

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**Escola de Engenharia**  
**Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais**

**DESENVOLVIMENTO DE CIMENTO ÓSSEO DE FOSFATO DE CÁLCIO**  
**COMO SUPORTE PARA O CRESCIMENTO DE TECIDOS**

**JÉFERSON LUIS DE MORAES MACHADO**

Dissertação para obtenção do título de Mestre  
em Engenharia

**Porto Alegre**

**2007**

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**Escola de Engenharia**  
**Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais**

**DESENVOLVIMENTO DE CIMENTO ÓSSEO DE FOSFATO DE CÁLCIO**  
**COMO SUPORTE PARA O CRESCIMENTO DE TECIDOS**

**JÉFERSON LUIS DE MORAES MACHADO**

Engenheiro de Materiais

Trabalho realizado no Departamento de Materiais da Escola de Engenharia da UFRGS, dentro do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais - PPGEM, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia.

Área de Concentração: Ciência e Tecnologia dos Materiais.

**Porto Alegre**

**2007**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Engenharia, área de concentração em Ciência e Tecnologia dos Materiais e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e pela Banca Examinadora do Curso de Pós-Graduação.

Orientador: Prof. Dr. Luis Alberto dos Santos

Banca Examinadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Einloft – PUC – RS

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Madalena de Camargo Forte – UFRGS – RS

Prof. Dr. Álvaro Meneguzzi – UFRGS - RS

Prof. Dr. Antonio Cezar Faria Vilela  
Coordenador do PPGEM

Porto Alegre

2007

“A cada dia que vivo, mais me convenço de que  
o desperdício da vida está no amor que não damos,  
nas forças que não usamos,  
na prudência egoísta que nada arrisca  
e que, esquivando-se do sofrimento,  
perdemos também a felicidade.”

Carlos Drummond de Andrade

## AGRADECIMENTOS

A todos que colaboraram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho, o meu reconhecimento e a minha sincera homenagem:

À UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul – pelo excelente ensino público, gratuito e de qualidade.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – pelo suporte financeiro para a realização desta dissertação de mestrado.

Ao Prof. Dr. Luis Alberto dos Santos, pelo estímulo, pela idealização e pela orientação nesta dissertação de mestrado, por todo o aprendizado durante este período, além da confiança, apoio e descontração, bem como ao LABIOMAT - Laboratório de Biomateriais - da Escola de Engenharia da UFRGS;

Ao pessoal do LACER, Rafael Trommer, Rubens Camaratta, Felipe Nobre, Leonardo Ladeira, Renato Bonadiman e Antônio Takimi, pelo grande auxílio nos ensaios, pelos momentos de descontração e pelas úteis discussões, além de compartilhar diversas dúvidas, anseios, problemas, enfim, pela grande amizade construída;

Aos estimados companheiros, ex-companheiros e mais novos companheiros de Laboratório, Vanusca Jahno, Hugo Alves, Gabriela Benderóvicz, Eduardo Avancini, Rafael Mendes Gelpi, Letícia Vasconcelos, Pablo Escuder e Samanta Vearick pela ajuda em diversos momentos e pelo ambiente de descontração;

Aos grandes amigos de LABIOMAT e de barra 99, Marcelo Bastos, pela amizade, companheirismo e auxílio; Tiago Moreno Volkmer pela amizade e auxílio na dissertação, além de ser um grande companheiro de festas;

Ao pessoal do LACOR e LAPOL por sempre estarem dispostos a ajudar e a emprestar objetos quando necessário.

Ao pessoal do Departamento de Genética, Prof. Nance Nardi, Flávia Danielski e principalmente à Isabel Cristina Giehl pelo grande auxílio nos ensaios e por me aturarem nesse período;

Ao pessoal do grupo de Magic, Jorginho, Doutor, Márcio, Otávio, Diego, PC, e claro, Marcelo e Tiago pela grande amizade e momentos de descontração,

A todos os meus grandes amigos que ainda não citei, Daniela, Gigio, Ale, Lengler, Luiz, Carina, Michele, Adri; o pessoal da barra 99, Japa, Bagé, Sílvia, Gemeli e todos os outros; o pessoal do curso de dança, Dagoberto, Josi, Fabi, Lucas; o pessoal da Casa do Estudante, Daniel, Marga, Cláudio, Diva, Lauri, Luciano, Juliano, Júnior, Daroit, Luis, Grazi, Gláucia, Liana, Jonas, Ildo, Jossana, Sandra, Daiana, Leandro, Karina, Jana, Eckert, Mateus, e é claro que não podia faltar o Hugo Ernesto, o Paulo, a Carol, o Rippel e minha querida prima Karine.

Aos meus pais, que além de terem me possibilitado chegar até aqui, me proporcionando uma sólida base familiar e suporte afetivo, sempre me apóiam a seguir adiante.



## RESUMO

O crescimento de células em arcabouços tridimensionais porosos tem se tornado progressivamente ativo na engenharia de tecidos. Os arcabouços guiam o crescimento celular, sintetizam uma matriz extracelular e outras moléculas biológicas, e facilitam a formação de tecidos e órgãos funcionais. Um cimento deste tipo pode ser preparado misturando um sal de fosfato de cálcio com uma solução aquosa para que se forme uma pasta que possa reagir à temperatura corporal dando lugar a um precipitado que contenha hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). A similaridade química e morfológica entre este biomaterial e a parte mineral dos tecidos ósseos permite a osteocondução, sendo o cimento substituído por tecido ósseo novo com o tempo e com a vantagem de não desencadear processos inflamatórios e de corpo estranho, com eventual expulsão do material implantado.

O objetivo do presente trabalho foi a obtenção e caracterização de suportes tridimensionais para a engenharia de tecido, com o uso de matérias-primas nacionais, por meio da utilização de microesferas de parafina como corpos geradores de poros. As microesferas foram produzidas por suspensão em solução aquosa de poli (álcool vinílico) (PVA) e sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Foram analisadas as fases presentes no cimento sintetizado e após a reação de cura do mesmo, a variação do tamanho de partícula e da resistência mecânica com o tempo de moagem. Foi analisada a porosidade dos suportes e a forma de extração da parafina daqueles que a utilizaram na sua formação. O tamanho de poro dos suportes gerados com a variação da quantidade de fase líquida ficou aquém do tamanho considerado ideal para o crescimento de tecido ósseo. A porosidade dos arcabouços fabricados com esferas de parafina foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), e seu comportamento foi analisado a partir de ensaios *in vitro* em solução SBF (simulated body fluid) e em cultura de células. A utilização de esferas de parafina permitiu a formação de poros com tamanho tal que possibilitam potencialmente o crescimento tecidual e celular.

**Palavras chave:** Cimento de fosfato tricálcico, arcabouços, microesferas de parafina, permeabilidade, biocerâmicas, biomateriais.



## ABSTRACT

The growth of cells in three-dimensional porous scaffolds has been extensively studied for use in tissue engineering. They guide grow of cells, synthesize extra cellular matrix and other biological molecules, and facilitate the formation of functional tissues and organs. Bone cements has been developed for biomedical applications for a decade approximately. This kind of cement can be prepared mixing a calcium phosphate salt with aqueous solution forming a paste that can react at body temperature generating a hydroxyapatite precipitated ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). The chemical and morphological similarity between the cement composition and the mineral part of the bones allows osteoconduction in the tissue with replacement of cement by new bone formed with the advantage to not unchain inflammatory processes and of strange body. The objective of this work was the use of the  $\alpha$ -TCP cement for making these scaffolds, through the variation of the amount of liquid phase in the cement and of the use of paraffin spheres as pore source. These spheres were produced by suspension in water solution of poly (vinyl alcohol) and sodium sulphate ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). The phases had been analyzed in the synthesized cement and after the reaction of cure of cement, beyond variation of the particle size and the resistance mechanics with the milling time. It was analyzed the porosity of the scaffolds and the extraction of the paraffin in that supports. The pore size of the supports generated with the variation of the amount of liquid phase was on this side of the size considered ideal for the bone tissue growth. The porosity of scaffolds manufactured with paraffin spheres was observed by Scanning Electron Microscopy (SEM), and its behavior was analyzed from test *in vitro* in SBF solution (simulated body fluid). The use of paraffin spheres allowed the formation of pores size able to permit tissue growth.

**Keywords:** Tricalcium phosphate cement, scaffolds, paraffin microspheres, bioceramics, permeability, biomaterials.

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	I
LISTA DE TABELAS .....	IV
LISTA DE ABREVIACÕES .....	V
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVO .....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
<b>3.1. Materiais Biocompatíveis .....</b>	<b>5</b>
<b>3.2. Classificação dos Biomateriais .....</b>	<b>6</b>
<b>3.3 Aplicações dos biomateriais .....</b>	<b>7</b>
<b>3.4. Biocerâmicas.....</b>	<b>8</b>
3.4.1. Hidroxiapatita.....	9
3.4.2. Outros Fosfatos de Cálcio .....	10
3.4.3. O processo de remodelação óssea .....	11
<b>3.5. Materiais Cimentícios.....</b>	<b>14</b>
3.5.1. Cimento Hidráulico Convencional .....	14
3.5.2. Cimento Portland.....	15
3.5.3. Cimento Ósseo .....	16
3.5.4. Reação de Cura.....	19
<b>3.6. Engenharia de Tecidos .....</b>	<b>20</b>
3.6.1. Materiais para arcabouços.....	21
3.6.1.1. Poliésteres lineares alifáticos .....	22
3.6.1.2. Materiais Cerâmicos .....	23
3.6.2. Tecnologia de fabricação de arcabouços .....	24
3.6.2.1. Tecnologia têxtil .....	24
3.6.2.2. Electrospinning .....	25
3.6.2.3. Técnicas de lixiviação de partículas.....	25
3.6.2.4. Separação de fase.....	26
3.6.2.5. Design de uma arquitetura de poros tridimensionais .....	28
3.6.3. Cerâmicas Porosas.....	31
3.6.3. Obtenção de Cerâmicas Porosas.....	33
3.6.3.1. Método gel esponja .....	33
3.6.3.2. Método gelcasting de espumas .....	33
3.6.3.3. Replicação de estruturas poliméricas porosas .....	34
3.6.3.4. Incorporação de materiais voláteis eliminados durante a queima.....	34
3.6.4. Aplicações e produtos da engenharia de tecidos .....	35
<b>3.7. Permeabilidade.....</b>	<b>37</b>
<b>3.8. Ensaios <i>in vitro</i> - Comportamento em SBF.....</b>	<b>40</b>
3.9.1 História do SBF.....	41
3.9.2. Correlação qualitativa da formação de apatita em SBF com bioatividade <i>in vivo</i> .....	43
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	44
<b>4.1. Obtenção do cimento de fosfato tricálcico .....</b>	<b>44</b>
<b>4.2. Obtenção das esferas de parafina .....</b>	<b>45</b>
<b>4.3. Obtenção dos arcabouços.....</b>	<b>46</b>
<b>4.4. Caracterização.....</b>	<b>46</b>
4.4.1. Difração de raios X.....	46
4.4.2. Espectroscopia de infravermelho .....	46

4.4.3. Difração de Laser (granulometria) .....	47
4.4.4. Análise termodiferencial .....	47
4.4.5. pH .....	48
4.4.6. Porosidade aparente .....	49
4.4.7. Porosidade .....	49
4.4.8. Resistência mecânica à compressão .....	50
4.4.9. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	51
4.4.10. Permeabilidade .....	51
<b>4.5. Ensaio <i>In Vitro</i> .....</b>	<b>52</b>
4.5.1. Ensaio em SBF.....	52
4.5.2. Ensaio de viabilidade celular .....	53
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>5.1. Síntese do cimento de fosfato tricálcico .....</b>	<b>54</b>
<b>5.2. Determinação do tamanho de partícula e tempo de moagem.....</b>	<b>58</b>
<b>5.3. Reação de cura.....</b>	<b>61</b>
<b>5.4. Variação da porosidade com a fase líquida .....</b>	<b>63</b>
<b>5.5. Obtenção de esferas de parafina .....</b>	<b>69</b>
<b>5.6. Obtenção dos arca-bouços.....</b>	<b>73</b>
<b>5.7. Permeabilidade.....</b>	<b>81</b>
<b>5.8. Ensaio <i>in vitro</i>.....</b>	<b>84</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>90</b>
<b>7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>93</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>94</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1: Exemplos de aplicações clínicas típicas dos biomateriais (HENCH, 1999). .....	8
Figura 3.2: Fotomicrografia de MEV mostrando a estrutura trabecular típica de osso esponjoso (GRAYFIELD OPTICAL, 2005).....	13
Figura 3.3: Representação do diagrama de fases do sistema $2\text{Ca.P}_2\text{O}_5$ e $\text{CaO}$ (Phase diagrams for ceramists, 1984). .....	19
Figura 3.4: Esquema da técnica para construção de tecidos. ....	20
Figura 3.5: Fotomicrografia de MEV de um arcabouço de não tecido de PGA com um diâmetro de fibra de aproximadamente $15\ \mu\text{m}$ (MA, 2004).....	24
Figura 3.6: Fotomicrografia de MEV de uma espuma de PLLA usando técnica de lixiviação de sal (MA, 1999). .....	26
Figura 3.7: Fotomicrografia de MEV do arcabouço de PLLA fabricado usando uma separação de fase sólido-líquido (MA, 2004).....	27
Figura 3.8 (a): Fotomicrografia de MEV do arcabouço de PLLA com arquitetura microtubular orientada; (b): Cultura de células MC3T3-E1 sobre o arcabouço de PLLA por duas semanas <i>in vitro</i> (MA, 2004).....	27
Figura 3.9: Fotomicrografia de MEV de um arcabouço poroso preparado a partir de uma solução 10% de PLGA (85/15) em uma mistura de dioxano e água (MA, 2004).....	28
Figura 3.10: Fotomicrografias de MEV de arcabouços poliméricos preparados usando esferas de parafina: (a) scaffold de PLLA, esferas de parafina: $200\text{-}420\ \mu\text{m}$ , 100x; (b) PLGA (85/15), esferas de parafina $420\text{-}500\ \mu\text{m}$ , 50x. (MA, 2001) .....	29
Figura 3.11: Fotomicrografias de MEV dos produtos obtidos da adição de PLLA em uma solução de 0,01% em peso contendo (a) $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , (b) $\text{K}_2\text{HPO}_4$ e (c) STP – Tripolifosfato de sódio, sob uma agitação de 450 rpm (MIZUTANIA <i>et al</i> , 2005). .....	30
Figura 3.12: Fotomicrografia de MEV mostrando um arcabouço formado pelas microesferas sinterizadas de PLGA (BORDEN <i>et al.</i> , 2002). .....	31
Figura 4.1. Esquema do permeâmetro. ....	51
Figura 4.2. Fluxograma da produção dos blocos para a análise <i>in vitro</i> .....	52
Figura 5.1: Difratoograma de raios X do DCPD mostrando as fases bruxita e monetita. ....	54
Figura 5.2: Difratoograma de raios X do pirofosfato de cálcio, obtido a partir da calcinação do DCPD por 2h a $550^\circ\text{C}$ . .....	55
Figura 5.3: Difratoograma do cimento de fosfato tricálcico obtido pela reação entre $\gamma\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ e $\text{CaCO}_3$ a $1300^\circ\text{C}$ , durante 5h, seguido de resfriamento brusco. ....	55

Figura 5.4: Termograma mostrando a evolução da reação entre o $\gamma$ -Ca <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> e o CaCO <sub>3</sub> , para a formação do cimento de fosfato tricálcico. ....	56
Figura 5.5: Espectroscopia de infravermelho das amostras de cimento antes e após a reação de cura. ....	57
Figura 5.6: Histograma da distribuição dos tamanhos de partícula para o cimento de fosfato tricálcico obtido após 2,5h de moagem em álcool etílico absoluto. ....	59
Figura 5.7: Comportamento da resistência mecânica do CFC para os diferentes tempos de moagem. ....	60
Figura 5.8: Difratoograma do cimento de fosfato tricálcico após 24h de cura. ....	61
Figura 5.9: Fotomicrografias de MEV de amostras de cimento (a) reagido com relação líquido/pó de 0,4mL/g de solução padrão e (b) reagido com relação líquido/pó de com 0,4mL/g de solução com defloculante. ....	62
Figura 5.10: Variação da densidade geométrica do cimento com o volume de fase líquida utilizado para cada uma das soluções. ....	63
Figura 5.11: Variação da porosidade aparente do cimento com o volume de fase líquida utilizado para cada uma das soluções. ....	64
Figura 5.12: Variação da resistência mecânica à compressão do cimento Portland pela razão água/cimento (LEITE, 2001).....	65
Figura 5.13: Variação da resistência mecânica a compressão do cimento com o volume de fase líquida utilizado para cada uma das soluções.....	65
Figura 5.14: Variação da resistência mecânica do cimento com a porosidade aparente. ....	67
Figura 5.15: Fotomicrografia de uma amostra de cimento contendo 0,7 mL de solução normal, indicando o tamanho dos poros formados. ....	67
Figura 5.16: Fotomicrografia de uma amostra de cimento contendo 1,6 mL de solução normal, indicando o tamanho dos poros formados. ....	68
Figura 5.17: Fotomicrografia de MEV mostrando as esferas de parafina utilizadas na confecção de poros no cimento.....	70
Figura 5.18: Variação da massa de esferas de parafina formada pela quantidade de PVA utilizada na solução.....	71
Figura 5.19: Variação da massa de esferas de parafina formada pela quantidade de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> utilizada na solução.....	71
Figura 5.20: Esquema representativo da deformação e rompimento dos glóbulos para várias razões de viscosidade de um determinado fluxo: (a) 0,0002; (b) 0,7; (c) 1,0; (d) 6,0 (LEE, 2002). ....	72

Figura 5.21: Termograma mostrando a curva de degradação da parafina. ....	73
Figura 5.22: Difratoograma do cimento de fosfato tricálcico após queima a 600°C. ....	74
Figura 5.23: Difratoograma do cimento de fosfato tricálcico após queima a 700°C. ....	75
Figura 5.24: Difratoograma do cimento de fosfato tricálcico após queima a 800°C. ....	76
Figura 5.25: Fotomicrografia de MEV do arcabouço confeccionado com aproximadamente 72,5% de parafina. ....	78
Figura 5.26: Fotomicrografia de MEV do arcabouço confeccionado com aproximadamente 82,2% de parafina. ....	79
Figura 5.27: Variação da porosidade com relação a quantidade de parafina utilizada na confecção dos arcabouços. ....	80
Figura 5.28: Curvas referentes às equações de Forchenheimer para diferentes porosidades estudadas. ....	82
Figura 5.29: Comparação entre os resultados de k1 obtidos neste trabalho com os da literatura. ....	84
Figura 5.30: Comparação entre os resultados de k2 obtidos neste trabalho com os da literatura. ....	84
Figura 5.31: Variação do pH da solução de SBF em função do tempo de imersão. ....	85
Figura 5.32: Difratoogramas de raios X das amostras de cimento de fosfato de cálcio imersas por diferentes períodos em SBF.....	86
Figura 5.33: Células L1210 observadas em microscópio invertido com contraste de fase. Aumento 100x. ....	87
Figura 5.34: Variação da concentração de células vivas pelo tempo de cultura. ....	88
Figura 5.35: Variação do número de células para cada célula colocada em cultivo no dia 0 pelo tempo de cultura. ....	89

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Classificação e algumas propriedades dos principais compostos de fosfato de cálcio (HENCH, 1999).....	11
Tabela 3.2: Tipo de crescimento tecidual de acordo com o tamanho dos poros (MATSURA, 1995). ....	31
Tabela 3.3: Produtos preparados pela engenharia de tecido e aprovados pelo FDA (ano 2003). ....	35
Tabela 3.4. Concentração de íons dos SBF's e do sangue humano.....	43
Tabela 4.1. Composição iônica do SBF. ....	52
Tabela 5.1: Distribuição e tamanho médio de partícula do cimento após intervalos de tempos de moagem a úmido. ....	59
Tabela 5.2: Equações das curvas relativas as porosidades obtidas.....	82
Tabela 5.3: Viabilidade celular (% células vivas) após cultivo durante 24, 48 ou 72 h em contato com HA em disco ou pasta.....	87
Tabela 5.4: Proliferação celular (número de células para cada célula colocada em cultivo no dia 0) nos cultivos controle e em presença do arcabouço, após 24, 48 ou 72 h. ....	88

## LISTA DE ABREVIACÕES

**APS** - persulfato de amônia;

**A/W vitrocerâmicas** – cerâmica vítrea com apatita e wolastonita na composição;

**Biovidro 45S5** – vidro biocompatível com 45% de sílica em sua composição;

**c-SBF** - SBF corrigido

**CDHA** - hidroxiapatita deficiente em cálcio;

**CFC** – Cimento de Fosfato de Cálcio

**CMP** - metafosfato de cálcio;

**CPP** - pirofosfato de cálcio;

**DCPA** - fosfato dicálcico anidro;

**DCPD** - fosfato dicálcico dihidratado;

**DMO** – Densidade Mineral Óssea

**D.P.** - desvio padrão;

$d_{\text{poro}}$  - diâmetro do poro;

**DRX** - difração de raios X;

**DTA** – Análise térmica diferencial;

**DTP** - distribuição do tamanho de partículas;

**ET** – Engenharia de Tecidos

**FDA** - Food and Drug Administration

**HA** -  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  – hidroxiapatita;

**HAC** - Hidroxiapatita carbonatada;

**HAP** - hidroxiapatita precipitada;

**IV** - Espectroscopia de Infravermelho,

**IV-FT** - Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier,

$k_1$  - constante de permeabilidade Darciana;

$k_2$  - constante de permeabilidade não-Darciana;

**kg** - quilograma;

**L** - espessura do meio poroso;

**LR** - linha basófila de reversão;

**MEV** - microscopia eletrônica de varredura;

**MET** - microscopia eletrônica de transmissão;

**mL** - mililitro;



**mm** - milímetro;

**MPa** - Mega Pascal;

**N** - Newton;

**n-SBF** – SBF novo

**NO** - neoformação óssea;

**OCP** - Fosfato octacálcico;

**OHA** - Oxiapatita;

**Pa** - Pascal;

**PEGDMA** - Poli(etileno glicol) dimetacrilato;

**PGA** – Poli (ácido glicólico);

**PLGA** – Poli (ácido láctico-co-glicólico)

**PLLA** – Poli (ácido l-láctico)

**PVA** – Poli (álcool vinílico)

**r-SBF** - SBF revisado;

**Re** - número de Reynolds;

**RPM** - rotações por minuto;

**SBF** - simulated body fluid (solução simulada de fluidos corpóreos)

**TCP** - fosfato tricálcico;

**TEP** – Tissue Engineered Products (produtos preparados pela engenharia de tecidos)

**TTCP** - Fosfato tetracálcico;

**TEMED** - N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina;

**TMP** – tamanho médio de partícula

**Vs** - velocidade de escoamento;

**$\alpha$ -TCP** - fase alfa do fosfato tricálcico;

**$\beta$ -TCP** - fase beta do fosfato tricálcico;

**$\mu$**  - viscosidade do fluido;

**$\mu\text{m}$**  - micrômetro;

**$\sigma_c$**  - tensão máxima de compressão (MPa);

**$\rho$**  - densidade do fluido;

## 1. INTRODUÇÃO

A Engenharia de Tecidos consiste no desenvolvimento e manipulação de moléculas, células, tecidos, ou órgãos crescidos em laboratório para substituir ou apoiar a função de partes de corpo defeituosas ou danificadas. Ela é um campo interdisciplinar que aplica os princípios de engenharia e ciências biológicas para desenvolver substitutos biológicos para restaurar, manter e melhorar as funções dos tecidos. Embora células tenham sido cultivadas, ou crescidas, fora do corpo por muitos anos, a possibilidade de crescer tecidos tridimensionais complexos, literalmente reproduzindo a forma e função do tecido humano, é um desenvolvimento recente. A engenharia de tecidos tem a intenção de cultivar virtualmente todo tipo de tecido humano - fígado, osso, músculo, cartilagem, vasos sanguíneos, músculos do coração, nervos, pâncreas, e outros (FREED *et al.*, 1993).

Um componente chave na engenharia do tecido para a regeneração de tecidos é o arcabouço que serve como um molde para interações celulares e a formação da matriz extracelular para fornecer a sustentação estrutural ao novo tecido formado. Os arcabouços para a formação de tecidos devem atender a determinados critérios para servir a esta função, incluindo as propriedades mecânicas adequadas àquelas do local, além de biocompatibilidade e uma biodegradabilidade a uma taxa proporcional com a remodelagem. Os arcabouços servem como estruturas condutivas, desde que o novo tecido seja formado pelo crescimento do tecido vivo adjacente.

A utilização de certos materiais como implantes não é um conceito novo. Os biomateriais são utilizados desde o tempo em que o homem dava seus primeiros passos na medicina e na odontologia, mas só depois da segunda guerra mundial houve um avanço significativo nesse ramo da engenharia dos materiais.

Os principais avanços no campo dos biomateriais têm ocorrido principalmente devido ao aumento do número de pacientes em função do aumento da população e da expectativa de vida. O aumento da expectativa de vida aumenta o número de pacientes nos hospitais em função principalmente da ocorrência de osteoporose e de acidentes nos meios de transporte. As patologias que mais comumente necessitam de enxerto ósseo são as pseudo-artroses dos ossos longos. Isto é, a ausência de consolidação desses ossos que necessitam serem fixadas cirurgicamente com placas e parafusos e terem a osteogênese estimulada pelo uso do enxerto. Usa-se enxerto ósseo também nas reconstruções articulares sejam primárias quando são usadas próteses não cimentadas ou quando é secundária em situação de revisão de próteses que sofreram falhas.

Um cimento de fosfato de cálcio pode ser preparado misturando um sal de fosfato de cálcio com água ou com uma solução aquosa para que se forme uma pasta que possa reagir à temperatura ambiente e ou corporal dando lugar a um (ou mais) precipitado que contenha fosfatos de cálcio, normalmente hidroxiapatita, ocorrendo a cura pelo intercruzamento dos cristais deste precipitado.

Este novo material biocompatível pode ser absorvido pelo organismo com o passar do tempo com a particularidade de seus produtos de degradação não causarem uma resposta negativa por parte do tecido vivo. A similaridade química entre a composição do cimento e a parte mineral dos tecidos ósseos permite a osteocondução dos tecidos ósseos, sendo o cimento substituído por tecido ósseo novo (HENCH, 1999).

Esse tipo de material é um substituto sintético dos ossos, com a vantagem de não ter reações de rejeição ou alérgicas, além de não estar relacionado à formas patogênicas que poderiam infectar o paciente (RAVAGLIOLI *et al.*, 1992). Estes cimentos são usados principalmente para as operações de preenchimento ósseo, que requer operações cirúrgicas extremamente invasivas.

Cerâmicas porosas à base de hidroxiapatita possuem grande potencial de aplicação na área de implantes ósseos, principalmente na reconstituição, reparos e preenchimento de cavidades ósseas decorrentes de processos inflamatórios, acidentes ou osteoporose (LIU, 1996; FABRI, 1995; RAVAGLIOLI; KRAJEWSKI, 1995; HENCH, 1998). Os implantes porosos possuem uma alta área superficial, o que permite uma maior área de contato entre o implante e o tecido hospedeiro, o que aumenta a resistência da interface e evita mobilidade do implante, diminuindo assim as chances de respostas inflamatórias. A presença de macroporosidade interconectada provê um reticulado permeável que permite a incorporação e crescimento de tecido ósseo em seu interior (RAVAGLIOLI; KRAJEWSKI, 1995; HENCH, 1998).

Inúmeros processos são atualmente utilizados para produzir cerâmicas porosas (SEPÚLVEDA, 1997; LIU, 1996). As técnicas mais simples se baseiam na incorporação de uma segunda fase orgânica na composição do material cerâmico, em proporções e tamanho controlados, que após sua eliminação deixam vazios de mesmo tamanho. A incorporação de uma segunda fase orgânica na composição do material cerâmico, em proporções e tamanho controlados, permite o controle do tamanho de poros pela eliminação posterior da fase orgânica, com a sinterização. Após a sinterização o corpo final apresenta poros com o mesmo tamanho das fases orgânicas inseridas na mistura.

O desenvolvimento de estruturas porosas de cimento de fosfato de cálcio é de grande utilização em engenharia de tecidos, além de outras áreas da traumatologia. Existem diversos trabalhos publicados na área de biomateriais no Brasil, em especial sobre a obtenção e caracterização de hidroxiapatita na forma de pó. Entretanto, são poucos os trabalhos versando sobre cimentos de fosfato de cálcio, em especial o sistema  $\alpha$ -fosfato tricálcico ( $\alpha$ -TCP), e principalmente, não há trabalhos nacionais na obtenção de estruturas porosas desses materiais. Apesar disso, a obtenção de materiais porosos requer tecnologias de processamento de pós e de caracterização de biomateriais que são disponíveis no país, o que pode permitir a obtenção de materiais com custos relativamente baixos e de elevada qualidade.

## **2. OBJETIVO**

O objetivo do trabalho foi a obtenção e caracterização de suportes tridimensionais para a engenharia de tecidos, com uma matriz baseada em cimento de fosfato tricálcico, utilizando como meio gerador de poros, excesso de fase líquida e, microesferas de parafina. Para o cimento de fosfato tricálcico serão estudadas as condições de processamento e síntese e, para as microesferas de parafina, as condições que levam à formação das mesmas.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Materiais Biocompatíveis**

A definição de biomateriais mais aceita atualmente é a da Conferência de Consenso (1982) que conceitua biomaterial como qualquer substância ou combinação destas, que não sejam drogas ou fármacos, de origem natural ou sintética, que pode ser usado por qualquer que seja o intervalo de tempo, aumentando ou substituindo parcial ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função do organismo, com a finalidade de manter ou melhorar a qualidade de vida do indivíduo.

Assim, biocompatibilidade significa que o material e seus possíveis produtos de degradação devem ser tolerados pelos tecidos envoltórios e não devem causar prejuízos ao organismo a curto e longo prazo.

Para que um material seja aceito clinicamente como um material de implante, ele precisa atender a alguns requisitos fundamentais (RAVAGLIOLI, 1992):

- O material deve ser biocompatível, ou seja, sua presença não deve causar efeitos nocivos no local do implante ou no sistema biológico;
- Os tecidos não devem causar a degradação do material, como por exemplo, corrosão em metais, ou pelo menos causar de forma tolerável;
- O material deve ser bifuncional, ou seja, deve ter as características mecânicas adequadas para cumprir a função desejada, pelo tempo desejado;
- O material deve ser esterilizável.

Paralelamente a biocompatibilidade, é importante que o implante permita o desempenho imediato e com êxito da função específica (estática e dinâmica) da parte do corpo que está sendo substituída. Esta habilidade está embutida no conceito de biofuncionalidade (RAVAGLIOLI, 1992). Neste conceito estão incorporados também, os problemas associados à degradação química dos materiais, visto que o meio fisiológico pode ser bastante agressivo mesmo aos materiais considerados extremamente inertes quimicamente, levando à redução da eficiência do implante (HENCH, 1999).

### 3.2. Classificação dos Biomateriais

Nenhum material de implante é sempre inerte, quando em contato com os fluidos corpóreos, sendo que todos causam um tipo de resposta no tecido hospedeiro (WILSON, 1997). Assim os biomateriais podem ser classificados de acordo com seu comportamento em meio fisiológico em (HENCH, 1999):

**Biotoleráveis:** materiais apenas tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes através da formação de camada envoltória de tecido fibroso. Atinge-se assim, no máximo, a chamada “osteoproximação” a distância, provavelmente induzida pela liberação por parte do material de componentes (p. ex. monômeros, íons, produtos de corrosão) que se alojam no tecido hospedeiro. A espessura desta camada, assim como sua composição, depende do tipo de material empregado. Quanto maior a espessura da camada de tecido fibroso formado, menor a tolerabilidade dos tecidos ao material. Os materiais biotoleráveis são praticamente todos os polímeros sintéticos, como o Polietileno de Alta Densidade Linear (PEAD) utilizado na cabeça de próteses femorais, assim como a grande maioria dos metais.

**Bioinertes:** materiais também tolerados pelo organismo, em que a formação de envoltório fibroso é mínima, praticamente inexistente. O material não libera nenhum tipo de componente ou, mais realisticamente, o faz em quantidades mínimas. A quantidade de células fagocitárias na interface é mínima. A resposta fagocitária será passageira e uma fina cápsula tomará lugar após o implante. Em alguns casos, esta camada é praticamente imperceptível. Os materiais bioinertes mais utilizados são alumina, zircônia, titânio, ligas de titânio e carbono.

**Bioativos:** materiais em que ocorrem ligações de natureza química entre material e tecido ósseo (osteointegração), em função da similaridade química entre estes materiais e a parte mineral óssea. O colágeno e a fase mineral do osso adjacente são depositados diretamente sobre a superfície do material do implante, dando origem a uma ligação resistente à tração entre o material bioativo e o osso. Os principais materiais desta classe são os vidros e vitrocerâmicas à base de fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita e os compostos de fosfato de cálcio.

**Absorvíveis:** materiais que após certo período de tempo em contato com os tecidos acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Tais materiais são extremamente interessantes em aplicações clínicas em função de ser desnecessária nova

intervenção cirúrgica para a retirada do material de implante. Os principais exemplos destes materiais são: o fosfato tricálcico (TCP) e o ácido polilático.

### **3.3 Aplicações dos biomateriais**

A reconstituição e substituição de tecidos duros tais como ossos e dentes têm sido mais desenvolvidos do que a de tecidos moles. Materiais como metais, cerâmicas, polímeros e compósitos são comumente utilizados na cirurgia reconstrutiva de ossos das regiões craniana e maxilofacial. Os materiais bioinertes (p.ex. alumina) não apresentam qualquer tipo de reatividade quando introduzidos no corpo humano devido às baixas taxas de dissolução.

Já os metais, muitas vezes preferidos pela sua melhor trabalhabilidade, quando colocados em contato com o meio fisiológico, inclusive os considerados mais resistentes à corrosão, sucumbem devido à sua alta reatividade e troca iônica com os fluidos corpóreos. Os metais são mais freqüentemente usados para dispositivos como discos, pinos, parafusos, suturas e placas ósseas. Neste caso, torna-se interessante impedir ou ao menos reduzir o seu contato superficial com o meio. Para tal, encontram-se disponíveis técnicas de recobrimento de metais, bem como de vários outros materiais. Em particular, foram desenvolvidos os processos de recobrimento com alumina ( $Al_2O_3$ ) e, nos últimos anos, aperfeiçoaram-se cada vez mais os de hidroxiapatita. Estes últimos, entretanto, apresentam problemas associados às diferenças das constantes elásticas com o substrato, bem como dão origem ao fenômeno de ruptura ou descolamento da base (HENCH, 1999).

Já as cerâmicas bioativas como hidroxiapatita, têm sido largamente empregadas na expansão do suporte alveolar de mandíbulas e maxilares atrofiados e/ou pequenos defeitos de contorno em ossos faciais. Os materiais absorvíveis (p.ex. fosfato tricálcico), por outro lado, não podem ser empregados para revestimentos, pois desintegram após um curto período de tempo, normalmente antes de serem substituídos por material fisiológico. Adicionalmente à instabilidade mecânica, se usado para evitar o contato metal/meio fisiológico, o problema, obviamente, persistiria (HENCH, 1999).

A partir do final dos anos 70 tem se utilizado granulados à base de hidroxiapatita e fosfato tricálcico como carga de preenchimento (ao menos, temporárias) para cavidades ósseas (p.ex. tumores) ou no tratamento de doenças ósseas de efeito desmineralizante (como p.ex. osteoporose).



Ainda na classe dos materiais bioativos, a nova geração de vidros, definidos como biológicos tem mostrado resultados bastante promissores na restauração de defeitos (p.ex. reconstituição do queixo), além de em algumas aplicações específicas como, por exemplo, o recobrimento de substratos metálicos (HENCH, 1999).

Além disso, colágeno, polímeros (como poliuretanas, borrachas à base de silicone, poli (metil-metacrilato), poli (tetrafluor-etileno), entre outros e compósitos à base de polímeros vem sendo cada vez mais utilizados em regiões onde atuam esforços mecânicos reduzidos, como por exemplo, nos preenchimento de contornos de ossos. Mais recentemente, o biomaterial colágeno vem despertando grandes expectativas, cujo potencial está sendo investigado, em especial, em combinação com hidroxiapatita ou vidro bioativo para aplicações que visam à restauração de pequenos defeitos em ossos faciais. Algumas aplicações típicas dos biomateriais podem ser vistas na Figura 3.1.

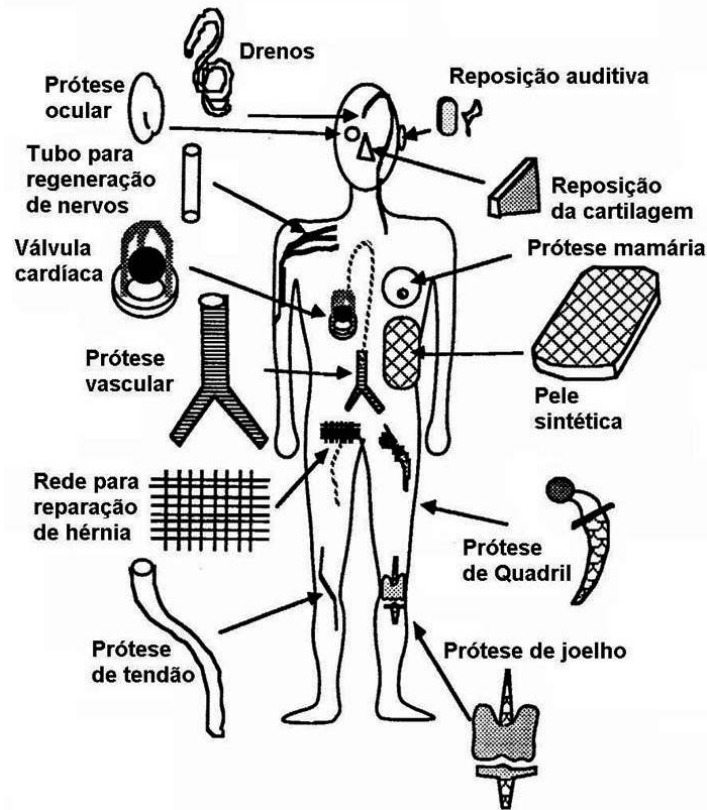


Figura 3.1: Exemplos de aplicações clínicas típicas dos biomateriais (HENCH, 1999).

### 3.4. Biocerâmicas

Tradicionalmente, as cerâmicas têm sido usadas em grande escala como materiais restauradores na odontologia. Isto inclui materiais para coroas dentárias, cimentação e

dentaduras (SKINNER, 1993; LE GEROS, 1991). Entretanto, seu uso em outros campos da medicina não tem sido muito extensivo comparado com metais e polímeros. Eles são geralmente usados para recolocar ou fixar tecidos conectivos duros, tais como osso, que não passa de um composto, compreendendo uma fase orgânica e uma fase cerâmica. Esta fase cerâmica é predominantemente HA ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) com uma razão Ca/P de 1,67. Então a hidroxiapatita sintética é um biomaterial biocompatível para implante.

Sob implante, a HA forma uma ligação próxima ao osso. Se esta ligação é química na natureza, ou meramente uma interdição mecânica, é ainda um item de discussão. Portanto, vários implantes metálicos dentários e ortopédicos são revestidos com HA para garantir uma fixação a longo prazo ao osso. A HA é muito dura e muito frágil para ter função de suportador de tensões.

Segundo Alves *et al.* (2003), a cerâmica densa tem sido objeto de estudos para aplicações de suporte de cargas, um exemplo, é a alumina de alta pureza. Ela é usada como suporte em próteses de quadril e de joelho. Esses implantes exibem baixa fricção e desgaste, proporcionando uma alta vida útil do componente. A zircônia, que exibe um baixo módulo de elasticidade e uma elevada resistência, está também sendo estudada para ser usada como cabeça de encaixe em tais implantes.

Uma classe de cerâmicas vidradas bioativas tem sido desenvolvida e testada extensivamente nos últimos trinta anos. Sob implantes, esses materiais, que são conhecidos como vidros de superfície ativa, passam por uma modificação na sua superfície e produzem uma camada de uma forma muito bioativa de hidroxiapatita. Como o osso é formado em oposição a esta camada, ela forma uma ligação muito forte. O melhor vidro de superfície ativa conhecido é o Bioglass 45S5, desenvolvido por Larry Hench na Universidade da Flórida. Entretanto, mais uma vez, a escala de uso destes materiais tem sido limitada devido a sua natureza frágil.

#### 3.4.1. Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HA) é um fosfato de cálcio hidratado ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), componente majoritário (cerca de 95%) da fase mineral dos ossos e dentes humanos. A palavra hidroxiapatita é formada pela junção das palavras hidroxi e apatita. Hidroxi refere-se ao grupo hidroxila (OH) e apatita ao nome do mineral de fosfato de cálcio.

A HA é o material que compõe o esqueleto dos vertebrados, devido à sua capacidade de atuar como reserva de cálcio e fósforo. Além disso, a HA biológica é ainda composta

por íons em concentrações diversas, tais como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ , etc., permitindo o controle desses importantes íons nos líquidos corporais por meio da sua liberação ou armazenamento.

Devido à similaridade química da HA com a fase mineral dos tecidos ósseos, a HA é um dos materiais mais biocompatíveis conhecidos, favorecendo o crescimento ósseo para os locais em que ela se encontra (osteocondutor), estabelecendo ligações de natureza química com o tecido ósseo, permitindo a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas, sendo que as células não distinguem entre a HA e a superfície óssea, o que indica a grande similaridade química superficial.

A superfície da HA permite a interação de ligações do tipo dipolo, fazendo que moléculas de água, proteínas e colágeno sejam adsorvidos na superfície induzindo, assim, a regeneração tecidual. As principais aplicações da HA são reparos de defeitos ósseos em aplicações odontológicas e ortopédicas, aumento de rebordo alveolar, regeneração guiada de tecidos ósseos, reconstrução bucomaxilofacial, equipamentos percutâneos, reparo e substituição de paredes orbitais, substituição do globo ocular e extensivamente no recobrimento de implantes metálicos.

A solubilidade da HA sintética é extremamente baixa, sendo que para HA sinterizada a taxa de solubilidade em tecido subcutâneo é cerca de 0,1mg/ano. Entretanto a HA pode apresentar-se em diferentes formas, porosidade, cristalinidade, defeitos cristalinos, entre outros, o que interfere diretamente na solubilidade e capacidade de absorção pelo organismo do material. Assim, é possível obter-se HA desde praticamente não absorvível até totalmente absorvível em meio fisiológico em função dos diferentes métodos e condições de obtenção.

#### 3.4.2. Outros Fosfatos de Cálcio

Além da HA discutida anteriormente em virtude da sua importância e extensivo uso comercial, existe ainda uma extensa lista de compostos de fosfatos de cálcio. 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.

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

O fosfato tricálcico é solúvel em soluções ácidas, enquanto que em soluções alcalinas ele se apresenta insolúvel. Além disso, a solubilidade do fosfato tricálcico modifica-se na presença de aminoácidos, proteínas, enzimas e outros compostos orgânicos.

Tabela 3.1. Classificação e algumas propriedades dos principais compostos de fosfato de cálcio (HENCH, 1999).

<b>Composto</b>	<b>Sigla</b>	<b>Fórmula química</b>	<b>Ca/P</b>	<b>Resposta biológica</b>
Metafosfato de Cálcio	CMP	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,5	Forte atividade macrofágica
Piroforfato de Cálcio	CPP	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1	Forte atividade macrofágica
Fosfato Dicálcico Anidro	DCP	$\text{CaHPO}_4$	1	Fraca atividade macrofágica
Fosfato Dicálcico Dihidratado	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1	Fraca atividade macrofágica
Fosfato Octacálcico Pentahidratado	OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33	Absorvível
Fosfato Tricálcico	TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	Absorvível
Hidroxiapatita	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67	Ativo biologicamente
Fosfato Tetracálcico	TeCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2	Sem relevância clínica

### 3.4.3. O processo de remodelação óssea

O osso é um tecido extremamente complexo, com três componentes principais: matriz orgânica, componente mineral e componente celular (osteoblastos, osteoclastos e osteócitos). O esqueleto é composto por dois tipos de ossos: o cortical e o trabecular. O osso cortical é responsável por 80% da massa esquelética. O osso trabecular constitui cerca de 20% da massa esquelética (BALSAMO, 2002) e na sua superfície o número de células por unidade de volume é maior do que no osso cortical, o que determina sua maior atividade metabólica. Possui cerca de 80% da superfície disponível para remodelação devido a sua alta porosidade.

Microscopicamente, os ossos são formados por cristais de HA e fibras de colágeno, as quais estão embebidas em uma substância amorfa que contém mucopolissacarídeos. Este tecido de sustentação está em constante remodelação, através do qual o osso velho é substituído por osso novo, numa espécie de programa de manutenção preventiva, através de um mecanismo mediado basicamente por dois tipos de células denominadas osteoblastos e os osteoclastos. A atividade anabólica do osso (formação) é mediada pelos osteoblastos, que derivam das células-tronco do tecido conjuntivo, as quais são responsáveis pela síntese dos constituintes orgânicos do osso (fibras colágenas e mucopolissacarídeos) e conseqüentemente pela calcificação.

A atividade catabólica (reabsorção) é mediada pelos osteoclastos, que são células gigantes multinucleadas da linhagem dos macrófagos derivadas de monócitos circulantes e que possuem grande número de enzimas. Essa fase de formação pode levar vários meses para se estabelecer. Sob condições normais, a quantidade de osso novo sintetizado em cada sítio de remodelação é exatamente igual àquela que foi removida pelos osteoclastos. Calcula-se que os adultos remodelem de 10 a 30% da sua massa óssea a cada ano. Há pouco mais de vinte anos, pesquisadores constataram que atletas competitivos freqüentemente apresentavam fraturas. Desde então, pesquisas foram direcionadas visando observar a densidade mineral óssea (DMO) em atletas e indivíduos não-competidores, objetivando traçar a melhor estratégia para evitar o desgaste ósseo e entender melhor a interação nutrição-exercício em um processo preventivo.

Segundo Bloomfield (2002), a DMO é a quantidade mineral em uma determinada área de tecido ósseo. É relacionada diretamente com a resistência óssea. Dependendo desta quantidade óssea, é possível diagnosticar dois tipos de deficiências mais conhecidas:

i) Osteoporose: é a diminuição do conteúdo mineral ósseo, provocando com isso, aumento da porosidade óssea. Taxas que demonstrem um decréscimo da DMO acima de 2,5%, comparadas com valores encontrados em adultos jovens saudáveis, clinicamente já são consideradas como um quadro de osteoporose;

ii) Osteopenia: é o momento no qual o processo degenerativo da massa óssea se encontra em valores menores que os determinados para o quadro de osteoporose.

Segundo Gibson *et al.* (1985) é importante definir que o termo “osso esponjoso” se refere à estrutura esponjosa, enquanto que o termo “osso trabecular” se refere ao material trabecular (tecido ósseo encontrado no osso esponjoso). A palavra trabécula significa “pequena trave” em latim. Uma trabécula individual é um único suporte do osso esponjoso (GIBSON *et al.*, 1985).

A Figura 3.2 apresenta uma fotomicrografia da estrutura trabecular típica de osso esponjoso, obtida por microscopia eletrônica de varredura (GRAYFIELDOPTICAL, 2005).

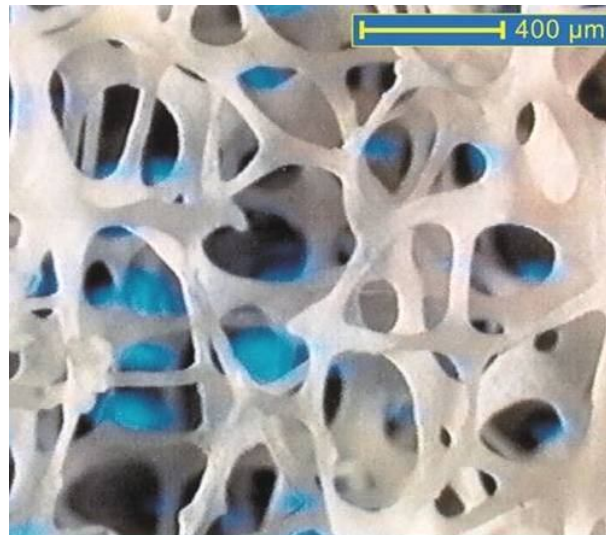


Figura 3.2: Fotomicrografia de MEV mostrando a estrutura trabecular típica de osso esponjoso (GRAYFIELDOPTICAL, 2005).

O osso esponjoso é uma estrutura mecânica biológica cujas propriedades são impossíveis de serem entendidas sem se considerar a sua biologia. A atividade celular desse osso ocorre pelo transporte de metabólitos entre o tecido duro trabecular e a medula. As trabéculas humanas são raramente servidas internamente por suprimento de sangue, sugerindo que os mecanismos de transporte são difusão e uma coleção de transporte ativo de metabólitos, podendo explicar: a) a íntima relação entre a superfície e o volume ósseo e b) o declínio exponencial da fração do volume ósseo durante períodos de desuso mecânico.

Como foi citado anteriormente, o remodelamento ósseo é um evento que ocorre na superfície, o osso trabecular, tendo uma área superficial maior que a área do osso cortical, apresenta um remodelamento ósseo de cerca de 8 vezes maior, apesar de osso trabecular ter 4 vezes menos massa do que o cortical (KAPLAN, 1994). Ignorando os detalhes microanatômicos de cada fase, o osso trabecular pode ser considerado um material com duas fases: tecido duro e medula. A estrutura do osso esponjoso é formada por uma rede interconectada de longas, finas e rugosas traves cilíndricas e placas (trabéculas), rodeadas por um mar de medula. Uma rede formada somente por traves produz baixa densidade, enquanto que uma outra formada por traves e placas fornece densidades mais elevadas.

O osso esponjoso é constituído por trabéculas individuais. Cada uma com sua própria rigidez (rigidez material), as trabéculas formam uma estrutura que, por sua vez, apresenta

rigidez própria (rigidez estrutural). A arquitetura do osso trabecular descreve a forma do osso e a sua orientação. A estrutura básica descreve a conectividade geral da trabécula, a espessura das trabéculas principais, o espaçamento entre as trabéculas e o número de trabéculas (KAPLAN, 1994). As diferentes arquiteturas existentes no osso trabecular resultam de uma anisotropia das propriedades elásticas do tecido.

Em uma amostra na medida em que a densidade aumenta, as travessuras progressivamente se espalham e se achatam, formando placas, e por fim se fundem, formando uma estrutura com aspecto de células fechadas (GIBSON *et al.*, 1985). Enquanto que o osso cortical tem uma densidade estrutural de cerca de  $1,8\text{g/cm}^3$  o osso trabecular atinge densidades entre  $0,15$  e  $1\text{g/cm}^3$  (ASHMAN *et al.*, 1988). Quando as cargas sobre um osso são alteradas, o remodelamento funcional reorienta as trabéculas de modo que elas se alinham com a nova trajetória da tensão principal. As trabéculas são dispostas segundo as orientações que correspondem às linhas de força que o osso suporta.

### **3.5. Materiais Cimentícios**

#### **3.5.1. Cimento Hidráulico Convencional**

Um cimento hidráulico pode ser definido como um material que tem o seguinte comportamento: o componente sólido pode formar uma pasta plástica quando misturado com água ou uma solução aquosa, e ao mesmo tempo resiste a esses líquidos. A pasta perde a sua plasticidade passado um tempo, sua resistência mecânica aumenta progressivamente, alcançando seu valor máximo depois de um período de tempo que pode ser de horas a dias. O cimento Portland é um exemplo típico desta classe. O gesso, mesmo endurecendo quando misturado com água, não pertence a essa classe devido à sua não-resistência à ação prolongada nesse líquido, no qual é solúvel.

A pega e endurecimento são resultados de uma reação química que pode ser de dissolução, precipitação ou hidrólise (NEVILLE, 1997). A pega é identificada como um certo estágio coloidal durante o desenvolvimento de uma rede cristalina, inicialmente fraca e tixotrópica, enquanto o processo de endurecimento denota o desenvolvimento de uma estrutura cristalina mais forte e irreversível. Esta teoria geral segue aquela de Le Chatelier que atribui o endurecimento à cristalização, mas a introdução do conceito de um estágio coloidal inicial tem o mérito de proporcionar explicações de uma variedade de fenômenos associados à medição e pega de cimentos. 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 a 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).

Os fatores que afetam as propriedades dos cimentos, tais como sua plasticidade inicial, tempo de pega ou resistência mecânica, são (NEVILLE, 1997):

- composição;
- tamanho de partícula;
- relação pó/líquido;
- temperatura.

### 3.5.2. Cimento Portland

Basicamente, o cimento Portland é formado por determinados componentes anidros que ao entrarem em contato com a água, reagem com a mesma, formando produtos hidratados cujas reações são a origem do processo de endurecimento (PETRUCCI, 1987). Desta forma, a pasta endurecida é formada pelos produtos hidratados dos diversos componentes, geralmente cristais de hidróxido de cálcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ), alguns compostos menores, cimento não-hidratado e por espaços residuais cheios de água na pasta fresca.

Os vazios são conhecidos como poros capilares, mas no interior do gel existem vazios intersticiais, denominados poros de gel. Genericamente, o diâmetro nominal dos poros de gel tem ordem de grandeza de milímetros, enquanto que os poros capilares são uma ou duas ordens de grandeza menores.

O cimento Portland anidro resulta da moagem do clínquer com uma pequena quantidade de sulfato de cálcio. O clínquer é uma mistura heterogênea de vários minerais produzidos em reações a altas temperaturas, entre óxido de cálcio e sílica, alumina e óxido de ferro (MEHTA *et al.*, 1994).

Quando o cimento é disperso em água, o sulfato de cálcio e os compostos de cálcio formados a altas temperaturas tendem a entrar em solução, e a fase líquida torna-se rapidamente saturada em várias espécies iônicas. Após alguns minutos de hidratação do cimento Portland, as reações entre o cálcio, o sulfato, o aluminado e os íons hidroxila resultam no aparecimento dos primeiros cristais aciculares de sulfoaluminato de cálcio



hidratado chamado etringita. Após algumas horas, aparecem cristais prismáticos grandes de hidróxido de cálcio e pequenos cristais fibrilares de silicato de cálcio hidratado que preenchem os espaços vazios inicialmente ocupados pela água e pelas partículas de cimento em solução (MEHTA *et al.*, 1994).

### 3.5.3. Cimento Ósseo

Dentre os cimentos mais popularizados para enxerto ósseo destaca-se o poli (metilmetacrilato) (PMMA), utilizado principalmente na fixação de próteses articulares. Conceitualmente, esta resina não deveria ser chamada de cimento, visto que sua reação de cura não envolve reações de hidratação. O PMMA apresenta ainda uma série de inconveniências. 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).

Outros fatores como monômeros não reagidos e superfícies pontiagudas resultantes podem ocasionar sérias complicações após o implante. Além do mais, o poli (metilmetacrilato), 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 recentes no mundo inteiro, devido a sua menor probabilidade de causarem reações negativas por parte do tecido vivo (GROOT, 1983). Favoravelmente, cimentos a base de fosfatos de cálcio tem sido utilizados como enxerto ósseo com um percentual de sucesso muito grande nesta última década.

O termo “cimento de fosfato de cálcio” (CFC) foi introduzido por Gruninger e colaboradores (GRUNINGER *et al.*, 1984). Segundo eles, 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 corporal dando lugar a um precipitado que contenha um ou mais fosfato de cálcio e ocorrendo a cura pelo intercruzamento dos cristais deste precipitado.

Os cimentos de fosfato de cálcio, como o fosfato tricálcico, por exemplo, tipicamente desenvolvem a reação de cura expressa pela Equação (1).



Assim sendo, é promissora a sua utilização nas áreas de odontologia, cirurgia bucomaxilofacial e ortopedia como substituinte da sua antecessora, a HA, 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*).

Esses cimentos reúnem uma série de vantagens que permitem seu uso como preenchimento e substituto de partes danificadas do sistema ósseo, dentre as quais estão:

- i) a preparação do cimento é realizada no ato cirúrgico;
- ii) curto tempo de moldagem e enxerto;
- iii) exige mínima cavidade para o implante;
- iv) o cimento ajusta-se à geometria óssea específica do paciente;
- v) ótimo contato entre osso e implante;
- vi) curto tempo de cura à temperatura corporal;
- vii) não apresenta retração nem expansão durante a cura;
- viii) não há liberação de calor durante a cura;
- ix) o pH da massa de cimento permanece neutro durante e após a cura;
- x) a resistência à compressão final é compatível com a dos ossos;
- xi) o cimento é biocompatível e estimula a neoformação óssea.

As aplicações dos CFC ainda não estão bem estabelecidas, em função de não existirem ainda produtos comerciais com tempo de utilização suficiente. Até o momento são consagradas no mercado três marcas de CFC comerciais: NORIAN<sup>®</sup> *Skeletal Repair System* (Norian Corp., Cupertino CA, USA), CEMENTEK<sup>®</sup> (Teknimed S.A., Vion Bigorre, França) e BIOCEMENT<sup>®</sup> D (Merck Biomaterial, Darmstadt, Alemanha). Em estudos comparativos de algumas propriedades destes cimentos observa-se que, o Biocement D tem propriedades superiores, seguido do Norian SRS e pelo Cementek, nessa ordem (DRIESSENS *et al.*, 1998).

Cimentos comerciais, não injetáveis, apresentam uma fração líquido/pó média de 0,35. Esta fração compreende a quantidade mínima de líquido necessária para se obter trabalhabilidade do cimento. Formulações comerciais de CFC, geralmente, contém adições de cerca de 2% de hidroxiapatita precipitada (HAP), podendo conter também cerca de 26% de CaHPO<sub>4</sub> e até 9% de CaCO<sub>3</sub>.

A principal desvantagem dos CFC conhecidos é sua baixa resistência mecânica, que no melhor dos casos consegue alcançar à do osso trabecular que varia entre 2 a 12MPa

(HENCH, 1999). Composições mais resistentes de CFC 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.

Conforme o diagrama de fases da Figura 3.3, no cimento de fosfato tricálcico a fase estável a baixa temperatura é o  $\beta$ -TCP, que, a  $1125^{\circ}\text{C}$ , se transforma em  $\alpha$ -TCP. Esta última fase é estável até  $1430^{\circ}\text{C}$ , quando se transforma em  $\alpha'$ -TCP, estável até a temperatura de fusão. A transformação  $\beta$ -TCP em  $\alpha$ -TCP é lenta e reversível, o que exige, para a obtenção do  $\alpha$ -TCP de maior pureza, a utilização de tempos de patamar elevados a temperaturas superiores a  $1200^{\circ}\text{C}$ , visando assegurar a máxima conversão, e resfriamento brusco para preservar a fase  $\alpha$ -TCP à temperatura ambiente.

Embora numerosos estudos demonstrem a resposta favorável dos CFC's, deve ser notado que um material de enxerto estará em contato não somente com os ossos, mas também com os outros tecidos, como o tecido conectivo e os músculos. Estes tecidos, geralmente, tendem a apresentar uma resposta inflamatória mais severa. Outros estudos mostram que CFC's com prolongado tempo de cura tendem a incitar uma resposta inflamatória por parte do tecido vivo (OOMS *et al.*, 2003).

Segundo Ooms *et al.* (2003), o desprendimento de pequenos fragmentos de cimento, tem maior tendência de provocar uma intensa resposta inflamatória localizada, caracterizada pela presença de macrófagos e células gigantes multinucleadas. Desta forma os CFC's não atuam como substitutos permanentes do osso, apenas temporários, sendo lentamente substituídos por tecido ósseo de nova formação. Este comportamento típico tem sido denominado de osteotransdutividade. A velocidade em que esse fenômeno ocorre depende fortemente do tipo de CFC, do sítio de implantação e da idade do indivíduo receptor, entre outros fatores (DRIESENS *et al.*, 1998). Conforme relatado por Ooms *et al.* (2003), a absorção dos CFC's podem ocorrer de duas maneiras distintas. A primeira seria mediada pelo processo de solução no qual o implante é dissolvido no meio fisiológico. A segunda maneira seria mediada por células gigantes (osteoclastos) que absorveriam o cimento através de fagocitose. No entanto, os mecanismos exatos e fatores que causam a calcificação no local de implante de CFC's necessitam de maiores investigações.

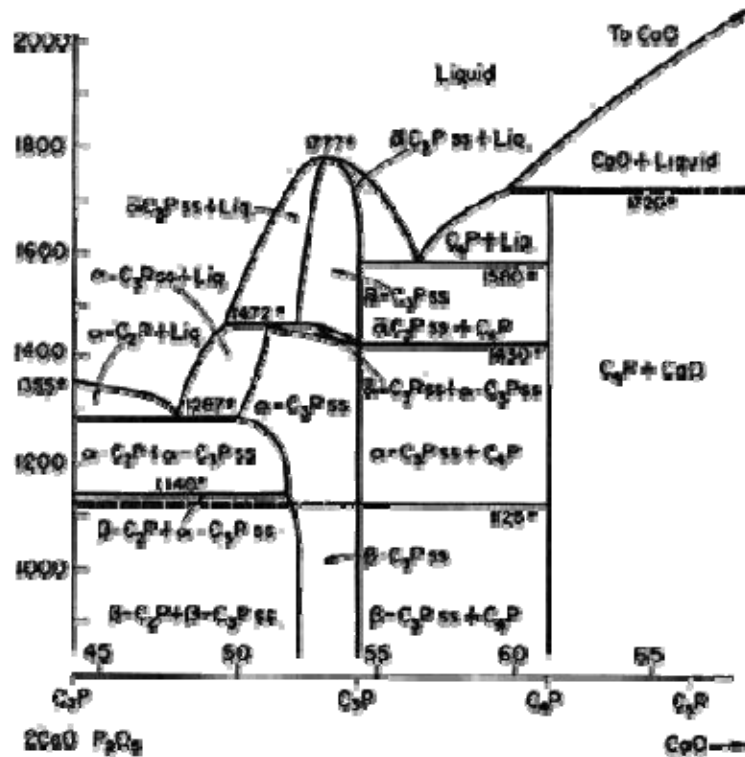


Figura 3.3: Representação do diagrama de fases do sistema 2Ca.P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e CaO (Phase diagrams for ceramists, 1984).

### 3.5.4. Reação de Cura

A utilização de aceleradores de cura em CFC ocorre por meio do favorecimento da solubilização dos cristais de fosfato de cálcio, permitindo a saturação do líquido em Ca e P e a precipitação de compostos mais estáveis. Isso ocorre, pois na faixa de pH de aproximadamente 4,2 e acima, a HA é o composto de fosfato de cálcio mais estável (menos solúvel) (CHOW *et al.*, 1997). Existe uma diferença entre a solubilidade da fase  $\alpha$ -TCP e da fase  $\beta$ -TCP. A fase  $\alpha$ -TCP é bastante solúvel no organismo vivo enquanto a fase  $\beta$ -TCP possui um tempo de degradação maior devido a sua maior estabilidade química. No entanto comparadas com a HA ambas às fases do fosfato tricálcico apresentam solubilidade muito maior.

As características do pó também são de suma importância e influenciam sobremaneira na reação de cura. Partículas pequenas possuem grandes áreas superficiais e freqüentemente aglomeram formando partículas secundárias, a fim de minimizar a superfície total ou a energia interfacial do sistema. A aglomeração refere-se à adesão de partículas que ocorrem devido às forças de atração de van der Waals. Normalmente, uma massa aglomerada pode ser desaglomerada por meio de uma dispersão em meio líquido. Já 19

a agregação, por outro lado, refere-se a partículas que interagem incipientemente, tornando difícil a quebra da massa agregada em partículas primárias (TONIOLO, 2004).

Quando o  $\alpha$ -TCP é misturado com a água, forma-se uma suspensão fluida e manipulável que se dissolve até formar uma solução saturada pela presença de cristais. Este tempo é conhecido como período de indução. Esse período é acompanhado por um aumento na consistência da massa que ainda permite a sua manipulação e devida compactação em uma determinada cavidade minutos antes da cura final. O tempo que vai do início da mistura do  $\alpha$ -TCP com a água até que o material endureça é conhecido como tempo de cura.

### 3.6. Engenharia de Tecidos

A engenharia de tecidos (ET), uma nova área de pesquisa biomédica tem estudado novas formas de produção tecidual para a utilização em cirurgias reparadoras. A ET compreende todos os métodos e esforços para criar ou induzir a formação de tecidos específicos em local específico, através da seleção e manipulação de células e estímulos biológicos. Estas são cultivadas sobre suportes biológicos ou sintéticos, conhecidos como arcabouços, para então serem implantadas no paciente (MUSCHLER, 2002). A Figura 3.4, adaptada de Freed *et al.* (FREED *et al.*, 1993), ilustra o desenvolvimento idealizado da técnica da ET.

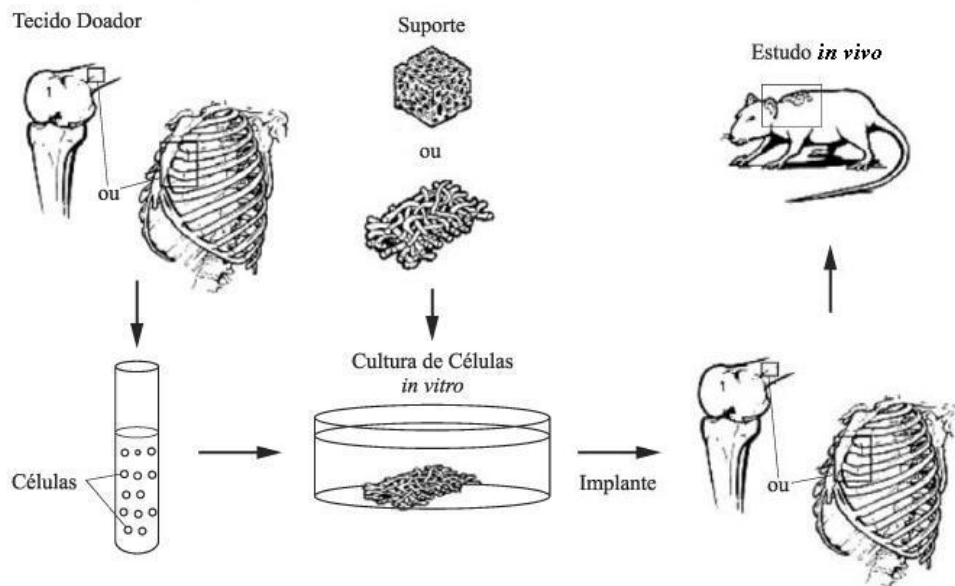


Figura 3.4: Esquema da técnica para construção de tecidos.

Buscando uma padronização tanto na terminologia como na metodologia de pesquisa e aplicação dos produtos preparados pela engenharia de tecidos, a regulamentação vem sendo feita por normas ASTM (entre elas F2312-03, F2027-00e1 e F2150-02e1) e por órgãos governamentais de países da Europa, Japão, Canadá e outros (LLOYD-EVANS, 2004). De uma forma geral, a preparação dos produtos da engenharia de tecidos segue as seguintes etapas:

- (I) Seleção e processamento do suporte
- (II) Inoculação da população celular sobre o suporte
- (III) Crescimento do tecido prematuro
- (IV) Crescimento do tecido maturado em sistema fisiológico (bioreator)
- (V) Re-Implante cirúrgico
- (VI) Assimilação do produto.

Há alguns requerimentos básicos que têm que ser amplamente aceitos para o desenvolvimento de arcabouços (MA, 2004). Primeiro, um arcabouço tem que ter alta porosidade e tamanho de poro definido. Segundo, uma alta área superficial é necessária. Terceiro, a biodegradabilidade é geralmente requerida, e uma taxa de degradação apropriada é necessária para igualar à taxa de formação do neotecido. Quarto, o arcabouço deve ter integridade mecânica para manter a estrutura pré-desenvolvida do tecido. Quinto, o arcabouço não deve ser tóxico para as células (ser biocompatível). Sexto, o arcabouço deve interagir positivamente com as células, incluindo melhorar a adesão celular, crescimento, migração e diferenciação de funções.

### 3.6.1. Materiais para arcabouços

Polímeros são materiais primários em várias aplicações da engenharia de tecidos, incluindo osso e outros tecidos mineralizados. Um número limitado de materiais inorgânicos é usado em pesquisas de construção de ossos e tecidos mineralizados.

Os materiais discutidos nesta categoria podem formar estruturas porosas sólidas e estáveis para servir como arcabouços tridimensionais pré-desenvolvidos. Eles geralmente não se dissolvem ou fundem sob condições de cultura de tecidos *in vitro* (em meio aquoso) ou quando implantados *in vivo*.

### 3.6.1.1. *Poliésteres lineares alifáticos*

O Poli (ácido glicólico) (PGA), Poli (ácido láctico) (PLA), e seus copolímeros Poli (ácido láctico – co – ácido glicólico) (PLGA) são uma família de poliésteres alifáticos lineares, que são mais frequentemente usados em engenharia de tecidos (MA, 2004; ZHANG, 2001; PACHENCE, 2000). Estes polímeros degradam através da hidrólise de suas ligações éster.

O PGA é um dos polímeros mais amplamente utilizados em arcabouços. Devido a sua relativa hidrofobicidade natural, o PGA se degrada rapidamente em soluções aquosas ou in vivo, e perde a integridade mecânica entre duas a quatro semanas (MA, 1995). Ele tem sido processado na forma de não-tecido como um dos arcabouços mais amplamente utilizados hoje em dia na engenharia de tecidos.

O PLA também é amplamente utilizado para fabricação de arcabouços. O grupo metil extra na unidade repetitiva do PLA (comparado com o PGA) faz com que tenha maior hidrofobicidade e uma menor taxa de hidrólise. São necessários muitos meses ou alguns anos para um implante ou arcabouço de PLA perder a integridade mecânica in vitro ou in vivo (MA, 1995). Para conseguir uma taxa de degradação intermediária entre PGA e PLA, várias razões entre ácido láctico e ácido glicólico são usados para sintetizar PLGAs. Estes polímeros (PLA, PLG e PLGAs) são alguns dos muitos polímeros sintéticos aprovados pelo *US Food and Drug Administration* (FDA) para aplicações clínicas humanas.

Há outros poliésteres alifáticos, como a poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) (CHOI, 2002) e o poli (hidroxi butirato) (PHB) (WOODWARD, 1985), que também são usados em pesquisas em engenharia de tecidos. O PCL degrada a uma taxa significativamente mais lenta que o PLA, o PGA e o PLGA (CHOI, 2002). A lenta degradação faz o PCL perder atratividade para aplicações em engenharia de tecidos, mas ganhar atratividade para implantes de longo prazo e aplicações para liberação controlada. Copolímeros baseados em PCL têm sido recentemente pesquisados para melhorar suas propriedades de degradação (CHOI, 2002). O PHB é feito por microrganismos via fermentação. O PHB e os copolímeros baseados em PHB degradam muito lentamente devido a sua hidrofobicidade e, conseqüentemente, são menos populares comparados com o PLA, o PGA e o PLGA para aplicações em engenharia de tecidos. Existem outros importantes polímeros sintéticos biodegradáveis como o poli (propileno fumarato) (PPF), que pode degradar através da hidrólise de suas ligações éster semelhante ao PLA e ao PGA (WOLF, 2002). Polímeros

derivados da Tirosina têm mostrado promissora biocompatibilidade. Estes polímeros têm sido usados em pesquisas em construção de tecidos ósseos (JAMES, 1999). Polifosfoésteres e polifosfazonas têm sido frequentemente usados para aplicações de liberação controlada, e têm sido recentemente explorados para certas aplicações em engenharia de tecidos. Similarmente, polianidridos e poli (orto ésteres) são estudados para aplicações de liberação controlada de drogas por causa de suas propriedades de superfície. Contudo, tem-se também explorado para fabricação de arcabouços em engenharia de tecidos (MA, 2004).

Além de polímeros sintéticos, alguns polímeros naturais, como as proteínas e os polissacarídeos, têm sido usados também para aplicações em engenharia de tecidos. O colágeno é uma proteína fibrosa e o maior componente de uma matriz extracelular. Ele tem sido usado para várias aplicações em regeneração de tecidos, especialmente para reparos de tecidos leves (MA, 2004). Por um lado, o colágeno como componente extracelular natural tem usualmente propriedades biológicas desejáveis para aplicações em engenharia de tecidos. Portanto, copolímeros de colágeno-glicosaminoglican (GAG) são fabricados na forma de arcabouços para engenharia de tecidos. Por outro lado, há preocupações sobre o colágeno devido ao seu potencial para transmissões patogênicas, reações imunes, deficiência de manuseio e de propriedades mecânicas, e menor controle da biodegradabilidade (MA, 2004).

### 3.6.1.2. *Materiais Cerâmicos*

Além dos polímeros, o uso de arcabouços de materiais cerâmicos como guias para o crescimento de tecidos ósseos tem revelado modos inesperados de como os arcabouços e as células interagem, mostrando efeitos complexos de integração e de desintegração do arcabouço. O modo pelo qual os arcabouços são absorvidos pelos osteoclastos, *in vitro* e *in vivo*, mostram processos mais complexos dos que os preditos pelo conhecimento a respeito da reabsorção óssea fisiológica. A investigação de novos materiais para engenharia de tecidos representa uma área essencial para o desenho das estratégias de engenharia de tecidos. Neste contexto situam-se os cimentos ósseos de fosfato de cálcio (CFCs). A principal vantagem do uso de CFCs é a facilidade de uso, permitindo a obtenção de formatos complexos.



### 3.6.2. Tecnologia de fabricação de arcabouços

Dentro do corpo, os tecidos são organizados em estruturas tridimensionais como órgãos funcionais ou sistemas de órgãos. Para construir órgão e tecidos com êxito, o arcabouço deve ser projetado para facilitar a distribuição celular e guiar a regeneração de tecidos em três dimensões.

#### 3.6.2.1. Tecnologia têxtil

Inicialmente os arcabouços em engenharia de tecidos compreendendo fibras de polímeros biodegradáveis eram produzidos usando tecnologia têxtil. PGA, PLA e outros polímeros semicristalinos podem ser processados na forma de fibras utilizando tecnologia têxtil. Um desses arcabouços frequentemente utilizado em pesquisas de engenharia de tecidos é o arcabouço de não tecido de PGA (Figura 3.5). Este arcabouço de PGA tem sido usado tanto sozinho como combinado com outros polímeros biodegradáveis para engenharia de cartilagem, tendões, ureter, intestino, vasos sanguíneos, válvulas cardíacas e outros tecidos (MA, 2004). Entretanto, há inúmeras limitações dos arcabouços de não tecido de PGA, como a baixa resistência a tensão, alta taxa de degradação, dificuldade em controlar a forma do poro e limitação na variação do diâmetro da fibra.

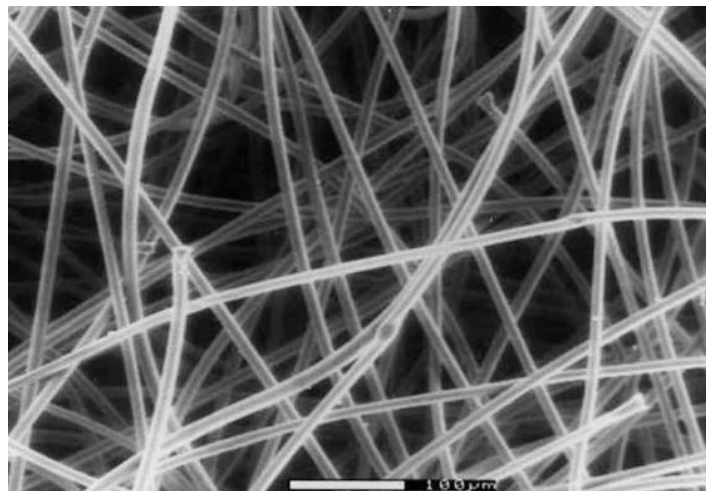


Figura 3.5: Fotomicrografia de MEV de um arcabouço de não tecido de PGA com um diâmetro de fibra de aproximadamente 15  $\mu\text{m}$  (MA, 2004).

### 3.6.2.2. *Electrospinning*

*Electrospinning* foi primeiramente introduzido em meados dos anos de 1930 para fabricação industrial ou caseira de produtos de não-tecidos. A técnica tem sido reinventada na última década para processos de polímeros biodegradáveis e/ou biocompatíveis com um diâmetro médio de fibra na ordem de micrômetros ou nanômetros para arcabouços em engenharia de tecidos. Para formar tais fibras usando *electrospinning*, uma solução polimérica é forçada através de um capilar, formando uma gota da solução polimérica na ponta. Uma alta voltagem é aplicada entre a ponta e o anteparo. Quando o campo elétrico supera a tensão superficial da gota, um jato da solução polimérica é acelerado em direção ao alvo coletor. Como o jato viaja através do ar, o solvente evapora e o polímero em forma de não-tecido é formado no alvo. Para gerar uma orientação preferencial e/ou estrutura tubular, um tambor rotativo eletricamente aterrado é usado como alvo coletor. Alguns polímeros sintéticos (PGA, PLGA, PCL e polipeptídeos sintéticos) e macromoléculas naturais (colágeno) têm sido processados na forma de arcabouços de não-tecido em pesquisas de engenharia de tecidos (MA, 2004). Entretanto, há algumas mudanças no uso dessa técnica para fabricar arcabouços de forma tridimensional complexa e redes de poros internos. Além disso, o diâmetro médio das fibras é frequentemente maior nas fibras de matrizes extracelulares, algumas vezes caindo para tamanhos micrométricos.

### 3.6.2.3. *Técnicas de lixiviação de partículas*

Lixiviação de partículas é outra técnica que tem sido frequentemente utilizada para fabricação de arcabouços em engenharia de tecidos (MA, 1999). Resumidamente, o sal é primeiramente moído em partículas pequenas e aquelas de tamanho desejado são transferidas para um molde. Uma solução polimérica é então colocada no molde ocupado com sal. Depois da evaporação do solvente, os cristais de sais são lixiviados com água para formar os poros do arcabouço (Figura 3.6). O processo é fácil de realizar. O tamanho do poro pode ser controlado pelo tamanho do cristal de sal e a porosidade pela razão sal/polímero. Entretanto certas variáveis críticas como a forma do poro e a interconexão dos poros não pode ser controlada.

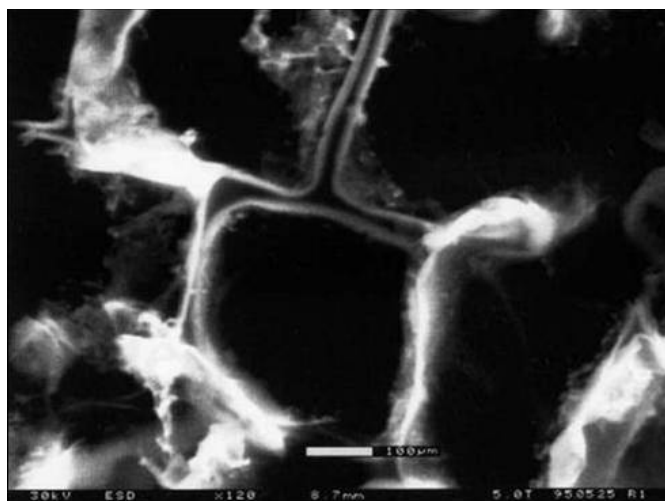


Figura 3.6: Fotomicrografia de MEV de uma espuma de PLLA usando técnica de lixiviação de sal (MA, 1999).

#### 3.6.2.4. Separação de fase

Um sistema multicomponente homogêneo, sob certas condições, torna-se termodinamicamente instável e tende a se separar em mais de uma fase para um sistema de menor energia livre. A separação de uma solução polimérica em duas fases, uma fase rica em polímero e uma fase pobre em polímero. Posteriormente o solvente é removido, a fase rica em polímero se solidifica. Técnicas de separação de fase têm sido usadas para fabricar membranas porosas para filtração e separação (BAKER, 2000). Entretanto os poros formados usando tal técnica, freqüentemente têm diâmetros na ordem de poucos a dez microns e freqüentemente, não são uniformemente distribuídos, o que não é apropriado para aplicações em engenharia de tecidos.

A separação de fase pode ser obtida pelo abaixamento da temperatura para induzir a cristalização do solvente da solução polimérica. O processo é definido como uma separação de fase sólido-líquido (formação de fase sólida em presença de fase líquida). Depois de removidos os cristais de solvente (sublimação ou troca de solvente), o espaço originalmente dos cristais de solvente se transformam em poros. Essa técnica pode ser usada para fabricação de arcabouços para muitos tipos de polímeros e materiais compósitos poliméricos (Figura 3.7) (MA, 2004).

Pela manipulação das condições de separação de fase, várias estruturas de poros podem ser obtidas. Por exemplo, muitos tecidos (como nervos, músculos, tendões, ligamentos, dentina e assim por diante) têm orientação tubular ou arquitetura em pacotes fibrosos. Para facilitar a organização e regeneração dos tipos de tecidos, um arcabouço

com alta porosidade e uma disposição orientada de microtúbulos abertos é desejado. Para conseguir este objetivo, uma nova técnica de separação de fase tem sido desenvolvida para o crescimento de cristais orientados em forma de hastes na solução polimérica. Depois de remover estas hastes, uma disposição paralela de microtúbulos é formada (Figura 3.8a) (MA, 2004). Este arcabouço tubular orientado tem propriedades mecânicas anisotrópicas similar a tecidos fibrilares e tubulares, e tem sido mostrado como facilitador da organização celular em tecidos orientados (Figura 3.8b).

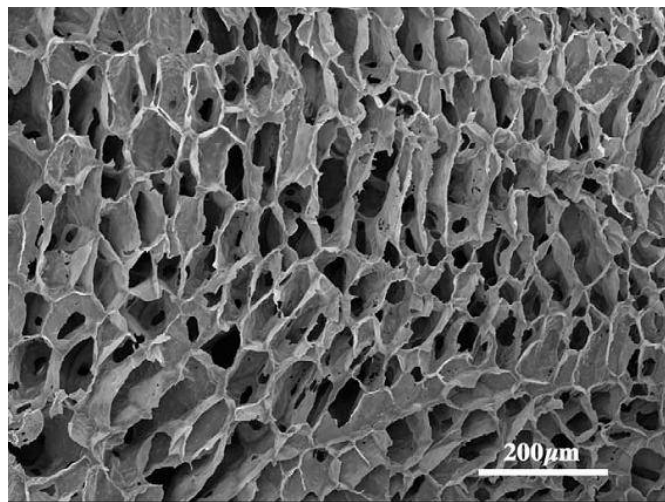


Figura 3.7: Fotomicrografia de MEV do arcabouço de PLLA fabricado usando uma separação de fase sólido-líquido (MA, 2004).

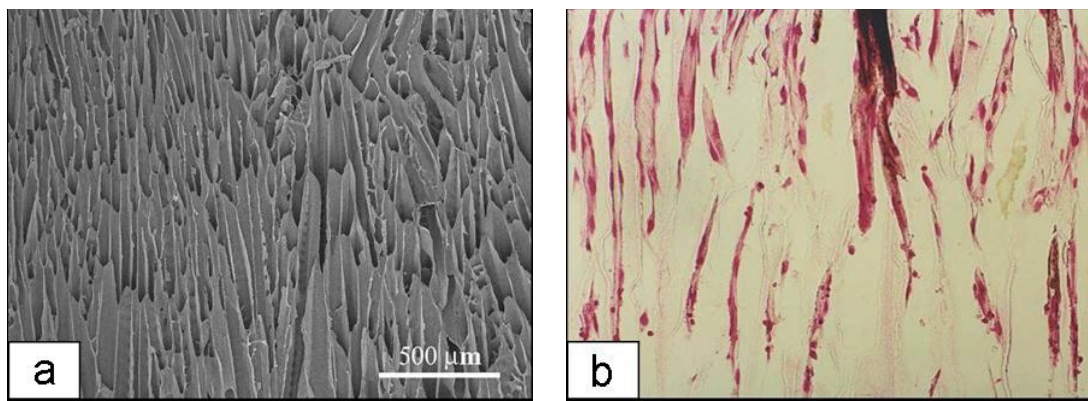


Figura 3.8 (a): Fotomicrografia de MEV do arcabouço de PLLA com arquitetura microtubular orientada; (b): Cultura de células MC3T3-E1 sobre o arcabouço de PLLA por duas semanas *in vitro* (MA, 2004).

O abaixamento da temperatura pode induzir a separação de fase líquido-líquido de uma solução polimérica com uma solução de temperatura supercrítica. Quando tal processo conduzir à formação de uma estrutura bicontínua (ambas as fases rica e pobre em

polímeros são contínuas), um arcabouço com uma estrutura de poros abertos é formada depois da remoção do solvente. Por exemplo, a mistura de dioxano em água tem sido usada por separação de fase líquido-líquido para fabricar arcabouços de PLA e PLGA (Figura 3.9) (MA, 2004).

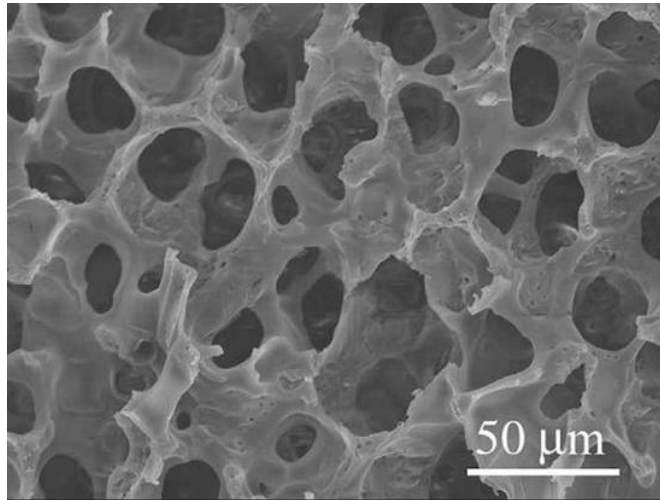


Figura 3.9: Fotomicrografia de MEV de um arcabouço poroso preparado a partir de uma solução 10% de PLGA (85/15) em uma mistura de dioxano e água (MA, 2004).

#### 3.6.2.5. Design de uma arquitetura de poros tridimensionais

Um dos assuntos mais comuns discutidos na tecnologia de fabricação está na falta de controle preciso da arquitetura de poros tridimensionais dos arcabouços. Para resolver este problema têm sido adotado a manufatura e o desing auxiliados por computador (CAD/CAM) (YANG *et al.*, 2002).

Tal técnica foi inicialmente explorada pelo Massachusetts Institute of Technology. Um dos sólidos foi feito por prototipagem rápida, chamado de impressão tridimensional. Com tal técnica objetos de forma complexa são desenvolvidos usando um software CAD. Os arcabouços foram fabricados através de *ink-jet* que imprime uma pasta em camadas colocadas sequencialmente do pó do polímero (ZELTINGER, 2001). Entretanto o tamanho das partículas do pó e as gotas da pasta (*pixels*) são limitados (para algumas centenas de microns). A exatidão do posicionamento do bocal de impressão é também limitada. Conseqüentemente, a precisão da tecnologia é seriamente limitada. Técnicas de prototipagem rápida têm limitações inerentes tais quais a seleção de materiais limitada e a resolução inadequada.

Para conseguir uma maior resolução para os arcabouços com poros esféricos interconectados bem controlados, esferas de parafina são fabricadas por um método de dispersão (MA, 2001). Essas esferas de parafina são então colocadas dentro de um molde tridimensional de forma projetada. As esferas são unidas por um processo de tratamento térmico. Uma solução polimérica é colocada em conjunto com a parafina no molde. Depois de remover o solvente as esferas de parafina são dissolvidas. Deste modo uma estrutura de poros esféricos interconectados é criada (Figura 3.10a e 3.10b). As características geradas têm significativamente melhor resolução que aquelas conseguidas com as técnicas de prototipagem rápida atuais. Além disso, não são necessários investimentos em equipamentos caros, o que permite que a tecnologia seja facilmente adaptada para pesquisa, assim com na indústria, se ajustado.

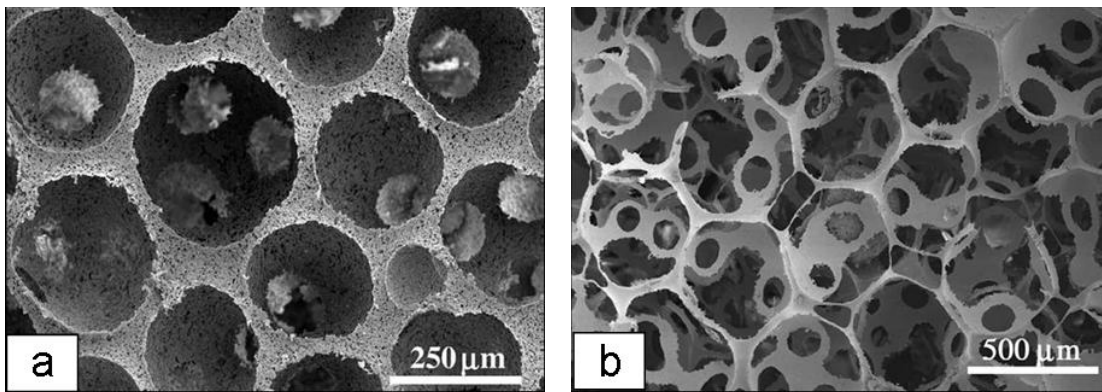


Figura 3.10: Fotomicrografias de MEV de arcabouços poliméricos preparados usando esferas de parafina: (a) scaffold de PLLA, esferas de parafina: 200-420 μm, 100x; (b) PLGA (85/15), esferas de parafina 420-500 μm, 50x. (MA, 2001)

Shum *et al.* realizaram um estudo criando estruturas porosas de PLGA a partir de microesferas de parafina (SHUM *et al.*, 2005). As microesferas foram misturadas com uma solução de piridina contendo o PLGA e então prensadas. As esferas de parafina foram removidas mergulhando a peça prensada em uma solução de hexano à temperatura ambiente por dois dias. Para a obtenção das microesferas de parafina foi aquecida uma solução de PVA em água (0,5% em massa) a uma temperatura entre 60 e 70°C. Vinte gramas de parafina, também aquecida a essa temperatura, foram adicionadas à solução sob forte agitação mecânica e, então, a mistura colocada em um recipiente contendo água fria. Após, as esferas foram colocadas em uma peneira de 100μm e lavadas com água destilada para retirar o PVA residual. Mizutania *et al.* prepararam microesferas de PLLA com um método parecido com o anterior, porém adicionando à solução Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como agente

coagulante (MIZUTANIA *et al*, 2005). Foi feito uma comparação entre diferentes tipos de sais adicionados à solução e então estudadas as diferentes morfologias. A Figura 3.11 mostra as morfologias obtidas com os diferentes sais adicionados à suspensão de PLLA.

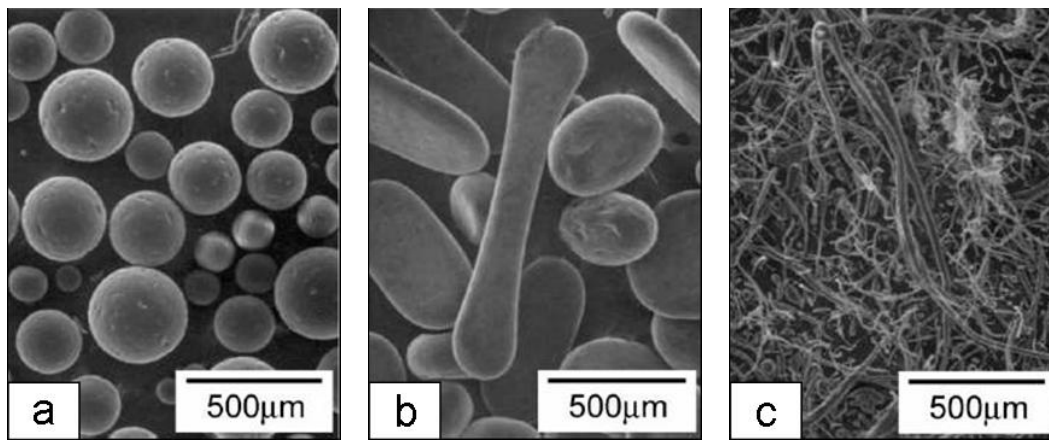


Figura 3.11: Fotomicrografias de MEV dos produtos obtidos da adição de PLLA em uma solução de 0,01% em peso contendo (a)  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , (b)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e (c) STP – Tripolifosfato de sódio, sob uma agitação de 450 rpm (MIZUTANIA *et al*, 2005).

Segundo Picos *et al* (PICOS *et al.*, 2000) os métodos para a obtenção de microesferas são a evaporação de solvente e separação de fases. A evaporação de solvente é amplamente utilizado na preparação de microesferas de polímeros biodegradáveis. Primeiramente se requer a formação de uma emulsão que pode ser: óleo em água (o/w), óleo em óleo (o/o) e água em óleo em água (w/o/w). Para acelerar o processo de formação das microesferas, se aplica calor e uma pressão reduzida na emulsão formada além de agitação para facilitar a evaporação do solvente. As esferas formadas são lavadas e coletadas por filtração ou centrifugação, e secas por liofilização ou outro processo de secagem.

Borden *et al.* (BORDEN *et al.*, 2002) obtiveram microesferas de PLGA dissolvendo este em cloreto de metila, em uma razão de 1:15 massa/volume (w/v) e gotejando em uma solução aquosa de poli (álcool vinílico) 1%, sob agitação de 300 rpm por 10h. As esferas obtidas foram isoladas por filtração à vácuo, lavadas, secas e separadas por diferentes faixas de tamanho. A Figura 3.12 mostra uma fotomicrografia das esferas obtidas. Posteriormente as esferas foram sinterizadas para a formação de arcabouços. Zielhuis *et al.* (ZIELHUIS *et al.*, 2004) realizaram um experimento semelhante, utilizando PLLA dissolvido em clorofórmio, e deixando sob agitação de 500rpm por 40h à temperatura ambiente. O método se mostrou efetivo na fabricação de microesferas desse material.

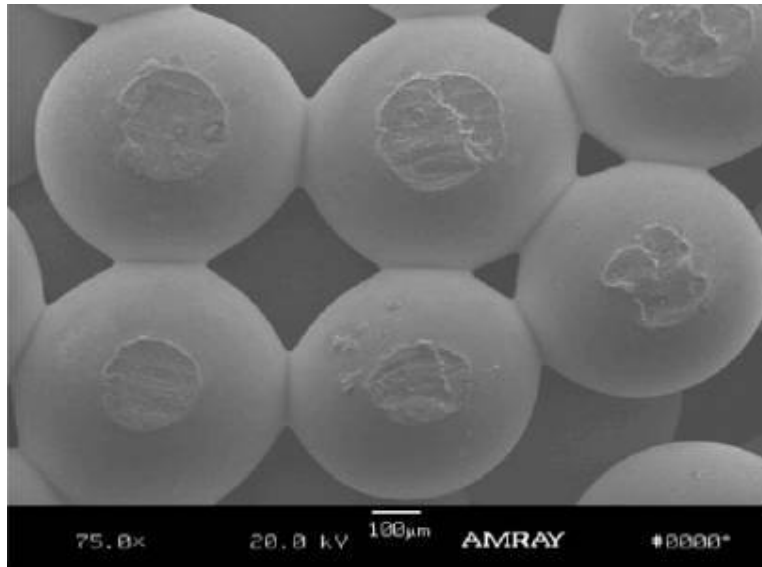


Figura 3.12: Fotomicrografia de MEV mostrando um arcabouço formado pelas microesferas sinterizadas de PLGA (BORDEN *et al.*, 2002).

### 3.6.3. Cerâmicas Porosas

Tentativas de reproduzir a estrutura porosa do tecido ósseo natural levaram ao desenvolvimento das cerâmicas porosas. 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 100-200 µm de diâmetro (HULBERT *et al.*, 1971; KARAGEORGIU; KAPLAN, 2005).

O tecido responde diferentemente ao diâmetro do poro do material e é resumido na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Tipo de crescimento tecidual de acordo com o tamanho dos poros (MATSURA, 1995).

menor que 10 µm	sem crescimento
entre 10 e 50 µm	crescimento fibrovascular
entre 50 e 150 µm	formação de osteóide
acima de 150 µm	crescimento ósseo

Uma das aplicações para cerâmicas porosas que tem grande destaque atualmente no campo de biomateriais é para a reconstituição, reparos e preenchimento de cavidades



ósseas decorrentes de processos inflamatórios, acidentes ou osteoporose (HENCH; WILSON, 1999). Para tal, utilizam-se matérias-primas de elevada pureza química e que não produzam reações tóxicas quando colocadas em contato com tecidos vivos.

Existem, 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 ( $\sigma_r$ ) dos materiais cerâmicos decresce quase que exponencialmente com a porosidade (P) de acordo com a Equação 2:

$$\sigma_r = \sigma_o \cdot \exp(-nP) \quad \text{Equação (2)}$$

De acordo com a teoria de Griffith, os poros grandes apresentam uma maior influência sobre a resistência mecânica do que os poros pequenos, de modo que a resistência mecânica decresce mais rapidamente para maiores concentrações de macroporos do que de microporos (KINGERY *et al.*, 1976; CALLISTER, 2000). A resistência mecânica,  $\sigma_r$ , é descrita pela Equação 3:

$$\sigma_r = (E(\gamma_s + \gamma_p)/c)^{1/2} \quad \text{Equação (3)}$$

onde  $E$  representa o módulo de elasticidade do material,  $\gamma_s + \gamma_p$ , é a energia mínima necessária para causar a propagação do defeito, sendo  $\gamma_s$  a energia superficial específica e  $\gamma_p$ , a energia para a deformação plástica. Já  $c$  é o raio do defeito (poro) que se propaga ao longo do maior eixo da elipse ( $2c$ ). A equação acima mostra que a tensão máxima no momento da ruptura é inversamente proporcional às dimensões do defeito. Dessa forma, considerando-se os poros como sendo os defeitos concentradores de tensão pode-se afirmar que a tensão de ruptura é menor para poros com maior volume. A resistência das amostras não depende somente do volume total de poros, mas também das dimensões dos poros (HUEC *et al.*, 1995).

Além disto, como muita 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 (HA, fosfatos de cálcio) como 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.

### 3.6.3. Obtenção de Cerâmicas Porosas

Existem diversos métodos para a obtenção de cerâmicas porosas, sendo os mais usuais:

#### 3.6.3.1. Método gel esponja

Em 2003, Ramay e Zhang desenvolveram um método para obtenção de blocos porosos de HA que consiste em uma mistura do método *gelcasting* com o método da replicação de uma esponja polimérica. Por tal técnica as peças são preparadas infiltrando a esponja polimérica em uma lama cerâmica contendo monômeros e iniciadores para uma rápida polimerização *in situ*. O sistema de polimerização *in situ* é o mesmo utilizado na técnica *gelcasting*, contendo como monômeros acrilamida e metilenobisacrilamida e como dispersante um poliácrlato de amônia. As espumas de poliuretano cortadas no formato desejado eram completamente imersas na suspensão cerâmica forçadas por vácuo para que ocorresse a migração do pó de HA para os poros das espumas. Os teores de catalisador e de iniciador foram controlados para permitir tempo suficiente para que a cerâmica se impregnasse na espuma de poliuretano antes da formação do gel.

#### 3.6.3.2. Método *gelcasting* de espumas

O processo *gelcasting* de espumas consiste na incorporação de uma fase gasosa dispersa dentro de uma suspensão cerâmica contendo tipicamente o pó cerâmico, água, defloculantes, ligantes e agentes de gelificação. A incorporação pode ser feita através de agitação da suspensão. Após a etapa de formação de espuma, o material é geleificado pela polimerização *in situ* de monômeros orgânicos (YOUNG *et al.*, 1991; SEPÚLVEDA; BINNER, 1999). O controle do tempo de geleificação é primordial para a obtenção de porosidade controlada que permita sua reprodutibilidade (POTOCZEK; ZAWADZAK, 2004; KOKABI *et al.*, 2005). A rápida polimerização dos monômeros imediatamente após a formação da espuma impede o colapso desta, resultando, após secagem e sinterização em um material poroso, com paredes altamente densificadas e poros esféricos.

A produção da espuma em uma suspensão cerâmica só é possível através do uso de um surfactante, o qual estabiliza a interface líquido-gás (SEPÚLVEDA; BINNER, 1999; VICENTE *et al.*, 2002) entre a suspensão e as bolhas de ar incorporadas por agitação. As moléculas dos surfactantes são compostas por uma porção polar (hidrofílica) e outra apolar (hidrofóbica). Estas moléculas ao se posicionarem na interface líquido-gás diminuem a tensão superficial das bolhas, tornando-as mais estáveis.

#### *3.6.3.3. Replicação de estruturas poliméricas porosas*

Tal método consiste em impregnar uma esponja polimérica, geralmente de poliuretano, com uma suspensão cerâmica aquosa defloculada. Geralmente, a amostra é imersa mais de uma vez e após cada imersão ela é passada por uma calandra. A calandra é constituída de dois roletes dispostos paralelamente entre si, sendo a distância entre ambos conhecida como abertura da calandra. O ajuste desta abertura é efetuado tomando-se como referência a espessura da esponja polimérica, uma vez que a função da etapa de calandragem é retirar o excesso da suspensão cerâmica da esponja por compressão da mesma entre os roletes. Assim, quanto maior for a abertura da calandra, uma quantidade maior da suspensão cerâmica ficará retida na esponja polimérica, aumentando, desse modo, a espessura dos filamentos. A porosidade inicial da espuma, que normalmente é expressa em PPI (poros por polegada linear), possui grande influência sobre as propriedades do produto final, pois determina também a quantidade de pó cerâmico que fica impregnado na espuma.

Após a impregnação e calandragem das esponjas poliméricas, estas geralmente são secas em três etapas: ao ar, em câmara climática e em estufa (SALVINI, 2002). Após a secagem, as peças são sinterizadas para o aumento da resistência mecânica.

#### *3.6.3.4. Incorporação de materiais voláteis eliminados durante a queima*

Este método consiste na incorporação de uma segunda fase orgânica numa matriz cerâmica, seguida de eliminação da fase orgânica via queima a temperaturas acima de 500°C. Utilizando-se fase orgânica com tamanho e formato controlados, é possível controlar o tamanho dos poros. Os implantes porosos contendo segunda fase orgânica podem ser conformados de várias maneiras. A grande vantagem desta técnica é o controle

do tamanho dos poros, porém há grandes dificuldades em se obter poros interconectados. A fase volátil pode ser naftaleno, cera, farinha, carvão, polímeros diversos.

Além destes métodos, é muito utilizado o método hidrotermal para a transformação da composição de alguns tipos de corais (*Goniopora* e *Poritis*, principalmente) de  $\text{CaCO}_3$  para HA, mantendo-se a estrutura porosa de poros interconectados dos corais intacta. Entretanto este método traz as desvantagens dos materiais obtidos a partir de materiais naturais, ou seja, a dificuldade de controle da fonte de matéria, gerando materiais com características químicas, mecânicas e biológicas variáveis, além da dificuldade de coleta no caso específico dos corais e da possibilidade de contaminação por poluentes.

#### 3.6.4. Aplicações e produtos da engenharia de tecidos

Existem diversos relatos na literatura de experimentos que visam a reprodução total ou parcial de estruturas anatômicas humanas, seja para terapia ou para reconstrução. Em franca expansão, os produtos preparados pela engenharia de tecidos (TEPs – *Tissue-Engineered Products*) estão em fase de aprovação pelo FDA. A Tabela 3.3 mostra a relação de produtos aprovados pelo FDA em comercialização (BARBANTI *et al.*, 2005).

Tabela 3.3: Produtos preparados pela engenharia de tecido e aprovados pelo FDA (ano 2003).

Produto	Empresa	Lançamento	Descrição
Apligraf <sup>®</sup>	Organogenesis Inc.	1998	Equivalente de Pele Humana
Carticel <sup>®</sup>	Genzyme Co.	1999	Cultura autóloga de condrócitos
Dermograft <sup>®*</sup>	Smith & Nephew Co.	2001	Equivalente de Pele Humana
OrCel <sup>®</sup>	Ortec International Inc.	2001	Equivalente de Pele Humana

\* O produto teve sua produção interrompida pela Smith & Nephew Co.

A reconstituição da pele pela engenharia de tecidos destaca-se como os primeiros produtos comerciais disponíveis e aprovados pelo FDA. O primeiro lançamento (Apligraf<sup>®</sup>), indicado para úlceras em pacientes diabéticos é produzido a partir de cultura

humana de prepúcio de recém-nascidos. O produto é um composto bilaminar, constituído de derme e epiderme e comercializado como um equivalente de pele humana. A camada dérmica é produzida usando-se uma cultura de fibroblastos em uma base de colágeno bovino. Após a maturação em um bioreator, a epiderme é formada pela inoculação de queratinócitos, sobre a camada de matriz extracelular produzida pelos fibroblastos dérmicos. A ausência de outras células da epiderme no produto final, como os melanócitos, células de Langerhans (células apresentadoras de antígeno), e células de Merkel (tidas como mecano-receptores) não limitam sua aplicação. Um produto similar ao Apligraf<sup>®</sup>, e também aprovado pelo FDA, é o OrCel<sup>®</sup>, diferenciando-se por utilizar culturas de células autólogas (BARBANTI *et al.*, 2005).

Outro produto também aprovado pelo FDA, mas com sua produção e comercialização descontinuada, é o Dermagraft<sup>®</sup>. Produzido por engenharia de tecidos, o produto é um substituto dérmico e utiliza um suporte de PLGA para o cultivo de fibroblastos humanos, também obtidos de prepúcio de recém-nascidos. O material degrada durante a cultura de células, servindo como suporte para a proliferação e secreção da matriz extracelular. Outros produtos são atualmente pesquisados para aplicações específicas na reconstrução de pele, incluindo o cultivo de fibroblastos e queratinócitos em microsferas de PLGA e outros materiais (BARBANTI *et al.*, 2005).

Durante a década de 90, grandes investimentos foram feitos em pesquisa e desenvolvimento de TEPs cartilagosos. Atualmente, o único produto comercial aprovado pelo FDA é o Carticel<sup>®</sup>, uma expansão *in vitro* de cultura autóloga de condrócitos. O produto tem sido indicado para defeitos cartilagosos sintomáticos dos côndilos femorais (lateral e medial) geralmente causados por traumas de repetição (BARBANTI *et al.*, 2005).

Em pesquisas com tecidos cartilagosos os polímeros bioreabsorvíveis são amplamente utilizados (KAMIL *et al.*, 2004). Liderados mundialmente pelo grupo de pesquisa do cirurgião Joseph P. Vacanti, o anestesiológico Charles Vacanti, ambos da Universidade de Harvard, e pelo engenheiro químico Robert Langer do MIT (*Massachusetts Institute of Technology*), a literatura tem descrito vários estudos de reconstrução de complexas estruturas anatômicas. Usando suportes de PGA e PLA é relatado reconstruções cartilagosas na forma de uma orelha humana, do septo nasal e traquéia (KAMIL *et al.*, 2004). Preparados pelo processo de *fiber bonding* o suporte é inoculado com condrócitos e inserido em bioreatores. Os resultados histológicos mostram neotecido cartilaginoso, abundante em componentes da matriz extracelular de cartilagem hialina e elástica: ácido hialurônico, sulfato de condroitina e colágeno.

Em pesquisas aplicadas ao pâncreas, a equipe multidisciplinar do Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL) do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, tem destaque no transplante de ilhotas de Langerhans em pacientes diabéticos do tipo I, usando-se cápsulas de 400-600µm diâmetro de Bioditrin (polissacarídeo conjugado de alginato com sulfato de condroitina) com poli (L-lisina) (MARIA-ENGLER *et al.*, 2001).

Nos últimos anos, mundialmente são descritos experimentos que visam a reprodução total ou parcial de estruturas anatômica humana, como por exemplo: tecido hepático, dente, mandíbula, nervos periféricos, válvulas e ductos urológicos, menisco, vasos e regeneração de tecido ósseo (BARBANTI *et al.*, 2005).

### 3.7. Permeabilidade

O conceito de permeabilidade surge naturalmente quando um fluido é forçado a atravessar um meio poroso. A complexa interação entre o fluido e o canal poroso causa uma transformação na energia do sistema, geralmente associada à diminuição da pressão exercida pelo fluido. A permeabilidade é assim uma propriedade não apenas do meio poroso ou do fluido, mas também da interação dinâmica entre ambos (INOCENTINNI *et al.*, 1999).

Historicamente, Darcy, em 1856, foi um dos primeiros a equacionar empiricamente a modificação na energia do fluido causada pela sua passagem através de um meio poroso. Trabalhando com meios granulares não-consolidados, Darcy propôs que, para baixas velocidades, o gradiente de pressão ( $dP/dx$ ) de um fluido incompressível com viscosidade  $\mu$  escoando através de um meio poroso, fosse dado por (INOCENTINNI *et al.*, 1999):

$$-\frac{dP}{dx} = \frac{\mu}{k_1} V_s \quad \text{Equação (4)}$$

A integração da Equação 4 para a espessura (L) do meio poroso resulta na equação da Lei de Darcy para a permeabilidade:

$$\frac{\Delta P}{L} = \frac{\mu}{k_1} V_s \quad \text{Equação (5)}$$

O parâmetro  $k_1$ , conhecido como constante de permeabilidade darciana ou viscosa, é uma propriedade da estrutura porosa.

A equação da Lei de Darcy tem o grande mérito de ser simples e de separar as influências do fluido ( $\mu$ ), escoamento ( $V_s$ ) e meio poroso ( $k_1$ ). Por ser derivada de ensaios a baixas velocidades, no entanto, a Lei de Darcy considera unicamente os efeitos do atrito sobre a queda de pressão no filtro.

Reynolds em 1900 e Forchheimer, em 1901, também trabalhando com meios granulares, perceberam que a Lei de Darcy não apresentava bons resultados com o aumento da velocidade do fluido. Ao invés de uma relação linear entre queda de pressão e velocidade, ambos observaram uma relação parabólica, e associaram-na à variação da energia cinética de um fluido incompressível com densidade ( $\rho$ ) durante seu escoamento pelo meio poroso. Posteriormente, observou-se que:

$$\frac{\Delta P}{L} = \frac{\mu}{k_1} V_s + \frac{\rho}{k_2} V_s^2 \quad \text{Equação (6)}$$

A equação acima, conhecida como equação de Forchheimer, introduziu uma nova constante,  $k_2$ , chamada de permeabilidade não-darciana ou inercial, sendo também dependente apenas do meio poroso.  $L$  é a espessura do meio poroso e  $\rho$  é a densidade do fluido.

Na equação de Forchheimer, o termo  $\mu V_s/k_1$  representa os efeitos viscosos da interação fluido-sólido, enquanto o termo  $\rho V_s^2/k_2$  representa os efeitos cinéticos (INOCENTINNI *et al.*, 1999). Por efeitos viscosos, o fluido perde energia de dois modos. Primeiro, pelo atrito entre as moléculas do fluido durante o escoamento. Neste caso, quanto maior a viscosidade do fluido ( $\mu$ ), maior será o atrito e conseqüentemente a transformação da energia de pressão em calor. A outra forma de perda de energia ocorre pelo atrito entre o fluido e a parede do meio poroso. Aqui, a área de contato entre ambos, representada pela constante  $k_1$ , quantifica esta perda de energia do fluido. Quanto maior a área de contato, maior será a resistência ao escoamento do fluido. Geralmente, o aumento de área é associado à diminuição do tamanho das partículas para estruturas granulares ou do tamanho do poro para estruturas celulares (INOCENTINNI *et al.*, 1999).

Os efeitos inerciais ou cinéticos sobre a queda de pressão são causados pela turbulência do fluido escoante e/ou pela tortuosidade do meio poroso. No primeiro caso, a turbulência é quantificada pelo número de Reynolds, definido como:

$$Re = \frac{\rho V_s d_{poro}}{\mu} \quad \text{Equação (7)}$$

onde  $V_s$  representa a velocidade pontual no interior de um poro de diâmetro  $d_{poro}$ .

Quando  $Re > 2100$ , o escoamento torna-se turbulento ou caótico, o que causa o distúrbio das camadas do fluido e aumenta a perda de energia. Quanto maior a energia cinética do fluido, mais turbulento será o escoamento e maior a perda de energia (pressão).

A tortuosidade, por outro lado, representa o caminho que o fluido percorre no interior dos poros dividido pela espessura do elemento poroso. Quanto mais tortuoso um meio poroso, maior a área de interação entre as camadas do fluido e as paredes dos poros. Isso potencializa os efeitos viscosos e inerciais que causam a queda de pressão do fluido. A constante de permeabilidade não-darciana,  $k_2$ , representa a contribuição do meio poroso para a ocorrência de efeitos inerciais/cinéticos sobre a queda de pressão.

Um fator que deve ser considerado para o ajuste das equações de permeabilidade é a compressibilidade do fluido permeante. Embora não ocorra para líquidos, uma expansão (ou descompressão) ocorre quando um gás escoar através do meio poroso. A consequência é que a velocidade do gás na entrada da amostra é menor do que na saída. O efeito será mais acentuado quanto maior a queda de pressão através da estrutura. Na prática, quanto menor a porosidade da estrutura ou maior a velocidade de escoamento, maior será a descompressão do gás, alterando a interação sólido-fluido e o perfil da curva de queda de pressão.

A inclusão da influência da compressibilidade do gás nas equações de permeabilidade pode ser feita com a consideração do gás como sendo ideal. A integração das equações diferenciais de Darcy e Forchheimer resulta deste modo em:

$$\frac{P_e^2 - P_s^2}{2PL} = \frac{\mu}{k_1} V_s \quad \text{Equação (8)}$$

$$\frac{P_e^2 - P_s^2}{2PL} = \frac{\mu}{k_1} V_s + \frac{\rho}{k_2} V_s^2 \quad \text{Equação (9)}$$

onde  $P_e$  e  $P_s$  são respectivamente a pressão na entrada e na saída da amostra sob ensaio. A pressão  $P$  corresponde à pressão de saída da amostra. As Equações 8 e 9 são respectivamente as versões para as equações de Darcy e Forchheimer válidas para o



escoamento de gases, quando os efeitos da compressibilidade são significativos para a queda de pressão. A equação de Forchheimer para fluidos incompressíveis apresenta, contudo, o termo quadrático negativo, o que carece de significado físico. As constantes de permeabilidade  $k_1$  e  $k_2$  obtidas por esta equação não teriam, assim, qualquer aplicação na estimativa da permeabilidade em outras condições de escoamento (tipo de fluido, velocidade, etc).

A constatação experimental da dependência parabólica entre a queda de pressão e a velocidade do fluido permeante conduz a uma das mais importantes observações sobre o escoamento em meios porosos, a de que permeabilidade é um conceito relativo. Dois meios porosos distintos podem ser cada qual mais permeável do que o outro a um mesmo fluido dependendo unicamente da faixa de velocidade escolhida. A utilização da equação de Forchheimer permite que esse comportamento ambíguo seja explicado. Um meio com menor constante de permeabilidade  $k_2$  tem queda de pressão mais sensível a efeitos cinéticos (densidade do líquido, turbulência e tortuosidade) que ocorrem com o aumento da velocidade  $V_s$ . Já outro meio, por sua vez, tem menor constante de permeabilidade  $k_1$ , e assim sente mais a influência dos efeitos viscosos (viscosidade do gás e área de contato gás-material) em baixas velocidades. Deste modo, não há sentido em dizer que um meio poroso é mais ou menos permeável do que outro a não ser que a velocidade de escoamento seja especificada. Somente através da correta determinação das constantes de permeabilidade da equação de Forchheimer é que a permeabilidade do material a um determinado fluido pode ser precisamente quantificada nas condições desejadas de escoamento (INOCENTINNI, 1999).

### **3.8. Ensaios *in vitro* - Comportamento em SBF**

Materiais artificiais implantados em defeitos ósseos são geralmente encapsulados por tecido fibroso, levando ao seu isolamento do osso que o cerca. Kokubo (KOKUBO, 2006), contudo, afirma que em 1972, Hench *et al.* mostraram que alguns vidros compostos de  $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$ , chamados de biovidros que se ligaram espontaneamente ao tecido ósseo sem a formação de tecido fibroso adjacente. Desde então muitos tipos de cerâmicas, como HA,  $\beta$ -TCP sinterizado, cerâmica bifásica HA/  $\beta$ -TCP e vitrocerâmicas A-W, contendo apatita cristalina e wollastonita, também mostraram formar ligações com osso vivo e foram usados clinicamente como importantes substitutos ósseos. Porém é desejado o desenvolvimento de novos materiais que se liguem ao tecido ósseo.

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 HA 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).

### 3.9.1 História do SBF

Em recente artigo publicado na revista *Biomaterials*, Kokubo & Takadama (2006) fazem uma revisão sobre a história e o desenvolvimento do SBF, além de citarem vários trabalhos que utilizaram SBF para prever o comportamento de determinado material quando implantado.

Em 1980, Hench *et al.* mostraram que a formação de um filme com uma camada rica em sílica e fosfato de cálcio que ocorre nos materiais biocompatíveis quando implantados pode ser reproduzida em uma solução tampão consistente de Tris hidroximetilamino metano e ácido clorídrico, com pH = 7,4 (OGINO, 1980).

Por outro lado, Kitsugi *et al.* (1987) mostraram que não há a formação de uma camada de SiO<sub>2</sub> em vitrocerâmicas A-W, mas sim a formação de uma camada de fosfato de cálcio na sua superfície, que permitiria a ligação com o tecido ósseo. Na seqüência, Kokubo *et al.* (1990), usando difração de raios X, identificaram esta camada de fosfato de cálcio como sendo apatita cristalina. Somando a isso, em 1990, eles mostraram que a formação *in vivo* da apatita na superfície da vitrocerâmica A-W pode ser reproduzida em SBF, com concentrações de íons quase iguais às do plasma sanguíneo humano, mas sem a solução tampão Tris (KOKUBO *et al.*, 1990; e Filgueiras *et al.* (1993), também independentemente confirmaram a formação de apatita na superfície do Biovidro 45S5 em SBF.

Uma análise detalhada por difração de raios X de filme fino (DRX-FF), infravermelho com transformada de Fourier (IV-FT), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transição (MET) da apatita superficial formada em SBF mostrou que ela é similar ao osso mineral em composição e estrutura (KOKUBO *et al.*, 1990; OHTSUKI, 1995). Como resultado, se especulou que os osteoblastos poderiam preferencialmente se proliferar e se diferenciar para produzir apatita e colágeno na sua

superfície. Então, a apatita formada pode se ligar com a superfície da apatita, assim como, ao osso próximo, conseqüentemente, é formada uma forte ligação química entre o material e o tecido ósseo através da camada de apatita. Em contraste, a vitrocerâmica A-W (Al), que contém apatita e wollastonita, mas em uma matriz vítrea contendo alumina ( $Al_2O_3$ ), porém não houve a formação da camada de apatita nos ensaios *in vivo* e *in vitro* e, por conseguinte, não houve ligação do implante com o tecido ósseo (KOKUBO *et al.*, 1990; KITSUGI, 1989).

Baseado nesses resultados, em 1991, foi proposto que o requisito principal para a formação de ligação entre o material e o tecido ósseo é a formação de uma apatita na superfície em SBF (KOKUBO, 1991).

De acordo com a Tabela 3.4, pode-se perceber que o SBF original usado por Kokubo *et al.* em 1990 e por Hench em 1993 não possuía o íon  $SO_4^{-2}$  presente no plasma sangüíneo. Isso foi corrigido em artigos (KOKUBO, 1991; OHTSUKI, 1991) publicados por Kokubo em 1991. Desde então, o c-SBF corrigido tem sido utilizado ao invés do SBF original.

Também se pode perceber que o SBF é uma solução altamente supersaturada. E é difícil de ser preparada sem precipitação. Em 1995, Cho *et al.* descreveu a preparação do SBF detalhadamente.

Entretanto, na Tabela 3.4, pode-se ver que o SBF corrigido é mais rico em  $Cl^-$  e mais pobre em  $HCO_3^-$  do que o plasma sangüíneo humano. Em 2003, Oyane *et al.* tentaram corrigir esta diferença preparando o SBF revisado (r-SBF), no qual as concentrações dos íons  $Cl^-$  e  $HCO_3^-$  foram igualados aos níveis do sangue humano. Porém o carbonato de cálcio utilizado no trabalho possui uma forte tendência a precipitar. Em 2004, Takadama *et al.* propuseram um novo SBF (n-SBF) no qual ele diminuiu somente a concentração do íon  $Cl^-$  ao nível do plasma sangüíneo, deixando a concentração de  $HCO_3^-$  igual à do c-SBF. Comparou-se o n-SBF com o c-SBF em sua estabilidade e reprodutibilidade. Nessa mesma pesquisa aprimorou-se os procedimentos para a preparação do SBF.

Em 2003, o método de preparação refinado do c-SBF foi proposto ao comitê Técnico ISO/TC150 como uma solução para as medidas *in vitro*.

Tabela 3.4. Concentração de íons dos SBF's e do sangue humano.

	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>
<b>Plasma sanguíneo humano</b>	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5
<b>SBF original</b>	142,0	5,0	1,5	2,5	148,8	4,2	1,0	0,5
<b>SBF corrigido (c-SBF)</b>	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,0
<b>SBF revisado (r-SBF)</b>	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5
<b>SBF novo (n-SBF)</b>	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	4,2	1,0	0,5

### 3.9.2. Correlação qualitativa da formação de apatita em SBF com bioatividade *in vivo*

Há a formação de uma fina camada de fosfato de cálcio na superfície da HA sinterizada quando imersa em SBF (Kokubo, 1988; KIM, 2004). O que foi confirmada com a formação de ligações entre a HA e o tecido ósseo através da camada de apatita formada *in vivo*. Tal comportamento também foi verificado para os Biovidros 45S5 e do sistema Na<sub>2</sub>O – CaO – B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – SiO<sub>2</sub> – P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, assim como para as vitrocerâmicas A-W, para as cerâmicas bifásicas HA/ β-TCP e para o sulfato de cálcio e para o compósito polietileno/vitrocaramica A-W.

A vitrocerâmica A-W(Al) não formou a camada de apatita em sua superfície quando mergulhada em SBF, mas também não houve a formação de tal camada quando implantado *in vivo*. Todos os trabalhos acima mostram que para todos esses materiais, a formação de apatita em suas superfícies em SBF é perfeitamente correlacionada com a sua bioatividade *in vivo*.

A calcita natural e o β-TCP não apresentaram a formação da camada de apatita em sua superfície, porém se ligam ao tecido ósseo quando implantados. Uma possível explicação para isso é a rápida taxa de absorção desses materiais *in vivo* de maneira que quando eles estão implantados, o processo de absorção é mais rápido do que o de crescimento de tecido ósseo.

A partir desses resultados, pode-se dizer que em um material no qual ocorra a formação de HA em sua superfície, pode se ligar ao tecido ósseo quando implantado.

## 4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 4.1. Obtenção do cimento de fosfato tricálcico

Os precursores químicos utilizados para a obtenção do cimento foram fabricados pelas empresas NUCLEAR<sup>®</sup> e QUIMIBRÁS<sup>®</sup>, respectivamente, para o carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) e para o hidrogenofosfato de cálcio diidratado (DCPD) ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). O cimento de fosfato tricálcico foi sintetizado em laboratório utilizando-se a metodologia reportada por Driessens (1997). Inicialmente obteve-se o pirofosfato de cálcio ( $\gamma\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ) a partir do DCPD. Para isso, o DCPD foi calcinado à temperatura de  $550^\circ\text{C}$  por 2h para que se chegasse à fase  $\gamma$ . O pirofosfato de cálcio após o resfriamento foi desagregado manualmente com almofariz e pistilo de porcelana em capela provida de exaustão, mantendo-se sempre o cuidado de evitar qualquer tipo de contaminação ao pó e depois passado em peneira malha 20 ABNT. O pirofosfato de cálcio e o carbonato de cálcio foram homogeneizados a seco com o objetivo principal de promover uma boa mistura entre os reagentes. A mistura foi realizada em frasco plástico de polipropileno contendo elementos de moagem esféricos de 10mm de diâmetro em Alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). A mistura foi realizada por um período de tempo de 30min com a proporção em massa de 1:4 entre carga e meios de moagem.

O tratamento térmico aos quais os precursores foram submetidos constitui-se de uma etapa de calcinação, seguida de uma etapa de resfriamento brusco. O processo de calcinação permitiu a reação dos dois precursores químicos, a fase gama do pirofosfato de cálcio ( $\gamma\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ) e carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), que foram mantidos em forno tipo mufla, sem controle de atmosfera, a temperatura de  $1300^\circ\text{C}$  durante um patamar de 5h.

Logo após o término do patamar de calcinação, com o forno ainda quente, foi realizado um resfriamento brusco, despejando-se a matéria-prima previamente alojada em cadinho de alumina em uma bandeja de aço resfriada externamente com água corrente, mantendo-se, além disso, o material calcinado sob ventilação contínua, com o objetivo de se obter um resfriamento brusco e priorizar a retenção da fase alfa do fosfato tricálcico ( $\alpha\text{-TCP}$ ) evitando a transformação indesejada na fase beta do fosfato tricálcico ( $\beta\text{-TCP}$ ), sistema este menos reativo.

O  $\alpha\text{-TCP}$  após resfriamento foi desagregado manualmente com almofariz e pistilo visando a granulação da matéria-prima num tamanho suficientemente pequeno, passando

em malha polimérica especificação 20 ABNT (abertura de 850 $\mu$ m), adequado para a próxima etapa de moagem a úmido.

A moagem a úmido foi efetivada utilizando álcool etílico (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH) como meio em um frasco polimérico cilíndrico com capacidade volumétrica de um litro, contendo corpos moedores esféricos de alumina, com a finalidade de se minimizar contaminações oriundas do processo de desgaste entre os meios de moagem.

A solução resultante (cimento moído + álcool) foi então peneirada apenas para se separar os meios de moagem e logo em seguida alocada em um béquer, onde permaneceu 72h em estufa a 60°C para promover a evaporação total do álcool, restando apenas o pó de cimento moído e seco.

A fração líquida foi formulada com o objetivo de se obter uma solução aquosa semelhante à composição padrão, utilizada na mistura convencional de cimentos de fosfato de cálcio. A formulação mais difundida para a fração líquida corresponde a uma diluição de 2,5% de hidrogenofosfato disódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (SYNTH<sup>®</sup>) em água deionizada. Neste sentido, formulou-se a referida solução através da diluição de 6,29g do reagente Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> em 100mL de água deionizada. Esta solução foi chamada neste trabalho de Solução Padrão.

Utilizou-se ainda uma outra solução contendo, além de água deionizada e 2,5% de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3% de defloculante. O defloculante utilizado foi o Poliacrilato de Amônio de nome comercial Disperlan L.A.(Lambra S/A). Esta solução foi chamada neste trabalho de Solução com Defloculante.

## **4.2. Obtenção das esferas de parafina**

Para a obtenção de parafina na forma de microesferas utilizou-se um béquer com capacidade para 1L contendo 500mL de água deionizada, 4g de poli (álcool vinílico) (PVA) (Kuraray Poval) e 5g de sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Synth). Esta solução foi aquecida à 100°C e nela foi adicionada a parafina comercial (Petrobrás) e aguardada sua total fusão ( $T_{m\text{parafina}} = 67^\circ\text{C}$ ). Colocou-se o sistema sob agitação mecânica de 400 rpm durante aproximadamente 10min para a formação de uma espuma consistente, e então foi desligado o aquecimento e feito um resfriamento rápido com a adição de água fria (aproximadamente 5°C). As esferas foram separadas da solução através de peneiras, em três faixas granulométricas: 100 a 250 $\mu$ m, 250 a 350 $\mu$ m e 350 a 850 $\mu$ m. As esferas foram lavadas com água deionizada, secas à temperatura ambiente e armazenadas em um dessecador.

### 4.3. Obtenção dos arcabouços

Os arcabouços foram confeccionados homogeneizando-se as esferas de parafina juntamente com o  $\alpha$ -TCP e só então adicionado à fase líquida. A fase líquida sempre foi adicionada na proporção de 1mL para cada 1g de  $\alpha$ -TCP. As esferas de parafina foram adicionadas nas seguintes quantidades 1,00g; 1,25g; 1,50g; 1,75g e 2,00g para cada grama de  $\alpha$ -TCP. A pasta formada foi vazada em moldes de silicone e os corpos-de-prova foram desmoldados após as 24h de cura e então submetidos a um tratamento térmico para extração da parafina. O tratamento térmico consistia em colocar os corpos-de-prova em estufa a 100°C sobre papéis absorventes para extração da maior parte da parafina e, posteriormente a colocação dos mesmos em um forno tipo mufla a uma temperatura de 600°C, a uma taxa de aquecimento de 10°C/min, com um patamar de 1h.

### 4.4. Caracterização

As propriedades e características do cimento de fosfato tricálcico, das esferas de parafina e dos arcabouços foram investigadas utilizando-se as técnicas descritas a seguir.

#### 4.4.1. Difração de raios X

A avaliação da composição mineralógica foi realizada através de um difratômetro de raios X marca comercial PHILLIPS®, modelo X'Pert MPD. O limite mínimo de detecção de fases cristalinas dispersas capazes de serem detectadas no equipamento utilizado está na faixa de 4%. Para a realização da análise utilizou-se um programa com um intervalo de varredura angular de 20 a 50°, com avanço gradual de 0,02° a cada intervalo de tempo de 1s. A configuração do aparelho contou com uma máscara com abertura de 15mm na saída do tubo, uma corrente no filamento de 40mA e uma tensão de aceleração dos elétrons de 40kV.

#### 4.4.2. Espectroscopia de infravermelho

Esta técnica é 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 500 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 (a HA) e uma porcentagem de KBr de grau espectroscópico na proporção de 0,3 mg de pó para 300 mg de KBr.

#### 4.4.3. Difração de Laser (granulometria)

Para um controle do processo de beneficiamento da matéria-prima determinou-se a distribuição do tamanho das partículas (DTP) do pó sintetizado para frações volumétricas da amostra de 10%, 50% e 90%. Avaliaram-se também através desta mesma técnica os respectivos tamanhos médios de partículas (TMP) dos demais componentes utilizados.

O TMP é calculado com relação a todo o intervalo de tamanhos de partículas medido no granulômetro, diferente da distribuição que demonstra as faixas de concentração de certos tamanhos de partícula.

Para a DTP foi usado o método de espalhamento de radiação laser num granulômetro de marca comercial CILAS<sup>®</sup>, modelo 1180. O método experimental escolhido foi a úmido, no qual a amostra fica suspensa em um fluido durante as medidas de distribuição de partículas. Tal método é preferencialmente usado, por eliminar as chances de que duas partículas passem ao mesmo tempo pelo detector, provocando erro nos resultados. Como fluido optou-se pela utilização de álcool isopropílico ( $\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$ ), com o objetivo de não promover reação de hidratação entre as partículas de cimento, o que poderia interferir significativamente no ensaio, assim como provocar danificação no equipamento.

Para se garantir uma análise com alto grau de confiabilidade foi realizada previamente a “medição do branco”, que é a análise do álcool isopropílico puro. Com este procedimento podem-se determinar possíveis partículas misturadas ao álcool isopropílico, que se não identificadas previamente, podem ocasionar erros nos resultados. Usando a teoria de difração de Fraunhofer, os valores de intensidade foram então usados para determinar a distribuição e o tamanho médio de partículas das amostras.

#### 4.4.4. Análise termodiferencial

A técnica de análise termodiferencial foi utilizada como uma ferramenta de controle para ajudar a entender os fenômenos envolvidos na reação dos precursores químicos utilizados durante a etapa de síntese da matéria-prima.



Quando uma substância sofre uma mudança física ou química, observa-se uma variação correspondente na entalpia. Se o processo for promovido por uma variação controlada de temperatura, isto constitui a base das técnicas conhecidas como análise térmica diferencial (DTA). A DTA permite medir a diferença de temperatura entre a amostra e um material de referência (inerte) em função da temperatura enquanto que ambos são aquecidos nas mesmas condições. A análise pode ser realizada com um programa de aquecimento ou resfriamento, com velocidade de variação de temperatura programável (em geral, na faixa de 5 a 20K/min). Há ainda a possibilidade de o sistema ser mantido a uma temperatura constante, isto é, operar no modo isotérmico, a qualquer temperatura dentro da faixa de operação do equipamento, durante um tempo determinado. Assim, as áreas sob os picos serão proporcionais às variações de entalpia que ocorrem em cada transformação. O registro da curva é expresso em termos de fluxo de calor (miliwatts, mW) versus temperatura (°C) ou tempo (min).

As reações exotérmicas são representadas por picos, enquanto que as reações endotérmicas são representadas por vales na curva termodinâmica. A interpretação destas variações permite identificação das reações ocorridas.

O programa de execução da análise seguiu uma taxa de aquecimento de 10K/min até a temperatura de 1300°C em uma termobalança marca comercial HARROP®, modelo ST-736. A atmosfera usada foi a ambiente com fluxo de ar forçado com vazão de 30L/h.

#### 4.4.5. pH

As medidas de pH foram realizadas com um medidor de pH digital marca comercial DIGIMED®, modelo DM-20, a temperatura de 22°C ± 1°C.

O pH é um dos principais fatores de influência nas propriedades reológicas de massas plásticas cerâmicas. Um cimento ósseo requer um rígido controle do pH, pois sua variação pode desencadear uma série de problemas ao local de enxerto, e ao corpo humano como um todo.

Entre os principais parâmetros que afetam a variação de pH durante a cura do cimento, pode-se citar a composição química do cimento, o tamanho relativo das partículas do cimento, o uso de aceleradores ou retardadores e sua concentração relativa, a razão líquido/pó e a temperatura. No entanto, 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 cura.

#### 4.4.6. Porosidade aparente

O procedimento para o cálculo da porosidade aparente baseou-se na norma internacional ASTM C 20 (*Standard test methods for apparent porosity, water absorption, apparent specific gravity, and bulk density of burned refractory brick and shapes by boiling water*) através da determinação da massa da amostra seca e das massas úmida e imersa. Este método é baseado no princípio de Arquimedes.

Para a realização da pesagem das amostras imersas e úmidas, foi necessário que os corpos-de-prova permanecessem imersos em água um período de tempo de 24h. Para a realização do peso imerso, utilizou-se o princípio de Arquimedes, de deslocamento de um fluido determinando-se o mesmo. Assim, utilizando-se o método de Arquimedes, expresso pela Equação (10), determinou-se a porosidade aparente dos corpos-de-prova.

$$P_{ap} (\%) = \frac{(M_u - M_s)}{(M_u - M_i)} \times 100 \quad \text{Equação (10)}$$

onde  $P_{ap}$  é a porosidade aparente [%],  $M_u$  a massa úmida,  $M_s$  a massa seca e  $M_i$  a massa imersa. Sendo que todas as medidas de massa estão na unidade grama [g].

Para o cálculo da porosidade aparente foram utilizados 5 corpos-de-prova conformados. A massa seca foi determinada após secagem dos corpos-de-prova por um período de tempo não inferior a 24h em estufa a 100°C, imediatamente após sua desmoldagem.

#### 4.4.7. Porosidade

As medidas de porosidade foram efetuadas pelo método geométrico, para tal as peças foram pesadas em balança com precisão de 0,0002g e tiveram as suas dimensões medidas com uso de um paquímetro. O valor de densidade,  $\rho$ , foi calculado pela divisão da massa pelo volume. A porosidade foi calculada de acordo com a formula:

$$\text{Porosidade}(\%) = 1 - \left( \frac{\rho}{\rho_o} \right) \quad \text{Equação (11)}$$

onde,  $\rho_o$  é igual a 3,156g/cm<sup>3</sup>.

#### 4.4.8. Resistência mecânica à compressão

As pastas cimentícias obtidas foram conformadas em um molde segundo a norma ASTM F 451-95 (*Standard specification for acrylic bone cement*). O molde foi confeccionado em aço inoxidável contendo cavidades de  $6\text{mm} \pm 0,1\text{mm}$  de diâmetro e  $12\text{mm} \pm 0,1\text{mm}$  de altura para moldagem plástica dos corpos-de-prova. Mesmo sendo todas as cavidades internas devidamente polidas, o molde foi lubrificado manualmente com uma fina camada de vaselina sólida para facilitar a desmoldagem dos corpos-de-prova para todas as formulações.

Os corpos-de-prova foram desmoldados após as 24h de cura dentro das cavidades do molde exposto ao ar à temperatura ambiente. Imediatamente antes da desmoldagem, realizou-se a correção do paralelismo das duas faces dos corpos-de-prova cilíndricos através de um leve desgaste superficial realizado por uma espátula metálica.

Para a determinação da resistência mecânica à compressão, os corpos-de-prova foram previamente submetidos a uma análise visual direta, com o intuito de verificar a sua integridade e acabamento superficial após sua extração dos moldes. Como critério de exclusão foram descartados os corpos-de-prova que apresentassem defeitos visíveis como quebras, bolhas ou falta de preenchimento.

Para a avaliação da resistência mecânica à compressão, foi utilizada uma máquina universal de ensaios ATS, modelo 1105 C a uma velocidade da travessa de 5mm/min. Com o ensaio de resistência mecânica pôde-se determinar a carga máxima necessária para o cálculo da resistência mecânica dos corpos-de-prova. A resistência mecânica à compressão é dada pela tensão de ruptura última do corpo-de-prova, que é dependente da força atuante na área efetiva da seção reta do corpo-de-prova. A resistência mecânica à compressão foi calculada de acordo com a Equação (12).

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad \text{Equação (12)}$$

onde  $\sigma$  é a tensão de ruptura [MPa],  $F$  é a força [N] necessária para a fratura e  $A$  é a área da seção reta dos corpos-de-prova [ $\text{mm}^2$ ].

#### 4.4.9. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise por microscopia teve como objetivo auxiliar as investigações das características microestruturais dos materiais investigados. A microestrutura pode ser considerada uma ponte entre o processamento cerâmico e as propriedades tecnológicas de interesse presentes no corpo cerâmico. O microscópio eletrônico de varredura utilizado foi um equipamento marca *JEOL*<sup>®</sup>, modelo JSM-6060. As amostras analisadas sofreram a aplicação de uma camada fina de ouro via *sputtering*.

#### 4.4.10. Permeabilidade

Para as medições de permeabilidade utilizou-se o equipamento descrito na Figura 4.1. O permeâmetro foi confeccionado no laboratório e consistiu de um compressor de ar, ligado a um fluxômetro, que permitia controlar o fluxo de ar que passava pela amostra, um manômetro antes da amostra e um depois da amostra, para medir a diferença de pressão na entrada e da saída do bloco poroso. No final, o sistema estava conectado a um rotâmetro cuja função era medir a velocidade de saída do ar. O equipamento para medida de permeabilidade foi baseado no trabalho de Moreira *et al.* (2004).

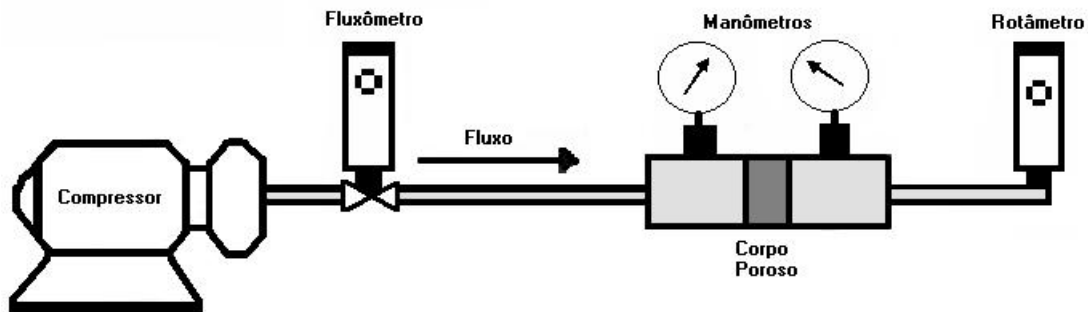


Figura 4.1. Esquema do permeâmetro.

Os resultados de permeabilidade foram calculados, utilizando-se a equação de Forchheimer, que já foi descrita anteriormente.

## 4.5. Ensaio *In Vitro*

### 4.5.1. Ensaio em SBF

Os ensaios *in vitro* foram feitos por imersão em SBF. Foram produzidos 30 blocos, os quais foram divididos em grupos de 5 e imersos em SBF por 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias. A troca da solução de SBF ocorria uma vez por semana. A composição do SBF se encontra na Tabela 4.1.

Antes da imersão dos blocos na solução de SBF, eles foram pesados e tiveram as suas dimensões avaliadas para calcular a porosidade. Também foi medido o pH da solução de SBF após cada semana de imersão. As fases cristalinas também foram avaliadas para cada tempo de imersão por difração de raios X. O esquema da Figura 4.2. mostra as etapas do estudo da imersão das peças em SBF.

Tabela 4.1. Composição iônica do SBF.

	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>
<b>SBF</b>	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5

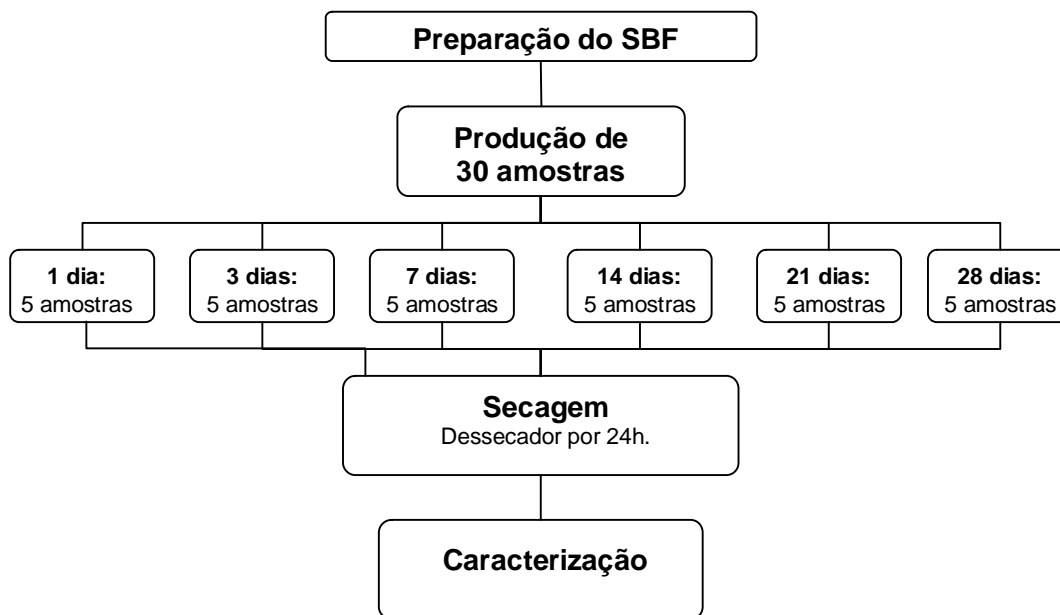


Figura 4.2. Fluxograma da produção dos blocos para a análise *in vitro*.

#### 4.5.2. Ensaio de viabilidade celular

##### *Cultivo celular*

Para análise da influência da HA sobre a viabilidade e capacidade proliferativa, foram utilizadas células da linhagem L1210, originadas do Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ. Estas células, que correspondem a uma leucemia linfocítica murina, são mantidas em cultivo permanente em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, *Sigma Chemical Co.* St Louis, MO, EUA) complementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, São Paulo, SP), a 37°C e em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

As células foram cultivadas em duas diferentes condições experimentais, em meio normal ou na presença dos arcabouços de CFC (porosidade de 85,4%). Foram feitos 3 grupos para os arcabouços e para o controle, com 24, 48 e 72 h de duração, sempre em triplicata. Para isto, foram usadas placas de cultivo celular com 24 poços, sendo colocado em cada poço 1 mL de meio de cultivo com diferentes concentrações celulares. Durante estes diferentes intervalos de tempo, a placa de cultivo foi mantida nas condições especificadas acima.

Para o período de 24 h (arcabouços e controle) foram usadas 10<sup>5</sup> (100.000) células por poço, enquanto que, para os períodos de 48 e 72 h (arcabouço e controle), foram usadas 10<sup>4</sup> (10.000) células por poço, devido ao maior tempo em cultura e conseqüente aumento esperado no número de células.

##### *Análise do número de células e viabilidade*

Ao final do período de cultivo, as células foram coletadas de cada poço e ressuspensas com Azul Tripan. Este corante azul não consegue atravessar a membrana intacta de células não lesadas (vivas) e cora apenas as células mortas, tornando-as azuis. A quantidade de células vivas e mortas é determinada em Câmara de Neubauer, observada em microscópio óptico, calculando-se assim a porcentagem de células vivas, sobre o total de células.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Síntese do cimento de fosfato tricálcico

A Figura 5.1 apresenta o difratograma do DCPD utilizado na confecção do pirofosfato de cálcio. Apesar de o fabricante declarar que o produto era composto apenas de DCPD, fase esta que é conhecida por bruxita, observou-se a presença de duas fases distintas: a bruxita e a monetita (DCPA – hidrogenofosfato de cálcio anidro). Embora houvesse a presença dessas duas fases, ao fazer a calcinação a 550°C, obteve-se somente a fase  $\gamma$ -Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> como se pode ver na Figura 5.2, que mostra o difratograma obtido da análise desse material. Os picos assinalados no difratograma da Figura 5.1 correspondem à ficha padrão de difração de número 09-0080 do *Joint Committee on Powder Diffraction Standards* (JCPDS) para o DCPA e ao número 09-0077 para o DCPD. Para a Figura 5.2 os picos correspondem a ficha padrão de difração número 15-0197.

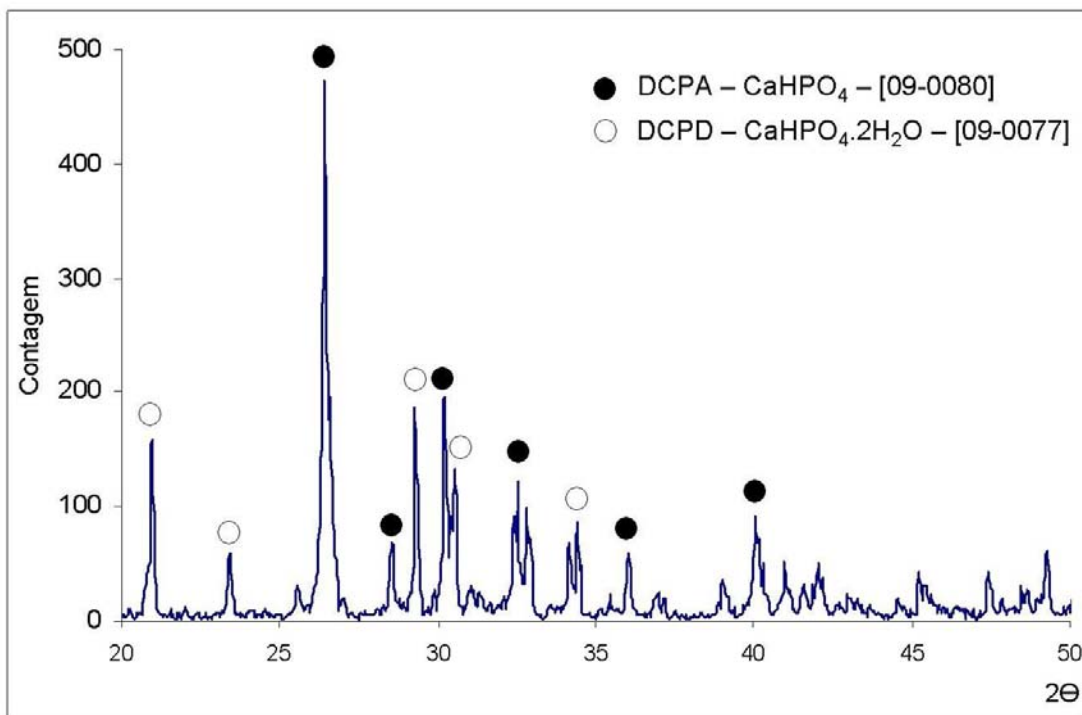


Figura 5.1: Difratograma de raios X do DCPD mostrando as fases bruxita e monetita.

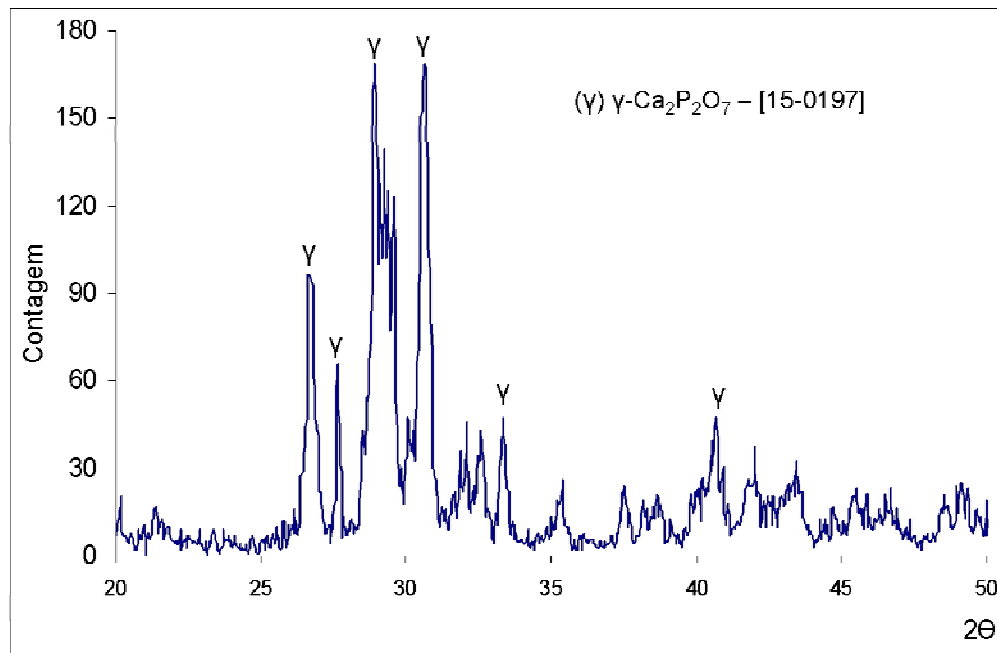


Figura 5.2: Difratoograma de raios X do pirofosfato de cálcio, obtido a partir da calcinação do DCPD por 2h a 550°C.

O  $\alpha$ -TCP obtido pelo método empregado na síntese era composto de  $\alpha$ -TCP como fase majoritária, acrescida de uma quantidade de  $\beta$ -TCP como fase indesejável como demonstrado pela análise qualitativa de difração de raios X. Na Figura 5.3 é apresentado o difratoograma do material obtido.

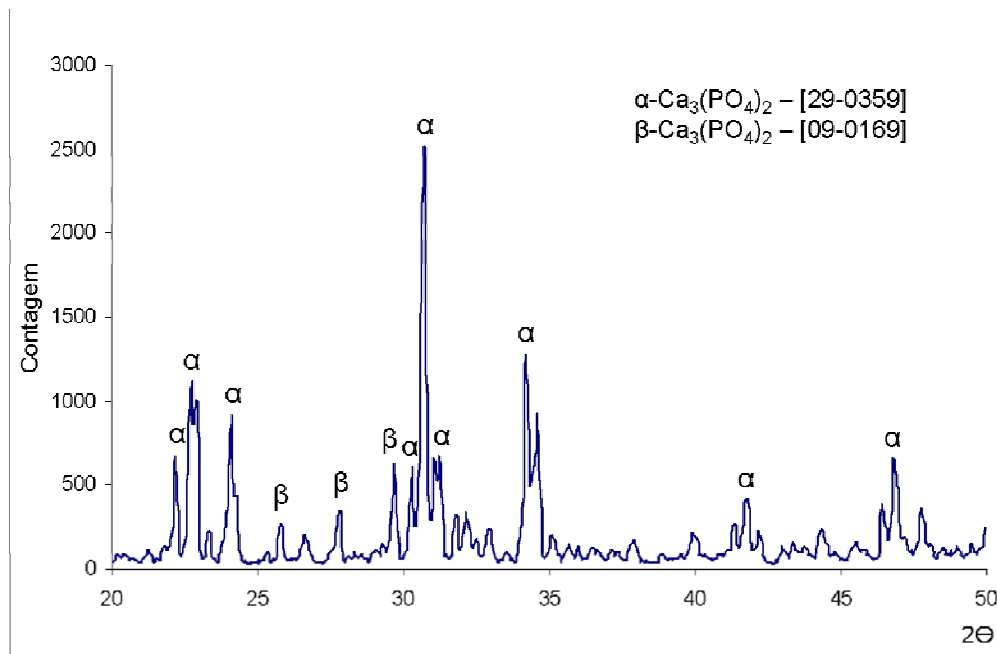


Figura 5.3: Difratoograma do cimento de fosfato tricálcico obtido pela reação entre  $\gamma$ -Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> e CaCO<sub>3</sub> a 1300°C, durante 5h, seguido de resfriamento brusco.



A presença de  $\beta$ -TCP como fase indesejada no processo de síntese do  $\alpha$ -TCP tem sido reportada na literatura (BERMUDÉZ *et al.*, 1994). Atualmente, ainda não são conhecidos registros sobre a obtenção de  $\alpha$ -TCP puro, independentemente do método de síntese utilizado, sendo a etapa de resfriamento brusco a etapa crítica neste processo (RAYNAUD *et al.*, 2002). O diagrama de fases do sistema CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (Figura 3.3 - Phase diagrams for ceramists, 1984) mostra que, para uma composição 3CaO.P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, a fase estável a baixa temperatura é o  $\beta$ -TCP, que, a 1125°C, se transforma em  $\alpha$ -TCP. Esta última fase é estável até 1430°C, quando se transforma em  $\alpha'$ -TCP, fase esta estável até a temperatura de fusão. A transformação  $\beta$ -TCP em  $\alpha$ -TCP é lenta e reversível, o que exige, 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.

A Figura 5.4 mostra um termograma dos precursores  $\gamma$ -Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> e do CaCO<sub>3</sub> na faixa de temperatura de 25°C até a obtenção do cimento de fosfato tricálcico. Nele são identificados picos exotérmicos em 250°C (possivelmente saída de CO<sub>2</sub>) e 1100°C, sendo que ambos estão acompanhados de uma perda de massa gradual. A inflexão em aproximadamente 1100°C está possivelmente relacionada com a formação do fosfato tricálcico a partir da combinação dos precursores.

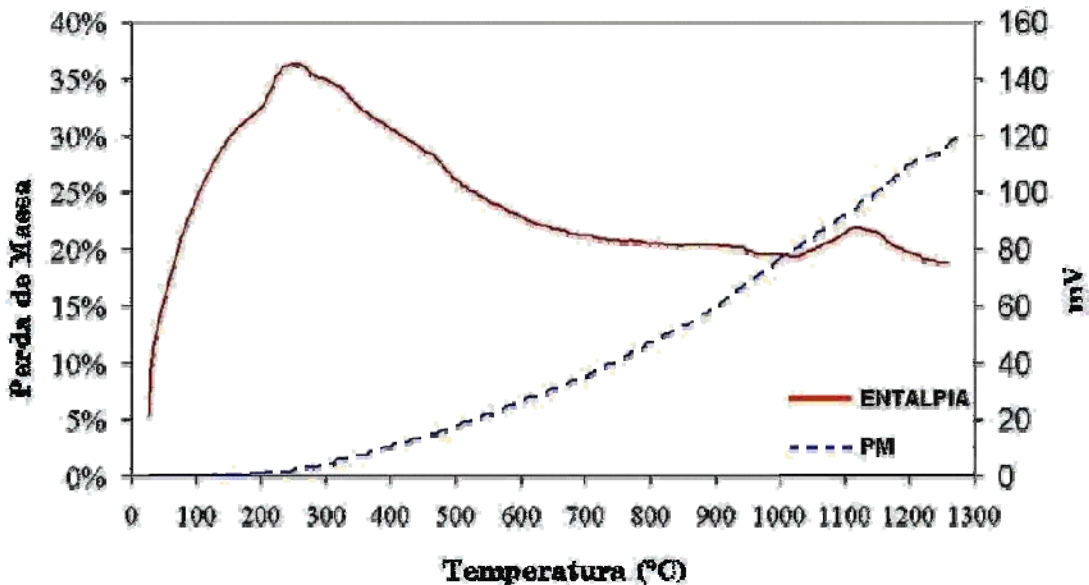


Figura 5.4: Termograma mostrando a evolução da reação entre o  $\gamma$ -Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> e o CaCO<sub>3</sub>, para a formação do cimento de fosfato tricálcico.

Nem todos os autores são unânimes na seqüência de conversão para a fase  $\alpha$ -TCP, como não há unanimidade também nas temperaturas exatas em que estas transformações ocorrem (VIALA, 1996; TAKAGI, 1998; FERNÁNDEZ, 2005). Acredita-se que estas variações estejam relacionadas com a pureza dos precursores utilizados nos diferentes estudos.

A Figura 5.5 mostra os resultados de espectroscopia de infravermelho para o  $\alpha$ -TCP antes e após a reação de cura. Observa-se que o espectro do cimento antes da reação de cura apresenta bandas largas, o que demonstra baixa cristalinidade do material (LE GEROS, 1991), devido ao choque térmico a que foi submetido na sua obtenção, o que provavelmente distorce a rede cristalina. As composições apresentaram as seguintes bandas de absorção: 660 e 563  $\text{cm}^{-1}$ , referentes à ligação P-O ou grupos  $\text{PO}_4$ ; 873  $\text{cm}^{-1}$  referente à ligação C-O; 1030  $\text{cm}^{-1}$ , referente a grupos  $\text{PO}_4$ ; 1454 e 1414  $\text{cm}^{-1}$  referentes à ligação C-O de grupos  $\text{CO}_3$  em hidroxiapatita carbonatada; 1615  $\text{cm}^{-1}$  referente à  $\text{H}_2\text{O}$  adsorvida; 2940 e 2970  $\text{cm}^{-1}$  de grupos  $\text{HPO}_4$ ; 3580  $\text{cm}^{-1}$  referente à ligação O-H de grupos (OH); 3700 a 3000  $\text{cm}^{-1}$  referente à  $\text{H}_2\text{O}$  adsorvida.

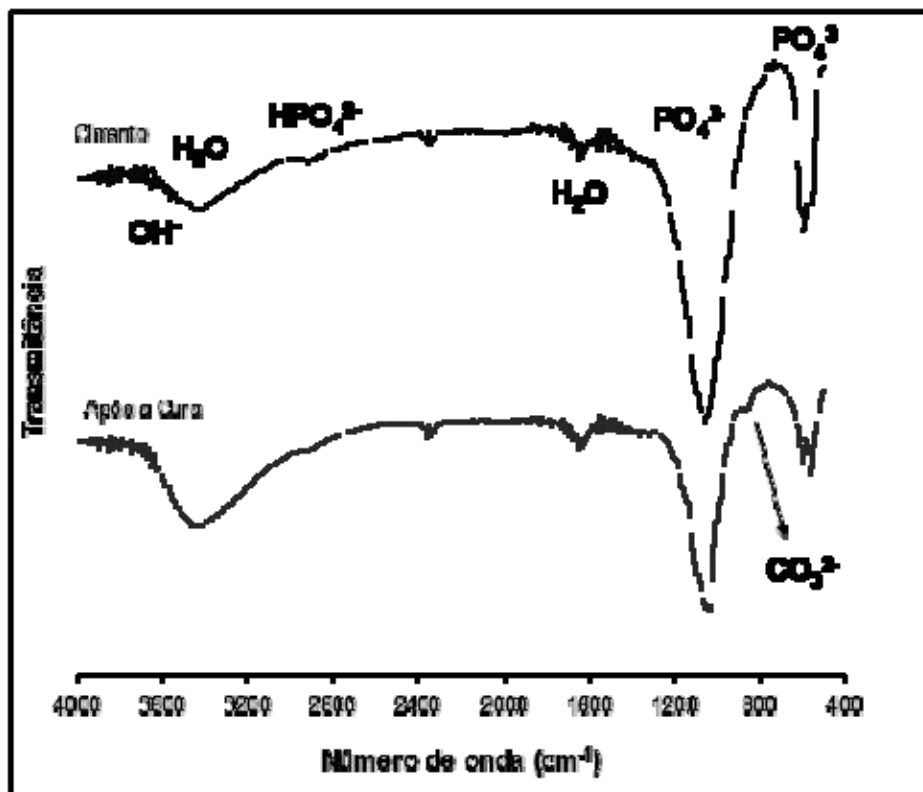


Figura 5.5: Espectroscopia de infravermelho das amostras de cimento antes e após a reação de cura.

A HA produzida pela reação de hidratação do  $\alpha$ -TCP é carbonatada devido à detecção de banda de absorção de  $\text{CO}_3^{2-}$  (1454 e 873  $\text{cm}^{-1}$ ). Os íons  $\text{CO}_3^{2-}$  entram na composição pela absorção do  $\text{CO}_2$  presente no ar ambiente. A presença de banda de absorção em 1997 e 2076  $\text{cm}^{-1}$  não pôde ser atribuída a nenhum tipo de ligação. A presença dessas bandas de absorção foram também observadas por Rigo, para HA precipitada, e Le Geros (RIGO, 1995; LE GEROS, 1991), para esmalte humano, dentina e osso. Esses autores também não fizeram a identificação do grupamento químico responsável pelo aparecimento dessa banda.

## 5.2. Determinação do tamanho de partícula e tempo de moagem

Para a determinação do tempo de moagem, foram obtidas amostragens para caracterização granulométrica após 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3h de moagem a úmido.

Os resultados obtidos na análise granulométrica do cimento avaliado nas diferentes etapas de moagem estão apresentados na Tabela 5.1. Em função desses resultados, optou-se por um tempo de moagem de 2,5 horas, já que não houve diminuição significativa do tamanho médio de partícula para um tempo de moagem superior a 2,5h.

A análise granulométrica do CFC moído por 2,5h é apresentada na Figura 5.6. Através da mesma, pode-se observar uma configuração bimodal, provavelmente, associada à diferença na friabilidade das fases  $\alpha$ -TCP e  $\beta$ -TCP.

Pode-se observar também a partir dos valores expostos na Tabela 5.1, que o tamanho médio de partículas após a moagem apresentou valor compatível com os encontrados na literatura, isto é, distribuição de tamanho de partículas entre 2 a 20 $\mu\text{m}$  (CHOW, 1997). Sabe-se que a distribuição de tamanho das partículas do cimento pode influenciar a quantidade de líquido necessário para a obtenção do material com consistência de pasta. A quantidade de líquido com 2,5% de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  mínima utilizada para a obtenção de uma pasta com consistência adequada (0,4mL/g), é diferente da reportada pela literatura por Driessens et al., 1994; Fernández, 1995 e Santos 2002 (0,32mL/g). Isso pode ser explicado pelo fato de haver, após 2,5h de moagem, uma porcentagem de partículas menores que 2 $\mu\text{m}$  superior a 10%, como mostra a Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Distribuição e tamanho médio de partícula do cimento após intervalos de tempos de moagem a úmido.

Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )						
Menor que	Após 0,5h	Após 1,0h	Após 1,5h	Após 2,0h	Após 2,5h	Após 3,0h
10% vol	1,21	1,19	1,19	1,16	1,14	1,14
50% vol	9,60	9,49	9,20	8,43	7,64	7,71
90% vol	22,24	20,45	19,53	17,79	15,88	16,01
TMP	10,90	10,33	9,96	9,06	8,18	8,24

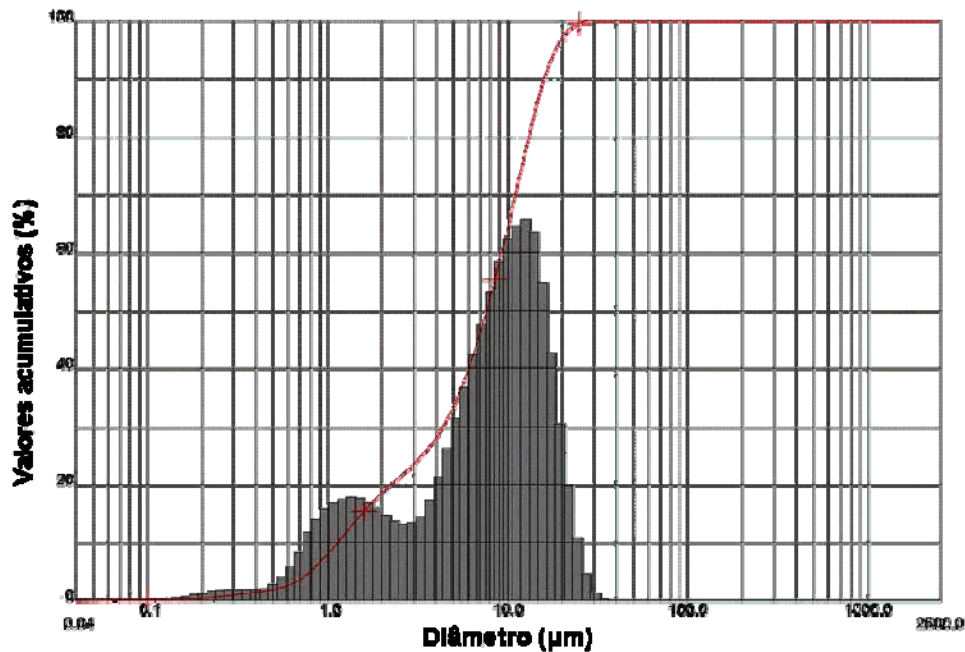


Figura 5.6: Histograma da distribuição dos tamanhos de partícula para o cimento de fosfato tricálcico obtido após 2,5h de moagem em álcool etílico absoluto.

Para avaliar como o tamanho de partícula, a partir do tempo de moagem, afeta as propriedades mecânicas do cimento de fosfato tricálcico, preparou-se uma composição com cimento acrescido de uma solução a 2,5% de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , com uma relação líquido/pó de 0,4mL/g. A análise dos resultados de resistência mecânica à compressão podem ser vistos na Figura 5.7.

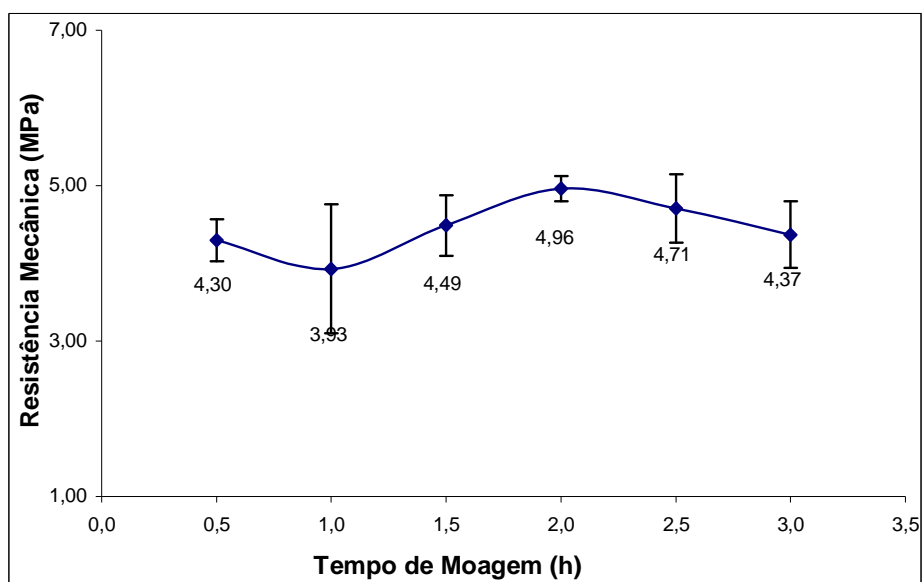


Figura 5.7: Comportamento da resistência mecânica do CFC para os diferentes tempos de moagem.

Através da comparação dos valores das resistências mecânicas com os seus respectivos tempos de moagem pode-se notar que não há uma variação significativa desses valores. Esses resultados de resistência mecânica pelo tempo de moagem são diferentes dos encontrados na literatura. Camiré *et al.* (2004) em seu trabalho estudaram a cristalinidade pelo tempo de moagem do  $\alpha$ -TCP e constatou que quanto maior o tempo de moagem menor a cristalinidade e maior a reatividade do material. Gbureck *et al.* (2003) ativou a formação de um cimento de  $\beta$ -TCP diminuindo a sua cristalinidade com o aumento do tempo de moagem. Em seus resultados a resistência mecânica do cimento aumentou com a diminuição da cristalinidade.

Possivelmente, neste trabalho, a resistência mecânica não se alterou com o tempo de moagem devido ao fato da microestrutura do cimento ser dada pela precipitação dos fosfatos de cálcio dissolvidos pelo líquido de cura e, portanto, a porosidade, fator determinante da resistência mecânica de materiais cerâmicos, estará ligada aos cristais precipitados de CDHA e não à granulometria do pó de cimento. Provavelmente a resistência mecânica somente aumenta quando se tem tamanho de partículas que não reajam e permaneçam na microestrutura, atuam como reforço do material. Não se estudou a cristalinidade do  $\alpha$ -TCP neste trabalho e, portanto, não é possível fazer uma comparação direta com a literatura. Um fato a ser levado em consideração é que quanto menor o tamanho da partícula, menor o tamanho dos poros formados na reação de cura e, conseqüentemente, podemos supor que maior a resistência mecânica. Analisando os dados

de Gbureck *et al.* podemos observar que não há grandes variações para o tamanho de partícula, mas como o material utilizado neste trabalho é diferente ( $\beta$ -TCP), será necessários realizar mais estudos para verificar a relação da cristalinidade do  $\alpha$ -TCP com o tamanho de partícula, para ter dados mais concisos a respeito da resistência mecânica.

Segundo Ginebra *et al.*(1998), Alves (2005) e Gbureck *et al.* (2003), a granulometria influencia o tempo de cura dos cimentos de fosfato de cálcio. Neste trabalho não foi avaliado o tempo de cura em virtude que não é fator imprescindível para a obtenção de arcabouços, sendo imprescindível no caso da utilização na forma de pasta para implante, que deve ter um tempo de presa inicial de cerca de 7 minutos (DRIESENS *et al.* 1997; SANTOS, 2002).

### 5.3. Reação de cura

A análise por difração de raios X do cimento após reação de cura é apresentada na Figura 5.8.

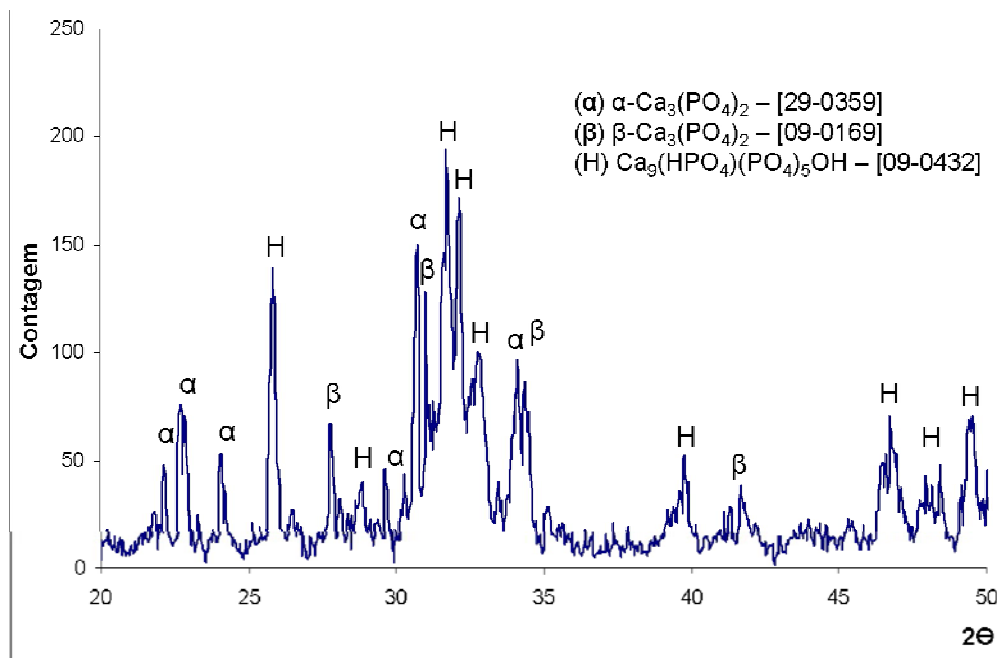


Figura 5.8: Difratoograma do cimento de fosfato tricálcico após 24h de cura.

O cimento foi homogeneizado com a solução padrão tendo uma relação líquido/pó de 0,4mL/g, deixando a pasta por 24h a temperatura ambiente. Constatou-se a presença da fase hidroxiapatita deficiente em cálcio ( $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$ ) (ficha de referência ICDD - *International Centre For Diffraction Data* 09-0432). Através do difratograma da Figura

5.8, pode-se observar também a presença remanescente da fase  $\beta$ -TCP e da fase  $\alpha$ -TCP não reagida. A permanência da fase  $\beta$ -TCP após a cura é provavelmente decorrente da sua maior estabilidade química (fase estável a baixa temperatura).

A micrografia da superfície de fratura do cimento reagido é apresentada na Figura 5.9. O aparecimento de agulhas ou placas petalóides é característico dos cimentos de fosfato de cálcio baseados no  $\alpha$ -TCP (GRUNINGER *et al.*, 1984; YU *et al.*, 1992; DRIESSENS *et al.*, 1997) e, na Figura 5.9 observa-se facilmente a presença dessas microestruturas características do cimento de  $\alpha$ -TCP reagido. É pelo intercruzamento destes cristais que ocorre o aumento da resistência mecânica do material (GRUNINGER *et al.*, 1984).

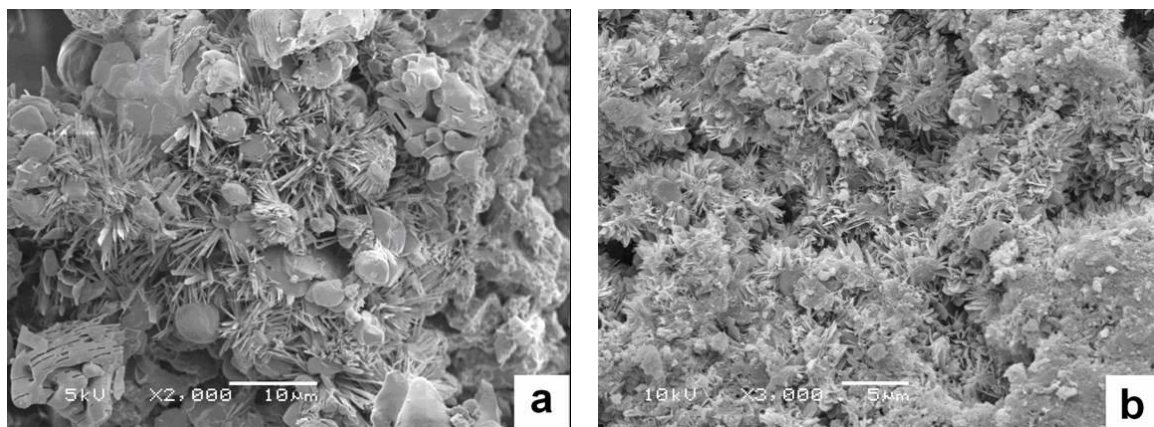


Figura 5.9: Fotomicrografias de MEV de amostras de cimento (a) reagido com relação líquido/pó de 0,4mL/g de solução padrão e (b) reagido com relação líquido/pó de com 0,4mL/g de solução com defloculante.

Praticamente não há mudanças na microestrutura do cimento no qual foi utilizado uma solução com defloculante, exceto uma diminuição das acículas como mostra a Figura 5.9 (b), condizente com o demonstrado por Santos (SANTOS, 2002). A diminuição do tamanho das agulhas é descrito por Santos como consequência do maior empacotamento das partículas, o que possibilita menores espaços entre estas, o que não permite o crescimento pronunciado das agulhas de CDHA precipitadas.

Provavelmente as partículas remanescentes no cimento tratam-se de partículas de alfa e de beta TCP como observado por diversos autores (YU *et al.*, 1992; DRIESSENS *et al.*, 1997; SANTOS, 2002;). A presença da fase beta deve reduzir o pH da composição de cimento em água, supondo que o ponto isoelétrico do fosfato tricálcico é menor que o ponto isoelétrico da HA (MEZZASALMA, 1997). O pH do cimento em meio líquido será ditado pelas contribuições das fases precipitadas e o pH é dos principais fatores que

determinam a citotoxicidade de cimentos de fosfato de cálcio (SANTOS, 2002; FERNÁNDEZ *et al.*, 1999).

#### 5.4. Variação da porosidade com a fase líquida

Como todo cimento de pega hidráulica, a adição de quantidades crescentes de água ao cimento de fosfato de cálcio aumenta a sua porosidade. À medida que aumenta a fração líquida no cimento, a densidade diminui, assim como aumenta a fração de vazios dentro do corpo. Pelos valores de Porosidade Aparente pode-se ter uma idéia da quantidade de vazios existentes nos corpos de prova. A porosidade aberta é considerada um fator favorável à condução tecidual, permitindo o crescimento de tecidos no interior dos poros, assim, estudou-se como a porosidade nos corpos de prova varia para cada tipo e quantidade de fase líquida utilizada. A Figura 5.10 mostra uma comparação dos valores de densidade geométrica dos corpos obtidos com uma solução contendo 2,5% de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (solução padrão) para diferentes quantidades de fase líquida, e dos corpos obtidos com uma solução contendo 2,5% de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  mais a adição de um defloculante (solução com defloculante), para as mesmas quantidades de fase líquida. A Figura 5.11 mostra os valores de porosidade aparente para as composições.

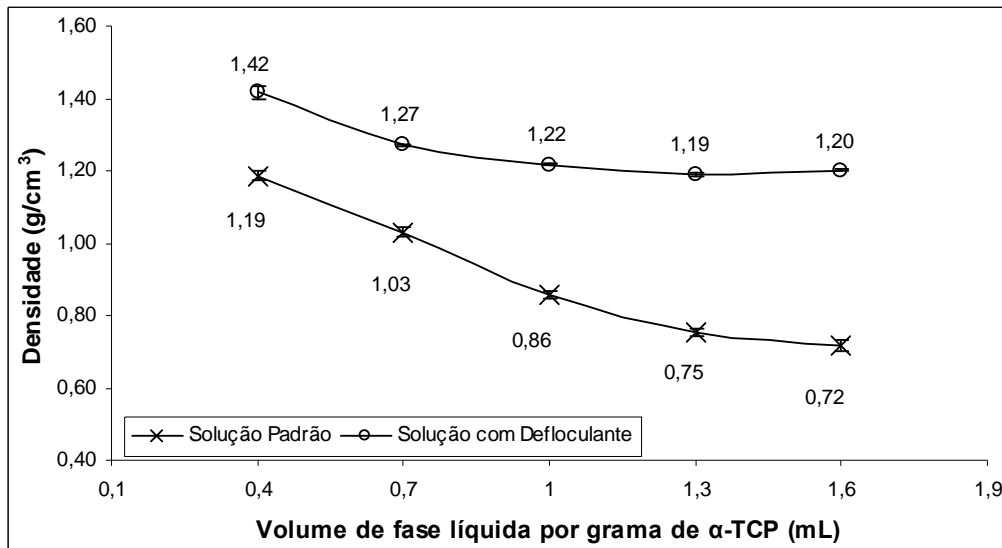


Figura 5.10: Variação da densidade geométrica do cimento com o volume de fase líquida utilizado para cada uma das soluções.



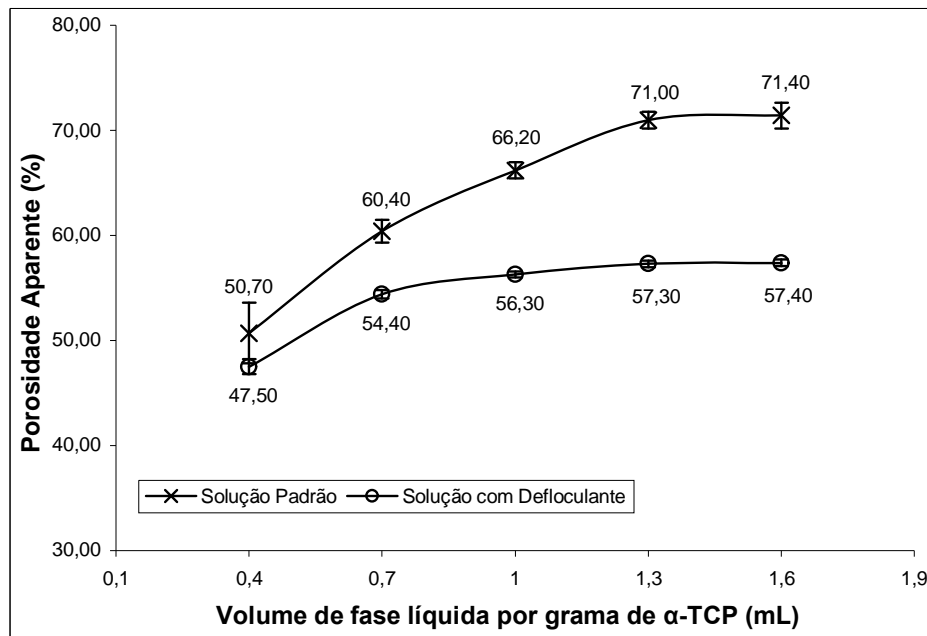


Figura 5.11: Variação da porosidade aparente do cimento com o volume de fase líquida utilizado para cada uma das soluções.

Como a quantidade de vazios aumenta conforme aumenta a quantidade de fase líquida utilizada, a densidade do material cai e conseqüentemente a porosidade aumenta. O uso de defloculantes na fase líquida favorece o empacotamento das partículas diminuindo o número de vazios encontrado dentro do material. Sendo a porosidade aberta considerada um fator favorável à osteocondução (MA, 2004; ALVES, 2005), permitindo o crescimento de tecido ósseo no interior dos poros, pode-se dizer que todas as formulações possuem tendência de favorecerem este comportamento biológico tendo em vista que todas as formulações apresentaram porosidade elevada.

Segundo Neville (1997), para o cimento Portland (que também é um cimento de pega hidráulica, assim como o de  $\alpha$ -TCP) a porosidade da pasta cimentícia depende da relação água/cimento, e que para relações maiores 0,38, o volume dos produtos da hidratação não é suficiente para preencher completamente o espaço disponível de modo que haverá um certo volume de poros capilares mesmo depois que o processo de hidratação se complete. Pastas cimentícias maduras contêm poucos poros maiores do que 1 $\mu$ m, com muitos outros menores do que 100nm. Eles têm formas diversas e formam um sistema interligado distribuído aleatoriamente por toda a pasta de cimento (NEVILLE, 1997).

A Figura 5.12 apresenta um gráfico mostrando a queda dos valores de resistência mecânica do cimento Portland pelo aumento da relação água/cimento (a/c), provenientes do trabalho realizado por Leite (2001).

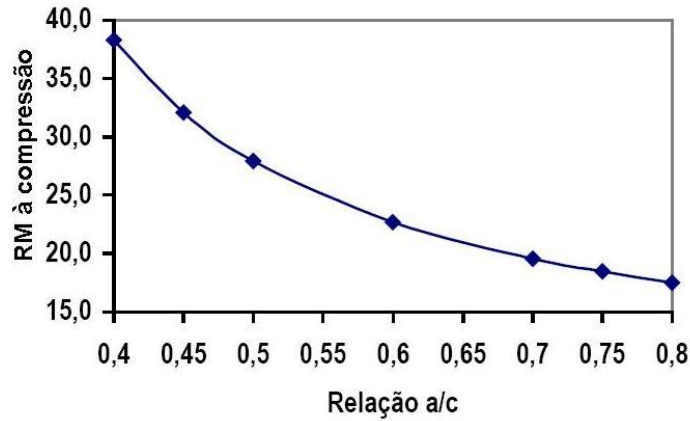


Figura 5.12: Variação da resistência mecânica à compressão do cimento Portland pela razão água/cimento (LEITE, 2001).

Através do gráfico é possível observar que a resistência à compressão do concreto tende a reduzir à medida que o valor de  $a/c$  aumenta. Isso apenas comprova as leis de comportamento amplamente difundidas no meio técnico de que a resistência à compressão é inversamente proporcional à relação  $a/c$ . Com o aumento da relação  $a/c$  ocorre um enfraquecimento progressivo da matriz de concreto devido ao aumento da porosidade, e, assim, ocorre a diminuição da resistência (LEITE, 2001). Comportamento semelhante ocorreu neste trabalho para resistência mecânica do cimento de  $\alpha$ -TCP, como pode ser visualizado no gráfico da Figura 5.13.

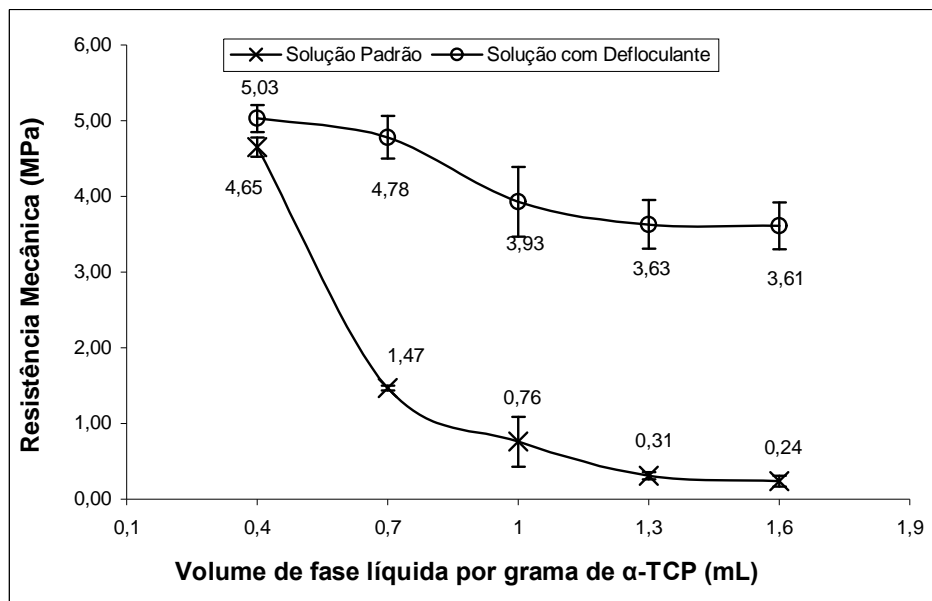


Figura 5.13: Variação da resistência mecânica a compressão do cimento com o volume de fase líquida utilizado para cada uma das soluções.

A resistência mecânica dos corpos-de-prova produzidos com a solução padrão diminuiu à medida que se aumentava a quantidade de fase líquida utilizada, de modo semelhante ao que aconteceu com os de solução com defloculante, porém, a queda da resistência é mais acentuada para a solução padrão. Como a adição do defloculante na fase líquida promove um melhor empacotamento e, conseqüentemente uma menor porosidade, a resistência mecânica desses corpos-de-prova tende a ser mais elevada em relação aos da solução padrão. A resistência mecânica dos corpos da solução com defloculante tendeu a uma estabilização a certo valor (~3,60MPa), pois ao produzir estes corpos-de-prova se notava a deposição por decantação da pasta cimentícia no fundo do molde, separando-se da fase líquida, ou seja, a estrutura do cimento acabava se modificando muito pouco com o aumento da quantidade de líquido. Esta decantação é observada em suspensões defloculadas, que permitem sua deposição em virtude da não formação de um gel pelo emaranhado de partículas, uma vez que as partículas estão separadas pela ação do defloculante (REED, 1988). A resistência mecânica dos corpos com solução padrão tende a zero com o aumento do volume de fase líquida, pois os corpos-de-prova tendem ao colapso com o aumento da porosidade, visto que quanto mais líquido se coloca na pasta cimentícia, mais este deixa vazios no corpo de prova.

É conhecido que a resistência mecânica ( $\sigma_r$ ) dos materiais cerâmicos decresce quase que exponencialmente com a porosidade (P) de acordo com a Equação 2 ( $\sigma_r = \sigma_0 \cdot \exp(-nP)$ ). Baseado nisso, foram feitos os gráficos comparativos descritos na Figura 5.14, mostrando as regressões exponenciais e seus respectivos  $R^2$  para os cimentos obtidos com a reação do  $\alpha$ -TCP com a solução padrão e da reação com a solução com defloculante.

Percebe-se que a resistência mecânica dos corpos produzidos com a solução padrão em relação à porosidade segue a Equação 2, com um valor de  $R^2$  de 0,98, condizente com o que acontece com a resistência dos materiais cerâmicos em função da porosidade. Já para os corpos nos quais foi utilizado a solução com defloculante, isto só acontece a partir de um valor de fase líquida utilizada, diferentemente do que acontece para a resistência mecânica dos materiais cerâmicos. Parece-nos que o uso de defloculantes aumenta a resistência mecânica da matriz de cimento, em virtude do maior empacotamento e contato das partícula de cimento da matriz. Além disso, a porosidade obtida a partir da solução com defloculante atua também como redutora do tamanho médio de poros das composições, aumentando a resistência mecânica do material, uma vez que pela teoria de Inglis e Griffith, a resistência dos materiais cerâmicos é função do maior defeito presente no material  $\rightarrow \sigma_r = (E(\gamma_s + \gamma_p)/c)^{1/2}$  (KINGERY *et al.*, 1976; CALLISTER, 2000).

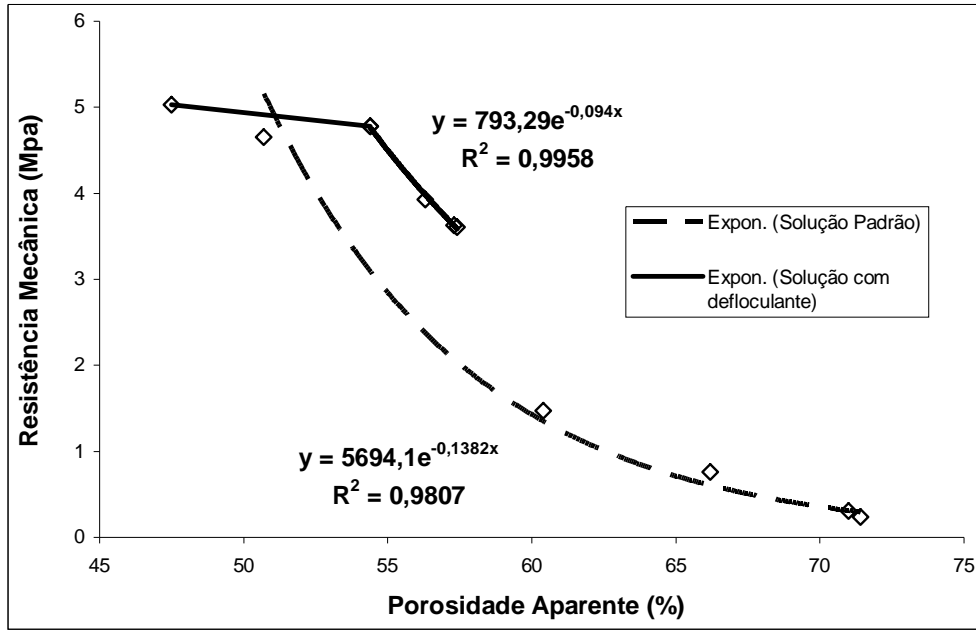


Figura 5.14: Variação da resistência mecânica do cimento com a porosidade aparente.

Através da microscopia eletrônica de varredura pôde-se observar uma microestrutura extremamente porosa para as formulações com a utilização de solução padrão e também uma variação do tamanho de poro conforme a quantidade de fase líquida utilizada na reação de cura do cimento. A Figura 5.15 mostra uma fotomicrografia de uma amostra de cimento com 0,7 mL de fase líquida por cada grama de cimento.

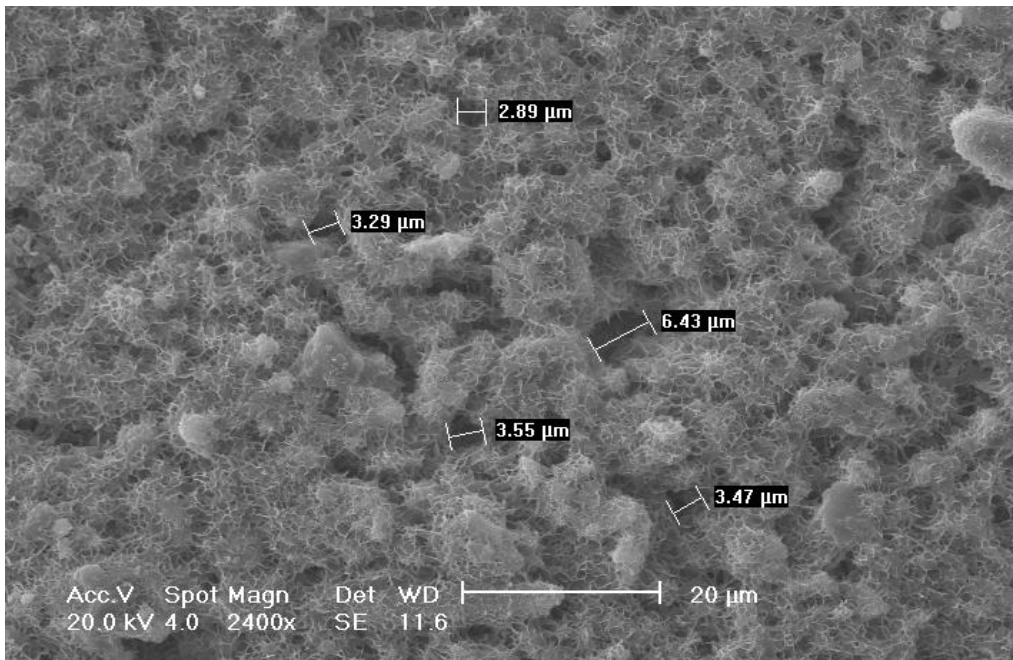


Figura 5.15: Fotomicrografia de uma amostra de cimento contendo 0,7 mL de solução normal, indicando o tamanho dos poros formados.

Através da fotomicrografia percebe-se a formação de hidroxiapatita na forma acicular, estrutura esta que se origina por precipitação após a cura do cimento, travando a estrutura, o que possibilita o aumento da resistência mecânica da amostra, como já citado anteriormente. O formato dos poros encontrados é irregular e a distribuição de tamanho é larga, semelhante ao que acontece com o cimento Portland (NEVILLE, 1997). O tamanho de poro encontrado, segundo a literatura (MA, 1995), é extremamente pequeno para favorecer o crescimento de tecido ósseo em suas cavidades. Entretanto poderá ocorrer crescimento fibrovascular e de outros tecidos com tamanho celular menor do que os dos tecidos ósseos.

Para uma amostra de  $\alpha$ -TCP com 1,6 mL de fase líquida, houve um crescimento no tamanho dos poros, como pode ser visualizado na Figura 5.16. A forma acicular da hidroxiapatita formada ainda pode ser observada, embora haja uma maior formação de placas petalóides. O formato dos poros continuou irregular e, embora haja uma boa interconexão dos mesmos, o tamanho destes ainda ficou abaixo do tamanho adequado para o crescimento de tecido ósseo. Além disso, a resistência mecânica observada para este tipo de material é muito baixa, o que impossibilita um manuseio adequado da amostra. Por estes motivos, tais composições foram descartadas para o uso como arcabouços celulares.

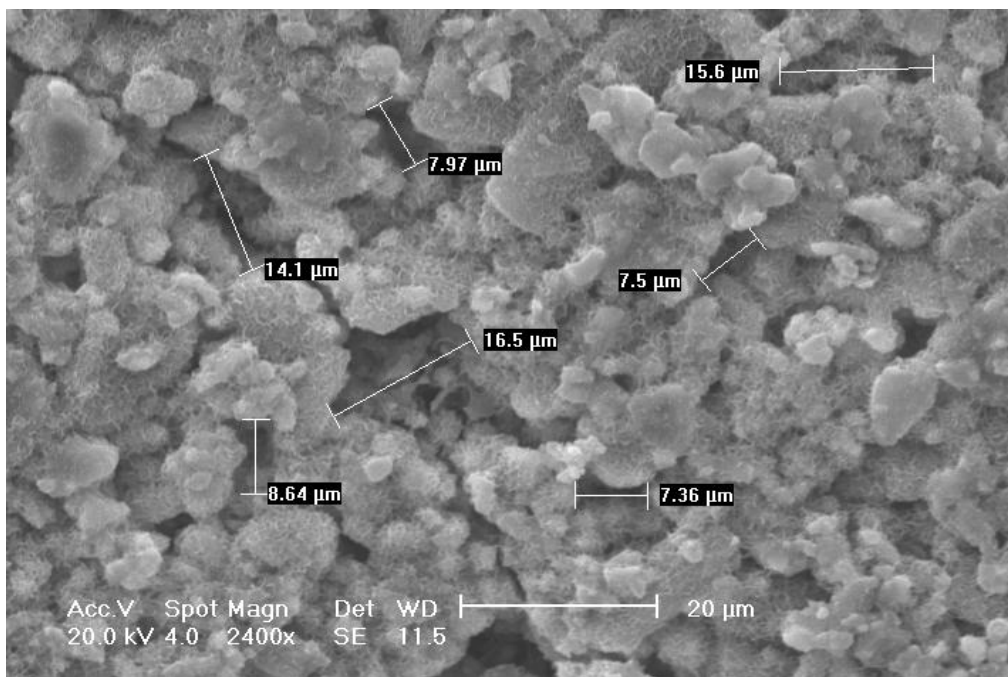


Figura 5.16: Fotomicrografia de uma amostra de cimento contendo 1,6 mL de solução normal, indicando o tamanho dos poros formados.

## 5.5. Obtenção de esferas de parafina

As esferas de parafina foram confeccionadas com o intuito de obter corpos orgânicos que poderiam, após uma queima a uma determinada temperatura, proporcionar a formação de poros de formato, tamanho e distribuição de tamanho controlados. Além disso, é importante que haja a interconexão desses poros para possibilitar o crescimento tecidual.

A parafina foi escolhida por ser um material orgânico de baixo ponto de fusão, o que possibilita uma facilidade no processamento; ter inércia química, fazendo com que não haja nenhuma reação com o cimento ou a fase líquida; ser de baixo custo.

Para obtenção de esferas de parafina foram feitos testes iniciais baseados na literatura (Shum *et al.*, 2005) apenas com a utilização de álcool polivinílico (PVA) na solução de agitação. Não foram obtidos resultados satisfatórios, pois parte das esferas formadas ficaram com um tamanho acima do esperado e unidas em aglomerados. A partir do trabalho de Mizutani *et al.* (MIZUTANI *et al.*, 2005), que utilizou  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  na obtenção de esferas de poli (ácido l-lático) (PLLA), determinou-se que este também seria importante na obtenção de esferas de parafina. A espuma formada sob a agitação da solução de PVA mais  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  se tornou mais espessa visualmente, com maior estabilidade, o que permitiu a formação de esferas de parafina de menor tamanho, sem estarem aglomeradas e sem a formação de pedaços disformes. Na Figura 5.17 podemos observar a boa homogeneidade de forma e tamanho das esferas de parafina produzidas usando essa técnica. A distribuição de tamanho fez-se através da separação em peneiras. As esferas utilizadas foram da faixa de 100 a 250 $\mu\text{m}$ .

Segundo Mizutani *et al.* (2005), em uma solução de PVA ocorre uma precipitação do mesmo depois da adição de um sal que contenha íons sulfatos, fosfatos, carbonatos, sódio e ou potássio, sendo que estes funcionam como um agente coagulante. Há uma alta concentração de PVA e do sal na região de interface entre a solução e o material com o qual se deseja fazer esferas, formando uma membrana de PVA ao redor do material.

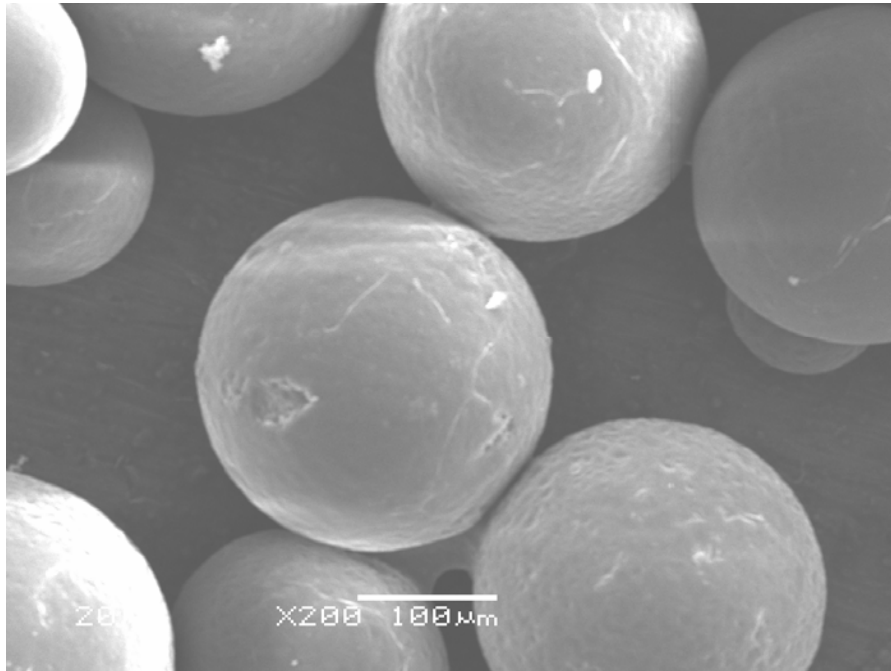


Figura 5.17: Fotomicrografia de MEV mostrando as esferas de parafina utilizadas na confecção de poros no cimento.

A quantidade de PVA utilizada na formação de esferas, tanto de PLLA, PLGA quanto de parafina, varia na literatura. Shum *et al.* (2005) utilizaram 2,5g de PVA em 500mL de água destilada, a uma temperatura de 70°C não mencionando a velocidade de agitação, para esferas de parafina. Ma *et al.* (2004) também utilizaram 2,5g de PVA, mas para esferas de PLLA. Mizutani *et al.* (2005) utilizaram 0,03% em massa de PVA em uma solução de 500mL de água destilada à temperatura ambiente com uma agitação entre 300 e 700rpm, também para PLLA, mas também utilizando uma concentração de 0,15mol/L de um agente coagulante.

Considerando que o tipo de agente coagulante utilizado modificou a forma do corpo formado (MIZUTANI *et al.*, 2005), e que o agente coagulante usado para confecção de corpos esféricos foi o  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , este foi escolhido para a produção de esferas de parafina. A partir desses resultados, foram feitos estudos preliminares para saber quais as quantidades de PVA e de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  seriam utilizadas. Os resultados podem ser visualizados nos gráficos das Figuras 5.18 e 5.19.

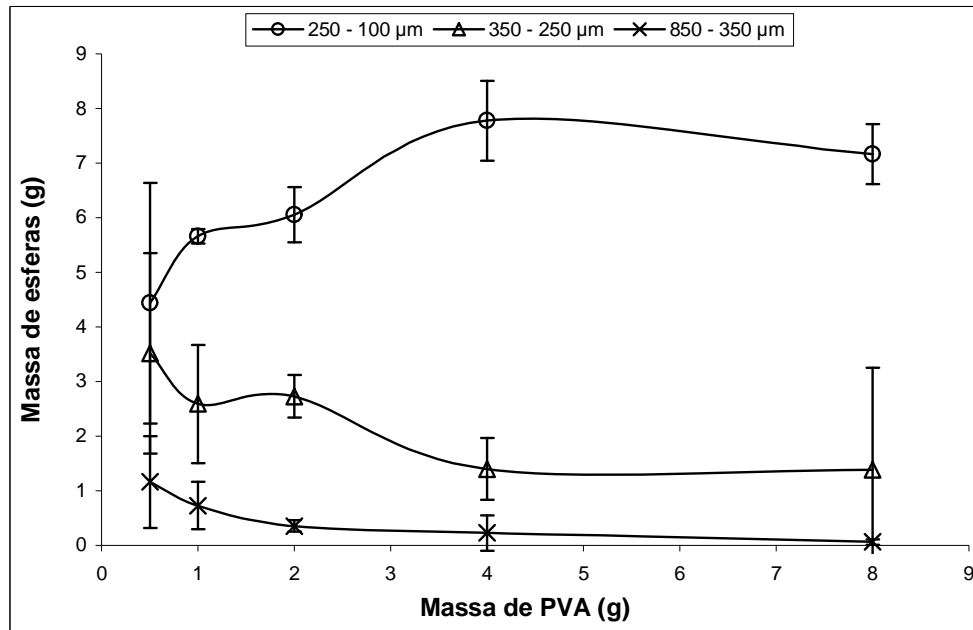


Figura 5.18: Variação da massa de esferas de parafina formada pela quantidade de PVA utilizada na solução.

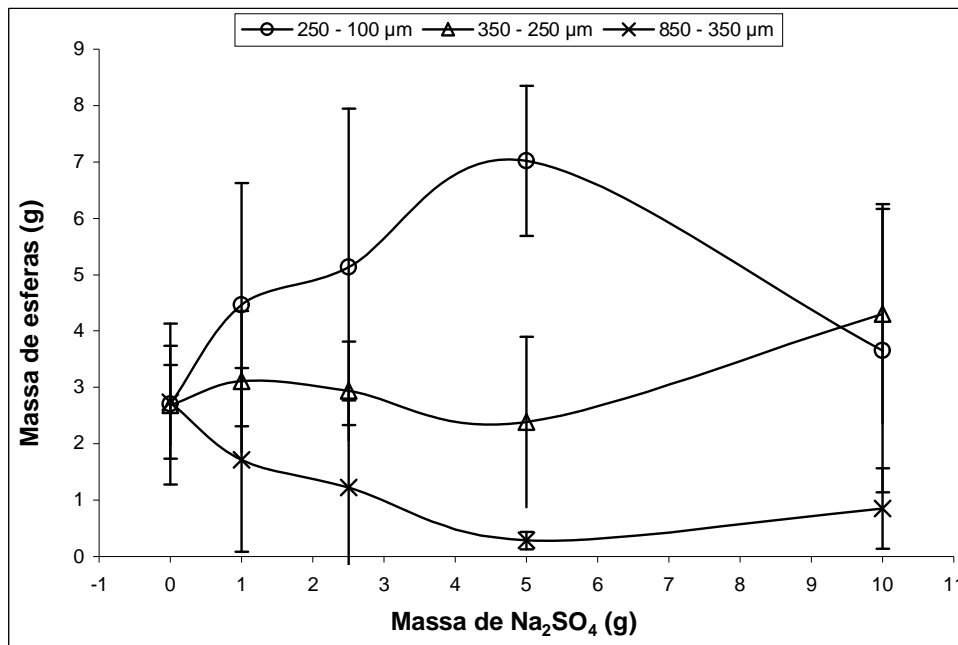


Figura 5.19: Variação da massa de esferas de parafina formada pela quantidade de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilizada na solução.

Considerando que, segundo a literatura (MATSURA, 1995), o tamanho de poro ideal para o crescimento de tecido ósseo é acima de 150µm, a faixa granulométrica adotada foi a de 100 a 250µm. Analisando os gráficos das Figuras 5.18 e 5.19, percebe-se que há maior formação de esferas nessa faixa granulométrica para uma solução contendo 4g de PVA e



em torno de 5g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Estes foram, então, os valores adotados para a produção das esferas de parafina. Analisando ainda o gráfico da Figura 5.19, percebe-se que para a solução sem a adição de agente coagulante o tamanho médio das esferas foi maior, apesar deste não ter sido quantificado.

Machado *et al.* (2005) e Morel *et al.* (2001), realizaram trabalhos onde produziram esferas de poliuretano, mas em meio polar, não em solução aquosa, e uma das características que mais influenciaram o tamanho das esferas foi a diferença de viscosidade entre o líquido precursor da poliuretana (pré-polímero) e o meio. A diferença de viscosidade também é citada por Lee (2002) na produção de esferas cerâmicas, mostrando como a viscosidade modifica a forma e o tamanho das esferas, o que pode ser visto na Figura 5.20.

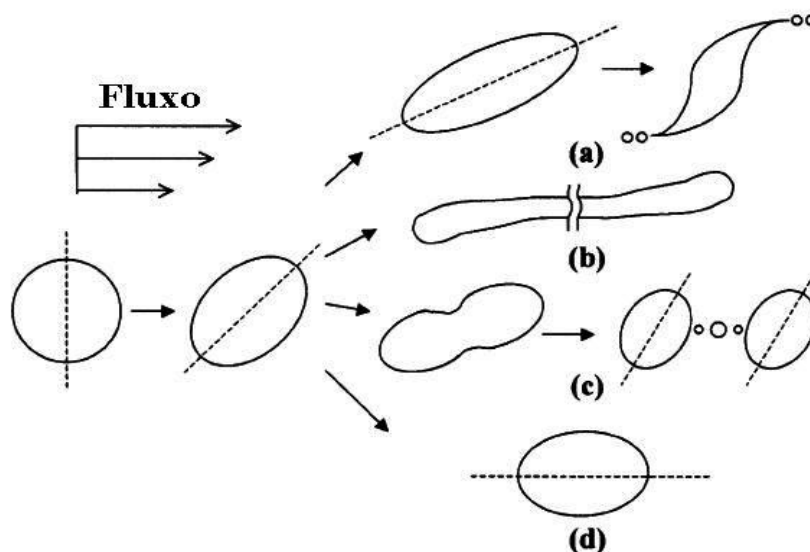


Figura 5.20: Esquema representativo da deformação e rompimento dos glóbulos para várias razões de viscosidade de um determinado fluxo: (a) 0,0002; (b) 0,7; (c) 1,0; (d) 6,0 (LEE, 2002).

As relações de viscosidades mostradas na Figura 5.20 se referem a uma razão entre a viscosidade da fase dispersa, pela fase contínua. Assim, uma propriedade que não foi abordada por este trabalho, mas que seria interessante para um maior controle da formação das esferas, é a viscosidade. Supomos que seria necessário um estudo da relação de viscosidade entre a parafina e o meio, através da variação da temperatura, modificação do surfactante e do agente coagulante, ou até mesmo a utilização de parafinas com pesos moleculares variados.

A análise termogravimétrica da parafina mostrou que esta tem seu pico de degradação a uma temperatura de aproximadamente  $370^\circ\text{C}$ , mas a degradação completa

ocorre um pouco antes dos 600°C, como pode ser visualizado no termograma da Figura 5.21.

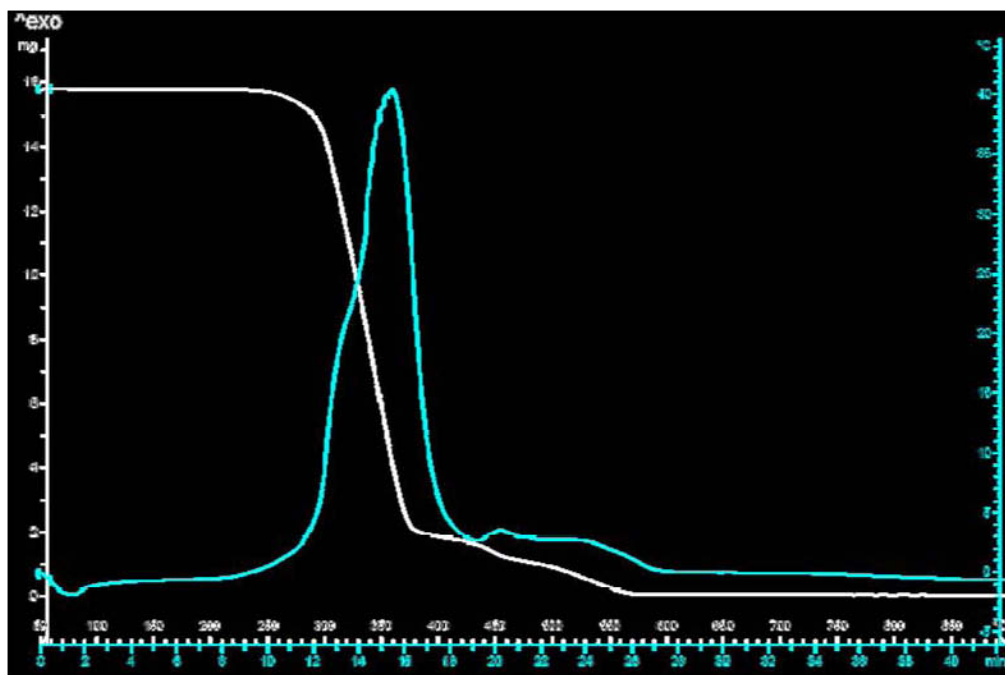


Figura 5.21: Termograma mostrando a curva de degradação da parafina.

Tendo em vista a baixa temperatura de degradação, não é necessário o estudo de outros materiais como agentes porogênicos, ou mesmo parafinas de menor tamanho de cadeia, eventualmente mais custosos do que a parafina comercial, de custo extremamente baixo e de fácil acesso.

## 5.6. Obtenção dos arcabouços

Em seu trabalho, Shum *et al.* (SHUM *et al.*, 2005), para a obtenção dos arcabouços, removeu a parafina mergulhando os corpos em hexano a temperatura ambiente por 2 dias, trocando o hexano três vezes ao dia. Após esses dois dias, os corpos foram deixados em uma solução de hexano com ciclohexano a uma temperatura de -20°C por 6h, seguido de uma secagem a -10°C por 2 dias e uma secagem a vácuo por uma semana para total extração do solvente. O processo de extração da parafina para obtenção dos arcabouços foi muito lento e dispendioso, mas necessário devido ao fato que o material utilizado era um polímero com ponto de fusão relativamente baixo, impossibilitando a utilização de um método térmico, pois, além de degradar a parafina, degradaria o polímero. O cimento de

fosfato de tricálcico, por ser um material cerâmico, tem um ponto de fusão muito alto e não degrada a altas temperaturas.

O fato do  $\alpha$ -TCP ser metaestável a temperatura ambiente, segundo o diagrama de fases da Figura 3.3, e pelo fato da hidroxiapatita formada na reação de cura do cimento ser deficiente em cálcio, teve-se que se tomar cuidado na escolha da temperatura de extração da parafina. Uma temperatura muito elevada favoreceria o aparecimento de novas fases na estrutura, o que poderia ser um inconveniente, pois não teríamos mais um fosfato de cálcio absorvível, sendo este extremamente necessário para a obtenção de um suporte temporário para crescimento celular.

Um estudo da modificação de fases do cimento após a cura com um aumento da temperatura se fez necessário. Para isso calcinou-se o cimento curado, isento de parafina, em diferentes temperaturas, inicialmente a 600°C, pois era a temperatura na qual, segundo o termograma da análise de TGA, ocorria a total degradação da parafina. A análise de difração do raio X do cimento calcinado a temperatura de 600°C com uma taxa de 10°C/min e um patamar de 1h pode ser visto na Figura 5.22.

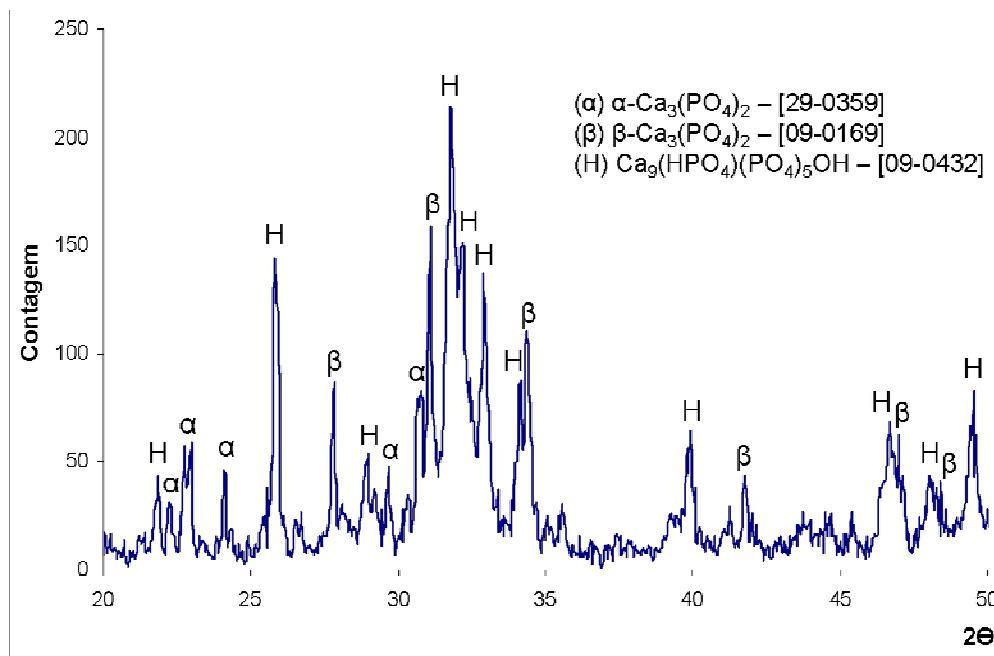


Figura 5.22: Difratograma do cimento de fosfato tricálcico após queima a 600°C.

O difratograma praticamente não revela diferença nas fases entre o cimento analisado logo após a cura, exceto uma diminuição nos picos da fase  $\alpha$ , o que pode indicar que essa fase está se transformando na fase  $\beta$ , sendo esta mais estável nesta temperatura conforme

mostra o diagrama de fase da Figura 3.3. A fase  $\beta$  do fosfato tricálcico também é absorvível, mas a uma taxa mais lenta que a fase  $\alpha$ , devido a uma maior cristalinidade da fase  $\beta$ . Com isso o tempo que o arcabouço teria para ser absorvido poderia ser modificado, além de uma possível diminuição do pH da amostra, pois a fase  $\beta$  se torna relativamente ácida em meio corpóreo. Um tratamento nos arcabouços para aumento do pH antes de se fazer uma cultura celular se faz necessário.

Com o aumento da temperatura de calcinação para 700°C, mantendo as mesmas condições de queima, observou-se uma mudança brusca na composição das fases (difratograma da Figura 5.23). Ocorreu praticamente, um desaparecimento da fase  $\alpha$ , e uma diminuição considerável da fase hidroxiapatita, para um aumento da fase  $\beta$ . Pelos resultados desse difratograma ficou estabelecido que a extração da parafina deve ser feita no máximo a temperatura de 600°C, pois com uma temperatura um pouco maior ocorreria a modificação do material do arcabouço.

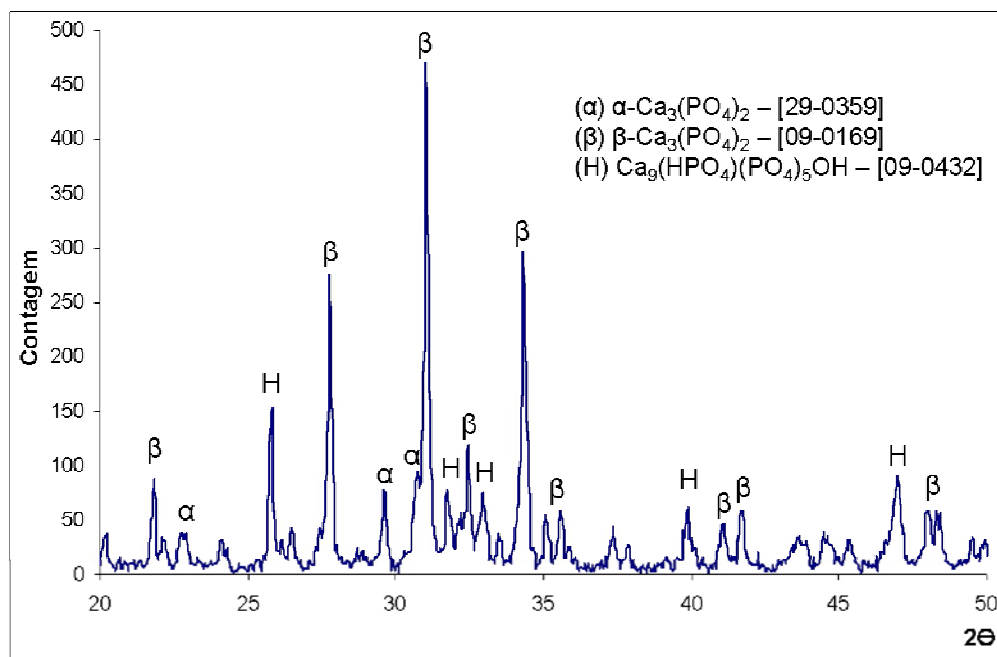


Figura 5.23: Difratograma do cimento de fosfato tricálcico após queima a 700°C.

Não foram encontrados dados de literatura que mostrassem comportamento similar, sendo o estudo da influência da temperatura nas fases cristalinas ainda um aspecto não estudado dos cimentos de fosfato de cálcio. Tais estudos poderão ser úteis na obtenção de materiais de fosfato de cálcio contendo mais de uma fase cristalina ( $\alpha$ -TCP,  $\beta$ -TCP, hidroxiapatita) e com diferentes cristalinidades, e portanto com solubilidades e

comportamentos *in vivo* diferenciados, o que pode ser útil em aplicações tais como a liberação controlada de drogas, preenchimento de grandes cavidades, etc. Além disso, o aumento da cristalinidade e da temperatura de calcinação podem resultar em valores de resistência mecânica mais elevados e próximos dos tecidos que se pretende substituir.

Para fins de comparação, foi realizada uma queima do cimento a temperatura de 800°C e feita a análise das fases por difração de raio X. Este difratograma pode ser visto na Figura 5.24, que mostra a total predominância da fase  $\beta$ , modificando totalmente o material da estrutura do arcabouço.

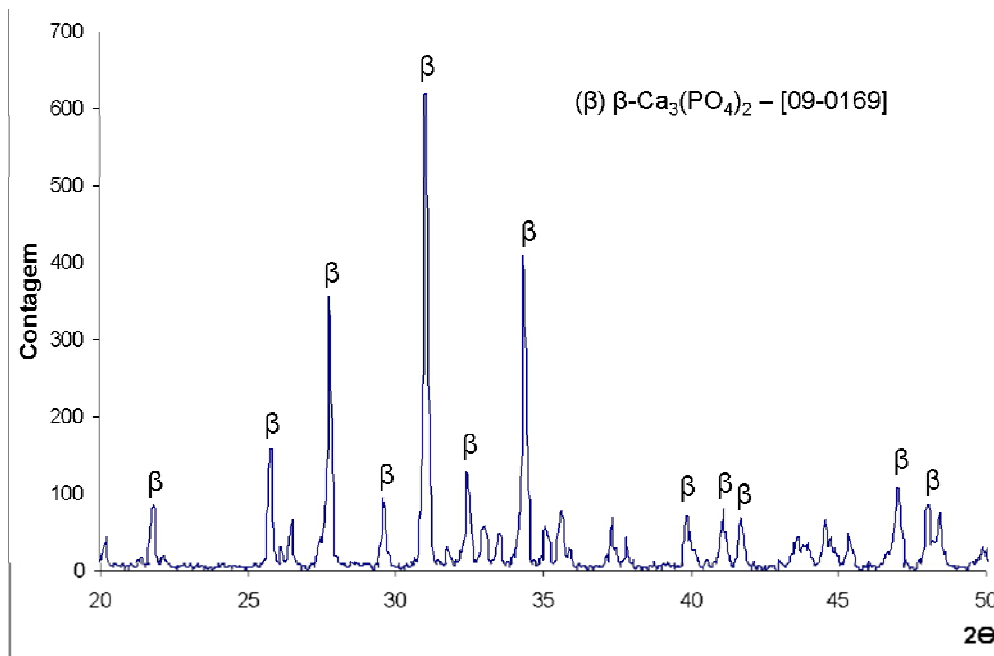


Figura 5.24: Difratograma do cimento de fosfato tricálcico após queima a 800°C.

Avaliada a temperatura de degradação da parafina, fizeram-se alguns estudos preliminares na queima e extração da parafina em corpos de cimento de fosfato de cálcio. Confeccionou-se um corpo de prova contendo 1,75g de esferas de parafina para cada 1g de cimento (aproximadamente 82,2% de parafina) e utilizando-se 1mL da solução padrão, o qual foi deixado durante 24h ao ar e a temperatura ambiente para a cura do cimento. O corpo, dentro de um cadinho de alumina, foi colocado em um forno, sob uma taxa de aquecimento de 10°C/min, a uma temperatura de patamar de 600°C durante 1h e após deixado resfriar até a temperatura ambiente desligando-se o forno. Nestas condições não se obteve um arcabouço, pois não houve a formação de uma estrutura rígida, obteve-se o cimento na forma de pó. Supõe-se que a parafina, por ter baixo ponto de fusão, com o

aumento rápido da temperatura, torna-se líquida aumentando a pressão dentro do corpo de prova devido a sua própria expansão de volume, com o rompimento e fragmentação da estrutura pela saída brusca da mesma.

Uma das saídas adotadas para extrair a parafina sem a destruição da estrutura do cimento, foi a diminuição da taxa de aquecimento. A literatura (ZORZI, 2001) comenta que a extração de ceras de corpos cerâmicos deve ser feita a uma taxa de aquecimento mais baixa possível. Segundo Trunec (1997), a extração de ligantes é o passo mais crítico na moldagem por injeção, onde a parafina é muito usada como ligante, sendo que a sua quantidade pode chegar a 50% em volume. A parafina deve ser removida lentamente, em um processo que requer a gradual formação de canais ao longo da peça. Estes canais permitem que a parafina saia da peça sem causar o colapso da mesma (MUTSUDDY e FORD, 1995). O diâmetro dos canais depende do tamanho das partículas do pó e da porosidade da peça e sua forma é altamente variável dentro da peça injetada. Os canais têm um alto nível de interconectividade e são tortuosos, de tal forma que o ligante fluido percorre uma distância muito maior que a espessura da peça cerâmica (MUTSUDDY e FORD, 1995). Como no cimento, a reação de cura une as partículas através de um ancoramento provocado pelas agulhas de CDHA e, como em todo cimento de pega hidráulica há a formação de poros capilares que representam a parte do volume total não preenchida pelos produtos da hidratação, supomos que estes poros acabam formando microcanais, sendo responsáveis por grande parte do fluxo de parafina líquida. Nestes microcanais a parafina acabava fluindo para fora do corpo sem danificá-lo, ao mesmo tempo em que era degradada.

Uma outra forma de se fazer a queima para extração da parafina sem danificar a estrutura do cimento, foi utilizar um pré-tratamento do corpo de prova em uma estufa a uma temperatura de aproximadamente 100°C durante aproximadamente 2h. Este tratamento era realizado com o auxílio de um papel absorvente que ficava em contato com o corpo de prova. Como a temperatura de fusão da parafina é em torno de 70°C, essa temperatura era suficiente para a fusão da parafina e esta ser absorvida pelo papel na medida em que fluía para fora do corpo de prova. Desta maneira restava muito pouca parafina no corpo de prova, e os micronais conseguiam eliminar a parafina residual e seus subprodutos de decomposição sem causar um aumento de pressão exagerado dentro dos poros, que acabaria colapsando o corpo de prova. Zorzi (2001), Mutsuddy e Ford (1995) explicam em seus trabalhos que uma variante da extração térmica é chamada de *wicking*, que é um processo no qual um ligante líquido, com baixa viscosidade, é “sugado” por

forças capilares em um meio poroso que envolve a peça cerâmica. É o processo conhecido como fluxo capilar em leito poroso (*wicking*) O fluxo capilar do líquido através do meio poroso que envolve a peça impede que se forme uma descontinuidade líquido-vapor na superfície do corpo, que poderia provocar a formação de defeitos na peça. Era possível desta forma, colocar o corpo de prova no forno a uma taxa mais alta sem a destruição da estrutura. A taxa usada foi a de 10°C/min e os corpos mantiveram sua estrutura de poros intacta. Para a remoção de resíduos carbonáceos (pseudografíticos e cadeias com ligações cruzadas – LEWIS, 1997), provenientes da extração térmica, mergulhou-se os corpos-de-prova em peróxido de hidrogênio (Synth), de modo a haver uma quantidade de oxigênio na atmosfera e adsorvido nas paredes do corpo, e fez novamente o aquecimento.

Algumas fotomicrografias dos arcaçouços formados podem ser vistas nas Figuras 5.25 e 5.26.

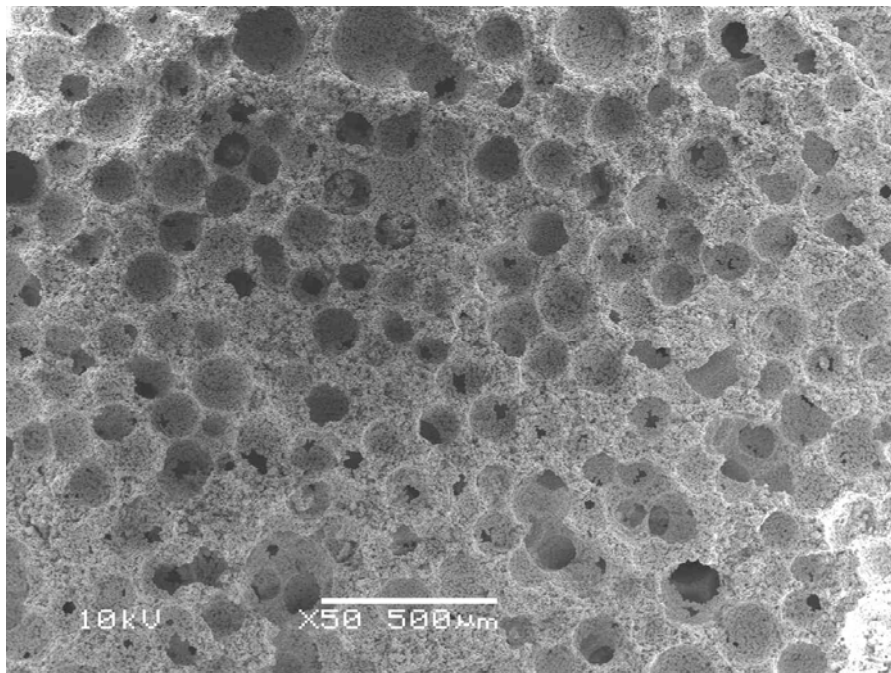


Figura 5.25: Fotomicrografia de MEV do arcaçouço confeccionado com aproximadamente 72,5% de parafina.

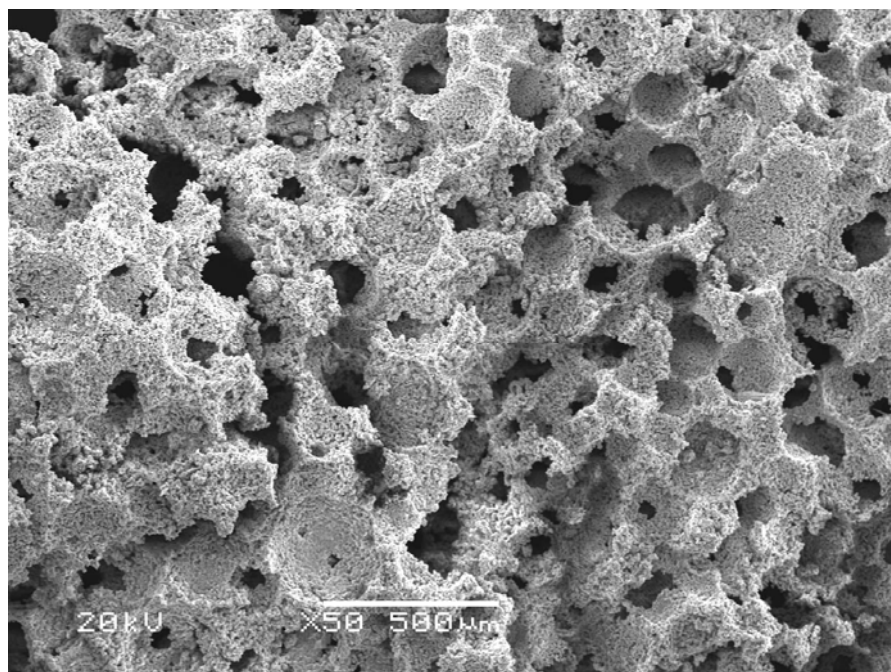


Figura 5.26: Fotomicrografia de MEV do arcabouço confeccionado com aproximadamente 82,2% de parafina.

Ressalta-se a forma esférica dos poros e a interconectividade na fotomicrografia da Figura 5.26, interconectividade esta que não é evidenciada no arcabouço confeccionado com 72,5% de parafina como pode ser visto na Figura 5.25. Não foram encontrados dados na literatura que demonstrem a quantidade de esferas para obter-se interconectividade. A quantidade de esferas adicionadas está ligada à formação de uma camada mínima de cimento entre as esferas, de forma que elas possam entrar em contato umas com as outras e, assim, após retirada da parafina, serem formadas interconexões entre os poros oriundos das esferas de parafina.

A partir da determinação das condições de retirada da parafina para obtenção dos arcabouços, foram confeccionados arcabouços com diferentes quantidades de parafina, mantendo-se fixa a proporção de cimento e fase líquida utilizada, ou seja, 1,00g de cimento e 1mL de fase líquida para as seguintes quantidades de parafina: 1,00g; 1,25g; 1,50g; 1,75g e 2,00g que, transformadas para porcentagens em massa, obtiveram os valores 50,0; 55,6; 60,0; 63,6 e 66,7% respectivamente. Os valores de porosidade dos arcabouços em relação à quantidade de parafina podem ser vistos no gráfico da Figura 5.27. Os valores foram comparados com os de Xu *et al.* (2006) que utilizou cimento de fosfato tetracálcico (TTCP) e Mannitol ( $\text{CH}_2\text{OH}[\text{CHOH}]_4\text{CH}_2\text{OH}$ ) (Sigma) como gerador de poros, nas quantidades de 0; 20; 30; 40 e 50% em peso. Os resultados são bastante similares, mostrando a linearidade com que cresce a porosidade na medida em que se adiciona



matéria orgânica para a obtenção de poros. A razão pó-líquido utilizada por Xu foi de 2:1, ou seja, 2g de pó para 1g do líquido, obtendo uma porosidade (64,8%) menor que a do material utilizada neste trabalho (66,2%), no qual foi utilizada uma razão 1:1. Os valores de  $R^2$  comprovam a linearidade dessas curvas, visto que os valores foram maiores que 0,9. A inclinação das retas é menor do que 1, mostrando que é necessário uma quantidade maior de matéria orgânica para que se tenha um pequeno aumento na porosidade.

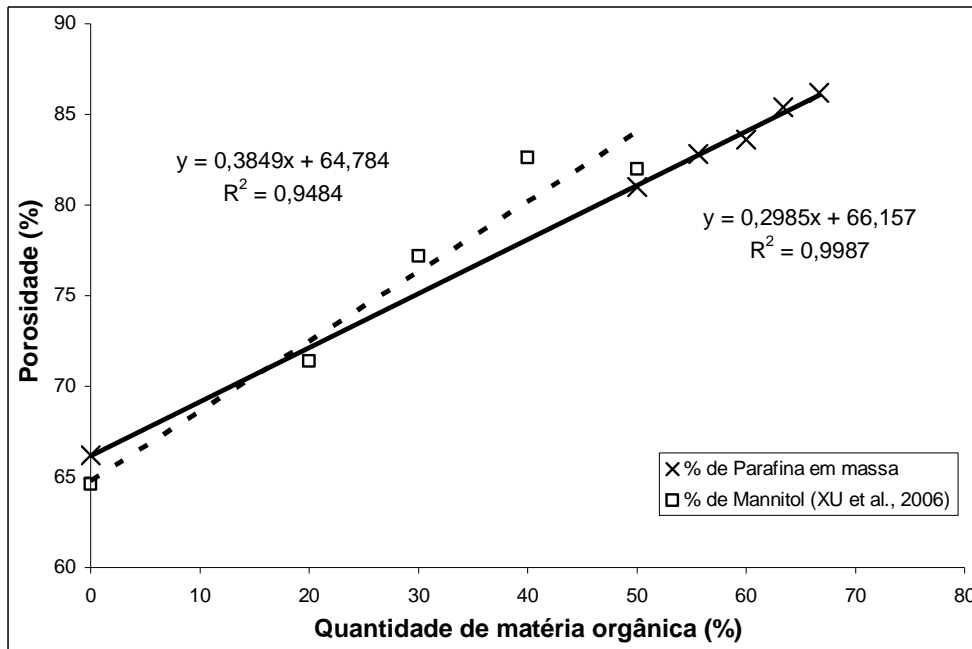


Figura 5.27: Variação da porosidade com relação a quantidade de parafina utilizada na confecção dos arcabouços.

A fixação da quantidade de cimento e fase líquida teve como objetivo não variar a resistência mecânica natural do cimento após a pega. Embora a quantidade de fase líquida seja relativamente grande em relação ao cimento, visto que a quantidade mínima de fase líquida para formar uma pasta é de 0,4mL/g, isto era necessário para dar molhabilidade às esferas de parafina que entraram na composição, e 1mL era o mínimo necessário para a formar uma pasta homogênea com a composição de 2,00g de parafina para 1,00g de cimento. A resistência mecânica dos arcabouços não foi satisfatória, pois além do fato da matriz de cimento perder resistência com o aumento da fase líquida, a quantidade de poros formada reduziu a resistência mecânica dos arcabouços ao ponto de não ser possível medi-la na máquina de ensaios. Os arcabouços tinham a resistência mínima suficiente para o manuseio dos mesmos, o que de certo modo já era suficiente, pois os arcabouços só iriam realmente ganhar resistência mecânica com a proliferação de osteoblastos ao formar o

tecido ósseo, e isto se dá de modo extracorpóreo, *in vitro*, sem grandes solicitações mecânicas.

De qualquer forma, para um aumento da resistência mecânica dos arcabouços utilizou-se a solução com defloculante, pois desta forma haveria um aumento na compactação da pasta cimentícia, favorecendo um aumento da resistência, como mostra o gráfico comparativo da Figura 5.13. Mesmo assim, a resistência não teve um grande aumento ao ponto de conseguir ser avaliada a partir da máquina de ensaios, mas foi um aumento suficiente para diminuir os cuidados tomados no manuseio dos arcabouços.

### **5.7. Permeabilidade**

As informações sobre a permeabilidade de uma estrutura porosa podem nos dar uma estimativa sobre a facilidade com que líquidos ou gases penetram e atacam a estrutura porosa. As equações e constantes de permeabilidade permitem que a resistência ao transporte do fluido seja quantificada como função das propriedades do fluido, do meio poroso e do escoamento. A permeabilidade dos arcabouços foi avaliada conforme a análise da equação de Forchheimer. As curvas de permeabilidade relativas a cada uma das amostras nas quais foram variadas a porosidade, estão exibidas na Figura 5.28. As equações referentes a cada uma das curvas foram obtidas por regressão quadrática e apresentaram um  $R^2$  maior que 0,9.

Pelo formato das curvas, como era esperado, quanto maior a porosidade, mais permeável é o corpo poroso, pois menor é a queda de pressão infligida pelo mesmo. Innocentini *et al* (INNOCENTINI *et al.*,1999) constataram experimentalmente que dois meios porosos distintos podem um ser mais permeável que o outro a um mesmo fluido dependendo unicamente da faixa de velocidade escolhida, ou seja, permeabilidade é um conceito relativo. Observando-se as curvas da Figura 5.28, nota-se que para velocidades mais baixas, há uma interposição das curvas, mostrando que a permeabilidade desses corpos varia nesta faixa de velocidades do fluido. É possível, ainda, que esta interposição seja relativa a algum erro experimental, mas visto que as regressões quadráticas obtiveram  $R^2$  acima de 0,9, podemos dizer que a primeira possibilidade é mais aceita. A Tabela 5.2 mostra as equações das curvas para cada uma das porosidades e mostra também os valores de  $R^2$  para cada uma das equações.

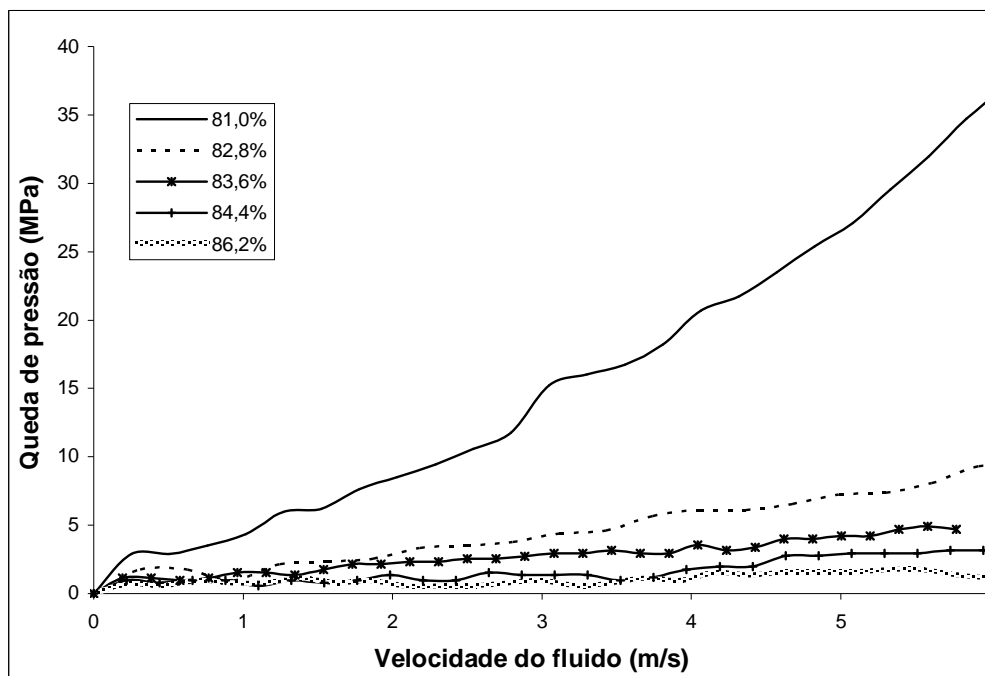


Figura 5.28: Curvas referentes às equações de Forchenheimer para diferentes porosidades estudadas.

Tabela 5.2: Equações das curvas relativas as porosidades obtidas.

Porosidade (%)	Equação	R <sup>2</sup>
81,0	$y=5,88.10^5x^2+2,10.10^6x+1,90.10^6$	0,9979
82,8	$y=4,54.10^5x^2+1,10.10^6x+6,21.10^5$	0,9895
83,6	$y=2,71.10^5x^2+5,24.10^5x+8,91.10^5$	0,9787
84,4	$y=2,12.10^5x^2+3,67.10^5x+1,89.10^5$	0,9531
86,2	$y=1,87.10^5x^2+1,63.10^5x+1,83.10^5$	0,9135

As Figuras 5.29 e 5.30 mostram uma comparação entre os valores de  $k_1$  e  $k_2$ , respectivamente, com os valores de alguns trabalhos encontrados na literatura. Ambas as publicações de Ortega *et al.* (ORTEGA *et al.*, 2002; ORTEGA *et al.*, 2001) utilizaram alumina, já a de Sepúlveda *et al.* (SEPÚLVEDA *et al.*, 1999b) e de Volkmer (VOLKMER, 2006) utilizaram HA. Ambos podem ser comparados, pois segundo Innocentini *et al* (INNOCENTINI *et al*, 1999), a permeabilidade independe do tipo de material utilizado.

Observa-se uma tendência ao aumento dos valores de constantes de permeabilidade, tanto Darciana ( $k_1$ ) como não-Darciana ( $k_2$ ). Para porosidades pequenas, a tendência é que as interconexões também sejam pequenas, conseqüentemente, isso servirá como um impedimento à passagem do fluido, aumentando o atrito deste com o material. Por isso um

menor valor de  $k_1$  para porosidades menores e um aumento de valor à medida que aumenta a porosidade do material, pois  $k_1$  está relacionado justamente aos efeitos viscosos, ou seja, a área de contato material-fluido. O mesmo acontece em relação aos efeitos cinéticos, inerciais, ou seja, os efeitos inerciais dependem da turbulência que, por sua vez, está associada ao caminho tortuoso do fluido dentro do reticulado cerâmico. Para o caso do escoamento de fluidos em tubulações, sabe-se das equações de Navier–Stokes que os distúrbios nas camadas do fluido dentro do tubo podem causar modificações energéticas. Estas modificações podem ser reversíveis ou irreversíveis. No caso reversível, observa-se a transformação de energia cinética em energia de pressão ou potencial. Já para o caso irreversível, verifica-se a transformação de energia cinética em calor decorrente do atrito. Os distúrbios nas camadas de fluido podem ser devidos à turbulência (quantificada pelo número de Reynolds) e, também, aos obstáculos durante o percurso do fluido (representado pela sinuosidade ou tortuosidade da estrutura). Assim, quanto menores as interconexões dos poros dentro do corpo poroso, maior será a resistência ao escoamento do fluido, traduzida em diminuição da permeabilidade não-Darciana  $k_2$ . Este comportamento pode ser atribuído ao aumento da tortuosidade do percurso, que potencializa os efeitos da turbulência sobre o escoamento.

Apesar de ocorrer certa tendência a um aumento do coeficiente de permeabilidade Darciana com o aumento da porosidade, esse aumento é relativamente pequeno. Assim como é pequena também a faixa de porosidade estudada (81 a 87%). Além disso, há uma diferença considerável nos valores encontrados na literatura. De acordo com Innocentini *et al.* (INNOCENTINI *et al.*, 1999), a resposta para essa variação de permeabilidade seria em termos do tamanho de poro, e não da porosidade. Então, o que pode estar afetando a permeabilidade Darciana  $k_1$  na Figura 5.29 é o diâmetro dos poros, uma vez que não houve variação no diâmetro de poros dos corpos utilizados neste trabalho, mas são relativamente diferentes dos utilizados nos trabalhos da literatura.

Quanto aos valores de  $k_2$ , apesar de ocorrer uma variação maior para os valores de porosidade, em relação aos valores de  $k_1$ , a permeabilidade diferente em relação a literatura também pode se dever aos diferentes diâmetros de poros, pois quanto menor o tamanho de poro maior será a resistência ao escoamento do fluido, traduzida em diminuição da permeabilidade não-Darciana  $k_2$  atribuído ao aumento da tortuosidade do percurso, que potencializa os efeitos da turbulência sobre o escoamento.

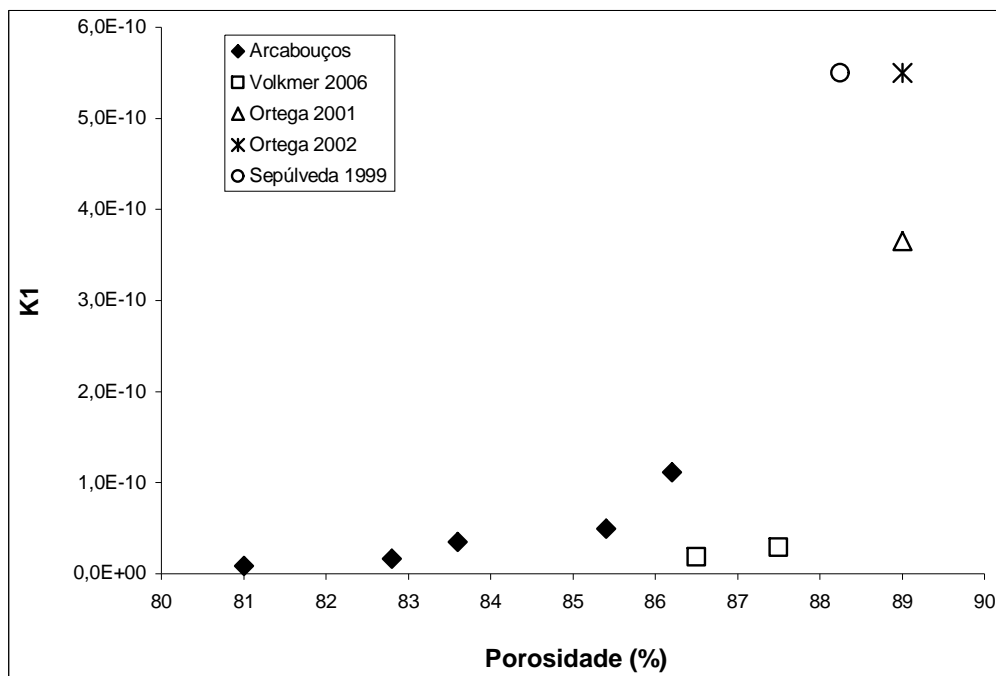


Figura 5.29: Comparação entre os resultados de k1 obtidos neste trabalho com os da literatura.

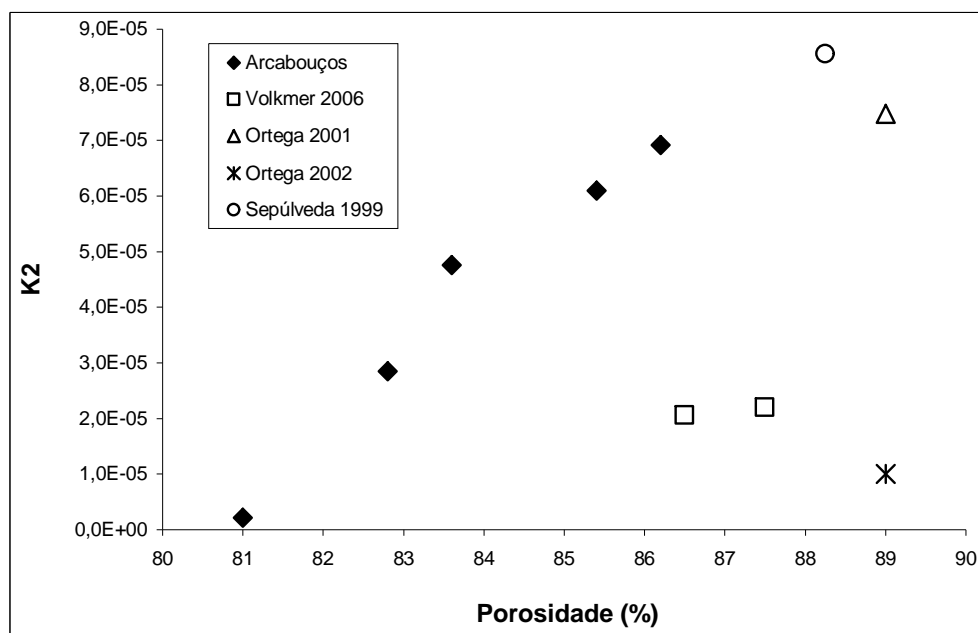


Figura 5.30: Comparação entre os resultados de k2 obtidos neste trabalho com os da literatura.

### 5.8. Ensaios *in vitro*

Para avaliação *in vitro*, arcabouços foram imersos em solução de SBF e mantidos a aproximadamente 37°C. A solução de SBF foi trocada a cada semana e o seu pH inicial foi de 7,27. A porosidade dos corpos de prova era a de 84,5%, tendo em vista que as 84

porosidades obtidas foram similares e que esta composição apresentava resistência mecânica adequada ao manuseio.

Após o tempo de imersão das peças em SBF, estas foram secas em estufa e então medida novamente a massa para comparação, não havendo variação significativa de massa. A variação vista em uma balança de quatro casas decimais chegava apenas na terceira casa. Supomos que há uma solubilização das peças em SBF, mas ao mesmo tempo em que há essa solubilização também há uma precipitação de HA proveniente do SBF. Talvez tenha ocorrido precipitação de HA e solubilização de alfa e/ou beta, com balanço de massa próximo a zero. Seria necessário fazer uma microscopia eletrônica de varredura, para confirmar tal suposição.

A Figura 5.31 mostra a variação do pH em função do número de dias em que as peças ficaram imersas em SBF.

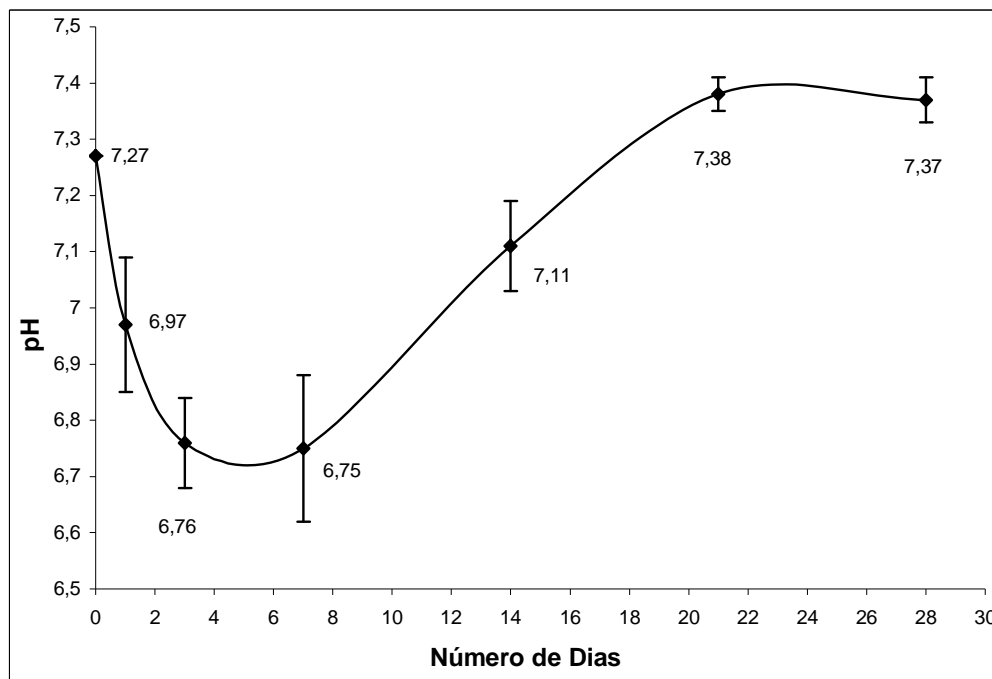


Figura 5.31: Variação do pH da solução de SBF em função do tempo de imersão.

Há uma queda brusca no pH da solução devido principalmente a formação de  $H_3PO_4$  produzido durante a reação de pega do cimento. Como o  $\alpha$ -TCP possui relação Ca/P inferior ao da HA, durante a hidratação pode ocorrer também a formação de  $H_3PO_4$  através da reação  $10Ca_3(PO_4)_2 + 6H_2O \rightarrow 3Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 2H_3PO_4$ , o que explica os valores reduzidos de pH. Um aumento do valor de pH ocorre após 7 dias de imersão em SBF, provavelmente devido à reação do  $H_3PO_4$  com íons cálcio da solução SBF. Ela produz

novamente HA, uma vez que este é o composto de fosfato de cálcio menos solúvel para  $\text{pH} \geq 4,2$  (CHOW, 1991), e estabiliza o pH próximo a 7,4.

A Figura 5.32 mostra os difratogramas relativos às amostras de cimento com até 14 dias de imersão em SBF. Percebe-se que antes da imersão, havia fase  $\alpha$ -TCP não reagida, fase esta que aparece apenas de forma residual nos difratogramas dos corpos que forma imersos em SBF, mesmo após 14 dias, de forma que foi dando lugar à HA deficiente em cálcio. Os picos referentes à fase  $\beta$ -TCP mantiveram-se para todos os tempos de imersão. Santos (SANTOS, 2002) obteve resultados semelhantes, nos quais também houve a permanência de uma  $\alpha$ -TCP residual, mesmo após 6 semanas de imersão em SBF e, além disso, não houve grandes variações nos difratogramas nessas 6 semanas, comportamento este similar ao que aconteceu neste trabalho, o que demonstra a estabilidade do material frente a condições fisiológicas simuladas.

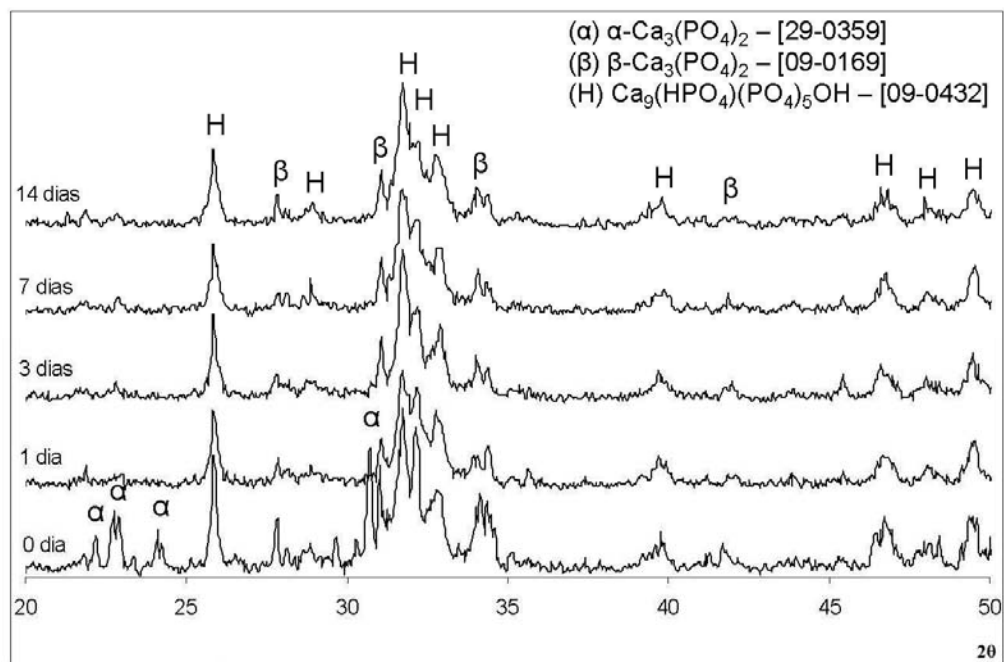


Figura 5.32: Difratogramas de raios X das amostras de cimento de fosfato de cálcio imersas por diferentes períodos em SBF.

#### 4.5.2. Ensaio de viabilidade e proliferação celular

As células da linhagem L1210 são arredondadas, e proliferam intensamente quando mantidas nas condições adequadas, sendo assim adequadas para experimentos visando avaliar a influência da HA sobre células de mamíferos.

Nestes experimentos, realizados sempre em triplicata, as células foram cultivadas em presença de arcabouços. A Figura 5.33 mostra uma colônia de células L1210 observada em microscópio invertido com contraste de fase com um aumento de 100x. Conforme os valores apresentados na Tabela 5.3 e no gráfico da Figura 5.34, enquanto nas condições controle as culturas mantiveram sempre viabilidade acima de 90%, o cultivo em presença dos arcabouços de CFC resultou em alguma diminuição na frequência de células vivas, principalmente na análise de culturas com 48 h.

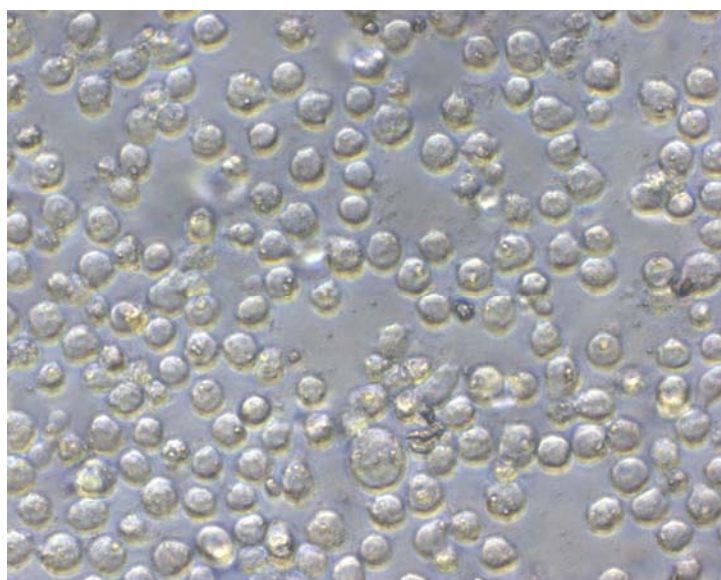


Figura 5.33: Células L1210 observadas em microscópio invertido com contraste de fase. Aumento 100x.

Tabela 5.3: Viabilidade celular (% células vivas) após cultivo durante 24, 48 ou 72 h em contato com HA em disco ou pasta.

Condições de cultivo	Tempo em cultura		
	24 h	48 h	72 h
<b>Controle negativo*</b>	88,4	93,1	96,9
	96,6	93,8	98,8
	94,7	95,3	97,7
<b>Arcabouço</b>	95,8	94,2	90,5
	94,5	81,3	93,1
	93,3	65,4	90,4

\* células cultivadas em condições normais, sem a presença do arcabouço.



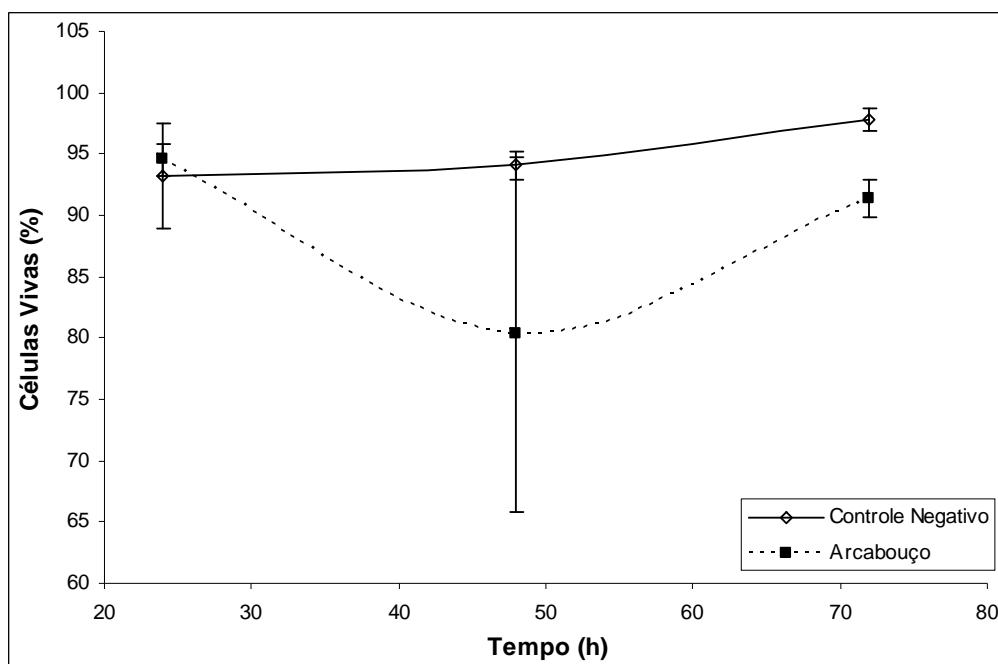


Figura 5.34: Variação da concentração de células vivas pelo tempo de cultura.

Maiores diferenças foram observadas quando o efeito dos arcabouços sobre a capacidade de proliferação celular foi analisado. Conforme os valores apresentados na Tabela 5.4 e no gráfico mostrado na Figura 5.35, enquanto o número de células nas condições controle aumentou progressivamente, atingindo mais de 300 vezes em 72 h, o aumento foi muito menor em presença dos arcabouços (cerca de 40 vezes em 72 h).

Tabela 5.4: Proliferação celular (número de células para cada célula colocada em cultivo no dia 0) nos cultivos controle e em presença do arcabouço, após 24, 48 ou 72 h.

Condições de cultivo	Tempo em cultura		
	24 h	48 h	72 h
<b>Controle negativo*</b>	17,2	60,5	200,0
	35,4	12,1	333,0
	34,9	71,0	252,0
<b>Arcabouço</b>	3,9	24,0	44,5
	2,3	40,0	38,5
	1,2	16,0	39,5

\* células cultivadas em condições normais, sem a presença do arcabouço

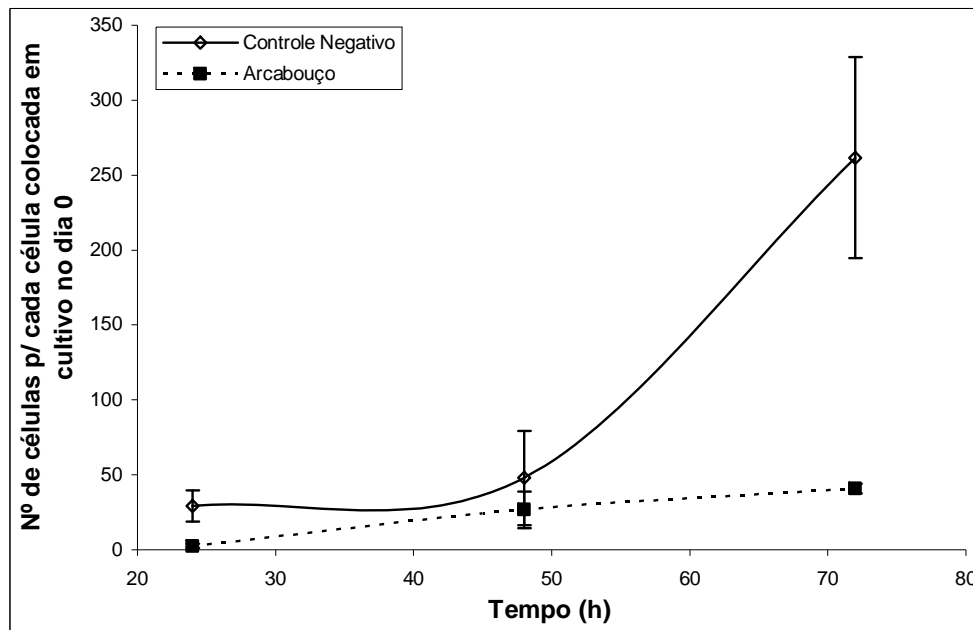


Figura 5.35: Variação do número de células para cada célula colocada em cultivo no dia 0 pelo tempo de cultura.

Dos valores obtidos, pode-se concluir que o arcabouço avaliado possui biocompatibilidade para células da linhagem L1210, permitindo sua viabilidade. Entretanto, a proliferação celular se reduz quando comparada com o controle negativo. Outro fator que deve ser levado em conta é a variação de pH dos cimentos de fosfato de cálcio em meio líquido, que podem ter influenciado os resultados obtidos. Diversos estudos tem demonstrado que o pH de cimentos de fosfato de cálcio podem até mesmo levar à caracterização do material como citotóxico (SANTOS, 2002). O condicionamento do material em soluções que permitam um melhor controle de pH parece ser fator imprescindível para o uso destes materiais na forma conformada.

## 6. CONCLUSÕES

Obteve-se e caracterizou-se arcabouços para crescimento celular e tecidual a partir de cimento ósseo de fosfato de cálcio, e microesferas de parafina como corpo gerador de poros. Este é um método inovador e o desenvolvimento deste trabalho permitiu as seguintes conclusões:

Obteve-se composição de cimento de fosfato de cálcio com base no  $\alpha$ -fosfato tricálcico, observando-se que:

- foi possível a obtenção do pirofosfato de cálcio a partir da calcinação do hidrogenofosfato de cálcio diidratado (DCPD), embora este tivesse uma grande concentração de hidrogenofosfato de cálcio anidro (DCPA). O pirofosfato de cálcio obtido se mostrou eficaz como precursor do cimento de fosfato tricálcico;
- o tamanho médio de partícula do cimento praticamente não se modifica em um tempo de moagem acima de 2,5h;
- a resistência mecânica do cimento após a cura não varia com o tempo de moagem.

Com relação às reações de cura e a variação da porosidade do cimento formado em relação a quantidade de fase líquida utilizada na cura pudemos observar que:

- a reação de cura do cimento ocasionou a precipitação de uma HA deficiente em cálcio ( $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$ ), além da fase  $\beta$ -TCP e a permanência da fase  $\alpha$ -TCP não reagida;
- através da microscopia eletrônica de varredura pode-se observar a estrutura acicular característica dos cimentos de fosfatos de cálcio baseados em  $\alpha$ -TCP;
- o cimento no qual foi utilizado solução padrão teve uma porosidade maior do que aquele em que foi usado solução com defloculante. A solução com defloculante provoca uma maior compactação da estrutura e, uma maior resistência mecânica;
- a variação na quantidade de fase líquida provoca modificações na porosidade e, conseqüentemente na resistência mecânica do cimento. Quanto maior a quantidade de fase líquida, maior a porosidade e menor a resistência mecânica, sendo que a porosidade mínima foi de 51% para a

solução padrão e 48% para a solução com defloculante, e a resistência mecânica máxima (para a menor porosidade) foi de 4,65MPa para a solução padrão e 5,03MPa para a solução com defloculante;

- poros com formato irregular e tamanho extremamente pequeno para favorecer o crescimento de tecido ósseo em suas cavidades, não são adequadas para o uso como arcabouços celulares.

Quanto à obtenção de esferas de parafina e obtenção de arcabouços podemos observar que:

- obteve-se esferas de parafina com diâmetro na ordem de micrômetros (faixa utilizada: 100 a 250 $\mu$ m) utilizando-se método reportado na literatura;
- obteve-se corpos porosos de cimento com a adição das esferas de parafina e posterior extração das mesmas após a cura, utilizando-se um método térmico;
- a temperatura para a extração da parafina do cimento foi determinada em 600°C, não ocorrendo mudança significativa das fases do cimento;
- os arcabouços obtidos com esferas de parafina tiveram alta porosidade (máx. 86%), poros com formato esférico e interconectados.

Quanto à permeabilidade dos arcabouços podemos afirmar que:

- a equação de Forchheimer se mostrou eficiente na determinação dos coeficientes de permeabilidade;
- quanto maior a porosidade mais permeável é o arcabouço, pois menor é a queda de pressão infligida pelo mesmo;
- há uma tendência ao aumento dos valores de constantes de permeabilidade, tanto Darciana ( $k_1$ ) como não-Darciana ( $k_2$ ) com o aumento da porosidade, mostrando que houve um aumento da interconectividade dos poros.

A análise *in vitro*, após imersão em SBF permitiu verificar que:

- não há variação significativa na massa dos corpos de prova com o aumento no número de dias de imersão;
- há uma queda significativa no valor do pH logo nos primeiros dias de imersão, voltando a subir com o aumento no número de dias até a

estabilização em um valor próximo a 7,3 quando o sistema entra em equilíbrio;

- a análise de DRX indicou que a fase  $\alpha$ -TCP não reagida, quando imersa em SBF, torna-se apenas residual nos corpos-de-prova, semelhante ao que é reportado na literatura.

A análise de viabilidade e proliferação celular permitiu concluir que:

- Os arcabouços obtidos permitiram a viabilidade celular de células L1210;
- A proliferação celular foi inferior ao controle negativo;
- Estudos mais aprofundados são necessários para avaliação dos materiais obtidos.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para se dar continuidade a este trabalho, tem-se como sugestões de aprimoramento:

- Estudo sobre a modificação da estrutura do cimento, visando maior resistência mecânica, através da utilização de alguns aditivos como polímeros, hidrogéis e outros;
- Estudo da influência da viscosidade na formação das microesferas de parafina;
- Utilizar novas faixas de granulometria de microesferas e fazer novos estudos quanto a permeabilidade, resistência mecânica e análise *in vitro*;
- Análise das transformações de fase do cimento com a elevação da temperatura para a extração da parafina;
- Estudar implantação *in vivo* e testar a influência de diferentes tamanhos de poros na condução de tecidos e biocompatibilidade;
- Estudo do condicionamento dos arcabouços obtidos em solução de SBF na viabilidade proliferação celular de diferentes tipos celulares.

## REFERÊNCIAS

ALVES, H. L. Dissertação de Mestrado Cimento ósso de fosfato tricálcico: síntese e influência de aditivos na sua injetabilidade, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Brasil. 106p, 2002. Copyright© 2005. Disponível em <<http://www.biblioteca.ufrgs.br/bibliotecadigital/>> [Acessado em 05 de dezembro de 2006].

ALVES, H. L. R., BERGMANN, C. P., STAINER, D. Avaliação da viabilidade de fabricação de componente em cerâmica avançada aplicado como cabeça femoral em próteses de quadril. Jovens Pesquisadores: Diversidade do Fazer Científico. Editora da UFRGS. Porto Alegre, p. 117-131, 2003. Copyright© 2005. Disponível em <<http://www.biblioteca.ufrgs.br/bibliotecadigital/>> [Acessado em 10 de junho de 2006].

ASHMAN, R. B.; RHO, J. Y. Elastic modulus of trabecular bone material. J Biomechanical, vol. 21, pp 117-118. 1988.

BAKER, R. W., Membrane technology and applications, McGraw-Hill (2000).

BALSAMO, S. A influência da musculação e da hidroginástica na densidade mineral óssea. Dissertação de Mestrado em Educação Física. Universidade Católica de Brasília. Brasil, 2002.

BARBANTI, S. H. et al.; Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos, Polímeros: Ciência e Tecnologia, vol. 15, nº 1, p. 13-21, 2005.

BLOOMFIELD, S. A. Cuidando da saúde dos ossos: impacto da nutrição dos exercícios e dos hormônios. Gatorade Sports Science Institute nº 33. Brasil, 2002.

BORDEN, M., ATTAWIA, M., LAURENCIN, C.T. KHAN, Y. Tissue engineered microsphere-based matrices for bone repair: design and evaluation Biomaterials 23 (2002) 551-559.

CALLISTER JR., W. D. Materials Science and Engineering: An Introduction. 5ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 871p, 1999.

CAMIRÉ, C. L. *et al.*, Correlating crystallinity and reactivity in an  $\alpha$ -tricalcium phosphate. Biomaterials 26 p.2787-2794 (2004).

CHO, S.; NAKANISHI, K.; KOKUBO, T.; SOGA, N.; OHTSUKI, C.; NAKAMURA, T. et al. Dependence of apatite formation on silica gel on its structure: effect of heat treatment. Journal of American Ceramic Society, v. 78, p. 1769-1974, 1995

CHOI, S. H., PARK, T. G., Synthesis and characterization of elastic PLGA/PCL/PLGA tri-block copolymers. J. Biomater. Sci. Polym. Ed.(2002) 13, 1163.

CHOW, L. C.; MARKOVIC, M.; TAKAGI, S.; CHERNG, M. Injectable calcium phosphate cements: effects of cement liquid on the physical properties of the cement. Innov Tech Med 18, 1997

DRIESSENS, F. C. M.; FERNÁNDEZ, E.; GINEBRA, M. P.; BOLTONG, M. G.; PLANELL, J. A. Calcium phosphates and ceramic bone cements vs. acrylic cements. *Anal. Quim. Int. Ed.*, vol. 93, p. S38 - S43, 1997. (98)

FABRI, M.; CELOTTI, G. C.; RAVAGLIOLI, A. Hydroxyapatite-Based Porous Aggregates: Physico-Chemical Nature, Structure, Texture and Architecture. *Biomaterials*, v. 16, p. 225, 1995.

FERNÁNDEZ, E.; PLANELL, J. A.; BEST, S. M. Precipitation of carbonated apatite in the cement system. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.47, p 466-471, 1999.

FERNÁNDEZ E.; SARDA S.; HAMCERENCU M.; VLAD M. D.; GEL M.; VALLS S.; TORRES R.; LÓPEZ J. High-strength apatitic cement by modification with superplasticizers. *Biomaterials – Elsevier Science-direct*, vol 26, 8p, 2005.

FILGUEIRAS M. R.; TORRES, G. L.; HENCHE, L. L. Solution effects on the surface reactions of a bioactive glass. *Journal Biomedicine Materials Res.*, v. 27, p. 445-453, 1993.

FREED, L. E.; MARQUIS, J. C.; NOHRIA, A.; EMMANUAL, J.; MIKOS, A. G., LANGER, R. ; *Biodegradable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering*; J. Biomed. Mater. Res., 27, p.11 (1993).

GBURECK, U.; et al.; Mechanical activation and cement formation of  $\beta$ -tricalcium phosphate. *Biomaterials*, 24, p. 4123-4131; (2003)

GIBSON, L. J. The mechanical behavior of cancelous bone. *J. Biomechanical*, vol. 18, pp 317-328. 1985.

GRAYFIELDOPTICAL® Company. Copyright© 2005. Disponível em <<http://www.grayfieldoptical.com/microscience/e500/>> [Acessado em 10 de março de 2005].

GROOT, K. D. Ceramics based on calcium phosphates. *Ceramics in Surgery*, vol. 17, International Symposium on Bioceramics, Lignano Sabbiadoro. Itália, 1983.

GRUNINGER, S. E.; SIEW, C.; CHOW, L. C. O'YOUNG, A.; TSAO, N. K., BROWN, W. E. Evaluation of biocompatibility of a new calcium-phosphate setting cement. *Journal of Dentistry Research*, vol 63, 1984.

HENCH, L. L.; SPLINTER, R. J.; ALLEN, W. C.; GREENLEE, T. K. Bonding mechanisms at the interface of ceramics prosthetic materials. *Journal Biomedicine Materials Res.*, v. 2, p. 117-141, 1972.

HENCH, L. L. Introduction to Biomaterials, *Analises de Química*. Journal of the Spain Roy of Chemistry, Spain, v. 93, n. 1, 1997.

HENCH, L. L. Bioceramics. *Journal of American Ceramic Society*, v. 81, n. 7, p. 1705, 1998.

HENCH, L. L.; WILSON, J. *An Introduction to Bioceramics*. Singapore: World Scientific Publish Co. Ptde. Ltd., 1999.



HUEC, J. C.; SCHAEVERBEKE, T.; CLEMENT, D.; FABER, J.; REBELLER, A. Influence of porosity on the mechanical resistance of hydroxyapatite ceramics under compressive stress. *Biomaterials*, v. 16, n. 2, p. 113-118, 1995.

HULBERT, S. F.; TALBERT, C. D.; KLAWITTER, J. J. Investigation of the potencial of ceramics for surgical applications. In: Belmont Junior, A. L. (Ed.) *Biomaterials: Bioengineering applied to materials for hard and soft tissue replacement*. 1 ed. Washington: Battelle Seattle Research Center and the University of Washington Press, 1971, p. 3-77.

INNOCENTINI D. M.; SALVINI, V. R.; PANDOLFELLI, V. C. Correlação entre permeabilidade e resistência mecânica de filtros cerâmicos no sistema Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-SiC. *Cerâmica* vol.46 n.298 São Paulo, 2000.

JAMES, K., et al., Small changes in polymer chemistry have a large effect on the bone-implant interface: evaluation of a series of degradable tyrosine-derived polycarbonates in bone defects; *Biomaterials*(1999) 20, 2203.

KAMIL, S. H. et al.; Tissue engineering of a human sized and shaped auricle using a mold. *Laryngoscope*, 114, p.867 (2004).

KAPLAN, F. S. Form and function of bone. In: SIMON, S. R. *Orthopaedic Basic Science*. American Academy of Orthopaedic Surgeons. p. 144. 1994.

KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 2005. Disponível em: <[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)>. Acesso em: 05 de mar. 2006.

KIM, H. M.; HIMENO, T.; KAWASHITA, M.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T. The mechanism of biomineralization of bone-like apatite on synthetic hydroxyapatite: an in vitro assessment. *Journal R. Society Interface*, v. 1, p. 17-22, 2004.

KINGERY, W. D.; BOWEN, H. K.; UHLMANN, D. R. *Introduction to ceramics*. 2 ed. Nova York: John Wiley Sons, 1976.

KITSUGI, T.; NAKAMURA, T.; YAMAMURO, T.; KOKUBO, T.; SHIBUYA, T.; TAKAGI, M. SEM-EPMA observation of tree types types of apatite-contagining glass ceramics implanted in bone: the variance of a Ca, P-rich layer. *Journal Biomedicine Materials Res.*, v. 21, p. 1255-1271, 1987.

KITSUGI, T.; YAMAMURO, T.; NAKAMURA, T.; KOKUBO, T. The bonding of glass ceramics to bone. *Int. Orthop.*, v. 13, p. 199-206, 1989.

KOKABI, M.; BABALUO, A. A.; BARATI, A. Gelation process in low-toxic gelcasting systems. *Journal of European Ceramic Society*, 2005. Disponível em: <[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)>. Acesso em: 20 de jan. 2006.

KOKUBO, T. Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials*, v. 12, p. 1255-1271, 1991.

- KOKUBO, T.; KUSHITANI, H.; EBISAWA, Y.; KITSUGI, T.; KOTANI, S.; OURA, K. et al. Apatite formation on bioactive ceramics in body environment. In: OONISHI; AOKI, H.; SAWAI, K. (Ed.) Bioceramics. Tokyo: Ishiyaku EuroAmerica, p. 157-162, 1988.
- KOKUBO, T.; KUSHITANI, H.; KOTANI, S.; SAKKA, S.; KITSUGI, T.; YAMAMURO, T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure change in bioactive glass-ceramic A-W. *Journal Biomedicine Materials Res.*, v. 24, p. 721-734, 1990.
- KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, v. 27, p. 2907-2915, 2006.
- LE GEROS, R. Z. Calcium phosphates in oral biology and medicine. EUA, 1991.
- LEITE, M. B. Avaliação de propriedades mecânicas de concretos produzidos com agregados reciclados de resíduos de construção e demolição. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Brasil. 290p, 2002. Copyright© 2002. Disponível em <<http://www.biblioteca.ufrgs.br/bibliotecadigital/>>
- LEWIS, J. Binder Removal From Ceramics. *Ann. Rev. Mater. Sci.*, v.27, p. 147-73, 1997.
- LIU, D. M. Porous Hydroxyapatite Bioceramics. In: Trans Tech Publications. (Ed.) Porous Ceramic Materials. Switzerland: Trans Tech Publications, p. 209, 1996.
- LLOYD-EVANS, M.; Regulating tissue engineering; *Materials Today*, May, p.48 (2004).
- MA, P. X., LANGER, R., Degradation, structure and properties of fibrous poly(glycolic acid) scaffolds for tissue engineering. In *Polymers in Medicine and Pharmacy*, Mikos, A. G., et al., (eds.) Materials Research Society, PA (1995), 99
- MA, P. X., Tissue Engineering. In *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, 3rd Edition, Kroschwitz, J. I., (ed.), John Wiley & Sons, NJ, (2004).
- MACHADO, J. L. M.; MARTINS, P. E.; FORTE, M. M. C.. Castor oil based polyurethanes films and particles with controlled morphology. In: X International Macromolecular Colloquium, 2005, Gramado. X International Macromolecular Colloquium, 2005.
- MARIA-ENGLER, S. S. et al.; Microencapsulation and tissue engineering as an alternative treatment of diabetes, *Braz. J. Med. Biol. Res.* , 34, p.691 (2001).
- MATSURA, E., Notas de aulas de Prótese Buco-Maxilo-Facial, Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia, São Paulo (1995).
- MEHTA, P. K.; MONTEIRO, P. M. Concreto: estrutura, propriedades e materiais. São Paulo: Pini. Brasil, 573p, 1994.
- MEZZASALMA, S. A.; Effect of Mixing Entropy on the Static Yield Stress of a Liquid Dispersion of Solid Particles: Comparison between  $\text{Si}_3\text{N}_4$  and  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  Aqueous Suspensions. *Journal of Colloid and Interface Science* 190, 302–306 (1997).

MIZUTANIA, Y., et al. Poly(L-lactic acid) short fibers prepared by solvent evaporation using sodium tripolyphosphate, *Polymer*, Vol. 46, p. 3789 – 3794, 2005.

MOREIRA, E. A.; INNOCENTINI, M. D. M.; COURY, J. R. Permeability of ceramic foams to compressible and incompressible flow. *Journal of the European Ceramic Society*, v. 24, p. 3209-3218, 2004.

MOREL, C. F.; FORTE, M. M. C. Desenvolvimento de biomateriais a base de poliuretanas e polimetacrilatos para aplicação nas áreas médica e odontológica. 2000. 0 f. Iniciação Científica. (Graduando em Engenharia de Materiais) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

MUSCHLER, G.F, MIDURA, R.J. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. *J Clin Orthop* 2002; 395: 66-80.

MUTSUDDY, B. C., FORD, R. G. *Ceramic Injection Molding*. London: Chapman & Hall, 1995.

NEVILLE, A. M. *Propriedades do Concreto*. São Paulo: Pini. Brasil, 828p. 1997.

OGINO, M.; OHUCHI, F.; HENCH, L. L. Compositional dependence of the formation of calcium phosphate films on bioglass. *Journal Biomedicine Materials Res.*, v. 14, p. 55-64, 1980.

OHTSUKI, C.; AOKI, Y.; KOKUBO, T.; BANDO, Y.; NEO, M.; NAKAMURA, T. Transmission electron microscopic observation of glass-ceramic A-W and apatite layer formed on its surface in a simulated body fluid. *Journal Ceramics Society Japan*, v. 103, p. 449-454, 1995.

OHTSUKI, C.; KUSHITANI, H.; KOKUBO, T.; KOTANI, S.; YAMAMURO, T. Apatite formation on the surface of Ceravital-type glass-ceramic in the body. *Journal Biomedicine Materials Res.*, v. 25, p. 1363-1370, 1991.

OOMS, E. M., *et al.* Soft-tissue response to injectable calcium phosphate cements. *Biomaterials*, v. 24, (2003), p. 749-757.

ORTEGA, F. S.; INNOCENTINI, M. D. M.; VALENZUELA, F. A. O.; PANDOLFELLI, V. C. Efeito da técnica de aeração sobre a macroestrutura e a permeabilidade espumas cerâmicas produzidas via “gelcasting”. *Cerâmica*, São Paulo, v. 48, n. 306, april/june 2002.

OYANE, A.; KIM, H. M.; FURUYA, T.; KOKUBO, T.; MIYAZAKI, T.; NAKAMURA, T. Preparation and assessment of revised simulated body fluids. *Journal Biomedicine Materials Res.*, v. 65A, p. 188-195, 2003.

OYANE, A.; ONUMA, K.; ITO, A.; KIM, H. M.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T. Formation and growth of clusters in conventional and new kinds of simulated body fluids. *Journal Biomedicine Materials Res.*, v. 64A, p. 339-348, 2003.

PACHENCE, J. M., KOHN, J., *Biodegradable Polymers*. In *Principles of Tissue Engineering*, 2nd Edition, Lanza, R. P., et al., (eds.) Academic Press, San Diego, (2000), 263

PETRUCCI, E.G.R. Concreto de cimento Portland. 11ª Edição. Rio de Janeiro. Globo Pini, 1987.

PHASE DIAGRAMS FOR CERAMISTS. Columbus: The American Ceramic Society, c1964-c1989, vol 7, 1984.

PICOS, D.R., CARRIL, M.G., MENA, D.F., FUENTE, L.N. Microesferas biodegradables de liberación controlada administración parenteral Rev Cubana Farm 2000;34(1):70-7

POTOCZEK, M.; ZAWADZAK, E. Initiator effect on the gelcasting properties of alumina in a system involving low-toxic monomers. Ceramics International, v. 30, p. 793-799, 2004.

RAMAY, H. R.; ZHANG, M. Preparation of porous hidroxyapatite scaffolds by combination of the gelcasting and polymer sponge methods. Biomaterials, v. 24, p. 3293-3302, 2003.

RAVAGLIOLI, A., KRAJEWSKI, A. Bioceramics: Materials, Properties, Applications. Chapman & Hall, New York, USA, 1992

REED, J. S. Introduction to the Principles of Ceramic Processing. USA, 1987.

RIGO, E. C. DA S. Efeito das condições de precipitação sobre as características físico-químicas da hidroxiapatita, 1995. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, Brasil.

SALVINI, V. R.; INNOCENTINI, M. D. M.; PANDOLFELLI, V. C. Influência das condições de processamento cerâmico na resistência mecânica e na permeabilidade dos filtros de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-SiC. Cerâmica, v. 48, n. 307, p. 121-125, jul./ago./set. 2002.

SANTOS, L. A. Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área médico-odontológica, 2002. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

SEPÚLVEDA, P. A; Binner, J. G. P. Processing of Cellular ceramics by Foaming and in situ polymerization of Organic Monomers. Journal of the European Ceramic Society, v. 19, p. 2059-2066, 1999.

SEPÚLVEDA, P.; Gelcasting Foams for Porous Ceramics, The American Ceramic Society Bulletin, 76, 10, Outubro 1997

SEPÚLVEDA, P.; PANDOLFELLI, V. C.; ROGERO, S. O.; HIGA, O. Z.; BRESSIANI, J. C. Hidroxiapatita porosa produzida através do gelcasting de espumas visando aplicações biomédicas. Cerâmica, São Paulo, v. 45, n. 296, nov.-dec. 1999a.

SEPÚLVEDA, P. A; INNOCENTINI, M. D. M; PANDOLFELLI, V.C. Propriedades de Hidroxiapatita porosa para aplicações biomédicas. In: 43º Congresso Brasileiro de Cerâmica, Florianópolis. Anais... Florianópolis: Brasil, p. 11101-11112, 1999b.

SHUM, A. W. T.; LI, J.; MAK, A. F. T. Fabrication and structural characterization of porous characterization of porous biodegradable poly(DL-lactic-co-glycolic acid) scaffolds with controlled range of pore sizes, *Polymer Degradation and Stability*, vol. 87, p. 487 – 493, 2005

SKINNER, P. R. W. *Materiais Dentários*. 9ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 40-53, Brasil, 1993.

TAKAGI, S.; CHOW, L. C.; HIRAYAMA, S.; EICHMILLER, F. C. Properties of elastomeric calcium phosphate cement-chitosan composites. Elsevier Science-direct. *Dental materials*, 8p, 2003.

TAKADAMA, H.; HASHIMOTO, M.; MIZUNO, M.; KOKUBO, T. Round-robin test of SBF for in vitro measurement of apatite-forming ability of synthetic materials. *Phos. Res. Bull.*, v. 17, p. 119-125, 2004.

TONIOLO, J. C. Síntese de pós de alumina nanocristalina por combustão em solução. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 61p, 2004. Copyright© 2005. Disponível em <<http://www.biblioteca.ufrgs.br/bibliotecadigital/>> [Acessado em 18 de dezembro de 2006].

TRUNEC, M. CIHLÁR, J. Thermal Debinding of Injection Moulded Ceramics. *J. Eur. Ceram. Soc.*, v.17, p. 203-209, 1997.

VALLET-REGÍ, M. Introduction to the world of biomaterials, *Análises de Química, Jor. of the Span. Roy. of Chem.*, vol. 93, number 1, Spain, 1997.

VICENTE, A.; DUGARTE, A.; ROJAS, O.; MOGOLLÓN, G.; GUTIERREZ, I.; GOMEZ, L. Formulacion de surfactantes y espécies alcalinas em el destintado por flotación. In: Congreso Iberoamericano de investigación en celulosa y papel, Campinas. Anais... Campinas: Brasil, 2002. Disponível em: <<http://www.celuloseonline.com.br/imagembank/Docs/DocBank/dc/dc326.pdf>>. Acesso em: 14 de abr. 2006.

VIALA, S.; FRECHE, M.; LACOUT, J. L. Effect of chitosan on octacalcium phosphate crystal growth. Elsevier Science-direct. *Carbohydrate polymers*, 5p, 1996.

VOLKMER, T. M. Obtenção e caracterização de hidroxiapatita poroso pelo método gel-casting de espumas para uso como implantes. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 139p, 2006.

XU, H. H. K.; WEIR, M. D.; BURGUERAL. E. F.; FRASER, A. M.; Injectable and macroporous calcium phosphate cement scaffold. *Biomaterials*, v. 27, 2006.

WILSON, J. Biocompatibility and Tissue Response to Implants: Análises de Química. *Journal of the Spain Royal of Chemistry*, v. 93, n. 1, p., 1997.

WOLFE, M. S., et al., In vitro degradation and fracture toughness of multilayered porous poly(propylene fumarate)/ $\beta$ -tricalcium phosphate scaffolds; *Journal of Biomedical Materials Research* (2002) 61, 159.

WOODWARD, S. C., et al., The intracellular degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone); Journal of Biomedical Materials Research (1985) 19, 437.

YANG, S., et al., The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part II. Rapid Prototyping Techniques; Tissue Engineering (2002) 8, 1.

YOUNG, A.; OMATETE, O. O.; JANNEY, M. A.; MENCHHOFER, P. A. Gelcasting of Alumina. Journal of American Ceramic Society, v. 74, n. 3, p. 3349-52, 1991.

YU, D. et al., Self-setting hydroxyapatite cement: A novel skeletal drug delivery system for antibiotics. J. Pharm. Sci. v.81(6), p. 529-31, 1992.

ZELTINGER, J., et al., Effect of Pore Size and Void Fraction on Cellular Adhesion, Proliferation, and Matrix Deposition; Tissue Engineering (2001) 7, 557.

ZHANG, R., MA, P. X., Processing of polymer scaffolds: Phase separation. In Methods of Tissue Engineering, Atala, A., and Lanza, R. (eds.) Academic Press, San Diego, (2001), 715.

ZIELHUIS, S. W., et al. Surface characteristics of holmium-loaded poly(  $\epsilon$ -lactic acid) microspheres. Biomaterials 26, (2005) p.925-932 .

ZORZI, J. E. Produção de peças de cerâmica avançada com perfil complexo. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Brasil. 149p. 2001.