

## MARINA SALVARANI TONOLI

# Obtenção e caracterização de cimentos de fosfato de cálcio $(\beta - TCP)$ contendo quitosana

Campinas

2013



### UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

## MARINA SALVARANI TONOLI

# Obtenção e caracterização de cimentos de fosfato de cálcio $(\beta - TCP)$ contendo quitosana

Orientadora: Marisa Masumi Beppu

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em Engenharia Química. Área de concentração Engenharia de Processos.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA MARINA SALVARANI TONOLI E ORIENTADA PELA PROFA.DRA. MARISA MASUMI BEPPU

Assinatura do Orientador

eme

Campinas

2013

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

Tonoli, Marina Salvarani, 1983 T6160 Obtenção e caracterização de cimentos de fosfato de cálcio (b-TCP) contendo quitosana / Marina Salvarani Tonoli. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Marisa Masumi Beppu. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Fosfatos de cálcio. 2. Biomateriais. 3. Quitosana. I. Beppu, Marisa Masumi,1975-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Preparation and characterization of calcium phosphates cements (b-TCP) containing chitosan Palavras-chave em inglês: Calcium phosphates Biomaterials Chitosan Área de concentração: Engenharia de Processos Titulação: Mestra em Engenharia Química Banca examinadora: Marisa Masumi Beppu [Orientador] Cecilia Amélia de Carvalho Zavaglia Bronislaw Polackievicz Data de defesa: 11-07-2013 Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE PROCESSOS

## DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Autora: Marina Salvarani Tonoli

Orientadora: Marisa Masumi Beppu

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:

Profa. Dra. Marisa Masumi Beppu, Presidente Universidade Estadual de Campinas, FEQ/ UNICAMP

ovol

Profa. Dra. Cecilia Amélia de Carvalho Zavaglia Universidade Estadual de Campinas, FEM/UNICAMP

Prof. Dr. Bronislaw Polackievicz Universidade de São Paulo, FCF/USP

#### AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora **Marisa Masumi Beppu**, que desde nossa primeira conversa depositou toda sua confiança no meu trabalho e que mesmo nos momentos difíceis e de quase desistência com sabedoria me guiou pelo melhor caminho.

À **Profa. Dra. Mariana Motisuke** que muitas vezes me guiou na condução dos experimentos e no entendimento dos resultados, clareando minhas idéias e ajudando a seguir em frente com o projeto.

Ao meu companheiro **Carlos Alberto Caressato Jr.** que com muito amor e de dedicação suportou todo o desenvolvimento deste trabalho principalmente em meus momentos de ausência.

Aos meu pais Alda Salete Salvarani Tonoli e José Tonoli, que souberam com humildade me dar toda a formação e educação que foram base para que eu me tornasse hoje a pessoa que sou.

Aos meus queridos irmãos **César Salvarani Tonoli** e **Flavia Salvarani Tonoli** que sempre me apoiaram na decisão de seguir em frente com o mestrado.

Não poderia deixar também de agradecer aos meus colegas do LEQUIP, **Mariana Moraes** e **Rodrigo Balloni** que sempre em momentos de necessidade estavam a postos para ajudar. E a colega **Kelly** (LUC/FEQ) pelo apoio nas microscopias e difratogramas.

Agradeço a empresa **3M do Brasil** na figura de seus profissionais **Camila V. M. dos Santos Cruz e Ricardo C. Campagnolli** que apoiaram o desenvolvimento deste trabalho.

Por fim agradeço a amizade e companheirismo das amigas Marininha, Mariana, Graziela e Priscilla que mesmo à distância motivaram a conclusão deste projeto.

vii

#### RESUMO

O aumento da qualidade e consequentemente da expectativa de vida do ser humano, associado ao aumento da obesidade e do sedentarismo, têm despertado o interesse de pesquisadores para o desenvolvimento de novos materiais para ortopedia.

Materiais promissores neste campo são os fosfatos de cálcio devido à sua composição química semelhante à fase mineral de ossos e dentes. O tecido ósseo, além de possuir uma fase inorgânica possui também uma fase orgânica que representa em torno de 30% em peso do tecido e aparentemente regula a deposição da fase inorgânica. Para serem aplicados como possíveis substitutos do tecido ósseo, os fosfatos de cálcio podem ser usados na forma de cimentos. Cimentos de fosfatos de cálcio são mistura do fosfato de cálcio em pó com uma fase líquida formando uma pasta que endurece ao longo do tempo. No intuito de imitar a natureza, este trabalho propõe a incorporação de uma fase orgânica, neste caso a quitosana, com a fase inorgânica, neste caso o  $\beta$ - tricálcio fosfato para estudar as propriedades do cimento resultante.

A quitosana é um produto obtido diretamente da desacetilação da quitina, que por sua vez é um polissacarídeo encontrado no exoesqueleto de insetos e crustáceos. Por ser um material de abundância na natureza e por possuir um grande potencial para ser usada como biomaterial, foi escolhida como objeto de estudo deste trabalho.

Frente ao exposto, a proposta deste trabalho é incorporar ao cimento de fosfato de cálcio uma matriz orgânica que no caso é a quitosana, verificar a sua viabilidade, entender seu papel no processo de cura (endurecimento) do cimento proposto, além de realizar estudos *in vitro* da alteração das propriedades mecânicas dos mesmos em FCS (fluido corpóreo simulado), ou em inglês SBF (simulated body fluid).

Para estudo do processo de cura do cimento, foram propostos dois métodos: no primeiro deles, as fases formadas foram analisadas em tempo real através da técnica de difração de raios-X. O segundo tem como princípio a "parada" da reação de cura do cimento em diferentes momentos e posterior análise das fases formadas.

Para o primeiro método proposto conclui-se que a reação de cura deste cimento é tão rápida que não foi possível observar diferenças significativas entre os difratogramas obtidos nos tempos estudados. Já o segundo método não se mostrou viável para a análise deste tipo de cimento, pois trata-se de um método desenvolvido para cimentos que  $\alpha$ -tricálcio fosfato, que

ix

curam através de uma reação a base de água. No caso de cimentos de  $\beta$ - tricálcio fosfato, a cura se dá através de acido fosfórico, a tentativa de parar a reação de cura apenas contribuiu para a formação de *monetita*. Foi possível o desenvolvimento do cimento proposto, a incorporação da quitosana na fase líquida (ácido fosfórico) mostrou-se viável. Além disso, os estudos *in vitro* comprovaram a bioatividade deste novo cimento, uma vez que foi possível através de microscopia eletrônica de varredura, verificar a formação da capa (camada fina) de *apatita*.

#### Palavras Chave

Fosfato de cálcio, Quitosana, Biomateriais, Cimentos de fosfato de cálcio.

#### ABSTRACT

Currently, problems that bring some kind of injury in the bone tissue, such as osteoporosis, traumatic accidents, obesity, cancer, have arisen the interest of researchers in developing new biomaterials for orthopedics. Calcium phosphates are promising materials in this field due to their chemical composition similar to the mineral phase of teeth and bones.

Bone tissue is composed of two phases, inorganic and organic, the latter represents approximately 30% by weight of the tissue, consists primarily of a polymeric matrix composed of collagen fibers associated with a liquid, known as basic substance, which apparently regulates the deposition of the inorganic phase. To be applied as potential bone substitutes calcium phosphates are used as cement. Calcium phosphate cements are a mixture of calcium phosphate powder with a liquid phase, forming a paste that hardens over time. In order to mimic nature, this paper proposes to incorporate an organic phase, in this case chitosan with inorganic phase, in this case  $\beta$ -tricalcium phosphate to study the properties of the resulting cement.

Chitosan is a product obtained directly from the deacetylation of chitin, which is a polysaccharide found in the exoskeleton of insects and crustaceans. Chitosan is found in abundance in nature, and has significant potential for use as a biomaterial.

The aim of this work is to incorporate the calcium phosphate cement an organic matrix, chitosan in this case, to verify its feasibility, to understand their role in the cement curing process, and in addition, to conduct *in vitro* studies.

In order to study the cure process of the cement, two methods were proposed: in the first, the formed phases were analyzed in real time using X-ray diffraction. The second method intends to stop the reaction of the cement at different times and analyses of the resultant phases.

For the first method, it was concluded that the curing reaction of the cement is so fast that it was not possible to see significant differences among diffractograms over time. The second method was not feasible to be applied to analyze this type of cement. This is a method developed for  $\alpha$ -tricalcium phosphate cements, which cure occurs via a water-based reaction. In the case of  $\beta$ -tricalcium phosphate cements the cure occurs through phosphoric acid, the attempt to stop the curing reaction only contributed to the formation of *monetite*.

xiii

It was feasible to develop the proposed cement through the addition of chitosan in the liquid phase (phosphoric acid). Besides, the *in vitro* studies have confirmed the bioactivity of this new cement, as shown by scanning electron microscopy that indicated apatite layer formation.

### Keywords

Calcium phosphates, Chitosan, Biomaterials, Calcium phosphates cements.

Sumário

1 Introdução	
2 Objetivos	4
3 Revisão da Literatura	5
3.1 Biomateriais	5
3.2 Biocerâmicas e Biocerâmicas de Fosfato de Cálcio	7
3.2 Cimentos de fosfato de cálcio	11
3.2.1 Adição de biopolímeros aos cimentos de fosfato de cálcio	16
3.2.2 Métodos de caracterização dos cimentos	19
3.3 Quitosana	21
4 Materiais e Métodos	24
4.1 Síntese e caracterização do β-TCP	24
4.2 Preparação da solução de quitosana	24
4.3 Preparação e caracterização dos cimentos	25
4.4 Análise da reação de cura (endurecimento ou "pega") do cimento	26
4.4.1 Análise da reação de cura do cimento – método I	26
4.4.2 Análise da reação de cura do cimento – método II	28
4.4 Imersão em Fluido Corporeo Simulado (FCS)	29
5 Resultados e Discussão	30
5.1 Caracterização do fosfato Tricálcico	30
5.2 Medição do tempo inicial e final de cura	32
5.2 Monitoramento da reação de cura, método I	33
5.3 Monitoramento da reação de cura, método II	38
5.4 Caracterização dos cimentos antes e após imersão em FCS	43
6 Discussão	52
7 Conclusões	55
8 Sugestões para trabalhos futuros	56
9 Referências Bibliográficas	57
5	

#### 1 Introdução

O aumento da qualidade e consequentemente da expectativa de vida do ser humano, associado ao aumento da obesidade e do sedentarismo, têm provocado um crescimento no número de pacientes que necessitam de implantes biomédicos, sejam eles para corrigir defeitos ósseos ou curar doenças. Isso é resultado da perda do tecido que reveste e protege as articulações e do aumento do atrito, levando à inflamações, dores agudas e perda dos movimentos.

Atualmente, problemas que trazem algum tipo de lesão no tecido ósseo, como osteoporose, acidentes traumáticos, obesidade e câncer, têm despertado o interesse de pesquisadores em desenvolver novos biomateriais para ortopedia, assim como aprimorar os biomateriais existentes com o intuito de melhorar a qualidade de vida de pessoas que sofrem com este tipo de problema. Até 2011, mais de 700 mil artroplastias (operação de uma articulação para restituir-lhe o quanto possível sua mobilidade ou função), apenas nos joelhos eram realizadas nos Estados anualmente (http://hcupnet.ahrq.gov).

A necessidade de substituição de tecidos no corpo humano, levando-se em conta as particularidades de cada tecido, levou à criação da Engenharia Biomédica, uma área que incorpora tecnologia e medicina, de forma que o melhor da primeira torne máximo o desempenho da última. Uma das mais promissoras técnicas em cirurgia ortopédica e em engenharia biomédica é o cultivo de células em suportes porosos para a substituição de tecidos danificados, esta técnica denomina-se engenharia tecidual. Hoje em dia, o desenvolvimento do campo dos biomateriais é mais acentuado devido ao grande avanço que a ciência dos materiais tem experimentado. A disponibilidade de novos dispositivos poliméricos, metálicos, cerâmicos e de compósitos é cada vez maior permitindo a criação de novos implantes que sejam bioestáveis ou biorreabsorvíveis, desenvolvimento de dispositivos médicos, construção de suportes celulares que guiem a regeneração óssea e o desenvolvimento de dispositivos que tenham sua reabsorção "in vivo" controlada e que permitam a liberação gradativa de drogas e compostos bioativos (MONTEIRO et al., 2004, GINEBRA et al. 2012, ARCOS; REGI , 2013)

Para que um tecido promova uma boa restauração é necessário um suporte mecânico, que seja biocompatível com o organismo e, dependendo das situações, é interessante que ele seja

biorreabsorvível, ou seja, o próprio organismo consiga eliminá-lo, depois do tecido ter se reconstituído, o que elimina a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica.

No intuito de desenvolver materiais que atendessem as características acima, no começo dos anos 80, pesquisadores estudaram os cimentos de fosfatos de cálcio (CFC), os quais eram bioativos e biorreabsorvíveis. Estes cimentos consistem em um material na forma de pó e um na forma líquida, que quando misturados formam uma pasta, que se implantada endurece *in vivo*. Sendo assim, estes materiais se apresentam muito promissores para o tratamento de fraturas ortopédicas. O conceito estabelecido no início dos anos 80, por Le Geros e colaboradores (1982) e Brown e colaboradores (1983), foi usado como uma plataforma para uma nova geração de materiais que substituem os ossos. Desde então, avanços na composição de cimentos ósseos têm sido feitos, e muitos outros estão em fase experimental (DOROZHKIN, 2009, TAMIMI, 2012). Após muitos estudos, chegou-se a conclusão que independente da composição inicial do cimento, após o processo de cura, apenas dois fosfatos são formados, a *apatita* ou a *brushita*. Sendo assim, cimentos ósseos são divididos em dois grandes grupos, dependendo do fosfato formado após seu endurecimento, são eles: cimentos de *apatita* e cimentos de *brushita*. Os cimentos escolhidos para este estudo são os cimentos de *brushita*.

O tecido ósseo é composto por duas fases, sendo uma inôrganica e outra orgânica. Esta última representa cerca de 30% em peso do tecido, consiste principalmente de uma matriz polimérica composta por fibras de colágeno associada a um líquido, conhecido como substância fundamental, que aparentemente regula a deposição da fase inorgânica (PRADO DA SILVA, 1999).

Já a fase inorgânica é composta por *apatitas* com fórmula química geral  $(Ca,Z)_{10}(PO_4Y)_6(OH,X)_2$ , sendo X, Y e Z substituintes. Estas susbtituições, que dependem do local e função do tecido, fazem com que este material seja não-estequimétrico e de cristalografia não muito bem definida, o que afeta suas propriedades. Alguns destes susbstituintes são o sódio, o magnésio e o carbonato (LE GEROS, 1991). Assim a hidroxiapatita sintética apresenta algumas diferenças significativas quando comparada as *apatitas* naturais, relacionadas principalmente à presença de substituintes, cristalinidade e morfologia.

Baseando-se no fato de que o tecido ósseo possui uma fase orgânica e uma fase inôrganica, a incorporação de aditivos orgânicos na composição do cimento é uma forma de tentar melhorar algumas características dos cimentos de fosfatos de cálcio. Tonoli (2006) mostrou

que a incorporação de material orgânico à composição do cimento aumenta a degradação *in vitro*, enquanto que Oliveira de Lima (2006) estudou a formação de fosfatos de cálcio em uma matriz polimérica (alginato e quitosana).

A quitosana é um produto obtido diretamente da desacetilação da quitina, que por sua vez é um polissacarídeo encontrado no exoesqueleto de insetos e crustáceos e encontra-se em abundânica na natureza, além de seu grande potencial para uso como biomaterial.

Frente ao exposto, a proposta deste trabalho é incorporar ao cimento de fosfato de cálcio uma matriz orgânica que no caso é a quitosana, verificar a sua viabilidade, entender seu papel no processo de cura (endurecimento ou "pega") do cimento proposto, além de realizar estudos *in vitro* da alteração das propriedades mecânicas dos mesmos em FCS (fluido corpóreo simulado) em inglês SBF (simulated body fluid) (KOKUBO, 2006).

#### 2 Objetivos

O principal objetivo deste trabalho é obter e caracterizar a formação de cimentos de  $\beta$ -TCP, contendo ácido fosfórico e quitosana. Pretende-se estudar o mecanismo de cura deste cimento identificando as novas fases formadas e verificar qual a influência da quitosana no processo de cura. Visa-se, assim, um melhor entendimento dos compostos formados durante o processo da cura, endurecimento ou "pega" com e sem a adição de quitosana.

Os objetivos específicos são:

- 1) Obter e caracterizar o  $\beta$ -TCP através da síntese por calcinação;
- Determinar as propriedades do cimento ósseo obtido a partir deste fosfato de cálcio com e sem a adição da quitosana;
- Submeter o material a estudos *in vitro* de alteração das propriedades mecânicas dos mesmos em FCS (fluido corpóreo simulado);
- Acompanhar as transformações nos cimentos, com e sem adição de quitosana, durante o processo de endurecimento.

#### 3 Revisão da Literatura

#### **3.1 Biomateriais**

Durante séculos, quando um tecido ou órgão humano sofria um trauma, o médico ou cirurgião dispunha de poucas alternativas e, frequentemente, a única alternativa era a amputação. Esta prática garantia a sobrevivência do paciente, porém sua qualidade de vida ficava totalmente comprometida. Com a descoberta, a partir da segunda metade do século XX, de antissépticos; antibióticos como a penicilina; o desenvolvimento das normas de higiene e dos biomateriais, a qualidade de vida de pacientes que sofrem intervenção cirúrgica é hoje considerada de boa a excelente (MONTEIRO, SANROMÁN, 2004).

A utilização de alguns biomateriais para certas aplicações com grau de adaptação relativamente aceitável remonta dos tratados médicos mais antigos, porém o desenvolvimento da ciência dos biomateriais se deu rigorosamente somente a partir do século XX.

Exemplos de materiais que podem ser utilizados como biomaterais são materiais poliméricos, metálicos, cerâmicos e compósitos e podem ter uma vasta gama de aplicações como: desenvolvimento de dispositivos médicos (biossensores, marcapassos, etc), construção de suportes celulares que guiem a regeneração óssea, desenvolvimento de dispositivos que tenham a reabsorção "in vivo" controlada e permitam a liberação gradativa de drogas (MONTEIRO, et al., 2004; GINEBRA et al. 2012; ARCOS; REGI , 2013). A Figura 1 mostra as principais aplicações dos biomateriais.



Figura 1: Aplicações dos biomaterais (MONTEIRO, et al., 2004)

Em março de 1986, alguns especialistas na área de biomateriais, se reuniram em uma conferência organizada pela Sociedade Européia de Biomateriais, e entraram em consenso sobre os termos utilizados nesta área de pesquisa. Um biomaterial é definido como qualquer substância ou combinação de substâncias, sintéticas ou naturais, que podem ser utilizadas por qualquer período de tempo, que aumente, trate ou substitua um tecido, órgão ou função no organismo (WILLIAMS, 1987). Deve satisfazer ainda algumas características como:

- Biocompatibilidade, materiais que não geram uma resposta inflamatória, aguda ou crônica no organismo (WILLIAMS, 1987),
- O material deve manter a sua integridade estrutural durante o período necessário (WILLIAMS, 1987),
- Biofuncionalidade, o material deve atender as características mecânicas necessárias para cumprir a função desejada, pelo tempo necessário (WILLIAMS, 1987).

Além das características listadas acima, se a intenção é que haja regeneração óssea outras propriedades devem ser observadas para o sucesso clínico de um novo biomaterial, são elas (WILLIAMS, 1987):

<u>Bioatividade</u>: um material é considerado bioativo quando gera uma resposta interfacial resultando na ligação com o tecido,

Biorreabsorção: remoção do material por um processo biológico,

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

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

Um biomaterial pode ainda ser bioinerte, ou seja, não gera uma resposta interfacial que resulta na ligação com tecido, também não gera rejeição pelo organismo. Há uma coexistência do tecido com o material e a separação de ambos se dá através de um tecido fibroso de espessura variável (WILLIAMS, 1987; DUBOK, 2000). A seleção do melhor biomaterial depende da aplicação do mesmo.

#### 3.2 Biocerâmicas e Biocerâmicas de Fosfato de Cálcio

Nenhum material implantando no organismo é totalmente inerte. Cada um estimula uma reação no tecido vivo. Se o material é tóxico, o tecido à sua volta morre; se o material é não tóxico e biologicamente inativo (bioinerte), um tecido fibroso de espessura variavel se forma; se o material é não tóxico e biologicamente ativo (bioativo), uma interface com o tecido é formada e se o material é não tóxico e dissolve, ele é reposto pelo tecido (biorreabsorvíveis) (DUBOK, 2000; HENCH, 1998).

Entre as substâncias inorgânicas, as únicas bioativas e biorreabsorvíveis são as biocerâmicas, que são utilizadas para a reparação e reconstrução de tecidos danificados. O interesse em se usar cerâmicas como biomaterial começou no final dos anos 1960, usadas inicialmente como uma alternativa aos metais com o propósito de aumentar a biocompatibilidade dos implantes (DOROZHKIN, 2010). As biocerâmicas quando implantadas possuem menor efeito no sistema imunológico além de possuir propriedades bioquímicas e mecânicas que as torna os materiais mais biocompatíveis já implantandos, (DUBOK, 2000). Suas aplicações vão desde dispositivos de diagnóstico, preenchimento ósseo, próteses estruturais e aplicações odontológicas. Biocerâmicas podem ser prepaparadas a partir de alumina, zircônia, silica, fosfatos de cálcio e outros materiais. A Figura 2 mostra alguns exemplos de biocerâmicas comercialmente disponíveis para implantes ósseos.



Figura 2: Biomateriais biocerâmicos comercialmente disponíveis para implantes ósseos (DOROZHKIN, 2010).

As biocerâmicas podem ser bioinertes, bioativas ou biorreabsorvíveis, sendo que este último tipo são as ideais, pois somente permanecem no corpo até que o tecido se regenere. Porém a maior inconveniência é que sua resistência mecânica diminui durante o processo de biorreabsorção (de AZA, 2004). A Tabela 1 mostra a classificação das biocerâmicas de acordo com a reposta do tecido vivo.

Tipo de biocerâmica
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (alumina), ZrO <sub>2</sub> (zirconia).
Hidroxiapatita porosa, metais recobertos com
hidróxiapatita.
Hidroxiapatita densa, biovidros.
Fosfatos de cálcio.

Tabela 1: classificação das biocerâmicas (HENCH, L. L. 1998)

O grande desafio das biocerâmicas é substituir o tecido ósseo danificado pelo tempo que o paciente ainda tiver de vida, o ideal é que a biocerâmica implantada seja substituída por um novo tecido ósseo. Atualmente, a expectativa de vida dos seres humanos está em torno dos 80 anos, e a necessidade de implantes ósseos por desgastes gira em torno dos 60 anos de idade, o que significa que o implante deve durar 20 anos ou mais em condições severas para as biocerâmicas, ou seja, solução salina corrosiva em torno de 37°C sob solicitações mecânicas (HENCH, L. L. 1998). Para este propósito, cerâmicas bioativas capazes de preencher o defeito e se integrarem com o tecido ósseo por um longo período de tempo são requeridas, ou ainda, cerâmicas que gradualmente são biorrebasorvíveis e substituídas por um osso saudável. A característica que faz algumas cerâmicas serem bioativas é a formação de uma camada de hidroxiapatita em um meio biológico, estes cristais possuem estrutura química idêntica a estrutura mineral dos óssos e forma fortes ligações com o tecido vivo. De acordo com a Tabela 1, biocerâmicas que apresentam este comportamento são as cerâmicas de fosfato de cálcio.

O que motivou cientistas a usarem fosfatos de cálcio como biocerâmicas é a similaridade química com os tecidos ósseos e dentais dos mamíferos. Além disso os fosfatos de cálcio são não

tóxicos, bioativos e promovem a osteocondução (LE GEROS, 1993).

A desvantagem de todas as biocerâmicas é a baixa resistência a fraturas e, comparadas com os metais, a ausência de ductilidade e a dificuldade de manipulação e ajustes durante uma cirurgia. A baixa resistência mecânica ainda é mais evidente em biocerâmicas altamente porosas, o que é um requisito para a vascularização e crescimento do tecido ósseo (GAUTHIER et al., 1999). Uma maneira de contornar estas dificuldades é utilizar os fosfatos de cálcio como recobrimento de superfícies metálicas, o que permite combinar a ductilidade e a resistência a fratura dos metais com as vantagens das biocerâmicas (DUBOK, 2000), tornando-se possível de utilizá-las como reparo em defeitos ósseos muito grandes (DOROZHKIN, 2007).

Uma lista completa dos fosfatos de cálcio conhecidos atualmente, e suas principais propriedades são mostrados na Tabela 2 (DOROZHKIN, 2007).

Ca/P (razão molar)	Composto	Fórmula	Solubilidade a 25°C (g/L)	pH (em solução aquosa a 25°C)
0,50	Fosfato Monocálcio Monoidratado (MCPM)	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ).H <sub>2</sub> O	18	0,0-2,0
0,50	Fosfato Monocálcio Anidro (MCPA)	Ca(H <sub>2</sub> PO4) <sub>2</sub>	17	с
1,00	Hidrogeno Fosfato de Cálcio diidratado, Brushita (DCPD)	CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,088	2,0-6,0
1,00	Hidrogeno Fosfato de Cálcio anidro, Monetita (DCPA)	CaHPO <sub>4</sub>	0,048	с
1,33	Fosfato Octacálcico (OCP)	Ca8(HPO4)2(PO4)4.5H2O	0,0081	5,5-7,0
1,50	α - Fosfato Tricálcico (α-TCP)	α - Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> )	0,0025	а
1,50	β – Fosfato Tricálcico (β-TCP)	β - Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> )	0,0005	а
1,2-2,2	Fosfato de cálcio Amorfo (ACP)	Ca <sub>x</sub> H <sub>y</sub> (PO <sub>4</sub> )z.nH <sub>2</sub> O, n=3-4,5; 15-20% H2O	b	5 12
1,5-1,67	Hidroxiapatita deficiente em Cálcio (CDHA)	Ca10-x(HPO4)x(PO4)6-x(OH)2-x 0 <x<1< td=""><td>0,0094</td><td>6,5 - 9,5</td></x<1<>	0,0094	6,5 - 9,5
1,67	Hidroxiapatita (HA)	Ca10(PO4)6(OH)2	0,0003	9,5 - 12
1,67	Fluorapatita (FA ou FAp)	Ca10(PO4)6F2	0,0002	7 12
2,00	Fosfato Tetracálcico (TTCP)	Ca4(PO4)2O	0,0007	a

Tabela 2: Principais propriedades dos fosfatos de cálcio (DOROZHKIN, 2007)

a Estes compostos não se precipitam em soluções aquosas

- b Não é possível medir precisamente
- c Estável em temperaturas acima de 100 °C

Entre os fosfatos de cálcio listados na Tabela 2 apenas alguns podem ser usados como biomateriais. Por exemplo, os fosfatos de cálcio com uma relação molar de Ca/P menor que 1 não podem ser implanatados, devido à alta solubilidade e baixo pH. O TTCP sozinho também não pode ser implantado devido ao alto pH que promove. Entretanto, compostos podem ser

misturados a outros fosfatos de cálcio ou até mesmo a outros compostos químicos, para formar um biomaterial (DOROZKHIN, 2010).

#### 3.2 Cimentos de fosfato de cálcio

A necessidade de desenvolver biocerâmicas que apresentassem uma invasão cirúrgica mínima, induziu ao conceito de cimentos ósseos feitos a partir de fosfatos de cálcio e aplicados como materiais injetáveis ou moldados para a correção de defeitos ósseos.

Os cimentos de fosfato de cálcio (CFC) foram primeiramente estudados por Le Geros et al. (1982) e uma forma de preparação destes cimentos foi patenteada por Brown et al. em 1985 (US PATENTE), este último descreveu a preparação do cimento baseada em uma pasta formada através de uma mistura aquosa de Ca<sub>4</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>O contendo pelo menos um dos fosfatos de cálcio a seguir: CaHPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, CaHPO<sub>4</sub>, Ca<sub>8</sub>H<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>.5H<sub>2</sub>O,  $\alpha$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>,  $\beta$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Estes cimentos são misturas de uma parte sólida de fosfatos de cálcio amorfos ou cristalinos e uma parte líquida que pode ser: água destilada, ácido fosfórico, ácido cítrico ou até mesmo solução de fluido corpóreo simulado (DOROZHKIN, 2009).

Após a mistura da parte sólida e da parte líquida, uma pasta viscosa e moldável é formada. Esta endurece em alguns minutos, quando a pasta se torna dura o suficiente para ser moldada, podendo ser colocada em um defeito ósseo, para substituir parte de um osso, onde termina de endurecer. Este método tornou-se um tratamento inovador para defeitos ósseos no final do século XX. Os cimentos ósseos também promovem a osteocondução, são não tóxicos, apresentam composição química similar ao do tecido ósseo, formam ligações químicas no osso hospedeiro e são biorebasorvíveis (DOROZHKIN, 2009). Em suma, os cimentos ósseos são biocerâmicas muito interessantes para utilização como preenchimento ósseo, pois apresentam toda a biocompatibilidade e bioatividade dos fosfatos de cálcio com a vantagem de serem moldáveis e endurecerem *in vivo* e, por serem biorreabsorvíveis, eliminam a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica após o período de regeneração óssea (MOTISUKE, 2010). A Tabela 3 (GINEBRA, et al., 2006a, GINEBRA, et al., 2006 b, AMBARD, et al., 2006 DOROZHKIN, 2009) mostra vantagens e desvantagens dos cimentos de fosfato de cálcio.

Tabela 3: Vantagens e Desvantagens dos cimentos de fosfato de cálcio (GINEBRA, et al.,
2006a, GINEBRA, et al., 2006 b, AMBARD, et al., 2006 DOROZHKIN, 2009)

Vantagens	Desvantagens
1. Endurecimento in vivo.	1. Baixa resistência mecânica.
2. Podem ser injetados, o que permite uma	2. Podem ser lixiviados caso haja excesso de
invasão cirúrgica mínima.	fluxo sanguíneo na região do implante.
3. Boa osteocondução.	3. A taxa degradação do cimento in vivo, pode
	ser maior que a taxa formação de um novo
	tecido.
4. Podem ser repostos pela formação de um	
novo tecido ósseo.	
5. São moldáveis, o que permite um ótimo	
contato com o osso, mesmo em defeitos	
geometricamente complexos.	
6. Excelente biocompatibilidade e bioatividade.	
7. Não tóxico.	
8. Baixo custo.	
9. Fácil preparo.	
10. Endurecimento em temperatura corpórea.	
11. Apresenta bioatividade	
12. Formados por materiais clinicamente	
seguros.	
13. Podem ser usados para liberar	
medicamentos, como antibióticos.	

Na literatura encontam-se relatos de mais de 15 misturas de cimentos de fosfato de cálcio diferentes (DRIESSENS et al., 1993, CHOW et al., 1998, DRIESSENS et al., 1994). A partir destes sistemas básicos, outras formulações podem ser derivadas através de aditivos, mas ainda continuam a comportar-se como cimentos.

Independente da mistura inicial, após a reção de cura, somente dois compostos podem ser

formados que são a hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA), ou a *brushita* (DCPD). CDHA é formada em pH's > 4.2 e DCPD formado em pH's < 4.2. De acordo com o produto final formado, os cimentos de fosfatos de cálcio são divididos em dois grupos: cimentos de *brushita* ou cimentos de *apatita*. O produto final tem uma grande importância para o estudo dos cimentos, pois determina sua solubilidade final e, consequentemente, a reabsorção *in vivo*. A composição química dos ossos de mamíferos é similar a CDHA, devido a essa similaridade os cimentos de *apatitas* são mais estudados, porém muitos estudos sobre os cimentos de *brushita* também são publicados (BOHNER 1993, MIRTCHI, 1989, CARRODEGUAS, 2003, TAMIMI, 2012).

A estabilidade e a solubilidade dos fosfatos de cálcio são os responsáveis pelas reações de endurecimento dos cimentos, a mistura de um pó de fosfato de cálcio em uma solução aquosa desencadeia uma série de transformações químicas que começam com a dissolução do pó na solução e posterior preciptação de *apatita* ou *brushita*, pode ainda haver a formação de precursores desta reação como fosfato de cálcio amorfo (ACP) ou fosfato de octacálcico (OCP). Durante a precipitação, os cristais crescem e formam uma rede de "microagulhas" o que confere resistência mecânica ao cimento endurecido. Em outras palavras, a formação dos cristais de *apatita* ou *brushita* é a principal razão para o endurecimento do cimento.

Para os cimentos de *apatita*, a água não participa da reação, no entanto, para os cimentos de *brushita*, a água é um dos principais reagentes, pois é necessária para a formação do DCPD. Razão pela qual os cimentos de *brushita* são também conhecidos por cimentos hidráulicos.

No cimento patenteado por Brown e colaboradores (1985), o  $\beta$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> é utilizado apenas como um reagente enquanto Mirtchi et al. (1988) mostrou ser viável a obtenção de um cimento de fosfato de cálcio preparado através de uma mistura aquosa de  $\beta$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> e MCPM (fosfato monocálcio monohidradato). A conclusão de Mirtch et al. (1988) foi que o tempo de endurecimento deste cimento era muito curto, aproximadamente 30 segundos, e que a resistência mecânica diminuia com o tempo. A reação de cura deste cimento é descrita na Equação 1:

$$\beta - Ca_3(PO_4)_{2(s)} + Ca(H_2PO_4)_2 H_2O_{(s)} + 7H_2O \rightarrow 4CaHPO_4 H_2O_{(s)}$$
(1)

Bohner e colaboradores (1993) propuseram a substituição do MCPM por uma solução de ácido fosfórico para tornar o cimento mais homogêneo, verificando também outras vantagens como preparação rápida e fácil, melhor controle da composição química e da reatividade, resistência à tensão e boa bioreabsorção. A reação de cura deste cimento é mostrada na Equação 2:

$$\beta - Ca_3(PO_4)_{2(s)} + H_3PO_{4(aq)} + 6H_2O \to 3CaHPO_4.2H_2O_{(s)}$$
(2)

Das duas grandes famílias de cimentos de fosfato de cálcio, os de *brushitas* reagem e endurecem muito mais rápido que os de *apatitas*. Como uma maneira de satisfazer os requisitos clínicos de aplicação do cimento durante uma cirurgia, o tempo de endurecimento das *brushitas* deve ser prolongado e das *apatitas* deve ser reduzido (BOHNER, 2000).

Acredita-se que o processo de endurecimento do cimento é composto de três etapas: dissolução dos reagentes até a completa saturação da solução líquida, nucleação dos cristais, crescimento dos cristais. Existem estratégias para interferir em uma das três etapas visando melhorar o tempo de endurecimento, como mostrado por Bohner (2007). Para interferir na etapa de dissolução dos reagentes as estratégias consistem em:

- 1) modificar a área superficial entre o reagente e a fase líquida;
- 2) modificar a solubilidade dos reagentes na fase líquida;
- 3) modificar a saturação da fase líquida em relação aos reagentes;
- 4) utilizar inibidores de dissolução;
- 5) ativação ou passivação da superfície dos reagentes;

Para interferir na fase de nucleação (acelerar ou postergar a nucleação) as estratégias consistem em:

- 1) adição de sementes favorecedoras da nucleação na formulação do cimento;
- 2) modificar a saturação da fase líquida em relação ao produto da reação;
- 3) utilizar inibidores da nucleação.

Por fim para interferir na fase de crescimento dos cristais as estratégias são similares com as utilizadas para a fase de nucleação, com exceção da adição de sementes favorecedoras da nucleação, que não influencia na taxa de crescimento dos cristais.

De maneira geral, todos os cimentos de fosfatos de cálcio continuam a reagir por um período longo, normalmente desde várias horas até várias semanas (BROWN et al, 1991 FULMER et al, 1992). Porém o ideal é que o tempo inicial de endurecimento dos cimentos seja em torno de 10 min e o tempo final de reação seja menor que 1 hora (BOHNER, 2007). Isso para

que o cirurgião, durante uma cirurgia, tenha tempo suficiente para moldar o cimento na cavidade, e que este cimento endureça em um tempo não muito longo, para que não haja atrasos na finalização da cirurgia (DOROZHKIN, 2009).

Atualmente, dois fosfatos de cálcio muito utilizados nos estudos de CPC's são o  $\alpha$ -TCP e o  $\beta$ -TCP. Cimentos feitos a partir de  $\alpha$ -TCP são cimentos de *apatita*, já cimentos feitos de  $\beta$ -TCP são cimentos de *brushita*. A biocerâmica a ser utilizada para obtenção do cimento, objeto de estudo deste trabalho, será o  $\beta$ -TCP, devido à facilidade na obtenção deste fosfato.

Motisuke (2010) utilizou, em seus estudos, a biocerâmica  $\alpha$ -TCP e mostrou que a síntese deste composto não é uma tarefa simples, uma vez que muitas condições de processo podem alterar suas propriedades finais ou ainda inibir sua formação, sendo que o maior fator de influência é a qualidade dos reagentes de partida, que podem ter contaminação de magnésio, a principal impureza que interfere na síntese do  $\alpha$ -TCP. Para a obtenção  $\beta$ -TCP, Jinlong e colaboradores (2002) mostraram que ao calcinar CaCO<sub>3</sub> e CaHPO<sub>4</sub>, a formação do  $\beta$ -TCP começa a ocorrer por volta dos 900°C, ou seja, trata-se de uma síntese simples e barata. A síntese ocorre devido à reação mostrada na Equação 3.

$$CaCO_3 + 2CaHPO_4 \rightarrow Ca_3(PO_4)_2 + CO_2 + H_2O$$
(3)

A Figura 3 reproduzida de Jinlong e colaboradores (2002) mostra a evolução de fases de acordo com a temperatura da reação. A Figura confirma a formação de  $\beta$ -TCP a partir dos 900°C. Após 1000°C a formação do  $\beta$ -TCP já está completa e não se altera até os 1200°C. Após 1200°C começa a haver a formação de  $\alpha$ -TCP.

A desvantagem de cimentos formados a partir de  $\beta$ -TCP concentra-se no fato de que a sua biocompatibilidade pode ser afetada devido aos baixos valores de pH alcançados durante a cura (BOHNER, 1997) e, como dito anteriormente, este tipo de cimento reage e endurece muito rapidamente.

Há um grande potencial para melhoria das propriedades desse tipo de cimento e suas características ideais devem ser buscadas através da manipulação da composição química, tamanho e distribuição de partículas, assim como adição de compostos em sua formulação.



Figura 3: DRX da reação CaCO<sub>3</sub> com CaHPO<sub>4</sub> de acordo com as temperaturas. PP  $(\beta$ -CO<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), b-TCP  $(\beta$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> e L (CaO) (JINLONG, et al. 2001).

#### 3.2.1 Adição de biopolímeros aos cimentos de fosfato de cálcio

A matriz óssea é constituída por uma parte inorgânica e outra parte orgânica. A parte inorgânica é principalmente formada por íons de cálcio e fosfato, mas podemos também encontrar íons de potássio, magnésio, citrato, sódio e bicarbonato. A parte orgânica da matriz é constituída por grande quantidade de fibras de colágeno, associadas a um líquido conhecido como substância fundamental, composto por proteoglicanos, tais como condroitina e ácido hialurônico, que aparentemente regulam a deposição da fase orgânica. A dureza e a resistência do osso estão ligadas a associação das fibras de colágeno com o fosfato de cálcio, formando um material compósito, com uma arquitetura finamente controlada em nível molecular. Nesses casos, a matriz polimérica afeta o tamanho, a forma, a orientação e até mesmo a composição de fases

das partículas formadas provendo sítios de nucleação, regulando a concentração local dos íons e inibindo determinadas reações (CALVERT, RIEKE, 1996).

Essa associação de uma fase orgânica com uma fase inôrganica é comum na natureza como, por exemplo, a carapaça de crustáceos, que é formada pela associação de quitina (um polissacarídeo) com carbonato de cálcio; os corais formam seus exoesqueletos através da manipulação da concentração de cálcio e carbonato no ambiente marinho, fornecendo sítios para a nucleação e crescimento através de sua matriz polimérica; o nácar é formado pela associação de uma fase orgânica, a conchiolina, associada com diversos polissacarídeos e cristais de carbonato de cálcio (BOWEN C.E., TANG H.,1996)

A utilização de técnicas biomiméticas (imitação da natureza) no projeto de biomateriais é ainda mais importante. A compreensão dos fênomenos fisiológicos é, por si só, fundamental para o projeto de biomateriais. Quando associada ao melhoramento das respostas *in vivo* através da incorporação de aspectos de reconhecimento molecular e auto-organização, obtêm-se materiais com bioatividade geralmente muito superior aos de origem.

Frente ao exposto, a incorporação de uma matriz polimérica aos cimentos de fosfatos de cálcio apresenta-se como uma idéia interessante, com o intuito de "imitar" a composição do técido ósseo.

Estudos publicados na literatura (YOKOYAMA, et al.,2002; RAU, et al., 2008; LUI, et al., 2006; TAKAGI, et al. 2003) mostram que a a adição de biopolímeros nos cimentos de fosfato de cálcio melhora a manipulação dos mesmos antes do implante, assim a biocompatibilidade e biodegradabilidade. A Tabela 4 mostra um resumo de trabalhos feitos com cimentos de fosfato de cálcio com adição de quitosana.

O biopolímero escolhido para ser adicionado ao cimento de  $\beta$ -TCP é a quitosana, devido às suas propriedades listadas na seção 3.3 deste trabalho.

Autores	Fórmula	Objetivo dos estudos
Yokoyama et al. (2002)	Pó: α-TCP e TTCP	* Investigação da concentração
	Líquido: ácido cítrico, glicose e	de ácido cítrico em processos
	quitosana.	inflamatórios,
		* Adição da quitosana para
		melhorar a moldabilidade do
		cimento.
Rau et al. (2008)	Pó: α-TCP ou TTCP	* Estudo da transformação de
	Líquido: carbonato de magnésio	fase durante a reação de
	adicionado ao ácido fosfórico.	endurecimento usando DRX,
		* Quitosana foi adicionada para
		retardar o endurecimento do
		cimento.
Liu et al. (2006)	Ρό: α-ΤCΡ	* Estudo das propriedades
	Líquido: ácido cítrico, glicose e	mecânicas e químicas do
	quitosana.	cimento,
		* Adição da quitosana para
		melhorar a moldabilidade do
		cimento.
Takagi et al. (2003)	Pó: TTCP e DCPA	* Estudo das propriedades
	Líquido: solução de quitosana,	mecânicas e químicas do
	ácido clorídrico, ácido málico e	cimento,
	ácido lático.	* Os cimentos com adição de
		quitosana foram mais
		resistentes à lavagem.

Tabela 4: Trabalhos feitos com cimentos de fosfato de cálcio com adição de quitosana

#### 3.2.2 Métodos de caracterização dos cimentos

Le Geros (1991) listou algumas técnicas que podem ser usadas na caracterização de fosfatos de cálcio dependendo da resposta que se está buscando. São elas:

- Difração de Raios X (DRX)- traz informações sobre quais as fases formadas, pureza, cristalinidade;
- Espectroscopia de Infravermelho (IR) presença de grupos funcionais, pureza e cristalinidade (grau de perfeição);
- Microscopia Eletrônica de varredura (MEV) morfologia do cristal (forma e tamanho);
- Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) propriedades ultra-estruturais como defeitos de rede, tamanho e morfologia de cristalito e orientação;
- Ressonânica Magnética Nuclear (RMN) ligações de hidrogênio efeitos do flúor;
- Termogravimetria (TGA) estabilidade térmica;
- Calorimetria determinação da quantidade de fósforo;
- Absorção atômica análise elementar de cátions.

Normalmente apenas com análises de DRX já se conseguem acuradas informações a respeito de um fosfato de cálcio, pois é possível obter dados sobre pureza e mistura de fases, cristalinidade, tamanho de cristalito e alterações na estrutura cristalina. Porém deve-se tomar cuidado na preparação das amostras. Por exemplo, uma amostra que não é mantida no mesmo plano do porta amostras em uma análise de DRX pode gerar diferença na intensidade de picos, ou desvio de posição ou má qualidade de sinal interferindo assim nos resultados (MOTISUKE, 2010).

Devido à importância da taxa e do tempo de endurecimento do cimento, muitos estudos tem sido direcionados para este assunto. Um das maneiras de medir o tempo de cura do cimento é através de métodos desenvolvidos para concretos, como agulhas de Gilmore (ASTM C-266-04), que determinam o tempo em que o cimento aguenta uma determinada carga. Porém, estes métodos determinam somente o tempo inicial e final do endurecimento e é insuficiente para caracterizar todo o processo de cura de um CFC. Sendo assim, estudos foram desenvolvidos com o intuito de caracterizar todo o processo de cura em termos de composição e propriedades

mecânicas (BOHNER, 2007).

Por exemplo, Hoffman e colaboradores (2006) estudaram o processo de endurecimento de cimentos formados a partir de  $\beta$ -TCP e MCPM (fosfato monocálcio monohidradato) em água (como mostrado na Equação 1) através da técnica de infravermelho – transformada de Fourier (FTIR). Neste caso, foi utilizado ácido cítrico para retardar o tempo de endurecimento para que fosse possível realizar as análises em tempo real. A análise de FTIR mostrou-ser uma técnica viável para o monitoramento em tempo real da cura do cimento.

Groover e colaboradores (2005) utilizaram a técnica de difração de raios X (DRX), para o monitoramento da reação de cura. Para realizar este estudo, as amostras foram preparadas diretamente no porta amostras do equipamento e as medidas, feitas sem que o porta amostras fosse retirado do equipamento. Nesse estudo também foi analisada a influência da temperatura no processo de endurecimento do cimento.

Segundo Rau e colaboradores (2008), as técnicas convencionais de monitoramento das fases formadas durante o processo de endurecimento de um cimento, como difração de raios X, são muito lentas. Sendo assim, propuseram o uso da técnica de difração de raios-X de energia dispersiva (EDXD). A vantagem desta técnica é que os padrões de raios-X são coletados de forma eletrônica, diminuindo o tempo de análise, diferentemente da forma convencional de difração de raios X, em que os padrões são coletados de forma mecânica. Além disso, Rau e colaboradores (2006) adicionaram quitosana na formulação de cimentos formados por  $\alpha$ -TCP. A adição de quitosana não afetou a formação final do cimento, apenas retardou a fase de cristalização e foi possível seu acompanhamento.

Estes métodos mostraram ser válidos, porém ambos possuem limitações como o tempo requerido para cada medida (250s), que pode ser um problema para formulações que endureçam rapidamente. As análises concentram-se na superfície do cimento onde a evaporação e os efeitos térmicos podem alterar a superfície quando comparada com o centro da amostra (BOHNER, 2007).

Ginebra, (1996) utilizou procedimentos que param a reação durante o processo, e então são caracterizadas as etapas distintas da reação. Foram dois métodos utilizados para parar a reação: congelamento e liofilização das amostras e imersão em acetona.

Outra abordagem que podemos listar são os estudos *in vitro* de biomateriais. Em 1991, Kokubo propôs que a formação da capa de *apatita* na superfície de biomateriais pode ser
verificada *in vitro* através da imersão do biomaterial em um solução de fluido corpóreo similado (FCS), que nada mais é que um fluido que simula a concentração de íons do plasma sanguíneo humano (KOKUBO, TAKADAMA, 2006). No caso dos fosfatos de cálcio, além da verificação da formação da capa de *apatita*, pode-se também verificar a degradação do material, assim como mudanças de pH e mudanças da fase cristalina.

Trata-se de um experimento que prediz alguns dos aspectos como erosão, degradação; antes mesmo do material ser testado em tecidos vivos e, portanto, tem o seu valor de caracterização.

### 3.3 Quitosana

A quitina é um dos polissacarídeos naturais mais abundantes no mundo. Em termos de disponibilidade, sua produção anual é estimada em  $10^{12}$  Kg (SAHOO et al., 2009).

A quitina se tornou um material de grande interesse, não somente pelo fato de ser um recurso sub-utilizado, mas também como um material com alto potencial em vários campos da ciência, que apresenta excelentes propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade, adsorção, capacidade de formar filmes e ser um agente quelante para metais (KUMAR, 2000).

A respeito da estrutura química, a quitosana é muito similar à celulose e à quitina, como mostra a Figura 3. A quitina é feita de uma cadeia linear de grupos de acetilglicosamida, enquanto a quitosana é obtida removendo o grupo acetil (CH<sub>3</sub>-CO), ou seja, através de uma desacetilação.

A quitosana é insolúvel em água, mas solúvel em soluções ácidas com pH abaixo de 6. Ácidos orgânicos, como o ácido acético, ácido fórmico e ácido lático são usados para dissolver a quitosana. O mais usado é o ácido acético em solução 1% (massa). A solubilidade da quitosana em ácidos inorgânicos é limitada. Por exemplo, a quitosana é solúvel em solução de ácido clorídrico a 1%, mas insolúvel em ácido sulfúrico e fosfórico. Em compensação, a quitosana precipita em soluções com pH acima de 7, formando um gel (SAHOO et al., 2009).

A Figura 4 mostra a estrutura da celulose, quitina e da quitosana, assim como a Figura 5 mostra o processo de desacetilação da quitina para formar quitosana.

A produção anual de quitina e quitosana é atualmente baseada no descarte de cascas de camarões e caranguejos da indústria pesqueira. A produção de quitosana vinda do descarte desta indústria é considerada bastante viável (KUMAR, 2000).



Celulose



Quitina



Figura 4: Estrutura da celulose, quitina e quitosana (KUMAR, 2000).



Figura 5: Processo de desacetilação da quitina para formar quitosana (KUMAR, 2000).

Diversas são as aplicações da quitosana: na área cosmética e na área médica para formação de pele artificial e lentes oftálmicas; nas áreas de alimentação e nutrição; devido à sua capacidade de adsorção, a quitosana é usada no tratamento de águas para remoção de metais pesados e corantes da água residual de indústrias têxteis e também tem sido bastante estuda na área farmacêutica para liberação controlada de drogas (KUMAR, 2000).

Outra aplicação da quitosana, de interesse deste trabalho, é ser usado como aditivo de biocerâmicas, pelo fato da quitosana ser reabsorvível *in vivo*, biocompatível e não tóxica.

Ensaios *in vitro* utilizando cultivos celulares de diferentes tipos mostraram que a excelente citocompatibilidade, devido ao seu caráter catiônico faz as células se aderirem fortemente ao material que contém a quitosana e gera uma boa proliferação (ABRAHAM et al, 2004). A Tabela 3 mostra alguns trabalhos publicados sobre a adição de quitosana em CFC's com o intuito de se melhorar a moldabilidade do cimento e, em alguns casos, retardar o processo de cura, para que o mesmo apresente melhores condições cinéticas que possibilitem seu estudo.

Além do que já foi dito anteriormente, a incorporação de uma matriz polimérica a um cimento de fosfato de cálcio apresenta-se como uma idéia interessante, no sentido de "imitar" a composição do tecido ósseo.

#### 4 Materiais e Métodos

#### 4.1 Síntese e caracterização do β-TCP

A síntese do  $\beta$ -TCP, foi baseada em Jinlong e colaboradores (2002), misturou-se 78,3 g de CaCO<sub>3</sub> (Dinâmica) e 212,6 g de CaHPO<sub>4</sub> (Synth) na proporção de 1 mol de CaCO<sub>3</sub> para 2 moles de CaHPO<sub>4</sub>.

Colocaram-se os dois reagentes em um jarro de polietileno. A mistura foi feita com movimentos aleatórios durante quinze minutos para garantir a completa homogeneização.

Após a homogeneização, a mistura foi colocada em cadinhos de porcelana. Os cadinhos foram levados para calcinação em uma mufla (Lindberg Blue M, modelo BFS 1314C). Calcinouse por 6 horas a 1050 °C com taxa de aquecimento de 10 °C/min.

Terminada essa etapa, a mufla foi desligada e quando a mistura já estava à temperatura ambiente, foi feita a moagem do pó resultante.

A moagem do pó de  $\beta$ -TCP foi realizada utilizando-se um moinho de bolas. Utilizou-se um jarro de polietileno de 1L e 500 mL e bolas de alumina de 13 e 23 mm de diâmetro. Montouse o jarro de maneira que o pó + meio de moagem ocupasse 50 % do volume do jarro. Foi utilizado aproximadamente 70% em volume de pó e 30% em volume de meio de moagem. O tempo de moagem foi de 48 horas.

Para a caracterização do pó resultante foram realizadas análises de difração de raios X-DRX (equipamento Philips, modeloX'Pert, Radiação: Cu Ka de l=1,54060 A). De acordo com a carta de difração do  $\beta$ -TCP 09-0169, os picos característicos de  $\beta$ -TCP ocorrem entre 20° e 40°, sendo assim para a análise de DRX utilizou-se uma varredura entre 20° e 40° e uma taxa de 2° (20)/min.

Para caracterização do tamanho de partículas fez-se análise granulométrica através da técnica de dispersão de luz com isopropanol (equipamento Malvern, modelo S-MAM5005).

## 4.2 Preparação da solução de quitosana

A solução de quitosana foi preparada pela dissolução de 7,5g de quitosana (M=~65.000) extraída de casca de caranguejo (Sigma Aldrich, St. Louis, MO – número de produto C3646, mínimo de 85% de quitina desacetilada) em 292,5mL de solução aquosa de ácido acético (Merck,

glacial 100%) 3% (w/w), esta concentração foi utilizada, pois solubiliza melhor a quitosana e o manuseio da solução fica mais fácil.

A solução foi então tampada e armazenada a 4°C durante uma semana, com agitações diárias durante 10 minutos, para completa solubilização. A solução viscosa foi filtrada a vácuo em sistema de filtração Millipore® para a remoção da matéria insolúvel presente. O filtrado, de aparência límpida e homogênea, foi armazenado a 4°C em frasco de vidro tampado.

#### 4.3 Preparação e caracterização dos cimentos

A fase líquida do cimento foi feita através do preparo de três soluções de ácido fosfórico, uma não contendo quitosana, uma contendo 5% (w/w) da solução de quitosana previamente preparada e a terceira contendo 10% (w/w) da solução de quitosana.

A solução que não continha quitosana foi preparada através da dissolução de ácido fosfórico comercial (Synth) 85% em massa em água destilada. Mediu-se 203,5 mL ácido fosfórico comercial e completou-se 1 L com de água destilada. Resultando em um solução de ácido fosfórico 3,0 M.

Bohner e colaboradores (1993) estudaram o cimento em questão com concentrações de ácido fosfóricos que variavam de 0,5 M a 5 M, os melhores resultados, em termos de tempo de cura, extensão da reação, porosidade e resistência mecânica foram obtidos na concentração de 3 M, baseado nesta referência então é que decidiu-se utilizar neste trabalho a concentração da solução de ácido fosfórico em 3,0 M.

A solução que continha 5% (massa) de quitosana foi feita pesando-se 5 g da solução de quitosana (Sartorius CP224S) preparada em uma proveta, adicionou-se então 95 g da solução de ácido fosfórico 3,0 M.

A solução que continha 10% (massa) de quitosana foi feita pesando-se 10 g da solução de quitosana (Sartorius CP224S), adicionando-se então 90 g da solução de ácido fosfórico 3,0 M.

A preparação do cimento foi baseada em Bohner e colaboradores (1993).

Para a preparação do cimento foi utilizada a relação líquido/pó (L/P) de 1,0 mL/g. 2g de pó (fosfato de cálcio) eram cuidadosamente pesados em uma balança analítica (Sartorius CP224S) utilizando-se um vidro de relógio. Neste mesmo vidro de relógio contendo o pó, adicionavam-se 2mL, medidos com o auxílio de uma pipeta, de solução de ácido fosfórico. A

mistura era manualmente agitada por 60s com o auxílio de uma pequena espátula, e então colocada em moldes de Teflon<sup>®</sup> com 6 mm de diâmetro e 12 mm de altura conforme mostrado na Figura 6. Para a desmoldagem destes cilindros, utilizou-se um molde macho confeccionado em policarbonato. A Figura 7 mostra o dispositivo utilizado para a desmoldagem dos cilindros.



Figura 6: Molde de Teflon<sup>®</sup>



Figura 7: Molde usado para desmoldagem dos cilindros

O tempo de cura do cimento foi medido através do método das Agulhas de Gilmore (ASTM- C-266-04). Este método consiste no uso de duas agulhas com massas diferentes, uma com menor massa e outra com maior massa. Após a moldagem do cimento nos cilindros utilizava-se a agulha de menor massa para verificar a marcação da ponta da agulha na superfície do cimento, quando esta marcação não era mais visível anotava-se o tempo (tempo inicial de endurecimento), e passava-se então a utilizar a agulha de maior massa para marcação da superfície do cimento, quando esta marcação não era mais visível anotava-se o tempo (tempo inicial de superfície do cimento, quando esta marcação não era mais visível anotava-se o tempo (tempo final de endurecimento do cimento).

## 4.4 Análise da reação de cura (endurecimento ou "pega") do cimento

A reação de cura foi analisada através de dois métodos para verificar a evolução das fases cristalinas formadas.

# 4.4.1 Análise da reação de cura do cimento – método I

O método I consistiu na análise da reação de cura ao mesmo tempo que a reação ocorria. Para isso, confeccionou-se um porta amostras com com as dimensões exatas do porta amostras do equipamento de raios-X a ser utilizado. Este porta amostras é mostrado na Figura 8. As análises de DRX foram feitas utilizando-se um equipamento Philips, modeloX Pert com Radiação: Cu Ka de 1=1,54060 A, para todas as análises foi feita uma varredura total de 10° (20) a 40° (20) com uma taxa de 2° (20/min).

Neste caso, devido ao tamanho do porta amostras, utilizou-se 1g para 1mL de líquido, porém a proporção L/P foi mantida . O pó foi cuidadosamente pesado (Sartorius CP224S) e transferido para o porta amostras. O líquido foi então adicionado e misturado durante 60 s. Após a mistura, o porta amostras foi levado para o equipamento dando início então às análises. Devido ao tempo da análise, a primeira análise era feita de 10  $^{\circ}$  a 20  $^{\circ}$ , depois outra amostra era preparada e feita a análise de 20 $^{\circ}$  a 30 $^{\circ}$  e assim sucessivamente até completar todo o espectro desejado.

As análises foram feitas em diferentes tempos da reação de cura:

- 5, 10, 15 min. para amostras contendo 0% de quitosana,
- 5, 10, 15 e 20 min. para amostras contendo 5% de quitosana,
- 5, 10, 15, 20 e 25 min. para amostras contendo 10% de quitosana.



Figura 8: Porta amostra em policarbonato

Trabalhos na literatura, conforme mostrados na Tabela 4 relatam que a adição de quitosana em cimentos de fosfato de cálcio retarda o tempo de endurecimento. Sendo assim, observaram-se tempos maiores quanto mais solução de quitosana era adicionada.

## 4.4.2 Análise da reação de cura do cimento - método II

Para o método II utilizou-se a metodologia proposta por Ginebra e colaboradores (1997).

Foram preparados cilindros de 6mm de diâmetro e 12 mm de altura, e para os seguintes tempos:

- 5, 10, 15 min. para amostras contendo 0% de quitosana,
- 5, 10, 15 e 20 min. para amostras contendo 5% de quitosana,
- 5, 10, 15, 20 e 25 min. para amostras contendo 10% de quitosana.

os cilindros foram desmoldados, lavados em solução de acetona por 2 horas, para que cessasse a reação de cura, em seguida as amostras foram secas em estufa (Fanem ORION 515) por 100°C durante uma noite. Após o processo de secagem, as amostras foram trituradas em almofariz de cerâmica com a ajuda de um pistilo também de cerâmica. Os pós obtidos foram caracterizados por difração de raios-X.

A Figura 9 mostra o fluxograma com as etapas seguidas para realização do método II de análise da reação de cura do cimento.



Figura 9: Fluxograma para realização do método II de análise da reação de cura do cimento.

# 4.4 Imersão em Fluido Corporeo Simulado (FCS)

Os cimentos ósseos obtidos foram analisados antes e após a imersão em fluido corpóreo simulado (FCS) durante 7 dias para verificar a formação da camada fina de *apatita* na superfície dos mesmos.

A solução de FCS foi preparada conforme metodologia apresentada por Kokubo e colaboradores (2006). A composição iônica do FCS utilizado, comparada à do plasma sanguíneo é mostrada na Tabela 5.

Tabela 5: Composição iônica do FCS em comparação ao plasma sanguíneo (KOKUBO et al.,

Concentração (mMol/L)	Na <sup>+</sup>	$K^+$	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	СГ	HCO <sup>3-</sup>	$HPO_4^{2-}$	$SO_4^{2-}$
FCS	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5
Plasma Sanguíneo	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5

2006)

Os cilindros obtidos (6 mm de diâmetro e 12 mm de altura) foram colocados na solução preparada de FCS, e deixadas por 7 dias em temperatura de 36,5°C. O pH da solução foi medido antes e após a imersão das amostras. A solução de FCS foi trocada a cada dois dias.

Após a retirada das amostras da solução de FCS, as mesmas foram deixadas em dessecador por 7 dias até que fossem feitas as análises. Para a realização das análises de DRX, as amostras foram trituradas com almofariz e pistilo de cerâmica.

Analisou-se também a superfície a fratura das amostras através de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

#### 5 Resultados e Discussão

## 5.1 Caracterização do fosfato Tricálcico

A Figura 10 mostra o difratograma para o pó obtido do processo descrito no item 4.1,



Figura 10: Difratograma obtido para o pó que será utilizado. Os picos marcados com  $\beta$  são picos característico do  $\beta$ -TCP.

Jinlong e colaboradores (2002) mostraram que, ao se calcinar CaCO<sub>3</sub> e CaHPO<sub>4</sub>, a formação do  $\beta$ -TCP começa a ocorrer por volta dos 900°C e que a partir de 1200°C começa a ocorrer a transformação de  $\beta$ -TCP em  $\alpha$ -TCP. O difratograma da mistura calcinada a 1050°C, Figura 10, mostra que a síntese foi eficaz, uma vez que o picos que caracterizam o  $\beta$ -TCP (carta de difração 09-0169) marcados com o símbolo  $\beta$ , na Figura 10, aparecem com bastante intensidade.



Figura 11: Distribuição granulométrica do  $\beta$ -TCP.

A Figura 11 mostra a distribuição granulométrica do β-TCP (obtida através do método de dispersão de luz). Percebe-se uma distribuição bem heterogênea do material, devido ao método de moagem empregado. Um resumo da distribuição granulométrica é apresentado na Tabela 6.

Tal	pela 6: distribuiçã	to granulométrica do $\beta$ -TCP.
	Dm(µm)	10% <d (μm)="" <90%<="" th=""></d>
	6,7	0,31 - 20,7

O tamanho da partícula influencia as propriedades do cimento no que se refere ao tempo de endurecimento, assim como na resistência mecânica do mesmo. No trabalho de Mirtchi e Lemaître (1989) foram utilizadas partículas de diâmetro médio de 1,5 µm, 2,3µm e 5,3µm e concluiu-se que o tamanho da partícula influencia na resistência mecânica do cimento, quanto maior a partícula maior a resistência mecânica. Por outro lado, o uso de reagentes muito finos aumenta a área de contato entre o reagente e a fase líquida diminuindo o tempo de reação. A distribuição heterogênea do material  $(0,31\mu$ m $-20,7\mu$ m) e um diâmetro médio de 6,7 $\mu$ m influenciará no tempo de endurecimento do cimento.

## 5.2 Medição do tempo inicial e final de cura

O tempo de cura inicial e final foi medido através dos métodos das agulhas de Gilmore e são relatados na Tabela 7.

Tabela 7: Tempo inicial e final de cura dos cimentos pelo método das agulhas de Gilmore.

· · · ·	C	11 1		1	· •	1	•
trinlicatae	toram	medidae	nara	Cada.	T1no	de	cimento
uipiicatas	Iorann	moutuas	para	caua	upo	uc	cincinc

	0% quitosana	5% quitosana	10% quitosana
Tempo Inicial (s)	72 <b>±</b> 2	107±15	130±0,3
Tempo Final (s)	328±14	367±6	352±12

Os resultados apresentados na Tabela 7 mostram que efetivamente a quitosana influencia no tempo de endurecimento do cimento, afetando principalmente o tempo inicial de cura. Os cimentos com adição de 5% e 10% de quitosana apresentaram tempo de endurecimento maior que o cimento sem adição de quitosana. Conforme dito em 3.2 o ideal para tempo inicial de cura é em torno de 10 minutos. Segundo mostrado na Tabela 7 o maior tempo inicial encontrado foi na maior concentração de quitosana, em torno de 2 minutos, ou seja, ainda muito rápido se comparado com o ideal relatado na literatura (BOHNER, 2007). Já o tempo final de cura, em torno de 5 minutos, não traria atrasos para a finalização da cirurgia.

Dados da literatura (BOHNER E LEMAÎTRE, 1993) mostram que cimentos preparados com  $\beta$ -TCP e ácido fosfórico a uma concentração de 3,0 M apresentam um tempo de endurecimento da ordem de 80 s.

Rau e colaboradores (2008) publicaram que a adição de quitosana em cimentos de  $\beta$ -TCP não afetava o produto final, que neste caso era a hidroxiapatita, porém aumentava o tempo de cristalização, sendo possível verificar este fato através da técnica de difração de raios- X com energia dispersiva. Este fenômeno também pode ser observado neste trabalho para a precipitação da *brushita*, uma vez que o tempo inicial de cura foi maior em cimentos com adição de quitosana, porém o tempo final não representa um aumento tão significativo. O que sugere que a

precipitação da *brushita* é afetada pela presença da quitosana.

#### 5.2 Monitoramento da reação de cura, método I

Os cimentos com e sem a adição de quitosana foram preparados de acordo com o item 4.3. A mistura foi colocada em um suporte de policarbonato construído para o encaixe no equipamento de DRX, e o endurecimento do cimento foi analisado em tempo real. Os resultados obtidos estão mostrados nas Figuras 12 a 14.

Os picos marcados com \* são característicos da *brushita* (JCPDS 09-0077), os picos marcado com  $\beta$  são caracteríticos do  $\beta$ -TCP (JCPDS 09-0169) e os picos marcados com 0 são caracteríticos da *monetita* (JCPDS 09-0080). O que pode ser confirmado é que o processo de cura se dá através da dissolução do  $\beta$ -TCP e precipitação de DCPD (*brushita*), porém alguma quantidade de  $\beta$ -TCP ainda resta sem reagir. Também é possível observar que durante a reação é formado DCPA (*monetita*). Não é possível observar a evolução da fase de  $\beta$ -TCP  $\rightarrow$ DCPD, pois não há diferenças significativas entre os tempos estudados, tanto para cimentos sem adição de quitosana quanto para cimentos com adição.

Porém é interessante observar que para cimentos contendo 10% de quitosana a intensidade dos picos característicos do DCPD é menor no tempo de 5 min, o que mostra que a quitosana realmente influencia na precipitação dos cristais de DCPD. Por esse motivo o tempo inial de cura é maior nos cimentos contendo quitosana.

A reação mostrada na Equação 2 ocorre em alguns segundos, a adição da quitosana apenas inibe o crescimento dos cristais de DCPD, uma vez que a maior parte da fase  $\beta$ -TCP é transformada em DCPD. Bohner e Lemaitre (1993) publicaram que este cimento reage e endurece em aproximadamente 80s, e que isso representa uma das principais desvantagens dos cimentos de *brushita*. Em 2007 Bohner publicou que apesar dessa alta reatividade dos cimentos de *brushita*, a reação ainda continua por aproximadamente um dia até sua completa finalização.

Quanto a cristalinidade das amostras, a quitosana não possui uma influência visível, os picos em todos os difratogramas são sempre bem definidos. Autores estudaram a precipitação de fosfatos de cálcio em presença de alginato e quitosana: as amostras precipitadas na presença de quitosana apresentaram maior cristalinidade em relação às amostras precipitadas sem a presença de quitosana (AIMOLI et al., 2008 AIMOLI et al., 2009) . Porém, neste trabalho, o fato da

reação ocorrer em fase pastosa ou sólida e não líquida e fluida como no trabalho de Aimoli, pode ter ocorrido um componente forte de limitação de transferência de massa de maneira que não foi possível perceber diferenças significativas na cristalinidade do material devido a presença do biopolímero.



Figura 12: Análise durante o processo de cura do cimento, amostra contendo 0% de quitosana método I. Picos marcados com \* são característicos da *brushita* os picos marcado com  $\beta$  são característicos do  $\beta$ -TCP e os picos marcados com 0 são característicos da *monetita*.



Figura 13: Análise durante o processo de cura do cimento, amostra contendo 5% de quitosana método I. Picos marcados com \* são característicos da *brushita* os picos marcado com  $\beta$  são característicos do  $\beta$ -TCP e os picos marcados com 0 são característicos da *monetita* 



Figura 14: Análise durante o processo de cura do cimento, amostra contendo 10% de quitosana método I. Picos marcados com \* são característicos da *brushita* os picos marcado com  $\beta$  são característicos do  $\beta$ -TCP e os picos marcados com 0 são característicos da *monetita*.

# 5.3 Monitoramento da reação de cura, método II

Utilizando-se o método II para análise da evolução da reação de cura, conclui-se que a fases formadas são as mesmas observadas através do método I, são elas: os picos marcados com \* são característicos da *brushita* (JCPDS 09-0077), os picos marcado com  $\beta$  são caracteríticos do  $\beta$ -TCP (JCPDS 09-0169) e os picos marcados com 0 são caracteríticos da *monetita* (JCPDS 09-0080). Os difratogramas obtidos são mostrados nas Figuras 15 a 17.



Figura 15: Análise durante o processo de cura do cimento, amostra contendo 0% de quitosana método II. Picos marcados com \* são característicos da *brushita* os picos marcado com  $\beta$  são característicos do  $\beta$ -TCP e os picos marcados com 0 são característicos da *monetita*.



Figura 16: Análise durante o processo de cura do cimento, amostra contendo 5% de quitosana método II. Picos marcados com \* são característicos da *brushita* os picos marcado com  $\beta$  são característicos do  $\beta$ -TCP e os picos marcados com 0 são característicos da *monetita*.



Figura 17: Análise durante o processo de cura do cimento, amostra contendo 10% de quitosana método II. Picos marcados com \* são característicos da *brushita* os picos marcado com  $\beta$  são característicos do  $\beta$ -TCP e os picos marcados com 0 são característicos da *monetita*.

Apesar das fases observadas pelo método I e pelo método II serem as mesmas, as fases referentes ao β-TCP e a *monetita* aparecem com mais intensidade nos difratogramas obtidos através do método II. O que ocorre neste caso é a tranformação de *brushita* em *monetita*, ou seja ocorre uma desidratação do DPCD, segundo a reação descrita na Equação 4:

$$CaHPO_4.2H_2O \rightarrow CaHPO_4 + 2H_2O \tag{4}$$

Uma das razões para isso, é que o método I analisou apenas a superfície da amostra, enquanto o método II analisou a amostra como um todo, uma vez que a amostra foi triturada para análise.

Bohner (2007) publicou que a utilização em tempo real da difração de raios-X apresentava-se como um método confiável para análises da evolução da reação de cura de cimentos de fosfatos de cálcio, porém o limitante seria justamente o fato desta análise concentrar-se na superfície dos cimentos onde a evaporação e os efeitos térmicos podem alterar a superfície quando comparada com o centro da amostra. Porém, neste caso deveríamos observar o contrário do que observamos nos difratogramas, haveria uma diminuição nos picos de *brushita* e um aumento dos picos de *monetita*, quando na verdade, para os mesmos tempos observados, temos dois resultados diferentes dependendo do método de análise aplicado.

Ginebra (1996) utilizou procedimentos que param a reação durante o processo, e então são caracterizadas as etapas distintas da reação. Foram dois métodos utilizados para parar a reação: congelamento e liofilização das amostras e imersão em acetona. Estas técnicas foram utilizadas para que se retirasse a água da reação, e assim, a cura do cimento fosse cessada. Estes métodos têm a vantagem de conseguirem uma "fotografia" do que ocorre na reação; porém foram desenvolvidos para cimentos de  $\alpha$ -TCP, que utilizam a água como fase líquida. Para os cimentos propostos neste trabalho, a fase líquida é o ácido fosfórico, assim a técnica de congelamento e liofilização poderia não ser eficaz para cessar a reação. Já na técnica de imersão em acetona poderia ocorrer reações entre o ácido fosfórico e a acetona influenciando a cura do cimento e causando ruídos na caracterização.

De acordo com a tabela 2, a *monetita* somente é estável a temperaturas maiores que 100°C em ambientes secos, porém Bohner et al (2000) publicaram que fatores como presença ou ausência de água, pH, tempo e temperatura influenciam na conversão de DCPD em DCPA. O que

42

pode ter ocorrido é que o propósito do método II era justamente retirar a água da reação para que a mesma cessasse, sendo assim o fato das amostras serem imersas em acetona provocou a desidratação da *brushita* em *monetita*.

O método II foi adaptado de um método de análise desenvolvido para cimentos de  $\alpha$ -TCP que reage principalmente com água, diferente do cimento de  $\beta$ -TCP que reage com ácido fosfórico. No caso do cimento em questão a reação de precipitação de DPCD ocorre tão rapidamente que a tentativa de parar a reação com a retirada da água, apenas influenciou na decomposição do produto final da reação.

Também pode ser observado que a quitosana não altera a formação cristalina do cimento, uma vez que os difratogramas das amostras que continham quitosana não foram diferentes daqueles que não continham quitosana, tanto para o método I como para o método II.

Alguns autores (BOHNER, LEMAÎTRE, 1993) publicaram que a reação de cura dos cimentos a base de  $\beta$ -TCP ocorria de maneira muito rápida, em torno de 80 s. Outros trabalhos publicados mostraram ser viável a adição de quitosana para retardar o tempo de endurecimento de cimentos de  $\alpha$ -TCP ou TTCP e ácido fosfórico (RAU et al. 2008). Pretendia-se então com a adição da quitosana retardar o processo de cura de cimentos de  $\beta$ -TCP e ácido fosfórico, para que as fases formadas fossem observada. Os resultados obtidos mostraram que a quitosana realmente influencia na preciptação da *brushita*, uma vez que no difratograma de 5 minutos de reação com 10% de quitosana (Figura 14) a intensidade dos picos de *brushita* é menor.

### 5.4 Caracterização dos cimentos antes e após imersão em FCS

As Figuras de 19 a 20 mostram os difratogramas obtidos para amostras após 24 hrs de cura e imersas por 7 dias em solução de fluido corpóreo simulado (FCS).



Figura 18: Cimento após 24 horas de cura, e imerso por 7 dias em FCS, amostra contendo 0% de quitosana. Picos marcados com \* são característicos da *brushita* os picos marcado com  $\beta$  são característicos do  $\beta$ -TCP e os picos marcados com 0 são característicos da *monetita*.



Figura 19: Cimento após 24 horas de cura, e imerso por 7 dias em FCS, amostra contendo 5% de quitosana. Picos marcados com \* são característicos da *brushita* os picos marcado com  $\beta$  são característicos do  $\beta$ -TCP e os picos marcados com 0 são característicos da *monetita* 



Figura 20: Cimento após 24 horas de cura, e imerso por 7 dias em FCS, amostra contendo 10% de quitosana. Picos marcados com \* são característicos da *brushita* os picos marcado com  $\beta$  são característicos do  $\beta$ -TCP e os picos marcados com 0 são característicos da *monetita*.

Novamente, as fases observadas foram: *brushita* (JCPDS 09-0077) picos marcados com \*,  $\beta$ -TCP ( JCPDS 09-0169) picos marcado com  $\beta$  e *monetita* (JCPDS 09-0080) picos marcados com 0. Observa-se que os difratogramas obtidos de amostras após 24 hrs de cura são muito semelhantes aos difratogramas obtidos pelo método I, porém com menor intensidade dos picos, ou seja, realmente a reação na superfície é mais rápida que no centro da amostra. A análise das amostras após 24 hrs foram feitas com as amostras trituradas, enquanto o método I analisou-se apenas a superfície. Este resultado é coerente com dados da literatura, Bohner 2007 publicou que apesar da alta reatividade de cimentos de *brushita*, a reação de cura normalmente leva um dia para completar-se.

As Figuras 21 e 22 mostram as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para superfície e fratura de amostras curadas e deixadas por 7 dias em FCS.



Figura 21: Micrografias da superfícies das amostras contendo 0% (a), 5% (c) e 10% (e) de quitosana. Micrografias das fraturas das amostras contendo 0% (b), 5% (d) e 10% (f) de quitosana. Sem imersão em FCS.



Figura 22: Micrografias da superfícies das amostras contendo 0% (a), 5% (c) e 10% (e) de quitosana imersas por 7 dias em FCS. Micrografias das fraturas das amostras contendo 0% (b), 5% (d) e 10% (f) de quitosana deixadas por 7 dias em FCS.

Analisando-se tanto os resultados de DRX quanto os resultados de MEV, conclui-se que a imersão dos cimentos nesta solução não altera a formação cristalina dos mesmos.

Os difratogramas das amostras curadas por 24 h sem imersão na solução de FCS são semelhantes aos difratogramas obtidos após a imersão em FCS (Figuras 18, 19 e 20).

A análise das micrografias das amostras antes da imersão em FCS confirma a formação de DCPD (estruturas em forma de cristais) tanto para superfície quanto para fraturas. A análise das micrografias das amostras após a imersão em FCS confirma a formação da capa de *apatita* primeiramente devido a uma diferença na superfície antes e depois da imersão, depois pela observação de duas estruturas diferentes nas micrografias de fraturas. As setas nas figuras 22b, 22 d e 22 f indicam a existência da capa de *apatita*.

Como dito anteriormente, a característica que faz algumas cerâmicas serem bioativas é a formação de uma camada de hidroxiapatita em um meio biológico. Estes cristais possuem estrutura química idêntica à estrutura mineral dos óssos e forma fortes ligações com o tecido vivo. Os resultados deste trabalho indicam que o cimento proposto é um material bioativo. Esta fase não foi observada nos difratogramas, pois a camada formada é muito fina. Seria possível verificar a estrutura cristalina desta fase através da técnica de difração de raios-X de filme fino.

Os resultados de pH da solução de FCS antes e após a imersão das amostras são mostrados na tabela 8. O pH da solução antes da imersão das amostras, ou seja no primeiro dia foi ajustado em 7,40

	ajustado*	0%	5%	10%
2° dia		7,27	7,19	7,12
3° dia	7,40**	7,59	7,59	7,58
4° dia	-	7,92	7,62	7,55
5° dia	7,53**	7,02	7,11	7,07
6° dia	-	7,33	7,40	7,43
7° dia	7,53	7,13	7,28	7,27

Tabela 8: Resultados de pH da solução de FCS antes e após a imersão das amostras.

\* valor do pH ajustado com solução de HCl, antes da imersão dos pinos.
\*\* troca da solução
- não houve troca da solução.

Analisando os resultados mostrados na Tabela 8, o pH da solução alterava com a imersão

dos pinos, em alguns casos a solução tornava-se mais ácida em outros a solução tornava-se mais básica, não tendo um padrão para a variação, porém o pH mais baixo encontrado foi de 7,02, ou seja uma solução neutra, que não causaria um processo inflamatório caso o cimento fosse implantado.

#### 6 Discussão

Cimentos de *bruhita* foram primeiramente propostos por Mirtchi and Lemaître em 1989, estudos posteriores mostraram que a vantagem em relação aos cimentos de *apatita* é sua capacidade de ser reabsorvido em condições fisiológicas, porém a maior desvantagem deste tipo de cimento é a dificuldade de manuseio, uma vez que o tempo de cura é muito rápido, além de apresentar baixa resistência mecânica.

A taxa de reação de um cimento deve ser muito bem controlada, ou seja, um cimento deve reagir devagar para que haja tempo de moldá-lo na cavidade, em contrapartida também deve reagir rápido para que não haja atrasos durante a cirurgia. Frente ao exposto é essencial o entendimento e o controle da reação de cura de um cimento. Um dos objetivos deste trabalho foi propor um método para analisar toda a reação de cura de um cimento de *brushita*, o que representa um desafio, uma vez que é um cimento de cura muito rápida. Considerando a importância da evolução da reação de cura, e a limitada informação que o tempo inicial e final de cura geram, estudos (HOFMANN, 2006,GROVER, 2005) têm sido publicados no sentido de trazerem métodos confiáveis para este tipo de análise.

Nos últimos 14 anos, desde a descoberta dos cimentos de *brushita*, muitos aditivos foram propostos na formulação original para prolongar o tempo de cura e melhorar a resistência mecânica. Segundo Bohner (2007) uma das maneiras de prolongar o tempo de reação é o uso de inibidores do crescimento dos cristais. Rau et. al. (2008) propôs o uso de quitosana como aditivo para inibir o crescimento dos cristais e assim conseguir prolongar o tempo de cura de cimentos. A quitosana é um biopolímero natural, biocompatível, biodegradável e osteocondutivo, sendo assim, representa um aditivo muito interessante para ser usado como em cimentos ósseo. A adição deste biopolímero também vem de encontro com a idéia de "imitar" a natureza, e incorporar uma fase orgânica na fase inorgânica, imitando o tecido ósseo.

A formulação proposta aqui é nova no sentido de utilizar como fase polimérica a quitosana, em cimentos que tem como produto final a *brushita*. Este biopolímero já foi utilizado como aditivo em outras formulações de cimentos de fosfato de cálcio, porém principalmente em cimentos de *apatita*. A quitosana foi incorporada principalmente para melhorar a moldabilidade dos cimentos (YOKOYAMA et al., 2002, Liu et. al., 2006, TAKAGI et.al., 2003), ou ainda para

otimizar o tempo de endurecimento (RAU et al., 2008). Assim como no trabalho de Rau et al. (2008) observa-se que a quitosana realmente influenciou a precipitação da *brushita* e com isso melhorou o tempo inicial de cura, o que é desejável para melhorar o manuseio do cimento em um possível implante.

A quitosana possui uma característica similar aos cimentos de *brushita* que é sua capacidade de ser reabsorvível *in vivo*, além de possuir boa citocompatibilidade, o que faz com que as células proliferem em sua superfície. Estes dois fatos combinados com os resultados de bioatividade do cimento proposto fazem com que esta nova formulação seja promissora e novos estudos sejam conduzidos.

Os cimentos de *brushita* podem ser utilizados como precursores para a formação de *monetita*, sendo assim em condições apropriadas a *brushita* pode reagir e formar *monetita* (forma anidra da *brushita*). Estas condições são: baixo pH, ausência de água ou ainda presença de íons metálicos. Como dito anteriormente um ponto ainda pouco explorado na literatura (BOHNER, 2007) é a análise das fases formadas durante o processo de cura de cimentos de *brushita*. Por ser um cimento de cura muito rápida, um dos métodos propostos neste trabalho foi a tentativa de parar a reação e analisar as fases formadas, este método foi usado por Ginebra (1996) para estudar as fases formadas durante o processo de endurecimento de cimentos *apatita*. Porém este mesmo método usado para o cimento de *brushita* em discussão neste trabalho criou uma condição favorável para a conversão da *brushita* em *monetita*, devido a ausência de água na reação, então o método II não se mostrou viável para analisar as fases formadas.

Já o método I mostrou-se mais viável para a análise, porém com ele conclui-se que a reação realmente é muito rápida e que a formação de *brushita* ocorre instantaneamente sem formação de fases intermediárias. Neste ponto a quitosana influenciou o tempo de preciptação dos cristais, mas não a sua formação, por isso o tempo inicial de cura é mais alto quanto maior a adição de quitosana na mistura. A limitação do método I, conforme já publicado por Bohner em 2007 é o tempo requerido para cada medida e o fato das análises ocorrerem na superfície, onde evaporação e os efeitos térmicos podem modificar a reação quando comparada com o centro da amostra.

Tendo em vista a discussão acima, o cimento proposto mostra-se como um promissor biomaterial pela sua bioatividade, de acordo com os resultados de imersão em FCS. O tempo de cura confirmou-se ser muito rápido, porém a adição de quitosana retarda em alguns segundos este tempo. Fato interessante deste trabalho foi o emprego de um método inicialmente desenvolvido para cimentos de  $\alpha$ -TCP em cimentos de  $\beta$ -TCP, que se mostrou não favorável para o objetivo proposto, porém a síntese de *monetita*, um material estável apenas acima de 100°C pode ser possível em temperatura ambiente controlando-se umidade e pH.

Para os ensaios de compressão mecânica, encontraram-se dificuldades no momento do preparo das amostras. A dissolução da fase sólida com a fase líquida resultava em um líquido pouco viscoso, porém que endurecia muito rapidamente. Ao verter este líquido nos moldes de teflon, bolhas eram formadas, o que influenciaria nos resultados de compressão mecânica. Também não era possível o manuseio do cimento após a colocação no molde, no sentido de evitar bolhas, pois essa operação também influenciaria nos resultados de compressão, através de uma reacomodação do material, tornando o cimento menos resistente.

Porém um fato interessante observado foi a forte adesão do cimento nos moldes de teflon, o que indica uma possível boa adesão aos tecidos ósseos. No entanto, estudos posteriores deveriam ser conduzidos para comprovar esta idéia.

## 7 Conclusões

1) O objetivo principal deste trabalho foi alcançado, foi possível desenvolver um cimento a base de  $\beta$ -TCP e quitosana que apresentou bioatividade em FCS, pela observação da formação da capa de apatita quando imersa em fluido corpóreo simulado. A adição da quitosana não alterou a cristalinidade do cimento final, porém melhorou algumas características deste tipo de cimento relatados na literatura, como o tempo inicial de cura maior.

2) O  $\beta$ -TCP foi obtido através de um processo muito simples, o que torna este cimento promissor para ser estudado e aprimorado como um novo biomaterial acessível e de baixo custo para a população.

3) Também foram propostos dois métodos para a análise da evolução da reação de cura, um dos métodos não foi possível observar diferenças significativas entre o tempo de cura, confirmando-se que a cura deste tipo de cimento é muito rápida, além disso, o fato da quitosana retardar o tempo inicial de cura não axiliou muito na análise da evolução da reação de cura, uma vez que a quitosana retardou apenas o crescimento dos cristais de DCPD, mas não a sua formação. O segundo método foi adaptado de cimentos de  $\alpha$ -TCP e acabou-se tendo como resultado uma alteração nos elementos finais do cimento. Formou-se monetita como produto final da reação de cura, a *monetita* é um fosfato de cálcio estável a temperaturas maiores que 100°C e neste caso sintetizou-a em temperatura menores ou igual a 100°C, apenas alterando características do meio ambiente como ausência de água e pH.

# 8 Sugestões para trabalhos futuros

Visando melhorar e entender melhor as características finais deste cimento sugere-se para trabalhos futuros:

- Estudo das características mecânicas deste cimento, este estudo permitiria verificar a possibilidade deste material ser usado como um implante *in vivo* e sugestões para o local do implante.
- Estudo da influência do tamanho de partículas no tempo de cura do cimento, e proposição de um tamanho ideal de partícula em termos de tempo de cura.
- Proposição da melhor combinação do tamanho de partículas, e da relação líquido pó para a fim de maximizar o tempo de cura e a resistência mecânica.
- Ensaios para verificar a adesão do cimento no tecido ósseo.
- Viabilidade de fazer um estudo da biocompatibilidade *in vivo* do cimento proposto.
- Estudo do tempo de absorção do cimento pelo organismo, e estudo da taxa de crescimento de um novo tecido, caso o material fosse realmente implantado.
- Aprofundar estudos de condições para formação de *monetita* em temperatura ambiente.
- Ensaios para verificar a toxicidade do cimento proposto.
## 9 Referências Bibliográficas

**ASTM-C266-04:** Standard Test Method for time of setting of hydraulic-cement paste by Gillmore needles.

ABRAHAM, A. G. et al. Biopolímeros de origen natural. In: **Biomateriales**. 1. ed. Faenza Editrice Iberica s.l., 2004. p.109-128.

AIMOLI, G. C.; OLIVEIRA, L.D.; BEPPU, M.M. Investigation on the biomimetic influence of biopolymers on calcium phosphate precipitation-part 2: Chitosan. **Materials Science and Engineering C**, v. 28. p. 1565–1571, 2008

AIMOLI, G. C.; OLIVEIRA, L.D.; BEPPU, M.M. Investigation on the biomimetic influence of biopolymers on calcium phosphate precipitation—Part 1: Alginate. **Materials Science and Engineering C**, v. 29. p.1109–1113, 2009

AMBARD, A.J.; MUENINGHOFF, L. Calcium phosphate cement, review of mechanical and biological properties. **J. Prosthodon**, v. 15, p. 321-328, set./out. 2006.

ARCOS, D.; REGÍ-VALLET, M. Bioceramics for drug delivery. Acta materialia, v. 61, p. 890-911, 2013.

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

BOWEN, C. E.; TANG, H., Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 115 A (1996) p. 269-275.

BOHNER, M.; LEMAÎTRE, J. Hydraulic properties of tricalcium phosphate – phosphoric acid – water mixtures. Journal of Materials Science Materials in Medicine, v.8, 1993

BOHNER, M.; VAN LANDUYT, P.; MERKLE, H.P.; LEMAÎTRE, J. Composition effects on the pH of a hydraulic calcium orthophosphate cement. **Journal of Materials Science Materials in Medicine**, v.8, p. 675-681, 1997.

BOHNER, M., et al. Effect of several additives and their mixtures on the physico-chemical properties of a calcium phosphate cement. Journal of Materials Science Materials in Medicine, v.11, p. 111-116, 2000.

BOHNER, M., MERKLE, H.P.; LEMAÎTRE, J. In vitro aging of a calcium phosphate cement. Journal of Materials Science Materials in Medicine, v.11, p. 155-162, 2000.

BOHNER, M. Reactivity of calcium phosphate cements. **Journal of Materials Chemistry**, v.17, p. 3980-3986, 2007.

BROWN, W. E.; CHOW, L. C. A New Calcium Phosphate Setting Cement. J. Dent. Res., v.62 1983.

CALVERT, P.; RIEKE, P. Chemistry of Materials 8 (1996) 1715-1727

CARRODEGUAS, R. et al. Hydrothermal Method for Preparing Calcium Phosphate Monoliths. **Materials Research**, v. 6, p. 395-401, 2003.

DOROZHKIN, S. V. Calcium Othophosphates. J. Mater. Sci., v.42, p.1061-1095, 2007.

DOROZHKIN, S. V. Calcium Orthophosphate Cements and Concretes. Materials, v. 27, p. 221-291, 2009.

DOROZHKIN, S. V. Bioceramics of Calcium Orthophospates. Biomaterials, v. 31, p. 1464-1485, 2010.

DUBOK, V. A. Bioceramics – Yesterday, Today and Tomorrow. **Powder Metallurgy and Metal Ceramics**, v.39, p.381-394, 2000.

GAUTHIER, O. et al. Kinetic Study of Bone Ingrowth and Ceramic Resorption Associated with the Implantation of Different Injectable Calcium- Phosphate Bone Substitutes. J. Biomed. Mater. Res., v.47, p. 28-35, 1999.

GINEBRA, M.P., TRAYKOVA, T. E PLANELL, J.A. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review. **J. Control. Rel**., v.113,p. 102-110, 2006b.

— 2006a. Calcium phosphate cements: competitive drug carriers for the musculoskeletal system.
Biomaterials., v. 27, p. 2171-2177, 2006a.

GINEBRA, M.P. Desarrolo y caracterización de un cemento óseo basado en fosfato tricálcico- α para aplicaciones quirurgicas. 1996. Dissertação (Doutorado em Ciências, Especialidade Física) – Departament de Ciências dels Materials i Enginyeria Metalurgica, Universitat Politécnica de Catalunya, 1996.

GINEBRA, M.P. et al. Calcium phosphate cements as drug delivery materials. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 64, p. 1090–1110, 2012.

GROVER, L. et al. Temperature dependent setting kinetics and mechanical properties of  $\beta$ -TCP– pyrophosphoric acid bone cement. **J. Mater. Chem.**, v.15, p.4955-4962, 2005.

HOFMAN, M. P. et al. FTIR-monitoring of a fast setting brushite bone cement: effect of intermediate phases. J. Mater. Chem., v.16, p.3199-3206, 2006.

HENCH, L. L. Bioceramics. J. Am. Ceram. Soc., v.7, p. 1705-1728, 1998.

http://hcupnet.ahrq.gov, acessado em 04 de agosto de 2013.

JINLONG, N.; ZHENXI, Z.; DAZONG, J. Investigation of phase evolution during the thermochemical synthesis of tricalcium phosphate. Journal of Materials Synthesis and **Processing**, v. 9, p. 235-240, 2002.

KOKUBO, T. Bioactive glass ceramics: properties and applications. **Biomaterials**, v12, p. 155-163, 1991.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials,** v 27, p. 2097-2915, 2006.

KUMAR, M. N. V. R., A Review of Chitin and Chitosan Applications. **Reactive and Functional Polymers,** v. 46, p.1-27, 2000.

LEGEROS, R. Z., CHOHAYEB, A. E SHULMAN, A. Apatitic calcium phosphates: possible dental restorative materials. J. Dent. Res., v.61, 1982.

LEGEROS, R. Z., Calcium phosphates in oral biology and medicine. Monographs in oral science, v.15 1991.

LEGEROS, R. Z., CRAIG R.G., Strategic to affect bone remodeling: osteointegration. J. Bone Miner. Res., v.8, p. 583-596, 1993.

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

MOTISUKE, M. Síntese de Cimento Ósseo a base de α-TCP e Estudo da Influência do Mg e do Si em suas Propriedades Finais. 2010. Dissertação (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

MONTEIRO, F. J., SAN RÓMAN J. Biomateriales: Introducción y Desarrollo Histórico. In: **Biomateriales**. 1. ed. Faenza Editrice Iberica s.l., 2004. p.17-40.

MIRTCH, A. A., LEMAITRE, J. Calcium phosphate cements: study of the  $\beta$ -Tricalcium Phosphate – Monocalcium phosphate System. **Biomaterials**, v.10, p. 475-480, 1989.

RAU, J. V. et al. Energy dispersive X-ray diffraction study of phase development during hardening of calcium phosphate bone cements with addition of chitosan. Acta Biomaterialia, v.4, p.1089–1094, 2008.

PRADO DA SILVA, M.H. Recobrimento de titânio com hidroxipatita: desenvolvimento do processo de deposição eletrolítica e caracterização biológica in vitro. Tese de doutorado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, 1999.

SAHOO, D. Chitosan: a new versatile bio-polymer for various applications. **Designed Monomers and Polymers,** v.12, p. 377-404, 2009.

TAMIMI, F.; SHEIKH, Z.; BARRALET, J. Dicalcium phosphate cements: Brushite and monetite. Acta Biomaterialia, v 8, p. 474-487, 2012.

TAKAGI, S. Properties of elastomeric calcium phosphate cement–chitosan composites. **Dental Materials**, v.19, p 797–804, 2003.

TONOLI, M. S.; LEAL, C. V.; ZAVAGLIA, C. A.; BEPPU, M. M. Development and characterization of  $\beta$ - tricalcium phosphate cements containing chitosan. Key Engineering Materials, v.309-311, p.845-848, 2006.

WILLIAMS, D. F. **Definitions in Biomaterials**: proceedings of a consensus conference of European Society for Biomaterials. 1. ed. Amsterdã: Elsevier, 1986. 72p.

YOKOYAMA, A. et al. Development of calcium phosphate cement using chitosan and citric acid for boné substitute materials. **Biomaterials**, v. 23, p. 1091-1101, 2002.