ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA ENDIDA POR Leonardo Riberto NTADOR

## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

Leonardo Ribeiro Rodrigues

# *Scaffolds* baseados em nanopartículas de fosfatos de cálcio para engenharia tecidual óssea

Campinas, 2012.

Leonardo Ribeiro Rodrigues

# *Scaffolds* baseados em nanopartículas de fosfatos de cálcio para engenharia tecidual óssea

Tese apresentada ao Curso de Doutorado da Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Mecânica.

Área de Concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Orientadora: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia

Campinas 2012

### FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

٦

R618s	Rodrigues, Leonardo Ribeiro. <i>Scaffolds</i> baseados em nanopartículas de fosfatos de cálcio para engenharia tecidual óssea / Leonardo Ribeiro Rodrigues – Campinas, SP: [s.n.], 2012.
	Orientador: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia. Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.
	<ol> <li>Hidroxiapatita. 2. Processo sol-gel. 3. Compósito.</li> <li>Nanotecnologia. 5. Células-tronco mesenquimais.</li> <li>Zavaglia, Cecília Amélia de Carvalho. II.</li> <li>Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. III. Título.</li> </ol>

Título em Inglês: Scaffolds based on calcium phosphate nanoparticles for bone tissue engineering.
Palavras-chave em Inglês: Hydroxyapatite, Sol-gel process, Composite, Nanotechnology, Mesenchymal stem cells.
Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação
Titulação: Doutor em Engenharia Mecânica
Banca examinadora: Luís Alberto dos Santos, Christiane Bertachini Lombello, Maria Clara Filippini Ierardi, Marcos Akira D'Ávila.
Data da defesa: 13-07-2012
Programa de Pós-Graduação: Engenharia Mecânica

## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS

**TESE DE DOUTORADO ACADÊMICO** 

# Scaffolds baseados em nanopartículas de fosfatos de cálcio para engenharia tecidual óssea

Autor: Leonardo Ribeiro Rodrigues Orientador: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia

A Bança Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Tese:

aciall 00---Prof. Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, Presidente Universidade Estadual de Campinas - DEMA-FEM-UNICAMP

Prof. Dr. Luís Alberto dos Santos Universidade Federal do Rio Grande do Sul - DEMAT - UFRGS / Porto Alegre 10/2 milillo

Prof. Dra./Christiane Bertachini Lombello Universidade Federal do ABC - CECS-UFABC man 10.

Prof. Dra. Maria Clara Filippini Ierardi Universidade Estadual de Campinas - DEMA-FEM-UNICAMP missill MIDN C

10

Prof. Dr. Marcos Akira D'Ávila Universidade Estadual de Campinas - DEMA-FEM-UNICAMP

Campinas, 13 de julho de 2012

## Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus e a todos que de alguma forma me ajudaram durante esta impressionante caminhada em busca do conhecimento que foi o doutorado.

### **Agradecimentos**

Este trabalho não poderia ter sido realizado sem a ajuda de diversas pessoas às quais presto minha homenagem:

Aos meus pais, irmãos e parentes pelo incentivo em todos os momentos da minha vida.

A minha orientadora professora Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, que me mostrou os caminhos a serem seguidos e sempre me apoiou em minhas decisões de trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior por ter investido neste trabalho através da bolsa de estudos.

Ao professor Fernando Jorge Monteiro da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto e Instituto de Engenharia Biomédica por me orientar no doutorado sanduíche.

Ao consórcio Euro Brazilian Windows – Erasmus Mundus, External Cooperation Window por me conceder a bolsa de doutorado sanduíche.

A Geraldine, a Guinea, a Loneta, a Andrea, a Bruna, a Daniele, a Fernanda, ao Carmo, a Marta (FEUP), ao André, ao Hugo, a Rosemeire, a Sandra, ao Célio, ao Fernando, a Lia e a todos os colegas de laboratório que me deram muitas alegrias nesses anos de convívio.

A professora Maria Helena Raposo Fernandes da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto por permitir a utilização do laboratório de farmacologia e biocompatibilidade celular para a realização dos ensaios *in vitro* nas amostras iniciais.

A Nilza, a Ana e ao professor William Belangero pelo brilhante trabalho realizado nos experimentos *in vitro* e *in vivo* da Amostra 4.

A Andrea e ao Ênio por realizarem os experimentos in vitro das Amostras 1 e 3.

A Ana Beatriz, a Daniele, ao Sobrapar e ao Centro de Estudos do Genoma Humano, por terem realizado os testes *in vitro e in vivo* na Amostra 2.

A todos os professores, técnicos e colegas do departamento e de laboratório, que me ajudaram de forma direta ou indireta na conclusão deste trabalho.

A professora Carmen Gilda Barroso Tavares Dias do IT-FEM-UFPA por permitir a utilização do equipamento FTIR e ajudar nas análises dos resultados.

Ao professor Oswaldo Luiz Alves do LQES-IQ-UNICAMP por permitir a realização das análises de microtomografia de raios X.

Ao professor Carlos Manuel Giles Antúnez de Mayolo e ao Fernando do LCARX-DFMC-IFGW-UNICAMP por realizarem as análises radiográficas.

Ao professor Fernando Galembeck do Instituto de Química - UNICAMP por permitir a utilização do microscópio eletrônico de transmissão (TEM) e ao Carlos Leite por utilizar sua grande experiência com este microscópio para realizar as análises das amostras em forma de "gel".

Ao Alexandre Fonseca por ajudar na obtenção dos dados de picnometria e a professora Maria Helena por permitir a utilização do equipamento.

A Claudenete por obter as imagens de microscopia eletrônica de varredura e análises EDS (DEMA-FEM-UNICAMP).

A professora Elisabete Maria Saraiva Sanchez por permitir a utilização do equipamento de ensaio mecânico de compressão.

A professora Solange e a professora Vanilda por ajudar na revisão ortográfica e gramatical desta tese.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e o Laboratório Nacional de Nanociência (LNNANO) por me treinar e permitir a utilização de seus equipamentos.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biofabricação (BIOFABRIS) e a Rede Iberoamericana de Biofabricação (CYTED) pelo apoio financeiro e suporte técnico em alguns eventos.

"Our thirty-year goal is to have such exquisite control over the genetics of living systems that instead of growing a tree, cutting it down, and building a table out of it, we will ultimately be able to grow the table..."

### **Rodney Brooks**

"Valeu a pena? Tudo vale a pena se a alma não é pequena, quem quiser passar além do Bojador, tem que passar além da dor".

### **Fernando Pessoa**

### Resumo

A engenharia tecidual associada à nanotecnologia ganhou destaque no meio científico devido a sua multidisciplinaridade e capacidade de atingir várias áreas de estudo, inclusive no campo da medicina regenerativa. Para que o processo de regeneração tecidual óssea ocorra de forma esperada é possível utilizar scaffolds, que com sua estrutura porosa e com poros interconectados estruturam e organizam a região injuriada durante a recuperação do tecido. A organização da estrutura 3D da região afetada deve ser estudada para que seja possível criar scaffolds apropriados ao tamanho e forma do defeito existente. Com o scaffold já implantado deve ser avaliada a interação dos materiais com as células da região danificada. A partir desse princípio, o objetivo deste trabalho foi sintetizar nanopartículas de hidroxiapatita (HA) e betafosfato tricálcico (β-TCP) utilizando a nova rota química baseada na utilização da sacarose como agente formador do gel (sucrose-based route) para síntese das nanopartículas, que são utilizadas na produção dos scaffolds, formando compósitos HA/TCP que serão utilizados como suporte para células tronco mesenquimais (MSCs) nos testes de substituição de tecidos ósseos. As nanopartículas foram caracterizadas por DRX, FRX, equação de Scherrer, MEV, MET, EELS, ESEM, NTA, FTIR e potencial Zeta. A partir dos dois fosfatos de cálcio (HA e β-TCP), foram feitos dois tipos de compósitos (esponja cerâmica e pastilha porosa) que foram caracterizados por ensaio mecânico de compressão axial, DRX, picnometria, microtomografia de raios X (Micro-CT), ESEM, FTIR e ensaio de degradação. Após a caracterização dos compósitos, os scaffolds foram submetidos a testes in vitro e in vivo e caracterizados por lupa de fluorescência, microscopia confocal, MEV, EDS, radiografia, MTT e histologia. Os resultados sugerem que os compósitos obtidos possam ser utilizados na potencialização da diferenciação osteogênica de MSCs provendo o desenvolvimento de novos modelos de bioengenharia tecidual na reconstrução óssea.

*Palavras Chave:* Hidroxiapatita; Processo sol-gel; Compósito; Nanotecnologia, Células-tronco mesenquimais.

### Abstract

Tissue engineering associated with nanotechnology stood out because of its multidisciplinarity and results, in addition to targeting many areas of study in the field of regenerative medicine. For the process of bone regeneration to occur in appropriate form, the injured area must be organized. The reorganization of the 3D structure in the affected area should be studied in order to create scaffolds of appropriate size and shape similar to the existing defect. The implanted scaffold should be evaluated regarding the interaction of the material with the cells on the damaged region. From this principle, the objective of this work was to synthesize nanoparticles of hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (β-TCP) using the new sucrosebased route which is based on the use of sucrose as a chelating agent for synthesis of nanoparticles, which are used in the production of scaffolds, forming composite HA / TCP that will be used as support for mesenchymal stem cells (MSC) in the replacement tests of bone tissue. The nanoparticles were characterized by XRD, XRF, Scherrer equation, SEM, TEM, EELS, ESEM, NTA, FTIR and Zeta potential. With two calcium phosphates (HA and TCP) it was prepared two types of composites (ceramic sponge and porous ceramic cylinder), which were characterized by mechanical test, XRD, pycnometry, X-ray microtomography (Micro-CT) ESEM, FTIR and degradation test. Scaffolds were tested in vivo and in vitro and they were characterized by magnifying fluorescence, confocal microscopy, SEM, EDS, radiography, MTT and histology. The results suggest that the scaffolds obtained can be used to improve the osteogenic differentiation of the MSC providing the development of new types of bone tissue engineering.

*Keywords:* Hydroxyapatite; Sol-gel process; Composite; Nanotechnology; Mesenchymal stem cells.

## Lista de Figuras

2.1	Processo de obtenção de nanopartículas e possíveis aplicações do sol (solução coloidal).	8
2.2	Molécula de hidroxiapatita - estrutura hexagonal.	12
2.3	Diagrama de fase para o sistema CaO – $P_2O_5$ (onde C = CaO e P = $P_2O_5$ ) para temperaturas elevadas. Cada linha representa uma mudança de fase. Aqui C <sub>7</sub> P <sub>5</sub> representa 7CaO.5P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ; Ca <sub>2</sub> P= Ca <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ; C <sub>3</sub> P= Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ; C <sub>4</sub> P= Ca <sub>4</sub> O(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ; HA= hidroxiapatita - Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub> as outras siglas podem ser escritas da mesma maneira. A hidroxiapatita e o fosfato tricálcico estão presentes no diagrama parcial.	13
3.1	Fluxograma geral das principais etapas do trabalho.	24
3.2	Fluxograma da síntese de hidroxiapatita e beta-fosfato tricálcico.	27
3.3	Fluxograma de produção das Amostras 1 e 2.	28
3.4	Fluxograma de produção das Amostras 3 e 4.	30
3.5	Amostra 4 com 3 mm de diâmetro utilizada nos testes in vivo.	31
3.6	Fluxograma das análises realizadas nos testes iniciais e testes finais.	32
3.7	Esquema da análise NTA.	34
3.8	<ul> <li>Procedimento cirúrgico (Amostra 4): A) Incisão de aproximadamente 1 cm;</li> <li>B) Exposição do platô medial da tíbia; C) Perfuração com furadeira de baixa rotação;</li> <li>D) Defeito ósseo de tamanho crítico; E) Defeito ósseo com a Amostra 4 implantada;</li> <li>F) Sutura da pele com pontos separados.</li> </ul>	54
4.1	<ul> <li>(a) Gráfico com a distribuição do tamanho das partículas presentes no gel. (b)</li> <li>Partículas dispersas (quadro representa 100x80 μm).</li> </ul>	57
4.2	FTIR do gel da hidroxiapatita sem sacarose.	60
4.3	FTIR das amostras HA e β-TCP comerciais e HA e β-TCP sintetizadas no laboratório (LABIOMEC).	62
4.4	Análise por MET e EELS do gel de HA sem sacarose. Detalhe MET: Tamanho de uma nanopartícula. Detalhe EELS: Detecção de componente elementar da amostra.	63
4.5	Análise por MET das nanopartículas presentes no gel de HA sem sacarose. (a) Nanocristal de 20 nm. (b) Nanopartículas aparentemente esféricas com ~ 5 nm.	64
4.6	Análise MET e EELS da amostra gel de HA com sacarose. Detalhe MET: nanopartículas com ~ 10 nm de espessura e esferas com ~ 5nm de diâmetro. Detalhe EELS: bordas $L_2$ e $L_3$ características do cálcio.	65
4.7	Análise MET da amostra gel de TCP com sacarose. (a) Região com muitas nanopartículas com morfologia esférica. (b) Região com nanopartículas envolvidas pelo filme de sacarose.	66

4.8	(a) Nanopartículas esféricas de hidroxiapatita comercial. (b) Hidroxiapatita nanoparticulada sintentizada no laboratório.	66
4.9	(a): Beta-fosfato tricálcico comercial em forma de nanoagulhas. (b) Beta-fosfato tricálcico sintentizada no laboratório.	67
4.10	<ul><li>(a) Morfologia do gel de hidroxiapatita antes de calcinar e sem recobrimento por plasma.</li><li>(b) Partículas dispersas no gel de HA.</li></ul>	68
4.11	Amostra W. (a) Estrutura macro do <i>scaffold</i> . (b) Detalhe dos poros. (c) Superfície do <i>scaffold</i> . (d) Detalhe da parede do <i>scaffold</i> .	69
4.12	Amostra X. (a) Estrutura macro do <i>scaffold</i> . (b) Detalhe dos poros. (c) Superfície do <i>scaffold</i> . (d) Fratura da parede do <i>scaffold</i> .	70
4.13	Amostra Y. (a) Porosidade. (b) Superfície. (c) Microestrutura.	71
4.14	Amostra Z. (a) Porosidade. (b) Microestrutura – vista geral. (c) Microestrutura - detalhes.	72
4.15	MEV das Amostras 1, 2, 3 e 4. Linha 1, identificação visual de todas as amostras obtidas no estereoscópio (lupa). Linha 2 e 3 microestruturas de todas as amostras. Linha 4 Imagens dos ensaios <i>in vitro</i> das Amostras 1, 3 e 4. Linha 5 resultados do ensaio <i>in vivo</i> sem células tronco da Amostra 4.	74
4.16	Pastilhas porosas HA+TCP. (a) Microtomografia da Amostra 1. (b) Imagem 3D da Amostra 1. (c) Microtomografia da Amostra 2. (d) Imagem 3D da Amostra 2.	76
4.17	Esponja HA+TCP. (a) Microtomografia da Amostra 3. (b) Imagem 3D da Amostra 3. (c) Microtomografia da Amostra 4. (d) Imagem 3D da Amostra 4.	77
4.18	Porosidade total das amostras com a indicação do desvio dos valores médios da porosidade apresentados na Tabela 4.3.	79
4.19	Distribuição dos diâmetros dos poros por fatias indicando o desvio de diâmetro médio dos poros apresentados na Tabela 4.3.	80
4.20	Mudanças da morfologia da superfície por decorrência do contato do alfa-TCP com a solução tampão. (a) Típica estrutura sinterizada antes do teste de degradação. (b) Estrutura modificada após o teste de degradação.	84
4.21	Hidroxiapatita comercial. Calcinada a 725°C e sinterizada a 1330°C. HA: picos de hidroxiapatita.	84
4.22	Difração de raios X da hidroxiapatita sintetizada no laboratório. Calcinada a 725°C e sinterizada a 1330°C. "HA": pico de hidroxiapatita. "o": pico de CaO. "p": pico de pirofosfato.	85
4.23	TCP comercial. Calcinado a 725°C e sinterizado a 1330°C. "b": beta- fosfato tricálcico. "a": alfa-fosfato tricálcico.	86
4.24	TCP sintetizado no LABIOMEC. Calcinado a 725°C e sinterizado a 1330°C. "b": beta- fosfato tricálcico. "a": alfa-fosfato tricálcico.	86

4.25	DRX da esponja cerâmica (HA/TCP) e dos materiais comerciais utilizados em sua fabricação (HA e TCP). Todos foram calcinados a 725°C. "b": pico referente ao beta-fosfato tricálcico. "HA": pico referente a hidroxiapatita. "p": pico referente ao pirofosfato.	87
4.26	DRX da pastilha cerâmica porosa (HA/TCP) e dos materiais comerciais utilizados em sua fabricação (HA e TCP). Todos foram sinterizados a 1330°C. "a": pico referente ao alfa-fosfato tricálcico. "HA": pico referente a hidroxiapatita.	88
4.27	DRX do compósito (HA/TCP) e dos materiais sintetizados (HA e TCP) que foram utilizados na produção dos <i>scaffolds</i> . Todos foram sinterizados a 1330°C. "a": pico referente ao alfa-fosfato tricálcico. "HA": pico referente a hidroxiapatita.	89
4.28	Células aderidas à Amostra W, no $2^{\circ}$ dia. (a) 6,3x de aumento. (b) 20x de aumento.	94
4.29	Células aderidas à Amostra X, no $2^{\circ}$ dia. (a) 6,3x de aumento. (b) 20x de aumento.	95
4.30	Células aderidas à Amostra Y, no $2^{\circ}$ dia. (a) 6,3x de aumento. (b) 20x de aumento.	95
4.31	Células aderidas à Amostra Z, no $2^{\circ}$ dia. (a) 6,3x de aumento. (b) 20x de aumento.	96
4.32	Células aderidas à Amostra W (aumento de 112,5x). (a) 2º dia. (b) 7º dia.	97
4.33	Células aderidas à Amostra X (aumento de 112,5x). (a) 2º dia. (b) 7º dia.	98
4.34	Células aderidas à Amostra Y (aumento de 112,5x). (a) 2º dia. (b) 7º dia.	98
4.35	Células aderidas à Amostra Z no 2º dia. (a) 20x de aumento. (b) 112,5x de aumento.	99
4.36	Células aderidas à Amostra Z no 7º dia. (a) 20x de aumento. (b) 112,5x de aumento.	100
4.37	Amostra W. (a) 2ºdia – apresenta células aderidas. (b) 7º dia - células aderidas nas arestas.	101
4.38	Células aderidas na Amostra X. (a) 2ºdia - Vista geral da amostra. (b) 7ºdia – vista geral e detalhe de uma célula aderida.	101
4.39	Amostra Y. (a) 2ºdia – Células pequenas no centro da imagem. (b) 7º dia - Vista geral e detalhe de uma célula aderida à superfície.	102
4.40	Células aderidas à Amostra Z. (a) Vista geral das células aderidas após 2 dias de cultura celular. (b) Vista geral da amostra com células aderidas após 7 dias de cultura celular.	103
4.41	Imagens obtidas por estereoscópio da morfologia celular após 13 dias. (a) Grupo controle. (b) Células cultivadas com a pastilha porosa feita com material sintetizado, indicando que a Amostra 1 não é citotóxica. Objetiva de aumento de 4x.	104
4.42	MEV da Amostra 1 com células aderidas. (a) Pastilha sem células. (b) Pastilha com a superfície recoberta por células. (c) Células aderidas na amostra e visualizadas a partir de uma fratura no material. (d) Detalhe das células tampando um poro. (e) Detalhe da célula aderida na superfície interna. (f) Célula aderida e espalhada na superfície do <i>scaffold</i> .	105

4.43	Imagens obtidas por estereoscópio da morfologia celular após 13 dias. (a) Grupo controle. (b) Células cultivadas junto com a Amostra 3 (esponja cerâmica feita com material sintetizado) indicando que a amostra não é citotóxica. Objetiva de aumento de 4x.	107
4.44	MEV realizado na Amostra 3 com células aderidas. (a) Esponja sem células. (b) Esponja com as células aderidas na superfície da parede. (c) Detalhe das células aderidas na parede da esponja. (d) Detalhe das células aderidas na superfície interna da parede da esponja.	108
4.45	Ensaio de citotoxicidade Amostra 4. (a) Direta. (b) Indireta.	109
4.46	MEV realizado na Amostra 4 com células tronco mesenquimais. (a) Esponja sem células. (b) Vista geral da esponja com a superfície recoberta por células. (c) Detalhe de uma célula aderida e tampando o poro. (d) Detalhe da célula espalhando para iniciar a sobreposição de um poro. (e) Células aderidas na superfície interna. (f) Detalhe de uma célula no poro.	110
4.47	EDS da Amostra 4 após a realização da cultura celular.	112
4.48	EDS da Amostra 4. Região apresentando possível liberação de cálcio pela célula.	113
4.49	Imagens obtidas por estereomicroscópio das tíbias pertencentes aos grupos: controle onde o defeito permaneceu vazio (GC); e HA/alfa-TCP (Amostra 4) após 7 e 14 dias de seguimento.	114
4.50	Imagens obtidas por estereomicroscópio das tíbias pertencentes aos grupos: controle onde o defeito permaneceu vazio (GC); e HA/alfa-TCP (Amostra 4) após 21 e 30 dias de seguimento.	114
4.51	Radiografias obtidas das tíbias pertencentes ao grupo controle - GC (defeito vazio) e Amostra 4 após 7, 14, 21 e 30 dias de seguimento.	115
4.52	MEV dos testes <i>in vivo</i> sem células tronco. GC – Grupo controle. Amostra 4 - Esponja HA/alfa-TCP.	117
4.53	Histologia da lamina obtida da Amostra 2 com células tronco mesenquimais de polpa dentária com 5x de aumento. Setas: indicam as ilhas de neoformação óssea. Triângulos: indicam infiltrados inflamatórios no material.	118
4.54	Histologia da lamina obtida da Amostra 2 grupo controle sem células. Com aumento de 5x. Setas: indicam as ilhas de neoformação óssea.	119
4.55	Imagens obtidas por estereomicroscópio das tíbias pertencentes aos grupos: controle onde o defeito foi semeado com células MSCs (GC) e HA/alfa-TCP (Amostra 4) com células MSCs após 7 e 14 dias de seguimento.	121
4.56	Imagens obtidas por estereomicroscópio das tíbias pertencentes aos grupos: controle onde o defeito foi semeado com células MSCs (GC) e HA/alfa-TCP (Amostra 4) com células MSCs após 21 e 30 dias de seguimento.	121
4.57	Radiografias obtidas das tíbias pertencentes ao grupo controle (GC) com células mesenquimais (defeito vazio) e HA-TCP (Amostra 4) com células mesenquimais, após 7, 14, 21 e 30 dias de seguimento.	123
4.58	MEV teste <i>in vivo</i> com células tronco mesenquimais. GC-Grupo controle. Amostra 4 - HA/alfa-TCP.	124
•••••		

## Lista de Tabelas

3.1	Nomenclatura das amostras dos testes iniciais e dos testes finais.	25
3.2	Parâmetros (testes iniciais) na análise por picnometria.	36
3.3	Parâmetros (testes finais) na análise por picnometria.	36
3.4	Descrição dos grupos e análises realizadas na Amostra 1- teste in vitro.	46
3.5	Descrição dos grupos e análises realizadas na Amostra 2 - teste in vivo.	47
3.6	Descrição dos grupos e análises realizadas na Amostra 3 - teste in vitro.	50
3.7	Descrição dos grupos e análises realizadas na Amostra 4 (teste <i>in vivo</i> ) sem células e com células tronco mesenquimais.	53
4.1	Análise semiquantitativa das amostras sintetizada e comercial (Fluidinova). Valores referentes à (%) em massa. A precisão do equipamento é de até $10^{-4}$ .	58
4.2	Frequências de absorção no infravermelho encontrados nos fosfatos de cálcio.	60
4.3	Valores médios da porosidade, espessura da estrutura e diâmetro dos poros obtidos a partir dos resultados de microtomografia computadorizada.	78
4.4	Valores médios de densidade e porosidade obtidos a partir de três medições consecutivas realizadas por picnometria nas amostras dos testes iniciais.	81
4.5	Valores médios de densidade obtidos a partir de três medições consecutivas realizadas por picnometria nas amostras dos testes finais.	81
4.6	Monitoramento do pH durante o experimento.	83
4.7	Ensaio de degradação dos <i>scaffolds</i> . Dados obtidos da diferença entre a massa antes e depois do ensaio. A massa das amostras não foi padronizada.	83
4.8	Tamanho dos cristalitos de HA e $\beta$ -TCP, calculados pela equação de <i>Scherrer</i> .	90
4.9	Valores de potencial Zeta extraídos da literatura.	90
4.10	Valores de potencial Zeta com materiais comerciais (teste inicial).	91
4.11	Valores dos resultados obtidos no ensaio mecânico por compressão axial.	92
4.12	Resultados das medições pontuais realizadas pelo equipamento EDS.	113

•••••

## Lista de Abreviaturas e Siglas

### Letras Latinas

P –	Carga de ruptura do material	[N]
d –	Diâmetro	[mm]
r –	Raio	[mm]
h –	Altura	[mm]
l –	Largura	[mm]
L –	Comprimento	[mm]
E –	Módulo de elasticidade	[Pa]
$\Delta L$ –	Variação do comprimento	[mm]
L <sub>inicial</sub> –	Comprimento inicial	[mm]
t –	Tamanho médio do cristalito	[nm]
•••••		

### Letras Gregas

Å –	Angström	[~10 nm]
β –	Largura a meia altura	[nm]
θ –	Ângulo de Bragg	[grau]
λ-	Comprimento de onda do raios X	[Å]
$\beta_{real}$ –	Largura a meia altura corrigida	[nm]
$\beta_{exp}$ –	Largura a meia altura medida	[nm]
β <sub>inst</sub> –	Largura a meia altura do padrão	[nm]
σ-	Tensão	[Pa]
π –	pí	[3,1415]
- 3	Deformação específica axial	[adimensional]
	••••••	

#### Abreviações

SEM-FEG – Microscópio de varredura de emissão de campo

- SEM-LV Microscópio eletrônico de varredura de baixo vácuo
- MEV Microscópio eletrônico de varredura
- TEM Microscópio eletrônico de transmissão
- EELS Espectroscopia por perda de energia de elétrons
- **DRX –** Difração de raios X
- FTIR Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
- NTA Análise de rastreamento de nanopartículas
- MTT Methyl Thiazolyl Tetrazolium (Metil Tiazol Tetrazólio)
- **Micro-CT** Microtomografia de raios X
- ESEM Microscópio eletrônico de varredura ambiental
- **DSC –** Varredura diferencial de calorimetria
- TGA Termogravimetria
- **EDS** Espectrometria de energia dispersiva de raios X
- **FRX –** Fluorescência de raios X
- **Camera CCD** Dispositivo de carga acoplada (Charge Coupled Device)
- JCPDS Banco de dados de padrões de difração de raios X em materiais particulados.

Scaffold – Arcabouço 3D

Sol – Suspensão coloidal

- Sol-gel Suspensão coloidal geleificada
- Colóide Nanopartículas dispersas em meio aquoso
- Sacarose Dissacarídeo composto por uma molécula de glicose e uma de frutose
- Glicose Monossacarídeo (Glucose)
- Dissacarídeo Tipo de carboidrato

Monossacarídeo – Tipo de carboidrato

**Alcoóxidos metálicos –** Compostos organometálicos do tipo M(OR)n, onde M é um metal e R é um grupamento alquil.

**Gel coloidal –** Sistema formado por uma estrutura consistente e contínua de partículas coloidais, a qual imobiliza a fase líquida em seus interstícios.

**Gel polimérico –** Estrutura formada por macromoléculas de cadeia ramificada, a qual imobiliza a fase líquida em seus interstícios.

Aerogel – Gel seco em autoclave.

Xerogel - Gel seco através de evaporação em condições normais de temperatura e pressão.

**Transição sol-gel** – É quando o sol polimérico ou particulado transforma-se em gel por estabelecimento de ligações entre as partículas inorgânicas ou espécies moleculares, resultando na formação de uma cadeia tridimensional contínua.

α-TCP – Alfa-fosfato tricálcico

β-TCP – Beta-fosfato tricálcico

TCP – Fosfato tricálcico

TiO<sub>2</sub> – Dióxido de titânio / titânia

 $Al_2O_3$  – Alumina

ZrO<sub>2</sub> – Zircônia

HA – Hidroxiapatita

CaO – Óxido de cálcio

 $Ca_2P_2O_7$  – Pirofosfato de cálcio

Ca/P – Relação cálcio fósforo

H<sub>2</sub>O – Água

 $\mathbf{Co_3}^{2-}$  – Íon carbonato

 $PO_4^{3-}$  – Íon ortofosfato

 $P_2O_7^{4-}$  - Íon pirofosfato

**OH**<sup>-</sup> - Íon hidroxila

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – Íon nitrato

**HPO**<sub>4</sub><sup>2-</sup> – Íon hidrogenefosfato

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> – Ácido fosfórico

 $Ca(NO_3)_2 \cdot 4 H_2O$  – Nitrato de cálcio tetrahidratado

 $C_{12}H_{22}O_{11}$  – Sacarose

(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> CO – Acetona

CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH – Álcool etílico absoluto

**MOL** (constante de avocado) –  $6,02x10^{23}$  (átomos, moléculas, íons, elétrons, partículas)

**MPa** – megapascal

- **kV –** quilovolt
- **mA** miliampère
- **mV** milivolts
- $\mathbf{mW}$  miliwatt
- **mg** miligrama
- **kgf** quilograma-força
- **kN** quilonewton
- **N** Newton
- **cc** centímetro cúbico  $(cm^3)$
- psig libras por polegada quadrada manométrica (pounds per square inch gauge)
- °C grau Celsius
- **mm –** milímetro
- **cm –** centímetro
- **nm –** nanômetro
- μ**m** micrômetro
- min. minuto
- **cos** coseno
- sen seno
- **g** grama
- **ml –** mililitro
- **pH** Potencial de hidrogênio iônico
- SBF Simulação de fluído corpóreo
- PBS Tampão fosfato salina (Phosphate Buffered Saline)
- SFB Soro Fetal Bovino

**DMEM –** Meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

- **CPT –** Controle positivo de Toxicidade
- **CNT –** Controle Negativo de Toxicidade
- **PVC –** Poli cloreto de vinila

**EDTA –** Ácido etilenodiamino tetracético

DMSO – Dimetilsulfóxido (Dimethyl Sulfoxide)

MSC – Células tronco mesenquimais (Mesenchymal stem cells)

#### Siglas

DEMA – Departamento de Engenharia de Materiais

FEM – Faculdade de Engenharia Mecânica

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

LABIMO - Laboratório de Biomateriais Ortopédicos

SOBRAPAR – Sociedade Brasileira de Pesquisa e Assistência para Reabilitação Crânio-facial

CEMUP - Centro de Materiais da Universidade do Porto

INEB – Instituto Nacional de Engenharia Biomédica

FEUP – Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

FMDUP – Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

GPCM - Grupo de Preparação e Caracterização de Materiais

LME – Laboratório de Microscopia Eletrônica

LNLS – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

LNNano – Laboratório Nacional de Nanotecnologia

**CEMIB –** Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

# SUMÁRIO

Lista de Figuras	X
Lista de Tabelas	xiv
Lista de Abreviaturas e Siglas	XV
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos	2
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Engenharia tecidual	3
2.2 Nanotecnologia	4
2.2.1 Obtenção de nanopartículas	6
2.3 Fosfatos de cálcio	10
2.4 Tecido ósseo	15
2.5 Biomateriais	15
2.6 Biocerâmicas	17
2.6.1 Biocerâmicas de fostato de cálcio	19
2.7 Scaffolds	20
2.8 Compositos	21
2.8.1 Nanocompositos 2.9 Culture colulor	21
2.9 Cultura celular	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Fluorescência de raios X (FRX)	32
3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	33
3.3 Análise de rastreamentos de nanopartículas (NTA)	33
3.4 Equação de <i>Scherrer</i>	35
3.5 Picnometria	35
3.6 Ensaio de degradação	37
3.7 Difração de raios X (DRX)	38
3.8 Microtomografia de raios X (Micro-CT)	38
3.9 Ensaio mecânico de compressão axial	39

3.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	40
3.11 Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS)	41
3.12 Microscopia eletrônica de varredura ambiental (ESEM)	41
3.13 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espectroscopia por perda de energia de elétrons (EELS)	41
3.14 Potencial Zeta	42
3.15 Cultura celular dos testes iniciais	43
3.16 Ensaio de viabilidade celular – Norma ISSO 10993-5	43
3.17 Lupa de fluorescência	44
3.18 Microscopia confocal de fluorescência por varredura laser	44
3.19 Procedimento experimental Amostra 1	45
3.20 Procedimento experimental Amostra 2	46
3.21 Procedimento experimental Amostra 3	49
3.22 Procedimento experimental Amostra 4	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	57
4.1 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)	57
4.2 Fluorescência de raios X (FRX)	58
4.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	59
4.4 Microscopia eletrônica de transmissão e espectroscopia por perda de energia de elétrons (MET e EELS)	62
4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	66
4.6 Microtomografia de raios X (Micro-CT)	75
4.7 Análise de densidade e porosidade por picnometria	80
4.8 Ensaio de degradação seguindo norma ABNT	82
4.9 Difração de raios X (DRX)	84
4.10 Equação de <i>Scherrer</i>	89
4.11 Potencial Zeta (testes iniciais)	90
4.12 Ensaio mecânico de compressão axial	91
4.13 Cultura celular (testes iniciais)	93

4.14 Ensaio <i>in vitro</i> (testes finais)	104
4.14.1 Amostra 1	104
4.14.2 Amostra 2	106
4.14.3 Amostra 3	106
4.14.4 Amostra 4	108
4.15 Ensaio in vivo (sem células tronco)	113
4.15.1 Amostra 4	113
4.16 Ensaio in vivo (com células tronco)	118
4.16.1 Amostra 2	118
4.16.2 Amostra 4	120
5 CONCLUSÕES	125
6 SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS	128
REFERÊNCIAS	129

ANEXO A – Trabalhos publicados em revistas e congressos	143
---	-----

## 1 INTRODUÇÃO

Neste trabalho, além da nova técnica de síntese que utilizou sacarose no processo de obtenção das nanopartículas de hidroxiapatita e de fosfato tricálcico que são utilizadas como matéria prima na produção dos *scaffolds*, também foi desenvolvida uma nova técnica onde se utiliza a solução coloidal gerada pelo método sol-gel para formar junto com as nanopartículas cerâmicas a barbotina. Esta nova técnica resultou em um aumento considerável na resistência mecânica das esponjas cerâmicas, esta análise foi possível por comparação com as esponjas feitas utilizando a barbotina tradicional que utiliza apenas água na mistura, e deste processo resultaram estruturas pouco estáveis, pois se desfizeram após a eliminação da esponja de poliuretano, surgindo assim à necessidade de utilizar um novo método (com solução coloidal) que fornecesse mais resistência mecânica aos *scaffolds*.

A hidroxiapatita e o fosfato tricálcico são biomateriais muito pesquisados em todo o mundo devido à busca por novas soluções para a engenharia tecidual óssea, além da utilização de células tronco mesenquimais com a intenção de potencializar os efeitos da regeneração do tecido ósseo.

Atualmente muitos biomateriais são produzidos aplicando as técnicas da nanociência e nanotecnologia e estão em destaque no meio científico e na sociedade, devido à capacidade de melhorar as propriedades dos materiais quando comparados com produtos feitos a partir de materiais micropartículados.

Para a produção de nanopartículas foi utilizado o processo sol-gel com sacarose, pois é um procedimento adequado para sintetizar materiais em escala nanométrica. Esse processo de síntese é eficiente e de baixo custo.

Os *scaffolds* produzidos com nanopartículas cerâmicas são utilizados na engenharia tecidual óssea que é considerada um campo de estudo multidisciplinar e que engloba principalmente as áreas: médica, biológica e de engenharia. Cada área representa uma parte importante, como é descrito a seguir: i) A engenharia produz os *scaffolds* que são utilizados como guia e suporte para as células; ii) As ciências biológicas são responsáveis pela aquisição, crescimento, proliferação, diferenciação e pelo ato de semear as células nos *scaffolds* quando são realizados os testes *in vitro* e *in vivo*; e iii) A medicina é responsável por realizar os testes clínicos.

Os *scaffolds* são conhecidos por serem objetos tridimensionais com poros interconectados. Os poros são controlados em tamanho e forma, devido à sua aplicação que é de suporte e guia para o crescimento celular e quando semeados com células tronco tem condição de formar tecidos naturais.

Para produzir *scaffolds* que em contato com o tecido ósseo natural respondam de forma satisfatória aos estímulos produzidos pelo meio no qual foi implantado, é necessário utilizar materiais que possuam características semelhantes ou muito próximas aos tecidos naturais, e atualmente para essa aplicação são utilizadas as biocerâmicas de fosfato de cálcio.

Os fosfatos de cálcio são biocerâmicas conhecidas como substitutos ósseos sintéticos, pois são semelhantes à fase mineral do tecido ósseo natural.

Escolheu trabalhar-se com a hidroxiapatita (HA) e com o fosfato tricálcico (TCP) na formação dos compósitos, pois a hidroxiapatita (HA) é um material cerâmico bioativo, pouco absorvido pelo organismo e conduz o crescimento do tecido ósseo ao mesmo tempo em que mantem uma estrutura com poros interconectados para guiar e dar suporte as células, já o TCP é considerado biorreabsorvível, pois quando implantado são absorvidos ou fagocitados e transformados pelo organismo em tecido ósseo natural.

#### 1.1 **Objetivos**

Os objetivos deste trabalho foram:

- Sintetizar e caracterizar nanopartículas de fosfatos de cálcio (hidroxiapatita e fosfato tricálcico) para a produção de *scaffolds*;

- Semear os *scaffolds* com células tronco mesenquimais para realizar a engenharia tecidual óssea;

- Utilizar o novo método sol-gel com sacarose para a síntese dos fosfatos de cálcio (HA e TCP);

- Aplicar a nova técnica de mistura da solução coloidal de hidroxiapatita com as nanopartículas de HA/TCP (barbotina) utilizada na produção das esponjas cerâmicas.

- Comparar as propriedades dos *scaffolds* obtidos a partir de materiais sintetizados com os *scaffolds* obtidos a partir de materiais comerciais.

- Realizar testes in vitro e in vivo.

### 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1 Engenharia tecidual

A engenharia tecidual é uma tecnologia recente, mas tem apresentado grandes resultados tanto em inovação com a aplicação de novas técnicas para tratamento de tecidos injuriados, quanto em tempo de recuperação de pacientes, podendo se tornar em um futuro próximo a melhor opção na reabilitação de pacientes. As células tronco mesenquimais estão diretamente ligadas ao processo de engenharia tecidual e tem a capacidade de se diferenciar em vários tipos de células e, por consequência, promover a regeneração de tecidos danificados e ou doentes [ARINZEH, T.L.; 2005]. Muitos fatores podem influenciar na engenharia tecidual, como: origem das células, concentração das células, tipo de *scaffold*, geometria do *scaffold*, tempo de semeadura, entre outros. A alteração na porosidade afeta significativamente a eficiência do ato de semear células tronco mesenquimais nos *scaffolds* [CHEN, Y.; et al.; 2011].

Um dos objetivos que se deseja atingir na regeneração ortopédica é a rápida remineralização dos defeitos ósseos e, para atingir este objetivo, tem-se estudado a aplicação de células tronco mesenquimais com a intenção de diferenciá-las em osteoblastos. O estudo de várias condições que levam à máxima mineralização no menor tempo possível tem sido o alvo de algumas pesquisas [THIMM, B.W.; et al.; 2011]. Esta técnica vem como alternativa a enxertos e aloenxertos (ou alotransplante, homotransplantação) na área de tratamento ortopédico.

A engenharia tecidual necessita de um suporte para crescimento celular, denominada arcabouço 3D ou em inglês "*scaffold*". Os *scaffolds* podem ser produzidos em materiais metálicos, poliméricos, cerâmicos ou compósitos [SALERNO, A.; et al.; 2010].

Para a produção de órgãos artificiais e tecidos com todas as suas funções naturais, é necessário a utilização de métodos complexos de cultura celular, além de ser necessário desenvolver novos métodos e equipamentos que a auxiliem como, por exemplo, a criação de redes capilares.

Aplicações:

As pesquisas migram para o desenvolvimento de processos e equipamentos que tenham a capacidade de desenvolver e criar órgãos e tecidos artificiais semelhantes ao natural. Atualmente a engenharia tecidual está associada ao reparo ou substituição de partes ou tecidos inteiros como: osso, cartilagem, vasos sanguíneos, bexiga, pele, entre outros [PENOLAZZI, L.; et al.; 2011]. Dependendo da aplicação, os tecidos envolvidos requerem certas propriedades mecânicas e estruturais para o funcionamento adequado.

#### 2.2 Nanotecnologia

Em 1959 o físico Richard Feynman proferiu uma conferência no encontro anual da Sociedade Americana de Física sobre o controle e manipulação da matéria na escala atômica. Feynman defendeu que não existia nenhum obstáculo teórico para a construção átomo a átomo de pequenos dispositivos, nem mesmo o princípio de incerteza de Heisenberg [TOUMEY, C., 2005].

A nanotecnologia estende o domínio da ciência de materiais à ordem nanométrica que por definição está entre 1 e 100 nanômetros, isso quando falamos em partículas e interfaces entre materiais [QUINA, F.H., 2004]. A palavra "nanotecnologia" foi utilizada pela primeira vez pelo professor Norio Taniguchi em 1974 para descrever as tecnologias que permitem a construção de materiais com escala de 1 nanômetro [FAHLMAN, B.D., 2007].

Desde então a nanotecnologia se associou a diversas áreas de pesquisa como: medicina, eletrônica, ciência da computação, física, química, biologia, engenharia dos materiais, entre outros. Com a nanotecnologia é possível desenvolver novos materiais, além de possibilitar a produção de dispositivos em escala atômica.

As nanopartículas entre várias aplicações possíveis, também são utilizadas para tentar melhorar as propriedades mecânicas das biocerâmicas, pois as cerâmicas são classificadas como materiais frágeis e de baixa resistência mecânica, e essas características estão presentes também nos *scaffolds* cerâmicos que são utilizados na engenharia tecidual óssea. Os *scaffolds* são objetos muito porosos, e os poros comprometem ainda mais a resistência mecânica da estrutura.

Quando a ideia é melhorar a resistência estrutural de um material deve-se tentar desenvolver novos meios para se atingir este objetivo. Atualmente, existem alguns métodos de síntese de materiais nanoparticulados que podem ajudar neste desenvolvimento, como os métodos: sol-gel, sol-gel com sacarose, precipitação, microemulsão, entre outros.

A grande área superficial específica das nanopartículas muitas vezes, levam os materiais a terem valores distintos de reatividade, de propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas, químicas, e biológicas quando comparados com materiais que possuem micro e macropartículas [NALDONI, A.; et al.; 2010]. O aproveitamento dessas propriedades em aplicações tecnológicas forma a base da nanotecnologia de materiais [QUINA, F.H., 2004]. A tendência é que, aos poucos, a nanotecnologia se transforme em uma tecnologia de base imprescindível para qualquer ramo industrial.

A nanotecnologia molecular (MNT) pressupõe a construção átomo a átomo de dispositivos úteis à vida humana. No futuro, espera-se que existam dispositivos capazes de, com as instruções de um programador, construir átomo a átomo qualquer máquina concebível pela mente humana. As previsões para o uso da nanotecnologia na área médica são boas a longo prazo, prevê-se o aparecimento de nanodispositivos relacionados à engenharia tecidual, capazes de garantir a regeneração de tecidos danificados [DREXLER, K. E., 1992].

A nanotecnologia tem se desenvolvido graças à contribuição de várias áreas de investigação. Existem atualmente 3 abordagens distintas da nanotecnologia:

- *Abordagem de cima para baixo:* que consiste na construção de dispositivos por desbaste de materiais macroscópicos. Esta é a abordagem utilizada em microeletrônica para produzir chips de computadores e mais recentemente é utilizada na confecção de dispositivos aplicados em testes clínicos [AGARWAL, A., et al., 2008].

- Construção de dispositivos que se formam espontaneamente a partir de componentes moleculares: recorre às técnicas tradicionais de química e das ciências dos materiais [BOW, J.S., et al., 2004].

 - Construção de materiais átomo a átomo: é aquela que levará mais tempo para produzir resultados significativos porque requer um controle rigoroso do processo de produção desses novos materiais, e que só será possível com o aperfeiçoamento da tecnologia e das técnicas aplicadas atualmente, levando-se em consideração todos os campos de aplicação [DREXLER, K. E., 1992].

Para a engenharia tecidual óssea os *scaffolds* aplicados como dispositivos ortopédicos necessitam que suas características sejam as mais semelhantes possíveis com o tecido ósseo natural. Os *scaffolds* são estruturas biomiméticas e quando se utilizam nanopartículas para a sua produção o resultado é a potencialização da interação com o tecido ósseo natural. Esse aumento na interação entre o *scaffold* e o tecido ósseo ocorre provavelmente devido ao tamanho reduzido das partículas, e por consequência sua maior área superficial específica, tornando-o mais reativo.

O processo sol-gel permite aplicar seus produtos de várias formas, como revestimento de superfície (por exemplo, gel de HA revestindo prótese de liga de titânio), o pó pode ser utilizado como preenchimento ósseo, entre outros.

O gel de hidroxiapatita (HA) é aplicado em camadas na superfície de um material, onde as nanopartículas dispersas aderem e formam um filme. O filme formado melhora a interação da prótese com o tecido natural, facilitando e tornando mais rápido o processo de proliferação celular, crescimento celular e deposição de matriz extracelular.

As dimensões nanométricas das partículas facilitam o revestimento de superfícies complexas, por exemplo, o método de replicação de esponjas poliméricas, no qual o gel cria um revestimento com espessura controlada por toda a superfície da esponja, e a eliminação do polímero ocorre posteriormente utilizando altas temperaturas.

#### 2.2.1 - Obtenção de nanopartículas

O processo sol-gel pode ser definido como a conversão de precursores sólidos inorgânicos através de reações de polimerização inorgânica induzida pela água. Normalmente o precursor é um composto metal orgânico (exemplo: nitrato) [SEGAL, D.L., et al., 1984]. O método sol-gel pode ser obtido por duas rotas: uma é a rota coloidal [HERRING, H.; et al., 1996] [MEYER, F.; et al.; 1999], a outra é a rota polimérica [MOHAMMADI, M.R.; et al.; 2011].

Na rota coloidal, o solvente pode ser etanol ou água e os resultados da solução são colóides em meio aquoso e com possível formação de aglomerações decorrentes de efeitos eletrostáticos, mas que podem ser prevenidas por repulsão de partículas. Na maioria dos casos, as partículas cristalinas são formadas após tratamento térmico.

Na rota polimérica, o solvente pode ser o etanol e o gel é formado com a união das nanopartículas. Estruturas amorfas podem ser formadas com a criação de sistemas microporosos.

O método sol-gel [LIVAGE, J., et al., 1989] [FENG, W., et al., 2005] para a síntese de pós, monolitos e filmes finos é baseado em reações de hidrólise e polimerização de precursores alcóxidos. Uma das vantagens do processo é a sua natureza sintética, capaz de gerar soluções de alta pureza. Além disso, o processo sol-gel envolve o uso de reagentes líquidos de baixa viscosidade e, portanto, uma boa homogeneização da solução pode ser alcançada em curto tempo. Desta forma, a mistura bem sucedida dos reagentes na solução implica em uma considerável homogeneidade, quando sóis e géis são formados. A homogeneidade das soluções é alcançada no estágio inicial de mistura, então, requer-se baixas temperaturas para a produção de sóis e géis.

Os alcóxidos metálicos são membros da família dos compostos metalorgânicos, os quais possuem ligantes orgânicos ligados a átomos de metais. A facilidade de reação entre os alcóxidos metálicos e a água é a principal propriedade química destes compostos que são de interesse direto no processo sol-gel.

O processo de produção dos géis é dividido em dois estágios: hidrólise e condensação. A hidrólise é a principal reação química que conduz à transformação de precursores aos produtos finais, ou seja, os óxidos. Uma variedade de fatores físicos e químicos, como por exemplo, temperatura, pressão, pH, concentração dos reagentes e catalisadores, influenciam os processos de polimerização e consequentemente as propriedades dos óxidos.

O processo sol-gel para a produção de óxidos inorgânicos tem sido conduzido atualmente não apenas pela metodologia alcóxido, mas também, pela metodologia que usa dispersões coloidais formadas a partir de sais orgânicos ou inorgânicos.

Os reagentes não-alcóxidos mais utilizados são sais orgânicos como acetilacetonatos e acetatos, ou sais inorgânicos como nitratos e cloretos.

O processo sol-gel com sacarose, chamado de rota baseada na sacarose (sucrose-based route) para a síntese de nanopartículas foi desenvolvido inicialmente por pesquisadores do Laboratório de Raios X da Universidade Federal do Ceará e do Laboratório de Preparação e Caracterização de Materiais da Universidade Federal de Sergipe para a produção de NiO e NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [SOUZA, E.A., et al., 2007]. A rota baseada na sacarose foi adaptada por pesquisadores do DEMA-FEM-UNICAMP para a síntese de fosfatos de cálcio [RODRIGUES, L. R., 2008].

No sol-gel que utiliza água de coco, a formação do sol se dá quando alguns aminoácidos da água de coco verde (principalmente a alanina) se ligam ao metal [MENESES, C.T., 2003]. Um possível e mais provável mecanismo de origem do gel, é que o metal se liga com as proteínas,

pois quando o sal é dissolvido nela, o seu tempo de estabilidade aumenta em até 50 vezes [MENESES, C.T., 2003] [MENESES, J.C.A., 2004]. Além disso, a presença do íon metálico impede que a proteína se decomponha e leve a formação de fungos e bactérias.

O "sol" da palavra sol-gel significa suspensão coloidal de partículas dispersas em um líquido, onde essas partículas não estão dissolvidas, aglomeradas e nem agregadas (Figura 2.1). A aglomeração de pequenas partículas ocorre devido às forças de Van der Waals, essas forças têm por finalidade reduzir a energia superficial, porém as forças de Van der Waals são fracas e se estendem por apenas alguns nanômetros. As etapas da formação do "gel" estão presentes na Figura 2.1.



Figura 2.1 – Processo de obtenção de nanopartículas e possíveis aplicações do sol (solução coloidal).

Tixotropia é o fenômeno presente nos colóides onde a viscosidade do fluído muda em função do tempo, sendo essa uma das características de alguns "géis" (fluidos não newtonianos) e pseudoplásticos. Muitos dos géis e coloides existentes são considerados materiais tixotrópicos, e exibem forma estável quando mantidos em repouso por um longo período de tempo, mas se tornando líquido quando agitados, essa mudança de gel para sol e vice-versa pode ser reprodutível por diversas vezes [SCHRAMM, G.; et al.; 1994].

Muitas dispersões não apresentam apenas potencial para orientação, mas também para interações moleculares dependentes do tempo. Esse fato faz com que "as ligações" criem uma estrutura tridimensional em rede frequentemente chamada de "gel". Em comparação com as forças intermoleculares, essas ligações geralmente são ligações de hidrogênio ou ligações iônicas que são relativamente fracas (elas se rompem facilmente quando a dispersão é submetida ao cisalhamento por um longo período de tempo) [SCHRAMM, G.; et al.; 1994].

O processo adotado neste trabalho para a produção de nanopartículas foi o novo processo sol-gel com sacarose [RODRIGUES, L.R., 2008] [RODRIGUES, L.R.; et al.; 2010] [RODRIGUES, L.R.; et al.; 2011]. O processo químico está baseado na utilização da sacarose como agente formador do gel e destaca-se pela simplicidade e baixo custo. Pode ser considerado similar ao método complexo amorfo, também chamado de método citrato amorfo. Na rota complexo amorfo, à solução ou citrato é adicionada água e materiais carbonáceos, gerando uma solução estável e homogênea. O solvente é evaporado a uma temperatura moderada e um gel pegajoso é obtido. Este gel é aquecido para remover os constituintes orgânicos e um pó cristalino, homogêneo e muito fino é obtido. Normalmente o ácido é utilizado como agente formador do gel, porém, neste caso, mesmo a rota química sendo similar, é a sacarose que tem destaque como agente formador do gel [SOUZA, E.A.; et al.; 2007].

Existem outros métodos de obtenção de nanopartículas, por exemplo: i) Método Pechini [PECHINI, M.P., 1967]; ii) Microemulsão [SMALL, D.M., 1977] [ATTWOOD, D., et al., 1983] [SHARMA, M.K., et al., 1985]; iv) Co-precipitação [BUENO, J.M.C., 1987] [PINHEIRO, E.A., 1992] [KAMBLE, R.B.; et al.; 2008].

#### Aplicações:

As nanopartículas podem ser aplicadas em diversas áreas como, a área terapêutica utilizando nanopartículas magnéticas, a substituição do tecido ósseo utilizando nanopartículas de fosfato de cálcio, a magnetohipertermia onde as nanopartículas magnéticas biocompatíveis são associadas a anticorpos para destruição de células cancerígenas, a indústria farmacêutica onde as nanopartículas de medicamentos são cobertas com biopolímeros e liberadas gradativamente durante o tratamento de uma determinada doença. As nanopartículas também são utilizadas como

sensores eletroquímicos, biosensores, e imobilizadores de proteínas e enzimas [LUO, X.; et al.; 2006].

A partir das novas técnicas de produção criadas pela nanotecnologia foi possível desenvolver novos produtos, como os tecidos resistentes a manchas e que não amassam, raquetes e bolas de tênis, sensores, displays, tratamento tópico para herpes e fungos, vidro autolimpante, diversas aplicações na medicina (cateteres, válvulas cardíacas, marca-passo, implantes ortopédicos, entre outros), produtos para limpar materiais tóxicos, cosméticos e protetores solares, sistemas de filtração do ar e da água, microprocessadores e equipamentos eletrônicos em geral, entre outros.

#### 2.3 Fosfatos de cálcio

Os fosfatos de cálcio tem tido importância muito relevante nas pesquisas de biomateriais cerâmicos, graças à sua semelhança com a fase mineral do tecido ósseo. As possíveis aplicações atingem uma série de áreas biomédicas, como a ortopedia, odontologia e administração de medicamentos por liberação controlada. Isto é possível graças à afinidade e a boa atividade biológica apresentada por estes materiais, quando em contado com tecidos vivos [BOW, J.S.; et al.; 2004].

Existem vários tipos de fosfatos de cálcio, assim como: hidroxiapatita, fosfato tricálcico, fosfato octacálcio, entre outros [AMJAD, Z., 1997]

As cerâmicas de fosfato de cálcio que hoje em dia merecem destaque são a hidroxiapatita (HA), o beta-fosfato tricálcico (beta-TCP) e o alfa-fosfato tricálcico (alfa-TCP). Estas biocerâmicas estão em destaque graças à excelente resposta biológica em ambientes fisiológicos.

O constante aumento de anomalias ou disfunções esqueléticas causadas por doenças ou traumas, estão exigindo a criação de tratamentos mais eficientes e menos traumáticos para os pacientes. Para tentar atender esta demanda, tem-se adotado a engenharia tecidual, utilizando biomateriais como a hidroxiapatita para formar estruturas tridimensionais (*scaffolds*), onde se realiza o cultivo de células diretamente nos poros (interconectados), e desta forma acaba por criar novos tecidos de forma mais rápida e guiada [BEM-NISSAN; et al.; 2004].

Os *scaffolds* para engenharia tecidual óssea precisam ser tridimensionais, com poros interconectados e com diâmetro médio de 100 micrometros a 400 micrometros [ZHU, X. et al., 2006].

O mecanismo de união da HA ao tecido ósseo é diferente do mecanismo apresentado por outros materiais [DUCHEYNE, P.; et al.; 1992]. Para a união dos implantes densos de HA, em princípio existe a formação da interface implante/tecido ósseo. A interface é constituída pela matriz celular óssea de osteoblastos diferenciados, que produzem uma fina faixa amorfa de somente 3 a 5 µm de alta densidade eletrônica [JARCHO, M., 1981]. Entre estas áreas e as células se observa conjuntos fixos de colágeno com alguns cristais de osso mineralizado. Com o tempo esta zona contrai para 0,05 a 0,02 µm, dando lugar a uma união do osso com o implante através de uma fina capa epitaxial de cristais de HA. Esta união epitaxial pode ser observada mediante a utilização do microscópio eletrônico de transmissão (MET) [DACULSI, G., et al., 1990a] [BONFIELD, W., et al., 1991]. Uma consequência desta zona de união ultrafina é o grande gradiente do módulo de elasticidade na interface entre a HA e o tecido ósseo.

Por ser bioativa a hidroxiapatita conduz o crescimento do tecido ósseo, tornando mais rápido o processo de regeneração. A perda de tecido ósseo pode ser resultante de traumas, doenças degenerativas e tumores, e pode ser tratada por intervenção cirúrgica, como por exemplo, a colocação de enxerto ósseo que é utilizado para restaurar as funções normais do tecido afetado.

A HA tem sido utilizada para procedimentos clínicos por mais de 25 anos [WHITE, A.A., et al., 2007]. Entretanto, sua baixa resistência mecânica quando comparada com o tecido ósseo, tem levado os pesquisadores a procurar novas alternativas, surgindo assim novas possibilidades para síntese de HA nanoestruturada.

A hidroxiapatita  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  (massa molecular de 1004,657g/mol) com estrutura hexagonal (Figura 2.2) é um biomaterial bioativo muito semelhante a fase mineral do tecido ósseo e por este motivo é utilizada no processo de substituição ou no preenchimento ósseo. A densidade da hidroxiapatita é de 3,156 g/cm<sup>3</sup> e o coeficiente de expansão térmica tem um valor de 11,6.10<sup>-6</sup> °K<sup>-1</sup>. A hidroxiapatita pertence a uma família de minerais denominada "apatitas", cujo nome deriva do grego que significa decepção ou engano, devido à facilidade com que era confundido com outros tipos de minerais como exemplo o berílio ou a turmalina [DEER, W.A.; et al.; 1972].



**Figura 2.2** - Molécula de hidroxiapatita - estrutura hexagonal [KAY, M.I; et al.; 1964] [MAVROPOULOS, E. 1999].

A hidroxiapatita pertence ao grupo das apatitas que em geral possui estrutura hexagonal e possui elementos de simetria do grupo espacial P6<sub>3</sub>/m [REBELO, A.H.S, 2006] com parâmetros de rede a=b=9,423 Å e c= 6,875 Å e que pode ser representada pela fórmula  $M_{10}$  (ZO<sub>4</sub>)<sub>6</sub> X<sub>2</sub> [ELLIOT, J.C.; et al.; 1994]. Onde "M" pode ser Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>. "ZO" pode ser PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, VO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, SiO<sub>4</sub><sup>4-</sup>. "X" pode ser F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, OH<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> [SANTOS, M.L., 2005].

A hidroxiapatita é um material cerâmico bioativo, porém é considerado frágil e de baixa resistência ao impacto. Por este motivo existe um crescente estudo na fabricação de compósitos que tem como objetivo melhorar as propriedades mecânicas do material formado [GOMIDE, V.S., 2005] [CARDOSO, G.B.C., 2010] [GALDINO, A.G.S., 2011].

Vários métodos para sintetizar hidroxiapatita estão sendo utilizados, mas em todos é necessário manter a relação molar Ca/P um pouco maior ou igual a 1,67 (Figura 2.3), por exemplo, a exposição hidrotérmica da fluorapatita  $[Ca_{10}(PO_4)_6 F_2]$  a altas temperaturas e pressões [LEVITT, S.R., et al., 1969], métodos químicos via úmida, incluindo precipitação aquosa

[CÚNEYTTAS, A., et al., 1997], hidrólise, processo sol-gel [BEZZI, G., et al., 2003], técnica de reação do estado sólido mesclando os compostos cálcio e fósforo, entre outros.

O fosfato tricálcico sintético é um grupo de minerais que contém íons de cálcio  $(Ca)^{2+}$  junto com íons ortofosfato  $(PO_4)^{3-}$ , íons metafosfatos ou pirofosfatos  $(P_2O_7)^{4-}$  e ocasionalmente hidrogênio ou íons de hidróxido. A fórmula molecular padrão é  $Ca_3(PO_4)^2$ .



**Figura 2.3** - Diagrama de fase para o sistema CaO –  $P_2O_5$  (onde C = CaO e P =  $P_2O_5$ ) para temperaturas elevadas. Cada linha representa uma mudança de fase. Aqui C<sub>7</sub>P<sub>5</sub> representa 7CaO<sup>5</sup>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; Ca<sub>2</sub>P= Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>; C<sub>3</sub>P= Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; C<sub>4</sub>P= Ca<sub>4</sub>O(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; HA= hidroxiapatita - Ca<sub>10</sub> (PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub> (OH)<sub>2</sub> as outras siglas podem ser escritas da mesma maneira. [DE GROOT, K., et al., 1990] [CARAYON, M.T.; et al.; 2003] [DOROZHKIN, S.V., 2012]. A hidroxiapatita e o fosfato tricálcico estão presentes no diagrama parcial.

O  $\beta$ -TCP, [ $\beta$  - Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>], é um fosfato de cálcio com relação Ca/P de 1,5 (Figura 2.3) e recebe grande destaque no campo das biocerâmicas e uma de suas principais aplicações é como cimento ósseo para o preenchimento de pequenos defeitos ósseos faciais. Além disso, sabe-se que
os fosfatos de cálcio são biocerâmicas que apresentam excelente biocompatibilidade uma vez que apresentam composição química muito semelhante à fase mineral do tecido ósseo [ABDEL-FATTAH, W.I.; et al.; 2008]. Beta-TCP é considerado um biomaterial reabsorvível, sendo que esta propriedade garante o equilíbrio entre absorção do material e a formação do novo tecido ósseo [SAGAWA, H.; et al.; 2010].

O alfa-fosfato tricálcico  $[\alpha$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>], ( $\alpha$ -TCP), é utilizado para promover a formação óssea e a calcificação de forma mais rápida. A fase alfa-TCP é gerada a partir de um tratamento térmico da fase beta-TCP, sendo que a mudança de fase se inicia aproximadamente quando o material atinge a temperatura de 1150°C.

Apesar de ser utilizado na formulação de cimentos ósseos o  $\beta$ -TCP pode também ser utilizado para a fabricação de compósitos cerâmicos densos ou porosos a partir de sua mistura com outras cerâmicas como, por exemplo, a hidroxiapatita [GUHA, A.K.; et al.; 2009].

Tanto para a utilização em forma de cimento ósseo ou para a confecção de compósitos, a distribuição granulométrica das matérias primas é um fator crucial para a obtenção de materiais com boas propriedades estruturais.

O  $\alpha$ -TCP e o  $\beta$ -TCP são reabsorvidos quando implantados *in vivo*. Este processo ocorre gradativamente conforme o tecido ósseo natural se desenvolve e ocupa o espaço do implante sintético [LEGEROS, R.Z., 1991]. A hidroxiapatita sintética, por causa da grande semelhança com a fase mineral do tecido ósseo, acaba por apresentar uma forte afinidade e uma boa aderência aos tecidos duros, não apresentando reabsorção.

# Aplicações:

O interesse da hidroxiapatita como biomaterial é explicado claramente por sua semelhança com a fase mineral do tecido ósseo. A hidroxiapatita seria um material muito bom tanto para restauração como para substituição óssea, porém não é, graças à sua baixa resistência mecânica, inclusive em formas compactadas e densas. Assim, o uso é indicado a todas as aplicações onde não se requer esforços mecânicos, encontrando seu mais amplo campo de utilização em recobrimento de substratos metálicos, com o objetivo de acelerar e incrementar a fixação das próteses ao osso. Como aplicação clínica a hidroxiapatita pode ser indicada como preenchimento ósseo no processo de fixação de falhas ósseas internas ou externas.

# 2.4 Tecido ósseo

O osso é um material composto em frações mássicas de 10% água, de 20% material orgânico, e 70% de material mineral [SHI, D.; et al.; 2006] e o componente celular, compreendendo osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, que ajudam, na deposição, na dissolução e na nutrição do osso. O principal componente inorgânico mineral é a apatita deficiente de cálcio [LEGEROS, R.Z., et al., 1993].

O osso pode assumir diferentes morfologias e funções de acordo com a sua localização no esqueleto humano. Essa mudança na morfologia acontece devido às diferentes solicitações mecânicas específicas a qual o osso é submetido. Os constituintes do osso estão em equilíbrio dinâmico, a histodinâmica natural do osso permite a reabsorção do mesmo por osteoclastos e a reposição por osteoblastos, sendo que a fase mineral e o colágeno estão sempre sendo reabsorvidos e depositados durante a vida adulta saudável. Esse processo permite a manutenção da forma e volume dos ossos, e é chamado de remodelamento ósseo [LOFFREDO, M.C.M., 2006].

O osso tem quatro funções principais no corpo humano: i) Função de sustentação; ii) Proteção dos tecidos e órgãos vitais; iii) Realiza a troca de minerais com o sangue; e iv) Atua na filtragem de íons gerados no sangue [DUVAIZEM, J.H., 2009].

O tecido ósseo é o mais complexo de todos os tecidos produzidos no corpo humano. Por causa de suas propriedades únicas, o osso atrai o interesse de diferentes tipos de pesquisadores que, utilizando diferentes técnicas, tentam chegar ao conhecimento completo de sua estrutura e diversidade de funções [LOFFREDO, M.C.M., 2006] [RODRIGUES, L.R., 2008].

#### 2.5 Biomateriais

Os biomateriais podem ser definidos como substâncias de origem natural ou sintética que são toleradas de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos. Dois fatores são importantes para o sucesso de um biomaterial:

- **Biocompatibilidade**, que é a habilidade de um material ter um desempenho satisfatório, com resposta adequada do tecido hospedeiro, para uma dada aplicação [WILLIAMS, D.F., 1987].

- **Biofuncionalidade**, que é a capacidade do material desempenhar apropriadamente a função para o qual foi projetado, pelo tempo necessário, que pode ser longo nos casos de implantes permanentes, ou curto no caso de implantes temporários. Esta característica está relacionada com as características mecânicas do material [WILLIAMS, D.F., 1987].

Cada biomaterial possui uma classificação, devido seu comportamento fisiológico variável, e abaixo serão citadas as classificações.

**Biotoleráveis** são materiais apenas tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes através de uma camada fibrosa. Quanto maior a espessura da camada de tecido fibroso, menor é a tolerabilidade dos tecidos naturais ao material. Os materiais biotoleráveis mais conhecidos são os polímeros sintéticos e a maioria dos metais.

**Bioativos** são materiais que em sua superfície ocorrem ligações químicas com o tecido ósseo, fato conhecido como osteointegração. Os biomateriais bioativos mais conhecidos são os vidros e as vitrocerâmicas a base de fosfato de cálcio, a hidroxiapatita e os compostos de fosfato de cálcio. Atualmente, pesquisadores estão tentando desenvolver polímeros que sejam bioativos.

**Bioinertes** são materiais tolerados pelo organismo, mas a formação do tecido envoltório é mínima. Os materiais mais conhecidos são: alumina, zircônia, titânio e suas ligas e materiais carbonosos.

**Reabsorvíveis** ou **biorreabsorvíveis** são materiais que atuam por um determinado período junto aos tecidos biológicos, e depois são degradados, solubilizados ou fagocitados por células do organismo. Fagocitose é o processo de ingestão e destruição de partículas sólidas, como bactérias ou fragmentos de tecido necrosado, por células amebóides chamadas de fagócitos, que tem como uma das funções a proteção do organismo contra infecções. Este material, após atuar no organismo, é eliminado por vias naturais do organismo, sem necessidade de outra intervenção cirúrgica. Os materiais com características reabsorvíveis ou biorreabsorvíveis mais conhecidos são: o fosfato tricálcico e o poli (ácido láctico) [HENCH, L. L., et al., 1993].

Aplicações:

Hoje em dia os biomateriais são utilizados em diversas áreas da medicina, inclusive a área de fármacos. Os produtos são diversos, como prótese ocular, substituição óssea, articulações, válvulas cardíacas, ossículos do ouvido (cabeça do martelo e a bigorna), pinos para fixação de fraturas, prótese mamária, próteses ortopédicas e muitos outros. Na área de fármacos existem os polímeros biorreabsorvíveis que liberam o medicamento de forma controlada, conforme ele é absorvido pelo organismo. O sucesso de um implante está relacionado a vários fatores, como: à forma de produção da matéria prima, ao processamento, à qualidade e controle bio-sanitário, à aplicação clínica final e ao monitoramento das reações do paciente após o implante.

# 2.6 Biocerâmicas

As biocerâmicas são utilizadas na preparação e reconstrução de partes do corpo que estejam danificadas por acidente ou por doença. As biocerâmicas são materiais cerâmicos desenvolvidos para terem um comportamento fisiológico específico ao serem aplicados em construções de próteses ou órgãos artificiais [SASTRE, R., et al., 2004].

Tradicionalmente a cerâmica tem sua utilização limitada a poucas aplicações, decorrente da sua fragilidade, da sua baixa resistência mecânica a tração, a flexão e ao impacto. A partir do final dos anos sessenta, foram desenvolvidas novas cerâmicas com propriedades mais adequadas e sua utilização aumentou consideravelmente [SHACKELFORD, J.F., 1999] [DUBOK, V.A., 2000].

As cerâmicas apresentam alta resistência à compressão, boa aparência estética e alta inércia química, estes fatos fizeram com que elas iniciassem suas aplicações na odontologia, sobretudo em coroas dentais. Posteriormente seu uso se estendeu como biomaterial para o sistema locomotor, na forma de implantes para substituição óssea [HULBERT, S.F., et al., 1987] [VALLET-REGI, M., 2001].

As bioceramicas mais conhecidas são: fosfatos de cálcio, alumina, zircônia e titânia. As biocerâmicas podem ser classificadas em diferentes formas:

#### a) De acordo com a resposta do tecido, se dividem em:

- Bioinertes: Alumina (alfa- Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), Zircônia (ZrO<sub>2</sub>) e os carbonos pirolíticos;
- *Bioativas:* Hidroxiapatita [Ca<sub>10</sub> (PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub> (OH)<sub>2</sub>], biovidros e as vitrocerâmicas bioativas.
- Biorreabsorvíveis e reabsorvíveis: Fosfato tricálcico [Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>].

#### b) De acordo com a aplicação que se destina:

- Estrutural: São cerâmicas de elevada resistência mecânica e geralmente bioinertes.

Exemplos típicos são a alumina (alfa- Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) e a zircônia (ZrO<sub>2</sub>).

- *Não estrutural:* São geralmente biocerâmicas bioativas ou reabsorvíveis, densas ou porosas, com baixa resistência mecânica, pois não necessitam suportar grandes cargas.

Exemplos típicos, são a hidroxiapatita (HA)  $[Ca_{10} (PO_4)_6 (OH)_2]$  e o fosfato tricálcico (TCP)  $[Ca_3(PO_4)_2]$ .

#### c) De acordo com as características do material:

- *Biocerâmicas densas e inertes:* são materiais com porosidade inexistente. Sua união ao osso é morfológica e se realiza de três formas: por crescimento do tecido nas irregularidades superficiais do implante, por união através de um cimento acrílico ou por acoplamento do implante no defeito mediante pressão. Exemplo típico deste grupo é a alumina tanto monocristalina quanto policristalina.

- *Biocerâmicas porosas e inertes:* a união com o osso é mecânica e a fixação é biológica, já que a produção do crescimento ósseo se dá através dos poros do implante. A alumina policristalina porosa é também um bom exemplo deste grupo.

- *Biocerâmicas densas ou porosas bioativas:* A união do tecido ósseo é do tipo químico e a fixação é bioativa. Exemplo típico deste grupo é a hidroxiapatita (HA). Ao mesmo grupo pertencem, os biovidros e as vitrocerâmicas bioativas.

- *Biocerâmicas densas ou porosas reabsorvíveis:* Este grupo se caracteriza pelo fato do implante ser lentamente substituído pelo osso. A este grupo pertencem o fosfato tricálcico (TCP) e outros fosfatos, assim como o sulfato de cálcio (CaSO<sub>4</sub> $\frac{1}{2}$  H<sub>2</sub>O).

#### 2.6.1 Biocerâmicas de fosfato de cálcio

Fosfato tricálcico é considerado uma cerâmica biorreabsorvível ou reabsorvível, neste caso quando implantada é dissolvida gradativamente no tecido natural, ou seja, o material implantado é gradualmente substituído enquanto o tecido ósseo se regenera. Seu grande inconveniente é que conforme o material é reabsorvido sua resistência mecânica diminui, porém somente durante o intervalo de tempo entre a absorção do *scaffold* e a neoformação óssea.

Todas as cerâmicas reabsorvíveis, exceto o gesso, estão baseados em fosfatos de cálcio variando sua solubilidade no sentido:

# alfa-TCP > beta-TCP >>>> HA

A reabsorção dos fosfatos de cálcio é causada por três fatores principais:

- Dissolução físico-química;

- Desintegração física em pequenas partículas;

- Fatores biológicos, como reabsorção ou biorreabsorção.

O fosfato tricálcico (TCP) é solúvel ou absorvível por excelência, sua fórmula química é  $Ca_3(PO_4)_2$  tem uma relação molar de Ca/P = 1,5.

A hidroxiapatita (HA) é uma cerâmica bioativa, é um fosfato de cálcio de fórmula química  $Ca_{10}$  (PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub> (OH)<sub>2</sub>, com uma relação molar de Ca/P = 1,67.

# Aplicações:

Algumas aplicações mais frequentes: engenharia tecidual, bioengenharia, recobrimento de próteses dentárias e maxilofaciais, cirurgia plástica, implantes dentários, em otorrinolaringologia, aumento da crista alveolar, defeitos periodontais, reconstituição maxilofacial, cirurgia de coluna, recobrimento pulpar, entre outros [RAVAGLIOLI, A., et al.; 1992].

# 2.7 Scaffolds

Os *scaffolds* são estruturas tridimensionais com poros interconectados e com o tamanho dos poros por volta de 100 a 400 µm [BEN-NISSAN, B., et. al., 2004] que favorecem a condução da regeneração óssea, desta forma contribuindo significativamente para o desenvolvimento do tecido neoformado. A nanotecnologia aplicada aos *scaffolds* promete melhorar a qualidade dos implantes. A engenharia de tecidos tem como objetivo desenvolver novos tecidos para facilitar a recuperação e manutenção das funções biológicas de cada órgão tratado [ZHANG, Y.; et al., 2010]. As estruturas 3D fornecem suporte físico, com morfologia adequada para o crescimento celular, porém para um *scaffold* ter sucesso em sua aplicação na engenharia tecidual é necessário levar em consideração a sua biorreabsorção, a sua resistência mecânica, a porosidade, o tamanho dos poros, a interconectividade, o material utilizado, entre outros.

A visualização das células vivas dentro dos *scaffolds* antes de serem implantados ainda é uma tarefa difícil e equipamentos capazes de fornecer informações volumétricas das células são poucos, como exemplo a microscopia óptica e a microscopia confocal. Essas técnicas têm sido utilizadas, porém devido ao espalhamento de luz, a penetração na amostra é pequena e por isso estas técnicas são consideradas limitadas. Uma alternativa para este problema é a microtomografia computadorizada (Micro-CT), mas essa técnica em vários casos exige a utilização de agentes de contraste tóxicos, o que teoricamente é um problema devido à necessidade posterior de descarte destes resíduos [ZHANG, Y.; et al.; 2010].

#### Aplicações:

Os *scaffolds*, ou suportes celulares, permitem a ligação e migração celular de forma guiada, e devido aos poros interconectados acaba por facilitar também o acesso dos fatores bioquímicos até as células localizadas no interior do *scaffold*. A estrutura tridimensional com poros interconectados dos *scaffolds* permite a difusão de nutrientes celulares vitais. Os *scaffolds* estão associados à engenharia tecidual, pois é uma ferramenta importante no processo de formação de novos tecidos quando semeados com células tronco [KRUGER, E.A.; et al.; 2011].

20

# 2.8 Compósitos

O termo compósito é empregado para designar a combinação artificial de 2 ou mais materiais, onde os materiais mantêm sua identidade física e química inicial. Na região de contato entre os componentes pode existir uma interface. As propriedades mecânicas de um material compósito normalmente são superiores às propriedades dos materiais analisados de forma individual [SASTRE, R., et al., 2004].

A combinação entre cerâmicas e alguns outros materiais, como por exemplo, os metais, os polímeros e as próprias cerâmicas, têm sido utilizados para a produção de compósitos de alto desempenho. O objetivo é fazer uso de propriedades inerentes das entidades envolvidas. Estas propriedades estão fundamentalmente ligadas à estrutura básica dos materiais (como ligações químicas primárias e arranjo atômico).

Os materiais que podem compor um material compósito podem ser classificados em dois tipos: matriz e reforço.

- *O material matriz* é o que confere estrutura ao material compósito, estando presente como material principal, porém com espaços vazios em sua estrutura que são preenchidos com os materiais de reforço.

- *Os materiais reforço* são os que melhoram propriedades mecânicas, eletromagnéticas ou químicas do material compósito como um todo.

Pode ainda, surgir uma sinergia ou cooperação entre o material matriz e o material reforço resultando em um material compósito com propriedades não existentes nos materiais, quando estando separados.

#### 2.8.1 Nanocompósitos

Os nanocompósitos podem ser fabricados de diversas maneiras: combinação de nanopartículas, para a formação de *scaffolds* ou corpos densos; combinação de polímeros dissolvidos com uma rede inorgânica preparada através da policondensação de alcóxidos metálicos; combinação de polímeros ou copolímeros funcionalizados com grupos alcoxissilanos e a rede inorgânica; precipitação de nanopartículas em um gel polimérico; impregnação de matrizes

inorgânicas porosas com monômeros ou oligômeros; polimerização simultânea de alcóxidos e monômeros; entre outros [RODRIGUES, L.R., 2008] [MORELLI, F.C., 2009].

Nanocompósitos baseados na inserção de nanoentidades, na forma de argilominerais, em matrizes poliméricas tem chamado a atenção por potencialmente gerar materiais com elevadas propriedades mecânicas, de barreira (reduzida difusão de espécies gasosas, por exemplo), elevadas propriedades térmicas e baixo custo, entre outros. Durante o processamento dos nanocompósitos, há a inserção de cadeias poliméricas entre a estrutura lamelar dos argilominerais.

O nanocompósito de hidroxiapatita /titânia consiste em filmes de gel de titânia impregnados com nanopartículas de hidroxiapatita (HA). Os filmes podem ser preparados em placas comerciais de Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V utilizando o método sol-gel.

A mistura de HA/titânia é aplicada em forma de camadas no substrato, para em seguida ser calcinada, formando uma fina camada do nanocompósito [SU, B.; et al., 2006].

Outra forma mais simples de fabricação de nanocompósitos é a adição de dois tipos de nanopartículas em um recipiente. Estas nanopartículas devem ser misturadas e compactadas formando sólidos de compósitos nanoestruturados. A porcentagem de cada material pode ser controlada pela quantidade de massa adicionada no recipiente.

# Aplicações:

Tanto os compósitos quanto os nanocompósitos são aplicados em lugares onde não é possível utilizar os materiais mais comuns, por alguns motivos, tais como: necessidade de um material estrutural mais leve e mais resistente, aplicação em embalagens alimentícias para melhorar a capacidade de barrar ou atenuar a movimentação de substâncias pela embalagem, ajudar no crescimento de tecido ósseo, facilitar a aderência do tecido ósseo natural ao nanocompósito [SHEN, Y.; et. al., 2008].

22

# 2.9 Cultura celular

A cultura celular é um interessante processo utilizado para avaliação de materiais, pois o teste não demanda de muito tempo para ser realizado, o custo é baixo (quando comparado ao teste *in vivo*) e é possível realizar o teste em vários materiais ao mesmo tempo em uma única placa de cultura, por isso normalmente utilizam este tipo de teste para a seleção de materiais que irão passar posteriormente pelos testes *in vivo*. [FRESHNEY, R. I., 2011]

Cultura de células é um complexo processo no qual as células são mantidas cultivadas em condições controladas. Existem dois tipos de cultura celular: cultura celular primária e cultura celular secundária, ou linhagem celular.

A cultura de células primárias é preparada diretamente a partir da extração das células do tecido de um organismo vivo.

A cultura celular secundária tem como base as células que são retiradas de organismos vivos (cultura celular primária) e que são capazes de se multiplicar *in vitro* mantendo suas características iniciais. Cada passagem da cultura representa uma geração de células.

Para um ensaio inicial é comum fazer testes com cultura celular, para verificar o comportamento do material em contato com um organismo vivo. As células são cultivadas em condições controladas de temperatura (37°C) e atmosfera com adição de 5% de CO<sub>2</sub>.

As culturas celulares são nutridas com meio de cultura e suplementos, usualmente com soro fetal bovino, para a obtenção de hormônios e fatores de crescimento e no caso de células tronco mesenquimais também são adicionados fatores de diferenciação celular. As condições do meio e os nutrientes utilizados variam, pois são específicas para cada tipo celular. O meio de cultura e os suplementos devem ser trocados sempre que necessário (em geral 3 vezes por semana). Durante o período de cultura, a morfologia celular pode ser detectada por contraste de fase e microscopia de fluorescência. Existem concentrações adequadas de células para os testes serem realizados e normalmente são medidas em células/ml.

# **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

A Figura 3.1 apresenta um fluxograma geral das principais etapas deste trabalho.



Figura 3.1 - Fluxograma geral das principais etapas do trabalho.

Para tornar o processo de identificação das amostras mais fácil foi criada a Tabela 3.1 onde constam os detalhes de cada amostra.

	Nome	Descrição das Amostras	Origem do material
Testes iniciais	Amostra W	Esponja com paredes finas calcinada a 725°C	Comercial
	Amostra X	Esponja com paredes espessas calcinada a 725°C	Comercial
	Amostra Y	Pastilha porosa calcinada a Comerci 725°C	
	Amostra Z	Pastilha porosa sinterizada a 1330°C	Comercial
Testes finais	Amostra 1	Pastilha porosa sinterizada a 1330°C	Sintetizado
	Amostra 2	Pastilha porosa sinterizada a 1330°C	Comercial
	Amostra 3	Esponja sinterizada a 1330°C	Sintetizado
	Amostra 4	Esponja sinterizada a 1330°C	Comercial

Tabela 3.1 - Nomenclatura das amostras dos testes iniciais e dos testes finais.

Para os testes iniciais de definição da melhor temperatura de trabalho e para a definição do melhor formato do *scaffold* foram adotadas duas técnicas: 1) Replicação de esponjas polimérica; e 2) Compactação mecânica com agentes porogênicos:

1) Amostras W e X: Foi utilizado o processo de replicação de esponjas poliméricas (*polymer foam replication technique*), através da barbotina feita com nanopartículas cerâmicas. As esponjas possuem poros entre 100 a 400 micrômetros e são interconectados. O método da esponja foi adotado devido a grande quantidade de poros uniformes e interconectados presentes na estrutura formada, além da relativa facilidade de trabalho neste tipo de processo. Também se levou em consideração o baixo custo das esponjas poliméricas. Esta técnica utilizou dois tipos de esponjas:

1) Poros maiores e paredes mais finas;

2) Poros menores e paredes mais grossas;

Para o processo de esponjas foram utilizados:

- Esponja de poliuretano cortada no formato desejado;

- Gel de hidroxiapatita (reagentes: ácido fosfórico 85% Sigma-Aldrich e nitrato de cálcio tetrahidratado 99% Fluka);

- Hidroxiapatita Fluidinova nanoXIM-HAp202 artigo 50120208;

- β-TCP (beta-fosfato tricálcico) Fluidinova nanoXIM-TCP202 artigo 50220208;

- Calcinação a 725°C.

2) Amostras Y e Z: Para estas amostras foi adotado o processo de compactação de nanopartículas cerâmicas (HA/ $\beta$ -TCP) com a adição de agente porogênico. Para eliminar o agente porogênico foi realizado o processo de lixiviação seguido do processo de calcinação para a Amostra Y e sinterização para a Amostra Z. As principais características obtidas foram poros em menor quantidade e paredes mais espessas (maior resistência mecânica aparente). A sacarose foi adotada como agente porogênico, por ser eficiente e de baixo custo.

Esta técnica foi adotada para comparação com a técnica de replicação de esponjas poliméricas, e assim se ter uma ideia do comportamento das células em dois tipos de *scaffolds*, com tamanho e forma de poros diferentes, além de uma superfície diferente devido à sinterização promovida pela alta temperatura.

Para o processo de compactação foram utilizados:

- Prensa simples;
- Molde de base circular;
- Sacarose como agente porogênico;
- Hidroxiapatita Fluidinova nanoXIM-HAp202 artigo 50120208;
- β-TCP (fosfato tricálcico) Fluidinova nanoXIM-TCP202 artigo 50220208;
- HA +  $\beta$ -TCP 50% em massa de cada um + gel (exemplo: 2g HA + 2g  $\beta$ -TCP + 2ml gel);
- Calcinação a 725°C para a Amostra Y e sinterização a 1330°C para a Amostra Z.

No processo de obtenção da hidroxiapatita e fosfato tricálcico (Figura 3.2) foram utilizados três tipos de reagentes e um tipo de solvente. Os reagentes foram: nitrato de cálcio tetrahidratado [Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> .4H<sub>2</sub>O], produzido pela empresa Synth e pertencente ao lote 136373, ácido fosfórico

 $(H_3PO_4)$  produzido pela empresa LAFAN e pertencente ao lote 8004, sacarose  $(C_{12}H_{22}O_{11})$  produzido pela empresa MERCK e pertencente ao lote 128718.

Para a síntese da hidroxiapatita  $[Ca_{10}(PO_4)_6 (OH)_2]$  foi necessário manter a relação cálcio e fósforo em aproximadamente 1,67 (Ca/P=1,67), ou seja, para cada 10 mols de cálcio deverá ter 6 mols de fósforo. O solvente foi água destilada (H<sub>2</sub>O) [RODRIGUES, L.R., 2008].

Para a síntese de fosfato tricálcico  $[Ca_3 (PO_4)_2]$  foi necessário manter a relação cálcio/fósforo em aproximadamente 1,5 (Ca/P=1,5), ou seja, para cada 3 mols de cálcio deverá ter 2 mols de fósforo. O solvente foi água destilada (H<sub>2</sub>O). Para conversão do beta fosfato tricálcico em alfa fosfato tricálcico foi necessário submeter o material a temperaturas acima de 1150°C [RODRIGUES, L.R.; et al.; 2011].



Figura 3.2 - Fluxograma da síntese de hidroxiapatita e beta-fosfato tricálcico.

A Figura 3.3 mostra o procedimento de obtenção das Amostras 1 e 2 (pastilhas cerâmicas porosas), produzidas com hidroxiapatita (HA) e reforçadas com beta-fosfato tricálcico (β-TCP).

Para a Amostra 1 foram utilizados materiais sintetizados em laboratório e para a Amostra 2 foram utilizados materiais comerciais.

Para a compactação foi utilizado prensa simples e molde de base circular tanto para a Amostra 1, quanto para a Amostra 2. Como agente porogênico foi utilizada a sacarose e a lixiviação foi realizada após a compactação.

Foi utilizada uma mistura de HA/ $\beta$ -TCP com 50% em massa de cada um + sacarose (2g de HA + 2g de  $\beta$ -TCP + 4g de sacarose)

A sinterização para ambas as amostras seguiu as seguintes etapas: i) Partiu da temperatura ambiente e foi até 500°C; ii) Manteve a temperatura em 500°C por 2 horas para eliminar o restante da sacarose que não foi eliminada com a lixiviação; iii) Partiu de 500°C e foi até 1330°C; iv) A temperatura foi mantida em 1330°C por 2 horas para realizar a sinterização em todo o *scaffold*.



Figura 3.3 - Fluxograma de produção das Amostras 1 e 2.

# Para a Amostra 1 (Figura 3.3) foram utilizados:

- Hidroxiapatita produzida no laboratório [RORIGUES, L.R.; et al.; 2009] [RODRIGUEZ, G.N.P.; et. al.; 2012];

β-TCP (beta-fosfato tricálcico) produzido no laboratório [RODRIGUES, L.R.; et al.;
2010] [RODRIGUES, L.R.; et al.; 2011].

#### Para a Amostra 2 (Figura 3.3) foram utilizados:

- Hidroxiapatita Fluidinova nanoXIM-HAp202 artigo 50120208;

- β-TCP (beta-fosfato tricálcico) Fluidinova nanoXIM-TCP202 artigo 50220208.

As pastilhas cerâmicas porosas (Amostra 1 e Amostra 2) foram feitas a partir da mistura entre as nanopartículas de hidroxiapatita, fosfato tricálcico e partículas de sacarose (agente porogênico) com tamanho controlado por peneiras. Os três elementos foram agitados manualmente com movimentos aleatórios por 5 minutos.

Para a confecção destes *scaffolds* foi quantificada a massa referente ao volume final escolhido, podendo assim variar o tamanho dependendo da aplicação, em seguida esse volume de mistura selecionado foi compactado. Foi utilizada a força de compactação de 2 toneladas, para fazer *scaffolds* de 5 mm de diâmetro por 5 mm de altura.

Depois de compactados, os *scaffolds* foram mergulhados em água purificada por osmose reversa por aproximadamente 5 minutos, porém este tempo vai depender do tamanho do *scaffold*, sendo que para um *scaffold* com as medidas citadas anteriormente este tempo foi suficiente. Após a lavagem foi necessário colocar os *scaffolds* em estufa a 50°C para ocorrer a secagem. Por fim os *scaffolds* foram sinterizados a 1330°C.

A Figura 3.4 mostra o procedimento de obtenção das Amostras 3 e 4 que são as esponjas cerâmicas produzidas com hidroxiapatita (HA) e reforçadas com beta-fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP). Para a Amostra 1 foram utilizados materiais sintetizados no laboratório e para a Amostra 4 foram utilizados materiais comerciais. Para todas as amostras foram utilizadas esponjas de poliuretano cortadas no formato desejado.

A proporção de materiais (HA e  $\beta$ -TCP) utilizados para a formação da barbotina foi de 50% em massa + solução coloidal de HA (2g de HA + 2g de  $\beta$ -TCP + 2ml de gel). A viscosidade da barbotina é variável, e é controlada pela quantidade de solução coloidal de HA adicionada na mistura.

A sinterização dos *scaffolds* (Amostras 3 e 4) seguiu as seguintes etapas: i) Partiu da temperatura ambiente e foi até 500°C com taxa de aquecimento lenta (1°C/min.); ii) Manteve a temperatura em 500°C por 2 horas para eliminar o restante da espuma de poliuretano; iii) Partiu

de 500°C e foi até 1330°C; iv) Manteve a temperatura em 1330°C por 2 horas para realizar a sinterização.



Figura 3.4 - Fluxograma de produção das Amostras 3 e 4.

# Para a Amostra 3 (Figura 3.4) foram utilizados:

Foram utilizados:

- Gel de hidroxiapatita (reagentes: ácido fosfórico 85% LAFAN e nitrato de cálcio tetrahidratado 99% Synth) [DEAN-MO, L.; et al.; 2001] [SANTOS, M.L.; et al.; 2005] [RODRIGUES, L.R., 2008];

- Hidroxiapatita produzida no laboratório [RORIGUES, L.R.; et al.; 2009] [RODRIGUEZ, G.N.P.; et. al.; 2012];

β-TCP (beta-fosfato tricálcico) produzido no laboratório [RODRIGUES, L.R.; et al.;
2010] [RODRIGUES, L.R.; et al.; 2011];

# Amostra 4 (Figura 3.4)

Foram utilizados:

- Gel de hidroxiapatita (reagentes: ácido fosfórico 85% LAFAN e nitrato de cálcio tetrahidratado 99% Synth);

- Hidroxiapatita Fluidinova nanoXIM-HAp202 artigo 50120208;

- β-TCP (beta-fosfato tricálcico) Fluidinova nanoXIM-TCP202 artigo 50220208;

As esponjas no processo de replicação foram cortadas nas dimensões de 1 centímetro cúbico e mergulhadas na barbotina. Foram produzidas esponjas cerâmicas a partir de materiais sintetizados e comerciais.

As esponjas cerâmicas (*scaffold*) foram sinterizadas a 1330°C, e devido à alta temperatura do tratamento térmico ocorreu a transformação de fase do  $\beta$ -TCP para  $\alpha$ -TCP. Em seguida as esponjas foram cortadas com o auxílio de um tubo com a ponta afiada, deixando as amostras com um diâmetro de aproximadamente 3 mm (Figura 3.5). A altura foi limitada em 1,5 mm e para realizar este corte foi utilizada uma lâmina de bisturi. Essas amostras foram utilizadas para o ensaio *in vitro* e *in vivo*.



Figura 3.5 - Amostra 4 com 3 mm de diâmetro utilizada nos testes in vivo.

A Figura 3.6 indica em forma de fluxograma as análises realizadas nas amostras durante o desenvolvimento deste trabalho que foi dividido em duas partes, os testes iniciais realizados no INEB-FEUP e que serviram para definir as melhores condições para a realização dos testes finais realizados na FEM-UNICAMP, SOBRAPAR, FCM-UNICAMP e ICB-USP.



Figura 3.6 - Fluxograma das análises realizadas nos testes iniciais e testes finais.

# 3.1 Fluorescência de raios X (FRX)

Para fluorescência de raios X foi utilizado o equipamento Rigaku RIX 3100 varredura completa para análise de possíveis impurezas presentes no material. Esta é uma técnica não destrutiva de análise qualitativa e semi-quantitativa da composição química de amostras. O equipamento emite um feixe de raios X sobre a amostra que reflete a radiação, essa radiação é captada por um detector, os dados captados são convertidos em forma de gráficos e visualizados no computador [BELMONTE, E.P., 2005].

Para a análise de fluorescência de raios X, foram feitos discos compactados de cada material com 30 mm de diâmetro. A carga aplicada foi de 10 MPa por 60 segundos.

#### **3.2** Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O processo de obtenção de dados se inicia com a produção do feixe de luz infravermelha que em seguida é dividido em dois raios separados. Um feixe passa pela amostra e o outro passa por uma referência. Os dois feixes são refletidos de volta ao detector, porém antes de chegar eles passam por um divisor que alterna a entrada do feixe no detector, sendo possível analisar cada feixe e compará-los e por fim coletar os dados. A referência tem a função de prevenir que a possível flutuação de energia elétrica da saída da fonte afete os resultados finais, e também evita que os efeitos do solvente modifiquem os resultados, pois a referência normalmente é a forma pura do material em estudo.

A análise de espectros de infravermelho foi realizada em um equipamento de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) da marca Thermo Scientific modelo Nicolet FT-IR IR100 com uma resolução espectral de 128 a 4 cm<sup>-1</sup>. A espectral utilizada foi de 4000 a 400 centímetros<sup>-1</sup>. As amostras foram misturadas ao KBr para a realização das análises em forma de disco compactado.

#### 3.3 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

Para a visualização e verificação do tamanho das partículas do gel para contrapor ou confirmar os resultados obtidos nas imagens do microscópio pode ser utilizado o equipamento NanoSight (Figura 3.7) com o NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*). Essa é uma técnica relativamente nova para visualização rápida, direta e em tempo real das nanopartículas dispersas em um líquido.



Figura 3.7 - Esquema da análise NTA [NanoSight].

Baseado em um microscópio óptico com iluminação a laser, as nanopartículas são visualizadas no centro da placa de dispersão onde as partículas se movimentam de forma aleatória (movimento browniano). Um vídeo capta o movimento de cada partícula e depois analisa seu movimento quadro por quadro e o resultado da análise da velocidade média do movimento gera como resultado o tamanho das partículas. É possível fazer contagem de partículas e verificar concentrações. Pelo fato de cada partícula ser medida isoladamente é possível medir o tamanho das partículas e a intensidade relativa da dispersão de luz de forma instantânea, permitindo uma melhor resolução de amostras com partículas que possuem diferentes tamanhos ou tipos do que se utilizasse a técnica convencional de difusão dinâmica de luz (DDL), conhecida também por espectroscopia de correlação de fótons. Este equipamento também quantifica particulas isoladas e aglomeradas.

A amostra foi submetida a análise NanoSight para verificar o tamanho das partículas presentes no gel. O aparelho utilizado nesta análise foi o NanoSight LM20 com faixa de medição entre 10nm e 1000nm. A amostra é introduzida no equipamento por meio de uma seringa. Na sequência, o equipamento emite um feixe de laser que incide no material, como as partículas são dispersas no equipamento sobre um fundo preto as partículas acabam por se destacar em forma de pontos luminosos individuais em movimento Browniano. Os resultados são mostrados como um gráfico de ditribuição de frequências de tamanho.

Normalmente o solvente pode ser qualquer um que não seja corrosivo, como por exemplo, a água. A saída do Laser é de 40mW em 640 nm e é necessário no mínimo 0,3 ml de material. O método *NanoSight* baseia-se no movimento browniano que controla os movimentos das partículas e calcula o coeficiente de difusão. Para estimar o tamanho das particulas é utilizada a equação de Stokes-Einstein [BLOEMBERGEN, S.; et.al.; 2010].

#### 3.4 Equação de Scherrer

Foi aplicada a equação de *Scherrer* associada à difração de raios X para verificar o tamanho aproximado dos cristalitos das amostras [NAG, M.; et. al.; 2007]. A seguir é apresentada a Equação 3.1 que define o tamanho médio do cristalito:

$$t = 0.9\lambda / \beta \cos \theta$$
 (Equação 3.1)

Onde "t" representa o tamanho médio do cristalito. " $\lambda$ " é o comprimento de onda da radiação eletromagnética. A variável " $\beta$ " é a largura a meia altura do pico principal de difração e " $\theta$ " é o ângulo de Bragg (ângulo de difração). Os parâmetros de " $\beta$ " foram corrigidos por meio da equação apresentada a seguir Eq.(2):

$$\beta = \beta_{exp}^2 - \beta_{int}^2$$
(Equação 3.2)

Em que " $\beta_{exp}$ " é a largura a meia altura medida e " $\beta_{inst}$ " é a largura a meia altura padrão. O "padrão" geralmente é um monocristal e com o tamanho de cristalito conhecido. Para este cálculo é considerado que o pico da difração de raios X apresenta uma distribuição gaussiana.

# 3.5 Picnometria

O equipamento picnômetro ultrapyc 1200e Quantachrome foi utilizado na determinação da densidade dos *scaffolds*, onde o gás penetra em duas câmaras, sendo uma com o material e a

outra vazia. Realizaram-se três medições com o objetivo de determinar o volume da amostra e da câmara vazia. Os valores das massas foram obtidos utilizando uma balança analítica convencional de laboratório e os valores de volume são fornecidos pelo equipamento e utilizados no cálculo para obtenção dos valores de densidade obtidos pelo equipamento que calculou os resultados com base nos valores de massa fornecidos e os valores de volume obtidos pelo próprio equipamento. O gás utilizado foi o Hélio e os parâmetros obtidos estão na Tabela 3.2 para os testes iniciais e Tabela 3.3 para os testes finais.

Para os testes iniciais foram utilizados: i) gás hélio seco, ii) foram feitas 3 medidas consecutivas com a pressão da câmara constante em 18 psig, iii) volume da célula foi de 19,339cc, iv) foi utilizada a câmara pequena com o volume de 12,691cc e v) tempo de preenchimento da câmara com o gás foi de 1 min.

Nome	Massa (g)	Volume geométrico (cc)	Temperatura (°C)
Amostra W	0,25	$0,164 \pm 0,001$	24,2
Amostra X	0,22	$0,169 \pm 0,001$	24,4
Amostra Y	0,69	$0,274 \pm 0,004$	24,0
Amostra Z	0,35	$0,207 \pm 0,001$	24,6

Tabela 3.2 – Parâmetros (testes iniciais) na análise por picnometria.

Para os testes finais foram utilizados: i) gás hélio seco, ii) foram realizadas 3 medidas consecutivas com a pressão da câmara constante em 18psig, iii) volume da célula foi de 58,518cc, iv) foi utilizada a câmara grande com o volume de 80,829cc e v) tempo de preenchimento da câmara com o gás foi de 1 min.

Tabela 3.3 – Parâmetros (testes finais) na análise por picnometria.

Nome	Massa (g)	Volume médio (cc)	Temperatura (°C)
Amostra 1	1,17	$0,452 \pm 0,002$	26,4
Amostra 2	1,29	$0,498 \pm 0,003$	28,1
Amostra 3	1,94	$0,818 \pm 0,003$	26,2
Amostra 4	0,45	$0,207 \pm 0,004$	26,9

#### 3.6 Ensaio de degradação

O método deste ensaio segue a Norma ABNT NBR ISO 13781:1998 e ABNT NBR ISO 15814: 2003 e recebe o nome de ensaio de degradação acelerado *in vitro*, onde a temperatura de processo se mantém em 70°C.

Para a realização do teste foi escolhido o pior caso (Amostra W - esponja calcinada a 725°C) e o melhor caso (Amostra Z – pastilha sinterizada a 1330°C). Considera-se pior caso a amostra que foi submetida somente a calcinação (725°C), pois a amostra sinterizada a 1330°C se torna mais resistente mecanicamente, além de diminuir a área superficial das amostras por não conter mais nanopartículas, graças a temperatura elevada de sinterização, este fato torna a estrutura menos susceptível a degradação.

As amostras foram submersas em 10ml da solução tampão de fosfato (tampão de Sörensen) consistindo de dihidrogeno fosfato de potássio e hidrogeno fosfato dissódico em água estéril bidestilada. São duas soluções:

- A) 1/15 mol/l de KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>, preparada pela dissolução de 9,078g KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> em 1 litro de água.
- B) 1/15 mol/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, preparada pela dissolução de 11,876g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O em 1 litro de água.

O tampão constitui-se de uma mistura de uma fração volumétrica de 18,2% da solução (A) e uma fração volumétrica de 81,8% da solução (B).

Nenhum outro aditivo deve ser utilizado na solução. O valor de pH da solução deve ser mantido em 7,4  $\pm$  0,2. A solução antes de ser utilizada apresentou o pH 7,574, valor que permanece dentro da tolerância da norma que fica entre 7,2 a 7,6.

Foram feitas 3 amostras de cada material (Amostra W e Amostra Z) para cada grupo. Os grupos foram: 24h, 7 dias e 14 dias. As amostras foram colocadas em recipientes apropriados e deixadas na estufa a 70°C.

#### 3.7 Difração de raios X (DRX)

A difração de raios X é utilizada para identificar as fases cristalinas através de picos gerados pelo equipamento e os resultados dos materiais sintetizados são comparados com os resultados dos materiais comerciais, além de ser possível consultar a biblioteca JCPDS e comparar os resultados obtidos com os picos já padronizados e citados na literatura [RODRIGUES, L.R., 2008]. Para a análise da cristalinidade dos materiais foram utilizados o equipamento Philips X'Pert do laboratório central de análises pertencente à Universidade de Aveiro e o equipamento DMAX 2200-Rigaku Co – radiação Cu-K $\alpha$  ( $\lambda$ = 1,5406), com filtro de Ni do DEMA-FEM-UNICAMP. O equipamento foi ajustado em 40kV e 30mA.

Nas amostras hidroxiapatita, fosfato tricálcico e *scaffolds* a difração de raios X foi realizada com um passo de 0,02° a cada 2 segundos, em 2 Teta/Teta, sendo estes parâmetros aplicados em um intervalo de 20° até 50°, pois é onde se localizam os principais picos da HA, beta-TCP e alfa-TCP.

#### 3.8 Microtomografia de raios X (Micro-CT)

A microtomografia foi utilizada para verificar a interconectividade dos poros, distribuição, diâmetro e qual é a porcentagem total da porosidade em relação o volume da estrutura. Com as imagens geradas pelo microtomógrafo de raios X (Micro-CT) SKYSCAN 1074 foi possível criar modelos 3D que puderam ser cortados e assim visualizar a porosidade interna do material. O software de captação de imagem foi o control skycan 1074. O software de análise de dados para geração dos gráficos foi o CTAn. O software utilizado para criar o modelo 3D foi o ANT.

As análises das amostras foram divididas em duas partes: pastilhas porosas e esponjas. As pastilhas porosas utilizaram 1500ms de exposição à radiação com 40kV, 1000mA e com um passo de 0,9° a cada avanço. A reconstrução escolhida foi de 360°. As esponjas utilizaram 1080ms de exposição à radiação com 40kV, 1000mA e com um passo de 0,9° a cada avanço.

O funcionamento do microtomógrafo de raios-X baseia-se na propriedade dos materiais em absorver a radiação de forma diferenciada dependendo de sua composição química e densidade.

A tomografia computadorizada (TC) é uma técnica que permite a visualização de seções transversais (cortes internos) de um objeto de forma não destrutiva.

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

#### 3.9 Ensaio mecânico de compressão axial

O ensaio mecânico nas pastilhas porosas e nas esponjas cerâmicas foi realizado no equipamento da marca Hounsfiel test modelo HT400 Pneumatic Grip Controller H localizado na FEM-UNICAMP. A velocidade de trabalho do equipamento foi de 5mm/min. com a célula de carga de 5000N.

Para o tratamento dos dados obtidos por ensaio mecânico de compressão axial foi utilizada a Equação 3.3 apresentado a seguir:

$$\mathbf{O}ca = (4 \cdot P \cdot 10^{-6}) / (\pi \cdot d^2)$$
(Equação 3.3)

Onde "Oca" representa a tensão de compressão axial, "P" representa a carga máxima aplicada medida em Newton e "d" representa o diâmetro da pastilha quantificado em "mm".

O módulo de Young ou módulo de elasticidade é um parâmetro mecânico que proporciona medida de rigidez de um material sólido e está associado com a descrição de várias outras propriedades mecânicas (tensão de escoamento, tensão de ruptura, entre outros). Para obtenção dos valores do módulo de elasticidade leva-se em consideração a deformação específica sob carga axial "E" dos corpos de prova (amostras) registrados em "mm", o módulo de elasticidade é

representado por "E" e a " $\sigma$ " tensão de compressão é medida em "Pa". A equação que representa este cálculo é a Equação 3.4.

$$E = \sigma / \epsilon$$
 (Equação 3.4)

Para quantificar o valor da deformação específica axial do corpo de prova é aplicado o cálculo utilizando a Equação 3.5.

$$\varepsilon = \Delta L / L_{inicial}$$
 (Equação 3.5)

Onde, " $\Delta$ L" é a variação do comprimento do corpo de prova e "L" é o comprimento inicial medido antes do ensaio.

#### 3.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica foi utilizada para verificar a morfologia dos *scaffolds* antes e após a cultura celular, porém quando se deseja realizar imagens após o ensaio *in vitro* é necessário realizar o procedimento de fixação celular.

Para analisar as amostras particuladas foi necessário misturar as nanopartículas em acetona, e em seguida a solução foi para o equipamento de ultrassom, com o objetivo de separar as partículas. Só depois deste processo, e utilizando uma pipeta de precisão a amostra foi gotejada no porta amostra. Depois de o porta amostra estar seco foi realizado o processo de metalização. A metalização consiste na aplicação de um filme de ouro de espessura nanométrica, de forma a não interferir na visualização da amostra.

O microscópio eletrônico de varredura utilizado foi o Carls Zeiss modelo EVO MA15 do DEMA-FEM-UNICAMP.

# 3.11 Espectrometria de energia dispersiva de raios X (EDS)

EDS ou espectrometria de energia dispersiva de raios X é um acessório acoplado ao microscópio eletrônico de varredura. Quando o feixe de elétrons incide sobre um mineral, os elétrons mais externos dos átomos e os íons constituintes são excitados, mudando de níveis energéticos. Ao retornarem para sua posição inicial, liberam a energia adquirida a qual é emitida em comprimento de onda no espectro de raios X. Um detector instalado na câmara de vácuo do MEV mede a energia associada a esse elétron. Os elétrons de um determinado átomo possuem energias distintas, por isso é possível, no ponto de incidência do feixe (da ordem de 1  $\mu$ m) determinar quais são os elementos químicos presentes no local.

O EDS utilizado foi da marca Oxford e está acoplado ao microscópio eletrônico da marca Carls Zeiss modelo EVO MA15 do DEMA-FEM-UNICAMP.

#### 3.12 Microscopia eletrônica de varredura ambiental (ESEM)

A microscopia eletrônica de varredura ambiental (ESEM) é utilizada para análise de superfície de amostras não-metálicas. A amostra é colocada numa câmara com níveis elevados de pressão positiva. Este tipo de microscópio electrônico neutraliza a carga negativa sobre a superfície da amostra quando o feixe interage com o gás. O tipo de gás pode ser variado de acordo com a necessidade. Neste tipo de microscópio a metalização da amostra é desnecessária. O modelo do equipamento foi FEI Quanta 400 FEG ESEM CEMUP-PT com detector de elétrons secundários para visualizar a estrutura de gel e morfologia das nanopartículas.

# **3.13** Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espectroscopia por perda de energia de elétrons (EELS)

Microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma técnica de microscopia na qual um feixe de elétrons é direcionado a uma amostra ultrafina que se encontra fixa no interior do equipamento. O feixe direcionado atravessa a amostra e interage com a mesma, formando uma

imagem que é ampliada e focada em um dispositivo de imagem, podendo ser detectado por uma câmera CCD.

Espectroscopia por perda de energia de elétrons (EELS) é uma técnica que está vinculada ao microscópio eletrônico de transmissão. O material analisado é exposto a um feixe de elétrons com uma faixa de energia cinética estreita e conhecida. Os elétrons sofrem espalhamento inelástico perdendo energia e por consequência tem sua direção de espalhamento modificada de forma aleatória. As interações inelásticas incluem entre outros fatores a ionização de camadas internas, essa ionização é útil para a detecção dos componentes elementares de um material. [EGERTON, R.F., 2009] [EGERTON, R.F., 2011].

O equipamento utilizado foi o microscópio eletrônico de transmissão Zeiss CEM-902 com analisador EELS, pertencente ao IQ-UNICAMP.

#### 3.14 Potencial Zeta

Para realizar a medida de potencial Zeta foi utilizado o equipamento Malvern Zetasizer modelo Nano ZS equipado com MPT-2 autotitration pertencente ao Instituto Nacional de Engenharia Biomédica vinculado a Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. Este equipamento permite o controle de temperatura entre 10-90°C e possui um laser de 633nm. As medidas de potencial Zeta são realizadas em partículas de 3 nanômetros até 10 micrômetros.

Os experimentos realizados no laboratório (testes iniciais) tiveram o pH das amostras controlados em aproximadamente 7.

A célula de medição foi lavada com água "miliq", em seguida a mesma célula de medição foi lavada com etanol e por fim foi lavada com água "miliq" novamente.

As medidas foram realizadas da seguinte forma:

- Parte opaca da célula de medição deve estar para frente.

- As bolhas de ar influenciam na medição, portanto foram retiradas antes do início do processo;

- Deve-se utilizar 750mL cada carga;

- Tentar estabilizar o equipamento perto de 0 mV antes do início, pois as amostras são mais estáveis nestas condições;

- A célula de medição utilizada foi a DTS 1060C PZ.

# 3.15 Cultura celular dos testes iniciais

Para a cultura celular foram utilizadas células MG63 e foram cultivadas em meio mínimo essencial Eagle modificado alfa ( $\alpha$  - MEM) contendo 10% de soro fetal bovino, 100µg mL<sup>-1</sup> de penicilina, 10 IU mL<sup>-1</sup> de estreptomicina, 2,5 µg mL<sup>-1</sup> de fungizona e 50 µg mL<sup>-1</sup> de ácido ascórbico. A incubação das células foi realizada em atmosfera umidificada e com 5% de gás carbônico CO<sub>2</sub>, a 37°C. Após a subcultura, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS – Gibco, UK). As células foram retiradas da placa de cultura após a aplicação da solução de tripsina a 37°C durante 5 minutos, e contadas utilizando o equipamento chamado hemocitómetro. As amostras e o grupo controle (placa de cultura) foram semeados com a concentração de 10<sup>5</sup> célula/cm<sup>-2</sup>. As amostras e o grupo controle foram pré-incubados no meio a 37°C por 1h em atmosfera umidificada e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado duas vezes por semana. O material após ser semeado foi observado por microscopia confocal de varredura laser (CLSM), lupa fluorescente e estereoscópio, após o 2° dia e o 7° dia de cultura [LARANJEIRA, M.S.; et al.; de 2010].

#### 3.16 Ensaio de viabilidade celular – Norma ISSO 10993-5

Para realizar o teste de viabilidade celular nas amostras dos testes iniciais (Amostras W, X, Y e Z) foi utilizada a linhagem celular humana de osteossarcoma (MG 63).

Para a visualização das células viáveis nos *scaffolds*, foi utilizada a técnica de coloração celular chamada MTT. O ensaio de coloração MTT (Metil Tiazol Tetrazólio) consiste na coloração da mitocôndria ativa de células vivas. A coloração normalmente é em tons de azul

escuro. Este teste foi utilizado nas células cultivadas até o segundo dia, devido a simplicidade do processo e o custo mais baixo quando comparado com a coloração para a microscopia confocal.

A atividade de desidrogenase mitocondrial de células MG63 viáveis foi determinada utilizando o substrato 3- (4,5 - dimetiltiazol 2-yl) - 2,5-difenil brometo de tetrazolina) da marca Sigma. Os sais de tetrazólio são reduzidos a formazano e que se acumula no citoplasma das células viáveis. Para este propósito foi utilizado 10µL da solução de MTT (5mg mL<sup>-1</sup>) e foi adicionado a placa de cultura 100µL de meio e incubado a 37°C em atmosfera controlada com 5% de CO<sub>2</sub> por 3h. Os sais de formazan foram dissolvidos com 200µL de dimetilsulfóxido e a absorvância foi medida a 600nm no leitor de placas [LARANJEIRA, M.S.; et al.; 2010].

#### 3.17 Lupa de fluorescência

Com a lupa de fluorescência é possível produzir várias imagens de células luminescentes na amostra em um curto espaço de tempo, isso é possível devido à facilidade de obtenção de imagem e o dinamismo de operação. A finalidade de obter muitas imagens é mapear toda a área da amostra. Um ponto importante é a possibilidade de visualizar a amostra em um todo, dando uma ideia geral da distribuição das células, porém essa não é uma técnica precisa, assim como o microscópio confocal de fluorescência por varredura laser. A lente ocular possui aumento fixo de 10x e as amostras tiveram uma ampliação de 2x e 11,25x, gerando um aumento real de 20x e 112,5x respectivamente.

#### 3.18 Microscopia confocal de fluorescência por varredura laser

O equipamento microscópio confocal de fluorescência por varredura laser pertence ao Instituto de Biologia Molecular e Celular – (IBMC - Portugal), e o seu funcionamento consiste em aumentar o contraste da imagem microscópica e construir imagens tridimensionais através da utilização de um orifício de abertura que permite uma grande definição de imagens mais espessas

que o plano focal. Esta técnica é muito aplicada na obtenção de amostras vivas e de informação computadorizada tridimensional na pesquisa biológica. Esta técnica foi impulsionada pelo desejo de se obter uma imagem de eventos biológicos que ocorrem *in vivo*.

O princípio da microscopia confocal consiste na utilização de compostos químicos chamados fluoróforos para produzir a fluorescência do material estudado. O uso do fluoróforos em biologia acontece quando se quer localizar uma área específica da amostra ou responder a um estímulo específico. Um típico exemplo de área específica na célula é a proteína. Neste trabalho foram coloridos os filamentos do citoesqueleto celular (verde fluorescente) e as proteínas nucleares (vermelho fluorescente).

As células foram fixadas com formaldeído a 4% (livre de metanol), permeabilizadas com 0,1% de triton e incubadas em 10 mg mL<sup>-1</sup> de albumina sérica bovina (BSA) com  $100\mu$ L mL<sup>-1</sup> de RNAse. Filamentos de actina F foram corados com faloidina conjugada com Alexa Flour e os núcleos foram marcados com  $10\mu$ g mL<sup>-1</sup> de iodeto de propídio. As amostras foram lavadas com PBS e cobertas com Vectashield®. O equipamento utilizado foi o da Marca Leica modelo TCS SP2 AOBS [LARANJEIRA, M.S.; et al.; 2010].

# 3.19 Procedimento experimental Amostra 1

# Ensaio in vitro

Foram utilizadas células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo. As células mesenquimais foram isoladas pela desagregação enzimática com solução de colagenase - IA do tecido adiposo epididimal de camundongos (C57BL/6) e cultivadas em meio DMEM – high gluce (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (HyClone) e 1% de solução de antibiótico (Gibco). As células foram amplificadas até a passagem 12, e foram semeadas na Amostra 1. As amostras foram esterilizadas por calor úmido (120°C por 20 minutos) e colocadas uma em cada poço da placa de cultura (placa de 12 poços). Foram semeadas 150000 células por poço de cultura e colocadas na incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C por 13 dias, com troca do meio a cada 3 dias (Tabela 3.4).

Após o tempo de cultivo, as amostras foram retiradas das placas, fixadas com formol 4% em solução salina (0,9%), congeladas e liofilizadas. As amostras com as células foram guardadas após a liofilização a 4°C até a análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

O material de controle foi a própria placa de cultura.

Grupos	Material	Tempo de seguimento (dias)	Análises	Número de amostras
Experimental	Amostra 1	13	Lupa, MEV	3
Controle	Placa de cultura	13	Lupa, MEV	3
			Total de amostras	6

Tabela 3.4 - Descrição dos grupos e análises realizadas na Amostra 1- teste in vitro.

# 3.20 Procedimento experimental Amostra 2

#### Ensaio in vitro

Foram utilizadas células tronco mesenquimais, extraída da polpa dentária de dentes decíduos (dentição infantil) [SUK-JU, H.; et. al.; 2005] [RAPOSO-AMARAL, C.E.; et. al.; 2010] [BUENO, D.F.; et. al.; 2011].

Para obter células-tronco da polpa dentária de dentes decíduos foi obtida a aprovação do Instituto de Biociências de Ética em Pesquisa (Protocolo 037/2005).

Cultura de células tronco mesenquimais obtidas a partir de DPSC (DPSC - *dental pulp stem cell* ou célula mesenquimal da polpa dentária) de dentes decíduos foram estabelecidas de acordo com protocolos publicados [BUENO, D.F.; et, al.; 2011]. As células foram cultivadas a  $37^{\circ}$ C com CO<sub>2</sub> a 5% em DMEM-F12 (Invitrogen, UK) suplementado com 15% de soro fetal bovino (*FBS, HyClone, EUA*) e congelados em FBS 40% para o armazenamento. As células foram descongeladas e cultivadas com até 80% de confluência em um frasco de 75 cm<sup>2</sup> e submetidos a privação de soro (12 h) antes da extração do RNA. Todos os experimentos foram realizados com células entre a subcultura 4 e 8.

As MSCs extraídas do tecido pulpar de dentes decíduos, já demostraram a sua capacidade de diferenciação em tecidos: ósseo, cartilaginoso, muscular e adiposo, comprovado em testes *in vitro* [BUENO, D.F.; et. al.; 2007] [COSTA, A.M.; et. al.; 2008].

# Ensaio in vivo

Os testes com animais foram realizados em ratos da linhagem Wistar, nos quais foram realizados dois defeitos ósseos na região da calota craniana um para o *scaffold* sem células tronco e um para o *scaffold* com células tronco.

Na literatura é possível encontrar estudos que comprovaram que após um mês de pósoperatório o defeito original de 28mm<sup>2</sup> não curou, portanto conclui-se que esse tempo é adequado para verificar as possíveis melhorias causadas na regeneração óssea após a utilização de células tronco mesenquimais [BUENO, D.F.; et. al.; 2005].

A Tabela 3.5 mostra os parâmetros adotados para o ensaio *in vivo* da Amostra 2.

Grupos	Materiais	Tempo de seguimento (dias)	Análises	Número de animais
Experimental	Amostra 2 com células MSCs	56	Histologia	5 esquerdo
Controle	Amostra 2 sem células	56	Histologia	5 direito
		r	Total de amostras	10

Tabela 3.5 - Descrição dos grupos e análises realizadas na Amostra 2 - teste in vivo.

# Animais

Cinco ratos Wistar foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB) e foram mantidos em gaiolas individuais, com comida e água *ad libitum* com temperatura controlada. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA/UNICAMP – Protocolo: 2482-1).

#### Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de ketamina (85 mg/kg; im) e xilazina (12 mg/kg; im). O pêlo foi raspado e foi realizada uma incisão mediana (20 mm) na pele ao longo da sutura sagital. A musculatura e o periósteo foram rebatidos expondo o osso parietal.

Dois defeitos ósseos foram criados na calvária dos ratos, e para criar esses defeitos foi utilizada uma trefina de 5,0 mm de diâmetro.

Os implantes (Amostra 2) foram inseridos nos defeitos criados. No lado esquerdo foi colocado o *scaffold* cultivado com células tronco mesenquimais, e no grupo controle pareado, foi inserido apenas o *scaffold* sem células. Após a cirurgia a musculatura e o periósteo foram reposicionados. No pós-operatório foi utilizado analgésico Dipirona via oral (vo) (500 mg/ml; vo), para o período subsequente de 24 horas. Todos os animais foram monitorados e alimentados *ad libitum*.

#### Procedimento histológico

Os animais foram anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical, após 8 semanas do início dos testes. Os discos de implantes foram colhidos e fixados em formalina a 10%, descalcificados, desidratados e embebidos em parafina. Foram obtidos cortes histológicos de 5 micrômetros de espessura e corados com hematoxilina e eosina. A biocompatibilidade do implante HA foi quantificada pela gravidade da cápsula de fibrose, reação de corpo estranho e processo inflamatório inespecífico. As propriedades de osteocondução foram determinadas pela capacidade de regeneração óssea.

Detalhamento de alguns tópicos:

Comida e água *ad libitum:* significa que eles tiveram comida e água a vontade.

**Injeção intramuscular de ketamina (85 mg/kg; im):** efeito de Anestesia/sedação e Analgesia. O "im" quer dizer que foi introduzido via intramuscular. E "vo" quer dizer via oral.

**Xilazina (12 mg/kg; im):** efeito de sedação, relaxamento muscular e analgesia. A Xilazina foi utilizada associada a anestésicos (Ketamina) para a obtenção de anestesia cirúrgica.

48

**Formalina a 10%:** usado para fixar o material e evitar a autólise, preservando assim o tecido.

**Descalcificados:** para análise adequada o osso foi descalcificado para deixar o tecido menos duro e assim facilitar os cortes histológicos.

**Desidratados:** é uma sequência de lavagens com etanol começando com 50% até atingir a concentração de 100% de etanol, passando depois para o xilol. Isto é feito porque é necessário introduzir o material na parafina para fazer os cortes, e a parafina não se mistura com a água, o processo é necessário, já que toda a água deve ser retirada do material, antes de ser incluído em parafina.

Embebidos em parafina: material é colocado em parafina para a realização do corte histológico.

Hematoxilina e eosina: O material cortado é corado com hematoxilina e depois é passado na eosina para diferenciar as estruturas do tecido. Hematoxilina é um sal neutro e é considerado um corante básico e tem o potencial de corar o núcleo de modo basófilo (de cor azul a roxo) e foi utilizado para colorir os componentes ácidos dos tecidos. A eosina (basófila) é um corante ácido e cora os elementos básicos da proteína do citoplasma de maneira acidófila. A eosina é um corante sintético e produz uma coloração vermelha.

Neste processo de coloração os ácidos nucléicos presentes no núcleo são corados pela hematoxilina, dando ao núcleo um tom azul, já a eosina é atraída pelos elementos básicos da proteína do citoplasma das células, corando-o de cor vermelha.

#### 3.21 Procedimento experimental Amostra 3

# Ensaio in vitro

O procedimento experimental para o ensaio *in vitro* utilizado para esta amostra, foi o mesmo utilizado no item 3.19 que é o procedimento experimental da Amostra 1.

Foram utilizadas células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo e semeadas nos *scaffolds* por 13 dias (Tabela 3.6).
Grupos	Material	Tempo de seguimento (dias)	Análises	Número de amostras
Experimental	Amostra 3	13	Lupa, MEV	3
Controle	Placa de cultura	13	Lupa, MEV	3
		]	Fotal de amostras	6

**Tabela 3.6** - Descrição dos grupos e análises realizadas na Amostra 3 - teste *in vitro*.

#### 3.22 Procedimento experimental Amostra 4

#### Ensaio in vitro

Foram utilizadas células VERO, uma linhagem celular do tipo fibroblastos recomendadas para testes de citotoxicidade, obtidas junto ao Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – SP (ISO-10993, 1993).

As células foram cultivadas em meio Ham F10 (Nutricel) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Gibco) a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> na atmosfera.

#### Métodos:

Os extratos dos materiais analisados foram obtidos através da incubação destes em placa de cultura de 24 poços na proporção de 0,2g de material por ml de meio DMEM com 10% SFB a 37°C por 48 horas sem agitação. Decorrido o período de incubação o meio foi utilizado no cultivo das células Vero, permitindo desta forma, avaliar a possível liberação de substâncias tóxicas no meio de cultura. O teste de citotoxicidade indireta e extração dos extratos foram feitas de acordo com as recomendações internacionais [ISO-10993-5, 1992] [ISO-10993, 1997] [NBR-ISO10993, 1999] [SJOGREN,G.; et. al; 2000].

A citotoxicidade direta é a medida obtida pelo contato direto do material com a cultura de células [ESTACIA, P.; et.al.; 2004]. Para avaliação da citotoxicidade direta foi adotado o teste de viabilidade celular pelo método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium). Foi inoculada uma suspensão de células Vero na concentração de 3x10<sup>6</sup> células por mililitro de meio de cultura em placa de cultura de 96 poços (*Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, USA*). Após a inoculação celular os materiais foram adicionados nos poços (n=5) e mantidos em contato direto com as células por 24 horas a 37°C [ISO-10993-5, 1992] [ISO-10993, 1997] [NBR-ISO10993, 1999] [SJOGREN, G.; et. al.; 2000].

Foi utilizada como controle positivo de toxidade (CPT) uma solução de meio Ham F10 com 10% SFB e 10% de fenol e como controle negativo de toxidade (CNT) o extrato de poliestireno (placa de cultura).

Decorrido o período de incubação o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados com 200 µl de solução tampão fosfato salino (*phosphate buffered saline*, PBS). Após este procedimento foi adicionado 200 µl de meio Ham F10 com 10mM de tampão Hepes e 50 µl MTT Sigma (5 µg por mililitro de PBS) e a placa de cultura foi incubada no escuro por 4 horas a 37°C. Após o período de incubação o meio com o MTT foi substituído por 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) e a placa foi mantida em agitação por 30 minutos.

Foi feita leitura da absorbância em leitor de microplacas (microplate reader DNM 9602, *Beijing Perlong New Technology Co, Ltd.*) em comprimento de onda de 540 nm. Foram utilizados como controle de reação poços onde não houve o cultivo de células (branco), nos quais foram adicionados os mesmos reagentes descritos anteriormente.

#### Avaliação da citotoxidade Indireta

O ensaio de citotoxicidade indireta as células entram em contato apenas com elementos solúveis que podem ser eliminados pelo material [ESTACIA, P.; et.al.; 2004]. Para o teste de viabilidade celular pelo método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium) foi inoculada uma suspensão celular na concentração de 3x10<sup>6</sup> células/ml em placa de cultura de 96 poços (*Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, USA*) e cultivada por 24

horas a 37°C.

Após o período de incubação de 24 horas, o meio de cultura contido na placa foi substituído pelo extrato dos materiais. Como controle positivo de toxidade (CPT) foi utilizada uma solução de meio DMEM com 10% SFB e 10% de Fenol e como controle negativo de toxidade (CNT) foi utilizado o extrato de poliestireno.

Decorrido o período de cultivo de 24 horas o extrato dos materiais foi retirado e os poços foram lavados com 200µl de *phosphater buffered saline* (PBS). Após este procedimento foi adicionado 200µl de meio DMEM com 10mM de tampão Hepes e 50µl MTT Sigma (5µg/ml em PBS) e a placa de cultura foi incubada no escuro por 4 horas a 37°C. Decorrido este período o meio com MTT foi substituído por 200µl de DMSO e a placa foi mantida em agitação por 30 minutos.

Foi feita leitura da absorbância em leitor de microplacas em comprimento de onda de 540nm. Foram utilizados como controle de reação poços onde não houve o cultivo de células (branco), nos quais foram adicionados os mesmos reagentes descritos anteriormente.

#### Ensaio in vivo

Foram obtidas células tronco mesenquimais (MSCs) derivadas de tecido adiposo humano (MSC/TA) doado por pacientes submetidos à cirurgia plástica no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), os quais assinaram o "termo de consentimento livre e esclarecido" e concordaram com a doação. Os procedimentos adotados foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa da UNICAMP (processo CEP n° 0226.0146.000-08).

O tecido adiposo obtido por lipoaspiração foi lavado com solução tampão fosfato salino (*phosphate buffered saline, PBS*) para remover o tecido conjuntivo e as hemácias presentes. Foi adicionado a cada 10g de tecido adiposo depositado em tubo falcon de 50 ml o tampão de digestão composto por 20 mg de colagenase tipo 1A, 200 mg de albumina sérica bovina (do inglês: *bovine serum albumin*, BSA), 20ml de meio DMEM com baixa concentração de glicose (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium Low Glucose, DMEM-LG*) e 10µl de gentamicina. Em seguida o tubo foi mantido em banho-maria à 37°C por 30 minutos. Após a digestão completa do tecido adiposo, a reação foi interrompida com 10 ml de soro fetal bovino (SFB) e imediatamente centrifugada por 15 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o pellet re-suspenso

em 10 ml de DMEM-LG com 10% de SFB. Após 24 horas de cultivo, o meio de cultura foi trocado a cada 3 dias até as células aderidas ao plástico atingirem a confluência de 70 a 80% da superfície da garrafa de cultura, quando eram submetidas a subcultura por meio da adição de uma solução de tripsina a 0,05% e 1mM de ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) e as células expandidas até a 4ª passagem.

#### Descrição dos grupos e análises que foram realizadas nos testes in vivo

Os grupos experimentais, os número de animais operados, e as análises realizadas para o testes sem células e com células tronco mesenquimais, encontram-se descritos na Tabela 3.7. Os *scaffolds* foram esterilizados por calor úmido em autoclave.

Grupos	Materiais	Tempo de seguimento (dias)	Análises	Número de animais/ amostras obtidas
Experimental	Amostra 4 sem células	7, 14, 21 e 30	Lupa, RX, MEV	28 / (56)
Controle	Defeito vazio	7, 14, 21 e 30	Lupa, RX, MEV	28 / (56)
Experimental	Amostra 4 com células MSCs	7, 14, 21 e 30	Lupa, RX, MEV	28 / (56)
Controle	Defeito com células MSCs	7, 14, 21 e 30	Lupa, RX, MEV	28 / (56)
		Total de a	animais/ amostras	112 / (224)

**Tabela 3.7** - Descrição dos grupos e análises realizadas na Amostra 4 (teste *in vivo*) sem células e com células tronco mesenquimais.

#### Animais

Foram utilizados 112 ratos machos brancos da linhagem Wistar fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP, com 12 semanas de idade e peso aproximado de 330 gramas.

#### Procedimento cirúrgico

Em decúbito dorsal, com os membros posteriores em abdução foi feita uma incisão de aproximadamente um centímetro na região proximal da tíbia para a exposição do platô medial da tíbia (Figura 3.8 A-B). Em seguida foi provocado um defeito com auxílio de furadeira de baixa rotação e broca helicoidal de 3,2 mm de diâmetro com limitador de 1 mm de profundidade, foi produzido um defeito ósseo crítico (Figura 3.8 C-D).

No grupo experimental foram implantados nos defeitos ósseos críticos a Amostra 4 demostrado na Figura 3.8 E. Já no grupo controle (GC) os defeitos permaneceram vazios. Após o implante a pele foi suturada com pontos separados (Figura 3.8 F).



**Figura 3.8 -** Procedimento cirúrgico (Amostra 4): **A**) Incisão de aproximadamente 1 cm; **B**) Exposição do platô medial da tíbia; **C**) Perfuração com furadeira de baixa rotação; **D**) Defeito ósseo de tamanho crítico; **E**) Defeito ósseo com a Amostra 4 implantada; **F**) Sutura da pele com pontos separados.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados segundo normas propostas pelo Comitê Brasileiro de Proteção Animal e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia (IB) da UNICAMP, protocolo nº 1768-1.

Os animais foram anestesiados via endovenosa caudal com tiopental sódico na concentração de 25mg/100g por peso do animal. Foi feita a tricotomia e assepsia com solução alcoólica de iodo dos membros posteriores direito e esquerdo.

Durante as primeiras 48 horas foi administrada aos animais uma solução analgésica de paracetamol<sup>®</sup> 25mg/kg/l diluída em água. Os animais foram mantidos em gaiolas convencionais com maravalha, água e ração industrializada, onde foi permitido apoio imediato dos membros posteriores. As gaiolas foram acondicionadas em área restrita a animais em experimentação no Biotério do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE) da FCM-UNICAMP.

#### Sacrifício

Após o período de seguimento os animais foram pesados e submetidos à eutanásia por meio do aprofundamento do anestésico tiopental sódico, via endovenosa caudal. Para retirada das tíbias foram desarticuladas as regiões proximal e distal com auxílio de bisturi.

Todos os espécimes obtidos (n= 224) foram colocados em solução fisiológica em temperatura ambiente e imediatamente observados e fotografados em estereomicroscópio Leica MZ 7.5 com objetivas de 10x.

#### Microscopia eletrônica de varredura para análise das células MSCs aderidas

As imagens das células aderidas nos *scaffolds* (Amostra 4) foram obtidas utilizando o microscópio eletrônico de varredura da marca Carls Zeiss modelo EVO MA15 do DEMA-FEM-UNICAMP.

Para a visualização das células aderidas ao *scaffold* foi necessário aplicar a técnica de fixação celular nas amostras. Para a fixação celular foi utilizado glutaraldeído, e após 2h elas foram lavadas 3X com PBS gelado por um período de 15 minutos cada lavagem. Após as amostras terem sido lavadas os poços da placa de cultura foram preenchidos com uma solução de tetróxido de ósmio a 1%, a placa de cultura foi embrulhada com folhas de alumíno e deixada na

geladeira por 15 minutos. A solução de ósmio foi retirada e as amostras foram lavadas 3X utilizando água purificada (osmose reversa) por um período de 10 minutos cada lavagem.

Depois da etapa de fixação foi feita a desidratação em etanol seguindo alguns estágios: i) Solução 50% por 15 minutos; ii) Solução 60% por 15 minutos; iii) Solução 70% por 15 minutos; iv) Solução 80% por 15 minutos; v) Solução 90% por 15 minutos; vi) Solução 95% por 15 minutos; e vii) Etanol 100% por 15 minutos. As amostras foram secas e metalizadas.

#### Avaliação macroscópica por estereomicroscópio (lupa)

Logo após o sacrifício todas as tíbias obtidas foram observados e fotografadas com objetivas de 8x e 10x em estereomicroscópio Leica. As imagens obtidas foram processadas em programa específico para aquisição de imagens (*Software Auto-Montage Pro Syncroscopy*).

Os parâmetros considerados para avaliação macroscópica foram aspectos da coloração dos tecidos adjacentes ao defeito ósseo, aspecto superficial dos implantes tais como: posicionamento, possíveis sinais de liberação de partículas e adesão de tecido neoformado.

#### Análise radiográfica dos defeitos ósseos

As imagens dos defeitos ósseos foram obtidas por meio de equipamento de radiografia Hamamatsu X-Ray Microfocus L-918-0 disponível no Departamento de Física da Matéria Condensada - Grupo de Cristalografia Aplicada e raios X (GCARX), localizado no Instituto de Física "Gleb Wataghin" da UNICAMP. As tíbias foram posicionadas a uma distância de 5 cm da fonte de emissão de raios X. Foi adotada a seguinte resolução para obtenção das imagens: energia do feixe de 40kV, corrente de 40µA por tempo de exposição de 12s.

### **4 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

#### 4.1 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

Com o NTA foi possível quantificar o tamanho dos aglomerados de nanopartículas presentes no gel de hidroxiapatita. Optou-se em verificar o tamanho das partículas antes do tratamento térmico, pois altas temperaturas interferem na morfologia das partículas.

A viscosidade absoluta da amostra analisada não permitiu as partículas terem movimento Browniano, por este motivo foi necessário realizar uma diluição de 500 vezes em água pura (18M Ohm). Os resultados foram apresentados na Figura 4.1.



**Figura 4.1 - (a)** Gráfico com a distribuição do tamanho das partículas presentes no gel. (b) Partículas dispersas (quadro representa  $100x80 \ \mu m$ ).

Após a diluição o sistema foi polidisperso e aparentemente a estrutura do gel foi desfeita, porém as partículas acabaram por se aglomerar. O resultado obtido do tamanho dos aglomerados das partículas foi de aproximadamente 150 nm.

#### 4.2 Fluorescência de raios X (FRX)

Com a fluorescência de raios X foi possível identificar e semiquantificar os elementos que contaminam as amostras durante o processo, alguns podem estar presentes na água e outros nos próprios reagentes. Os resultados obtidos estão na Tabela 4.1.

Pequenas quantidades de impurezas como o cloro (Cl), ferro (Fe) e sódio (Na) estão presentes no ácido fosfórico. Na sacarose foram encontradas pequenas quantidades de impurezas como cloro (Cl), ferro (Fe) e enxofre (S). O nitrato de cálcio tetrahidratado apresentou pequenas quantidades de impurezas como: cloro (Cl), bário (Ba), magnésio (Mg) e enxofre (S).

A água segundo dados da SANASA – Etas III e IV – Barão Geraldo possui um grande volume de impurezas [SANASA, 2012], por isso não será possível citá-las aqui, porém a água utilizada no laboratório passa pelo equipamento de osmose reversa retirando quase por completo os sais e impurezas presentes na água. Portanto, é possível deduzir que as impurezas presentes no material e que não estão contidas nos reagentes vieram dos resquícios de impurezas presentes na água.

T	Hidrox	iapatita	Beta-Fosfato Tricálcico		Norma ASTM
Impurezas	Comercial	Sintetizada	Comercial	Sintetizada	F1185-03
K	0,049	ald	0,256	ald	Х
Na	0,011	0,018	0,171	0,011	Х
Sr	0,007	0,028	0,012	0,018	Х
S	0,021	0,007	0,012	0,006	Х
Ni	0,006	ald	0,005	0,003	Х
Fe	ald	0,004	ald	ald	Х
Cl	ald	0,028	ald	ald	Х
Al	ald	ald	ald	0,005	Х
Zr	ald	ald	ald	0,006	Х
As	ald	ald	ald	ald	0,0003
Cd	ald	ald	ald	ald	0,0005
Hg	ald	ald	ald	ald	0,0005
Pb	ald	ald	ald	ald	0,0030

**Tabela 4.1** - Análise semiquantitativa das amostras sintetizada e comercial (Fluidinova). Valores referentes à (%) em massa. A precisão do equipamento é de até  $10^{-4}$ .

ald: abaixo do limite de detecção.

Os resultados de fluorescência demonstraram que nenhum material aplicado neste trabalho apresentou elementos químicos considerados perigosos para aplicação como biomaterial, segundo a norma ASTM F1185-03.

Quando se compara a hidroxiapatita comercial com a hidroxiapatita sintetizada pode-se dizer que ambos apresentaram 5 elementos de contaminação. O material comercial apresentou o K, Na, Sr, S e Ni, já a hidroxiapatita sintetizada apresentou o Na, Sr, S, Fe e Cl. A HA comercial apresentou valores superiores de K, S e Ni, já a HA sintetizada apresentou valores superiores de Sr, Fe, e Cl, porém Cl está presente nos três reagentes e Fe está presente na sacarose e no ácido fosfórico.

O fosfato tricálcico comercial foi comparado com o fosfato tricálcico sintetizado e podemos dizer que o TCP comercial apresentou 5 elementos de contaminação e o TCP sintetizado apresentou 6 elementos de contaminação. O TCP comercial apresentou nas análises K, Na, Sr, S e Ni, porém os valores de K e Na foram altos quando comparados ao TCP sintetizado, além disso, o S e o Ni também apresentaram valores maiores que o TCP sintetizado, porém em quantidades mínimas. O TCP sintetizado apresentou em suas análises Na, Sr, S, Ni, Al e Zr. Dos elementos contidos na amostra apenas três (Sr, Al e Zr) foram em quantidades superiores ao TCP comercial, porém em quantidades mínimas.

Em geral pode-se dizer que, em quantidade de elementos contaminantes para aplicação como biomateriais, todos os materiais apresentaram resultados dentro da norma.

#### 4.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A presença da banda em 630 cm<sup>-1</sup> e em 3570 cm<sup>-1</sup> é relacionada com a presença de hidroxiapatita [GAN, L., et al., 2004]. Banda presente no intervalo de 1440-1400 cm<sup>-1</sup> é indício da presença da vibração do grupo  $(CO_3)^{2^-}$ , que caracteriza hidroxiapatita carbonatada. Na rede apatita existem dois tipos de substituições para íon de  $(CO_3)^{2^-}$ , a tipo A que substitui íons  $(OH)^-$  e a tipo B que substitui o íon  $(PO_4)^{3^-}$  [LEGEROS, R.Z., et al., 2002].

A Tabela 4.2 mostra as frequências de absorção no infravermelho características dos fosfatos de cálcio, obtidas na literatura e no experimento [LEGEROS, R.Z., et al., 2002] [GAN, L., et al., 2004] [LARANJEIRA, M.S.; et al.; 2010].

Modos de vibração (estiramento)	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	472, 497, 503, 560, 603, 800, 824, 875, 960-1100
$CO_{3}^{2-}$	730, 1188, 1370, 1400-1450
OH -	630, 700, 1640, 3200-3600
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1370
$\mathbf{P} = \mathbf{O}$	1212
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	2000-2500

Tabela 4.2 - Frequências de absorção no infravermelho encontrados nos fosfatos de cálcio.

#### FTIR - Gel HA sem sacarose

A Figura 4.2 mostrou as bandas de absosorção do gel de hidroxiapatita onde foi possível encontrar os grupos  $(PO_4)^{3^-}$  e  $(OH)^-$  que estão presentes na hidroxiapatita e na fase mineral do tecido ósseo. No gel também foram encontradas as bandas de absorção dos íons de  $(NO_3)^-$  e  $(HPO_4)^{2^-}$  que estão relacionados com a utilização de nitrato de cálcio e ácido fosfórico respectivamente para a síntese do gel. A banda de absorção  $(OH)^-$  também está relacionada ao gel, pois o processo de síntese envolve água H<sub>2</sub>O, além da hidroxiapatita também conter íons de hidroxila em sua estrutura.



Figura 4.2 - FTIR do gel da hidroxiapatita sem sacarose.

O espectro de FTIR presente na Figura 4.2 revela as bandas de fosfato  $(PO_4)^{3-}$  em 497, 824, 1002 cm<sup>-1</sup>. A grande banda de absorção em 3400 cm<sup>-1</sup> representa a água (hidroxila - OH<sup>-</sup>) contida na amostra, e além desta banda foi detectada outra banda de hidroxila em 1640 cm<sup>-1</sup>. A banda de absorção do grupo P=O está registrada em 1212 cm<sup>-1</sup>. A banda de grupamento hidrogenofosfato  $(HPO_4)^{2-}$  correspondem à posição entre 2376 cm<sup>-1</sup>. A banda de absorção do íon nitrato  $(NO_3^{-1})$  está presente na posição 1370 cm<sup>-1</sup>.

#### FTIR – Nanopartículas comerciais e sintetizadas

O mineral fósforo não é encontrado de forma livre na natureza, ele é encontrado de forma estável como íon ortofosfato  $(PO_4)^{3-}$ .

Os ortofosfatos de cálcio são sais de ácido fosfórico tribásico H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (reagente utilizado na síntese de HA e  $\beta$ -TCP), que podem formar compostos que contém os íons (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sup>-</sup>, (HPO<sub>4</sub>)<sup>2-</sup> ou (PO<sub>4</sub>)<sup>3-</sup>. Os fosfatos que contém os íons (HPO<sub>4</sub>)<sup>2-</sup> e (PO<sub>4</sub>)<sup>3-</sup>, geralmente constituem a fase mineral de fosfatos de cálcio biologicamente importantes como, por exemplo, os ossos, os dentes e também em várias calcificações patológicas, enquanto que aqueles apenas com íons (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sup>-</sup> normalmente não são encontrados em condições fisiológicas, mas são comercialmente importantes como em componentes de fertilizantes [OLIVEIRA, S.V.; et al.; 2009].

A presença dos grupamentos  $(PO_4)^{3-}$  e  $(OH)^{-}$  foi confirmado por espectros obtidos por FTIR (Figura 4.3) em todos os materiais, tanto os comerciais quanto os sintetizados no LABIOMEC-DEMA-FEM-UNICAMP.

O espectro de FTIR revelou as bandas de fosfato  $(PO_4)^{3-}$  em 472, 503, 560, 603, 800, 875, 962, 1034 e 1089 cm<sup>-1</sup>, e as bandas de hidroxila  $(OH)^{-}$  foram detectadas em 3570 cm<sup>-1</sup> em todas as amostras e em 700 cm<sup>-1</sup> nas amostras  $\beta$ -TCP comercial, HA comercial e HA sintetizada (Figura 4.3). As grandes bandas presentes em 3200 a 3600 cm<sup>-1</sup> são de água (H<sub>2</sub>O) adsorvida sobre os materiais. As bandas do grupo carbonato  $(CO_3)^{2-}$  estão registradas em 1450, 1370, 1188 e 730 cm<sup>-1</sup>. As bandas de grupamento hidrogenofosfato  $(HPO_4)^{2-}$  correspondem à posição entre 2500 e 2000 cm<sup>-1</sup>.

As amostras apresentaram picos referentes ao grupo carbonato, fato que se deve a uma possível adsorção de íons  $(CO_3)^{2-}$  a partir da atmosfera. A tendência é que o grupo  $(CO_3)^{2-}$ 

desapareça após a sinterização, por isso, acredita-se que esses grupos tem origem a partir do CO<sub>2</sub> presente no ar atmosférico [LARANJEIRA, M.S.; et al.; 2010].



**Figura 4.3 –** FTIR das amostras HA e  $\beta$ -TCP comerciais e HA e  $\beta$ -TCP sintetizadas no laboratório (LABIOMEC).

## 4.4 Microscopia eletrônica de transmissão e espectroscopia por perda de energia de elétrons (MET e EELS)

A Figura 4.4 mostrou os resultados obtidos por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espectroscopia por perda de energia de elétrons (EELS), onde é possível visualizar a distribuição de vários nanocristais com aproximadamente 50 nm de comprimento e 12 nm de largura, como é mostrado no detalhe.

Segundo a literatura, as bordas  $L_3$  e  $L_2$  do cálcio obtidas por EELS são representadas na Figura 4.4 e indicam a perda de energia na região entre 340 a 360 eV referentes a amostra gel HA. As bordas  $L_{3,2}$  obtidas são características de fosfatos de cálcio (Ca/P) [SZ-CHIAN, L.; et al.; 2004].



**Figura 4.4** – Análise por MET e EELS do gel de HA sem sacarose. Detalhe MET: Tamanho de uma nanopartícula. Detalhe EELS: Detecção de componente elementar da amostra.

A técnica EELS é indicada para medir a perda de energia abaixo de 2 keV e permite analisar as bordas L de cálcio. Seguindo regras de seleção de dipolos o espectro das bordas L<sub>3</sub> e L<sub>2</sub>, onde L<sub>3</sub> representa a transição do nível eletrônico  $2p^{3/2}$  para o nível  $3d^{3/2} 3d^{5/2}$  e L<sub>2</sub> representa a transição eletrônica do nível  $2p^{1/2}$  para o nível  $3d^{3/2}$  [SZ-CHIAN, L.; et al.; 2004]. A contagem de excitação das bordas L<sub>3</sub> e L<sub>2</sub> com variação de perda de energia de 340-360 eV [SZ-CHIAN, L.; et al.; 2004] foi demostrado na Figura 4.4. Segundo o atlas EELS [AHN, C.C.; et al.; 1983] o elemento cálcio (Ca) possui a borda L<sub>2,3</sub> e tem perda de energia em 346,4 eV.

A Figura 4.5 mostra a análise do gel HA por microscopia eletrônica de transmissão com um aumento maior do que a da Figura 4.4 que foi utilizada também para análise EELS. A alta resolução da imagem permitiu realizar um aumento maior e assim verificar a presença de nanocristais com aproximadamente 20 nm (Figura 4.5a) e nanopartículas com aproximadamente 5 nm (Figura 4.5b). Com esta análise foi possível quantificar aproximadamente o tamanho inicial das partículas antes de ser realizado o tratamento térmico de calcinação, que modifica o tamanho das partículas.



**Figura 4.5** – Análise por MET das nanopartículas presentes no gel de HA sem sacarose. (a) Nanocristal de 20 nm. (b) Nanopartículas aparentemente esféricas com ~ 5 nm.

A Figura 4.6 mostrou os resultados obtidos por MET e EELS da amostra gel HA com sacarose onde foi possível verificar a presença de muitos nanocristais em forma de agulhas que é a morfologia característica dos fosfatos de cálcio. Também foi possível verificar a presença de nanopartículas de aproximadamente 5 nm, e deduzimos que este é o tamanho inicial das nanopartículas presentes no gel no início do processo e conforme a solução se torna mais viscosa as partículas que não estão isoladas pelo gel se juntam formando nanocristais maiores. É

importante salientar que a sacarose introduzida no processo isolou as partículas, e desta forma acabou evitando que elas se agrupassem.

A análise EELS comprovou a presença de cálcio nas amostras por conter as bandas  $L_3$  e  $L_2$  de perda de energia na região entre 340 e 360 eV [AHN, C.C.; et al.; 1983].



**Figura 4.6** - Análise MET e EELS da amostra gel de HA com sacarose. Detalhe MET: nanopartículas com ~ 10 nm de espessura e esferas com ~ 5 nm de diâmetro. Detalhe EELS: bordas  $L_3$  e  $L_2$  características do cálcio.

Na Figura 4.7 foram apresentados os resultados de MET da amostra gel TCP com sacarose e foi possível verificar que as nanopartículas estão muito concentradas (Figura 4.7a), porém estão isoladas. Comparando o tamanho das partículas com as escalas presentes na figura, foi possível verificar que o tamanho aproximado das partículas (ou aglomerados) é de 50 nm. Na Figura 4.7b foram apresentadas nanopartículas envolvidas por uma espécie de filme fino de sacarose. A sacarose foi introduzida no gel de TCP durante a síntese das partículas. Com as imagens da Figura 4.7b foi possível fazer uma estimativa da espessura das agulhas formadas (de 20 a 45 nm).



**Figura 4.7** - Análise MET da amostra gel de TCP com sacarose. (a) Região com muitas nanopartículas com morfologia esférica. (b) Região com nanopartículas envolvidas pelo filme de sacarose.

#### 4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Na Figura 4.8 foram apresentadas as hidroxiapatitas utilizadas (comercial e sintetizada). Na Figura 4.8a foram apresentadas as nanopartículas HA comerciais e no detalhe é possível verificar a morfologia esférica. Na Figura 4.8b foram apresentadas as nanopartículas HA sintetizadas e no detalhe é possível verificar que as partículas têm aproximadamente 82 nm.



**Figura 4.8 - (a)** Nanopartículas esféricas de hidroxiapatita comercial. **(b)** Hidroxiapatita nanoparticulada sintentizada no laboratório.

Na Figura 4.9 foram apresentadas as amostras de fosfatos tricálcico utilizadas (comercial e sintetizada). Na Figura 4.9a foram apresentadas as nanopartículas  $\beta$ -TCP comerciais e no detalhe foi possível verificar a morfologia de agulhas que é a morfologia característica do fosfato tricálcico. Na Figura 4.9b foram apresentadas as nanopartículas  $\beta$ -TCP sintetizadas, onde é possível ver também que elas estão muito aglomeradas e no detalhe é possível verificar que as partículas têm aproximadamente 80 nm.



**Figura 4.9 - (a):** Beta-fosfato tricálcico comercial em forma de nanoagulhas. (b) Beta-fosfato tricálcico sintentizada no laboratório.

Na Figura 4.10 (a) e (b) foi possível verificar as imagens do gel de hidroxiapatita captadas no microscópio eletrônico de varredura ambiental (ESEM) pertencente ao CEMUP – Centro de Materiais da Universidade do Porto. Nestas amostras não foram feitos recobrimentos por plasma com o objetivo de não mascarar o tamanho real das partículas. Na Figura 4.10b foi possível verificar que o gel forma uma camada que separa e recobre as nanopartículas e de acordo com a imagem essas nanopartículas são esféricas. Devido à morfologia do gel a visualização das partículas não foi perfeita, mas por comparação com a escala foi fácil encontrar partículas nesta amostra com o tamanho aproximado de 100 nm. Portanto é possível afirmar que todos os materiais utilizados são nanoparticulados.



**Figura 4.10-** (a) Morfologia do gel de hidroxiapatita antes de calcinar e sem recobrimento por plasma. (b) Partículas dispersas no gel de HA.

#### Nanocompósitos – testes iniciais

Os testes iniciais foram realizados no doutorado sanduíche sob a orientação do professor Dr. Fernando Jorge Monteiro da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto e Instituto de Engenharia Biomédica – Portugal e receberam o nome de Amostra W, Amostra X, Amostra Y e Amostra Z e as descrições delas estão na Tabela 3.1 presente no Capítulo 3.

A Amostra W (Figura 4.11) apresentou uma boa estrutura, com paredes bem definidas, com poros interconectados, porém devido a este fato o *scaffold* se tornou mais frágil do que a Amostra X (Figura 4.12) com poros menores e também mais frágil que a Amostra Y e Amostra Z (Figura 4.13 e 4.14). Visualizando a morfologia das superfícies das Amostras W, X e Y foi possível afirmar que elas são nanoestruturadas.

#### Amostra W - Esponja calcinada a 725°C

A Figura 4.11(a) apresentou uma vista geral da estrutura da Amostra W e foi possível verificar que as paredes são muito finas, e na imagem (b) foi mostrado em detalhes os poros (entre 100 e 600  $\mu$ m), e o tamanho visualizado foi próximo ao adequado para o crescimento celular, porém sua estrutura por ser muito fina pode dificultar a adesão e proliferação celular.

Na Figura 4.11(c) foi apresentada uma superfície rugosa e com alguns poros aparentes que podem ajudar na adesão celular, pois facilita à fixação dos elementos (microtúbulos, microfilamentos, filamentos intermediários e filamentos de actina) do citoesqueleto celular. A Figura 4.11(d) apresentou em detalhes as partículas aglomeradas presentes na parede da esponja, onde foi possível verificar as diferenças morfológicas dos dois tipos de partículas presentes (esferas HA e agulhas TCP).



**Figura 4.11 –** Amostra W. (a) Estrutura macro do *scaffold*. (b) Detalhe dos poros. (c) Superfície do *scaffold*. (d) Detalhe da parede do *scaffold*.

#### Amostra X - Esponja calcinada a 725°C

A Figura 4.12a apresentou uma vista geral da estrutura da (Amostra X) que é uma esponja com as paredes mais espessas que da amostra presente na figura anterior (Figura 4.11). A Figura 4.12b mostrou em detalhes os poros em forma circular e com poros por volta de 100 a 400 micrômetros que são considerados valores adequados para o crescimento e proliferação celular de tecido ósseo, porém também estavam presentes alguns poros com tamanhos de 600µm. A estrutura porosa bem definida apresentou uma superfície rugosa (Figura 4.12c), e com microporos. A Figura 4.12d apresentou a estrutura interna do *scaffold*, e através da fratura foi possível ver as agulhas de beta-TCP recobertas com o filme de hidroxiapatita.



Figura 4.12 – Amostra X. (a) Estrutura macro do *scaffold*. (b) Detalhe dos poros. (c) Superfície do *scaffold*. (d) Fratura da parede do *scaffold*.

#### Amostra Y - Pastilha calcinada a 725°C

A Figura 4.13a apresentou poros entre 100 e 800 micrômetros (Amostra Y), tamanhos toleráveis para o crescimento celular. Na Figura 4.13b a estrutura porosa irregular apresentou uma superfície rugosa e na Figura 4.13c foi possível verificar a existência de vários microporos que são indicados para a adesão celular. Nesta imagem também foi possível verificar a diferença entre a morfologia dos dois materiais, onde o TCP se aglomerou em pequenas partículas já não estando mais em forma de agulhas e a HA se juntou formando uma malha altamente porosa, que é uma característica já conhecida deste material.





Figura 4.13 – Amostra Y. (a) Porosidade. (b) Superfície. (c) Microestrutura.

#### Amostra Z - Pastilha sinterizada a 1330°C

A Figura 4.14a apresentou poros entre 100 e 500 micrômetros (Amostra Z), tamanho indicado para o crescimento celular. Os poros possuem um tamanho reduzido graças à temperatura de sinterização que diminui o volume da amostra e por consequência diminui o tamanho dos poros, este fenômeno é verificado quando comparado com as imagens da Figura 4.13.





**Figura 4.14 –** Amostra Z. (a) Porosidade. (b) Microestrutura – vista geral. (c) Microestrutura - detalhes.

A estrutura porosa irregular da pastilha sinterizada a 1330°C (Figura 4.14) apresentou uma superfície rugosa (imagem b), e com muitas arestas, porém não apresentou cantos vivos acentuados (imagem c). A Figura 4.14c apresentou uma superfície com microporos e arestas com ângulos obtusos.

Materiais com cantos arredondados são bons para a adesão celular, pois facilitam a movimentação e a fixação das células, além dos microporos que também são bons para a fixação celular.

#### Scaffolds - testes finais

A Tabela 3.1 do Capítulo 3 apresentou a nomenclatura das amostras dos testes iniciais e finais. Os parâmetros para a produção das amostras utilizadas nos testes finais foram obtidos a partir dos resultados dos testes iniciais.

A Figura 4.15 é um resumo dos resultados das 4 amostras por microscopia eletrônica de varredura. Cada coluna representa um material e foi possível verificar que todas as Amostras apresentaram bons resultados.

A Figura 4.15 Amostra 1 (1) apresentou uma pastilha porosa feita com materiais sintetizados em laboratório. A imagem (2) mostrou a porosidade da amostra, porém não foi possível verificar se existe porosidade interna, por isso foi necessário aplicar a técnica de microtomografia. A imagem (3) apresentou a microestrutura da amostra e foi possível verificar a existência de microporos, além de a superfície apresentar formas arredondadas, que é adequada para a adesão celular [RODRIGUES, L.R., 2008]. A imagem (4) mostra as células aderidas no *scaffold*.

A Figura 4.15 Amostra 2 (1) mostrou a pastilha porosa feita com materiais comerciais. A imagem (2) mostrou a porosidade presente na superfície, porém assim como na Amostra 1 não foi possível verificar se existe porosidade interna, por isso foi necessário também realizar a microtomografia. A imagem (3) mostrou a microestrutura da amostra e foi possível verificar que a microporosidade da superfície é parecida com a da Amostra 1.



Figura 4.15 - MEV das Amostras 1, 2, 3 e 4. Linha 1, identificação visual de todas as amostras obtidas no estereoscópio (lupa). Linha 2 e 3 microestruturas de todas as amostras. Linha 4 Imagens dos ensaios *in vitro* das Amostras 1, 3 e 4. Linha 5 resultados do ensaio *in vivo* sem células tronco da Amostra 4.

A Figura 4.15 Amostra 3 (1) é uma esponja cerâmica feita com materiais sintetizados em laboratório. Na imagem (2) foram mostrados os poros do *scaffold*, e pela estrutura apresentada na imagem acredita-se que são interconectados, além de possuir um tamanho adequado para crescimento celular, porém a análise com microtomografia é aconselhável devido ao fato de não se ter certeza que seu interior possui a mesma estrutura. Na imagem (3) foi possível verificar que a superfície do *scaffold* possui microporos e a estrutura tem formas arredondadas com alguns cantos com arestas, porém estas arestas são originadas das fraturas das paredes, portanto em geral a amostra apresentou boas condições em sua superfície para adesão celular. A imagem (4) apresentou as células aderidas e acompanhando as curvas e a forma da parede da esponja.

A Figura 4.15 Amostra 4 (1) foi apresentada a esponja cerâmica feita com materiais comerciais. A imagem (2) mostrou os poros do *scaffold*, e apresentou poros com indícios de serem interconectados, além de possuir poros com tamanho adequado para crescimento celular, porém a análise com microtomografia é necessária para ser possível comprovar a interconectividade dos poros. Com a imagem (3) foi possível visualizar as formas arredondadas da microestrutura, além disso, também foi verificada a existência de microporos na superfície. A imagem (4) apresentou células quase tampando um poro. A imagem (5) apresentou o teste *in vivo*, e com este teste foi possível visualizar que ocorreu uma boa interação do *scaffold* com o tecido ósseo natural, além de manter os poros abertos facilitando o fluxo de sangue que tende a levar nutrientes para as células no interior do *scaffold*.

#### 4.6 Microtomografia de raios X (Micro-CT)

A Figura 4.16 apresentou imagens das pastilhas porosas Amostra 1 e Amostra 2. A Figura 4.16a apresentou a imagem 2D de uma fatia no interior da Amostra 1 obtida por um microtomógrafo e foi possível visualizar a grande porosidade presente na amostra. A Figura 4.16b apresentou a projeção 3D da Amostra 1 obtida por software do equipamento Micro-CT, e foi possível visualizar a morfologia dos poros, além de ter sido possível verificar também que eles são interconectados.

A Figura 4.16c apresentou a imagem 2D (Amostra 2) de uma fatia no interior da amostra obtida pelo microtomógrafo e foi possível visualizar a boa distribuição dos poros. A Figura 4.16d apresentou a projeção 3D da Amostra 2 e verificou-se que os poros são interconectados, porém em alguns pontos das extremidades foi observado somente uma pequena quantidade de poros, já próximo ao centro a quantidade foi excessiva. Esta diferença na distribuição de poros em diferentes regiões do *scaffold* interfere na resistência mecânica, além de dificultar o fluxo do sangue e a distribuição de proteínas, durante a recuperação do tecido ósseo danificado.





**Figura 4.16 -** Pastilhas porosas HA+TCP. (**a**) Microtomografia da Amostra 1. (**b**) Imagem 3D da Amostra 1. (**c**) Microtomografia da Amostra 2. (**d**) Imagem 3D da Amostra 2.

A Figura 4.17 apresentou imagens das esponjas cerâmicas (Amostra 3 e Amostra 4). A Figura 4.17a apresentou a imagem 2D de uma fatia no interior da Amostra 3 obtida por um

microtomógrafo e foi possível visualizar as finas paredes, além de constatar que os poros são todos interconectados.

A Figura 4.17b apresentou a projeção 3D da Amostra 3, e foi possível visualizar que o *scaffold* possui uma boa distribuição e interconexão dos poros. Essas características são indicadas quando se pretende obter um bom espalhamento e uma boa proliferação celular.



Figura 4.17 - Esponja HA+TCP. (a) Microtomografia da Amostra 3. (b) Imagem 3D da Amostra 3. (c) Microtomografia da Amostra 4. (d) Imagem 3D da Amostra 4.

A Figura 4.17c apresentou a imagem 2D de uma fatia do interior da Amostra 4 obtida por microtomografia, e foi possível visualizar que o *scaffold* possui uma boa distribuição dos poros, assim como apresentou a Amostra 3.

A Figura 4.17d apresentou a projeção 3D da Amostra 4 obtida por software do equipamento Micro-CT, onde foi possível visualizar a interconexão dos poros no interior da amostra, além de verificar que as paredes internas estão semelhantes as paredes externas visualizadas no MEV.

A Tabela 4.3 mostrou que a amostra mais porosa foi a Amostra 3 com 85% de porosidade e a menos porosa foi a Amostra 2 com 35% de porosidade. Esse valor abaixo dos 50% obtido pela Amostra 2, é consequência da presença reduzida de poros em algumas regiões do *scaffold*, e isso é comprovado na imagem 3D obtida por microtomografia. A diferença de porosidade verificada na estrutura do *scaffold* se deve ao processo de compactação. Um fator que comprova a menor quantidade de poros é a espessura da estrutura do *scaffold*, e que no caso da Amostra 2 foi de 168µm considerado o maior valor, já o menor valor foi obtido pela Amostra 3 com 45µm. O menor diâmetro médio distribuído por fatia foi obtido pela Amostra 3 com 216µm e o maior valor de diâmetro médio de poros foi obtido pela Amostra 2 com 937µm.

Amostras	Porosidade total (%)	Espessura da estrutura (µm)	Diâmetro dos poros (µm)
1	$57 \pm 3$	$99 \pm 7$	$567 \pm 90$
2	$35 \pm 2$	$168 \pm 16$	$937 \pm 185$
3	$85 \pm 1$	$45 \pm 1$	$216 \pm 13$
4	$77 \pm 1$	$140 \pm 6$	$399 \pm 36$

**Tabela 4.3** – Valores médios da porosidade, espessura da estrutura e diâmetro dos poros obtidos a partir dos resultados de microtomografia computadorizada.

A Figura 4.18 apresentou em cada fatia da seção transversal a porosidade de cada amostra e verificou-se que a Amostra 3 foi a que possuiu maior homogeneidade na distribuição de poros por fatia, e as amostras com menor homogeneidade foram as Amostras 1 e 2. Este fato ocorreu

por não ser possível controlar a distribuição dos poros de forma precisa quando se utiliza o processo de compactação para a produção dos *scaffolds*.

A boa distribuição da porosidade por fatia demonstrou a capacidade dos dois processos em obter bons resultados, e como todas as amostras apresentaram um desvio aceitável e com distribuição senoidal da porosidade por quase todo o volume das amostras é possível dizer que os processos adotados possuem boa reprodutibilidade, ou seja, o gráfico da Figura 4.18 indica que os *scaffolds* produzidos por essas técnicas tem a tendência de obter os mesmos resultados.



**Figura 4.18 -** Porosidade total das amostras com a indicação do desvio dos valores médios da porosidade apresentados na Tabela 4.3.

Os resultados apresentados na Figura 4.19 demonstraram que existe homogeneidade na distribuição dos poros em cada fatia, além disso, também existe uma variação pequena nos diâmetro dos poros (Amostra 3). A Amostra 4 apresentou resultados satisfatórios, mesmo não sendo tão bons quanto os resultados obtidos pela Amostra 3 que também é uma esponja cerâmica. As esponjas apresentaram maior porosidade e menor tamanho de poros do que as pastilhas porosas, porém são resultados já esperados, devido o processo de confecção das esponjas ser diferente do processo das pastilhas.

A Amostra 2 obteve a maior variação no tamanho dos poros por fatias, mas as imagens de microtomografia e MEV dos *scaffolds*, e os resultados *in vitro* e *in vivo* indicaram que apesar desta variação os resultados foram satisfatórios para a aplicação como suporte celular.



**Figura 4.19** – Distribuição dos diâmetros dos poros por fatias indicando o desvio de diâmetro médio dos poros apresentados na Tabela 4.3.

#### 4.7 Análise de densidade e porosidade por picnometria

O picnômetro foi utilizado para realizar medidas de porosidade e densidade das amostras dos testes iniciais. Como foi verificada nas imagens de MEV a Amostra W teve a maior porosidade com a medida aproximada de 94% (Tabela 4.4). Quando a amostra mais porosa (Amostra W) foi comparada com a amostra menos porosa que foi a pastilha sinterizada (Amostra Z) se verificou uma diferença na porosidade de aproximadamente 44%. Quando se comparou a

Amostra Y (pastilha porosa calcinada a 725°C) com a Amostra Z (pastilha sinterizada a 1330°C) foi constatado uma diminuição de 11% na porosidade da amostra sinterizada.

A melhor opção entre as esponjas foi a Amostra X que teve a porosidade um pouco menor que a Amostra W e por isso apresentou paredes mais espessas criando uma superfície mais adequada para a adesão e proliferação celular, além de melhorar a resistência mecânica do *scaffold*.

Amostras	Densidade (g/cc)*	Porosidade (%)
Amostra W	$1,542 \pm 0,008$	$93,69 \pm 0,04$
Amostra X	$1,317 \pm 0,004$	$81,99 \pm 0,07$
Amostra Y	$2,535 \pm 0,038$	$61,16 \pm 0,71$
Amostra Z	$1,715 \pm 0,002$	$49,66 \pm 0,05$

**Tabela 4.4** - Valores médios de densidade e porosidade obtidos a partir de três medições consecutivas realizadas por picnometria nas amostras dos testes iniciais.

\*desvio padrão em relação ao volume

Com o picnômetro foi possível verificar que a densidade média dos *scaffolds* em forma de pastilha porosa obtidas com os testes finais e apresentadas na Tabela 4.5 (Amostra 1 e Amostra 2), foram quase idênticas, ou seja, a quantidade de materiais adicionados na câmara de compactação e a forma como foram compactados geraram esta precisão nos resultados.

**Tabela 4.5** - Valores médios de densidade obtidos a partir de três medições consecutivas realizadas por picnometria nas amostras dos testes finais.

Amostras	Densidade (g/cc)*
1	$2{,}588 \pm 0{,}002$
2	$2,\!589\pm0,\!003$
3	$2,371 \pm 0,003$
4	$2,\!169\pm0,\!004$

\*desvio padrão em relação ao volume

As Amostras 3 e 4 (esponjas) apresentaram valores de densidade próximos (Tabela 4.5), mas não tão próximos como os valores obtidos pelas pastilhas, isso se deve ao fato das esponjas poliméricas serem de origem industrial e possuírem uma estrutura porosa variável de lote para lote, além disso, existe outro agravante, que é o fato das esponjas terem uma área superficial muito grande, e com isso acabam por dificultar a dedução exata da quantidade de material necessária para a formação das paredes estruturais com a mesma espessura em toda a amostra. Porém, considerando esses fatores, as diferenças apresentadas nas medidas de porosidade das Amostras 3 e 4 são pouco significativas.

# 4.8 Ensaio de degradação seguindo norma ABNT NBR ISO 15814: 2003 e ABNT NBR ISO 13781:1998

O ensaio de degradação foi realizado para verificar possíveis alterações nos *scaffolds* e que de alguma forma pudessem impedir a sua utilização nos testes biológicos. Este teste foi importante para nos dar a certeza que os *scaffolds* resistem à manipulação e as constantes trocas do meio no caso dos testes *in vitro*, e ter a certeza que a forma estrutural iria ser mantida pensando na aplicação *in vivo*. A esponja utilizada foi calcinada a 725°C (Amostra W) e a pastilha porosa utilizada foi sinterizada a 1330°C (Amostra Z).

Foi adotada esta seleção de amostras, pois se pensou em testar a melhor condição (maior resistência mecânica) que era a Amostra Z e a pior condição (menor resistência mecânica) que era a Amostra W, porém ambos os casos não ocorreu degradação.

O pH da solução inicial partiu de 7,57 e depois de acrescentar as amostras as variações de pH nos três períodos de análise e nos dois tipos de amostras se mantiveram na tolerância aceitável do experimento que foi entre 7,2 e 7,6 (Tabela 4.6). Este fator contribuiu para a validação do experimento.

Neste teste levou-se em consideração o comportamento dos *scaffolds* em meio aquoso por um tempo semelhante ao de cultura celular, além de verificar as dificuldades de manuseio, devido a sua fragilidade e baixa resistência mecânica.

As amostras foram lavadas três vezes no próprio recipiente onde foi realizado o experimento. A água utilizada foi purificada no equipamento de osmose reversa e depois passada no equipamento deionizador.

Tempo	Amostra W (pH)	Amostra Z (pH)
24h	7,5	7,3
7 dias	7,5	7,3
14 dias	7,6	7,5

 Tabela 4.6- Monitoramento do pH durante o experimento.

Os resultados foram bons, pois as amostras não apresentaram degradação. Em geral as amostras na forma de pastilha sofreram um acréscimo de massa Tabela 4.7. Este fato pode ser justificado por três possíveis fatores: i) não degradação das amostras; ii) Mudança na morfologia da superfície por causa do contato do alfa-TCP com o meio (demostrado na Figura 4.20b); iii) Possível deposição de minerais na superfície modificada.

A esponja sofreu acréscimo de massa inferior ao da pastilha, porém isso se justifica pelo fato da esponja ter sofrido possíveis quebras, por causa da espessura das paredes estruturais serem finas, além de já estarem com a resistência mecânica comprometida por não terem sido sinterizadas.

**Tabela 4.7** - Ensaio de degradação dos *scaffolds*. Dados obtidos da diferença entre a massa antes e depois do ensaio. A massa das amostras não foi padronizada.

	Amostra W	Amostra Z
Tempo	Variação de massa após o teste (%)	Variação de massa após o teste (%)
24h	2,9	4,7
7 dias	8,5	3,1
14 dias	1,0	6,0

A Figura 4.20 mostrou a mudança de morfologia do *scaffold* HA/TCP em contato com a solução de degradação. A Figura 4.20a mostrou a morfologia da superfície do *scaffold* antes do contato com a solução. A Figura 4.20b mostrou a superfície do *scaffold* modificada após o contato com a solução.



**Figura 4.20** – Mudanças da morfologia da superfície por decorrência do contato do alfa-TCP com a solução tampão. (a) Típica estrutura sinterizada antes do teste de degradação. (b) Estrutura modificada após o teste de degradação.

#### 4.9 Difração de raios X (DRX)

#### Materiais

#### Hidroxiapatita - HA

A Figura 4.21 apresentou a evolução da fase cristalina da hidroxiapatita comercial e neste gráfico consta o difratograma da amostra calcinada a 725°C e a amostra sinterizada a temperatura de 1330°C. Estas análises foram feitas utilizando o equipamento de difração de raios X para comparar os resultados dos difratogramas individualizados (HA e TCP) com os picos dos compósitos calcinados a 725°C e sinterizados a 1330°C.



**Figura 4.21 -** Hidroxiapatita comercial. Calcinada a 725°C e sinterizada a 1330°C. HA: picos de hidroxiapatita.

A Figura 4.22 mostrou a evolução da fase cristalina da hidroxiapatita sintetizada, onde podemos comparar os picos do material calcinado a 725°C com os picos do material sinterizado a 1330°C. Podemos visualizar a fase semi-cristalina obtida por calcinação a 725°C, e que apresentou picos no difratograma pouco intensos e não muito definidos, além do pico principal ser de pirofosfato que é uma fase anterior a da hidroxiapatita. Este fenômeno ocorre graças à temperatura de calcinação. Neste caso, utilizando sol-gel com sacarose, acredita-se que ocorreu uma alteração na temperatura de mudança de fase, pois no sol-gel convencional não ocorreu este fenômeno [RODRIGUES, L.R. 2008]. A amostra 1330°C apresentou boa cristalinidade e revelou a fase hidroxiapatita.



**Figura 4.22** – Difração de raios X da hidroxiapatita sintetizada no laboratório. Calcinada a 725°C e sinterizada a 1330°C. "HA": pico de hidroxiapatita. "o": pico de CaO. "p": pico de pirofosfato.

A fase critalina da HA revelada por DRX e associada com o resultado de FRX (Tabela 4.1) garante a aplicação da hidroxiapatita como biomaterial.

Fosfato tricálcico - TCP

A Figura 4.23 apresentou os difratogramas das amostras de beta-TCP comercial calcinada a 725°C e sinterizada a 1330°C. O intuito foi comparar posteriormente com os picos dos compósitos em suas respectivas temperaturas. Como era esperado o TCP com a fase beta ( $\beta$ ) sinterizado a 1330°C apresentou modificação para a fase alfa ( $\alpha$ ). Acredita-se que o processo de mudança de fase teve início após o aquecimento ultrapassar a temperatura de 1150°C.


**Figura 4.23 -** TCP comercial. Calcinado a 725°C e sinterizado a 1330°C. "b": beta- fosfato tricálcico. "a": alfa-fosfato tricálcico.

A Figura 4.24 apresentou os difratogramas das amostras de beta-TCP produzidas em laboratório. O intuito foi comparar os resultados de cada material com os seus respectivos compósitos.

Como era esperado o beta-TCP sinterizado a 1330°C modificou a sua estrutura para alfa-TCP, assim como ocorreu com o material comercial.



**Figura 4.24 -** TCP sintetizado no LABIOMEC. Calcinado a 725°C e sinterizado a 1330°C. "b": beta- fosfato tricálcico. "a": alfa-fosfato tricálcico.

### Nanocompósitos e compósitos

#### Amostras W e X - Esponja 725°C

A Figura 4.25 apresentou um nanocompósito cerâmico baseado na estrutura da esponja polimérica calcinado a 725°C (Amostras W e X), como foi possível verificar na primeira linha superior, logo abaixo está localizado o difratograma do beta-TCP comercial também calcinado a 725°C e na sequência está localizado o difratograma da hidroxiapatita comercial calcinada a 725°C. Como foi possível verificar no gráfico do nanocompósito tanto os picos de beta-TCP quanto os picos de hidroxiapatita se encontram nas mesmas posições que os picos referentes aos seus difratogramas individuais. Provando, assim, a existência real dos dois materiais na amostra final, porém também deve ser levado em consideração o fato dos materiais apresentarem difratogramas com picos de baixa intensidade e com pouca cristalinidade.



**Figura 4.25 –** DRX da esponja cerâmica (HA/TCP) e dos materiais comerciais utilizados em sua fabricação (HA e TCP). Todos foram calcinados a 725°C. "b": pico referente ao beta-fosfato tricálcico. "HA": pico referente a hidroxiapatita. "p": pico referente ao pirofosfato.

# Amostra Z - Pastilha 1330°C

A Figura 4.26 apresentou o difratograma do compósito poroso de hidroxiapatia com betafosfato tricálcico (Amostra Z) e os difratogramas isolados de beta-fosfato tricálcico comercial e da hidroxiapatita comercial (todos foram sinterizados a 1330°C). A temperatura de sinterização ultrapassou a temperatura de mudança de fase do TCP, onde a fase beta modificou para a fase alfa, tanto no compósito quanto nos materiais isolados, por este motivo as amostras apresentaram picos de alfa-TCP, da mesma forma como foi verificado nos testes de evolução de fase realizados anteriormente. A hidroxiapatita se manteve estável tanto no compósito quanto no difratograma isolado.

Com essa comparação foi possível afirmar que no final do processo existe um compósito de hidroxiapatita e alfa-TCP, ao invés de hidroxiapatita e beta-TCP que era a composição inicial.



**Figura 4.26 -** DRX da pastilha cerâmica porosa (HA/TCP) e dos materiais comerciais utilizados em sua fabricação (HA e TCP). Todos foram sinterizados a 1330°C. "a": pico referente ao alfa-fosfato tricálcico. "HA": pico referente a hidroxiapatita.

A Figura 4.27 mostrou três difratogramas, um do compósito poroso de hidroxiapatita com beta-TCP (HA/TCP), outro do beta-TCP sintetizado transformado em alfa-TCP e o terceiro foi o da hidroxiapatita sintetizada (HA). Todos esses materiais citados sofreram sinterização a 1330°C. Ocorreu a mudança de fase de beta para alfa no fosfato tricálcico, da mesma forma que ocorreu no material comercial. A hidroxiapatita se manteve estável.

Com essa comparação foi constatado que o comportamento do material sintetizado foi semelhante ao do material comercial, demonstrando desta forma o potencial de comercialização

do material sintetizado, e desta forma abrindo discussões sobre a possibilidade do desenvolvimento de projetos para a criação de uma planta piloto com o intuito de produzir em grande escala os matérias estudados.



**Figura 4.27** - DRX do compósito (HA/TCP) e dos materiais sintetizados (HA e TCP) que foram utilizados na produção dos *scaffolds*. Todos foram sinterizados a 1330°C. "a": pico referente ao alfa-fosfato tricálcico. "HA": pico referente a hidroxiapatita.

## 4.10 Equação de Scherrer

Aplicando a equação de *Scherrer* (Equação 2 e Equação 3) nos dados adquiridos por DRX foi possível obter o tamanho médio do cristalito da hidroxiapatita e do beta-fosfato tricálcico. Os resultados são mostrados na Tabela 4.8.

Como foi possível verificar, os resultados dos tamanhos de cristalitos das amostras estão compatíveis com as imagens de microscopia eletrônica, pois todas as amostras estão visualmente em escala nano, assim como os resultados obtidos com a equação de *Scherrer*. Deve ser levada

em consideração a tolerância de medida gerada pelas imagens de microscopia eletrônica, pois existem partículas aglomeradas que de uma forma em geral comprometem a análise.

**Tabela 4.8** – Tamanho dos cristalitos de HA e β-TCP, calculados pela equação de *Scherrer*.

Amostra	Materiais comerciais		Materiais sintetizados	
	HA (nm)	β-TCP (nm)	HA (nm)	β-TCP (nm)
Calcinado 725°C	63	130	45	83

## 4.11 Potencial Zeta (testes iniciais)

Analisando os dados da literatura nesta área [REYNOLDS, E.C.; et al.; 1983] foi constatado que quanto mais negativo for o número obtido de potencial Zeta menor será a adesão celular na superfície da hidroxiapatita.

A Tabela 4.9 demonstrou a variação do potencial Zeta para a hidroxiapatita quando moléculas de proteínas são aderidas a sua superfície. Este teste foi realizado segundo a literatura para comprovar que as proteínas produzem um aumento na carga líquida negativa, como mostra a medição do potencial Zeta. As proteínas básicas que foram analisadas produziram uma carga liquida positiva que facilitou a adesão das células. [REYNOLDS, E.C.; et al.; 1983].

Compostos adsorvidos na HA	Potencial Zeta (mV)	No. de células bacterianas aderidas a HA (x10 <sup>7</sup> )
Poli-L-glutamato	$-25,4 \pm 3,7$	$0,57 \pm 0,12$
$\alpha_{s1}$ -Caseína	$-24,5 \pm 3,0$	$0,59 \pm 0,32$
α-Lactalbumina	$-21.0 \pm 1.8$	$1,06 \pm 0,41$
Fosvitina	$-19,7 \pm 2,8$	$0,53 \pm 0,19$
β-Caseína	-19,7 + 2,2	$1,26 \pm 0,43$
k- Caseína	$-18,5 \pm 2,8$	$0,62 \pm 0,19$
β- Lactalbumina	$-13,6 \pm 1,9$	$0,94 \pm 0,49$
Albumina de soro bovino	$-13,0 \pm 2,6$	$0,61 \pm 0,19$
Dextrano	$-10,7 \pm 1.5$	$2,29 \pm 0,86$
Poli-L-lisina	$+20,2 \pm 3,7$	$3,72 \pm 1,12$
Histona H1	$+29,6 \pm 3,5$	$2,26 \pm 1,01$
Histona H3	+32,7 + 7,6	$2,65 \pm 1,02$

Tabela 4.9 - Valores de potencial Zeta extraídos da literatura [REYNOLDS, E.C.; et al.; 1983].

Foi verificado que o pH também interfere no resultado, pois quanto maior o valor de pH mais negativo é o valor obtido do potencial Zeta medido em miliVolts (- mV). Com valores de pH entre 6,5 a 12 foi obtido resultados de potencial Zeta entre 20mV a -20mV respectivamente.

Os valores de potencial Zeta obtidos (Tabela 4.10) são animadores, pois os materiais nanoparticulados e também os compósitos que partem de materiais nanoparticuldos possuem valores de potencial Zeta mais próximos de 0 mV do que o material micropartículado. Baseandose na literatura [REYNOLDS, E.C.; et al.; 1983] (Tabela 4.9) podemos dizer que existe uma grande chance das amostras que são produzidas a partir de nanopartículas apresentarem maior adesão celular do que as amostras produzidas com micropartículas, pois segundo os dados da Tabela 4.10 as amostras nano estão mais próximas ao 0 mV.

Materials	Média dos resultados (mV)
Micro HA	$-26,8 \pm 1,1$
Amostra Z	$-17,9 \pm 1,0$
Nano HA	$-17,0 \pm 0,9$
Amostras W e X	$-12,4 \pm 0,3$

Tabela 4.10 - Valores de potencial Zeta com materiais comerciais (teste inicial).

O fato das nanopartículas se apresentarem aglomeradas nas imagens de microscopia eletrônica em parte tem relação aos valores obtidos com análise de potencial Zeta, pois segundo a literatura o valor do potencial Zeta é uma medida da estabilidade cinética de um sistema coloidal, ou seja, as amostras com valores superiores a aproximadamente + 30mV ou inferior a – 30mV são consideras cineticamente estáveis [RÉFEGA, R.J.M. 2010], ou seja tem a tendência para repelirem umas às outras. As amostras analisadas possuem em torno de -12 a -18 mV isso justifica em partes a aglomeração das partículas apresentadas nas análises realizadas.

## 4.12 Ensaio mecânico de compressão axial

A Tabela 4.11 mostrou os resultados obtidos com o ensaio mecânico de compressão axial realizados nas amostras feitas com materiais sintetizados em laboratório e amostras feitas com

material comercial. A tabela apresenta valores do módulo de elasticidade (**E**), carga máxima (**P**) e valor médio da tensão a compressão axial (**G**ca).

Amostras	E (MPa)	<b>P</b> (N)	σca (MPa)
Amostra 1	$40 \pm 8,9$	$25,6 \pm 4,4$	$1,\!49\pm0,\!30$
Amostra 2	$53 \pm 8,3$	$23,1 \pm 2,1$	$1,\!55\pm0,\!10$
Amostra 3	8,7 ± 2,2	$5,7 \pm 1,3$	$0,1 \pm 0,03$
Amostra 4	$2,4 \pm 0,4$	$4,5 \pm 2,8$	$0,1\pm0,05$

Tabela 4.11 – Valores dos resultados obtidos no ensaio mecânico por compressão axial.

As Amostras 1 e 2 são pastilhas compactadas porosas, mesmo sendo de materiais diferentes apresentaram valores de resistência mecânica parecidos, onde a Amostra 1 (feita com material sintetizado) atingiu um valor médio ligeiramente maior, obtendo 25,6 N de carga máxima, já o material comercial (Amostra 2) atingiu uma carga média máxima de 23,1 N.

As Amostras 3 e 4 possuem poros semelhantes devido as esponjas poliméricas que as originaram terem a mesma estrutura. As esponjas cerâmicas feitas com material sintetizado no laboratório (Amostra 3) apresentaram uma resistência mecânica média de 5,7N e a Amostra 4 que foi feita com material comercial atingiu a carga máxima de 4,5N.

Os valores de carga máxima foram baixos devido à porosidade elevada dos materiais e conforme o ensaio era realizado existia a ruptura das paredes superiores, mas as camadas inferiores ficavam inteiras demonstrando que a estrutura rompia por estágios determinados por camada de poros. Os resultados das Amostras 1 e 2 (pastilhas porosas) para tensão máxima de ruptura foram muito próximos ao da literatura (2 a 5 MPa) quando comparados ao osso trabecular (osso esponjoso ou osso medular) [DING, M.; et.al.; 1997] [COSTA, H.S.; et al.; 2008]. Dados obtidos na literatura citando a resistência mecânica de esponjas de alumina com porosidade aproximada de 65% foi entre 1,6 a 3 MPa, esses valores são próximos (Tabela 4.11) aos obtidos pela Amostra 1 (com ~ 57% de porosidade) e Amostra 2 (com ~ 35% de porosidade) produzidas com HA/TCP. HA e TCP são materiais que possuem resistência mecânica inferior a alumina, porém possui uma melhor interação com o tecido ósseo [COSTA, H.S.; et al.; 2008].

Os valores médios de tensão a compressão axial obtidos com os testes nas Amostras 3 (com ~ 85% de porosidade) e Amostra 4 (com ~ 77% de porosidade) são próximos ao valor inferior de

resistência mecânica de matrizes porosas de hidroxiapatita segundo a literatura, valores que giram entorno de 0,3 a 5,0 MPa com porosidade entre 65% a 90% [JUN, Y.-K..; et al.; 2003] [COSTA, H.S.; et al.; 2008].

Resultados de ensaios mecânicos de *scaffolds* em forma de espumas de alfa-fosfato tricálcico (com porosidade entre 90 e 95%) obtidos na literatura apresentaram resultados de resistência mecânica a compressão de 0,05 MPa a 0,25 MPa [UDOH, K.I.; et al.; 2010], que são valores abaixo dos resultados obtidos com as Amostras 1, 2, 3, 4.

#### **4.13 Cultura Celular (testes iniciais)**

#### Lupa normal - ensaio MTT (testes iniciais)

Para iniciar o processo de cultura celular foi realizado um ensaio de MTT nas Amostras W (Figura 4.28), X (Figura 4.29), Y (Figura 4.30) e Z (Figura 4.31), após dois dias para verificar se as células conseguiram aderir bem ao material e se elas se fixaram também no interior dos *scaffolds*. Foram testados dois tipos de esponjas a Amostra W e a Amostra X. Foram também testadas duas pastilhas a Amostra Y (calcinada a 725°C) e a Amostra Z (sinterizada a 1330°C), que foram testadas para verificar a influência dos poros e da estrutura do *scaffold* na cultura celular.

Amostra W - testes iniciais

A Amostra W possui poros maiores e paredes mais finas que a Amostra X e por isso possui menor resistência mecânica aparente. Esta análise foi feita com base no manuseio das amostras durante os testes iniciais. Na Amostra W (Figura 4.28b) foi possível visualizar células coloridas com tonalidade escura, indicando que são células viáveis aderidas no *scaffold*.



Figura 4.28 - Células aderidas à Amostra W, no 2° dia. (a) 6,3x de aumento. (b) 20x de aumento.

A Amostra W apresentou na Figura 4.28a uma estrutura muito porosa e com poros interconectados, porém tem a espessura de suas paredes muito finas (Figura 4.28b). *Scaffolds* com paredes muito finas tendem a dificultar a adesão e consequentemente a proliferação celular, pois a espessura das paredes estruturais dos *scaffolds* devem ser compatíveis com o tamanho das células, por este motivo acredita-se que a Amostra W não apresenta uma estrutura adequada para este tipo de cultura celular.

A Amostra W apresentou sinais de células aderidas em seu interior, mas mesmo assim seu desempenho foi inferior em todos os aspectos quando comparada com a Amostra X (Figura 4.29). Entende-se por desempenho inferior os resultados obtidos por ensaios mecânicos e a quantidade de células visíveis aderidas na superfície dos *scaffolds* (Figuras 4.28b e 4.29b).

# Amostra X – testes iniciais

A Figura 4.29a demonstrou a estrutura porosa com poros interconectados e a Figura 4.29b mostrou as células coloridas e aderidas a superfície do material.



Figura 4.29 - Células aderidas à Amostra X, no 2° dia. (a) 6,3x de aumento. (b) 20x de aumento.

Amostra Y - testes iniciais

A Figura 4.30 apresentou os resultados da Amostra Y no 2º dia de cultura celular. A Figura 4.30a apresentou o *scaffold* com grandes trincas e fraturas, este fato está associado à baixa resistência mecânica decorrente da temperatura utilizada no tratamento térmico. Na Figura 4.30b foi possível verificar uma pequena quantidade de células aderidas à superfície.



Figura 4.30 - Células aderidas à Amostra Y, no 2° dia. (a) 6,3x de aumento. (b) 20x de aumento.

### Amostra Z - testes iniciais

Todas as amostras apresentaram células viáveis aderidas as suas superfícies, porém a Amostra Z (Figura 4.31) apresentou resultados melhores tanto na cultura celular em relação à população visual de células aderidas (Figura 4.31a e Figura 4.31b), quanto na resistência ao manuseio durante o ensaio *in vitro*. A Figura 4.31a demostrou uma superfície com distribuição irregular de poros, porém com muitas células aderidas.

A Figura 4.31b apresentou detalhes da superfície da amostra, onde foi possível ver células aderidas em toda a superfície, além de ser possível verificar que no interior dos poros também ocorreu acumulo de células.

A quantidade de células na superfície da Amostra Z foi superior, mas não é possível afirmar que possui mais células que as outras amostras, pois não se consegue neste tipo de análise verificar as células presentes no interior dos *scaffolds*, além disso, as amostras em forma de pastilha tem a superfície externa maior pelo fato de serem menos porosas que as esponjas. Com a microscopia confocal e com a lupa de fluorescência será possível verificar com mais detalhes as células aderidas e assim afirmar em qual amostra as células se desenvolveram melhor.



Figura 4.31 - Células aderidas à Amostra Z, no 2° dia. (a) 6,3x de aumento. (b) 20x de aumento.

#### Lupa de Fluorescência

Esta análise foi realizada para verificar em cada amostra as células viáveis com base no contraste de cor gerado pela coloração fluorescente.

Amostra W - testes iniciais

Foi possível verificar na Amostra W células aderidas e um pouco esticadas após 2 dias de cultura celular (Figura 4.32a), e após 7 dias de cultura celular (Figura 4.32b) as células estavam mais esticadas indicando que elas se adaptaram a superfície do material e continuaram viáveis.



Figura 4.32 - Células aderidas à Amostra W (aumento de 112,5x). (a) 2° dia. (b) 7° dia.

Amostra X - testes iniciais

A Amostra X (Figura 4.33) após 2 dias de cultura celular apresentou uma quantidade de células menor do que o esperado, além de existir uma aparente diminuição na quantidade de células presentes na amostra após 7 dias (Figura 4.33b) quando comparada com a imagem do 2° dia de cultura celular (Figura 4.33a). A estrutura da esponja como já foi visualizada anteriormente foi considerada adequada para utilização como *scaffold*, porém como foi calcinada a 725°C ela apresentou baixa resistência mecânica e este fato acabou dificultando o manuseio da amostra, além de dificultar também o crescimento e desenvolvimento celular.



Figura 4.33 - Células aderidas à Amostra X (aumento de 112,5x). (a) 2° dia. (b) 7° dia.

Amostra Y - testes iniciais

A Figura 4.34a representou o 2°dia de cultura celular, neste estágio foi possível visualizar que as células estão iniciando a adesão, pois se apresentaram em formato de esferas que é uma condição comum nos primeiros dias de cultura, porém esta característica pode ser também uma influência da estrutura do *scaffold*.



**Figura 4.34 -** Células aderidas à Amostra Y (aumento de 112,5x). (a) 2° dia. (b) 7° dia.

A Amostra Y após 7 dias de cultura celular (Figura 4.34b) demonstrou bons resultados, pois apresentou células aderidas e com indícios de crescimento (apresentou espalhamento celular), e proliferação (apresentou pequenos grupamentos em uma determinada região da amostra). O resultado obtido com a Amostra Y foi melhor do que os resultados apresentados pelas Amostras W e X, graças ao fato do *scaffold* em forma de pastilha manter a integridade estrutural até o final do processo, e assim manter as células aderidas em sua superfície.

## Amostra Z - testes iniciais

A Figura 4.35a representou o 2° dia de cultura e apresentou células aderidas e espalhadas em uma grande área da amostra. A Figura 4.35b representou também o segundo dia, porém apresentou as células em maior aumento, e foi possível verificar que mesmo no segundo dia elas já estão espalhadas e aderidas ao biomaterial.



Figura 4.35 - Células aderidas à Amostra Z no 2° dia. (a) 20x de aumento. (b) 112,5x de aumento.

A Figura 4.36a representou o 7ºdia de cultura celular e foi possível visualizar as células ocupando uma grande área da superfície da Amostra Z. Na Figura 4.36b foi possível verificar em um maior aumento as células muito espalhadas na superfície.

Ambos os períodos (2ºdia e 7ºdia) confirmaram os resultados do ensaio de MTT onde apresentou uma grande quantidade de células na superfície do material. Nesta análise foi possível verificar que as células se desenvolveram muito bem tanto em quantidade quanto em tamanho. Foi possível verificar que elas se fixaram nos poros e em toda a superfície, além de estarem bem espalhadas.



Figura 4.36 - Células aderidas à Amostra Z no 7° dia. (a) 20x de aumento. (b) 112,5x de aumento.

Com este resultado foi possível afirmar que entre todas as amostras estudadas a que apresentou melhores resultados foi a Amostra Z, porém essa amostra tem uma maior área superficial, o que pode favorecer a observação de células neste plano superficial, sendo que o mesmo fato não ocorre nas esponjas (Amostras W e X) devido a maior porosidade.

Microscopia confocal de fluorescência por varredura laser

Amostra W – testes iniciais

Na Figura 4.37 (a) e (b) foram visualizados os resultados apresentados pela Amostra W, e foram considerados satisfatórios quando os comparamos com as outras amostras. No segundo dia representado pela imagem (a) existem células aderidas, mas pouco desenvolvidas, como foi esperado para este tempo de cultura. Após 7 dias (imagem 4.37b) foi possível identificar o núcleo de algumas células e notar um bom desenvolvimento (adesão e espalhamento) delas sobre a superfície, apesar da pouca quantidade aparente.



Figura 4.37 - Amostra W. (a) 2ºdia – apresenta células aderidas. (b) 7º dia - células aderidas nas arestas.

Amostra X – testes iniciais

A Figura 4.38a e Figura 4.38b apresentaram os resultados do 2º dia e do 7º dia de cultura celular na Amostra X. O resultado obtido no segundo dia (imagem a) foi considerado bom, pois existem células espalhadas na superfície do *scaffold* apesar de ainda não estarem bem desenvolvidas, devido ao pouco tempo de ensaio.



**Figura 4.38 -** Células aderidas na Amostra X. (a) 2ºdia - Vista geral da amostra. (b) 7ºdia – vista geral e detalhe de uma célula aderida.

A imagem (b) são os resultados após 7 dias de cultura celular e mostrou uma quantidade pequena de células, quando comparamos ao segundo dia. Este fato ocorreu graças a grande porosidade do material, e que acarreta na falta de células em alguns pontos da amostra, mas as células presentes estão aderidas e um pouco espalhadas, assim como foi possível ver no detalhe da Figura 4.38b onde foi possível visualizar que a célula acompanha a estrutura do *scaffold*.

### Amostra Y – testes iniciais

Na Figura 4.39 são apresentados os resultados da Amostra Y. Os resultados apresentados após o segundo dia de cultura celular (imagem a) não foi o esperado, pois só foi possível visualizar algumas células pequenas, como as apresentadas no detalhe criado na imagem (a).



**Figura 4.39 –** Amostra Y. (a) 2°dia – Células pequenas no centro da imagem. (b) 7° dia - Vista geral e detalhe de uma célula aderida à superfície.

A Figura 4.39b representou o 7ºdia de cultura celular, e foi possível visualizar uma maior presença de células em comparação com o 2º dia. No detalhe criado na imagem (b) foi possível visualizar a célula e seu núcleo de cor vermelho, representando bom crescimento e uma boa aderência.

## Amostra Z – testes iniciais

Na Amostra Z apresentada na Figura 4.40a foi realizada a cultura celular por dois dias e foi possível visualizar células bem espalhadas por toda a superfície, e quando comparamos com os resultados das outras amostras, as células na Amostra Z apresentam características de células de 7 dias de cultura, nos levando a acreditar que a superfície sinterizada facilitou o espalhamento das células, porém este resultado pode ser consequência das características da superfície da amostra.

Na imagem (b) foi possível visualizar as células bem espalhadas pela superfície do *scaffold*, além de algumas acompanharem o formato da superfície, demostrando total compatibilidade com o material. As células em alguns pontos apresentaram indícios de proliferação, devido a formação de pequenos grupamentos celulares.



**Figura 4.40 -** Células aderidas à Amostra Z. (a) Vista geral das células aderidas após 2 dias de cultura celular. (b) Vista geral da amostra com células aderidas após 7 dias de cultura celular.

A Amostra Z nas análises por microscopia confocal confirmou os bons resultados apresentados nos ensaios anteriores de MTT e lupa de fluorescência.

#### 4.14 Ensaio in vitro – testes finais

## 4.14.1 Amostra 1

A Figura 4.41 apresentou resultados de cultura celular na Amostra 1, onde o material foi cultivado com células tronco mesenquimais. Com as Figuras 4.41 (a) e (b) foi possível verificar a semelhança morfológica das células tanto no controle (Figura 4.41a), quanto nas células que estavam em contato com a Amostra 1(Figura 4.41b). Os resultados indicaram que as células estão viáveis, comprovando que o material não é citotóxico.



**Figura 4.41** – Imagens obtidas por estereoscópio da morfologia celular após 13 dias. (a) Grupo controle. (b) Células cultivadas com a pastilha porosa feita com material sintetizado, indicando que a Amostra 1 não é citotóxica. Objetiva de aumento de 4x.

As imagens (Figura 4.42) de microscopia feitas no material após 13 dias de cultura apresentaram células muito bem aderidas e espalhadas na superfície e nos poros.

A Figura 4.42 (a) apresentou a pastilha sem células aderidas na superfície para poder ajudar na identificação dos pontos onde ocorreu a adesão e proliferação celular.

Na imagem (b) a superfície da Amostra 1 foi totalmente recoberta por células, mostrando total afinidade das células com o material.

Na imagem (c) foi possível visualizar as células aderidas em uma fratura demonstrando a possível migração das células através dos poros para a parte interna do *scaffold*.



**Figura 4.42** – MEV da Amostra 1 com células aderidas. (a) Pastilha sem células. (b) Pastilha com a superfície recoberta por células. (c) Células aderidas na amostra e visualizadas a partir de uma fratura no material. (d) Detalhe das células tampando um poro. (e) Detalhe da célula aderida na superfície interna. (f) Célula aderida e espalhada na superfície do *scaffold*.

A Figura 4.42(d) mostrou o mecanismo de recobrimento da superfície da Amostra 1 realizado pelas células, além de ilustrar as células tampando um poro.

A imagem (e) apresentou uma parte da superfície interna do *scaffold*, onde as células aderiram e espalharam.

Na imagem (f) está uma região do *scaffold*, onde foi possível visualizar a morfologia das células aderidas e espalhadas na superfície do *scaffold*.

Em geral as células interagiram bem com as pastilhas porosas, pois elas aderiram tanto na superfície quanto nas regiões internas do *scaffold*.

4.14.2 Amostra 2

Os resultados *in vitro* da Amostra 2 (amostra tipo B- Pastilha sinterizada a 1330°C) foram apresentados anteriormente nos testes inicias. Esta amostra (testes realizados na FMDUP e FEUP) foi que apresentou os melhores resultados nos testes anteriores, e por este motivo os seus parâmetros de produção foram utilizados para os *scaffolds* dos testes finais (Amostras 1, 2, 3 e 4).

4.14.3 Amostra 3

A Figura 4.43 apresentou os resultados de cultura celular do controle e da Amostra 3, após 13 dias, onde foi realizado o cultivo de células tronco mesenquimais. A semelhança morfológica das células do grupo controle (Figura 4.43a) com as células cultivadas junto a Amostra 3 (Figura 4.43b) indicaram que a Amostra 3 não é citotóxica, pois a imagem das células do controle foi visualmente semelhante as células que estão junto com a Amostra 3, indicando que o *scaffold* não interferindo no crescimento células.



**Figura 4.43** – Imagens obtidas por estereoscópio da morfologia celular após 13 dias. (a) Grupo controle. (b) Células cultivadas junto com a Amostra 3 (esponja cerâmica feita com material sintetizado) indicando que a amostra não é citotóxica. Objetiva de aumento de 4x.

As Figuras 4.44 (a), (b), (c) e (d) apresentaram os resultados de cultura celular após 13 dias feita na Amostra 3. Os resultados apresentaram células aderidas e espalhadas na superfície da esponja cerâmica.

A imagem (a) apresentou o *scaffold* antes da cultura celular para poder ajudar na comparação e identificação dos pontos onde ocorreram a adesão e espalhamento celular.

A imagem (b) mostrou a superfície da Amostra 3 com células recobrindo parcialmente sua estrutura, mostrando a afinidade da célula com o material.

A imagem (c) mostrou uma parte da parede estrutural da Amostra 3 recoberta por células que contornaram a estrutura da esponja, indicando uma boa adesão e compatibilidade celular com o material, além de apresentar uma possível migração das células para o interior do *scaffold*.

A imagem (d) mostrou uma região da esponja (Amostra 3) onde a célula está aderida e espalhada na superfície.

Em geral as células interagiram bem com a Amostra 3, pois elas aderiram em várias partes da esponja e se mostraram espalhadas.



**Figure 4.44** – MEV realizado na Amostra 3 com células aderidas. (a) Esponja sem células. (b) Esponja com as células aderidas na superfície da parede. (c) Detalhe das células aderidas na parede da esponja. (d) Detalhe das células aderidas na superfície interna da parede da esponja.

# 4.14.4 Amostra 4

Foi utilizada como controle positivo de toxidade (CPT) uma solução de meio Ham F10 com 10% SFB (soro fetal bovino) e 10% de Fenol e como controle negativo de toxidade (CNT) o extrato de poliestireno. O Fenol (ácido carbólico) foi utilizado com controle positivo, pois este elemento é altamente nocivo para as células, e é considerado sólido, cristalino, tóxico, cáustico e pouco solúvel em água. O extrato de poliestireno (placa de cultura) foi utilizado como controle

negativo, pois não oferece nenhum tipo de interferência ao desenvolvimento celular [OLIVEIRA, P.P.M., 2008].

O ensaio de citotoxicidade direta (Figura 4.45a) visa à observação dos possíveis efeitos deletérios sobre as células a partir do contato direto das mesmas com a superfície do material estudado.

No ensaio de citotoxicidade indireta (Figura 4.45b) as amostras foram submersas em meio Ham F10 [KIIRKPATRICK, C.J.; 1992] [SJÖGREN, G.; et al.; 2000] [OLIVEIRA, P.P.M., 2008]. O objetivo foi extrair as possíveis substâncias tóxicas solúveis eliminadas pelas amostras.

Tanto no ensaio de citotoxidade direta quanto no ensaio de citotoxidade indireta, a Amostra 4 apresentou resultados melhores que o controle positivo, mostrando que a Amostra 4 pode ser considerada não citotóxica.

Ocorreu uma diferença muito grande em ambos os ensaios de citotoxicidade quando comparado ao controle positivo no qual foi utilizado o fenol, substância sabidamente citotóxica.

Os resultados nos levam a deduzir que a Amostra 4 não foi citotóxica, visto que no ensaio de citotoxicidade direta apresentou maior quantidade de células viáveis que o controle negativo (Figura4.45a) e no teste de citotoxicidade indireta apresentou um resultado semelhante ao controle (Figura 4.45b). Portanto, a Amostra 4 não impediu o crescimento das células, nem de modo direto quando as células foram colocadas em cultura sobre sua superfície, nem de modo indireto quando as células entram em contato apenas com elementos solúveis eliminados pelo material.



Figura 4.45 - Ensaio de citotoxicidade Amostra 4. (a) Direta. (b) Indireta.

A microscopia eletrônica de varredura feita na Amostra 4 (Figura 4.46) após a cultura com células tronco mesenquimais apresentou células aderidas e espalhadas na superfície e nos poros do *scaffold*.



**Figura 4.46** – MEV realizado na Amostra 4 com células tronco mesenquimais. (a) Esponja sem células. (b) Vista geral da esponja com a superfície recoberta por células. (c) Detalhe de uma célula aderida e tampando o poro. (d) Detalhe da célula espalhando para iniciar a sobreposição de um poro. (e) Células aderidas na superfície interna. (f) Detalhe de uma célula no poro.

A Figura 4.46(a) apresentou a esponja (Amostra 4) sem células aderidas na superfície para poder auxiliar na identificação dos pontos onde ocorreram a adesão e proliferação celular.

Na imagem (b) foram apresentadas as paredes da estrutura da esponja recobertas por células, mostrando a afinidade delas com o material.

Na Imagem (c) foi apresentada uma parte da esponja onde as células aderidas estão sobrepondo o poro.

A Imagem (d) ilustra uma célula espalhando (prolongamentos do citoplasma) para iniciar a sobreposição de um poro.

Na imagem (e) foi possível ver células aderidas no interior do *scaffold* (Amostra 4) recobrindo a superfície.

Na imagem (f) estão visíveis algumas células aderidas, porém com parte de seus citoesqueletos soltos, podendo ser visto de forma detalhada a morfologia das células.

Em geral a esponja cerâmica (Amostra 4) interagiu bem com as células, pois elas aderiram tanto na superfície quanto nas regiões internas do *scaffold*. Em alguns pontos existiu a dúvida se havia ocorrido a formação de fosfatos de cálcio pelas células. Para se tentar comprovar este fato foi realizada a análise EDS pontual na Amostra 4 com células.

Foram realizadas duas medições pontuais na região da Amostra 4 indicada na Figura 4.47 e neste caso não foi registrado nenhuma presença de fosfato de cálcio. Este resultado nos leva a acreditar que as células recobriram a região inteira da amostra presente na Figura 4.47. Este fato foi comprovado quando se analisou a imagem e verificou que no poro do canto esquerdo inferior existe uma camada de célula rompida e que nos leva a deduzir que no momento em que foi realizado o procedimento de fixação das células no material, elas estavam sobrepondo o poro.



Figura 4.47 - EDS da Amostra 4 após a realização da cultura celular.

Foram também realizadas duas medições pontuais na Amostra 4 na região indicada na Figura 4.48, porém neste caso, além das células terem recoberto a amostra elas aparentemente liberaram cristais de fosfato de cálcio. Esta suspeita após análise EDS em outra região da Amostra foi comprovada com as duas medições pontuais realizadas por EDS e apresentadas na Tabela 4.12. No caso apresentado nesta imagem (Figura 4.48) as duas medições realizadas indicaram a presença de cálcio e fósforo, portanto acredita-se que existiu a formação de cristais de fosfato de cálcio.



Figura 4.48 - EDS da Amostra 4. Região apresentando possível liberação de cálcio pela célula.

	0	Р	Ca
Espectro 1	31,03	9,66	59,31
Espectro 2	46,84	10,06	43,10

Tabela 4.12 – Resultados das medições pontuais realizadas pelo equipamento EDS.

## 4.15 Ensaio in vivo (sem células tronco)

# 4.15.1 Amostra 4

As imagens obtidas por estereomicroscópio apresentam o local do defeito após os períodos de seguimento pré-estabelecidos. O defeito foi realizado no sulco exterior tibial com 3,2mm de diâmetro por 1,2mm de profundidade. Nas imagens apresentadas na Figura 4.49 foi possível observar nitidamente o local do defeito no grupo experimental no qual foi implantado o HA/alfa-

TCP (Amostra 4) com tempos de seguimento de 7 e 14 dias. No grupo controle (defeito vazio) com o mesmo tempo de seguimento o defeito ósseo foi de difícil visualização devido à presença do tecido neoformado recobrindo a superfície do implante.



Figura 4.49 - Imagens obtidas por estereomicroscópio das tíbias pertencentes aos grupos: controle onde o defeito permaneceu vazio (GC); e HA/alfa-TCP (Amostra 4) após 7 e 14 dias de seguimento.

Nos demais tempos de seguimento Figura 4.50 (21 e 30 dias) ainda foi possível observar o HA/alfa-TCP (Amostra 4) implantado no local do defeito. Nestes grupos o material apresenta-se associado a tecido neoformado, tornando a visualização difícil quando comparada aos grupos com tempos de seguimento mais curto (7 e 14 dias).

Nos GC com 21 e 30 dias (Figura 4.50) foi possível observar que o padrão de crescimento do tecido neoformado na região do defeito foi preservado, apresentando assim como nos GC com 7 e 14 dias a presença de grande quantidade de tecido recobrindo a região da lesão.



**Figura 4.50** - Imagens obtidas por estereomicroscópio das tíbias pertencentes aos grupos: controle onde o defeito permaneceu vazio (GC); e HA/alfa-TCP (Amostra 4) após 21 e 30 dias de seguimento.

A Figura 4.51 apresentou os resultados obtidos utilizando o equipamento de radiografia.

No 7° dia a imagem do defeito com o *scaffold* (Amostra 4) foi semelhante ao defeito do grupo controle, e a diferença aparente na imagem foi que no defeito com a Amostra 4 foi possível visualizar o *scaffold* na radiografia.

Na imagem do 14º dia foi possível visualizar uma estrutura porosa que vem a ser o *scaffold* (Amostra 4) demonstrando uma estruturação do defeito, fato muito importante quando se deseja guiar o crescimento das células e sua proliferação, mantendo a estrutura porosa natural do tecido ósseo. A imagem do defeito ósseo no grupo controle neste período apresentou um resultado semelhante ao grupo controle no 7º dia.



**Figura 4.51 -** Radiografias obtidas das tíbias pertencentes ao **grupo controle - GC** (defeito vazio) e **Amostra 4** após 7, 14, 21 e 30 dias de seguimento.

No 21° dia (Figura 4.51) já não foi possível visualizar na radiografia os poros referentes ao *scaffold* (Amostra 4) que eram visíveis no 7° dia e no 14° dia. A imagem da radiografia no 14° dia apresentou um defeito com tonalidade cinza quase igual ao do osso levando ao entendimento de

que a densidade do local do defeito estava quase igual ao do osso sem defeito. O grupo controle no 14º dia apresentou uma radiografia do defeito ósseo com a tonalidade próxima ao do tecido ósseo sadio, porém ainda com os limites do defeito bem demarcados.

No 30° dia já quase não foi possível visualizar o defeito criado no início do experimento devido a densidade do osso neoformado ser próxima ao tecido ósseo natural. Deve-se ressaltar que o defeito ósseo foi estruturado e guiado pelo *scaffold* (Amostra 4). O defeito do grupo controle no 30°dia apresentou bons resultados, pois quase não foi possível visualizar o contorno do defeito, isso devido a reconstrução do tecido ósseo, porém de forma não guiada.

O resultado no 30° dia de ensaio de ambas as amostras foram semelhantes com relação a densidade óssea, porém a estrutura formada poderá ser visualizada nas imagens de microscopia eletrônica de varredura.

A Figura 4.52 apresenta as imagens dos resultados da Amostra 4 e do grupo controle (sem células), obtidos no ensaio *in vivo* por imagens de MEV.

No 7ºdia o defeito estava bem estruturado e com os poros bem ressaltados graças ao *scaffold* implantado, além de apresentar uma adesão e integração aparentemente total com o tecido ósseo. O grupo controle apresenta uma estrutura irregular e deformada devido a falta de uma estrutura de apoio.

No 14ºdia a Amostra 4 apresentou uma estrutura não muito porosa, porém alinhada e bem estruturada semelhante com o visualizado na radiografia. O grupo controle apresentou uma formação melhor estruturada após 7 dias de cultura celular, porém ainda irregular e desorganizada apresentando poros muito grandes em alguns pontos e a não existência de poros em outros pontos.

No 21ºdia a Amostra 4 apresentou uma estrutura óssea bem organizada e com a camada superficial bem alinhada, além de apresentar poros novos, e maiores que os do próprio *scaffold* implantado, demonstrando a morfologia do novo tecido formado. O grupo controle apresenta uma estrutura óssea bem formada externamente, porém a parte interna apresentou uma grande desorganização.



**Figura 4.52**– MEV dos testes *in vivo* sem células tronco mesenquimais. **GC** – Grupo controle. **Amostra 4** - Esponja HA/alfa-TCP.

No 30° dia (Figura 4.52) de ensaio o grupo com a Amostra 4 e sem as células mesenquimais apresentaram uma estrutura muito semelhante ao tecido ósseo natural, porém apenas com uma pequena camada do *scaffold* próximo a camada superficial do tecido ósseo. O grupo controle sem células MSCs apresentou a camada superficial óssea bem reconstruída, porém o seu interior estava ainda muito desorganizado e com a estrutura sem uniformidade.

Os resultados de microscopia, assim como os resultados da radiografia nos deram informações referentes a formação do tecido ósseo, porém com as imagens de microscopia foi possível verificar a morfologia e a organização do tecido neoformado.

Nos testes realizados, em geral o defeito com a Amostra 4 teve o crescimento do tecido ósseo guiado e aparentemente organizado, já o tecido neoformado no defeito vazio, apresentou características que indicam a ocorrência de uma grande desorganização no crescimento deste novo tecido.

# 4.16 Ensaio in vivo (com células tronco)

# 4.16.1 Amostra 2

# Histologia

O *scaffold* HA/TCP (Amostra 2) apresentou bons resultados no ensaio *in vitro* e foram demonstrados no ensaio MTT, na lupa de fluorescência e na microscopia confocal e este fato justificou a realização dos testes *in vivo* (Figura 4.53 e 4.54).



**Figura 4.53** – Histologia da lamina obtida da Amostra 2 com células tronco mesenquimais de polpa dentária com 5x de aumento. Setas: indicam as ilhas de neoformação óssea. Triângulos: indicam infiltrados inflamatórios no material.

Os compósitos em forma de pastilhas cerâmicas porosas apresentaram boa adesão e proliferação celular em sua superfície e poros, esses resultados obtidos foram muito importantes,

pois prova que o material não é citotóxico. Nos resultados *in vivo* segundo imagens de histologia após os 56 dias de ensaio, foi verificado a presença de reação inflamatória crônica granulomatosa do tipo corpo estranho, tanto no *scaffold* com célula tronco mesenquimal, quanto no grupo controle onde foi implantado somente o *scaffold*. Essa reação inflamatória (indicada por triângulos) foi considerada normal para o período avaliado e precede a neoformação óssea. Este processo de formação de tecido ósseo foi verificado nas regiões onde existem ilhas de tecidos neoformados indicados por setas (Figura 4.53 e 4.54).



**Figura 4.54** – Histologia da lamina obtida da Amostra 2 grupo controle sem células. Com aumento de 5x. Setas: indicam as ilhas de neoformação óssea.

A Figura 4.54 representou as imagens obtidas a partir das lâminas de histologia da Amostra 2 que não foram semeadas com células tronco e foram denominadas grupo controle. Nesta figura foi possível verificar a neoformação óssea indicada por setas, porém em quantidades inferiores aos resultados obtidos quando se utilizou células tronco (Figura 4.53), além disso, a intensidade celular que precede a neoformação óssea nesta condição foi visivelmente reduzida e quase inexistente. Estes resultados indicaram que a presença de células tronco mesenquimais nos *scaffolds* implantados potencializou a neoformação óssea, principalmente no interior dos *scaffolds*, onde o crescimento ósseo decorrente da formação não induzida por células tronco foi mais difícil. Fato este que pode ser constatado pelas inúmeras ilhas de neoformação óssea (Figura 4.53) envoltas por infiltrados inflamatórios que precedem a formação óssea.

Normalmente nos ensaios *in vivo* em biomateriais ocorrem o encapsulamento fibroso nos materiais implantados, essa reação ao corpo estranho foi considerada normal. A espessura do encapsulamento fibroso determina o quão compatível foi o material, ou seja, quanto menor a espessura do encapsulamento mais biocompatível foi o material. Os fosfatos de cálcio que foram os materiais utilizados neste trabalho também apresentaram esse encapsulamento fibroso.

O que ocorreu nos primeiros dias foi uma resposta inflamatória aguda originada devido a trefina causar necrose no tecido adjacente ao defeito ósseo criado. O corpo hospedeiro reage gerando uma reação inflamatória aguda. No processo de reação inflamatória aguda, os leucócitos destroem o tecido danificado e enviam sinais aos macrófagos, que ingerem e digerem os antígenos e o tecido morto. A partir desta reação inflamatória inicial o organismo identifica o material implantado como "corpo estranho" e induzem uma reação inflamatória crônica do tipo corpo-estranho.

## 4.16.2 Amostra 4

A Figura 4.55 obtida por estereomicroscópio apresentou o local do defeito na tíbia dos ratos após os períodos de seguimento pré-estabelecidos.

O defeito foi criado no sulco exterior tibial com 3,2mm de diâmetro por 1,2mm de profundidade.

Nas imagens do grupo da Amostra 4 com células MSCs do 7º dia e 14º dia foi possível observar a formação de um tecido sobre a região do defeito, tecido este criado como resultado da cicatrização. O grupo controle (defeito com células MSCs) no 7º dia e 14º dia de seguimento apresentou também a formação de um tecido sobre o defeito, porém por não ter o *scaffold* o defeito ósseo apresenta um leve rebaixo na superfície.



**Figura 4.55** - Imagens obtidas por estereomicroscópio das tíbias pertencentes aos grupos: controle onde o defeito foi semeado com células MSCs (GC) e HA/alfa-TCP (Amostra 4) com células MSCs após 7 e 14 dias de seguimento.

Na Amostra 4 com células MSCs nos tempos de 21 e 30 dias (Figura 4.56) não existe mais a presença do tecido sobre a região do defeito, porém ainda foi possível observar a presença do *scaffold* no 21° dia e no 30° dia o *scaffold* já foi totalmente incorporado ao tecido neoformado, tornando a visualização difícil quando comparada aos grupos com tempos de 7 e 14 dias de seguimento (Figura 4.55).

Nos GC (grupo controle) com 21 e 30 dias foi possível observar que ocorreu o crescimento de tecido ósseo na região do defeito, pois neste período não existe mais o rebaixo na superfície como foi constatado no 7° e 14° dia.



**Figura 4.56** - Imagens obtidas por estereomicroscópio das tíbias pertencentes aos grupos: controle onde o defeito foi semeado com células MSCs (GC) e HA/alfa-TCP (Amostra 4) com células MSCs após 21 e 30 dias de seguimento.
A Figura 4.57 apresenta as radiografias realizadas na Amostra 4 e no grupo controle semeados com células tronco mesenquimais.

O grupo controle com células MSCs no 7° dia apresenta uma fratura no canto esquerdo inferior do furo, porém não apresenta nenhuma alteração na morfologia do osso. A fratura pode ter ocorrido possivelmente por dois fatores: ou foi devido ao processo de trefinação (furação); ou foi durante o período de recuperação dos animais, que por causa do defeito ósseo criado a resistência mecânica diminui consideravelmente. Por se tratar de poucos dias a região do defeito apresentou uma diferença muito grande de densidade quando comparado com a região do osso natural. O defeito com a Amostra 4 com células apresentou uma pequena diferença de densidade entre a região do defeito e do osso natural, porém foi possível visualizar a porosidade da esponja presente no defeito.

No 14º dia o grupo controle apresentou resultados parecidos ao 7º dia, porém com um pequeno aumento na densidade do osso na região do defeito representando um possível crescimento de tecido ósseo. No *scaffold* com células foi possível visualizar uma diferença na densidade do osso na região do defeito que representa a formação do tecido ósseo, além de ainda ser possível visualizar uma estrutura porosa que vem a ser o *scaffold*. Essa estrutura demonstrou ser estável, portanto foi adequada para guiar as células durante o crescimento e proliferação, mantendo a estrutura porosa natural do tecido ósseo.

No 21ºdia o grupo controle com células apresentou uma fratura no osso, porém na região do defeito ósseo a densidade estava muito próxima ao do osso natural representando o tecido neoformado. No grupo da Amostra 4 a densidade estava próxima a do osso natural, porém ainda foi possível visualizar a porosidade do *scaffold*, mas somente na região central, indicando a presença de tecido neoformado nas extremidades e a integração do *scaffold* com os tecidos adjacentes.

No 30° dia o grupo controle apresentou bons resultados, porém a densidade estava diferente do osso natural indicando que não ocorreu a formação completa do tecido ósseo natural. No grupo com a Amostra 4 a região superior do defeito ósseo estava com a densidade idêntica com a do osso porém na região inferior ainda existiu diferença de densidade. Na região central ainda foi possível constatar traços da porosidade do *scaffold*, este fato representou a reabsorção do *scaffold* em algumas regiões formando tecido ósseo novo.

122



**Figura 4.57 -** Radiografias obtidas das tíbias pertencentes ao grupo controle (**GC**) com células mesenquimais (defeito vazio) e HA-TCP (**Amostra 4**) com células mesenquimais, após 7, 14, 21 e 30 dias de seguimento.

A Figura 4.58 apresentou os resultados de microscopia eletrônica de varredura do ensaio *in vivo* realizado na Amostra 4 e no grupo controle (com células tronco mesenquimais).

A Amostra 4 com as MSCs no 7º dia, apresentou uma região bem estruturada pelo *scaffold* e devido ao pouco tempo de ensaio as amostras ainda apresentaram a morfologia dos poros semelhantes ao inicio do teste, porém apresentou boa fixação e integração com o tecido ósseo natural. O grupo controle com células MSCs apresentou uma estrutura mais uniforme do que o grupo controle (Figura 4.52) que não foi semeado com as MSCs, além do tecido neoformado aparentemente ser maior.

No 14ºdia o *scaffold* com células apresentou uma estrutura com poros menores indicando a tendência das células em fechar os poros. Em alguns pontos foi possível visualizar na figura que as células fecharam alguns poros, além disso, a área onde se encontrava o *scaffold* (Amostra 4) os poros estavam menores indicando o processo continuo de fechamento dos poros. O grupo

controle no 14° dia apresentou uma estrutura em forma de vórtice e um pouco desuniforme. Aparentemente os microporos diminuíram dando uma impressão visual de estar mais densa, porém em contrapartida apareceram poros maiores na região central.

No 21º dia a estrutura óssea estava mais bem organizada e com a camada superficial bem alinhada, além de ter apresentado poros pequenos devido ao recobrimento causado pelo tecido ósseo neoformado. Aparentemente a integração foi completa. O grupo controle apresenta uma estrutura óssea bem formada e com a região central em alguns pontos aparentemente densificada e desorganizada, mas ao entorno desta região a amostra apresentou porosidade adequada.

No 30° dia a estrutura óssea formada estava semelhante ao tecido ósseo natural apresentando em alguns pontos certa mudança na morfologia do *scaffold* (Amostra 4) se tornando semelhante ao tecido ósseo natural presente na região de contato. Um fato interessante foi a presença do crescimento de tecido ósseo nos poros, demonstrando a neoformação óssea na parte interna dos *scaffolds*. O grupo controle com as células MSCs apresentou a camada superficial óssea bem reconstruída, com poros fechados, porém apresentou dois poros grandes no centro, que possivelmente são caminhos formados para a passagem de fluídos devido a falta de poros menores espelhados pela estrutura.



**Figura 4.58** - MEV teste *in vivo* com células tronco mesenquimais. GC - Grupo controle. Amostra 4 - HA/alfa-TCP.

## **5 CONCLUSÕES**

Os objetivos propostos foram atingidos com êxito, pois se conseguiu produzir nanopartículas de fosfatos de cálcio pela nova rota baseada na sacarose para a formação do gel e com essas nanopartículas conseguimos produzir os dois tipos de *scaffolds* que foram propostos no início do trabalho. Em todas as caracterizações realizadas, os resultados dos *scaffolds* feitos com material sintetizado, foram muito bons e próximos dos obtidos a partir de materiais importados.

Concluiu-se que os materiais sintetizados e as técnicas aplicadas para a produção dos *scaffolds* foram eficientes e nos permitiu pensar na próxima etapa que é aperfeiçoar os processos e técnicas utilizadas, e assim produzirmos os materiais e os *scaffolds* em larga escala.

A nova técnica de aplicação de solução coloidal para a formação da barbotina se mostrou muito eficiente, pois por comparação com a literatura, constatou-se os bons resultados que obtivemos, em relação a resistência mecânica dos *scaffolds*.

As amostras segundo os ensaios realizados não foram degradadas, porém nos testes *in vivo*, se constatou certa reabsorção dos *scaffolds* durante a neoformação óssea, demonstrando que os *scaffolds* atenderam os objetivos propostos.

Cada tipo de *scaffold* tem uma aplicação apropriada, pois as pastilhas são indicadas onde se necessita mais resistência mecânica e as esponjas são indicadas para locais onde a resistência mecânica não é importante, mas que necessita de uma intensa irrigação tecidual.

Com as células tronco mesenquimais semeadas nos *scaffolds* a formação tecidual foi mais intensa e guiada indicando uma grande redução no tempo de recuperação do tecido injuriado, além de apresentar uma grande integração com o tecido ósseo natural.

Com o MET e EELS foi verificado que, na amostra gel HA o tamanho das partículas é de aproximadamente 20 nm e com indícios de nanopartículas com 5 nm, porém também foram verificados cristais de 500 nm formados por nanoagulhas de aproximadamente 20 nm de largura por 100 nm de comprimento. Este tipo de formação não foi encontrado nas amostras que utilizaram sacarose no processo.

Com MET as amostras gel de HA feita com sacarose, e gel de TCP feita com sacarose não foram localizados cristais de 500 nm como na amostra gel de HA sem sacarose, foram encontrados em sua maioria cristais de 50 nm e na amostra gel HA com sacarose foram encontrados muitos cristais de 10 nm de largura por 50 nm de comprimento e várias nanopartículas esféricas com aproximadamente 5 nm de diâmetro. Esses resultados comprovam a eficiência da sacarose em manter as nanopartículas separadas durante a síntese, garantindo a formação de partículas menores quando se compara com o processo tradicional.

Com base nos resultados apresentados neste trabalho deduziu-se, que os poros e a estrutura da Amostra W não são muito indicados devido à espessura das paredes não permitir uma boa fixação das células, além de serem mais frágeis ao manuseio quando comparados com a Amostra X.

A Amostra X apresentou uma boa estrutura que aparentemente deu boas condições para a adesão celular, apesar disso não foi possível superar os bons resultados da Amostra Z.

A Amostra W não sofreu degradação aparente, porém ocorreram algumas quebras no manuseio, fato que não ocorreu com a Amostra Z, portanto podemos concluir que a Amostra Z proporciona melhores condições de trabalho para a realização dos testes *in vitro* e *in vivo*.

Com os resultados de microscopia eletrônica de varredura e difração de raios X foi comprovado que os *scaffolds* calcinados a 725°C ainda possuem a estrutura em escala nano.

Com os resultados iniciais foi possível comprovar que a melhor temperatura de trabalho foi 1330°C, devido a melhor facilidade de manuseio das amostras, além de proporcionar a melhor superfície para a adesão celular.

Os resultados dos ensaios de potencial Zeta realizados nos testes iniciais indicaram, segundo a literatura que materiais que partem de nanopartículas possuem maior chance de terem boa adesão celular quando comparados com micropartículas.

As imagens de microscopia e microtomografia comprovaram que as amostras produzidas apresentaram estruturas com porosidade adequada para cultivo e crescimento celular.

A difração de raios X comprovou que os materiais nanoparticulados mesmo após a mistura para a fabricação dos compósitos (*scaffolds*), ainda mantiveram suas fases cristalinas, tanto nos materiais comerciais quanto nos materiais sintetizados.

Os resultados da análise por fluorescência de raios X comprovaram que os materiais utilizados não continham metais pesados como contaminantes.

A diferença mais evidente entre os dois tipos de *scaffolds* foi a porosidade, pois é possível verificar que na Amostra 3 (esponja) os poros são interconectados e com tamanho apropriado

para crescimento celular. Essas características possibilitaram a adesão celular na superfície e facilitaram a movimentação das células para o interior do *scaffold*, fato que não aconteceu de forma tão fácil com as pastilhas devido a interconexão entre os poros das pastilhas serem menores.

## 6 SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

- Fazer e caracterizar *scaffolds* recobertos com um filme de PLLA e comparar esses resultados com os resultados de *scaffolds* recobertos com um filme de colágeno.
- Construir um biorreator que seja capaz de reproduzir um ambiente com condições o mais semelhante possível ao meio natural, onde se utilizará células tronco mesenquimais para criar tecidos com características do tecido ósseo natural. Para isso poderão ser utilizados os *scaffolds* desenvolvidos neste trabalho que tem a função de dar suporte para o espalhamento e crescimento celular durante a neoformação óssea.
- Fazer teste *in vivo* nos *scaffolds* feitos com materiais sintetizados no LABIOMEC-FEM-UNICAMP.
- Preparar nanopartículas de fosfatos de cálcio para a utilização na máquina de prototipagem rápida.
- Fazer *scaffolds* utilizando o equipamento de prototipagem rápida e comparar os resultados obtidos com os deste trabalho.
- Realizar ensaios mecânicos para comparação: no osso com s*caffold* semeado com células tronco mesenquimais; no osso com defeito criado por trefina; e no osso sem defeito.

## Referências

1. ABDEL-FATTAH, W.I.; REICHA, F.M.; ELKHOOLY, T. A. Nano-beta-tricalcium phosphates synthesis and biodegradation: 1.Effect of microwave and SO4 2- ions on beta-TCP synthesis and its characterization. **Biomedical Materials**, 3, 1-13, 2008.

2. AGARWAL, A., BUDDHARAJU, K., LAO, I.K., SINGH, N., BALASUBRAMANIAN, N., KWONG, D.L. Silicon nanowire sensor array using top-down CMOS technology. **Sensors and Actuators A**. 145-146, 207-213, 2008.

3. AHN, C.C.; KRIVANEK, O.L.; BURGNER, R.P; DISKO, M.M.; SWANN, P.R. **EELS ATLAS: A reference collection of electron energy loss spectra covering all stable elements**, ASU HREM Facility and Gatan, inc. USA, 1983.

4. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS INTERNATIONAL. ASTM F 1185-03: Standard Specification for Composition of Hydroxyapatite for Surgical Implants. West Conshohocken. Pennsylvania.3p, 2009.

5. ANDRIC, T.; SAMPSON, A.C.; FREEMAN, J.W. Fabrication and characterization of electrospun osteon mimicking scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering:** C. 31, 1: 2-8, 2011.

6. ARINZEH, T.L. Mesenchymal Stem Cells for Bone Repair: Preclinical Studies and Potential Orthopedic Applications. Foot And Ankle Clinics. 10: 651–665, 2005.

7. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO 13781:** Resinas e formas fabricadas de poli (L-lactato) para implantes cirúrgicos - Ensaio de degradação *in vitro*, 1998.

8. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO 10993:** Avaliação Biológica de produtos para saúde. Parte 1 Avaliação e Ensaio, 1999.

9. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO 15814:** Resinas e formas fabricadas de poli (L-lactato) para implantes cirúrgicos - Ensaio de degradação *in vitro*, 2003.

10. ATTWOOD, D.; FLORENCE, A.T. Surfactant systems: their chemistry, pharmacy and biology. London: Chapman and Hall, 1983.

11. AMJAD, Z. Calcium phosphates in biological and industrial systems. 1° Edição. Boston/Dordrecht / London: Kluwer academic publishers, 1997.

12. BELL, D.C.; RUSSO, C.J.; KOLMYKOVD, D.V. 40 keV atomic resolution TEM. **Ultramicroscopy.** 114: 31-37, 2012

13. BELMONTE, E.P. **Espectrometria por fluorescência de raios-X por reflexão total: um estudo simulado utilizando o método de Monte Carlo**. 2005. 156p. Dissertação de (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. 2005

14. BEN-NISSAN, B.; MILEV, A.; VAGO, R. Morphology of sol-gel derived nano-coated coralline hydroxyapatite. **Biomaterials.** 25, 20: 4971-4975, 2004.

15. BEZZI, G.; CELOTTI, G.; LANDI, E.; LA TORRETTA, T.M.G.; SOPYAN, I.; TAMPIERI ampieri, A. A novel sol-gel technique for hydroxyapatite preparation. **Materials Chemistry and Physics**. 78, 816-824, 2003.

16. BIAN, J.; WEI, X.W.; LIN, H.L.; WANG, L.; GUAN, Z.P. Comparative Study on the Exfoliated Expanded Graphite Nanosheet-PES Composites Prepared via Different Compounding Method. **Journal of Applied Polymer Science**, 124: 3547–3557, 2012.

17. BLOEMBERGEN, S.; MCLENNAN, I.J.; LEEUWEN, J.V.; LEE, D.I. **Specialty biobased monomers and emulsion polymers derived from starch**. TAPPI 11<sup>th</sup> Advanced Coating Fundamentals Symposium, October 11-13, 2010, Munich, Germany.

18. BONFIELD, W.; LUKLINSKA, Z. B. **High-Resolution electron microscopy of a bone implant interface. The bone-biomaterial interface.** Edited by J.E. Davis, University of Toronto Press. 89-93, 1991.

19. BOW, J.S.; LIOU, S.C.; CHEN, S.Y. Structural characterization of room-temperature synthesized nanosized ticalcium phosphate. **Biomaterials.** 25, 3155-3161, 2004.

20. BUENO, D.F. **Uso de células tronco adultas para estudo da etiopatogenia das fissura lábio palatinas e bioengenharia de tecidos.** 2007. 116p. Tese de (Doutorado). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 2007.

21. BUENO, D.F.; KERKIS, I.; COSTA, A.M.; MARTINS, M.T.; KOBAYASHI, G.S.; ZUCCONI, E.; FANGANIELLO, R.D.; SALLES, F.T.; ALMEIDA, A.B.; DO AMARAL, C.E.; ALONSO, N.; PASSOS-BUENO, M.R. New source of muscle-derived stem cells with potential for alveolar bone reconstruction in cleft lip and/or palate patients. **Tissue Engineering Part A.** 15, 2: 427-435, 2009.

22. BUENO, D.F.; SUNAGA, D.Y.; GERSON SHIGERU KOBAYASHI, G.S.; AGUENA, M.; RAPOSO-AMARAL, C.E.; MASOTTI, C.; CRUZ, L.A.; PEARSON, P.L.; PASSOS-BUENO, M.R. Human Stem Cell Cultures from Cleft Lip/Palate Patients Show Enrichment of Transcripts Involved in Extracellular Matrix Modeling By Comparison to Controls. **Stem Cell Reviews and Reports.** 7: 446–457, 2011.

23. BUENO, J.M.C. Contribuição ao estudo da preparação e caracterização dos catalisadores de Al-Zn para transformação de etanol em butadieno. 1987. Tese de (Doutorado). Escola Politécnica da USP, São Paulo, São Paulo.

24. CARAYON, M.T.; LACOUT. J.L. Study of the Ca/P atomic ratio of the amorphous phase in plasma-sprayed hydroxyapatite coatings. **Journal of Solid State Chemistry**. 172, 6: 339-350, 2003.

25. CARDOSO, G.B.C. Matriz tridimensional polimérica com adição de cerâmicas para reconstruções ósseas. 2010. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Mecanica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil, 2010.

26. CHEN, Y.; BLOEMEN, V.; IMPENS, S.; MOESEN, M.; LUYTEN, F.P.; SCHROOTEN, J. Characterization and Optimization of Cell Seeding in Scaffolds by Factorial Design: Quality by Design Approach for Skeletal Tissue Engineering. **Tissue engineering: Part C**. 17, 12: 1211-1221, 2011.

27. COSTA, A.M., BUENO, D.F., MARTINS, M.T.; KERKIS, I.; KERKIS, A.; FANGANIELLO, R.D.; CERRUTI, H.; ALONSO, N.; PASSOS-BUENO, M.R. Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. **Journal of Craniofacial Surgery**. 19, 1: 204–210, 2008.

28. COSTA, H.S.; MANSUR, A.A.P.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. Morphological, mechanical, and biocompatibility characterization of macroporous alumina scaffolds coated with calcium phosphate/PVA. Journal of Material Science. 43: 510–524, 2008.

29. CULLITY, B.D.; STOCK, S.R. Elements of X-Ray Diffraction, 3rd Ed., Prentice-Hall Inc.; 2001, p 167-171.

30. CÜNEYTTAS, A.; KORKUSUZ, F.; TIMUÇIN, M.; AKKAS, N. An investigation of the chemical synthesis and high-temperature sintering of calcium hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP) bioceramics. **Journal of Materials Science, Materials in Medicine**. 8, 91-96, 1997.

31. DACULSI, G.; LEGEROS, R. Z.; DEUDON, C. Scanning and transmission electron microscopy, and electron probe analysis of the interface between implants and host bone. **Scanning Microscopy.** 4, 2: 309-314, 1990.

32. DACULSI, G.; LEGEROS, R. Z.; LEGEROS, J. P.; MILTRE, D. Lattice defects in calcium phosphate ceramics: high resolution TEM ultraestructural study. **Journal of Applied Biomaterials.** 2, 3: 147-152, 1991.

33. DANILATOS, G.D. Foundations of environmental scanning electron microscopy. Advances in Electronics and Electron Physics. 71: 109–250, 1988

34. DEAN-MO, L.; TROCZYNSKI, T.; TSENG, W.J. Water-based sol-gel synthesis of hydroxyapatite: process development. **Biomaterials**. 22: 1721-1730, 2001.

35. DEER, W.A.; HOWIE, R.A.; ZUSSMAN, J. An Introduction to Rock-forming minerals. Volume 5B: Non-silicates: sulphates, carbonates, phosphates and Halides. Second edition. John Willey & Sons, 1972.

36. DE GROOT, K.; KLEIN, C.P.A.T.; WOLKE, J.G.C.; DE BLIEK-HOGERVORST, J. Chemistry of calcium phosphate bioceramics. **Handbook of Bioactive Ceramics**, Vol. II, **Calcium phosphate and hydroxylapatite Ceramics**, Editores YAMAMURO, T., HECH, L.L, WILSON, J. Boca Ratón, FI (USA), CRC Press. 3-15, 1990.

37. DREXLER, K. E. Nanosystems - Molecular machinery, manufacturing, and computation (Book). New York, NY: John Wiley & Sons, Inc , 1992.

38. DING, M.; DALSTRA, M.; DANIELSEN, C.C.; KABEL, J.; HVID, I.; LINDE, F. Age variations in the properties of human tibial trabecular bone. **The journal of bone and joint surgery**. 79-b, 6: 995-1002, 1997.

39. DOROZHKIN, S.V. Review Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates. Acta Biomaterialia. 8, 3: 963–977, 2012.

40. DUBOK, V.A. Bioceramics – Yesterday, today, tomorrow. **Powder metall met C+.** 39, 7-9: 381-394, 2000.

41. DUCHEYNE, P.; BIANCO, P.; RADIN, S.; SHEPERS, E. **Bioactive materials:** mechanisms and bioengineering considerations. Bone-Bonding Materials. Edited by DUCHEYNE, P., KOKUBO, T., VAN BLITTERSWIJK, C. A. Reed Healthcare Communications, Leiderdop, The Netherlands, 1-12, 1992.

42. DUVAIZEM, J.H. Estudo das propriedades mecânicas e microestruturais de ligas à base de titânio-nióbiozircônio processados com hidrogênio e metalurgia do pó para utilização em implantes dentários. 2009. Dissertação de (Mestrado). Instituto de pesquisas energéticas e nucleares, USP, São Paulo, São Paulo.

43. EGERTON, R.F. Electron Energy-Loss Spectroscopy in the electron microscope. 3<sup>rd</sup> Edition, Springer, 491pp. 2011.

44. EGERTON, R.F. REVIEW: Electron energy-loss spectroscopy in the TEM. **Reports on Progress in Physics**. 72, 1: 25pp, 2009.

45. ELLIOT, J.C. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 1994. 389 pp.

46. ESTACIA, P.; SANTOS JR, A.R.; GENARI, S.C. Assessment of the possible toxic effect of a semifluorinated alkane on Vero cell culture. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. 67, 6: 905-1010, 2004.

47. FAHLMAN, B.D. Materials Chemistry. Nanomaterials, Springer, Dordrecht. The Netherlands, 2007, Cap. 6, pp. 275-356.

48. FENG, W., MU-SEN, L., YU-PENG, L, YONG-XIN, Q. A simple sol-gel technique for preparing hydroxyapatite nanopowders. **Materials Letters**, 59, 916-919, 2005.

49. FRESHNEY, R.I. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 6° edição. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. 2010.

50. GALDINO, A.G.S. **Produção e caracterização de arcabouços porosos de compósitos hidroxiapatita-titânia (HA-TiO<sub>2</sub>) para uso em engenharia tecidual óssea.** 2011. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Mecanica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil, 2011.

51. GAN, L.; PILLIAR, R. Calcium phosphate sol-gel derived thin films on porous-surfaced implants for enhanced osteoconductivity. Part I: Synthesis and characterization. **Biomaterials.** 25, 22: 5303-5312, 2004.

52. GOMIDE, V.S. **Caracterização de compósitos hidroxiapatita-particulados através das propriedades mecânicas**. 2005. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Mecanica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil, 2005.

53. GUHA, A.K.; SINGH, S.; KUMARESAN, R.; NAYAR, S.; SINHA, A. Mesenchymal cell response to nanosized biphasic calcium phosphate composites. **Colloids and Surfaces B: Bionterfaces**. 73, 146-151, 2009.

54. GUO, C.; GUO, X.; CAI, N.; DONG, Y. Novel fabrication method of porous poly(lactic acid) scaffold with hydroxyapatite coating. **Materials Letters**. 74: 197–199, 2012.

55. GUO, X.; XIAO, P. Effects of solvents on properties of nanocrystalline hydroxyapatite produced from hydrothermal process. Journal of the European Ceramic Society. 26: 3383–3391, 2006.

56. GURKAN, U.A.; KISHORE, V.; CONDON, K.W.; BELLIDO, T.M.; AKKU, O. A Scaffold-Free Multicellular Three-Dimensional In Vitro Model of Osteogenesis. **Calcified Tissue International**, 88: 388-401, 2011. 57. HENCH, L.L.; WILSON, J. Introduction to Bioceramics. Singapore: Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, 1-15, 1993.

58. HERRING, H.; HEMPELMANN, R. A colloidal approach to nanometre-sized mixed oxide ceramic powers. **Materials Letters**. 27: 287-292, 1996.

59. HULBERT, S.F.; BOKROS, J.C.; HENCH, L.L.; WILSON, J.; HEIMKE, G. Ceramics in Clinical Applications: Past, Present and Future, en High Tech Ceramics. Editado por P. Vincenzine. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. 189-213, 1987.

60. HYUN, S.J.; HAN, D.K.; CHOI, S.H.; CHAI, J.K.; CHO, K.S.; KIM, C.K.; KIM, C.S. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2, -4, and -7 on bone formation in rat calvarial defects. **Journal of Periodontology.** 76, 10: 1667-1674, 2005.

61. INTERNATIONAL STANDARD. ISO 10993-5 I (E): Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods, 1992.

62. INTERNATIONAL STANDARD. **ISO 10993:** Biological evaluation of medical devices – part 1 – Evaluation and testing, 1997.

63. JARCHO, M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics, **Cli. Orthop. Relat. Res.** 157, 6: 259-278, 1981.

64. JUN, Y.-K.; KIM, W.H.; KWEON, O.-K.; HONG, S.-H. The fabrication and biochemical evaluation of alumina reinforced calcium phosphate porous implants. Biomaterials. 24: 3731–3739, 2003.

65. KAMBLE, R.B., MATHE, V.L. Nanocrystalline nickel ferrite thick film as an efficient gas sensor at room temperature. **Sensors and Actuators B.** 131: 205-209, 2008.

66. KAY, M.I; YOUNG, R.A.; POSNER, A.S. Crystal Structure of Hydroxyapatite. **Nature.** 204: 1050-1052, 1964.

67. KIRKPATRICK, C.J. Biological testing of materials and medical devices - A critical view of current and proposed methodologies for biocompatibility testing: cytotoxicity in vitro. **Regulatory Affairs.** 4, 1:13-32, 1992.

68. KOTOBUKI, N.; IOKU, K.; KAWAGOE, D.; FUJIMORI, H.; GOTO, S.; OHGUSHI, H. Observation of osteogenic differentiation cascade of living mesenchymal stem cells on transparent hydroxyapatite ceramics. **Biomaterials**, 26, 7: 779-785, 2005.

69. KRUGER, E.A.; IM, D.D.; BISCHOFF, D.S.; PEREIRA, C.T.; HUANG, W.; RUDKIN, G.H.; YAMAGUCHI, D.T.; MILLER, T.A. In Vitro Mineralization of Human Mesenchymal Stem Cells on Three-Dimensional Type I Collagen versus PLGA Scaffolds: A Comparative Analysis. **Plastic and Reconstructive Surgery**. 127, 6: 2301-2311, 2011.

70. LARANJEIRA, M.S.; FERNANDES, M.H.; MONTEIRO, F.J. Innovative macroporous granules of nanostructured-hydroxyapatite agglomerates: Bioactivity and osteoblast-like cell behavior. Journal of Biomedical Materials Research A. 95a, 3: 891 – 900. 2010.

71. LEGEROS, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. Clinical Orthopedics and Related Research. 395: 81-98, 2002.

72. LEGEROS, R.Z.; LEGEROS, J.P. Dense Hydroxyapatite. Em An Introduction to Bioceramics. Hench, L.L.; Wilson, J. 1<sup>a</sup> Edição Singapore: World Scientific, Singapore, 139–180, 1993.

73. LEGEROS, R.Z. Calcium phosphates in oral biology and medicine. Monographs in oral Science, Vol. 15, HM Myers, (ed.) S. Karger, Basel, Switzerland., 1991.

74. LEVITT, S.R.; CRAYTON, P.H.; MONROE, E.A.; CONDRATE, R.A. Forming Method for Apatite Prostheses. J. Biomed. Mater. Res. 3, 4: 683–684, 1969.

75. LIVAGE, J., SANCHEZ, C., HENRY, M., DOEUFF, S. The chemistry of the sol-gel process. **Solid State Ionics**, 32-33, 2, 633-638, 1989.

76. LOFFREDO, M.C.M. **Resistência mecânica e tenacidade a fratura do osso cortical bovino**. 2006. Dissertação de (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

77. LUO, X.; MORRIN, A.; KILLARD, A. J.; SMYTH, M. R. Application of naoparticles in electrochemical sensors and biosensors. **Electroanalysis.** 4: 319-326, 2006.

78. MAVROPOULOS, E. A hidroxiapatita como absorvedor de metais. 1999. 105p. Dissertação de Mestrado. Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública. Rio de Janeiro, Brasil, 1999.

79. MENESES, C.T. **Propriedades elétricas e estruturais de óxidos de manganês obtidos via processo sol-gel protéico**. 2003. Dissertação de (Mestrado). Universidade Federal de Sergipe, Sergipe.

80. MENESES, J.C.A., **Filmes finos de LiMn2O4 via processo sol-gel protéico**. 2004. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Sergipe, Sergipe.

81. MEYER, F., HEMPEMANN, R.; MATHURB, S, VEITHB, M. Microemulsion mediated sol–gel synthesis of nano-scaled MAl2O4 (M=Co, Ni, Cu) spinels from single-source heterobimetallic alkoxide precursors. **Journal of Materials Chemistry**. 9: 1755-1763, 1999.

82. MOHAMMADI, M.R.; FRAY, D.J. Synthesis of Nanostructured and Nanoporous TiO2-AgO Mixed Oxide Derived from a Particulate Sol-Gel Route: Physical and Sensing Characteristics. **Metallurgical and Materials Transactions A**. 42A: 2011-2481, 2011.

83. MORELLI, F.C. Nanocompósitos de PP/PP-g-AM/argila organofílica: processamento, propriedades mecânicas, termo-mecânicas e permeação de gás. 2009. Dissertação de (Mestrado). Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo.

84. NAG, M., BASAK, P., MANORAMA, S. V. Low-Temperature hydrothermal synthesis of phase-pure rutile titania nanocrystals: Time temperature tuning of morphology and photocatalytic activity. **Materials Research Bulletin**. 42: 1691-1704, 2007.

85. NAJAFI, H.; NEMATI, Z.A.; SADEGHIAN, Z. Inclusion of carbon nanotubes in a hydroxyapatite sol-gel matrix. **Ceramics International**. 35: 2987–2991, 2009.

86. NALDONI, A.; MINGUZZI, A.; VERTOVA, A.; DAL SANTO, V.; BORGESE, L.; BIANCHI, C.L. Electrochemically assisted deposition on TiO2 scaffold for Tissue Engineering: an apatite bio-inspired crystallization pathway. **Journal of Materials Chemistry.** 21: 400-407, 2010.

87. OLIVEIRA, S.V.; MEDEIROS, K.M.; ARAÚJO, E.P.; BRAGA, C.R.C.; ARAÚJO, E.M.; FOOK, M.V.L. Caracterização química e morfológica do pirofosfato de cálcio obtido por via úmida. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, 4.3: 11-20, 2009.

88. OLIVEIRA, P.P.M. Uso de membrana de poli (álcool vinílico) –PVAI como substituto pericárdico – Trabalho Experimental. 2008. 58p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

89. PECHINI, M. P. Method of preparing lead and alkaline earth titanates and niobates and coating method using the same to form a capacitor, **United States Pattent Office** – 3,330,697, 1967.

90. PENOLAZZI, L.; MAZZITELLI, S.; VECCHIATINI, R.; TORREGGIANI, E.; LAMBERTINI, E.; JOHNSON, S.; BADYLAK, S.F.; PIVA, R.; NASTRUZZI, C. Human Mesenchymal Stem Cells Seeded on Extracellular Matrix-Scaffold: Viability and Osteogenic Potential. Journal of Cellular Physiology. 227, 2: 857-866, 2012.

91. PINHEIRO, E.A., **Uso de Métodos sol-gel e de coprecipitação na preparação de óxidos metálicos**. 1992. Tese de (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

92. QUINA, F.H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectiva e riscos. **Química nova**. 27, 6, pp.1028-1029, 2004.

93. RAPOSO-AMARAL, C.E.; KOBAYASHI, G.S.; ALMEIDA, A.B.; BUENO, D.F.; FREITAS, F.R.S.; VULCANO, L.C.; PASSOS-BUENO, M.R.; ALONSO, N. Alveolar osseous defect in rat for cell therapy. Preliminary report. **Acta Cirúrgica Brasileira**. 25, 3: 264-268, 2010.

94. RAVAGLIOLI, A.; KRAJEWSKI, A.; BIASINI, V.; MARTINETTI, R.; MANGANO, C.; VERINI, G. Interface between hydroxyapatite and mandibular human bone tissue. **Biomaterials.** 13, 3: 162-167, 1992.

95. REBELO, A.H.S. **Preparação de hidroxiapatita nanométrica com caracteristicas adequadas ao processamento coloidal para aplicação biométicas.** 2006. 78p. Disseratação de Mestrado. Universidade de Aveiro. Aveiro, Portugal, 2006.

96. RÉFEGA, R.J.M. **Nanopartículas para aplicação biomédica.** 2010. 82p. Dissertação de Mestrado. Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, Portugal, 2010.

97. REY, C.; COMBES, C.; DROUET, C.; SFIHI, H.; BARROUG, A. Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials. **Materials Science Engineering C**. 27: 198–205, 2007.

98. REYNOLDS, E.C.; WONG, A. Effect of adsorbed protein on hydroxyapatite zeta potential and *streptococcus mutans* Adherence. **Infection and Immunity**. 39, 3: 1285-1290,1983.

99. RODRIGUES, L.R.; DIAS, C.G.B.T.; CERAGIOLI, H.J.; RODAS, A.C.D.; MONTEIRO, F.J.M.; ZAVAGLIA, C.A.C. FTIR Analysis and Cytotoxicity Test of Titanium Dioxide Nanoparticles. **Key Engineering Materials**. 493-494: 768-774, 2012.

100. RODRIGUES, L. R.; DIAS, C.G.B.T.; MONTEIRO, F.J.M.; ZAVAGLIA C.A.C. Synthesis of Hydroxyapatite and beta Tricalcium Phosphate Using Sol-Gel Process and Analysis with FTIR. 21st International Congress of Mechanical Engineering, 2011, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

101. RODRIGUES, L.R.; MOTISUKE, M.; ZAVAGLIA C.A.C. Synthesis of b-TCP nanoparticles by sol-gel process. 6th Latin American Congress of Artificial Organs and Biomaterials, 2010, Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil.

102. RODRIGUES, L.R.; MOTISUKE, M.; ZAVAGLIA, C.A.C. Synthesis of nanostructured hydroxyapatite: A comparative study between sol-gel and aqueous solution precipitation. **Key Engineering Materials**, 396-398: 623-626, 2009.

103. RODRIGUES, L.R. **Síntese e caracterização de hidroxiapatita e titânia nanoestruturadas para a fabricação de compósitos.** 2008. 92p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil, 2008.

104. RODRIGUEZ, G.N.P.; RODRIGUES, L.R.; DIAS, C.G.B.T.; D'ÁVILA, M.A.; ZAVAGLIA, C.A.C. Electrospun Scaffolds Composed of Poly(L-lactic acid) and Hydroxyapatite. **Key Engineering Materials.** 493-494: 872-877, 2012.

105. SAGAWA, H.; ITOH, S.; WANG, W.; YAMASHITA, K. Enhanced bone bonding of the hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate composite by electrical polarization in rabbit long bone. **Artificial Organs**. 34, 6: 491-497, 2010.

106. SALERNO, A.; GUARNIERI, D.; IANNONE, M.; ZEPPETELLI, S.; NETTI, P. A. Effect of Micro- and Macroporosity of Bone Tissue Three-Dimensional-Poly(e-Caprolactone) Scaffold on Human Mesenchymal Stem Cells Invasion, Proliferation, and Differentiation In Vitro. **TISSUE ENGINEERING: Part A.** 16, 8: 2661-2673, 2010.

107. SANTOS, M.L. Aplicação do processo sol-gel na produção de recobrimentos de hidroxiapatita sobre ligas a base de Ti empregadas em implantes odontológicos. 2005. 151p. Tese de Doutorado. Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil, 2005a.

108. SANTOS, M.L.; FLORENTINO, A.O..; SAEKI, M.J.; APARECIDA, A.H.; LIA FOOK, M.V.; GUASTALDI, A.C. Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. **Eclética Química**. 30, 3: 29-35, 2005b.

109. SANASA. Informações extraídas no dia 18 de maio de 2012. Site pesquisado: http://www.sanasa.com.br/document/analiseagua/2\_3\_20111231.pdf

110. SASTRE, R., AZA, S., ROMÁN, J. S., **Biomateriales**. Faenza, Itália: Faenza Editrice Iberica S.L. 1., 2004, 515pp.

111. SCHRAMM, G. A Pratical approach to rheology and rheometry. Gebrueder Haake, 1<sup>ST</sup> edition, 1994, pp 290.

112. SEGAL, D.L. Sol-gel processing: Routes to oxide ceramics using colloidal dispersions of hydrous oxide and alkoxide intermediates. **Journal of Non-Crystalline Solids**. 63, 1-2: 183 – 191, 1984.

113. SHACKELFORD, J.F. Bioceramics: Current status and future trends. Mater Sci. Forum. 293: 99-106, 1999.

114. SHARMA, M.K.; SHAH, D.O. In macro and microemulsions: theory and applications. Sha, D.O. (Ed.). Washington, D.C.: American Chemical Society, (ACS Symposium Series, Vol. 272), 1985.

115. SHEN, Y.; WANG, X.; XIE, A.; HUANG, L.; ZHU, J.; CHEN, L. Synthesis of dextran/Se nanocomposites for nanomedicine application. **Materials Chemistry and Physics**, 109: 534-540, 2008.

116. SHI, D.; XUEJUN, W. **Bioactive Ceramics: Structure, Synthesis, and Mechanical Properties**. Introduction to Biomaterials. ed. by D. Shi. Tsinghua University Press, Beijing, 13–28, 2006.

117. SJÖGREN, G.; SLETTEN, G.; DAHL, J.E. Cytotoxicity of dental alloys, metals and ceramics assessed by Millipore filter, agar overlay and MTT tests. **The Journal of Prosthetic Dentistry.** 84, 2: 229-236, 2000.

118. SMALL, D.M. Liquid crystals in living and dying systems. Journal Colloid interface Science, 58: 3; 581-602, 1977.

119. SMITH, L.A.; MA, P.X. Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces and Nanotechnology. 39, 3: 125-131, 2004.

120. SOUZA, E.A.; DUQUE, J.G.S.; KUBOTA, L.; MENESES, C.T. Synthesis and characterization of NiO and NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles obtained by a sucrose-based route. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**. 68, 594-599, 2007.

121. SU, B.; ZHANG, G.; YU, X.; WRANG, C. Sol-gel derived bioactive hydroxyapatite/titania composite films on  $Ti_6Al_4V$ . Journal of University of Science and Technology Beijing: Mineral Metallurgy Materials (Eng Ed), 13, 5: 469-475, 2006.

122. SUK-JU, H.; DONG-KWAN, H.; SEONG-HO, C.; JUNG-KIU, C.; KYOO-SUNG, C.; CHONG-KWAN, K.; CHANG-SUNG, K. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2, -4, and -7 on bone formation in rat calvarial defects. **Journal of Periodontology**. 76, 10:1667-1674, 2005.

123. SZ-CHIAN, L.; SAN-YUAN, C.; HSIN-YI, L.; JONG-SHING, B. Structural characterization of nano-sized calcium deficient apatite powders. **Biomaterials.** 25, 2: 189-196, 2004.

124. TAMARI, S. Optimum design of the constant-volume gas pycnometer for determining the volume of solid particles. **Measurement Science Technology**. 15: 549-558, 2004.

125. THIMM, B.W.; WÜST, S.; HOFMANN, S.; HAGENMÜLLER, H.; MÜLLER, R. Initial cell pre-cultivation can maximize ECM mineralization by human mesenchymal stem cells on silk fibroin scaffolds. **Acta Biomaterialia**. 7: 2218–2228, 2011.

126. TOUMEY, C. Apostolic Succession: Does Nanotechnology Descend from Richard Feynman's 1959 Talk? **Engineering and Science**. 68,1: 16-23, 2005.

127. UDOH, K.I.; MUNAR, M.L.; MARUTA, M.; MATSUYA, S.; ISHIKAWA, K. Effects of sintering temperature on physical and compositional properties of  $\alpha$ -tricalcium phosphate foam. Dental Materials Journal. 29, 2: 154–159, 2010.

128. VALLET-REGI, M. Ceramics for medical applications, J. Chem Soc Dalton. 2, 97-108, 2001.

129. WHITE, A.A.; BEST, S.M.; KINLOCH, I.A. Hydroxyapatite-Carbon Nanotube Composites for Biomedical Applications: A Review. Int. J. Appl. Ceram. Technol. 4, 1: 1-13, 2007.

130. WILLIAMS, D.F. **Definitions in Biomaterials**. European Society for Biomaterials. Amsterdam: Edição, Elsevier, 1987, 72pp.

131. WIKIPEDIA. Página extraída de http://pt.wikipedia.org/wiki/Escala\_de\_Mohs no dia 5 de janeiro de 2012.

132. ZHANG, Y.; CAI, X.; CHOI, S.W.; KIM, C.; WANG, L.V.; XIA, Y. Chronic label-free volumetric photoacoustic microscopy of melanoma cells in three-dimensional porous Scaffolds. **Biomaterials**, 31, 33: 8651-8658, 2010.

133. ZHU, X.; EIBL, O.; BERTHOLD, C.; SCHEIDELER, L.; GEIS-GERSTORFER J. Structural characterization of nanocrystalline hydroxyapatite and adhesion of pre-osteoblast cells. **Nanotechnology**. 17: 2711-2721, 2006.

## ANEXO A – Trabalhos publicados em revistas e congressos

RODRIGUES, L.R.; DIAS, C.G.B.T.; CERAGIOLI, H.J.; RODAS, A.C.D.; MONTEIRO, F.J.M.; ZAVAGLIA, C.A.C. FTIR Analysis and Cytotoxicity Test of Titanium Dioxide Nanoparticles. **Key Engineering Materials**. 493-494: 768 - 774, 2012.

RODRIGUEZ, G.N.P.; RODRIGUES, L.R.; DIAS, C.G.B.T.; D'ÁVILA, M.A.; ZAVAGLIA, C.A.C. Electrospun Scaffolds Composed of Poly(L-lactic acid) and Hydroxyapatite. **Key Engineering Materials**. 493-494: 872 - 877, 2012.

Artigo aprovado para apresentação em Congresso: RODRIGUES, L.R.; ALMEIDA, A.B.A.; FELICIANO, D.F.; RAPOSO-AMARAL, C.E.; PASSOS-BUENO, M.R.; BUENO, D.F.; ALAMADA, B.V.P.: MONTEIRO, F.J.M.: ZAVAGLIA, C.A.C. Inclusão de células mesenquimais em scaffold de fosfato de cálcio para testes *in vivo*. 7th Latin American Congress of Artificial Organs and Biomaterials, 22 a 25 de Agosto de 2012, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

Artigo aprovado para apresentação em Congresso: RODRIGUES, L.R.; RODAS, A.C.D.; BASSI, E.J.; ALMEIDA, D.C.; CÂMARA, N.O.S.; MONTEIRO, F.J.M.; ZAVAGLIA, C.A.C. Síntese de nanopartículas de fosfatos de cálcio utilizadas na fabricação de *scaffolds* aplicados na engenharia tecidual óssea: avaliação *in vitro* da interação de células tronco mesenquimais. 7th Latin American Congress of Artificial Organs and Biomaterials, 22 a 25 de Agosto de 2012, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

Artigo aprovado para apresentação em Congresso: RODRIGUEZ, G.N.P; RODRIGUES, L.R.; MOTA, A.C.; RODAS, A.C.D.; BASSI, E.J.; ALMEIDA, D.C.; CÂMARA, N.O.S.; DUEK, E.A.R.; ZAVAGLIA, C.A.C.; DIAS, C.G.B.T.; D'ÁVILA, M.A. Ensaios "*in vitro*" de nanofibras de PLLA e PLLA/HA obtidas por eletrofiação. 7th Latin American Congress of Artificial Organs and Biomaterials, 22 a 25 de Agosto de 2012, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

Artigo aprovado para apresentação em Congresso: RODRIGUES, L.R.; RODRIGUES, A.M.; BATISTA, N.A.; MONTEIRO, F.J.M.; BELANGERO, W.D.; ZAVAGLIA, C.A.C. In Vitro Evaluation Of HA/TCP Scaffold. 2012 Annual Meeting of Biomedical Engineering Society -BMES, Atlanta, USA. 24-27 Outubro 2012.

Artigo aprovado para apresentação em Congresso: RODRIGUEZ, G.N.P; RODRIGUES, L.R.; ZAVAGLIA, C.A.C.; DIAS, C.G.B.T.; D'ÁVILA, M.A. Forcespinning scaffold composed of Poly(L-Lactic acid) and hydroxyapatite. 2012 Annual Meeting of Biomedical Engineering Society - BMES, Atlanta, USA. 24-27 Outubro 2012.

GABRIEL, L.P.; SANTOS, D.J.; RODRIGUES, L.R.; ZAVAGLIA C.A.C.; MUNHOZ, A.L.J.; BÁRTOLO, P.J.S.; DIAS, C.G.B.T.; FILHO, R.M. **Polyurethane foams as biomedical devices for tissue engineering**. 1st International Conference on Design and Processes for Medical Devices, May 2 – May 4, 2012, Padenghe Sul Garda – Brescia – Italy.

GABRIEL, L. P.; SANTOS, D. J.; RODRIGUES, L. R.; ZAVAGLIA C.A.C.; MUNHOZ, A.L.J., DIAS, C.G.B.T.; FILHO, R.M. **Poliuretanos para engenharia tecidual**. 11° Congresso Brasileiro de Polímeros, 2011, Campos do Jordão, São Paulo, Brasil.

RODRIGUES, L. R.; DIAS, C.G.B.T.; Monteiro, F.J.M.; ZAVAGLIA C.A.C. Synthesis of Hydroxyapatite and beta Tricalcium Phosphate Using Sol-Gel Process and Analysis with FTIR. 21st International Congress of Mechanical Engineering, 2011, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

COSTA, G.M.; GALDINO, A.G.; RODRIGUES, L. R.; DA SILVA, M. R.; ZAVAGLIA C.A.C. **Caracterização estrutural de compósitos porosos de hidroxiapatita-titânia**. 6th Latin American Congress of Artificial Organs and Biomaterials, 2010, Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil.

RODRIGUEZ, G.N.P.; RODRIGUES, L. R.; RAMOS, S.L.F.; D'ÁVILA, M.A.; ZAVAGLIA C.A.C. Electrospinning of nanocomposites of poly (L-Lactic Acid) with hydroxyapatite for bone regeneration. 6th Latin American Congress of Artificial Organs and Biomaterials, 2010, Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil.

RODRIGUES, L. R.; MOTISUKE, M.; ZAVAGLIA C.A.C. **Synthesis of b-TCP nanoparticles by sol-gel process.** 6th Latin American Congress of Artificial Organs and Biomaterials, 2010, Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil.

RODRIGUES, L. R.; MONTEIRO, F.J.M.; ZAVAGLIA C.A.C. Synthesis and Caracterization of Nanocrystalline Hydroxyapatite Gel Obtained by Sol-Gel Process. 19° Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2010, Campos do Jordão, São Paulo, Brasil.

RODRIGUES, L.R.; GOMIDE, V.; GONÇALVES, C.; ZAVAGLIA, C.A.C.; FERNANDES, M.H.; MONTEIRO, F.J.M. Characterization and in vitro evaluation of hydroxyapatite and beta-TCP scaffolds in the presence of human mesenchymal cells. 50° Congreso de la SECV-Sociedad Española de Cerâmica y Vidrio, 2010, Madrid, España.

RODRIGUES, L.R.; MOTISUKE, M., ZAVAGLIA, C. A. Synthesis of Nanostructured Hydroxyapatite: A Comparative Study between Sol-Gel and Aqueous Solution Precipitation. **Key Engineering Materials**. 396-398: 623 - 626, 2009.

RAMOS, S.L.F.; MOTISUKE, M.; RODRIGUES, L. R.; ZAVAGLIA, C. A. Whisker-Like Hydroxyapatite Synthesized by Molten Salt Synthesis (MSS) of Nano-Hydroxyapatite in a KCl/NaCl Flux. **Key Engineering Materials**. 396-398: 497 - 500, 2009.

RODRIGUES, L.R.; COSTA, G.M.; MOTISUKE, M.; ZAVAGLIA, C.A.C. Síntese de hidroxiapatita nanoestruturada para compósitos utilizados na fabricação de scaffolds. 2º Encontro Nacional de Engenharia Biomecânica, 2009, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

RODRIGUES, L.R.; MOTISUKE, M.; ZAVAGLIA, C.A.C. A Comparative Study on the Synthesis of HA Nanostructured: Conventional and Proteic Sucrose Sol-Gel Process. 8th World Biomaterials Congress, 28 de maio a 01 de junho de 2008, Amsterdã, Holanda.

RODRIGUES, L.R.; CERAGLIOLI, H.J.; BARANAUSKAS, V.; ZAVAGLIA, C.A.C. Síntese e Caracterização de TiO<sub>2</sub> (anatase) Nanocristalino. V Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais, 22 a 25 de junho de 2008, Ouro Preto, MG, Brasil.

RODRIGUES, L.R.; MOTISUKE, M.; ZAVAGLIA, C.A.C. Ensaio mecânico de compósito de HA/titânia nanoestruturadas. XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 16 a 20 de novembro de 2008, 1210-1213p, Salvador, BA, Brasil.

RODRIGUES, L. R. WHAT THEY SAY ABOUT THEIR PARTICIPATION IN EBW. Euro Brazilian Windows Newsletter. http://ebw.up.pt/?lang=EN, p.1 - 4, 2011.

RODRIGUES, L. R.; DIAS, C.G.B.T.; Ceragioli, H. J.; RODAS, A.C.D.; Monteiro, F.J.M.; ZAVAGLIA C.A.C. Ensayo de citotoxicidad de las nanopartículas de dióxido de titanio desarrollado en el laboratorio, 2012. (Palestra de apresentação de trabalho) em Conferencia Internacional Nuevos Materiales en la Era de la Convergencia - Universidad de la Habana, Cuba.

ZAVAGLIA, C.A.C.; RODRIGUES, L.R.; DIAS, C.G.B.T.; RODRIGUEZ, G.N.P.; LOMBELLO, C. B.; D'ÁVILA, M.A. **Dispositivo modular de rotofiação, método de operação e uso.** Depósito de pedido de patente no INPI em 10/04/2012, código BR1020120084040.