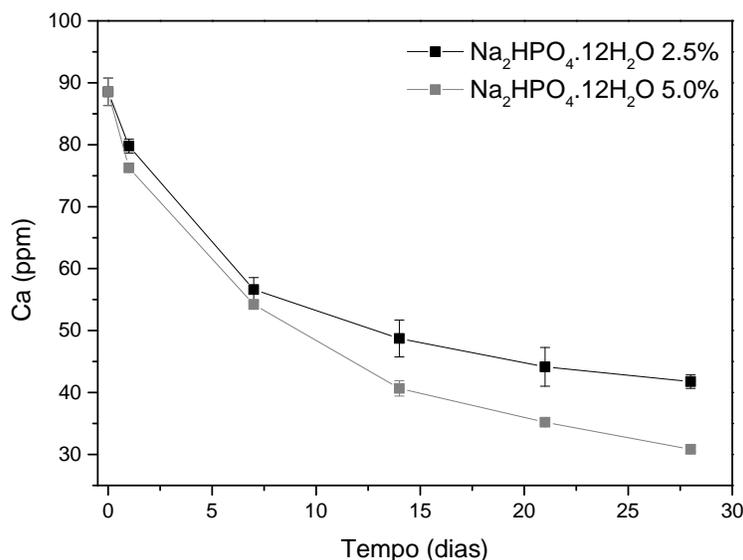


#### 5.4.2.4 Espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES)

As Figuras 5.28 e 5.29 mostram os resultados da análise química elementar de cálcio e fósforo respectivamente, das soluções de SBF que armazenaram as amostras pelos diferentes períodos de tempo.

O cálcio é um dos principais elementos presentes no SBF e em materiais bioativos, cuja participação é bastante efetiva no processo de dissolução/precipitação. A liberação deste íon representa um dos principais fatores responsáveis pela formação da camada biologicamente ativa e estímulo para o crescimento ósseo (HENCH, 1991; STOCH *et al.*, 1999).

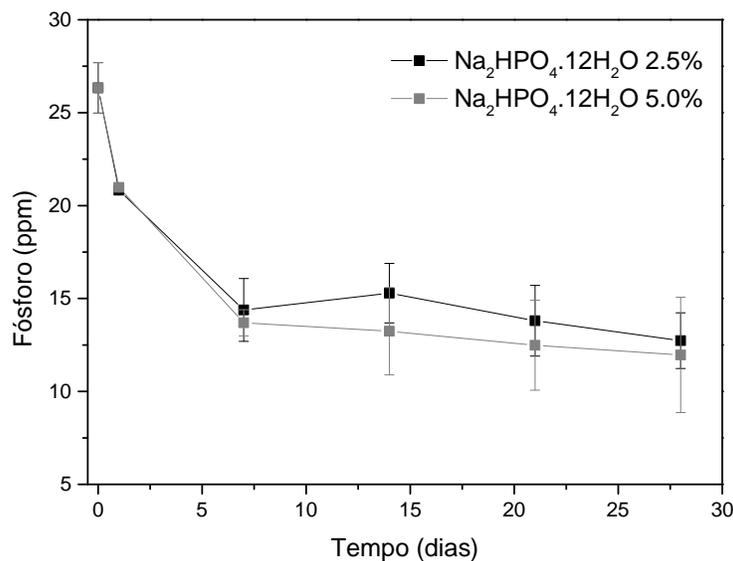
**Figura 5.28.** Concentração de cálcio na solução de SBF contendo as amostras, em função do tempo de imersão.



As soluções salinas de SBF apresentam concentração inicial de cálcio igual a 2,5 mmol.L<sup>-1</sup>, quantidade equivalente a 100 ppm. Já a concentração de HPO<sub>4</sub><sup>-2</sup> no SBF é de 1 mmol.L<sup>-1</sup>, equivalente a 31 ppm de fósforo. O SBF preparado apresentou uma quantidade um pouco menor de cálcio e fósforo na solução de partida, ficando esta em torno de 90 ppm de cálcio e 27 ppm de fósforo. É observada a redução na concentração de cálcio e fósforo nas soluções de SBF, para as composições estudadas. Este comportamento é observado em todos os períodos analisados e indica a precipitação de hidroxiapatita. Assim a taxa de dissolução do alfa-TCP foi menor que a taxa de formação de hidroxiapatita. Estas trocas iônicas entre a solução e as amostras finalizam quando a fonte de íons fósforo no

SBF termine ou, se a difusão dos íons através da interface pare, devido à espessura da camada de Ca-P ter atingido um valor crítico (ALEMANY *et al.*, 2005)

**Figura 5.29.** Concentração de fósforo na solução de SBF contendo as amostras, em função do tempo de imersão.



As solução na qual estavam imersas as amostras preparadas com Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 5,0% apresentaram uma quantidade de cálcio ligeiramente menor que as solução na qual estavam imersas as amostras preparadas com Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 2,5%. Isso indica que houve maior precipitação de hidroxiapatita nas amostras preparadas com Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 5,0%.

Como o alfa-TCP possui relação Ca/P inferior ao da hidroxiapatita (HA), durante a hidrólise pode ocorrer também a formação de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ( $10\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 2\text{H}_3\text{PO}_4$ ), reduzindo o pH para os cimentos sem imersão em SBF (composição 0D), que aumentam conforme a reação de transformação prossegue (composições: 1D e 7D). O aumento do valor de pH, após 7 dias de imersão em SBF ocorre provavelmente devido à reação do H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> com íons cálcio da solução SBF. Ela produz novamente hidroxiapatita, uma vez que este é o composto de fosfato de cálcio menos solúvel para pH ≥ 4,2 (CHOW, 1991), e estabiliza o pH em patamar próximo de 6,8. Entretanto, o valor de pH não permite concluir alguma reação deletéria quando da implantação do material *in vivo*, uma vez que, além de o pH estar próximo ao fisiológico,

os fluidos extracelulares possuem características de tamponamento, impedindo uma reação inflamatória e de corpo estranho mais acentuada (SANTOS, 2002).

O pH do cimento é o principal fator controlador das concentrações de Ca e P na solução de cimento, afetando as taxas da reação de pega. Os principais parâmetros que afetam a variação de pH durante a pega do cimento incluem: a composição química dos principais componentes do cimento, a proporção dos reagentes na mistura, o tamanho relativo de partículas dos componentes principais do cimento, o tamanho de partículas do material usado como semente de cristalização, o uso de aceleradores ou retardadores na fase líquida e sua concentração relativa, a razão líquido/pó e a temperatura (FERNÁNDEZ *et al.*, 1999).

### 5.4.3 Degradação

Poucos estudos têm sido realizados para avaliar o comportamento de degradação *in vitro*. Embora existam diferenças óbvias entre o complexo meio fisiológico dinâmico e o ambiente menos complexo *in vitro*, os sistemas *in vitro* permitem testar variáveis de forma independente. Constantz *et al.* (1998) relataram a utilização de diferentes meios de teste, no entanto, resultados apenas em tampão fosfato salino (PBS) foram apresentados. Os autores observaram que a hidrólise procedeu a partir da superfície das amostras de cimentos de fosfato de cálcio.

Rodrigues (2012) avaliou a degradação de pastilhas de nanopartículas cerâmicas (HA/beta-TCP) preparadas com a adição de agente porogênico e sinterização a 1330°C, utilizando solução tampão de fosfato (tampão de Sörensen) que consiste de dihidrogeno fosfato de potássio e hidrogeno fosfato dissódico em água estéril bidestilada. O autor verificou que não houve degradação da amostra, o pH da solução se manteve entre 7,2 e 7,6 e houve o aumento de massa da amostra, o qual foi justificado por três possíveis fatores: i) não degradação das amostras; ii) Mudança na morfologia da superfície por causa do contato do alfa-TCP com o meio; iii) Possível deposição de minerais na superfície modificada.

A degradação das amostras foi avaliada pelos seguintes métodos:

#### 5.4.3.1 Absorção de água e perda de massa

A Tabela 5.16 apresenta os resultados de absorção de água e perda de massa das amostras, com o decorrer do tempo.

**Tabela 5.16.** Absorção de água e perda de massa das amostras imersas em PBS.

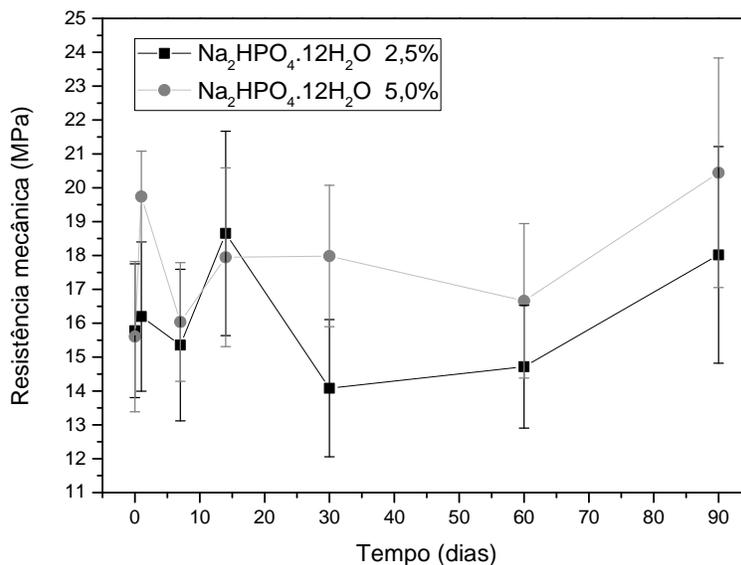
	Tempo de imersão	Absorção de água (%)	Perda de massa (%)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O 2,5%	3 dias	27,82 ± 1,64	1,13 ± 0,38
	7 dia	27,45 ± 4,08	0,70 ± 0,27
	14 dias	27,88 ± 2,85	0,84 ± 0,16
	30 dias	28,55 ± 3,13	0,33 ± 0,10
	60 dias	27,22 ± 0,50	0,42 ± 0,13
	90 dias	26,51 ± 0,46	0,03 ± 0,01
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O 5,0%	3 dias	25,91 ± 1,81	1,00 ± 0,29
	7 dia	25,78 ± 0,87	0,65 ± 0,11
	14 dias	26,86 ± 2,22	0,86 ± 0,22
	30 dias	26,84 ± 4,12	0,25 ± 0,13
	60 dias	26,66 ± 0,78	0,07 ± 0,03
	90 dias	26,19 ± 2,75	0,04 ± 0,01

Pode-se observar que a absorção de água ficou estável durante os períodos avaliados, indicando que a absorção máxima de água foi alcançada nos 3 primeiros dias de análise. As amostras preparadas com Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 2,5% apresentaram absorção de água ligeiramente maior do que as amostras preparadas com Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 5,0%.

A maior perda de massa foi observada nos três primeiros dias, ocasionada pela dissolução do alfa-TCP. Após esse período aparentemente ocorreu a precipitação dos íons da solução, ocasionando a redução na perda de massa. Possivelmente a perda de massa tenha sido mais acentuada para períodos inferiores a três dias e o processo de precipitação já tenha sido iniciado anteriormente. O tampão fosfato salino, PBS (Phosphate Buffered Saline), tem sido amplamente utilizado na avaliação da degradação de compostos, porém aparentemente não é o meio mais indicado para cimentos de fosfato de cálcio, visto que houve a precipitação dos íons em solução, ocasionando a formação de outros compostos.

#### 5.4.3.2 Resistência mecânica à compressão

A resistência mecânica das amostras do ensaio de degradação está apresentado na Figura 5.30 para as amostras preparadas com Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 2,5% e com 5,0%.

**Figura 5.30.** Resistência mecânica das amostras imersas em PBS.

Pode-se observar um ligeiro aumento na resistência mecânica à compressão das amostras preparadas, já no terceiro dia de imersão. Indicando que já houve a formação de novos compostos durante este período. Contudo não houve variação significativa nas propriedades mecânicas das amostras.

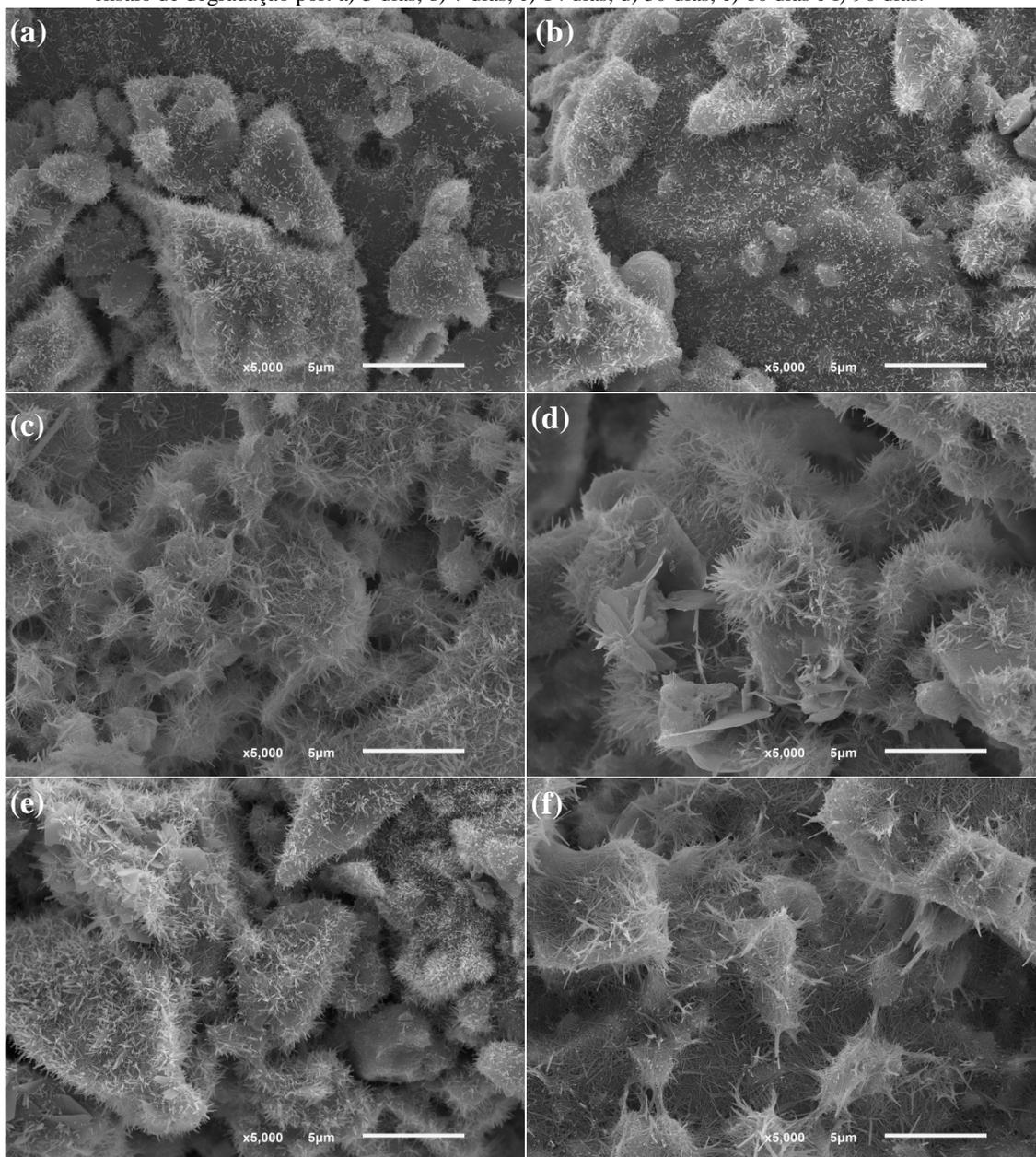
#### 5.4.3.3 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia das amostras submetidas ao ensaio de degradação estão apresentadas nas Figuras 5.31 e 5.32.

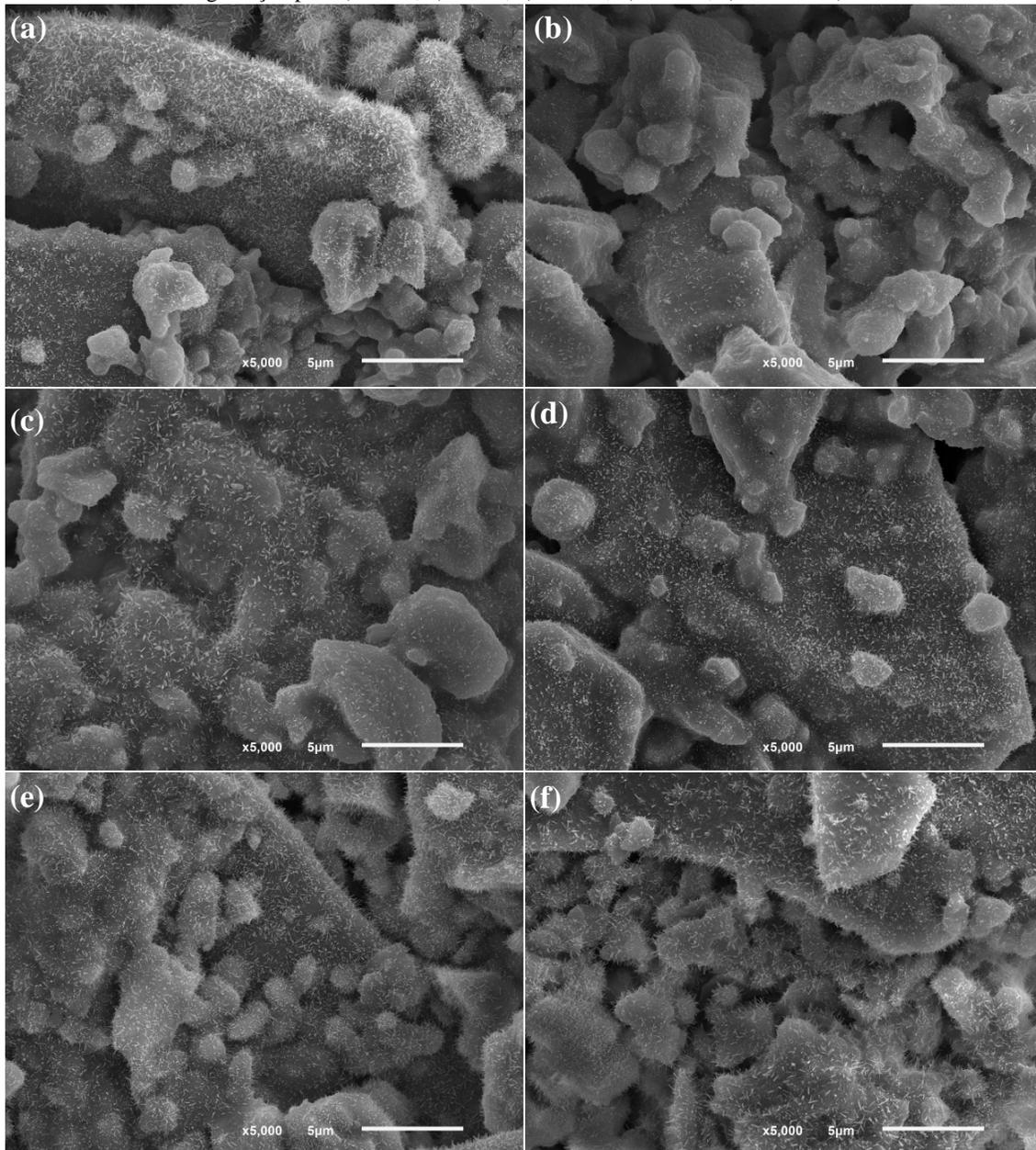
Assim como para as amostras imersas em SBF, pode-se notar que as amostras preparadas com Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 5,0% apresentaram menor formação de precipitados na superfície.

Na superfície das amostras preparadas com Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 2,5% pode-se notar mais claramente a formação de uma estrutura diferente à obtida pela imersão das amostras em SBF, com finas agulhas de hidroxiapatita. Contudo pode ter ocorrido a formação de outro composto visto a disponibilidade de fósforo e o aumento de cálcio no meio, conforme será discutido a seguir.

**Figura 5.31.** Morfologia da superfície das amostras preparadas com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2,5%, submetidas ao ensaio de degradação por: a) 3 dias, b) 7 dias, c) 14 dias, d) 30 dias, e) 60 dias e f) 90 dias.



**Figura 5.32.** Morfologia da superfície das amostras preparadas com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5,0%, submetidas ao ensaio de degradação por: a) 3 dias, b) 7 dias, c) 14 dias, d) 30 dias, e) 60 dias e f) 90 dias.

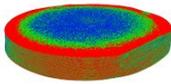
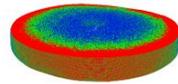
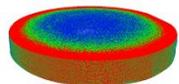
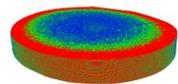
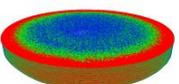
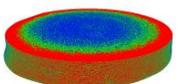
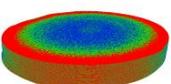


#### 5.4.3.4 Microtomografia de raios X (micro-CT)

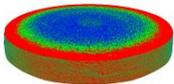
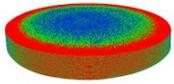
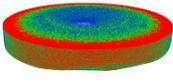
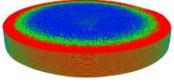
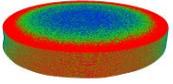
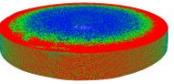
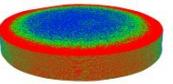
As Tabelas 5.17 e 5.18 apresentam as microtomografias das amostras antes e após o ensaio de degradação, avaliada por microtomografia de raios X. Foi utilizado *threshold* de 2 a 255, sendo que, para distinguir as regiões de menor densidade das regiões de maior densidade, foi adotado *threshold* de 2 a 86 cor azul, de 86 a 170 cor verde e de 170 a 255 cor vermelha.

Pela análise das microtomografias é possível observar baixa porosidade das amostras, bem como a presença de uma camada densa nas extremidades das mesmas, com uma quantidade maior de poros no centro das amostras. Esta diferença na distribuição de poros em diferentes regiões da amostra, que se deve ao processo de compactação, interfere na resistência mecânica, além de dificultar o fluxo do sangue e a distribuição de proteínas, durante a recuperação do tecido ósseo danificado (RODRIGUES, 2012).

**Tabela 5.17.** Microtomografia das amostras preparadas com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2,5%, submetidas ao ensaio de degradação.

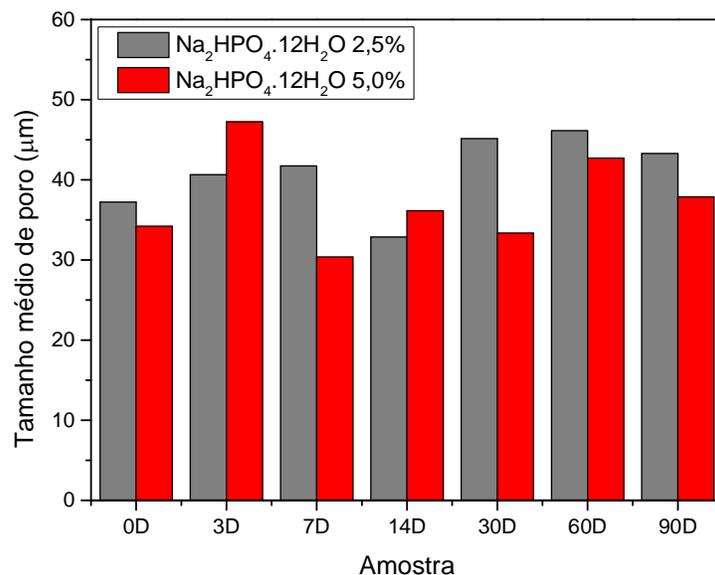
	Tempo de imersão	Estrutura	Tempo de imersão	Estrutura
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,5%	0 dias		30 dias	
	3 dias		60 dias	
	7 dias		90 dias	
	14 dias			

**Tabela 5.18.** Microtomografia das amostras preparadas com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5,0%, submetidas ao ensaio de degradação.

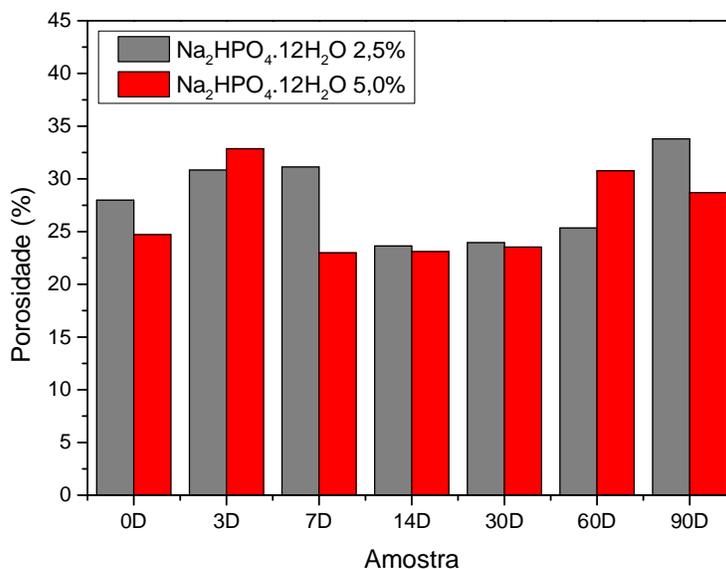
	Tempo de imersão	Estrutura	Tempo de imersão	Estrutura
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5,0%,	0 dias		30 dias	
	3 dias		60 dias	
	7 dias		90 dias	
	14 dias			

Com a análise de microtomografia de raios X, foi possível avaliar o tamanho médio dos poros, a porosidade e a interconectividade das amostras submetidas ao ensaio de degradação, com resolução de 4 micrômetros. As Figuras 5.33 e 5.34 apresentam os resultados obtidos de tamanho médio de poro e porosidade, respectivamente.

**Figura 5.33.** Tamanho médio de poro das amostras submetidas ao ensaio de degradação.



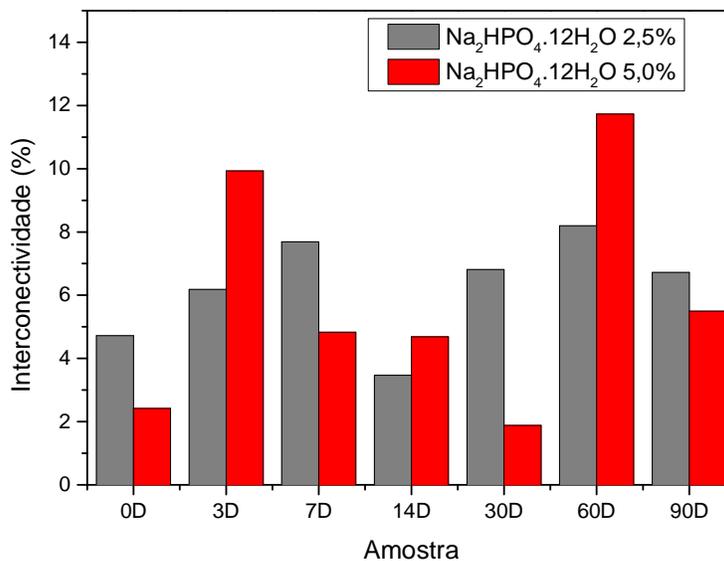
**Figura 5.34.** Porosidade das amostras submetidas ao ensaio de degradação.



O tamanho médio de poro e a porosidade são ligeiramente maiores para as amostras imersas em PBS por três dias, comparado às amostras que não foram imersas. Isso se deve à dissolução do alfa-TCP. A seguir os valores oscilam devido aos processos de dissolução e precipitação dos íons em solução. O mesmo acontece para a interconectividade dos

poros, mostrada na Figura 5.35.

**Figura 5.35.** Interconectividade dos poros.

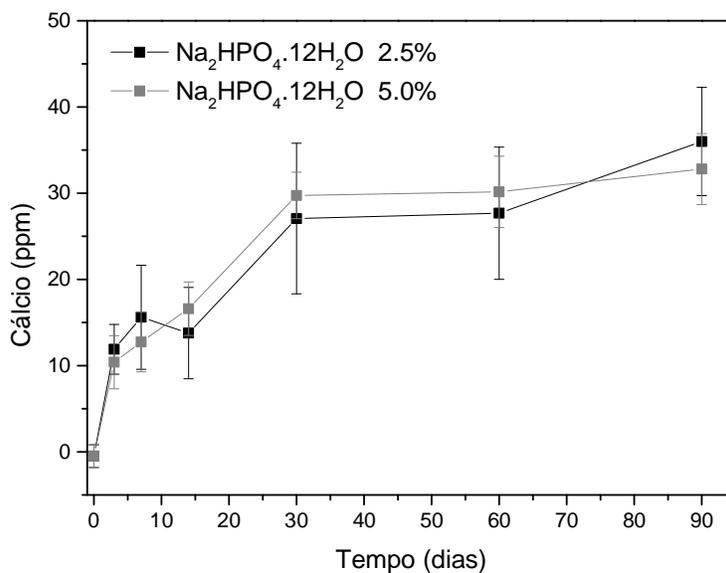


Como descrito anteriormente, o tecido responde de forma diferente em relação ao diâmetro do poro do material. A interconectividade exposta na Figura 5.35 se refere a poros com diâmetro maior que  $50 \mu\text{m}$ , os quais permitiriam a penetração de tecido fibroso que contribuiria para a fixação mecânica do implante. Para promover o crescimento e a regeneração óssea o diâmetro deve ser maior que  $100 \mu\text{m}$  (KARAGEORGIU & KAPLAN, 2005; WHANG *et al.*, 1999). A maior interconectividade, em torno de 12%, foi encontrada para a amostra preparada com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5,0%, imersa em PBS por 60 dias.

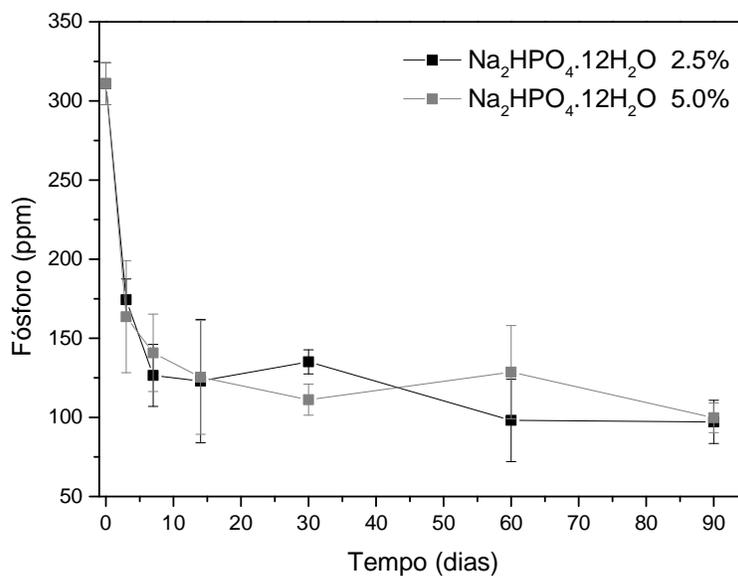
#### 5.4.3.5 Espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES)

As Figuras 5.36 e 5.37 mostram os resultados da análise química elementar de cálcio e fósforo respectivamente, das soluções de PBS que armazenaram as amostras pelos diferentes períodos de tempo.

**Figura 5.36.** Concentração de cálcio na solução de PBS contendo as amostras, em função do tempo de imersão.



**Figura 5.37.** Concentração de fósforo na solução de PBS contendo as amostras, em função do tempo de imersão.



O PBS é um tampão contendo fosfato, cloreto de potássio e cloreto de sódio. Assim, inicialmente a composição é isenta de cálcio, como também é observado na Figura 5.36. A concentração de cálcio aumenta gradativamente em solução, devido à dissolução

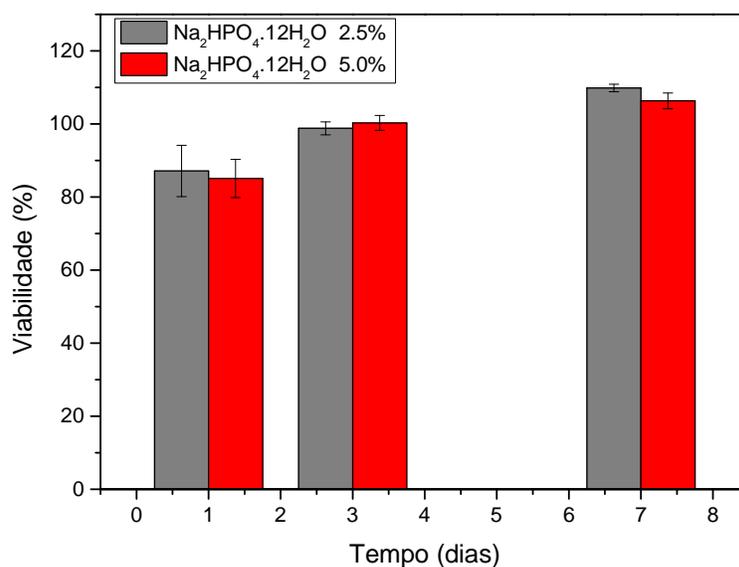
do alfa-TCP. Por outro lado, o teor de fósforo, que inicialmente estava em torno de 320 ppm, diminui gradativamente. Com a dissolução de íons cálcio para a solução e a disponibilidade de fósforo, ocorreu a precipitação destes íons. Essa precipitação possivelmente gerou a formação de compostos com menor relação Ca/P, visto a disponibilidade de cálcio no meio. Dessa forma pode ter ocorrido a precipitação de compostos com DCPD ou OCP que apresentam relação Ca/P igual a 1,0.

#### 5.4.4 Citotoxicidade

##### 5.4.4.1 Teste MTS

O ensaio de citotoxicidade foi avaliado através da colocação das amostras sobre as células previamente cultivadas no fundo do poço por 24 horas. A viabilidade celular, após diferentes períodos de cultura, foi determinada através do teste MTS. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 5.38.

**Figura 5.38.** Atividade metabólica (viabilidade) das células L929 cultivadas em contato direto com as amostras, durante diferentes tempos de cultivo.



Através dos resultados pode-se dizer que o metabolismo celular foi mantido ao longo do tempo. Segundo a ISO 10993-5 uma redução da viabilidade das células maior do que 30% é considerado com efeito citotóxico. Ambas as amostras apresentaram viabilidade

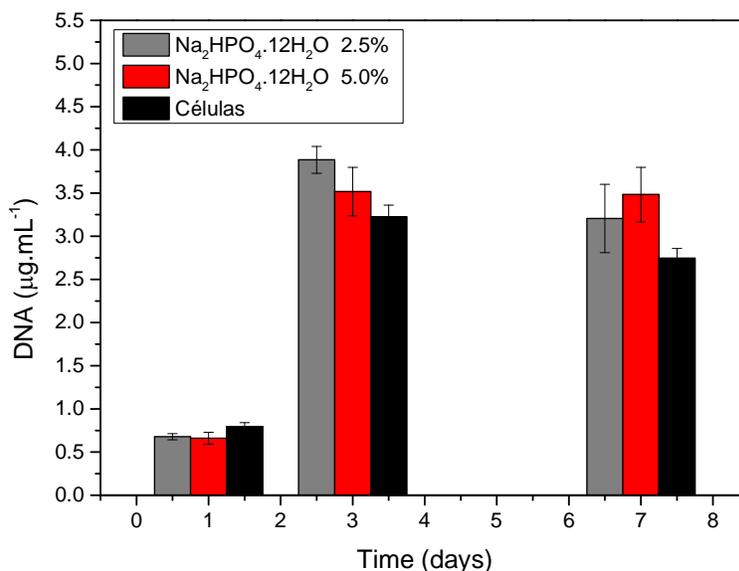
celular acima de 80% para os diferentes períodos de tempo. Assim, os resultados mostraram que as amostras não apresentam efeito citotóxico sobre as células L929.

Os resultados são apresentados em porcentagem relativa de viabilidade, em comparação com o controle negativo, ou seja, sem amostra, que representa 100% de viabilidade celular.

#### 5.4.4.2 *Quantificação de DNA*

A proliferação, determinada através da quantificação de DNA, está apresentada na Figura 5.39.

**Figura 5.39.** Quantificação da taxa de proliferação das células L929 cultivadas em contato direto com as amostras, após diferentes períodos de cultivo.



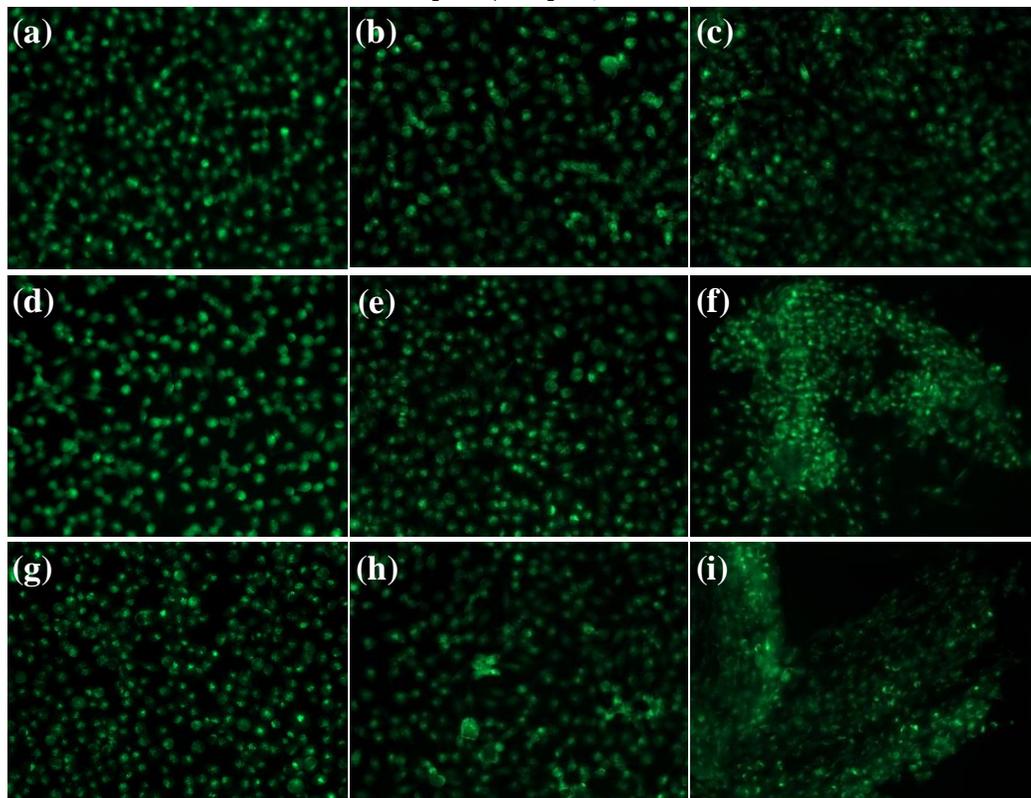
Pode-se verificar que houve um nível de proliferação das células, que ficaram em contato com as amostras, igual ou superior ao apresentado pelo controle negativo.

A análise dos valores de DNA mostra uma melhoria significativa comparativamente aos tempos iniciais. O número de células aumentou e, portanto, uma elevada proliferação celular ocorreu. A análise bioquímica de DNA foi confirmada pelo ensaio de MTS (Figura 5.38) mostrando que as células não apenas proliferaram bem nas amostras, mas também permanecem viáveis. Estes resultados mostram que as amostras são adequadas para a proliferação celular.

#### 5.4.4.3 Distribuição espacial

A distribuição espacial das células viáveis está apresentada na Figura 5.40, onde foi observada as células, após a remoção das amostras, através de um microscópio óptico de luz transmitida, após coloração com calcein-AM/DAPI.

**Figura 5.40.** Disposição espacial das células L929 após diferentes períodos de cultivo, sendo a) 1 dia, b) 3 dias, c) 7 dias do controle (células), d) 1 dia, e) 3 dias, f) 7 dias submetidas às amostras preparadas com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2,5% e g) 1 dia, h) 3 dias e i) 7 dias submetidas às amostras preparadas com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5,0% .



Pelas imagens é possível observar que existe uma distribuição homogênea das células em função dos diferentes períodos de cultivo, em ambas as amostras.

#### 5.4.5 Adesão e proliferação de células

A medicina regenerativa com a utilização de células estaminais é um campo em rápida expansão no tratamento de defeitos ósseos. Células-tronco mesenquimais (MSC) facilitam a cicatrização de defeitos ósseos (HERNIGOU *et al.*, 2005).

Cerâmicas de fosfato de cálcio permitem que a adesão e crescimento de MSC's e osteoblastos (KASTEN *et al.*, 2008). Fatores críticos que podem determinar o sucesso de

um MSC/biomaterial para osteogênese incluem: a adesão inicial de MSC's; a sobrevivência das MSC's no biomaterial; a proliferação de células após a sua colocação; e a extensão de diferenciação osteogénica (KASTEN *et al.*, 2008).

MSC's derivadas de medula óssea ou de outras fontes são capazes de se expandirem num estado indiferenciado, e, em seguida, de se diferenciarem em osteoblastos e outras células do tecido conjuntivo, em meios adequados (PITTINGER *et al.*, 1999; BIANCO *et al.*, 2001).

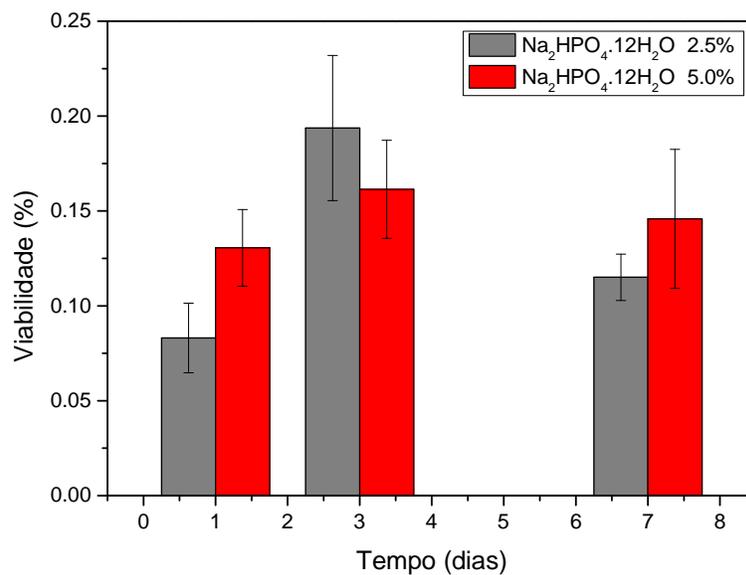
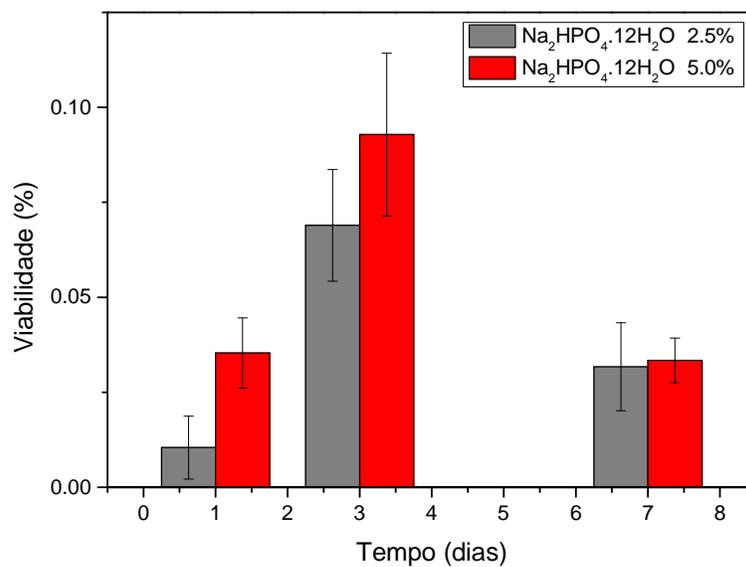
A linhagem celular de osteoblastos SAOS-2, derivada de osteossarcoma humano, é amplamente utilizado em estudos sobre a diferenciação das células ósseas, a proliferação e o metabolismo e é conhecida como sendo capaz de produção de osso (ANDERSON *et al.*, 1995; HUNT *et al.*, 1996).

O ensaio de adesão e proliferação foi realizado com células-tronco mesenquimais derivada de medula óssea humana (MSC's) e com uma linhagem celular de osteoblastos humanos (SAOS-2). O meio de cultura não foi trocado durante os sete dias de ensaio o que pode ter prejudicado os ensaios, devido à falta de nutrientes para as células, principalmente para o tempo de sete dias de ensaio. Mesmo assim ensaios realizados com elevados tempos de cultivo sem a troca do meio de cultivo também servem para observar se o material esta liberando ou não algum exudato tóxico que possa estar influenciando na viabilidade das células.

Os testes de MTS, quantificação de DNA e fosfatase alcalina são realizados a partir do meio de cultura celular residual resultante da cultura de uma suspensão de células semeadas diretamente na superfície das amostras. O plaqueamento das células diretamente na superfície das amostras gerou valores mais baixos, comparado ao ensaio de citotoxicidade (contato direto), porém estes ensaios fornecerem dados importantes sobre o comportamento das células.

#### 5.4.5.1 Teste MTS

A viabilidade celular, após diferentes períodos de cultura, determinada através do teste MTS, está apresentada na Figura 5.41 e 5.42, para MSC's e SAOS-2, respectivamente.

**Figura 5.41.** Atividade metabólica (viabilidade) das células MSC's, após diferentes períodos de cultivo.**Figura 5.42.** Atividade metabólica (viabilidade) das células SAOS-2, após diferentes períodos de cultivo.

Pelo teste MTS pode-se verificar que houve um acréscimo no número de células metabolicamente ativas até três dias de ensaio. Após esse período a viabilidade reduziu para ambas as amostras. Como exposto anteriormente, esse decréscimo pode ter sido

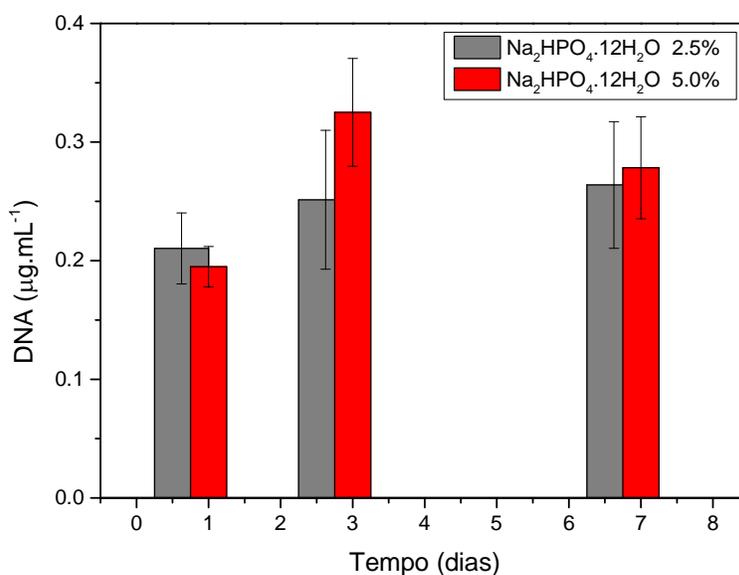
ocasionado pela falta de nutrientes para as células.

#### 5.4.5.2 Quantificação de DNA

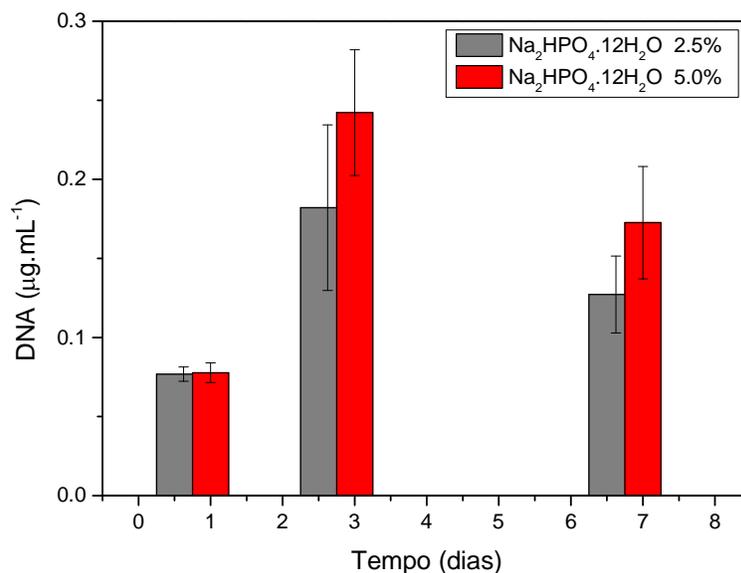
A proliferação, determinada através da quantificação de DNA, está apresentada nas Figuras 5.43 e 5.44 para MSC's e SAOS-2, respectivamente.

A proliferação das células foi mais evidente até três dias de ensaio. Contudo, o alfa-TCP avaliado não influencia negativamente a atividade metabólica de algumas células, tornando-as mais proliferativas. As células MSC's apresentaram maior proliferação do que as células SAOS-2, como também pode ser observado pelas micrografias da superfície das amostras, como mostrado a seguir.

**Figura 5.43.** Quantificação da taxa de proliferação de células MSC's, após diferentes períodos de cultivo.



**Figura 5.44.** Quantificação da taxa de proliferação de células SAOS-2, após diferentes períodos de cultivo.



#### 5.4.5.3 Quantificação de fosfatase alcalina (ALP)

A fosfatase alcalina (FA) é uma fosfohidrolase, isto é, é uma enzima capaz de remover grupos fosfatos de um grande número de moléculas diferentes, incluindo nucleotídeos, proteínas e alcalóides; como o próprio nome sugere, essa enzima é mais ativa em soluções alcalinas. O processo de remoção desses grupos fosfatos é conhecido como defosforilação. A fosfatase alcalina é sintetizada por osteoblastos e condrócitos e está presente no processo de mineralização de ossos e cartilagens. Ela é a enzima envolvida na formação das células ósseas, é o marcador mais amplamente utilizado na estimativa da taxa de formação óssea (STEPAN *et al.*, 1987). A fosfatase alcalina é também um marcador associado com o processo de diferenciação durante o processo de calcificação, visto que esta enzima se faz necessária antes da total mineralização da matriz.

Não foi verificada alteração nas medições de fosfatase alcalina para as amostras, demonstrando assim que não houve um aumento na atividade de formação óssea durante os sete dias de ensaio. Possivelmente a elevação da atividade de ALP não foi observada por não ter sido utilizado um meio de indução osteogênica adequado.

Kasten *et al.* (2008), avaliaram a influência da porosidade (25%, 65% e 75%) de cerâmicas de  $\beta$ -fosfato tricálcico (TCP) sobre a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais (MSC) *in vitro* e *in vivo*. Para a avaliação *in vitro*, scaffolds de TCP com

MSC's foram mantidos em meio de indução osteogênica durante 21 dias. Os autores concluíram que uma maior porosidade dos *scaffolds* de TCP não significa necessariamente uma elevada atividade de ALP *in vivo*. Porém a distribuição e o tamanho dos poros, bem como a estrutura da superfície, pode desempenhar um papel importante para a diferenciação osteogênica.

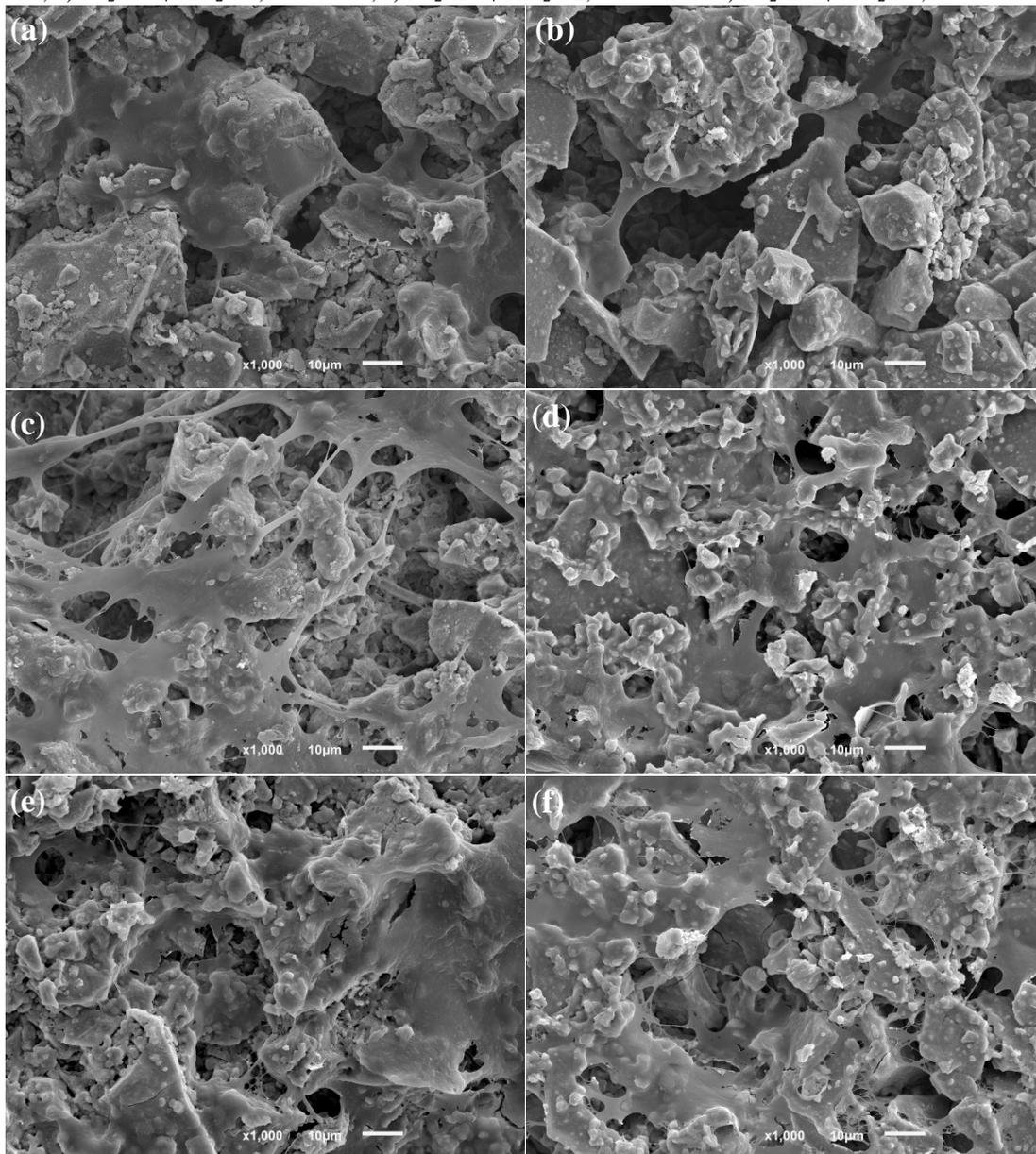
#### 5.4.5.4 Distribuição celular

As Figuras 5.45 e 5.46 mostram a integração e distribuição das células nas amostras, nos diferentes períodos de cultura, observado por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

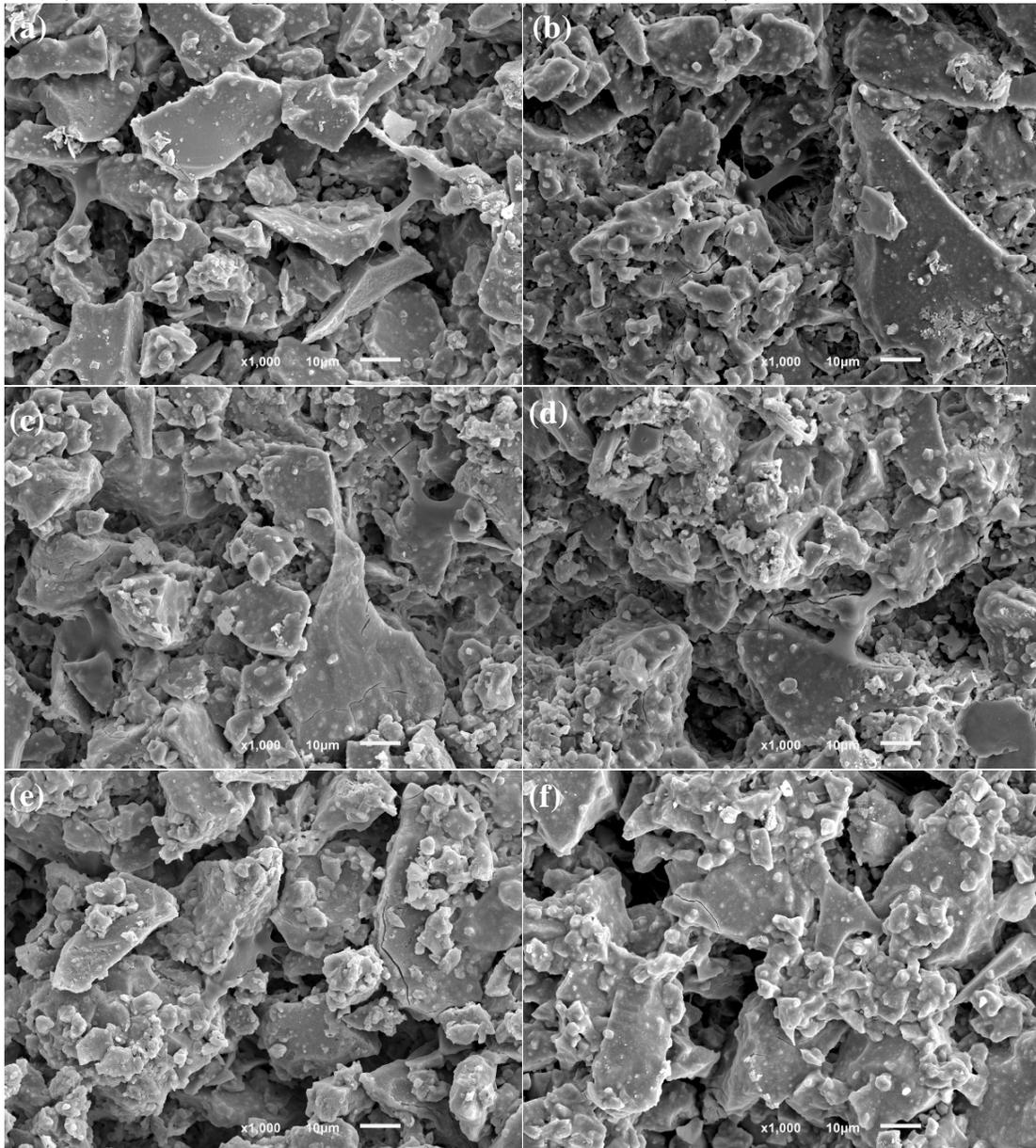
Pelas micrografias é possível verificar que houve adesão de ambas as células na superfície das amostras.

Pode-se observar que as células MSC's apresentaram melhor integração com a superfície do material, bem como aparecem em maior quantidade. Mesmo após sete dias de ensaio e sem troca do meio, pode-se notar um grande número de células sobre as amostras. As células SAOS-2 apresentaram-se em menor quantidade sobre a superfície das amostras sendo que, após sete dias de ensaio, praticamente não havia células.

**Figura 5.45.** Micrografias das células MSC's fixadas nas amostras em diferentes períodos de cultivo celular *in vitro*: a)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2,5% - 1 dia, b)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5,0% - 1 dias, c)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2,5% - 3 dias, d)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5,0% - 3 dias, e)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2,5% - 7 dias e f)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5,0% - 7 dias.



**Figura 5.46.** Micrografias das células SAOS-2 fixadas nas amostras em diferentes períodos de cultivo celular *in vitro*: a)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2,5% - 1 dia, b)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5,0% - 1 dia, c)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2,5% - 3 dias, d)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5,0% - 3 dias, e)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2,5% - 7 dias e f)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5,0% - 7 dias.



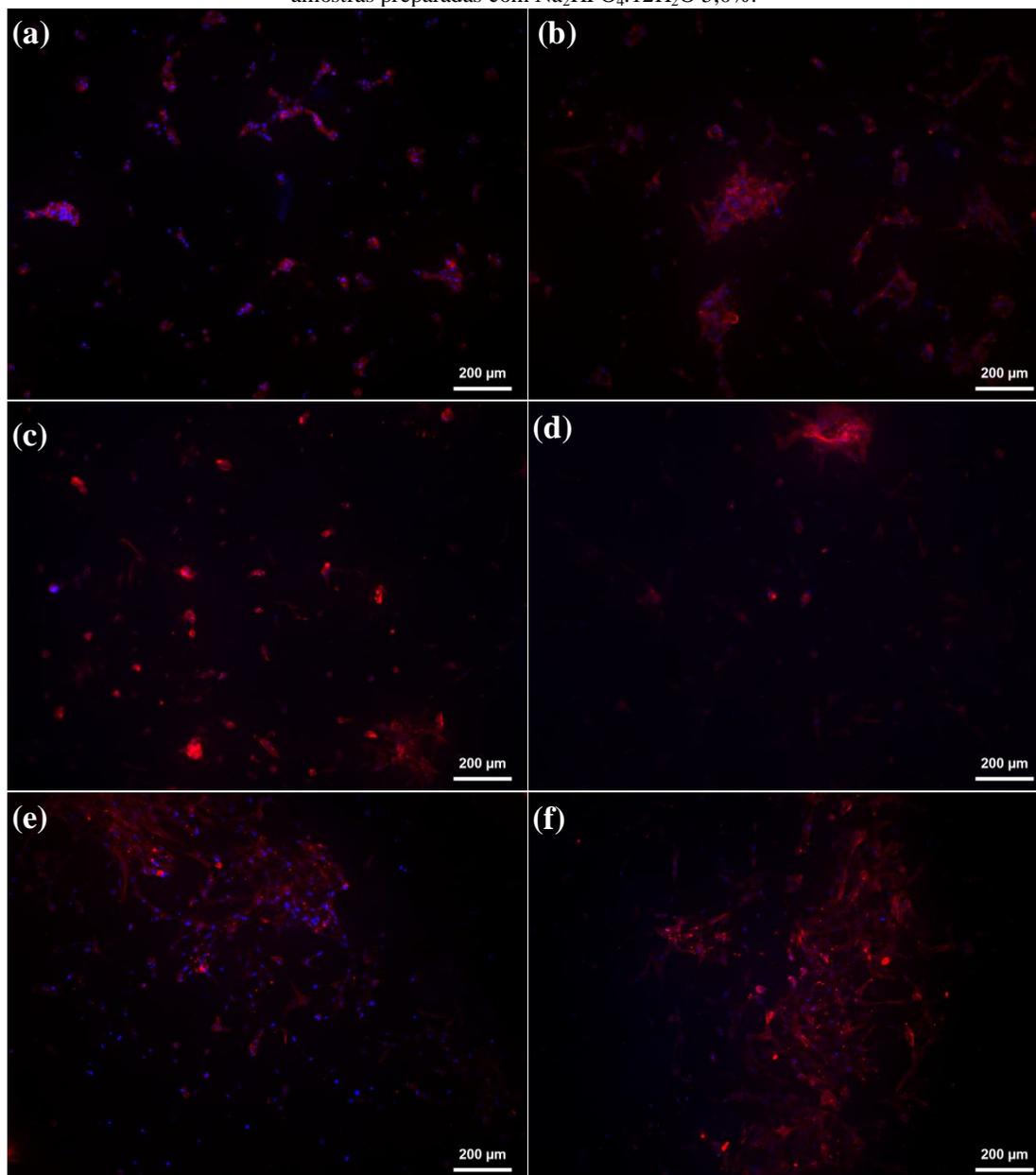
#### 5.4.5.5 Morfologia celular

A distribuição espacial das células vivas integradas à superfície amostras está mostrada na Figura 5.47 e 5.48, para MSC's e SAOS-2, respectivamente.

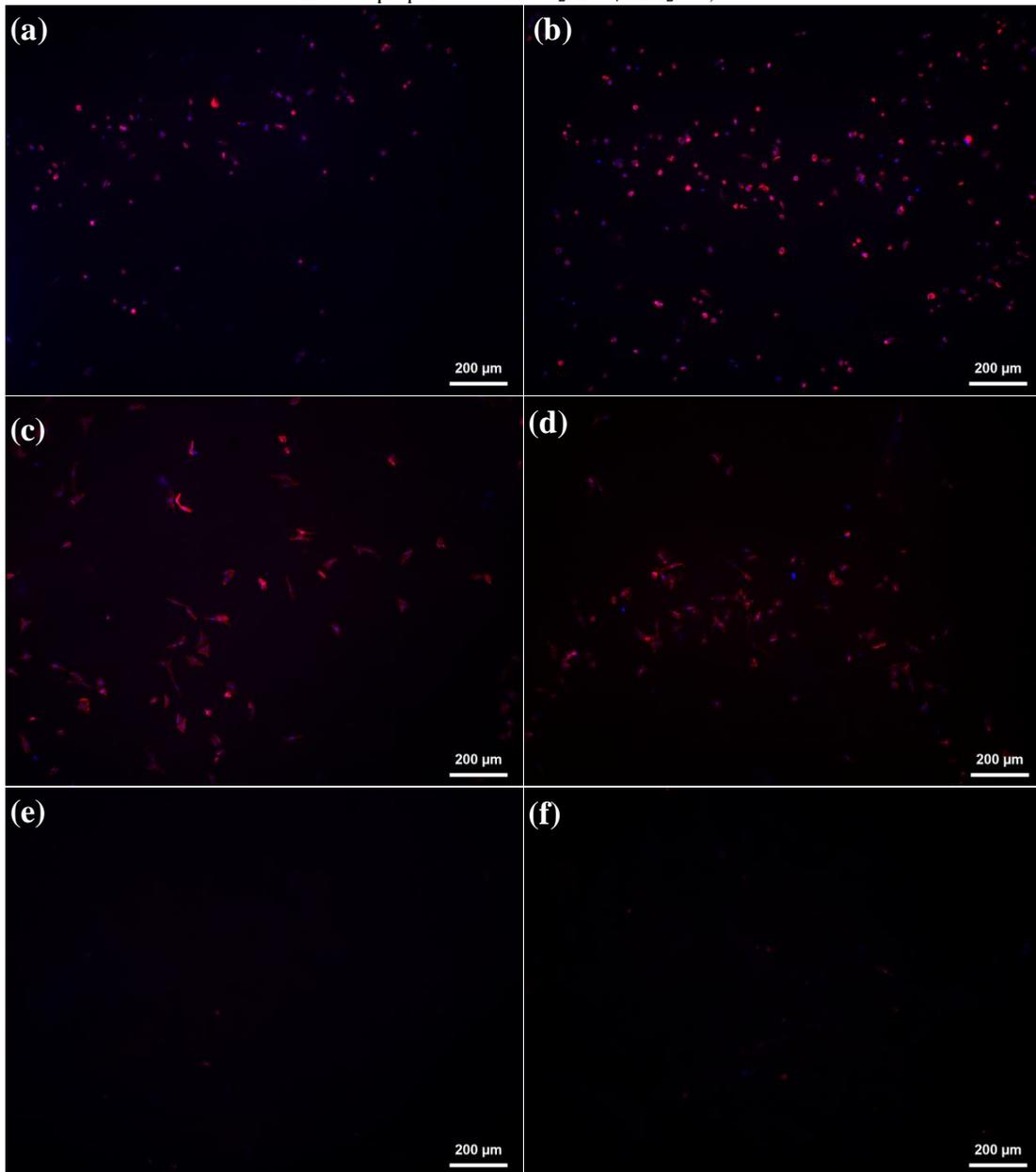
Assim como nos resultados do teste MTS, quantificação de DNA e MEV pode se observar que existe uma quantidade significativamente maior de MSC's aderidas na

superfície das amostras, comparado às SAOS-2. Visualmente houve um aumento do número de células MSC's com o decorrer do tempo de cultura, apresentando grande quantidade de células, mesmo após sete dias de ensaio. Já, para amostras com sete dias de imersão, praticamente não havia células SAOS-2 aderidas à superfície das amostras.

**Figura 5.47.** Morfologia e distribuição das células MSC's na superfície das amostras, sendo: a) 1 dia, c) 3 dias, e) 7 dias, das amostras preparadas com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2,5% e b) 1 dia, d) 3 dias, f) 7 dias, das amostras preparadas com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5,0%.



**Figura 5.48.** Morfologia e distribuição das células SAOS-2 na superfície das amostras, sendo: a) 1 dia, c) 3 dias, e) 7 dias, das amostras preparadas com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2,5% e b) 1 dia, d) 3 dias, f) 7 dias, das amostras preparadas com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5,0%.



Os resultados expostos mostram que tanto cimentos de alfa-TCP preparados com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2,5% como os preparados com 5,0% apresentaram boa adesão celular na superfície. Pode-se dizer também que o alfa-TCP preparado pelo método proposto não é citotóxico e permite a adesão e proliferação de células MSC's e SAOS-2.

## CONCLUSÕES

Com o desenvolvimento do trabalho foi possível sintetizar a fase  $\alpha$ -fosfato tricálcico através do método de síntese por via úmida. O método de síntese se mostrou um processo eficiente e rápido para obtenção de fosfatos de cálcio. Após a definição dos melhores parâmetros de síntese foi possível verificar a viabilidade de sua utilização como cimento de fosfato de cálcio. Com isso foi possível determinar seu potencial de aplicação como substituto ósseo e também verificar a influência da incorporação de hidrogéis aos cimentos.

A seguir são descritas as principais conclusões após cada estudo.

Obteve-se e caracterizou-se a fase alfa-fosfato tricálcico por reação via úmida. A utilização de nitrato de cálcio e ácido fosfórico como reagentes para obtenção desta fase, pelo método de obtenção proposto é inovadora.

A partir do estudo da ordem de adição dos reagentes e temperatura de calcinação na obtenção de alfa-TCP, observou-se que:

- alterações no procedimento de síntese influenciaram na fase obtida;
- o pH exerce grande influência sobre o produto obtido, sendo que, quanto mais ácido, mais favorável à formação de  $\alpha$ -fosfato tricálcico;
- pH mais alto (em torno de 4,0) favoreceu a formação de pirofosfato de cálcio;
- a ordem da titulação também exerce influência sobre a fase obtida, sendo que a utilização do ácido como titulante e do nitrato de cálcio como titulado favorece a formação da fase alfa-TCP;
- a avaliação da temperatura de calcinação mostrou que a utilização de 1500°C por uma hora, permitiu a obtenção de alfa-TCP com elevado grau de pureza, sem a necessidade de choque térmico.

Pelo estudo da influência da concentração dos reagentes, verificou-se que o aumento na concentração dos reagentes para 2 M, não influenciou de forma negativa a obtenção da fase alfa-fosfato tricálcico, quando mantida a temperatura de calcinação em 1500°C.

Pela avaliação do tempo de moagem sobre as propriedades do alfa-TCP, verificou-se que:

- o tamanho médio de partículas é fortemente influenciado pelo tempo de moagem

do pó;

- o tamanho médio de partículas influenciou na relação líquido/pó necessária para a obtenção da pasta cimentícia com consistência adequada para a obtenção dos corpos de prova;

- para o pó com maior tamanho médio de aglomerados, ou seja, sem moagem adicional em etanol, foi necessária menor quantidade de líquido para a formação da pasta cimentícia e resultou em corpos de prova com menor porosidade aparente e maior resistência à compressão;

- para  $\alpha$ -TCP preparado por reação via úmida, utilizando nitrato de cálcio e ácido fosfórico como reagentes, o procedimento de moagem em moinho de bolas foi desnecessário para se obter melhores propriedades de resistência à compressão do cimento.

As formulações de hidrogéis preparados na Avaliação 1 permitiu obter hidrogéis com diferentes propriedades, que conduz a diferentes aplicações. Verificou-se que:

- o produto da polimerização de N-vinil-2-pirrolidona utilizando persulfato de amônio como iniciador se mostrou completamente solúvel em água;

- o iniciador AIBN mostrou maior eficiência de iniciação para as formulações propostas como iniciador;

- os hidrogéis mostraram boa estabilidade térmica até cerca de 100 °C e uma única Tg.

- entre as formulações testadas a amostra H2 mostrou-se mais promissora para a incorporação em cimentos, devido ao seu maior grau de reticulação.

Para os hidrogéis testados na Avaliação 2, observou-se que:

- a presença de ácido acrílico nos hidrogéis ocasionou uma redução no grau de intumescimento dos hidrogéis, sugerindo que a presença deste aumentou o grau de reticulação das amostras.

- a utilização de AIBN como iniciador resultou em menor grau de intumescimento dos hidrogéis, permitindo a obtenção de hidrogéis mais reticulados;

- a utilização de persulfato de amônio como iniciador resultou em amostras menos reticuladas;

- pela utilização do fotoiniciador HCPK, foi possível obter hidrogéis com grau de reticulação intermediário aos obtidos pelos outros dois iniciadores.

- o quociente de equilíbrio de inchamento é maior para os hidrogéis preparados

somente com NVP e foi significativamente maior para hidrogéis de NVP utilizando como fotoiniciador o HCPK. O mesmo se observa para o peso molecular entre ligações entrecruzadas.

Pela obtenção de compósitos pelo método de dupla pega, utilizando o alfa-TCP preparado e os hidrogéis da Avaliação 1 foi possível verificar que:

- as amostras preparadas apenas com solução de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  a 2,5% mostraram uma resistência mecânica média ligeiramente superior quando comparado com as amostras preparadas com hidrogéis;
- a presença dos hidrogéis permitiu manter a mesma porosidade, sem afetar significativamente as propriedades mecânicas do material;
- a incorporação de hidrogéis ao cimento não afetou a formação de hidroxiapatita nas amostras, quando imersas em SBF;
- a presença dessas formulações de hidrogéis não aumentou a absorção de água do material, contudo a presença dos hidrogéis poderia auxiliar na adesão de células, bem como permitir a incorporação de drogas.

Pelo preparo de compósitos de alfa-TCP com os hidrogéis da Avaliação 2, pelo método de dupla pega, foi possível verificar que:

- novamente o cimento preparado apenas com solução de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2,5%, apresentou maior resistência mecânica à compressão, quando comparado às amostras preparadas com hidrogéis;
- a incorporação das formulações de hidrogéis ao cimento permitiu maior absorção de água pelos compósitos, comparado à amostra sem hidrogel. Assim, possivelmente esses compósitos permitiriam uma melhor adesão celular ao material;
- a resistência mecânica à compressão dos compósitos varia significativamente considerando o tipo de hidrogel incorporado;
- para as formulações preparadas com AIBN, o ensaio de resistência mecânica à compressão, mostrou que os compósitos apresentaram resistência mecânica similares (dentro dos valores do erro medidos), demonstrando que a adição dos hidrogéis não tiveram influência significativa sobre esta propriedade.
- com a utilização do iniciador AP, os compósitos apresentaram redução significativa nos valores de resistência mecânica à compressão;
- a composição que permitiu manter as propriedades mecânicas mais próximas às

amostras sem adição de hidrogel, foi a que utilizou NVP e AA com HCPK como fotoiniciador.

Pelo estudo de bioatividade, degradação e citotoxicidade do alfa-TCP foi possível verificar que:

- a utilização de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  na concentração de 5,0% reduz o tempo de pega dos cimentos, sem comprometer a resistência mecânica à compressão das amostras;

- a utilização de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2,5% permitiu a obtenção de amostras com maior precipitação de hidroxiapatita em sua superfície, indicando assim sua maior bioatividade ou facilidade de ligação com o tecido ósseo.

- pela imersão das amostras em SBF e análise elementar dos íons em solução, pode-se verificar que a taxa de dissolução do alfa-TCP foi menor que a taxa de formação de hidroxiapatita.

- pelo ensaio de degradação utilizando PBS, foi possível verificar que não houve variação significativa na resistência mecânica das amostras mesmo após 90 dias de imersão;

- o tamanho médio de poro e a porosidade são ligeiramente maiores para as amostras imersas em PBS por três dias, comparado às amostras que não foi imersa em SBF (0D). Isso se deve à dissolução do alfa-TCP. A seguir os valores oscilam devido aos processos de dissolução e precipitação dos íons em solução;

- Pela imersão das amostras em PBS, pode-se observar que ocorreu a dissolução de íons cálcio para a solução e, devido à disponibilidade de fósforo no meio, ocorreu a precipitação destes íons. Essa precipitação possivelmente gerou a formação de compostos com menor relação Ca/P, visto a disponibilidade de cálcio no meio.

- pelo ensaio de citotoxicidade foi possível observar a não toxicidade do alfa-TCP preparado pelo método proposto.

- as amostras permitiram a adesão e proliferação de células MSC's e SAOS-2, sendo observado melhores resultados para com as MSC's.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Repetir as formulações de hidrogéis, bem como os ensaios de caracterização, porém utilizando outro método de secagem dos hidrogéis;
- avaliar a tenacidade à fratura dos compósitos comparando com formulações do cimento sem hidrogel;
- avaliar a degradação das amostras utilizando outro meio;
- testar o cimento de fosfato de cálcio desenvolvido, em processo de biofabricação com impressão 3D;
- avaliar a incorporação de proteínas ao cimento e avaliar sua influência na adesão e proliferação de células;
- realizar testes *in vivo* em animais com o material desenvolvido neste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- ABD ALLA, S. G.; EL-DIN, H. M. N.; EL-NAGGAR, A. W. M. Structure and swelling-release behaviour of poly(vinyl pyrrolidone) (PVP) and acrylic acid (AAc) copolymer hydrogels prepared by gamma irradiation. **European Polymer Journal**, v. 43, p. 2987–2998, 2007.
- ALBEE, F. H.; MORRISON, H. F. Studies in bone growth: triplecalcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. **Annals of Surgery**, v. 71, p. 32-36, 1920.
- ALEMANY, M. I. *et al.* Effect of materials processing methods on the ‘in vitro’ bioactivity of wollastonite glassceramic materials. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 351, p. 1716 – 1726, 2005.
- ALMQVIST, N. *et al.* Methods for fabricating and characterizing a new generation of biomimetic materials. **Materials Science and Engineering**, v. 7, p. 37-43, 1999.
- ALPATOVA, A. Ultrafiltration of water containing natural organic material: heavy metal removing in the hybrid complexation-ultrafiltration process. **Separation and Purification Technology**, v. 40, p. 155–162, 2004.
- ALVES, N. M. *et al.* Designing biomaterials based on biomineralization of bone. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, p. 2911-2921, 2010.
- AMEYE, D. *et al.* Ex vivo bioadhesion and in vivo testosterone bioavailability study of different bioadhesive formulations based on starch-g-poly(acrylic acid) copolymers and starch/poly(acrylic acid) mixtures. **Journal of Controlled Release**; v. 79, 173-182, 2002.
- ANDERSON, H. C. *et al.* The mechanism of bone induction and bone healing by human osteosarcoma cell extracts. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 313, p. 129–134, 1995.
- ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, p. 667- 681, 2000.
- ASTM C20– 00. **Standard test methods for apparent porosity, water absorption, apparent specific gravity, and bulk density of burned refractory brick and shapes by boiling water**, 2010.
- ASTM C266 – 89. **Standard test method for time of setting of hydraulic. Cement Paste by Gillmore Needles**, 1989.
- ASTM F451 – 08. **Standard Specification for Acrylic Bone Cement**, 2008.
- ASTM F813 – 07. **Standard Practice for Direct Contact Cell Culture Evaluation of Materials for Medical Devices**, 2012.
- ASTM F895 – 84. **Standard test method for agar diffusion cell culture screening for cytotoxicity**, 2006.
- AUSTIN, K. Scaffold design: Use of chitosan in cartilage tissue engineering. **MMG 445 Basic Biotechnology**, v. 3, 62-66, 2007.
- AVNIR, D. *et al.* Recent bio-applications of sol-gel materials. **Journal of Materials Chemistry**, v. 16, p. 1013-1030, 2006.

- AZA, P.; AZA, S. 2004. Bioceramics. **Biomateriales**, p. 41-54, 2004.
- AZA, P. N.; AZA, A. H.; AZA, S. Crystalline Bioceramic Materials. Cerámica y Vidrio. **Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio**, v. 44, p. 135–145, 2005.
- BAJPAL, S. K.; DUBEY, S. In vitro dissolution studies for release of vitamin B12 from poly(N-vinyl-2-pyrrolidone-co-acrylic acid) hydrogels. **Reactive & Functional Polymers**, v. 62, p. 93–104, 2005.
- BAJPAL, S. K.; DUBEY, S.; SAXENA, S. Flow Through Diffusion Cell Method: A Better Approach to Study Drug Release Behavior as Compared to Traditional Dissolution Test Method. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**, v. 43, p. 627-636, 2006.
- BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, p. 13-21, 2005.
- BARBIERI, D.; Yuan, H.; Groot, F.; Walsh, W. R.; Bruijn, J. D. Influence of different polymeric gels on the ectopic bone forming ability of an osteoinductive biphasic calcium phosphate ceramic. **Acta Biomaterialia**, v. 7, p. 2007–2014, 2014.
- BARBU, E. *et al.* Vinylpyrrolidone-co-(meth)acrylic acid inserts for ocular drug delivery: synthesis and evaluation. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 74A, p. 598-606, 2005.
- BAUER, T.; MUSCHLER, G.F. Bone Graft materials. **Clinical Orthopedics and Related Research**, v. 371, p. 10-27, 2000.
- BENAMER, S. *et al.* Synthesis and characterisation of hydrogels based on poly(vinyl pyrrolidone). **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B**, v. 248, p. 284-290, 2006.
- BEN-NISSAN, B. Natural bioceramics: from coral to bone and beyond. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 7, p. 283-288, 2003.
- BERMÚDEZ, O. *et al.* A. Development of some calcium phosphate cements from combinations of alfa-TCP, MCPM e CaO. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 5, p. 160-163, 1994.
- BHATT, R. A.; ROZENTAL, T. D. Bone graft substitutes. **Hand clinics**, v. 28, p. 457–68, 2012.
- BIANCO, P. *et al.* Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**, v. 19, p. 180–192, 2001.
- BIGI, A.; BRACCI, B.; PANZAVOLTA, S. Effect of added gelatin on the properties of calcium phosphate cement. **Biomaterials**, v. 25, p. 2893–2899, 2004.
- BLACK, J. **Biological performance of materials: fundamentals of biocompatibility**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1992. 463 p.
- BOHNER, M.; GALEA, L.; DOEBELIN, N. Calcium phosphate bone graft substitutes: Failures and hopes. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 32, p. 2663–2671, 2012.
- BOSE, S.; TARAFDER, S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering : A review. **Acta Biomaterialia**, v. 8, p. 1401-1421, 2012.

- BOYAN, B. D. *et al.* Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. **Biomaterials**, v. 2, p. 137-146, 1996.
- BUCK, B.E.; MALININ, T.H. Human Bone and tissue allograft. Preparation and safety. **Clinical Orthopaedics and related research**, v. 303, p. 8-17, 1994.
- CALLAN, D.P.; ROHRER, M.D. Use of hidroxyapatite in the treatment of edentulous ridge defects: A human clinical and histologic case report. **Journal of periodontology**, v. 64, p. 575-582, 1993.
- CAMIRÉ, C. L. *et al.* Correlating crystallinity and reactivity in an alpha-tricalcium phosphate. **Biomaterials**, v. 26, p. 2787-94, 2005.
- CAO, W.; HENCH, L. L. Bioactive material. **Ceramics International**, v. 22, p. 493-507, 1996.
- CARDENAS, L. J. *et al.* Effects of tricalcium silicate addition on basic properties of  $\alpha$ -tricalcium phosphate cement. **Journal of the Ceramic Society of Japan**, v. 116, p. 83-87, 2008.
- CARLISLE, E. M. Silicon: A Possible factor in bone calcification. **Science**, v. 167, p. 279-280, 1970 .
- CARR, D. A.; PEPPAS, N. A. Molecular Structure of Physiologically-Responsive Hydrogels Controls Diffusive Behavior. **Macromolecular Bioscience**, v. 9, p. 497-505, 2009.
- CARRODÉGUAS, R. G. *et al.* Hydrothermal method for preparing calcium phosphate monoliths. **Materials Research**, v. 6, p. 395-401, 2003.
- CARRODEGUAS, R. G. *et al.* New approach to the  $\beta \rightarrow \alpha$  polymorphic transformation in magnesium-substituted tricalcium phosphates and its practical implications. **Journal of the American Ceramic Society**, v.91, p.1281-1286, 2008.
- CARRODEGUAS, R. G.; DE AZA, S.  $\alpha$ -Tricalcium phosphate: synthesis, properties and biomedical applications. **Acta biomaterialia**, v. 7, p. 3536-46, 2011.
- ÇAYKARA, T.; KANTOGLU, O. Thermal behavior and network structure of poly(N-vinyl-2- pyrrolidone-crotonic acid) hydrogels prepared by radiation-induced polymerization. **Polymer Advanced Technology**, v. 15, p. 134-139, 2004.
- CHAPIRO, A.; LEGRIS, C. Formation de gels de poly(N-vinylpyrrolidone) par l'action des rayons gamma sur des solutions aqueuses de poly(N-vinylpyrrolidone). **European Polymer Journal**, v. 21, p. 49-53, 1985.
- CHARLESBY, A.; ALEXANDER P. Reticulation of polymers in aqueous solution by  $\gamma$ -rays. **Journal de Chimie. Physique et de Physico-Chimie Biologique**, v. 52, p. 699-709, 1955.
- CHEN, K. S. *et al.* Preparation and characterization of pH sensitive poly(N-vinyl-2-pyrrolidone/itaconic acid) copolymer hydrogels. **Materials Chemistry and Physics**, v. 91, p. 484-489, 2005.
- CHENG, X. *et al.* Properties and in vitro biological evaluation of nano-hydroxyapatite/chitosan membranes for bone guided regeneration, **Materials Science and Engineering C**, v. 29, p. 29-35, 2009.

- CHESMEL, K. D. *et al.* Cellular Responses to Chemical and Morphologic Aspects of Biomaterial Surfaces. II. The Biosynthetic and Migratory Response of Bone Cell Populations. **Journal of Biomedical Material Research**, v. 29, p. 1101-1110, 1995.
- CHOW, L. C. Development of self-setting calcium phosphate cements. **Journal of the Ceramic Society of Japan** (The Centennial Memorial Issue), v. 99, p. 954-964, 1991.
- CHUN, M-K.; CHO, C-S.; CHOI, H-K. Mucoadhesive drug carrier based on interpolymer complex of poly(vinyl pyrrolidone) and poly(acrylic acid) prepared by template polymerization. **Journal of Controlled Release**, v. 81, p. 327-334, 2002.
- CIAPETTI, G. *et al.* Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. **Biomaterials**, v. 17, p. 1259-1264, 1996.
- CONSTANTZ, B. R. *et al.* Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites. **Journal of Biomedical Materials Research (Applied Biomaterials)**, v. 43, p. 451-461, 1998.
- CZAJA, W. K. *et al.* The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 1-12, 2007.
- DAVIS, J. R., [ed.]. 2003. Handbook of Materials for Medical Devices. Ohio : **ASM International**, 2003.
- DEE, K. C.; ANDERSEN, T. T.; BIZIOS, R. Design and function of novel osteoblastadhesive peptides for chemical modification of biomaterials. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 40, p. 371-377, 1998.
- D'ESTE, M.; EGLIN, D. Hydrogels in calcium phosphate moldable and injectable bone substitutes: Sticky excipients or advanced 3-D carriers?. **Acta Biomaterialia**, v. 9, p. 5421-5430, 2013.
- DEVINE, D. M. *et al.* Multifunctional polyvinylpyrrolidinone-polyacrylic acid copolymer hydrogels for biomedical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 326, p. 50-59, 2006.
- DEVINE, D. M.; HIGGINBOTHAM, C. L. Synthesis and N-vinylpyrrolidinone (NVP) based hydrogels. **European Polymer Journal**, v. 41, p. 1272-1279, 2005.
- DITTMER, M.; DURRANI, M.; LEHMANN, K. Acrylic polymers: A review of pharmaceutical application. **STP Pharma Science**, v. 7, p. 403-437, 1997.
- DOROZHKIN, S. V. Bioceramics based on calcium orthophosphates (Review). **Glass and Ceramics**, v. 12, p. 26-31, 2007.
- DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid Biomaterials. **Journal of Materials Science**, n. 44, p. 2343-2387, 2009.
- DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphates - Occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications. **Landes Bioscience**, v. 1, p. 121-164, 2011.
- DOROZHKIN, S. V. Biphasic , triphasic and multiphasic calcium orthophosphates. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 3, p. 963-977, 2012.

- DRIESSENS, F. C. M. *et al.* Effective formulations for the preparation of calcium phosphate bone cements. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 5, p. 164-170, 1994.
- DRIESSENS, F. C. M. *et al.* Calcium phosphates and ceramic bone cements vs. acrylic cements. **Anales de Quimica International Edition**, v. 93, p. S38-S43, 1997.
- DU, C. *et al.* Formation of calcium phosphate/collagen composites through mineralization of collagen matrix. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 50, p. 518-527, 2000.
- DU, C. *et al.* Supramolecular assembly of amelogenin nanospheres into birefringent microribbons. **Science**, v. 307, p. 1450–1454, 2005.
- DUARTE, A. R. C. *et al.* Ionic liquids as foaming agents of semi-crystalline natural-based polymers. **Green Chemical**, v. 14, p. 1949–1955, 2012.
- DUNCAN, J. *et al.* The role of the chemical composition of monetite on the synthesis and properties of  $\alpha$ -tricalcium phosphate. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 34, p. 123–129, 2014.
- EANES, E. D. Crystal growth of mineral phases in skeletal tissues. **Progress in Crystal Growth and Characterization**, v. 3, p. 3-15, 1980.
- ELLIOTT, J. C. **Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates**, Amsterdam: Elsevier, 1994. 389 p.
- EL-REHIM, H. A. *et al.* Radiation preparation of drug carriers based polyacrylic acid (PAAc) using poly(vinyl pyrrolidone) (PVP) as a template polymer. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 254, p. 105-112, 2007.
- ESLAMINEJAD, M. B.; BORDBAR, S.; NAZARIAN, H. Odontogenic differentiation of dental pulp-derived stem cells on tricalcium phosphate scaffolds. **Journal of Dental Sciences**, v. 8, p. 306–313, 2013.
- FATIMI, A. *et al.* The stability mechanisms of an injectable calcium phosphate ceramic suspension. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 21, p. 1799-1809, 2010.
- FERNANDEZ, E. *et al.* Influence of reaction kinetics on the setting and hardening properties of DCP-a-TCP bone cements. **Bioceramics**, v.11, p.239-244, 1998.
- FERNÁNDEZ, E.; PLANELL, J. A.; BEST, S. M. Precipitation of carbonated apatite in the cement system -  $\alpha$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-CaCO<sub>3</sub>. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 47, p. 466-471, 1999.
- FERREIRA, A.; OLIVEIRA, C.; ROCHA, F. The different phases in the precipitation of dicalcium phosphate dihydrate. **Journal of crystal growth**, v. 252, p. 599-611, 2003.
- FRESHNEY, R. I. **Animal cell culture – A practical approach**, Oxford: IRL Press, 1989. 329 p.
- GARLAND, M. *et al.* Electrically enhanced solute permeation across poly(ethylene glycol)–crosslinked poly(methyl vinyl ether-co-maleic acid) hydrogels: Effect of hydrogel crosslink density and ionic conductivity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 406, p. 91–98, 2011.

- GÁSCUE, B. R. *et al.* Síntesis y caracterización de hidrogeles copoliméricos obtenidos a partir de acrilamida, ácido maleico y ácido acrílico. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 9, p. 158-163, 2008.
- GAUR, U. *et al.* Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 202, p. 1–10, 2000.
- GBURECK, U.; BARRALET, J. E. Amorphous  $\alpha$ -tricalcium phosphate: Preparation and aqueous setting reaction. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 87, p.1126-1132, 2004.
- GEEVER, L. M. *et al.* The synthesis, characterisation, phase behaviour and swelling of temperature sensitive physically crosslinked poly(1-vinyl-2-pyrrolidinone)/poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels. **European Polymer Journal**, v. 42, p. 69–80, 2006.
- GINEBRA, M. P. *et al.* Effect of various additives and temperature on some properties of an apatitic calcium phosphate cement. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 6, p. 612–616, 1995a.
- GINEBRA, M. P. *et al.* The effects of temperature on the behaviour of an apatitic calcium phosphate cement. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, n. 6, p. 857-860, 1995b.
- GRUNINGER, S. E. *et al.* Evaluation of biocompatibility of a new calcium-phosphate setting cement. **Journal of Dentistry Research**, v. 63, p. 200-210, 1984.
- GUOWEI, D. *et al.* PVP magnetic nanospheres: Biocompatibility, in vitro and in vivo bleomycin release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 78-85, 2007.
- GÜVEN, O.; SEM, M. Preparation and characterization of poly(n-vinyl 2-pyrrolidone) hydrogels. **Polymer**, v. 32, p. 2491-2495, 1991.
- HADLEY, D. W.; DOLCH, W. L.; DIAMOND, S. On the occurrence of hollow-shell hydration grains in hydrated cement paste. **Cement and Concrete Research**, v. 30, p. 1-6, 2000.
- HASSOUNA, F. *et al.* Photooxidation of poly(N-vinylpyrrolidone) (PVP) in the solid state and in aqueous solution. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, p. 2257–2266, 2009.
- HENCH, L. L. Bioceramics: from concept to clinic. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 74, p. 1487-1510, 1991.
- HENCH, L. L. Bioceramics. **Journal of American Ceramic Society**, v. 81, p. 1705-1728, 1998.
- HENCH, L. L.; WILSON, J. **An Introduction to Bioceramics**. Singapore: World Scientific Publish Co. Ptd. Ltd., 1993.
- HERNIGOU, P. *et al.* Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 87, p. 1430–1437, 2005.
- HILMY, N.; DARWIS, D.; HARDININGSIH, L. Poly(N-vinylpyrrolidone) hydrogels. 2. Hydrogel composites as wound dressing for tropical environment. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 42, p. 911-914, 1993.

- HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 3-12, 2002.
- HOKUGO, A.; TAKAMOTO, T.; TABATA, Y. Preparation of hybrid scaffold from fibrin and biodegradable polymer fiber. **Biomaterials**, v. 27, p. 61-67, 2006.
- HOLLISTER, S. J. Porous scaffold design for tissue engineering. **Nature Materials**, v. 4, p. 518-524, 2005.
- HSU, F. Y.; CHUEH, S. C.; WANG, Y. J. Microspheres of Hydroxyapatite/ Reconstituted Collagen as Supports for Osteoblast Cell Growth. **Biomaterials**, v. 20, p. 1931-1936, 1999.
- HUANG, M.; JIN, X.; FANG, Y. Synthesis and Characterization of novel pH sentive graft copolymers of maleoychitosan and poly(acrylic acid). **Reactive and Functional Polymers**, v. 66, p. 1041-1046, 2006.
- HUNT, T. R.; SCHWAPPACH, J. R.; ANDERSON, H. C. Healing of segmental defect in the rat femur with use of an extract from a cultured human osteosarcoma cell-line (Saos-2): A preliminary report. **Journal of Bone and Joint Surgery - Series A**, v. 78, p. 41-48, 1996.
- HUNTER, G. K.; GOLDBERG, H. A. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. **Biochemical Journal**, v. 302, p. 175-179, 1994.
- ISHIKAWA, K. *et al.* Behaviour of a calcium phosphate cement in simulated blood plasma in vitro. **Dental Materials**, v. 10, p. 26-32, 1994.
- ISO 10993. **Biological evaluation of medical devices**, 2009.
- ISO 23317. **Implants for surgery — In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials**, 2007.
- JAIN, E.; SRIVASTAVA, A.; KUMAR, A. Macroporous interpenetrating cryogel network of poly(acrylonitrile) and gelatin for biomedical applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, p. S173-S179, 2009.
- JIN, S. *et al.* Complexation between poly(acrylic acid) and poly(vinylpyrrolidone): Influence of the molecular weight of poly(acrylic acid) and small molecule salt on the complexation. **European Polymer Journal**, v. 41, p. 2406-2415, 2005.
- JIN, L. *et al.* Vitamin B12 diffusion and binding in crosslinked poly(acrylic acid)s and poly(acrylic acid-co-N-vinyl pyrrolidinone)s. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 371, p. 82-88, 2009.
- JIN, S. *et al.* Preparation and electrical sensitive behavior of poly (N-vinylpyrrolidone-co-acrylic acid) hydrogel with flexible chain nature. **European Polymer Journal**, v. 49, p. 1871-1880, 2013.
- JINLONG, N.; ZHENXI, Z.; DAZONG, J. Investigation of Phase Evolution During the Thermochemical Synthesis of Tricalcium Phosphate. **Materials Chemistry and Physics**, v. 78, p. 308-312, 2002.
- KACZMAREK, H.; SZALLA, A. Photochemical transformation in poly (acrylic acid)/poly (ethylene oxide) complexes. **Journal of Photochemistry and Photobiology A. Chemistry**, v. 180, p. 46-53, 2006.

- KAFLAK, A. *et al.* Efficiency of  $1\text{H} \rightarrow 31\text{P}$  NMR cross-polarization in bone apatite and its mineral standards. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 29, p. 345-348, 2006.
- KANNAN, S.; BALAMURUGAN, A.; RAJESWARI, S. Bio-Composites: A Review of Literature. **Trends in Biomaterials & Artificial Organs**, v. 14, p. 30-36, 2001.
- KAPLAN, H.; GÜNER, A. Swelling Behavior of Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) and Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)/ $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  Hydrogels in Urea Solutions. **Advances in Polymer Technology**, v. 19, p. 210–217, 2000.
- KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v. 26, p. 5474-5491, 2005.
- KASTEN, P. *et al.* Porosity and pore size of  $\beta$ -tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: An in vitro and in vivo study. **Acta Biomaterial**, v. 4, p. 1904–1915, 2008.
- KAWACHI, E. Y. *et al.* Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, p. 518-522, 2000.
- KAWAI, T.; FUJISAWA, N.; SUZUKI I. Control of setting behavior of calcium phosphate paste using gelatinized starch. **Journal of the Ceramic Society of Japan**, v. 118, p. 421-424, 2010.
- KHAN, T. A.; PEH, K. K.; CH'NG, H. S. Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 303-311, 2000.
- KHARE, A. R.; PEPPAS, N. A. Swelling/deswelling of anionic copolymer gels. **Biomaterials**, v. 16, p. 559-567, 1995.
- KHARLAMPIEVA, E.; EREL-UNAL, I.; SUKHISHVILI, S.A. Amphoteric Surface Hydrogels Derived from Hydrogen-Bonded Multilayers: Reversible Loading of Dyes and Macromolecules. **Langmuir**, v. 23, p. 175-181, 2007.
- KIKUCHI, M. *et al.* Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized *in vitro* and its biological reaction *in vivo*. **Biomaterials**, v. 22, p. 1705-1711, 2001.
- KOKUBO, T. Bioactive glass ceramics: properties and applications. **Biomaterials**, v. 12, p. 1255-1271, 1991.
- KOKUBO, T.; KIM, H. M.; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials**, v. 24, p. 2161-2175, 2003.
- KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, p. 2907-2915, 2006.
- KUMARI, T. V. *et al.* Cell surface interactions in the study of biocompatibility. **Trends in biomaterials and artificial organs**, v. 15, p. 37-41, 2002.

- LAKOURAJ, M. M.; TAJBAKHS, M.; MOKHTARY, M. Synthesis and Swelling Characterization of Cross-linked PVP/PVA Hydrogels. **Iranian Polymer Journal**, v. 14, 1022-1030, 2005.
- LAUFFENBURGER, D. A.; HORWITZ, A. F. Cell migration: A physically integrated molecular process. **Cell**, v. 84, p. 359-369, 1996.
- LEE, J. W.; PARK, J. H.; ROBINSON, J. R. Bioadhesive-based dosage forms: The next generation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, p. 850-866, 2000.
- LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical application of Collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, p. 1-22, 2001.
- LEGEROS, R. Z. Properties of Osteoconductive Biomaterials: Calcium Phosphate. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 395, p. 81-98, 2002.
- LEUCHT, P.; CASTILLO, A. B.; BELLINO, M. J. Comparison of tricalcium phosphate cement and cancellous autograft as bone void filler in acetabular fractures with marginal impaction. **Injury**, v. 44, p. 969-74, 2013.
- LEVITT, G. E. *et al.* Forming methods for apatite prosthesis. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 3, p. 683-685, 1969.
- LIN, C.; METTERS, A. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1379-1408, 2006.
- LOPES, C. M. A.; FELISBERTI, M. I. Mechanical behaviour and biocompatibility of poly(1-vinyl-2-pyrrolidinone)-gelatin IPN hydrogels. **Biomaterials**, v. 24, p. 1279-1284, 2003.
- LU, Y. *et al.* New bioactive hybrid material of nanohydroxyapatite based on N-carboxylchitosan for bone tissue engineering. **Applied Surface Science**, v. 256, p. 7228-7233, 2010.
- LUESSEN, H. L. *et al.* Bioadhesive polymers for the peroral delivery of peptide drugs. **Carbohydrate Research**, v. 29, p. 329-338, 1994.
- LUTOLF, M. P.; HUBBELL, J. A. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. **Nature Biotechnology**, v. 23, p. 47-55, 2005.
- LYNN, A. K. *et al.* Phase mapping: a novel design approach for the production of calcium phosphate-collagen biocomposites. **Key Engineering Materials**, v. 254-256, p. 593-596, 2004.
- MA, J. *et al.* A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a *scaffold* of human neonatal dermal fibroblasts. **Biomaterials**, v. 22, p. 331-336, 2001.
- MADIHALLY, S. V.; MATTHEW, H. W. T. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 20, p. 1133-1142, 1999.
- MAKAROV, C.; GOTMAN, I.; JIANG, X. In situ synthesis of calcium phosphate polycaprolactone nanocomposites with high ceramic volume fractions. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 21, p. 1771-1779, 2010.

- MARINHO, R.M. **Climatério**. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica, 1995.
- MARK, J. E. **Polymer Data Handbook**. Oxford: Oxford University Press, 1999.
- MARTÍNEZ, I. M. *et al.* In vitro behavior of  $\alpha$ -tricalcium phosphate doped with dicalcium silicate in the system  $\text{Ca}_2\text{SiO}_4\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . **Materials Characterization**, v. 63, p. 47–55, 2012a.
- MARTÍNEZ, I. M. *et al.* Preparation and characterization of novel bioactive  $\alpha$ -Tricalcium Phosphate doped with Dicalcium Silicate ceramics. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, p. 878–886, 2012b.
- MARX, R.E. Bone and bone graft healing. **Oral & Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v. 19, p. 455–466, 2007.
- MATE-SANCHEZ DE VAL, J. E. *et al.* New block graft of  $\alpha$ -TCP with silicon in critical size defects in rabbits: Chemical characterization, histological, histomorphometric and micro-CT study. **Ceramics International**, v. 38, p. 1563–1570, 2012.
- MATHEWS, F. L.; RAWLING, R. D. **Composite Materials: Engineering and Science**. Chapman & Hall: London, 1994.
- MI, F-L. *et al.* Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. **Biomaterials**, v. 22, p. 165-173, 2001.
- MONROE, Z. A. *et al.* New calcium phosphate ceramic material for bone and tooth implants. **Journal of Dental Research**, v. 50, p. 860-862, 1971.
- MOREIRA, K. D. **Efeito do polímero hidratassolo sobre propriedades físicoquímicas em solução nutritiva no desenvolvimento da cebolinha (allium fistulosum l.)**. 2011. 55 f. Monografia (Licenciatura em Química) - Universidade Estadual do Maranhão, Caxias, MA, 2011.
- MOSCHOU, E. A. *et al.* Artificial Muscle Material with fast electroactuation under neutral pH conditions. **Chemical Materials**, v. 16, p. 2499-2502, 2004.
- MUSCHLER, G. F.; NAKAMOTO, C.; GRIFFITH, L. G. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 86-A, p. 1541-1558, 2004.
- MUTAR, M. A.; RADIA, N. D. Controlled Release From Crosslinked Polyacrylic acid As Drug Delivery Theophylline. **Iraqi National Journal of Chemistry**, v. 45, 67-85, 2012
- NEEDLEMAN, I.; SMALES, F. In vitro assessment of bioadhesion for periodontal and bucal drug delivery. **Biomaterials**, v. 16, p. 617–624, 1995.
- NEMEC, J. W.; BAUER, J. In Encyclopedia of Polymer Science and Engineering; Wiley Interscience, New York, p. 211, 1985.
- NEVILLE, A. M. **Propriedades do Concreto**. São Paulo: Pini. Brasil, 1997.
- ODA, M. *et al.* Effects of liquid phase on basic properties of  $\alpha$ -tricalcium phosphate-based apatite cement. **Dental Materials Journal**, v. 27, p. 672-677, 2008.

- OECHSNER, M.; KEIPERT, S. Polyacrylic acid/polyvinylpyrrolidone bipolymeric systems. I. Rheological and mucoadhesive properties of formulations potentially useful for the treatment of dry-eye-syndrome. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 47, p. 113-118, 1999.
- OGATA, D.V.G. *et al.* Biosecurity in Brazil's bone banks. **Implant News**, v. 3, p. 363-367, 2006.
- OKAMOTO, T. *et al.* Implante de osso anorgânico em cavidade óssea. Estudo histológico em ratos. **Revista de odontologia da Unesp**, v. 23, p. 213-219, 1994.
- PAPE, H. C.; EVANS, A.; KOBBE, P. Autologous bone graft: properties and techniques. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 24, p. S36-40, 2010.
- PARK, J. B. **In Biomaterials an Introduction**. New York: Plenum Press, 1980.
- PARK, J. B. **Biomaterials Science and Engineering**. New York and London: Plenum Press, 1990.
- PATTERSON, J. *et al.* Hyaluronic acid hydrogels with controlled degradation properties for oriented bone regeneration. **Biomaterials**, v. 31, p. 6772-6781, 2010.
- PAVLIDOU, S.; PAPANAYIDIS, C. D. Nanocompósitos de PVC com Argila Organicamente Modificada: Efeitos do Processamento e do Método de Incorporação da Argila. **Progress in Polymer Science**, v. 28, p. 1539-1641, 2008.
- PENICHE, C. *et al.* Water sorption of flexible networks based on 2-hydroxyethyl methacrylate – triethylenglycol dimethacrylate copolymers. **Polymer**, v. 38, p. 5977-5982, 1997.
- PEPPAS, L.; PEPPAS, N. Equilibrium swelling behaviour of dilute ionic hydrogels in electrolytic solutions. **Journal of Controlled Release**, v. 16, p. 319-330, 1991.
- PEPPAS, N. A. *et al.* Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 27-47, 2000a.
- PEPPAS, N. A. *et al.* Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 2, p. 9-29, 2000b.
- PÉREZ-GRANADOS, A. M.; VAQUERO, M. P. Silicon, aluminium, arsenic and lithium: Essentiality human health implications. **The Journal of Nutrition, Health & aging**, v. 6, p. 154-162, 2002.
- PICONI, C.; MACCAURO, G. Zirconia as a ceramic biomaterial. **Biomaterials**, v. 20, p. 1-25, 1999.
- PITTENGER, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, p. 143-147, 1999.
- PONOMAREVA, N. I. *et al.* Microemulsion method for producing hydroxyapatite. **Russian Journal of General Chemistry**, v. 80, p. 905-908, 2010.
- PORTER, A. E. Effect of sintered silicate-substituted hydroxyapatite on remodeling processes at the bone-implant interface. **Biomaterials**, v. 25, p. 3303-3314, 2004.
- RAVAGLIOLI, A.; KRAJEWSKI, A. **Bioceramics-Materials, Properties and Applications**. London: Chapman & Hall, 1992. 422 p.

- RAVICHANDRAN, P.; SHANTHA, K. L.; RAO, P. Preparation, swelling characteristics and evaluation of hydrogels for stomach specific drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 154, p. 89-94, 1997.
- RAZZAK, M. T. *et al.* The characterization of dressing component materials and radiation formation of PVA–PVP hydrogel. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 55, p. 153-165, 1999.
- RESENDE, C. X. *et al.* Estudo teórico e experimental da Solução Avaliadora de Bioatividade (SAB). **Matéria**, v. 12, p. 358-366, 2007.
- RISBUD, M.; HARDIKAR, A.; BHONDE, R. Growth modulation of fibroblasts by chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogel: Implications for wound management? **Journal of Bioscience**, v. 25, p. 25-31, 2000.
- ROBINSON, B. V. **PVP: A Critical Review of the Kinetics and Toxicology of Polyvinylpyrrolidone (Povidone)**. Chelsea MI: Lewis Publishers, 1990. 232 p.
- ROEGES, N. P. G. **A Guide to the Complete Interpretation of Infrared Spectra of Organic Structure**. Nova Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 1994.
- RODRIGUES, L. R. **Scaffolds baseados em nanopartículas de fosfatos de cálcio para engenharia tecidual óssea**. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas/SP, 2012.
- ROGERO, S. O. *et al.* Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs. **Toxicology in Vitro**, v. 14, p. 497-504, 2000.
- ROGERO, S. O. *et al.* Biocompatibility Study of Polymeric Biomaterials. **Artificial Organs**, v. 27, p. 424-427, 2003.
- SANTOS JR., A. **Cultura de Células Vero sobre polímeros bioabsorvíveis a base de poli-L-ácido láctico**. 2001. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2001.
- SANTOS, L. A. **Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área médico-odontológica**. 2002. 247p. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, SP, 2002.
- SANTOS, L. A. *et al.*  $\alpha$ -Tricalcium phosphate cement: “in vitro” cytotoxicity. **Biomaterials**, v. 23, p. 2034-2042, 2002.
- SANTOS, L. A. *et al.* Dual-Setting Calcium Phosphate Cement Modified with Ammonium Polyacrylate. **Artificial Organs**, v. 27, p. 412-418, 2003.
- SCARANO, A. *et al.* Maxillary sinus augmentation with different biomaterials: a comparative histologic and histomorphometric study in man. **Implant dentistry**, v. 15, p. 197-207, 2006.
- SEN, M.; YAKAR, A. Enhancement of copolymerization of Itaconic acid with N-vinyl 2-pyrrolidone chemically and by radiation induced cross-linking. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 234, p. 226-234, 2005.

- SENA, L. A. **Produção e caracterização de compósitos hidroxiapatita-colágeno para aplicações biomédicas**. 2004. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.
- SHANTHA, K. L.; HARDING, D. R. K. Preparation and in-vitro evaluation of poly[N-vinyl-2-pyrrolidone-polyethylene glycol diacrylate]-chitosan interpolymeric pH-responsive hydrogels for oral drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 207, p. 65–70, 2000.
- SHI, N. *et al.* Anions bonded on the supramolecular hydrogel surface as the growth center of biominerals. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, p. 84–89, 2008.
- SIEBERS, M. C. *et al.* Integrins as Linker Proteins Between Osteoblasts and Bone Replacing Materials. A Critical Review. **Biomaterials**, v. 26, p. 137-146, 2005.
- SIKAVITSAS, V. I.; TEMENOFF, J. S.; MIKOS, A. G. Biomaterials and Bone Mechanotransduction. **Biomaterials**, v. 22, p. 2581-2593, 2001.
- SILVER, F.; DOILLON, C. **Biocompatibility: interactions of biological and implantable materials**. New York: VCH, 1989.
- SIMÕES, R. D. *et al.* Aspectos do Metabolismo Ósseo: Osteoporose. In: **Ginecologia Endócrina**. 1. ed. São Paulo: Editora Atheneu: 1995.
- SIVAKUMAR, M.; RAO, K. P. Preparation, Characterization and In Vitro Release of Gentamicin from Coralline Hydroxyapatite-Gelatin Composite Microspheres. **Biomaterials**, v. 23, p. 3175-3181, 2002.
- SLAUGHTER, B. V. *et al.* Hydrogels in regenerative medicine. **Advanced Materials**, v. 21, p. 3307-3329, 2009.
- SOARES, G. A. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Ciência, Tecnologia e Inovação. Biomateriais**, [http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr10\\_biomateriais.pdf](http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr10_biomateriais.pdf), Rio de Janeiro (2005), acesso em 08 de março de 2012.
- SOHAIL, K. *et al.* pH-sensitive polyvinylpyrrolidone-acrylic acid hydrogels: Impact of material parameters on swelling and drug release. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, 173-184, 2014.
- SONG, J.; MALATHONG, V.; BERTOZZI, C. R. Mineralization of synthetic polymer scaffolds: a bottom-up approach for the development of artificial bone. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, p. 3366–3372, 2005.
- STEFANIC, M.; KRNEL, K.; KOSMAC, T. Novel method for the synthesis of a  $\beta$ -tricalcium phosphate coating on a zirconia implant. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 33, p. 3455–3465, 2013.
- STEPAN, J. *et al.* Bone loss and biochemical indices of bone remodeling in surgically induced postmenopausal women. **Bone**, v. 8, p. 279-284, 1987.
- STEVENS, M. M.; GEORGE, J. H. Exploring and Engineering the Cell Surface Interface. **Science**, v. 310, p. 1135-1138, 2005.
- STOCH, A. *et al.* FTIR monitoring of the growth of the carbonate containing apatite layers from simulated and natural body fluids. **Journal of Molecular Structure**, v. 511, p. 287-294, 1999.

- STOCK, U. A.; VACANTI, J. P. Tissue engineering: Current state and prospects. **Annual Review of Medicine**, v. 52, p. 443-451, 2001.
- SZÁRAZ, I.; FORSLING, W. A spectroscopic study of the solvation of 1-vinyl-2-pyrrolidone and poly(1-vinyl-2-pyrrolidone) in different solvents. **Polymer**, v. 41, p. 4831-4839, 2000.
- TAN, Y. T. F.; PEH, K. K.; AL-HANBALI, O. Investigation of interpolymer complexation between carbopol and various grades of polyvinylpyrrolidone and effects on adhesion strength and swelling properties. **Journal of Pharmaceutics Science**, v. 4, p.7-14, 2001.
- TEMENOFF, J. S.; MIKOS, A. G. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage, **Biomaterials**, v. 21, p. 431-440, 2000.
- THAKUR, A.; WANCHOO, R. K.; SINGH, P. Structural Parameters and Swelling Behavior of pH Sensitive Poly(acrylamide-co-acrylic acid)Hydrogels. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, v. 25, p. 181-194, 2011.
- TMIHATA, K.; IKADA, Y. *In vivo* degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. **Biomaterials**, v. 18, p. 567-575, 1997.
- TORRADO, S. *et al.* Chitosan-poly(acrylic acid) polyionic complex: in vivo study to demonstrate prolonged gastric retention. **Biomaterials**, v. 25, p. 917-923, 2004.
- TOTH, J.M.; LYNCH, K.; DEVINE, T.R. Mechanical and Biological characterization of Phosphates for use as Biomaterials. In. **Encyclopedic Handbook of Biomaterials Anal**. New York: Marcel, 1995.
- UZUN, C. *et al.* Enhancement and control of crosslinking of dimethylaminoethyl methacrylate irradiated at low dose rate in the presence of ethylene glycol dimethacrylate. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 208, p. 242-246, 2003.
- VALLET-REGÍ, M; GONZÁLEZ-CALBET, M. J. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. **Progress in Solid State Chemistry**, v.32, p. 1-31, 2004.
- VOLKMER, T. M. **Obtenção e caracterização de  $\alpha$ -fosfato tricálcico por síntese de combustão e aplicação em cimentos ósseos e arcabouços de criogéis**. 2011. 183p. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2011.
- VOLKMER, T. M. *et al.* Novel method for the obtainment of nanostructured calcium phosphate cements: synthesis, mechanical strength and cytotoxicity. **Powder Technology**, v. 235, p. 599-605, 2013.
- WATANABE, K. *et al.* A new bacterial cellulose substrate for mammalian cell culture. A new bacterial cellulose substrate. **Cytotechnology**, v.13, p.107-114, 1993.
- WHANG, K. *et al.* Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture. **Tissue Engineering**, v. 5, p. 35-51, 1999.
- WILLIAMS, D. F. **Definitions in Biomaterials**. New York: Elsevier, 1987.
- WILLIAMS, S. F. *et al.* PHA applications: Addressing the price performance issue I. Tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 111-121, 1999.

- WOODLEY, J. Bioadhesion: New possibilities for drug administration? **Clinical Pharmacokinetics**, v. 40, p. 77- 84, 2001.
- WU, G.; LIN, S.; YANG, C. Alkaline Zn-air and Al-air cells based on novel solid PVA/PAA polymer electrolyte membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 280, p. 802-808, 2006.
- WU, Y-H.; FREEMAN, B. D. Structure, water sorption, and transport properties of crosslinked N-vinyl-2-pyrrolidone/N,N'-methylenebisacrylamide films. **Journal of Membrane Science**, v. 344, p. 182-189, 2009.
- WU, Y-H. *et al.* Effect of UV intensity on structure, water sorption, and transport properties of crosslinked N-vinyl-2-pyrrolidone/N,N-methylenebisacrylamide films. **Journal of Membrane Science**, v. 348, p. 47-55, 2010.
- YARIMKAYA, S.; BASAN, H. Synthesis and swelling behaviour of acrylate-based hydrogels. *Journal of Macromolecular Science Part A: Pure and Applied Chemistry*, v. 44, p. 699-706, 2007.
- YOKOI, T.; KATO, H.; KAMITAKAHARA, M. Formation of octacalcium phosphate with incorporated succinic acid through gel-mediated processing. **Journal of the Ceramic Society of Japan**, v. 118, p. 491-497, 2010.
- YU, D. *et al.* Selfsetting hydroxyapatite cement: A novel skeletal drug delivery system for antibiotics. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 81, p. 529-31, 1992.
- YU, H. *et al.* Medicated Wound Dressings Based on Poly(vinyl alcohol)/Poly(N-vinyl pyrrolidone)/Chitosan Hydrogels. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 101, p. 2453-2463, 2006.
- YU, H. *et al.* Preparation and Antibacterial Effects of PVA-PVP Hydrogels Containing Silver Nanoparticles. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 103, p. 125-133, 2007.
- YUAN, H.; DE GROOT, K. Calcium Phosphate Biomaterials: an Overview. [ed.] R. L. Reis e S. Weiner. **Learning from Nature How to Design New Implantable Biomaterials: From Biomineralization Fundamentals to Biomimetic Materials and Processing Routes**. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 2005.
- ZHAI, M. *et al.* Swelling behaviour of a new kind of polyampholyte hydrogel composed of dimethylaminoethyl methacrylate and acrylic acid. **Polymer International**, v. 53, p. 33-36, 2004.
- ZHANG, Y. *et al.* Calcium phosphate-chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering. **Tissue Engineering**, v. 9, p. 337-345, 2003.
- ZHANG, F. *et al.* Study of growth of calcium carbonate crystals on chitosan film. **Materials and Design**, v. 27, p. 422-426, 2006.