

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

*SCAFFOLDS* DE ÓXIDO DE TITÂNIO E BIOSILICATO PARA APLICAÇÕES  
MÉDICAS E ODONTOLÓGICAS OBTIDOS COM O USO DE PARTÍCULAS  
ORGÂNICAS

Mérlin Cristina dos Santos Fernandes

São Carlos  
2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E**  
**ENGENHARIA DE MATERIAIS**

*SCAFFOLDS* DE ÓXIDO DE TITÂNIO E BIOSILICATO PARA APLICAÇÕES  
MÉDICAS E ODONTOLÓGICAS OBTIDOS COM O USO DE PARTÍCULAS  
ORGÂNICAS

Mérlin Cristina dos Santos Fernandes

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciência e Engenharia  
de Materiais como requisito parcial à  
obtenção do título de DOUTOR EM  
CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS

Orientador: Dr. Márcio Raymundo Morelli

Coorientador: Dr. Pedro Íris Paulin Filho

Agência Financiadora: CAPES

São Carlos

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F363s      Fernandes, Mérilin Cristina dos Santos  
Scaffolds de óxido de titânio e biosilicato para  
aplicações médicas e odontológicas obtidos com o uso  
de partículas orgânicas / Mérilin Cristina dos Santos  
Fernandes. -- São Carlos : UFSCar, 2015.  
127 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2015.

1. TiO<sub>2</sub>. 2. Porosidade. 3. Biomaterial. 4.  
Bioatividade. 5. Regeneração óssea. I. Título.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais Antonio e Mara, os eternos e incondicionais incentivadores dos meus sonhos. São eles que estão do meu lado em todos os momentos.

## **VITAE DA AUTORA**

Mestra em Ciência e Engenharia de Materiais pela UFSCar (2010).

Graduada em Engenharia de Materiais pela UFSCar (2007).





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS


Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Mérlin Cristina dos Santos Fernandes, realizada em 30/01/2015:

  
Prof. Dr. Márcio Raymundo Morelli  
UFSCar

  
Prof. Dr. João Baptista Baldo  
UFSCar

  
Prof. Dr. Cauê Ribeiro de Oliveira  
Embrapa

  
Profa. Dra. Eliana Cristina da Silva Rigo  
USP

  
Profa. Dra. Juliana Kelmy Macário de Faria Daguano  
UFABC





## AGRADECIMENTOS

E no fim desta jornada, dedico meus sinceros agradecimentos às pessoas que contribuíram com esta longa, encantadora e nem sempre fácil caminhada.

Ao Prof. Dr. Márcio Morelli, pela oportunidade de realização deste trabalho e por sua orientação, ajuda, confiança e paciência no transcorrer do projeto.

Ao Clever Chinaglia que com seu olhar crítico e construtivo expandiu os horizontes desta pesquisa. Agradeço pelas conversas norteadoras e análises no microscópio eletrônico de varredura.

À Marina Trevelin e Murilo Crovace por compartilharem toda sua experiência em cerâmicas médicas e odontológicas. À Marina agradeço ainda pelo auxílio nos ensaios de bioatividade *in vitro*.

Ao Walter Mariano por toda a amizade ao longo destes anos de vivência no DEMa. Agradeço pelas análises realizadas neste trabalho e desde a época de Iniciação Científica.

Ao José Luis do Laboratório de Ensaio Mecânicos pela disponibilidade e simpatia na realização dos ensaios de resistência mecânica.

Ao Robson, que contou com uma torcida animada e engajada para ocupar um dos principais lugares da minha vida. Sua forma doce de ouvir e incentivar me mantém sempre confiante. Obrigada por todo o amor, pelo carinho, pelo cuidado, por existir.

Aos meus pais Antonio e Mara que, até onde deu, souberam enfrentar a dificuldade de conviver, mas sempre concordando que o estudo levaria suas filhas longe. Vocês são meu orgulho e sei que eu e minha irmã somos o orgulho de vocês.

À minha irmã Évelin agradeço por ser sempre meu braço direito e me deixar ser o seu quando necessário. Obrigada por tomar conta sozinha das coisas quando eu não estou por perto. Ver você nascer e se tornar quem se tornou me enche de alegria.

Aos meus segundos pais Andréa e Rubinho para quem eu recorro sempre que surge um problema, uma solução, uma indecisão, uma decisão... Obrigada por cuidarem de mim sem que eu me sinta um fardo na vida de vocês.

Aos cunhados Nelson, Adriana, Eduardo, Rodrigo e Aline por serem os portos seguros dos meus portos seguros.

Às minhas princesas Pietra e Bianca que me foram presenteadas pela vida para que eu conhecesse a magia que é ser tia e a alegria que é receber seus sorrisos mais sinceros.

Às amigas Paula e Cátia que dividem comigo a coincidência de sermos “Cristinas” e a mesma vontade de fazer do mundo um lugar melhor. Saber que eu posso dividir medos, dúvidas e vontades com vocês facilita muito as coisas.

Aos amigos Alessandro de Melo, Rodrigo Tadei, Anderson Piva e Breno de Paula que serão sempre figuras essenciais em meu exercício diário de reflexão acerca de toda a contribuição positiva que eu tenho a obrigação de dar para o mundo.

Aos amigos de longa data Taís Scheel, Solange Mantovane, Rafaela Nascimento, Rafael Sgroi, João Otávio Júnior e Willian Semi que há mais de 10 anos compartilharam o desejo de cursarmos uma faculdade enquanto revelavam-se amigos mais que queridos. Sou muito feliz por acompanhar as realizações de cada um deles e por essa amizade que só cresceu depois de tanto tempo.

Às sempre amigas Anna Elisa e Marisa Moser, com quem não posso estar junto tanto quanto gostaria, mas com quem eu sei que sempre vou contar. Porque não é preciso estar presente em todos os momentos e nem falar a toda hora para ser indispensável.

Ao amigo Rafael Parigi com quem continuo dividindo conversas, comilanças, sonhos e acrobacias.

Às amigas Tatiane Silva e Cinthia Dias, que por diversas vezes assumiram o papel de psicólogas e, em alguns outros, o de paciente. A companhia e o conselho de vocês foram e continuam primordiais para acalmar qualquer stress.

Aos amigos-cunhados Leandro Pinguero, André Serillo e Talita Gaspar que, entre tapas e beijos, ocupam um lugar especial no meu coração.

A todas as amigas do Studio Neyma Al Najmah, em especial à própria Neyma, que me mostrou na arte da dança do ventre uma paixão que eu demorei para encontrar.

À Cristina Wulf, Erika Yokote, Millena Bellazalma e Nilva Teixeira, que entraram em minha vida como excelentes profissionais e permaneceram como ótimas ouvintes e conselheiras.

Aos professores do Departamento de Engenharia de Materiais que dedicaram seu tempo e compartilharam sua experiência para que minha formação fosse além do âmbito escolar.

Aos membros das bancas de Qualificação e Tese, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Cândida Martins Rodrigues, Prof. Dr. João Baptista Baldo, Prof. Dr. José Donato Ambrósio, Prof. Dr. Cauê Ribeiro de Oliveira, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eliana Rigo e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juliana Daguano pelos comentários, sugestões e revisões.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPG-CEM) por toda a infraestrutura oferecida e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

A todos aqueles que me ajudaram, direta ou indiretamente, e porventura deixei de citar aqui, não sendo por isso menos importantes para mim.



- *Miguilim, este feixinho está muito pesado para você?*  
- *Tio Terêz, está não. Se a gente puder ir devagarinho como precisa, e ninguém não gritar com a gente para ir depressa demais, então eu acho que nunca que é pesado...*

João Guimarães Rosa – Manuelzão e Miguilim  
(Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 16ª Edição, p. 37)



## RESUMO

Os *scaffolds* são uma alternativa aos enxertos naturais para auxiliar a regeneração do osso em grandes defeitos ósseos. Independente do material escolhido para sua fabricação, o *scaffold* deve possuir um microambiente tridimensional apropriado para promover osteogênese e uma estabilidade mecânica adequada para o local do defeito. O óxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) é uma cerâmica altamente biocompatível com boas propriedades osseocondutoras e elevada confiabilidade mecânica; o biosilicato apresenta excelente nível de bioatividade. Desta forma, visando fabricar *scaffolds* que aliassem características positivas de resistência mecânica e bioatividade necessárias para um bom produto, biosilicato foi pioneiramente combinado com  $\text{TiO}_2$ . Dentre as técnicas disponíveis para a fabricação de *scaffolds* optou-se pelo uso do método do sacrifício, que apresenta baixo custo, simplicidade e versatilidade, sendo a porosidade gerada pela eliminação térmica de materiais orgânicos adicionados à matriz cerâmica. Diversos agentes formadores de poros foram testados, e a apresentação da serragem de madeira como um material promissor na fabricação de *scaffolds* mostrou-se inovadora e satisfatória. Análises microestruturais mostraram que a adição de quantidades controladas de serragem de madeira gerou estruturas de poros homogêneas e altamente interconectadas com até 63% de porosidade aparente e tamanho médio de poros maior que 200  $\mu\text{m}$ . Testes de bioatividade em SBF revelaram que após 4 dias de imersão já era observado o início da precipitação de hidroxiapatita carbonatada nos produtos com biosilicato, sendo que após 12 dias, o *scaffold* estava totalmente coberto por este mineral. A realização de testes mecânicos permitiu avaliar o comportamento dos *scaffolds* quando solicitados por tração e revelaram, para amostras com o máximo de porosidade obtida, valores mais altos de resistência mecânica para aquelas que continham biosilicato. Os *scaffolds* produzidos tiveram sucesso na estrutura de poros obtida pelo uso do método do sacrifício, sendo que a adição de biosilicato garantiu melhoras na bioatividade e na resistência mecânica.





## TITANIUM DIOXIDE AND BIOSILICATE SCAFFOLDS PREPARED WITH ORGANIC PARTICLES FOR MEDICAL AND DENTAL APPLICATIONS

### ABSTRACT

Scaffolds are an alternative to natural grafts to help bone regeneration in large bone defects. Regardless of the material chosen for its manufacture, scaffold should have a suitable dimensional microenvironment to promote osteogenesis and an appropriate mechanical stability for the defect site. Titanium dioxide ( $\text{TiO}_2$ ) is a highly biocompatible ceramic with good osteoconductive properties and high reliability mechanical; biosilicate has excellent bioactivity level. Thus, in order to fabricate scaffolds allying positive mechanical strength and bioactivity characteristics necessary to a good product, biosilicate was pioneered combined with  $\text{TiO}_2$ . Among the techniques available for scaffolds production, the sacrificial template method, in which porosity is generated by thermal elimination of organic materials added to the ceramic matrix, has a low cost, simplicity and versatility. Different sacrificial agents were tested and the presentation of sawdust as a promising material in scaffolds manufacture proved to be innovative and satisfactory. Microstructural analyzes showed that controlled addition of wood sawdust amounts generated a homogeneous and highly interconnected pore structure with 63% apparent porosity and an average pore size higher than 200  $\mu\text{m}$ . Bioactivity tests in SBF showed that after 4 days of immersion has already observed starting precipitation of hydroxycarbonate apatite in products with biosilicate, and after 12 days of immersion the scaffold was fully covered by this mineral. Mechanical tests allowed evaluating the scaffolds behavior when they are requested by tensile efforts, and revealed for samples with maximum porosity obtained, higher values of strength for samples containing biosilicate. The produced scaffolds had success in the pore structure obtained by sacrificial template method being biosilicate addition guaranteed improvements in bioactivity and mechanical strength.



## PUBLICAÇÕES

FERNANDES, M. C. S.; MORELLI, M. R.; CHINAGLIA, C. R. Fabrication of TiO<sub>2</sub>-Biosilicate-Composite Scaffolds for Medical and Dental Applications. Submetido à **Materials Research**, 2014.

FERNANDES, M. C. S.; MORELLI, M. R. Obtenção de *Scaffolds* de TiO<sub>2</sub> Incorporados Com Vidro Bioativo. In: 21º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais – 21º CBECiMat (**Resumo**), Cuiabá – MT, 2014.

FERNANDES, M. C. S.; MORELLI, M. R. Desenvolvimento de *Scaffolds* de TiO<sub>2</sub> e a Adição de Vidro Bioativo. In: 58º Congresso Brasileiro de Cerâmica – 58º CBC (**Resumo**), Bento Gonçalves – RS, 2014.

FERNANDES, M. C. S.; MORELLI, M. R. Obtenção de Corpos Cerâmicos Porosos de TiO<sub>2</sub>. In: 57º Congresso Brasileiro de Cerâmica & 5º Congresso Ibero-Americano de Cerâmica (**Resumo**), Natal – RN, 2013.



## ÍNDICE DE ASSUNTOS

FOLHA DE APROVAÇÃO.....	i
AGRADECIMENTOS.....	iii
EPÍGRAFE.....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
PUBLICAÇÕES.....	xiii
ÍNDICE DE ASSUNTOS.....	xv
ÍNDICE DE TABELAS.....	xvii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xix
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos.....	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Implantes e Qualidade de Vida.....	5
2.2 Biomateriais.....	7
2.3 Biocerâmicas.....	10
2.4 A Estrutura do Osso.....	14
2.5 Desenvolvimento e Crescimento Ósseo.....	17
2.6 Manutenção, Remodelação e Reparação Óssea.....	18
2.7 Engenharia de Tecidos.....	20
2.8 <i>Scaffolds</i> .....	22
2.9 Osseointegração, Osseoindução e Osseocondução.....	24
2.10 Bioatividade.....	26
2.11 Importância dos Poros.....	27
2.12 Propriedades e Interações Mecânicas.....	30
2.13 Conformação de <i>Scaffolds</i> .....	34
2.14 Óxido de Titânio.....	40
2.15 Biosilicato e Biovidro.....	48
2.16 Testes de Bioatividade <i>in Vitro</i> .....	49
2.17 Reatividade dos Biovidros.....	51
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	55

3.1	Óxido de Titânio .....	56
3.2	Seleção de Agentes Porogênicos.....	56
3.2.1	Esponja Vegetal .....	57
3.2.2	Poliuretano .....	57
3.2.3	Gelatina .....	57
3.2.4	Serragem .....	58
3.2.5	Polietileno.....	58
3.2.6	Carboximetilcelulose.....	59
3.2.7	Dextrina .....	59
3.3	Biosilicato .....	60
3.4	Manufatura dos <i>Scaffolds</i> de TiO <sub>2</sub> .....	60
3.5	Manufatura dos <i>Scaffolds</i> de TiO <sub>2</sub> e Biosilicato .....	62
3.6	Curva de Queima .....	62
3.7	Análise Termogravimétrica .....	63
3.8	Densidade Aparente, Porosidade Aparente e Porosidade Total .....	64
3.9	Estereomicroscopia .....	65
3.10	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	65
3.11	Resistência à Tração por Compressão Diametral .....	66
3.12	Testes de Bioatividade <i>in Vitro</i> .....	67
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	69
4.1	Caracterização do Óxido de Titânio.....	69
4.2	Preparação das Composições Iniciais.....	71
4.3	Análises Termogravimétricas .....	74
4.4	Obtenção e Caracterização dos <i>Scaffolds</i> de TiO <sub>2</sub> .....	77
4.4.1	Processamento com Serragem .....	77
4.4.2	Processamento com Polietileno .....	84
4.5	Obtenção e Caracterização dos <i>Scaffolds</i> de TiO <sub>2</sub> com Biosilicato .....	87
4.6	Resistência à Tração por Compressão Diametral .....	92
4.7	Testes de Bioatividade <i>in Vitro</i> .....	94
5	CONCLUSÕES .....	103
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	105
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	107

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1	Tipo de material do implante e resposta do tecido hospedeiro. Adaptado de Ratner e colaboradores [11].	8
Tabela 2.2	Classificação das biocerâmicas. Adaptado de Hench e Wilson [24].	12
Tabela 2.3	Tipos de solicitações mecânicas que atuam nos ossos [31].	31
Tabela 2.4	Exemplos de agentes porogênicos encontrados na literatura [79].	38
Tabela 2.5	Concentração de íons (mM) na solução de SBF original e de acordo com a ISO 23.317, comparadas com a do plasma sanguíneo humano [63].	50
Tabela 3.1	Tipo e quantidade de agentes porogênicos utilizados na tentativa de fabricação dos primeiros <i>scaffolds</i> .	61
Tabela 4.1	Porosidade aparente e porosidade total dos <i>scaffolds</i> preparados a partir de serragem de pinus, jequitibá e cedro.	79
Tabela 4.2	Porosidade aparente e porosidade total dos <i>scaffolds</i> preparados a partir de serragem de cambará e CMC.	81
Tabela 4.3	Porosidade aparente e porosidade total dos <i>scaffolds</i> preparados com biosilicato.	91
Tabela 4.4	Resultados obtidos no ensaio de compressão	92





## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 (a) Dedo de madeira utilizado como prótese encontrado em um túmulo no Egito, 1065-740 a.C. [7]. (b) Prótese dental feita pelos Etruscos, 1065-740 a.C. [4]. (c) Prótese de quadril, um dos implantes mais utilizados no mundo. (d) Implante dentário de titânio. (e) <i>Stent</i> de uma liga platina-cromo, que é implantado no interior de vasos sanguíneos para evitar o estreitamento. ....	6
Figura 2.2 Aplicações médicas das cerâmicas. Adaptado de Hench e Wilson [13].....	11
Figura 2.3 (a) Corte de um osso humano. (b) Ampliação dos cortes mostrando osteócito, (c) célula osteoprogenitora, (d) osteoblasto, (e) osteoclasto. Adaptado de Martini e colaboradores [30]. ....	15
Figura 2.4 Representação dos ossos cortical e trabecular [32]. ....	16
Figura 2.5 Ilustração das etapas de reparação óssea. Adaptado de Martini e colaboradores [30]. ....	20
Figura 2.6 Representação do processo de osseointegração no qual os números representam: (1) implante de titânio; (2) hematoma; (3) osso danificado; (4) osso saudável; (5) hematoma transformado num novo osso; (6) osso cicatrizado pela desmineralização e remineralização; (7) osso novo saudável. Adaptado de Branemark [59]. ....	24
Figura 2.7 Diagrama de índice de bioatividade para vidros à base de CaO, SiO <sub>2</sub> e Na <sub>2</sub> O com 6% em peso de P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> . O círculo e o triângulo representam as composições do <i>bioglass</i> e do biossilicato, respectivamente. A linha tracejada (campo A) representa o índice de bioatividade igual a 8. Adaptado de Tiloca [62] e Kokubo [63]. ....	26
Figura 2.8 Porosidade e tamanho de poros típicos obtidos pelos métodos de réplica, eliminação por queima e <i>direct foaming</i> [79]. ....	36
Figura 2.9 Esquema das possíveis rotas de processamento usadas para produção de cerâmicas macroporosas. (a) Réplica, (b) <i>direct foaming</i> e (c) eliminação por queima [79]. ....	35

Figura 2.10 Resistência à compressão relativa em função da densidade relativa de cerâmicas macroporosas produzidas pelos métodos de réplica, sacrifício e <i>direct foaming</i> . Os dados foram obtidos para cerâmicas porosas de diferentes composições químicas [79]. .....	40
Figura 2.11 Microestruturas de cerâmicas macroporosas produzidas pelo método de sacrifício. (a) Espuma de TiO <sub>2</sub> exibindo estruturas gradualmente porosas. (b) SiO <sub>2</sub> com macroporos ordenados usando esferas de poliestireno para formar poros. (c) Estrutura alveolar de SiO <sub>2</sub> altamente orientada obtida com géis de sílica. (d) Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> com macroporos obtida com o uso de canfeno [79]. .....	39
Figura 2.12 Óxido de titânio na forma de (a) rutilo (b) anatase (c) brookita.	41
Figura 2.13 (a) Fibroblastos aderidos à superfície de um <i>scaffold</i> de TiO <sub>2</sub> . (b) Um único fibroblasto ligado à superfície do <i>scaffold</i> [96]. .....	42
Figura 2.14 (a) <i>Scaffolds</i> porosos de TiO <sub>2</sub> foram implantados em cavidades de mandíbulas de mini-porcós. (b) Os alvéolos foram modificados cirurgicamente para acomodar os <i>scaffolds</i> cilíndricos. (c, d) Espaços vazios foram preenchidos com sangue, enquanto os <i>scaffolds</i> foram impregnados com sangue antes da inserção [112]. .....	45
Figura 2.15 Modelo de lesão desenvolvido em tíbia de coelhos. (a) 2 defeitos foram feitos na tíbia (b) sendo o <i>scaffold</i> de TiO <sub>2</sub> colocado em um deles (mostrado pela seta), enquanto o outro permaneceu vazio. (c) Imagem de MEV do <i>scaffold</i> antes da implantação. (d) Moedas de titânio foram colocadas no topo dos defeitos e cobertas com teflon. (e) Após a cura, o teflon foi removido. O osso peri-implante ligado aos discos de titânio foi analisado. (f) A seta mostra que o <i>scaffold</i> de TiO <sub>2</sub> promoveu a cura completa do defeito [113]. .....	46
Figura 2.16 As reações superficiais ocorrendo na interface biovidro/fluido corpóreo. Adaptado de Hench e West [61]. .....	51
Figura 2.17 Espectro de infravermelho da superfície do <i>bioglass</i> 45S5 após duas horas em SBF a 37°C. Os dois picos associados à ligação P – O indicam a presença da apatita cristalina enquanto o pequeno pico associado a C – O indica a incorporação de ânions carbonatos pela rede da apatita. Isto indica a presença de uma fina camada de HCA que após 10 horas poderá chegar a 4	

um de espessura e dominar todo espectro de infravermelho. Adaptado de Hench e Wilson [132]. .....	53
Figura 3.1 Diagrama de fluxo das atividades realizadas. ....	55
Figura 3.2 Fluxograma do processo de manufatura dos scaffolds. ....	62
Figura 3.3 Estágios de queima das pastilhas para obtenção dos <i>scaffolds</i> (Tamb: temperatura ambiente; T1: temperatura de remoção dos agentes porogênicos; T2: temperatura de sinterização do TiO <sub>2</sub> ). ....	63
Figura 3.4 Ensaio de compressão para corpo-de-prova cilíndrico. ....	67
Figura 3.5 Esquema utilizado nos testes de bioatividade. ....	68
Figura 4.1 Distribuição de tamanho de partículas do TiO <sub>2</sub> utilizado para preparação dos <i>scaffolds</i> . ....	69
Figura 4.2 Difratoograma do óxido de titânio mostrando o rutilo como única fase presente. ....	70
Figura 4.3 Distribuição e morfologia do pó de óxido de titânio visualizados no MEV com aumento de (a) 10.000x e (b) 20.000x. ....	71
Figura 4.4 Pastilhas obtidas com o uso de 60% em volume de serragem de cambará (à esquerda) e polietileno (à direita). ....	73
Figura 4.5 Análise termogravimétrica da serragem de cambará. ....	74
Figura 4.6 Análise termogravimétrica do polietileno. ....	75
Figura 4.7 Análise termogravimétrica da serragem de pinus. ....	76
Figura 4.8 Imagens obtidas no estéreo da superfície das amostras preparadas com serragens de (a) cambará, (b) pinus, (c) jequitibá e (d) cedro. ....	80
Figura 4.9 Superfície embutida em resina epóxi do <i>scaffold</i> de TiO <sub>2</sub> obtido com 75% de serragem cambará e 15% de CMC. ....	82
Figura 4.10 Superfície de fratura do <i>scaffold</i> de TiO <sub>2</sub> obtido com 75% de serragem cambará e 15% de CMC. ....	84
Figura 4.11 Superfície embutida em resina epóxi do <i>scaffold</i> de TiO <sub>2</sub> obtido com 50% de polietileno e 25% de CMC. ....	86
Figura 4.12 Superfície de fratura do <i>scaffold</i> de TiO <sub>2</sub> obtido com 50% de polietileno e 25% de CMC. ....	87

Figura 4.13 Superfície embutida em resina epóxi do <i>scaffold</i> de TiO <sub>2</sub> com biosilicato. ....	89
Figura 4.14 Superfície de fratura do <i>scaffold</i> de TiO <sub>2</sub> com biosilicato. ....	90
Figura 4.15 <i>Scaffold</i> de TiO <sub>2</sub> sem biosilicato após 12 dias de imersão no SBF. ....	95
Figura 4.16 <i>Scaffold</i> de TiO <sub>2</sub> com biosilicato após 1 dia de imersão no SBF. ....	96
Figura 4.17 <i>Scaffold</i> de TiO <sub>2</sub> com biosilicato após 4 dias de imersão no SBF. (a) e (b) mostram o interior dos <i>scaffolds</i> fraturados enquanto (c), (d) e (e) mostram sua superfície. ....	97
Figura 4.18 Espectros de EDS do <i>scaffold</i> de TiO <sub>2</sub> com biosilicato após 4 dias de imersão no SBF. ....	98
Figura 4.19 <i>Scaffold</i> de TiO <sub>2</sub> com biosilicato após 12 dias de imersão no SBF. (a) e (b) mostram o interior dos <i>scaffolds</i> fraturados enquanto (c), (d) e (e) mostram sua superfície. ....	100
Figura 4.20 Espectros de EDS do <i>scaffold</i> de TiO <sub>2</sub> com biosilicato após 12 dias de imersão no SBF. ....	101

## 1 INTRODUÇÃO

O osso tem a capacidade inata de se remodelar e regenerar, permitindo a reparação espontânea de pequenas lesões. No entanto, nos casos em que o defeito é muito grave ou o ambiente local não é o ideal para a adequada autorreparação do tecido danificado os enxertos ósseos são geralmente necessários para auxiliar a cicatrização [1]. Os transplantes ósseos contêm todos os elementos necessários para estimular a regeneração óssea, mas a escassez de material de enxerto viável, morbidade da área doadora, reabsorção do material de enxerto e possíveis reações imunogênicas associadas aos enxertos são deficiências que limitam a utilização de transplantes autógenos e alógenos na reconstrução de tecidos [2]. Alternativas que visam promover a capacidade natural de regeneração de tecido ósseo com o auxílio de um *scaffold* poroso oferecem uma solução para apoiar o crescimento ósseo em grandes defeitos ósseos.

Algumas características são fundamentais em *scaffolds* para que eles possam promover a osteogênese, como a morfologia, tamanho, distribuição e interconectividade dos poros. No entanto, sua manufatura depende ainda da seleção dos materiais, das propriedades mecânicas e de sua interação com o meio biológico.

Durante boa parte do século XX, a disponibilidade de materiais para a confecção de implantes era a mesma para outras aplicações na indústria. Atualmente centenas de materiais e dispositivos são utilizados na ortopedia, resultando em ampla gama de aplicações clínicas. Entretanto, paralelamente à vantagem de diversas alternativas terapêuticas, ocorre também um desafio: indicar o material mais adequado ao problema em questão.

Pesquisas em diversas áreas são realizadas visando à solução e a adequação de materiais ao corpo humano. Dentre os materiais pesquisados as cerâmicas são de fundamental importância por serem quase sempre biocompatíveis e garantirem que o implante feito a partir delas não provoque efeitos negativos no tecido vivo. O óxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) apresenta uso muito difundido atualmente. Segundo Galdino [3], muitas pesquisas envolvendo

implantes de titânio buscam uma superfície que garanta osseointegração por meio da deposição de uma camada de óxido de titânio, já que esta é muito mais reativa. E a partir daí surge o interesse em conformar *scaffolds* de óxido de titânio.

Rutilo ( $\text{TiO}_2$ ) tem sido estudado como um material promissor de *scaffolds* para induzir a formação de osso na restauração de grandes defeitos ósseos. Características importantes como porosidade, distribuição de tamanho de poro adequada e poros interligados são possíveis de serem obtidas com *scaffolds* fabricados a partir deste material. Entretanto, o óxido de titânio é considerado quase bioinerte e assim pode não favorecer o crescimento ósseo para o interior do implante poroso, o que dificultaria sua fixação e levaria a uma falha prematura do implante.

O biosilicato é uma vitrocerâmica bioativa que apresenta características de bioatividade próximas aos materiais com a maior bioatividade conhecida, os biovidros, com a vantagem de possuir propriedades mecânicas superiores. Nas cerâmicas bioativas a biocompatibilidade é ótima e ocorre uma conexão direta e funcional do osso com a superfície do implante, o que proporciona uma união química e uma resposta biológica positiva. Entretanto, a adição de poros no biosilicato prejudica sua resistência mecânica a ponto de comprometer o manuseio. A combinação deste material com um material osseocondutor de resistência mecânica comprovadamente superior, como o  $\text{TiO}_2$ , torna-se então conveniente.

Não existe ainda um método de produção em massa de *scaffolds* de materiais biocompatíveis. Os métodos de fabricação existentes são demorados, caros e geralmente de baixa reprodutibilidade. Para obter *scaffolds* que possam ter porosidade, distribuição de tamanho de poro e morfologia de poros controlados é possível utilizar a técnica da matriz de sacrifício (adição e eliminação por queima de agentes porogênicos), que é bastante simples e permite o uso de uma elevada gama de materiais orgânicos formadores de poros. Além disso, a resistência mecânica das estruturas porosas obtidas por este método é normalmente mais elevada do que a dos materiais porosos produzidos por outros meios, tal como a incorporação de bolhas de ar via

espumação direta durante o processamento. Desta forma espera-se que um processo reprodutível de produção em massa de *scaffolds* de TiO<sub>2</sub> com macro e microarquitetura definidas possa ser estabelecido.

## 1.1 Objetivos

O objetivo principal desta pesquisa está no desenvolvimento de *scaffolds* de óxido de titânio com biosilicato por meio da técnica de adição e eliminação de agentes porogênicos, de forma a obter porosidade maior que 50 a 60% e poros com tamanho médio acima de 200 µm, que aliem respostas mecânicas e bioatividade suficientes para que o material sirva de apoio para o reparo do tecido.

Os objetivos específicos são:

- Definir o melhor agente porogênico a ser utilizado no processo de manufatura;
- Obter corpos-de-prova porosos de TiO<sub>2</sub> com arquitetura de poros adequada para crescimento ósseo, atingindo porosidade e tamanho de poros mínimos;
- Investigar a reprodutibilidade e eficácia do método de obtenção dos *scaffolds*;
- Impregnar partículas de biosilicato na matriz cerâmica de TiO<sub>2</sub> e verificar a alteração que este processo causa nas características analisadas;
- Analisar o comportamento do material na solução de SBF (fluido corporal simulado);
- Analisar a resistência mecânica para aplicação em implantes.





## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Implantes e Qualidade de Vida

Desde a antiguidade o homem procura restaurar ou substituir partes do corpo humano danificadas por doença ou trama (Figura 2.1). O pioneirismo na tecnologia de próteses é atribuído aos egípcios, os responsáveis pela mais antiga tala encontrada (Figura 2.1a). A primeira referência escrita conhecida de um membro artificial foi feita por volta de 500 a.C. quando Heródoto (490-430 a.C.) escreveu sobre um prisioneiro que escapou das correntes cortando o pé, e mais tarde o substituiu por um pedaço de madeira [5].

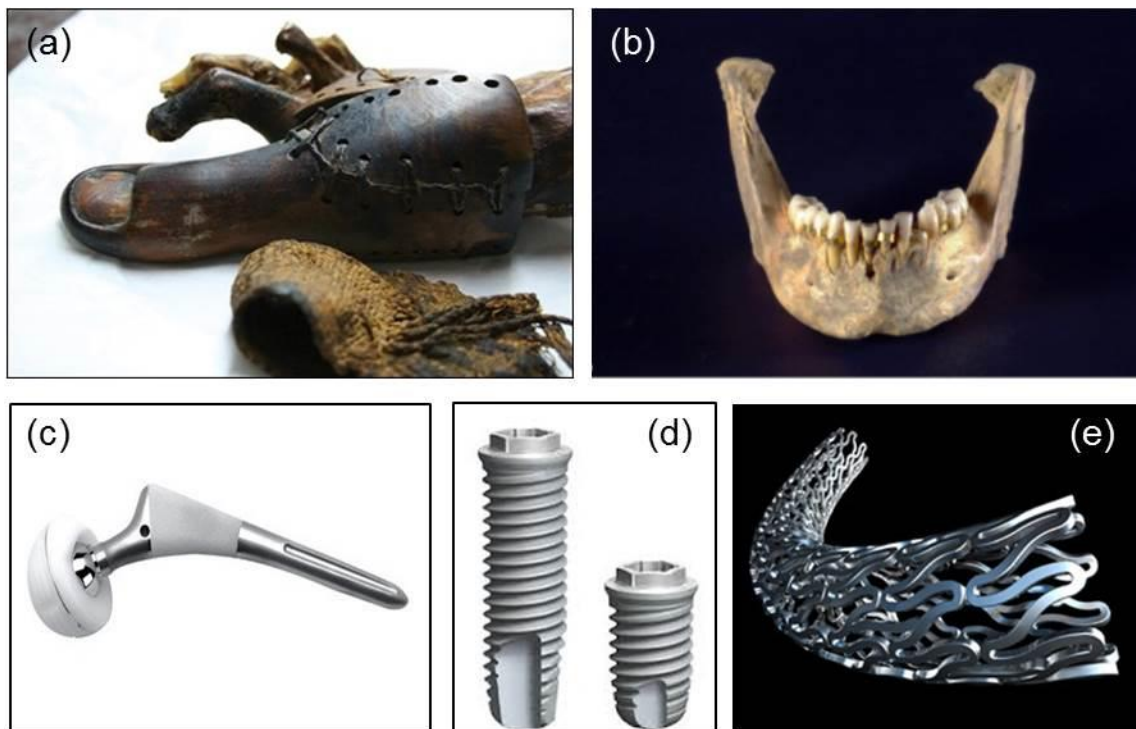
Em 1529, o cirurgião francês, Ambroise Paré (1510-1590) introduziu a amputação como uma medida salva-vidas na medicina, o que era eficiente em muitos casos, porém a qualidade de vida dos pacientes não era satisfatória [5]. Assim começou o entendimento sobre os riscos dos defeitos ósseos e a necessidade de reparar os tecidos humanos. O primeiro a escrever sobre restauração óssea com o uso de um material que não era osso foi Gabriele Fallopius (1523-1564) [6]. Ele implantou uma placa de ouro quando era impossível usar fragmentos de ossos locais para restaurar um defeito craniano, e desde então os implantes são usados para substituir partes danificadas do sistema ósseo.

Os avanços da medicina em conjunto com a maior preocupação com a alimentação e o conforto da “vida moderna” aumentaram a expectativa de vida e, conseqüentemente, aumentou a população de idosos e as doenças relacionadas à velhice. Entre as doenças que afetam a estrutura óssea, a osteoporose e a perda de massa óssea são bastante estudadas [7] por causa do prejuízo que causam na qualidade de vida das pessoas. Os problemas na estrutura óssea também atingem pessoas jovens em decorrência de acidentes automobilísticos, de trabalho, esportes e outros.

A seriedade destes problemas de saúde faz com que pesquisadores estejam à procura de materiais que possam substituir os ossos danificados de forma apropriada. Estes materiais devem apresentar propriedades físicas e

biológicas compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros, para estimular uma resposta adequada [7].

Com o advento de novas tecnologias a área de materiais com fins biológicos vem se tornando mais forte, com uso de cerâmicas, ligas metálicas, polímeros sintéticos e compósitos. Esses novos materiais proporcionaram melhoras significativas no desempenho, funcionalidade, reprodutibilidade na fabricação e eficácia do uso, quando comparados com os similares de origem natural [8]. Este avanço foi o responsável pelo aumento de pessoas utilizando os dispositivos criados com esses materiais, como os implantes de quadril (Figura 2.1c), os implantes odontológicos (Figura 2.1d), os *stents* coronários (Figura 2.1e) e diversos outros.



**Figura 2.1** (a) Dedo de madeira utilizado como prótese encontrado em um túmulo no Egito, 1065-740 a.C. [9]. (b) Prótese dental feita pelos Etruscos, 700 a.C. [6]. (c) Prótese de quadril, um dos implantes mais utilizados no mundo. (d) Implante dentário de titânio. (e) *Stent* de uma liga platina-cromo, que é implantado no interior de vasos sanguíneos para evitar o estreitamento.

Alguns destes materiais com aplicações médicas podem ser chamados de biomateriais. O termo é bastante abrangente, mas basicamente um biomaterial é aquele que interage diretamente com os sistemas biológicos com a função de avaliar, tratar, aumentar ou substituir tecido, órgão ou função do corpo [10]. Muitos biomateriais ainda são inviáveis comercialmente e outros ainda não atingiram o mais alto grau de perfeição.

## **2.2 Biomateriais**

Há várias definições para o termo 'biomateriais' que foram modificadas ao longo do tempo ou definidas de formas diferentes por cada autor. Utilizando a definição da Conferência de Consenso da Sociedade Europeia de Biomateriais realizada em março de 1986, em Chester-Inglaterra, os biomateriais são substâncias de origens naturais ou sintéticas toleradas de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos dos organismos dos seres vivos. Eles são utilizados como um todo ou parte de um sistema que trata, restaura ou substitui algum tecido, órgão ou função do corpo, ou ainda como um material não biológico utilizado em um dispositivo médico, com intenção de interagir com sistemas biológicos [10].

Os primeiros estudos nessa área focavam apenas no desempenho mecânico desses dispositivos. Como as reações entre implantes e tecidos eram pouco entendidas, a escolha do material se limitava aos ditos bioinertes, já que se acreditava que eles não produziam qualquer resposta (positiva ou negativa) do tecido hospedeiro. Assim, foram desenvolvidos os substratos biologicamente inertes que formavam os implantes de primeira geração [11].

O início do entendimento dos processos de integração entre osso e implante ocorreu em meados da década de 60 quando o físico Brånemark da Universidade de Gotenburgo (Suécia) observou uma aderência total entre cilindros de titânio e o osso dos coelhos em estudo, de uma forma nunca relatada anteriormente. Brånemark denominou esse processo de adesão como "osseointegração" [12].

Os diferentes tipos de materiais podem apresentar as mais variadas respostas do tecido hospedeiro, desde a morte do tecido circundante até a absorção do próprio material pelo organismo e sua substituição por tecido vivo [13]. A Tabela 2.1 mostra o comportamento dos tecidos na presença de implantes.

**Tabela 2.1** Tipo de material do implante e resposta do tecido hospedeiro. Adaptado de Ratner e colaboradores [13].

<b>Tipo de Material</b>	<b>Resposta do Tecido</b>
Material tóxico	O tecido vizinho morre
Material não tóxico e biologicamente inativo (quase inerte)	Formação de um tecido fibroso com espessura variável
Material não tóxico e biologicamente ativo (bioativo)	Formação de ligação na interface
Material não tóxico e absorvível	Substituição do material pelo tecido vizinho

A interação dos materiais com o tecido ósseo pode ser influenciada por várias características, como a presença de poros ou rugosidade na superfície dos implantes, a corrosão ou não do material quando em contato com os fluidos fisiológicos, a capacidade de o material induzir a diferenciação celular e a deposição de tecido mineralizado ou de tecido fibroso [14].

De acordo com a resposta biológica induzida no organismo, os materiais biocompatíveis podem ser classificados em biotoleráveis, bioinertes, bioativos e bioabsorvíveis [15].

- **Biotoleráveis:** apenas tolerados pelo organismo, são isolados dos tecidos vivos pela formação de uma camada de tecido fibroso envolvendo o implante. Quanto maior a espessura da camada de tecido fibroso, menor a tolerância dos tecidos ao material. Os materiais biotoleráveis são a maioria dos polímeros sintéticos e dos metais.

- **Bioinertes:** são também tolerados pelo organismo, mas a formação de envoltório fibroso é mínima, praticamente inexistente. Em alguns casos esta camada é praticamente imperceptível. Não há liberação de nenhum tipo de componente ou a liberação ocorre em mínimas quantidades. Os materiais bioinertes mais utilizados são alumina, zircônia, titânia, ligas de titânio e carbono.

- **Bioativos:** nestes materiais ocorrem ligações químicas com o tecido ósseo. Neste caso o tecido interage intimamente com o material depositando-se diretamente na superfície dele (osseocondução) sem a formação da camada de tecido fibroso. Os principais materiais desta classe são os vidros e vitrocerâmicas bioativos, a hidroxiapatita e alguns compostos de fosfato de cálcio.

- **Bioabsorvíveis:** após certo período de tempo em contato com os tecidos, acabam degradados ou solubilizados pelo organismo. Estes materiais tornam desnecessárias novas cirurgias para a retirada do implante. Os principais exemplos desses materiais são o fosfato tricálcico (TCP) e o poli (ácido lático).

Um grande desafio da pesquisa atual é produzir biomateriais comerciais com características físico-químicas e morfológicas que possam não somente induzir sinais bioativos no ambiente nos quais estão inseridos, mas também responder a estímulos desse ambiente [16]. Desta forma, as lesões podem ser reparadas e os tecidos degenerados serem renovados. Estes seriam os implantes de segunda e terceira geração. Os implantes de segunda geração substituem os tecidos perdidos em doenças ou traumas e os de terceira geração, além da substituição dos tecidos, poderiam induzir a formação de células essenciais na produção de tecido ósseo [17][18].

O substituto ósseo ideal deve ser osteogênico, biocompatível, dar apoio estrutural, servir como transportador de medicamentos, ser fácil de usar na prática clínica e com uma taxa razoável de custo-benefício [19]. Embora as cerâmicas inorgânicas não demonstrem ter habilidade osseoindutora, elas certamente possuem habilidades osseocondutoras, bem como uma notável capacidade de se ligar diretamente ao osso [20].

### 2.3 Biocerâmicas

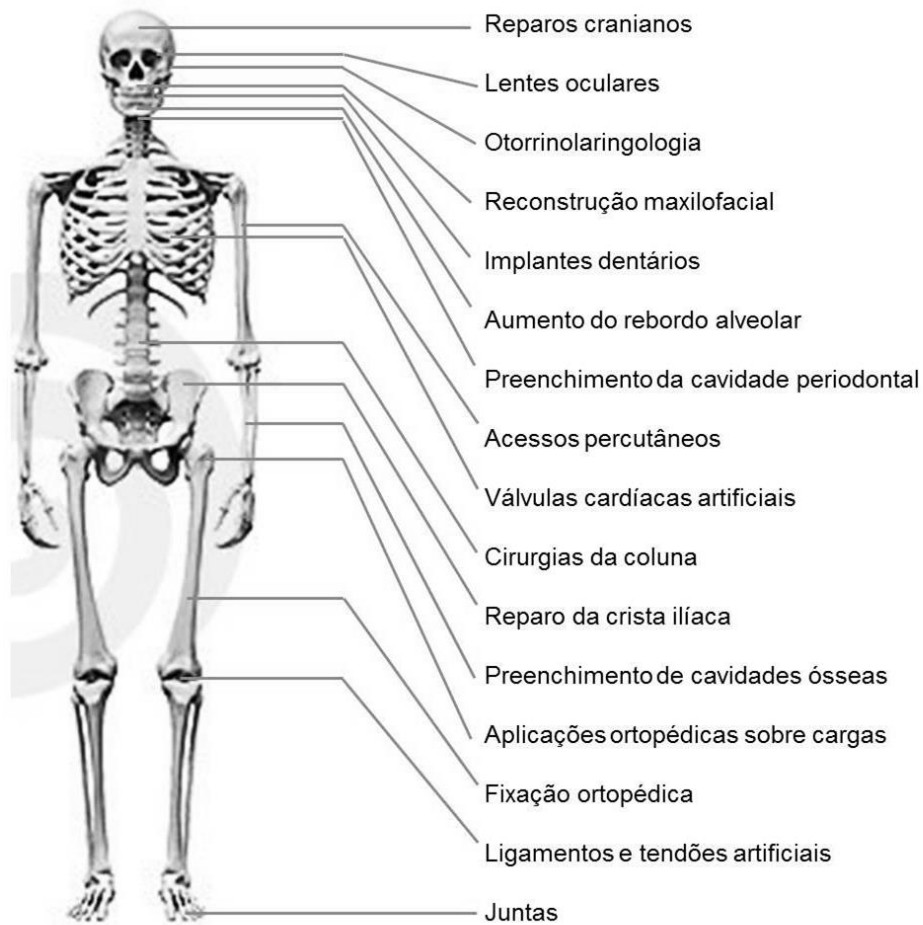
O uso de cerâmicas para fins biológicos remonta a 1894, quando Dreesman [21] relatou a utilização de gesso ( $\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ ) como um possível substituto ósseo. Este material possui uma resistência mecânica muito baixa e é completamente absorvido pelo organismo, o que causa uma rápida fragmentação e degradação. Estas propriedades pouco atrativas praticamente excluíram a utilização do gesso como cerâmica para implantes [7].

No início das pesquisas com implantes sintéticos, procurava-se desenvolver e utilizar materiais que provocassem uma mínima ou nenhuma reação do tecido. Com o decorrer do tempo e o aumento do conhecimento na área dos materiais cerâmicos foi proposto que as cerâmicas para implantes deveriam provocar reações de formação de tecido e, se possível, formar uma ligação íntima entre a cerâmica e os tecidos [22].

Em 1967, durante uma conferência do exército americano, o cientista e engenheiro Hench relatou que um Coronel que havia acabado de voltar do Vietnã reclamava que milhares de soldados estavam tendo braços e pernas amputados devido a implantes defeituosos, metais e plásticos que eram rejeitados pelo corpo [23]. Hench iniciou um trabalho com verba do exército americano em setembro de 1969 e dois meses depois apresentou um vidro que se soldava tão bem aos ossos e tecidos de ratos, que os pesquisadores não conseguiam separá-los. Aparentemente o vidro que Hench havia desenvolvido atraía as células ósseas [23].

Em 1985, a Food & Drug Administration (FDA) aprovou a petição da U.S. Biomaterials Corporation, de Baltimore, de utilizar o chamado *bioglass* para substituir os ossos do ouvido médio, restaurando a audição. Hench havia descoberto uma nova classe de materiais médicos: a biocerâmica [15].

O progresso notável da cerâmica resultou no desenvolvimento de materiais com propriedades químicas, físicas e mecânicas que são satisfatórios para as aplicações médicas. Os campos de aplicação incluem ortopedia, odontoestomatologia, oftalmologia, cirurgia plástica e cirurgia cosmética [24]. A Figura 2.2 mostra algumas aplicações das cerâmicas em implantes médicos.



**Figura 2.2** Aplicações médicas das cerâmicas. Adaptado de Hench e Wilson [15].

Os materiais cerâmicos são utilizados por conta de suas características, como biocompatibilidade, resistência à corrosão e resistência à compressão. Como desvantagens podem ser citadas fragilidade, baixa resistência à fratura, dificuldade de fabricação, baixa confiabilidade mecânica e falta de resiliência, o que vem estimulando pesquisadores a desenvolver biomateriais na forma de compósitos, como alternativa em aplicações de bioengenharia [25].

Diferente de alguns materiais de origem orgânica, as biocerâmicas não induzem reações imunológicas ou tóxicas quando utilizadas, não apresentam riscos de transmissão de patologias infectocontagiosas e nem de degradação proteica [26].

Hench [27] agrupou as cerâmicas para implantes em 4 classes, de acordo com a resposta desenvolvida na interface tecido vivo/implante, conforme apresentado na Tabela 2.2. Esta característica influencia a funcionalidade destes materiais em organismos biológicos e assim define a aplicação de cada biocerâmica.

**Tabela 2.2** Classificação das biocerâmicas. Adaptado de Hench e Wilson [27].

<b>Tipo de implante</b>	<b>Interações com os tecidos</b>	<b>Exemplos</b>
Quase inerte	Quase não há interação química ou biológica. Ancoragem mecânica.	alumina, zircônia e óxido de titânio
Poroso	Ocorre o crescimento de tecido dentro dos poros	aluminatos e hidroxiapatita
Bioativo	Ocorre uma forte ligação na interface osso-implante	biovidros, hidroxiapatita e vitrocerâmicas
Absorvível	A cerâmica é degradada e substituída pelos tecidos	fosfato tricálcico, biovidros

As biocerâmicas quase inertes e densas possuem elevada resistência mecânica à compressão. Nelas ocorre a formação de uma cápsula fibrosa ao redor do implante, o que impede a formação de qualquer ligação química ou biológica entre o tecido e o implante [13][15]. A fixação do implante ao osso pode se dar pelo crescimento do tecido nas irregularidades superficiais do implante, pela união com um cimento acrílico ou pelo acoplamento do implante no defeito por pressão. A movimentação na interface tecido/implante pode levar à deterioração do implante e/ou do tecido e a consequente falha do implante.

Simscke e colaboradores [28] identificaram algumas propriedades desejadas em cerâmicas bioinertes. São elas: não sofrerem corrosão nem lixiviação, ou seja, não serem bioabsorvíveis; não serem citotóxicas; não serem



mutagênicas nem carcinogênicas; não se deformarem; não causarem reação inflamatória; manter suas propriedades mecânicas; não apresentarem microfaturas e não sofrerem fadigas cíclicas; serem biocompatíveis [14].

Nos implantes porosos, apesar do aumento da porosidade diminuir a resistência mecânica do material isoladamente, a existência de poros com dimensões adequadas pode favorecer o crescimento de tecido através deles, fazendo com que ocorra um forte entrelaçamento do tecido com o implante, aumentando, por conseguinte, a resistência do material *in vivo* [7]. A união ao osso é mecânica e o crescimento do osso através dos poros permite uma fixação biológica. Mas para que o tecido ósseo cresça de maneira saudável é necessário tamanho de poros adequado. Em 1970 Hulbert [29] demonstrou que poros maiores que 100  $\mu\text{m}$  favorecem o crescimento do osso através do implante. Esta necessidade de um tamanho de poro específico está relacionada à necessidade de fornecer um suprimento sanguíneo ao tecido conectivo em crescimento.

As biocerâmicas absorvíveis são degradadas gradualmente e substituídas pelo tecido hospedeiro. Estes materiais possuem uma alta bioatividade e a taxa com a qual são absorvidos é diretamente proporcional a esta bioatividade. Existem algumas dificuldades no desenvolvimento destas cerâmicas como a manutenção da resistência e da estabilidade da interface durante a degradação do implante e formação do tecido natural, já que a resistência mecânica destes materiais não é muito elevada, e a adequação das taxas de absorção do implante com as taxas de formação do tecido [13][15].

As cerâmicas bioativas possuem propriedades intermediárias entre as quase inertes e as absorvíveis e sua resistência mecânica é baixa. Estes materiais bioativos formam uma ligação interfacial com os tecidos vizinhos. A união ao tecido ósseo é química e a fixação bioativa. A dependência do tempo de ligação, a força da ligação, o mecanismo da ligação e a espessura da zona da ligação são diferentes para os diferentes materiais. A interface entre um implante bioativo e o osso é semelhante às que ocorrem naturalmente entre ossos, tendões e ligamentos [13][15].

Para avaliar a aplicação dos materiais destinados a implantes médicos é importante conhecer a estrutura óssea humana e alguns mecanismos de regeneração humana. É o que veremos nos próximos capítulos.

## 2.4 A Estrutura do Osso

O osso possui vários tecidos diferentes trabalhando em conjunto: tecido ósseo, cartilaginoso, conjuntivo denso, epitelial, adiposo, nervoso e vários tecidos formadores de sangue. Cada osso individual é um órgão dinâmico e em constante mudança ao longo da vida. Os ossos, juntamente com suas cartilagens, compõem o sistema esquelético.

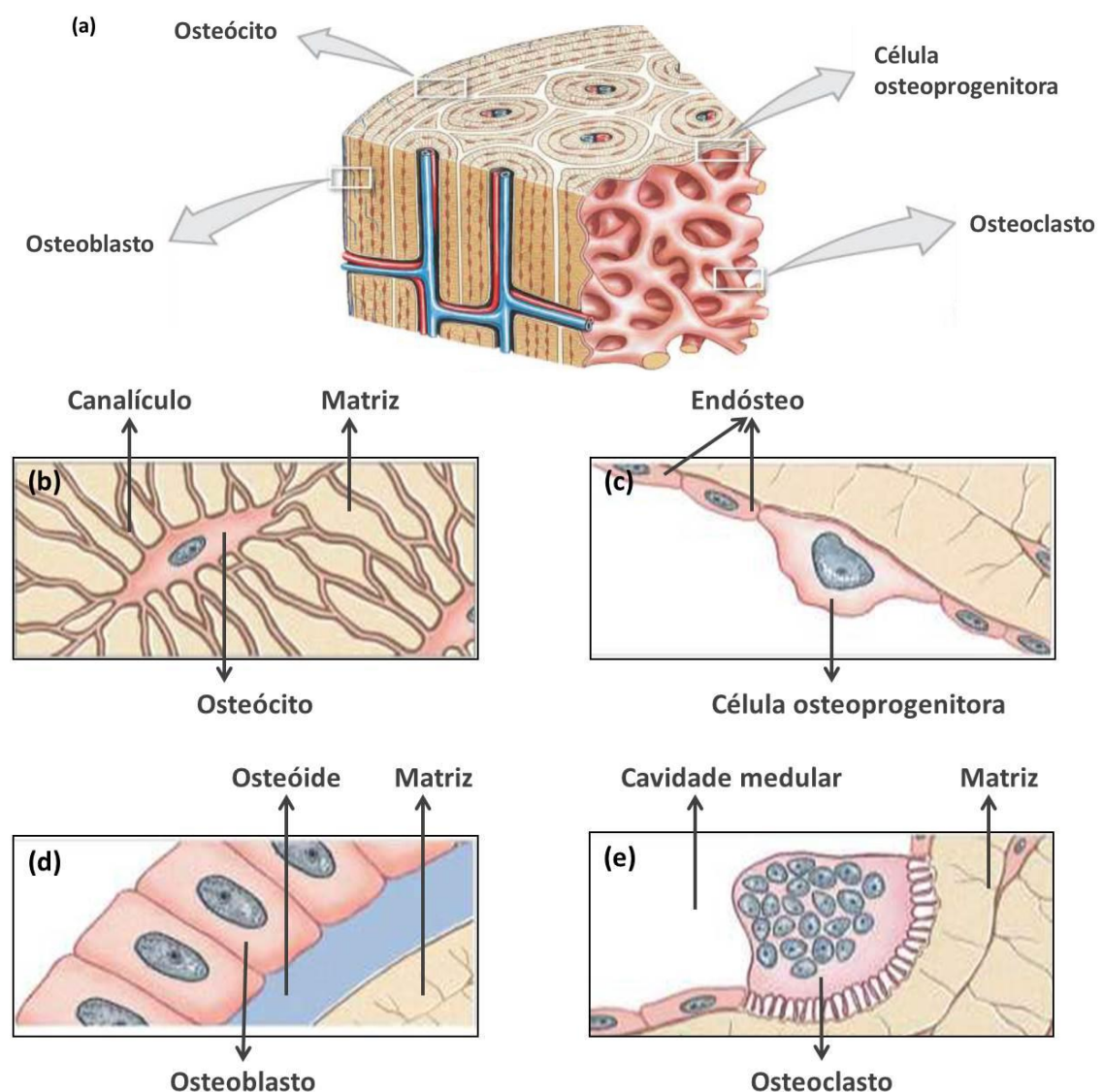
O osso é composto por 33% de matriz orgânica, dentre os quais 28% são colágeno e 5% são proteínas não colagenosas. Os 67% restantes compõem-se de mineral ósseo, principalmente hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) [30]. O colágeno é formado por cadeias de proteínas de hélice tripla, que possui alta resistência à tração e à flexão, enquanto a hidroxiapatita contribui com a rigidez e resistência à compressão do osso. A combinação de colágeno e hidroxiapatita fazem o osso extremamente forte [3].

Os ossos possuem diversas funções como apoiar e proteger os tecidos moles, servir de alavanca para os músculos tornarem os movimentos possíveis e armazenar minerais de cálcio e fósforo (homeostase mineral) [31]. São compostos por 4 tipos de células:

- **Osteoblastos:** são células ósseas imaturas encontradas nas superfícies internas e externas dos ossos. Eles produzem osteoides que estão envolvidos na formação da matriz óssea (osteogênese).
- **Osteócitos:** são células ósseas maduras derivadas dos osteoblastos. Estão presos em lacunas dentro da matriz óssea calcificada. Apresentam a função de manter o teor de proteína e mineral da matriz óssea.
- **Células osteoprogenitoras:** encontradas nas superfícies internas e externas dos ossos. Podem se diferenciar para formar novos osteoblastos. Estão fortemente envolvidas no reparo de ossos após uma fratura.

- **Osteoclastos:** secretam ácidos que dissolvem os ossos. Este processo causa a liberação de íons cálcio e fosfato para o sangue que podem ser reabsorvidos pelo tecido ósseo no local da fratura (osteólise). Estão localizados no endóstio (superfície interna do osso).

A Figura 2.3a mostra um esquema do osso com alguns cortes que podem ser vistos com aumento nas figuras seguintes (Figura 2.3b até Figura 2.3e). Nestes cortes são vistas as células descritas.



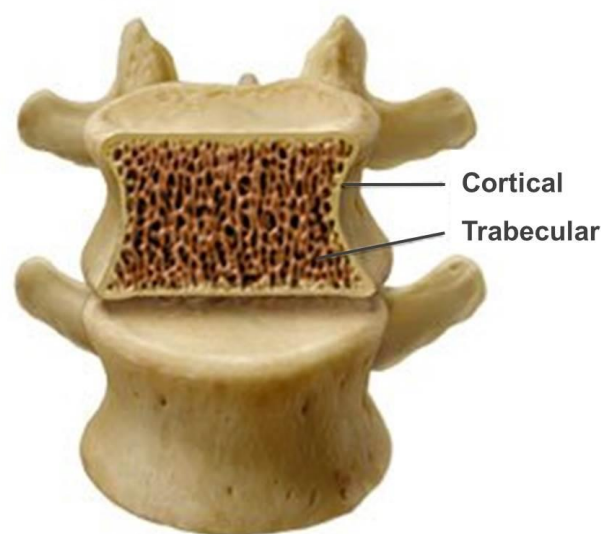
**Figura 2.3** (a) Corte de um osso humano. (b) Ampliação dos cortes mostrando osteócito, (c) célula osteoprogenitora, (d) osteoblasto, (e) osteoclasto. Adaptado de Martini e colaboradores [32].

O osso é um tecido bem organizado com baixo peso e que fornece uma excelente estrutura de suporte. Sua composição varia de acordo com a localização, idade e doenças que acometeram o indivíduo. Ele pode ser dividido em dois componentes macroestruturais distintos: o osso cortical ou compacto e o osso trabecular ou esponjoso. As proporções de osso cortical e trabecular são diferentes em cada região do esqueleto [33].

O osso cortical é denso e compacto e compõe cerca de 80% do esqueleto. Constitui a parte externa de todas as estruturas esqueléticas e sua principal função é fornecer força mecânica e proteção, embora também possa participar de respostas metabólicas quando ocorre um déficit mineral severo e/ou prolongado [33].

O osso trabecular compõe 20% do esqueleto e é encontrado na porção interna dos ossos longos, corpos vertebrais e pelve. É mais ativo metabolicamente que o cortical e fornece suprimento inicial nos estados de deficiência mineral, sendo perdido mais rapidamente na osteoporose que o osso cortical. Possui porosidade de 30 a 90%, sendo capaz de suportar alongamento e deformações antes de fraturar. As estruturas do osso trabecular são mais afetadas pela osteoporose [33].

A Figura 2.4 mostra uma representação dos ossos cortical e trabecular.



**Figura 2.4** Representação dos ossos cortical e trabecular [34].

## 2.5 Desenvolvimento e Crescimento Ósseo

Antes de seis semanas de desenvolvimento, o esqueleto humano é composto somente por cartilagem. Nesse período ocorre o processo de ossificação no qual as células de cartilagem são substituídas pelas células ósseas. Existem dois tipos de ossificação, a ossificação intramembranosa e a ossificação endocondral [32].

A ossificação endocondral ocorre na formação de ossos longos, como os das pernas, braços, vértebras e quadris. Nesses ossos duas regiões principais sofrerão a ossificação: o cilindro longo, conhecido como diáfise e as extremidades dilatadas, que correspondem às epífises. Entre a epífise de cada extremidade e a diáfise é mantida uma região de cartilagem, conhecida como cartilagem de crescimento, que possibilitará a ocorrência constante de ossificação endocondral, levando à formação de mais osso. Na ossificação endocondral, uma peça de cartilagem serve de molde para a confecção de tecido ósseo. Os osteoblastos derivados das células mesenquimáticas se apoiam sobre a matriz extracelular cartilaginosa. Então os osteoblastos produzem matriz óssea que é secretada e depositada sobre a matriz de cartilagem. A matriz óssea se mineraliza e dá origem aos osteócitos. Nesse caso, a cartilagem é gradualmente destruída e substituída por tecido ósseo [32].

A ossificação intramembranosa está envolvida no desenvolvimento da clavícula, mandíbula, crânio, rosto, etc. Ela acontece no interior das membranas do tecido conjuntivo, o chamado centro de ossificação primária. As células mesenquimáticas se multiplicam e diferenciam em osteoblastos. Estes, por sua vez, sintetizam osteoides (matriz óssea recém-sintetizada), que se mineralizam, dando origem aos osteócitos. Então uma nova camada de osteoblastos se coloca na superfície do osso recém-formado, secreta matriz óssea e assim o processo se repete acrescentando camada por camada ao osso. Este mecanismo também é usado para o crescimento futuro destes ossos durante a vida pós-natal e para o crescimento em diâmetro dos ossos longos [32].

Os osteoclastos atuam como verdadeiros demolidores de osso, enquanto os osteoblastos exercem papel de construtores de mais osso. Nesse sentido, o processo de crescimento de um osso depende da ação conjunta de reabsorção de osso preexistente e da deposição de novo tecido ósseo. Considerando, por exemplo, o aumento de diâmetro de um osso longo, é preciso efetuar a reabsorção de camada interna da parede óssea, enquanto na parede externa deve ocorrer deposição de mais osso.

## **2.6 Manutenção, Remodelação e Reparação Óssea**

Depois que o osso atinge seu tamanho e forma adultos, o tecido ósseo antigo é constantemente destruído e um novo tecido é formado em seu lugar, em um processo conhecido como remodelação. A remodelação ocorre em diferentes velocidades nas várias partes do corpo e permite que os tecidos já gastos ou que tenham sofrido lesões sejam trocados por tecidos novos e saudáveis. Ela também permite que o osso sirva como reserva de cálcio para o corpo [35].

O uso de aparelhos ortodônticos é um exemplo de remodelação dos ossos, neste caso, resultando na remodelação da arcada dentária. Os aparelhos exercem forças diferentes daquelas a que os dentes estão naturalmente submetidos. Nos pontos em que há pressão ocorre reabsorção óssea, enquanto no lado oposto há deposição de matriz. Assim, os dentes movem-se pelos ossos da arcada dentária e passam a ocupar a posição desejada [35].

Em um adulto saudável, uma delicada homeostase (equilíbrio) é mantida entre a ação dos osteoclastos (reabsorção) durante a remoção de cálcio e a dos osteoblastos (deposição) durante a deposição de cálcio. Se muito cálcio for depositado, podem se formar calos ósseos ou esporas, causando interferências nos movimentos. Se muito cálcio for retirado, há o enfraquecimento dos ossos, tornando-os flexíveis e sujeitos a fraturas [35].

O crescimento e a remodelação normais dependem de vários fatores [35]:

- suficientes quantidades de cálcio e fósforo devem estar presentes na dieta alimentar do indivíduo;
- deve-se obter suficiente quantidade de vitaminas, principalmente vitamina D, que participa na absorção do cálcio ingerido;
- o corpo precisa produzir os hormônios responsáveis pela atividade do tecido ósseo.

Com o envelhecimento, o sistema esquelético perde cálcio. Isso começa geralmente aos 40 anos nas mulheres e continua até que 30% do cálcio nos ossos sejam perdidos, por volta dos 70 anos. Nos homens, a perda não ocorre antes dos 60 anos. Essa condição é conhecida como osteoporose [35].

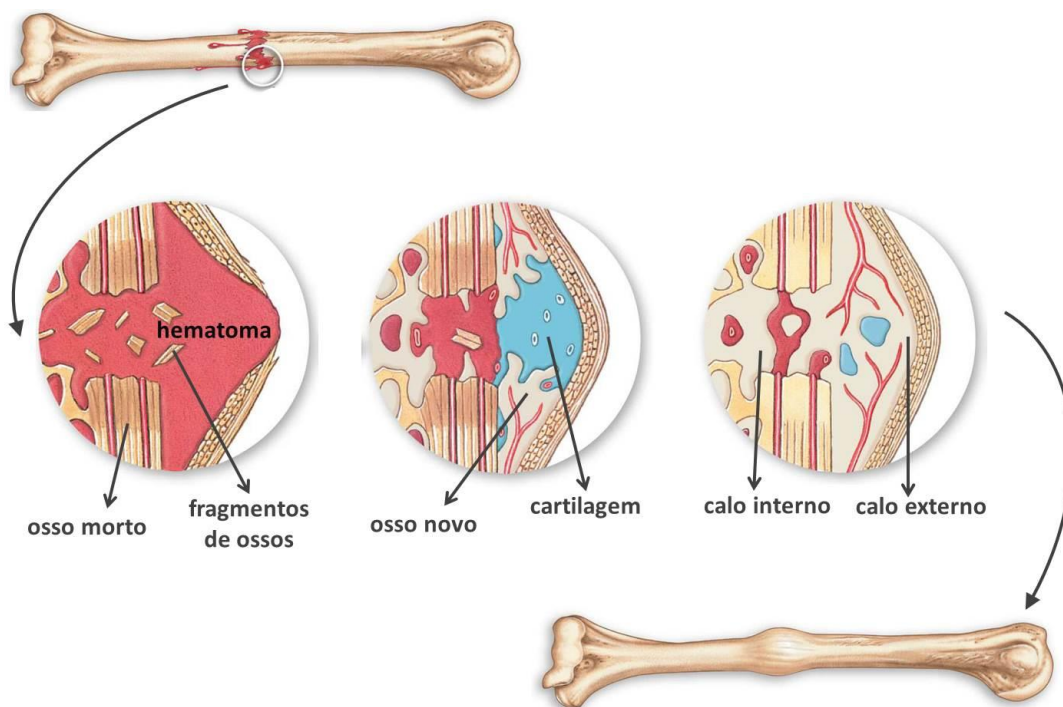
Outro efeito do envelhecimento é a redução da síntese de proteínas, o que diminui a produção da parte orgânica da matriz óssea. Como consequência, há um acúmulo de parte inorgânica da matriz. Em alguns indivíduos idosos, esse processo causa uma fragilização dos ossos, que se tornam mais susceptíveis a fraturas [35].

Quando um osso se quebra ocorre o rompimento dos vasos sanguíneos que percorrem o comprimento do osso. O sangue sai dessas veias e se forma um coágulo chamado de hematoma de fratura. Sem receber sangue, as células ósseas rapidamente morrem. Seguem-se inchaço e inflamação, devido ao trabalho das células que estão removendo os tecidos mortos e danificados. O hematoma se transforma em um tecido mais duro (calo mole) e a ação de células o transforma num calo cartilaginoso (calo duro) que preenche o espaço entre as partes fraturadas do osso. Os osteoblastos, então, começam a produzir células ósseas, formando o calo ósseo. Essa cobertura rígida dura de três a quatro meses e oferece a proteção e a estabilidade necessárias para que o osso entre em seu estágio final de cura [32].

A essa altura, o corpo estabeleceu a posição do osso dentro dos músculos, começou a reabsorver porções mortas de osso e criou um calo duro para ocupar o espaço entre as duas porções do osso fraturado. Mas esse tecido ainda precisa de muito trabalho antes que o osso possa absorver a

carga costumeira de peso. Osteoclastos e osteoblastos passam meses remodelando o osso e substituindo o calo ósseo por matéria óssea compacta, de maior dureza. Essas células também reduzem o volume do calo ósseo e devolvem o osso ao seu formato original. A circulação sanguínea no osso melhora e o influxo de nutrientes que ajudam a reforçar os ossos, como o cálcio e o fósforo, dão maior resistência ao osso [32].

A Figura 2.5 mostra as etapas de reparação óssea após uma fratura.



**Figura 2.5** Ilustração das etapas de reparação óssea. Adaptado de Martini e colaboradores [32].

## 2.7 Engenharia de Tecidos

A melhora da tecnologia aplicada à saúde humana aumenta a expectativa de vida, mas nem todas as partes do corpo mantêm suas funções com o envelhecimento. É necessário que os ossos e a cartilagem apoiem o envelhecimento do corpo, embora as células que os produzem se tornem menos ativas com o tempo [36].



As cirurgias para a reparação da perda de tecidos envolvem implantes de enxerto (transplantes), que podem ser doados de um sítio do mesmo paciente (autoenxerto), de outro ser humano (homoenxerto) ou de outras espécies (xenoenxertos). Tanto nos homoenxertos quanto nos xenoenxertos, existe a possibilidade de transmissão de doenças, o que aumenta a demanda para substitutos sintéticos especialmente projetados e fabricados [36].

Existem várias razões clínicas para desenvolver alternativas para a engenharia tecidual óssea, incluindo a necessidade de melhores materiais de preenchimento que possam ser usados na reconstrução de grandes defeitos ortopédicos e da necessidade de implantes ortopédicos que sejam mecanicamente mais adequados para o ambiente biológico [37].

A substituição de tecidos e órgãos completos danificados por doença ou trauma é um desafio para a ciência dos materiais. No caso do sistema esquelético, os materiais devem possuir adequadas propriedades mecânicas, morfológicas e físico-químicas para alcançar um elevado grau de biocompatibilidade e biofuncionalidade [38].

A engenharia de tecidos é um campo interdisciplinar que combina os princípios de engenharia de materiais e das ciências da saúde visando o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e substitutos biológicos que restaurem, mantenham, substituam ou melhorem as funções biológicas. A associação de biomateriais, células-tronco, fatores de crescimento e fatores de diferenciação permitiu o desenvolvimento de oportunidades de novos tratamentos na maioria das áreas biomédicas [39].

As conquistas obtidas pela engenharia de tecidos nos últimos anos resultaram em novas terapias tais como a produção de pele para tratar queimaduras [40], enxertos ósseos para substituir grandes defeitos ósseos [41], artérias de pequeno calibre para tratar a aterosclerose [42] e cartilagem para cirurgias plásticas e reconstrutivas [43]. Importantes avanços têm sido relatados na área de odontologia visando à regeneração da articulação temporomandibular [44], do ligamento periodontal [45], dentina [46], esmalte [47] e tecidos dentários integrados [48].

O conceito de engenharia de tecidos foi proposto pela primeira vez nos Estados Unidos em meados de 1980, a fim de reduzir a escassez na doação de transplante de órgãos. A abordagem clássica de engenharia de tecidos com base em células envolve o desenvolvimento de *scaffolds* com células e/ou fatores de crescimento e, em seguida, sua implantação, de modo a induzir e conduzir o crescimento de tecido [49].

Os *scaffolds* são componentes-chaves na Engenharia de Tecidos para a regeneração óssea. Trata-se de estruturas porosas que servem como um caminho para a interação das células e formação de uma matriz óssea extracelular para fornecer suporte estrutural para a formação de um novo tecido [50].

## 2.8 *Scaffolds*

Obter peças que se fixem ao tecido hospedeiro sem formação de cápsula fibrosa na interface tecido-implante é um dos maiores desafios nos projetos de implantes [27]. Se após a implantação ocorrer consolidação com a presença de tecido fibroso em vez de tecido mineralizado, corre-se o risco de o implante não apresentar a fixação planejada.

Muitas características dos implantes podem influenciar na interação dos materiais com o tecido ósseo hospedeiro. Algumas destas características são a presença de poros, a rugosidade na superfície dos implantes, a ocorrência de corrosão do material quando em contato com os fluidos fisiológicos e a capacidade de induzir diferenciação celular e deposição de tecido mineralizado ou de tecido fibroso [14]. Dentre estes fatores, a interação tecidual com materiais que apresentam poros, denominados *scaffolds*, é extensivamente pesquisada.

*Scaffolds* são estruturas usadas para fornecer um microambiente tridimensional no qual as células podem proliferar, diferenciar e gerar o tecido desejado. Existem várias tentativas de tradução do termo *scaffold* para o idioma português. Alguns termos utilizados são arcabouço [51][52], escafolde

[53] e corpos porosos estruturais [54]. Todavia, nenhum destes termos foi largamente aceito pela sociedade científica brasileira até o momento.

Idealmente, um *scaffold* deve permitir a fixação e migração celular, a liberação localizada e sustentável dos fatores de crescimento, e a entrada de oxigênio para manter altas as demandas metabólicas de células envolvidas na regeneração dos tecidos [39]. Devem apresentar resistência mecânica adequada para suportar tensões *in vivo*, e devem ainda ser mecanicamente compatível com os tecidos circundantes. A porosidade do *scaffold* é essencial para a geração de tecido. A quantidade e extensão de poros altera a superfície específica do *scaffold* modificando sua permeabilidade e propriedades mecânicas, tendo forte impacto na propagação das células, difusão de nutrientes e crescimento interno de tecido [55].

Quando os *scaffolds* não possuem tamanho adequado de poros as células ósseas não podem migrar para seu interior devido à falta de nutrientes e oxigênio e a insuficiente remoção dos resíduos [56]. Assim, apenas as células próximas à superfície seriam capazes de sobreviver. É importante ressaltar que nenhum tipo de célula, com exceção dos condrócitos (células de cartilagem), é capaz de se desenvolver a uma distância maior do que 25-100 µm do suprimento de sangue [57][58].

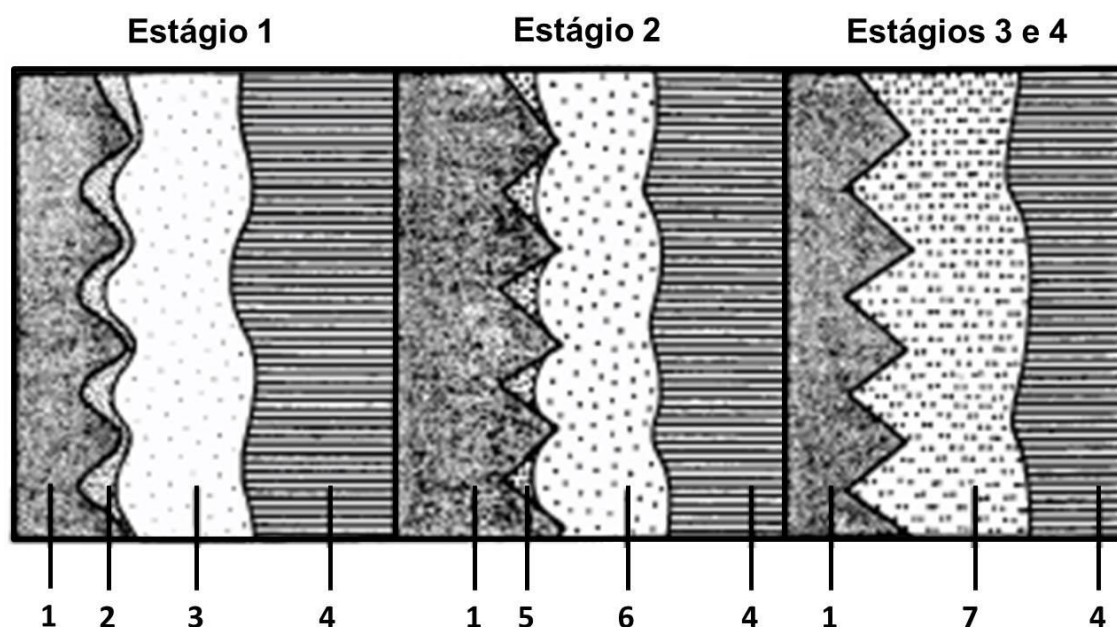
Porosidade controlada proporciona um ambiente propício para a fixação do implante, no entanto reduz a resistência mecânica do *scaffold*, já que os vazios contidos em uma peça porosa aumentam a propensão a fraturas. Um implante denso seria mecanicamente vantajoso, entretanto, um material com estrutura totalmente densa, ao ser implantado em tecido ósseo pode não se fixar adequadamente ao tecido, pois a fixação do implante depende principalmente da interface do material [14].

Considerando que o sucesso da implantação depende de fatores como a migração celular, formação de tecido e união íntima entre implante e osso, é importante entender os conceitos de osseocondução, osseoindução e osseointegração.

## 2.9 Osseointegração, Osseoindução e Osseocondução

A osseointegração é a união anatômica e funcional direta entre o osso vivo remodelado e o implante, capaz de suportar cargas fisiológicas normais sem deformação excessiva e sem rejeição [59]. É o requisito que garante a ancoragem do implante pela formação de tecido ósseo ao seu redor sem crescimento de tecidos fibrosos indesejáveis na interface osso-implante [12].

O processo de osseointegração ocorre em 4 estágios, como mostrado na Figura 2.6.



**Figura 2.6** Representação do processo de osseointegração no qual os números representam: (1) implante de titânio; (2) hematoma; (3) osso danificado; (4) osso saudável; (5) hematoma transformado num novo osso; (6) osso cicatrizado pela desmineralização e remineralização; (7) osso novo saudável. Adaptado de Branemark [60].

No **Estágio 1** ocorre o aparecimento do hematoma (2) como consequência do trauma mecânico e térmico sofrido na colocação do implante. O implante (1) não é perfeitamente congruente com o osso danificado (3) [61].

Durante a cicatrização sem carga, o hematoma é gradualmente transformado em um novo osso (5), o que constitui o **Estágio 2**. O osso danificado também é cicatrizado por um processo de revascularização, desmineralização e remineralização (6) [61].

Quando a cicatrização estiver completa (**Estágios 3 e 4**) o novo osso (7) estará praticamente em contato direto com o implante sem nenhuma camada intermediária de tecido fibroso. O osso em contato com o implante se regenera em resposta à carga aplicada [61].

Se este processo não for bem sucedido, o tecido conjuntivo não mineralizado forma um tipo de pseudoartrose (falsa articulação) na superfície do implante. O tecido conjuntivo pode se organizar até certo grau, porém não é apropriado, já que propriedades mecânicas e biológicas inadequadas criam regiões de menor resistência.

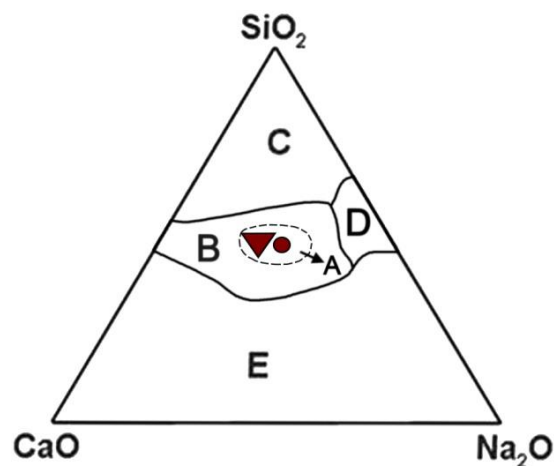
Outros dois conceitos que devem ser levados em consideração são os de osseoindução e osseocondução. A osseoindução é o processo no qual um implante de material altamente bioativo induz a formação de tecido ósseo em locais onde ele não é encontrado naturalmente [12]. Já a osseocondução é o processo no qual o material apresenta compatibilidade biológica que permite a migração do tecido ósseo sobre a interface do material, mas não estimula a atividade das células osteogênicas que geram o tecido ósseo como nos materiais bioativos da classe A [62][63]. Os materiais bioativos de classe A apresentam simultaneamente osseocondução e osseoindução, sendo os que possuem maiores níveis de bioatividade.

O implante está sempre condicionado pelos componentes do fluido onde está inserido, ficando sua superfície coberta com uma mistura de lipídios, açúcares, íons e proteínas específicas. As características da superfície determinarão quais moléculas serão adsorvidas, e essas moléculas trarão consequências diretas na ancoragem, proliferação e diferenciação das células. A ancoragem das células requer a presença de proteínas de ligação específicas, enquanto a proliferação e diferenciação requerem que fatores de crescimento e citocinas estejam presentes. A aderência de células é um pré-requisito para que haja a integração de tecidos ao implante [59].

## 2.10 Bioatividade

Bioatividade é a capacidade que alguns materiais possuem de interagir com os tecidos vivos de modo a estimular respostas biológicas que favorecem a ligação do material ao tecido vivo. No contato entre os implantes bioativos e o tecido hospedeiro ocorre a formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA) biologicamente ativa, que promove uma ligação química muito forte entre os dois. Esta camada interfacial imita a interface que é formada nos processos naturais de reconstrução dos tecidos e é química e estruturalmente equivalente à fase mineral do osso [62]. Se as reações na interface bioativa forem suficientemente rápidas, o implante é absorvido e o tecido gerado pelos processos naturais substitui gradativamente o implante, levando à reconstrução do tecido degenerado.

O diagrama de índice de bioatividade para vidros a base de CaO, SiO<sub>2</sub> e Na<sub>2</sub>O com 6% em peso de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> é mostrado na Figura 2.7.



**Figura 2.7** Diagrama de índice de bioatividade para vidros à base de CaO, SiO<sub>2</sub> e Na<sub>2</sub>O com 6% em peso de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. O círculo e o triângulo representam as composições do *bioglass* e do biossilicato, respectivamente. A linha tracejada (campo A) representa o índice de bioatividade igual a 8. Adaptado de Tiloca [63] e Kokubo 0.

Estes vidros são divididos em 5 classes de bioatividade:

- **Classe A** - um vidro na região A possui a maior bioatividade e é capaz de se ligar com tecidos duros e moles. O índice de bioatividade para estes materiais está entre 8 e 12,5.
- **Classe B** - apenas composições dentro da região A e B são bioativas e capazes de formar uma ligação com o tecido ósseo. O índice de bioatividade dentro da região B aumenta em direção ao centro e varia de 0 a 8.
- **Classe C** – São vidros com mais de 60% de  $\text{SiO}_2$  e não são bioativos.
- **Classe D** – os vidros com essa composição são muito solúveis e, portanto, rapidamente reabsorvidos.
- **Classe E** – As cerâmicas com essas composições não geram vidros.

### 2.11 Importância dos Poros

A remodelação ou reabsorção da matriz óssea se processa ao mesmo tempo em que a sua formação ocorre. Quando a síntese predomina, forma-se excesso de matriz extracelular, o que é chamado de fibrose. Quando predomina a degradação, ocorre o desaparecimento parcial ou total da fibrose [65].

A degradação da matriz e, conseqüentemente, o desaparecimento da fibrose podem ser favorecidos por alguns materiais. Hench [27] constatou que materiais porosos e inertes em meio fisiológico formam uma cápsula fibrosa temporária e o implante se une ao tecido ósseo com congruência. Por outro lado, Anderson [66] considera que sem a presença de poros (implantes densos) há a formação de cápsula fibrosa na interface osso-implante; com a presença de poros a integração do material ao tecido é promovida.

A vascularização dos implantes ósseos é uma condição essencial para a cicatrização de defeitos, já que o crescimento de novos vasos sanguíneos é necessário para a formação e crescimento ósseo e a integração do biomaterial ao tecido vivo.

Griss e colaboradores [67] compararam a resposta tecidual em implantes densos de alumina e em implantes densos de aço inoxidável. Ambos os implantes foram colocados em fêmur de ratos. Após a remoção dos implantes, houve uma comparação histológica entre eles e constatou-se que a alumina densa não apresentou cápsula fibrosa nem corrosão, e ainda se encontrava integrada ao tecido. Em contrapartida, o metal denso apresentou-se isolado por uma cápsula fibrosa e com características de processo de corrosão.

Apesar do sucesso de alguns implantes densos, a literatura considera que a presença de poros é importante em implantes ósseos. Entretanto, não há um consenso em relação à porosidade total, tamanho de poros ou distribuição de tamanho de poros ideais.

A resposta fisiológica do implante quando ele possui a superfície porosa, assemelha-se a cicatrização dos defeitos de um osso trabecular, com tecidos recém-formados ocupando o espaço vazio do material poroso. O implante entrará em contato com porcentagens variáveis de osso cortical, osso trabecular e medula óssea. Algumas áreas estarão comprimindo o tecido ósseo enquanto outras estarão em contato com sangue e uma variedade de células [59].

Bobyn e colaboradores em 1980 [68] sugeriram um tamanho de poro variando de 50 a 400  $\mu\text{m}$  para um ótimo crescimento ósseo dentro de superfícies porosas de implantes metálicos. Em geral, é bem aceito que os poros devem possuir ao menos 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro e uma porosidade total superior a 50%, para garantir a vascularização até a região central do *scaffold* [50].

Para Karageorgiou [50], o tamanho mínimo necessário para o crescimento de células ósseas é de 100 a 200  $\mu\text{m}$ . Poros menores, entre 75 e 100  $\mu\text{m}$  resultam no crescimento de tecido osteóide não mineralizado. Poros menores ainda, entre 10 e 75  $\mu\text{m}$ , permitem a penetração apenas de tecido fibroso, o que ajuda na fixação mecânica da peça. Em alguns casos, poros maiores que 300  $\mu\text{m}$  são recomendados devido às observações de formação de tecido ósseo juntamente com a formação de capilares sanguíneos.



Segundo Vaccaro [69], o tamanho ótimo estaria na faixa de 150 a 500  $\mu\text{m}$ , o que seria comparável ao tamanho de vasos sanguíneos e osteoblastos, e com uma porosidade total maior do que 50 a 60% em volume. Entretanto, para Oh e colaboradores [70], o crescimento dos condrócitos e osteoblastos, por exemplo, são mais evidentes entre os poros de 380 a 405  $\mu\text{m}$ , os fibroblastos são encontrados entre os poros de 186 a 200  $\mu\text{m}$ , e osso recém-formado é encontrado entre 290 e 310  $\mu\text{m}$ .

Poros ainda maiores foram propostos por Holly e colaboradores [71]. Os autores acreditam que a regeneração óssea será alcançada somente quando a estrutura interconectada possuir poros com tamanhos variando na faixa de 1,2 a 2 mm. No entanto, foi descrito por Hollister [72] um crescimento ósseo de até 80% depois de 2 meses da implantação de *scaffolds* em camundongos, independentemente do tamanho de poros, que variou de 300 a 1200  $\mu\text{m}$ . Estas abordagens com poros maiores possuem vantagens evidentes devido à alta razão superfície/volume, que facilitaria o crescimento de células e vasos sanguíneos. Contudo, estas características afetam de forma drástica as propriedades mecânicas dos *scaffolds*.

Embora enxertos ósseos artificiais estejam sendo utilizados há décadas, existem poucos estudos clínicos bem planejados e controlados destes implantes [73]. Não foi encontrado na literatura nenhum estudo clínico que tenha avaliado cuidadosamente o efeito da porosidade e do tamanho dos poros de *scaffolds* na regeneração óssea.

Junto com tamanho de poros, a interconectividade e acessibilidade deles são extremamente importantes para a proliferação de osteoblastos, o crescimento vascular e a formação óssea [74]. Em um mesmo material podem existir poros com grande variedade de formas e tamanhos.

A geometria, tamanho, distribuição e interconectividade dos poros também apresentam relação com as propriedades mecânicas. O controle da porosidade na peça deve ser realizado de forma que não comprometa as propriedades mecânicas do implante, já que quanto maior a porosidade, menor a resistência mecânica do *scaffold*. É importante manter uma resistência mecânica compatível com a região onde ocorrerá a implantação [50].

Para o sucesso do implante, o controle do tamanho dos poros e a interconectividade são fundamentais, pois poros “vazios”, sem tecido organizado ou sem tecido ósseo recém-formado, são concentradores de tensão.

## **2.12 Propriedades e Interações Mecânicas**

O osso não é totalmente flexível e nem propriamente quebradiço, é uma combinação de ambos, com a parte mineral sendo mais rígida e a parte orgânica mais flexível. A parte mineral fornece a rigidez para que o osso resista à compressão, enquanto a fase orgânica (colágeno) contribui com o limite de elasticidade e com as propriedades da fratura, fazendo com que o osso resista à força de tração [75].

O osso é considerado um material viscoelástico. Ele apresenta um limite de deformação elástica e um ponto crítico que delimita o alcance de deformação de uma variação não elástica. Na curva tensão-deformação o osso não exibe comportamento linear e nem inteiramente elástico na porção inicial do gráfico, mas curva-se levemente. Portanto o osso é sujeito a uma deformação recuperável (escoamento plástico), mas pode ceder sob tensão e se recuperar da deformação dentro do seu limite. O osso não exibe uma alta recuperação de deformação quando ocorre uma significativa perda de energia; uma histerese ocorre durante uma carga e descarga [59]. Por ser um material anisotrópico, suas propriedades elásticas dependem de sua orientação com relação à direção de carregamento.

O osso raramente é submetido por um único tipo de solicitação mecânica, devido à sua estrutura geométrica ser irregular. As forças que atuam sobre um osso podem ser de compressão, de tração, de flexão, de torção e de cisalhamento, como mostrado na Tabela 2.3, e a combinação dessas forças pode ocasionar diversos tipos de fratura quando a carga ao qual o osso é submetido supera a sua resistência [33].

**Tabela 2.3** Tipos de solicitações mecânicas que atuam nos ossos [33].

<b>Solicitação mecânica</b>	<b>Efeito da solicitação mecânica e local de ocorrência</b>
Compressão	Tende a diminuir o comprimento e aumentar a largura do osso. Nas vértebras e ossos dos membros inferiores.
Tração	Tende a aumentar o comprimento e separar as partes. Na suspensão em barra e carregamento de peso.
Flexão	Atua por meio de um momento de força que age num plano contendo o eixo longitudinal. As forças dos músculos atuando nos ossos longos.
Torção	Atua por meio de um momento de força que age em um plano perpendicular ao eixo longitudinal do osso. Nas fraturas de tibia.
Cisalhamento	Atua quando cargas são aplicadas de forma transversal à superfície da estrutura e são contrárias entre si. Nas fraturas do osso esponjoso e fêmur.

Conforme citado por Karageorgiou [50], as propriedades mecânicas dos ossos dependem fundamentalmente da idade do osso. Estudos com fêmur de 3, 5 e 35 anos encontraram módulos de elasticidade de 7,0, 12,8 e 16,7 GPa, respectivamente. Em geral, após a maturação do osso, a resistência à tração do osso cortical femoral diminui enquanto seu módulo de elasticidade aumenta.

Além da relação com a idade, as propriedades mecânicas do osso dependem do tipo de osso, do tipo de carregamento, da orientação do carregamento (longitudinal ou transversal), entre outras características, e por isso são encontrados diversos valores na literatura.

Yaszemski e colaboradores [76] realizaram medidas de resistência à tração, resistência à compressão e módulo de elasticidade do osso cortical. Eles observaram que na orientação longitudinal (paralelo ao longo do eixo do osso) o limite de resistência à tração fica entre 79 e 151 MPa enquanto a resistência à compressão está entre 131 e 224 MPa. Na direção transversal (perpendicular ao longo do eixo do osso) o osso cortical é mais frágil, com uma resistência à tração entre 51 e 56 MPa e resistência à compressão entre 106 e

113 MPa. Além disso, o módulo de elasticidade do osso cortical é de 17 a 20 GPa na direção longitudinal e de 6 a 13 GPa na direção transversal, tanto quando submetido à tração quanto à compressão.

Gibson e Ashby [77] mostraram a curva tensão-deformação para o osso cortical úmido, fornecendo informações sobre suas propriedades mecânicas em compressão. Na direção longitudinal foi descrito um comportamento elástico até uma deformação de aproximadamente 0,7%. Acima disso ele passa para a fase plástica até uma deformação em torno de 3%. Na direção transversal, o osso cortical úmido é forte, dúctil e menos rígido, e em tração ele quebra com uma deformação de apenas 0,6%.

A resistência mecânica e o módulo de elasticidade do osso esponjoso estão relacionados com sua densidade e são sensíveis ao carregamento bem como a direção de carregamento. Os valores médios para a resistência à compressão do osso trabecular, segundo Athanasiou [75], estão entre 2 e 5 MPa e o módulo de elasticidade entre 0,1 e 4 GPa.

O osso trabecular possui um baixo módulo de elasticidade e deformação até a fratura maior que a do osso cortical, o que se deve a sua baixa densidade em relação ao mesmo. Ambos possuem um maior módulo de elasticidade do que os tecidos conectivos, como tendões e ligamentos. Esta diferença de rigidez (módulo de elasticidade) entre os tecidos produz um suave gradiente de tensão através do osso, entre os ossos e entre músculos e ossos [15].

Como o osso está continuamente sob solicitação, as propriedades mecânicas do *scaffold* devem ser similares ao do osso onde será implantado, de forma que a mobilização do local lesionado possa ocorrer o mais cedo possível. O *scaffold* deve conferir estabilidade mecânica à região onde o material foi colocado durante o período em que o novo tecido ósseo é formado, uma vez que o processo de regeneração depende não apenas do estímulo biológico, mas também do estímulo mecânico.

A interação mecânica entre o implante e o tecido receptor é um fator determinante para a estabilização do primeiro. A diferença entre os módulos de elasticidade dos tecidos e dos materiais usualmente empregados na confecção de implantes faz com que estes apresentem uma resposta à tensão diferente

da apresentada pelo tecido vivo. Assim, cada estrutura irá se deformar de uma maneira e, conforme a direção das tensões aplicadas, poderá ocorrer movimento relativo entre elas [59].

A influência dos fatores mecânicos na interface se faz sentir de duas maneiras inter-relacionadas: a ação direta das tensões sobre os tecidos e a ação dos movimentos provocados por estas tensões. Forças de tração e de cisalhamento tendem a provocar movimento relativo na interface, o que resulta no encapsulamento fibroso do implante quando em contato direto com o tecido vivo ou na fratura do cimento utilizado como meio de fixação [59].

A concentração de tensões em determinadas regiões pode ser produzida pela forma ou adaptação inadequadas da prótese. Para se evitar esse defeito, a prótese deve adaptar-se harmonicamente ao leito receptor do osso, possibilitando assim maior área de transmissão de carga [59].

As superfícies de alguns implantes permanentes passaram a ser fabricadas com certa porosidade para estimular o crescimento de tecido em seu interior e para transformar as forças de tensão ou cisalhamento entre o tecido vivo e o implante em forças de compressão das paredes internas dos poros. Além disso, superfície porosa preenchida com tecido vivo age como um compósito com módulo de elasticidade intermediário entre estes dois componentes, favorecendo a integração biomecânica do implante [78].

O sucesso clínico de um implante pela fixação por osseointegração e pelo crescimento de tecido ósseo através do implante depende principalmente da união estável entre o implante e o leito receptor [78].

Um dos fatores que torna a interface osso-implante estruturalmente fraca é a perda de tecido ósseo e a consequente diminuição da resistência mecânica do osso, que podem ser ocasionados por doenças ou pelo envelhecimento. Além disso, quando o implante possui um módulo elástico muito superior ao osso, o estado de carregamento do osso é alterado, levando ao fenômeno conhecido como *stress shielding*. Neste caso o implante suporta a maior parte da carga durante o movimento, fazendo com que ocorra a reabsorção óssea da região afetada, que deixa de receber o estímulo mecânico. Esta condição pode em longo prazo levar a fratura do osso nessa região [15].

Uma grande variação nos valores das propriedades mecânicas dos *scaffolds* é encontrada na literatura. Isso acontece devido aos diferentes métodos de fabricação empregados, que levam a diferentes geometrias e distribuição de tamanho de poros. Além disso, a determinação de propriedades mecânicas depende também da geometria e da espessura de parede do *scaffold*, assim como do formato da amostra utilizada nos ensaios.

Embora a alta porosidade e a presença de poros grandes favoreçam o crescimento do tecido ósseo no interior do *scaffold*, estas características resultam na diminuição de sua resistência mecânica. Para cada aplicação específica, um equilíbrio entre porosidade e resistência mecânica deve ser encontrado.

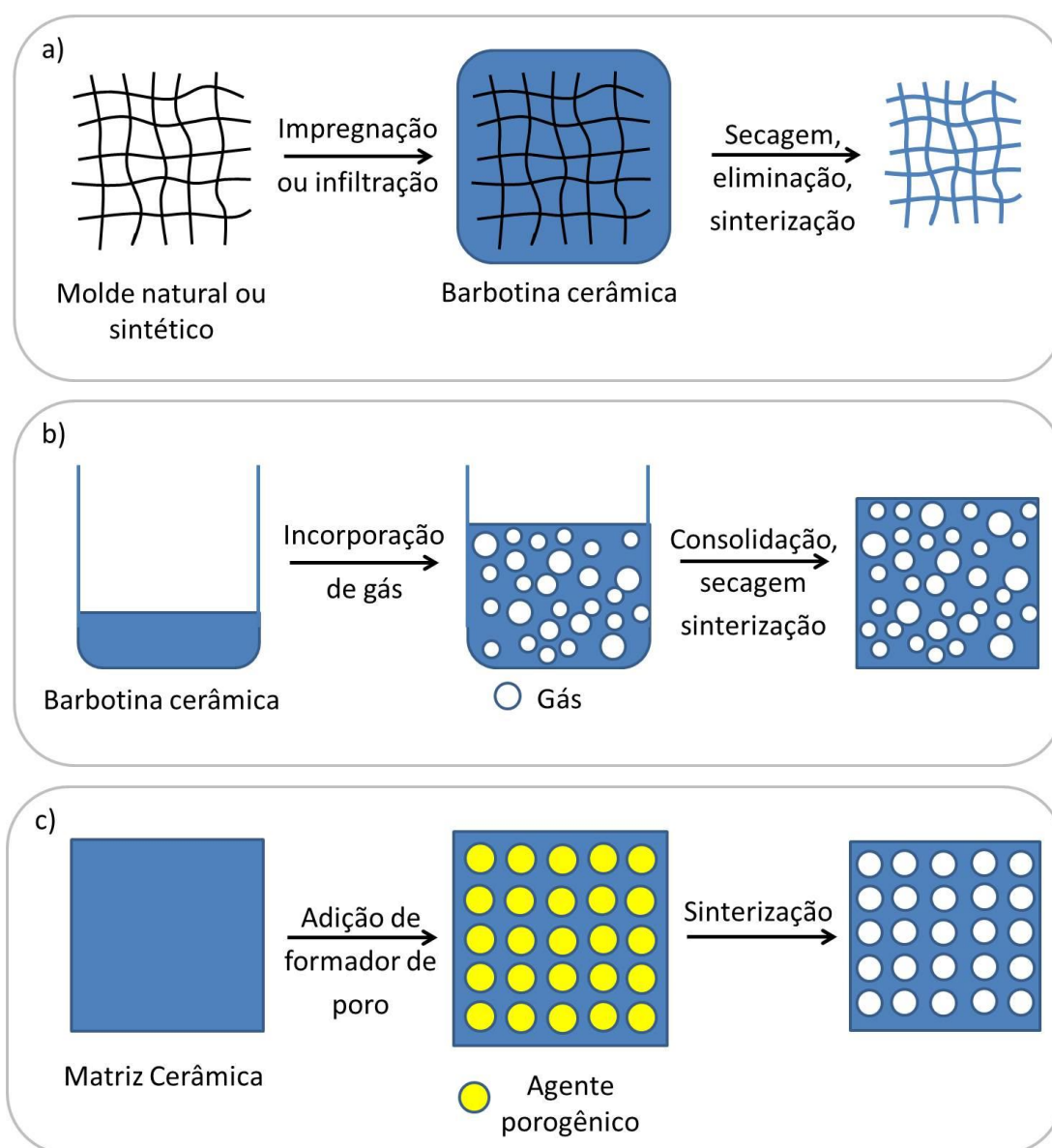
### 2.13 Conformação de *Scaffolds*

Diversos métodos estão disponíveis para a conformação de *scaffolds* cerâmicos com microestrutura controlada, em resposta ao crescente número de aplicações para estes materiais. Técnicas versáteis que permitem o controle da porosidade, morfologia do poro e distribuição do tamanho de poros, além da possibilidade de uso de materiais com diferentes composições químicas, são estudadas.

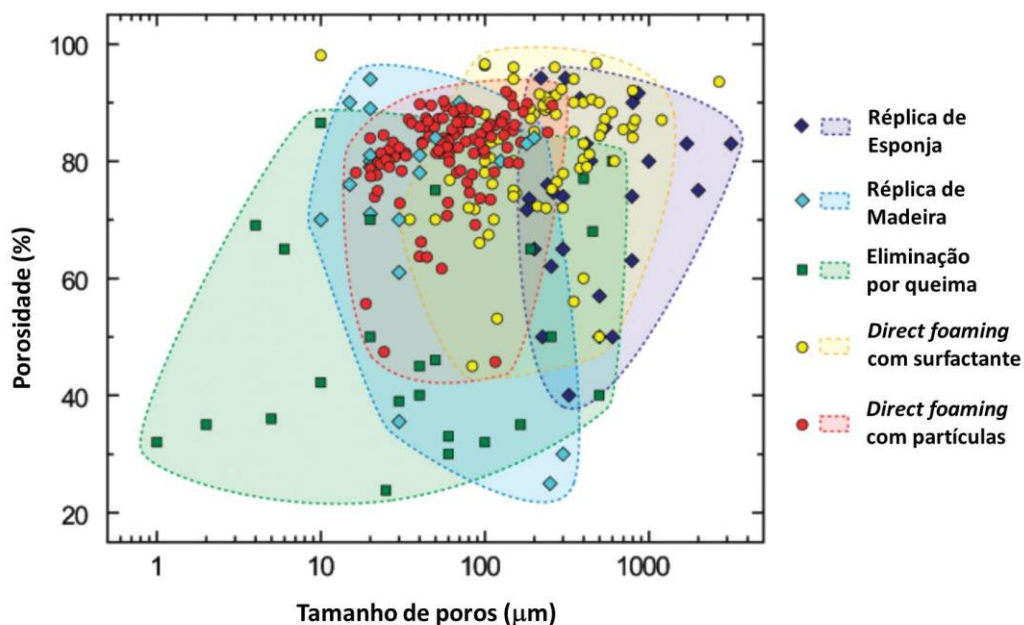
Studart e colaboradores [79] citam três principais métodos para a obtenção de cerâmicas macroporosas, cujas rotas de processamento são mostradas na Figura 2.8: (a) técnica da réplica ou da esponja polimérica (*replica or polymer sponge method*), (b) técnica da espuma direta (*direct foaming*) e (c) técnica do sacrifício ou da eliminação por queima de agentes porogênicos (*sacrificial template method*).

O método da réplica consiste na imersão de uma esponja polimérica, ou alguma outra estrutura porosa sintética ou natural, em uma barbotina cerâmica, produzindo cerâmicas porosas que podem alcançar porosidade aberta na faixa de 40 a 95% com poros altamente interconectados e tamanhos entre 0,2 e 3 mm [80], como mostrado na Figura 2.9. Neste processo, o material poroso que

serviu de molde é eliminado durante a queima e a cerâmica é sinterizada no formato do molde, como mostrado na Figura 2.8a. A reologia de impregnação da suspensão e sua adesão na esponja são as etapas cruciais neste método. Apesar da simplicidade, esta técnica possui a desvantagem de produzir estruturas com propriedades mecânicas afetadas pela formação de trincas durante a pirólise [81].



**Figura 2.8** Esquema das possíveis rotas de processamento usadas para produção de cerâmicas macroporosas. (a) Réplica, (b) *direct foaming* e (c) eliminação por queima [79].



**Figura 2.9** Porosidade e tamanho de poros típicos obtidos pelos métodos de réplica, eliminação por queima e *direct foaming* [79].

O método conhecido como *direct foaming* fornece um caminho fácil, barato e rápido para preparar cerâmicas com porosidades abertas ou fechadas de 40 a 97%. Neste método os poros são resultados da incorporação direta de bolhas de ar em uma barbotina cerâmica (Figura 2.8b), que é em sequência ajustada para manter a estrutura de bolhas formada. As espumas consolidadas são mais tarde sinterizadas a altas temperaturas para obter cerâmicas porosas de alta resistência. A porosidade total das cerâmicas obtidas é proporcional à quantidade de gás incorporado, já o tamanho de poro é determinado pela estabilidade da espuma antes da consolidação. A estabilização e consolidação da espuma são etapas decisivas nesta técnica.

O último método é o de eliminação por queima ou método do sacrifício, que combina baixo custo, simplicidade e versatilidade [82] e foi escolhido como método de conformação dos *scaffolds* deste trabalho. De acordo com esta abordagem, partículas orgânicas são empregadas como agentes formadores de poros, ou agentes porogênicos, numa matriz cerâmica. A fase orgânica é homoganeamente distribuída no pó ou precursor cerâmico e, em sequência, é removida termicamente durante a sinterização, como mostra a Figura 2.8c.



Esta técnica leva a um material poroso exibindo uma réplica negativa do material de sacrifício original, ao contrário da morfologia positiva obtida pela técnica de réplica.

A etapa crucial nesta técnica é a remoção do agente formador de poros pela pirólise, evaporação ou sublimação. Este processo pode envolver um lançamento excessivo de gases e exigir taxa de aquecimento lenta para evitar rupturas na estrutura. A remoção lenta do agente porogênico pode aumentar consideravelmente o tempo de processamento de componentes grandes [83].

A forma como o agente porogênico é extraído do compósito consolidado depende principalmente do tipo de formador de poros empregado. Uma grande variedade de materiais tem sido usada como formadores de poros, incluindo compostos orgânicos naturais e sintéticos, tais como o polietileno [84], sacarose [85], gelatina [86] e amido de milho, batata e arroz [87]. Cuidados devem sempre ser tomados com relação à pureza dos materiais utilizados. A Tabela 2.4 ilustra alguns exemplos de possíveis formadores de poros.

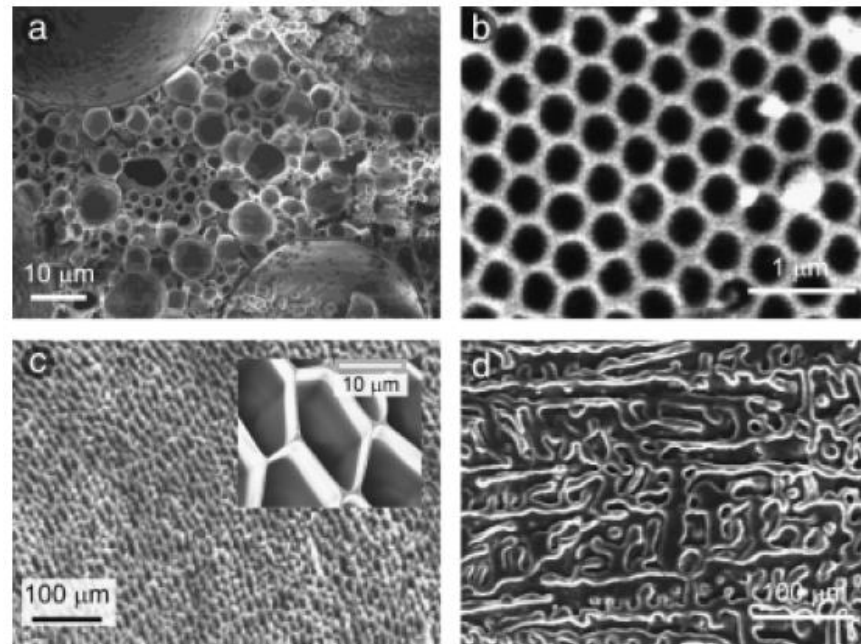
Orgânicos sintéticos e naturais são frequentemente extraídos por meio de pirólise pela aplicação de tratamentos térmicos longos a temperaturas entre 200° e 600°C [88]. Os longos períodos necessários para pirólise completa do componente orgânico e a extensa quantidade de subprodutos gasosos gerados durante esse processo são as principais desvantagens da utilização de materiais orgânicos como agentes porogênicos [79]. Em todos os processos, a matriz contínua deve ser parcialmente consolidada antes da remoção do agente formador de poro, de modo que a estrutura porosa não sofra colapso durante a etapa de extração.

A técnica de eliminação por queima é bastante flexível com respeito à possibilidade de composições químicas que podem ser usadas no processo de fabricação. Diferentes óxidos têm sido usados para fabricar cerâmicas porosas com partículas de amido como agente porogênico. As principais vantagens desta técnica são sua simplicidade e a disponibilidade imediata de partículas de amido de variadas morfologias e tamanhos (2-100  $\mu\text{m}$ ) [89].

**Tabela 2.4** Exemplos de agentes porogênicos encontrados na literatura [79].

<b>Agente Porogênico</b>	<b>Composições</b>
<b>Orgânicos sintéticos</b>	
Grãos de PVC	$Al_2O_3$ , PZT, $(Ca_{1-x}, Mg_x)Zr_4(PO_4)_6$
Grãos de PS	$SiO_2$ , $TiO_2$ , $TiO_2-SiO_2$ , Zeólita, $Al_2O_3$
Grãos de PMMA	SiOC, SiC, Hidroxiapatita, PZT, Tricálcio fosfato
Resina fenólica	$Si_3N_4$
Náilon	SiC
Acetato de celulose	$SiO_2$ , $Al_2O_3$
Géis poliméricos	$SiO_2$ , $TiO_2$
Naftaleno	Fosfato de cálcio
<b>Orgânicos Naturais</b>	
Gelatina	$Al_2O_3$
Ervilhas e sementes	$Al_2O_3$
Celulose/algodão	$Al_2O_3$ , Mulita
Glicídios	PZT
Sacarose	Fosfato de cálcio
Dextrina	SiC
Cera	Hidroxiapatita
Alginato	$Al_2O_3$
Amido	$Al_2O_3$ , PZT, vidro de $SiO_2-Na_2O-CaO-MgO$ , Hidroxiapatita, Mulita, $Si_3N_4$ , $CaCO_3$ , Diatomita, Cordierita

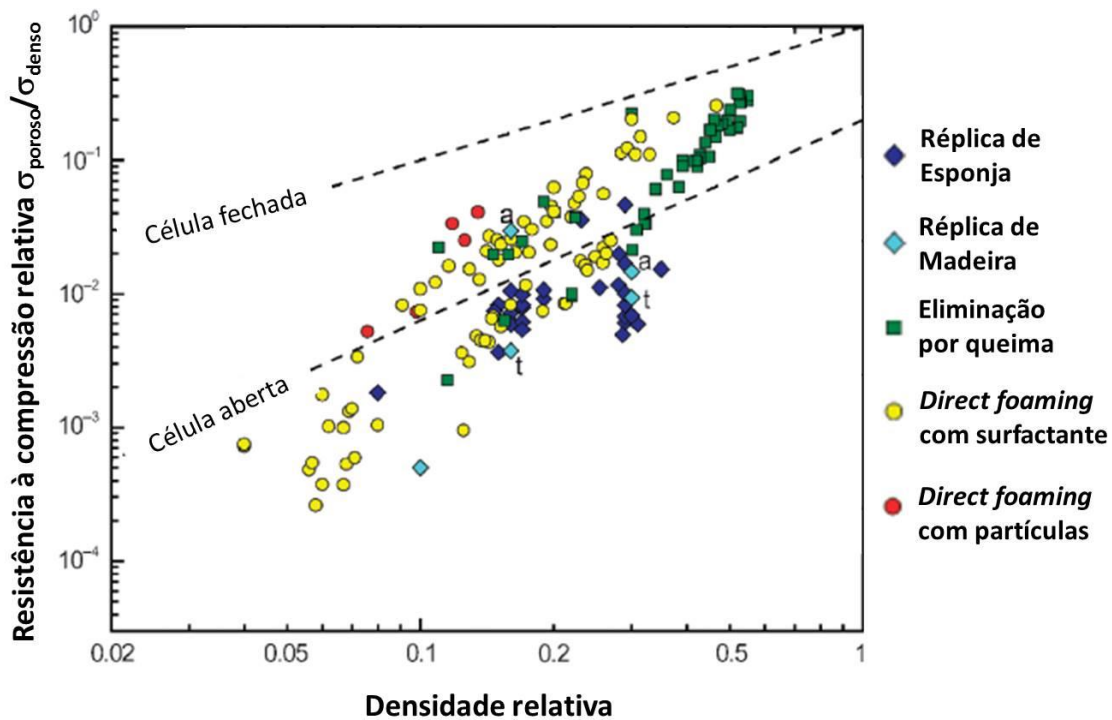
Uma das principais vantagens do método de eliminação por queima em comparação com outras rotas de fabricação é a possibilidade de adaptar a porosidade, a distribuição de tamanho de poro, e a morfologia dos poros do componente cerâmico final por meio da escolha apropriada do agente formador de poros. Como mostrado na Figura 2.9 existe uma gama muito ampla de porosidade e dimensões dos poros que podem ser alcançados com esta técnica (20% - 90 % e 1 - 700  $\mu m$ , respectivamente), uma vez que depende apenas da fração de volume e do tamanho do agente porogênico usado [79]. A Figura 2.10 mostra algumas estruturas obtidas por este método.



**Figura 2.10** Microestruturas de cerâmicas macroporosas produzidas pelo método de sacrifício. (a) Espuma de  $\text{TiO}_2$  exibindo estruturas gradualmente porosas. (b)  $\text{SiO}_2$  com macroporos ordenados usando esferas de poliestireno para formar poros. (c) Estrutura alveolar de  $\text{SiO}_2$  altamente orientada obtida com géis de sílica. (d)  $\text{Al}_2\text{O}_3$  com macroporos obtida com o uso de canfeno [79].

Já que neste método a estrutura cerâmica corresponde ao negativo do molde original, a remoção controlada da fase de sacrifício não leva a falhas na estrutura como no caso das técnicas de réplicas positivas. Assim, a resistência mecânica das estruturas obtidas por este método é geralmente mais elevada que as produzidas por outros modelos, como mostrado na Figura 2.11.

Dessa forma, as diversas rotas de processamento usando os métodos de réplica, sacrifício ou *direct foaming* estão disponíveis para a conformação de cerâmicas macroporosas. As técnicas diferem largamente em termos de características de processamento e microestrutura/propriedades obtidas. Assim, a seleção da rota de processamento para a produção de cerâmicas porosas depende primeiramente das propriedades e aplicações desejadas [79].



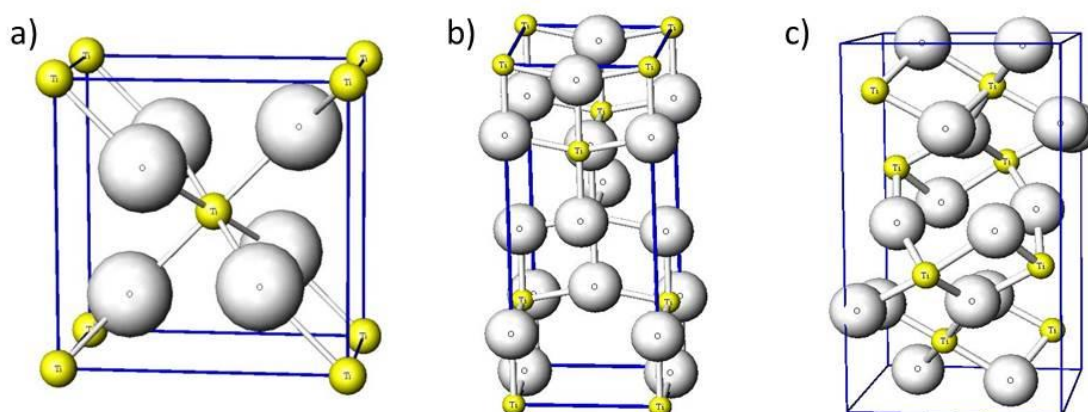
**Figura 2.11** Resistência à compressão relativa em função da densidade relativa de cerâmicas macroporosas produzidas pelos métodos de réplica, sacrifício e *direct foaming*. Os dados foram obtidos para cerâmicas porosas de diferentes composições químicas [79].

## 2.14 Óxido de Titânio

O titânio (Ti) é o nono elemento mais abundante da Terra. Trata-se de um elemento que possui uma forte afinidade por oxigênio, fazendo com que a maior parte ocorra na forma de óxido. O óxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ), ou titânia, é um sólido branco utilizado como pigmento opacificante em tintas, papéis, tecidos, plásticos e outros materiais [90].

O óxido de titânio ocorre naturalmente em diversos minerais, entre os quais se encontra o rutilo que possui um índice de refração maior que o diamante, mas é muito macio para ser usado como pedra preciosa. Essa característica permite que se obtenha granulometrias muito finas no processo de moagem. Além disso, não é um produto tóxico, é bastante estável e possui

baixo custo [91]. Também pode ser encontrado na forma mineral de anatase e brookita. Estas estruturas são diferentes entre si, e consistem de cátions  $Ti^{4+}$  no centro de um octaedro de oxigênio. No mineral rutilo, que tem simetria tetragonal, a estrutura é construída através de ligação octaédrica. Na estrutura anatase, o arranjo dos ânions e cátions é similar e o cristal é novamente tetragonal, porém cada octaedro é distorcido e divide quatro arestas com outro octaedro. Na brookita, a estrutura é bem mais complicada, onde o octaedro divide tanto as arestas quanto as quinas. Dessa forma, a tendência rutilo-anatase-brookita é de sempre diminuir simetria [92]. A Figura 2.12 mostra os arranjos dos átomos nas três estruturas do óxido de titânio ( $TiO_2$ ).

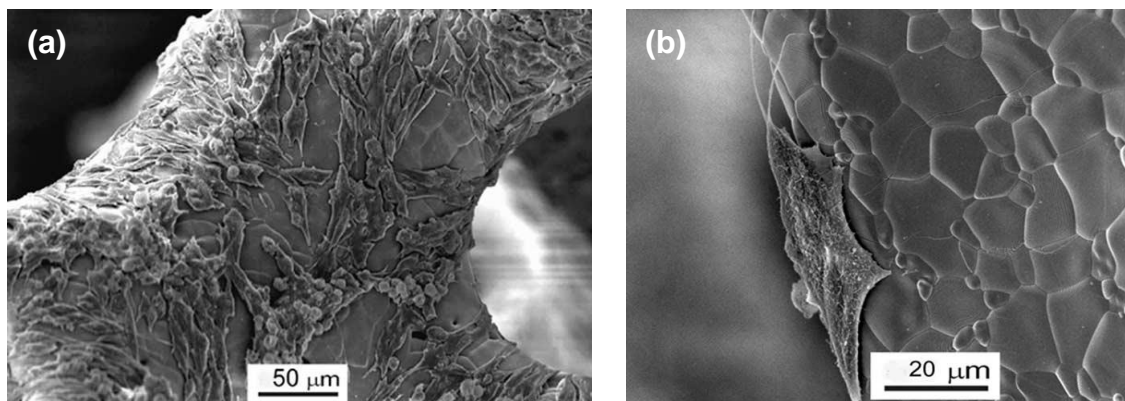


**Figura 2.12** Óxido de titânio na forma de (a) rutilo (b) anatase (c) brookita.

O titânio metálico tem sido utilizado com sucesso em cirurgia de reconstrução como implantes dentários e ortopédicos por mais de 40 anos devido à sua excelente biocompatibilidade com o tecido ósseo. Esta compatibilidade é explicada pelas características únicas da interface osso-titânio: crescimento lento (alguns nanômetros por ano) de camadas de óxido de titânio hidratado revelou a incorporação dos elementos cálcio e fósforo que formam a camada de apatita compatível com o osso. Os grupos  $TiOH$  que se formam sobre os implantes de titânio são assumidos como sendo responsáveis por essa incorporação, que leva à osseointegração do implante e até mesmo ligação óssea [93].

Assim, o óxido de titânio foi escolhido na produção dos *scaffolds* do presente trabalho por estar mostrando ser um material biocompatível [94], permitir o crescimento ósseo e vascular [95] e apresentar certo grau de efeito bacteriostático [96]. O rutilo tem sido estudado como um promissor material de *scaffold* para induzir a formação óssea na restauração de grandes defeitos ósseos [94][97][98][99].

Haugen e colaboradores [97] produziram *scaffolds* de  $\text{TiO}_2$  não-reabsorvíveis pelo método da esponja polimérica utilizando esponjas de poliuretano de 45 e 60 ppi que foram infiltradas com uma barbotina de  $\text{TiO}_2$ , sendo posteriormente queimados até  $1150^\circ\text{C}$ . A caracterização via porosimetria por intrusão de mercúrio indicou poros com três faixas de tamanhos diferentes, atingindo o valor máximo de  $385\ \mu\text{m}$  para a esponja de 45 ppi e  $700\ \mu\text{m}$  para a esponja de 60 ppi. A porosidade total para os dois casos foi de 74%. Os *scaffolds* obtidos apresentaram a habilidade de promover a adesão de fibroblastos e osteoblastos em toda a sua superfície, como pode ser observado na Figura 2.13.



**Figura 2.13** (a) Fibroblastos aderidos à superfície de um *scaffold* de  $\text{TiO}_2$ . (b) Um único fibroblasto ligado à superfície do *scaffold* [97].

Jiang e colaboradores [100] sintetizaram *scaffolds* de  $\text{TiO}_2$  com *bioglass* e *scaffolds* de *bioglass* puro, com macroporos entre 30 e  $50\ \mu\text{m}$  e mesoporos entre 4,4 e  $5,6\ \text{nm}$ , pela utilização do método da esponja polimérica. Os pesquisadores observaram que a estrutura  $\text{TiO}_2$ -*bioglass* induziu a formação de hidroxiapatita mais rapidamente do que o *bioglass* puro, sendo que em

apenas 3 horas as estruturas  $\text{TiO}_2$ -*bioglass* foram cobertas com uma camada de hidroxiapatita.

Sabetrasekh e colaboradores [101] compararam as propriedades e características de um enxerto ósseo de  $\text{TiO}_2$  com três diferentes enxertos ósseos disponíveis no mercado, Natix<sup>®</sup>, Straumann<sup>®</sup> BoneCeramic e Bio-Oss<sup>®</sup>. Para isso células-tronco mesenquimais humanas foram cultivadas nos substitutos ósseos e avaliadas depois de 1 e 3 dias. Eles relataram que a viabilidade e proliferação celular, porosidade, interconectividade, tamanho de poros abertos e razão área-volume dos grânulos de  $\text{TiO}_2$  foram significativamente maiores que os grânulos ósseos comerciais, enquanto nenhuma diferença significativa foi encontrada nos testes de resistência à compressão. Os testes *in vitro* ainda mostraram que os enxertos de  $\text{TiO}_2$  apresentaram a menor citotoxicidade dentre os materiais testados.

Algumas pesquisas [102][103][104] mostraram que as nanofases cerâmicas de alumina e titânia podem aumentar a adesão de certos tipos de células com subsequente aumento nas taxas de proliferação. Nestes estudos a titânia superou a alumina, evidenciando o grande potencial da titânia como um material para estudos biológicos.

Lindström e colaboradores [105] estudaram o efeito da adição de uma camada nanoporosa de titânia (na forma de rutilo) sobre micropoços de vidro utilizados para a cultura de células-tronco. Foram feitos experimentos de crescimento de células-tronco mesenquimais de ratos no vidro puro, vidro coberto com colágeno e vidro coberto com titânia. Observou-se que houve uma maior adesão inicial de células nos substratos cobertos com titânia além da proliferação mais rápida. As células foram encontradas mais fortemente ligadas aos substratos cobertos com titânia.

A citotoxicidade de nanopartículas de anatase foi testada por Bernier e colaboradores [106] em osteoblastos e fibroblastos. As nanopartículas de anatase exerceram um efeito citotóxico nas duas linhagens celulares, mas, comparado aos fibroblastos, os osteoblastos foram sensíveis a menores concentrações, revelando assim diferentes comportamentos celulares. Para os dois tipos de células, as nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  não impediram a adesão

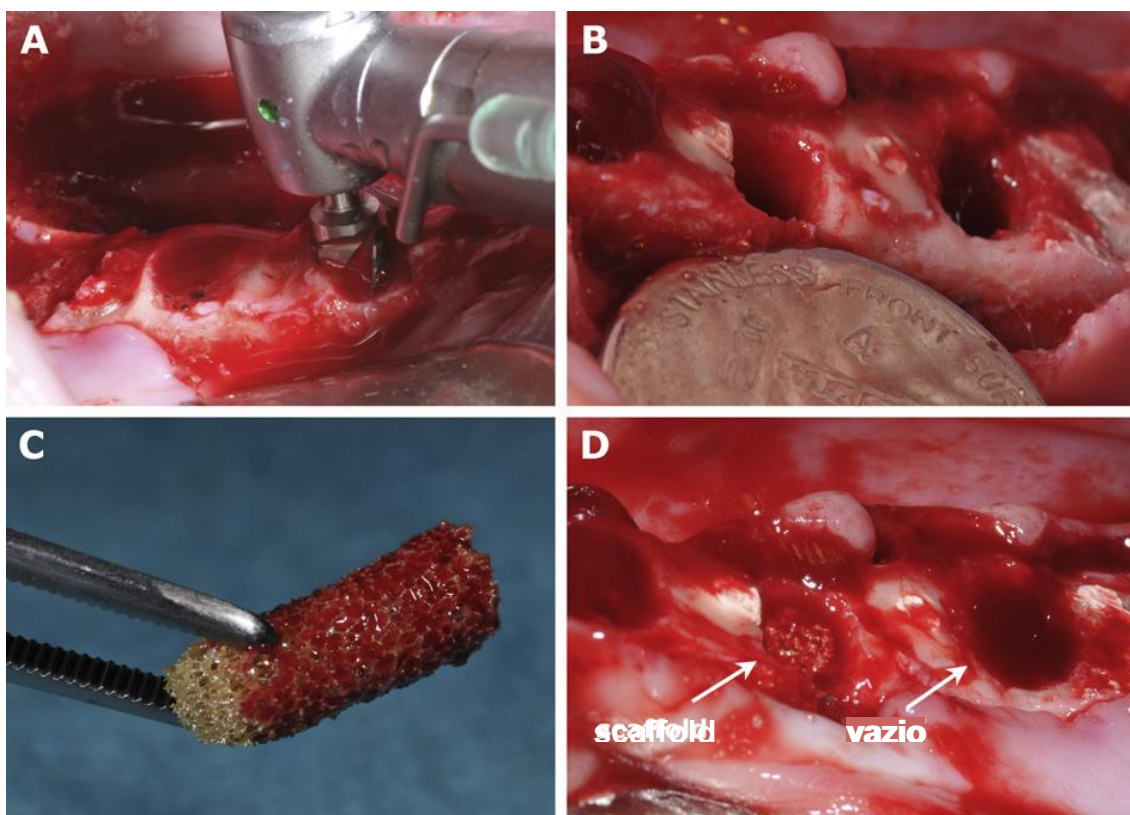
celular, mas provocaram o decréscimo do tamanho das células. De acordo com os resultados de citotoxicidade obtidos nos osteoblastos, o uso de nanopartículas de anatase em implantes ortopédicos deve ser considerado com precaução.

Devido à elevada resistência à compressão das cerâmicas de  $\text{TiO}_2$  em comparação com outros materiais comuns de *scaffolds* osseocondutores, tais como cerâmicas de fosfato de cálcio (CaP), vidros bioativos e compósitos CaP/polímeros, é esperado que o  $\text{TiO}_2$  forneça maiores resistências mecânicas à estrutura de *scaffolds* com porosidades altamente interconectada. Valores de resistência à compressão de aproximadamente 2,5 MPa foram obtidos para *scaffolds* cerâmicos de  $\text{TiO}_2$  numa porosidade geral de 85% [99], e essa resistência é também retida depois da implantação devido à natureza não-reabsorvível do  $\text{TiO}_2$ . Outros pesquisadores [107] obtiveram *scaffolds* de  $\text{TiO}_2$  com resistência à compressão de 3,4 MPa por meio do aumento no tempo de sinterização das peças (acima de 5 horas) sem alteração significativa nas características dos poros. Os valores de resistência à compressão reportados para *scaffolds* de CaP e compósitos de CaP/polímeros com porosidades similares estão geralmente bem abaixo de 2 MPa, frequentemente dentro do alcance de 0,1 a 1 MPa [108][109][110][111].

Tiainen e colaboradores [112] realizaram o primeiro estudo *in vivo* de *scaffolds* de  $\text{TiO}_2$  altamente porosos em um modelo animal grande. O trabalho teve como foco investigar a capacidade osseocondutora dos *scaffolds* pela avaliação do crescimento ósseo nestas estruturas após sua colocação em cavidades dentais de mandíbulas de mini-porcos, como mostrado na Figura 2.14. Os *scaffolds* produzidos apresentavam tamanho médio de poros de aproximadamente 400  $\mu\text{m}$  e uma porosidade geral de mais de 83% com uma rede de poros altamente interconectada e resistência à compressão de 1,68 MPa. Todos os locais defeituosos mostraram cura rotineira sem sinais clínicos de inflamação ou efeitos adversos após 6 semanas. A avaliação histológica qualitativa e os dados 3D da microtomografia computadorizada revelaram que mais de 70% dos *scaffolds* foram preenchidos com tecido ósseo recém-formado. Nenhum sinal de células inflamadas foi observado. A presença de

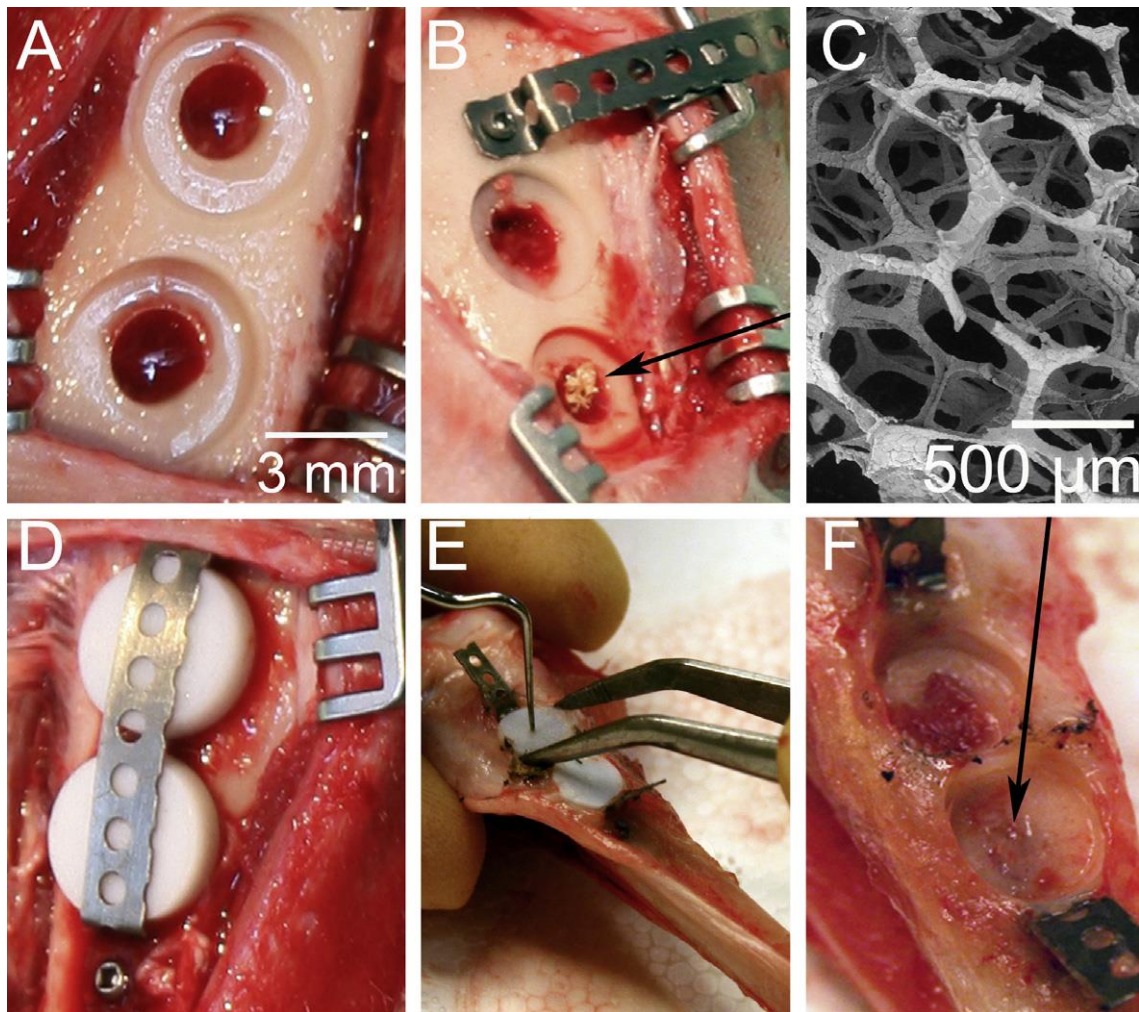


grande quantidade de tecido ósseo mineralizado e a evidência de vascularização no *scaffold* indicam que a estrutura de poros altamente interconectada mostrou excelente capacidade osseocondutora e forneceu um ambiente favorável para o crescimento ósseo. Tecido ósseo recém-formado foi encontrado em contato direto com as paredes dos *scaffolds* de  $\text{TiO}_2$ , que, junto com o extenso crescimento ósseo, fornece boa estabilidade mecânica ao local de implantação.



**Figura 2.14** (a) *Scaffolds* porosos de  $\text{TiO}_2$  foram implantados em cavidades de mandíbulas de mini-porcos. (b) Os alvéolos foram modificados cirurgicamente para acomodar os *scaffolds* cilíndricos. (c, d) Espaços vazios foram preenchidos com sangue, enquanto os *scaffolds* foram impregnados com sangue antes da inserção [112].

Haugen e colaboradores [113] também analisaram o desempenho *in vivo* de *scaffolds* porosos de  $\text{TiO}_2$ , o que é resumido na Figura 2.15.



**Figura 2.15** Modelo de lesão desenvolvido em tíbia de coelhos. (a) 2 defeitos foram feitos na tíbia (b) sendo o *scaffold* de  $\text{TiO}_2$  colocado em um deles (mostrado pela seta), enquanto o outro permaneceu vazio. (c) Imagem de MEV do *scaffold* antes da implantação. (d) Moedas de titânio foram colocadas no topo dos defeitos e cobertas com teflon. (e) Após a cura, o teflon foi removido. O osso peri-implante ligado aos discos de titânio foi analisado. (f) A seta mostra que o *scaffold* de  $\text{TiO}_2$  promoveu a cura completa do defeito [113].

Os *scaffolds* com porosidade de 91% e resistência à compressão ao redor de 1,2 MPa foram implantados em ferimentos no osso tibial de coelhos. O defeito escolhido possuía 2 mm de diâmetro para que se pudesse comparar o desempenho do *scaffold* de  $\text{TiO}_2$  contra a cura espontânea de defeitos vazios. Depois de 8 semanas de cura, análises morfológicas por microtomografia

computadorizada mostraram maior volume dos defeitos tratados com *scaffolds* de  $\text{TiO}_2$  quando comparados com vazios. Nenhum efeito adverso (necrose do tecido ou inflamação) foi observado. Foi possível observar a presença de osso recém-formado nos defeitos e próximo às superfícies do *scaffold* e do implante de titânio. O *scaffold* de  $\text{TiO}_2$  apresentou-se bem integrado ao osso.

Todos os *scaffolds* de óxido de titânio citados foram fabricados pelo método da esponja polimérica. Não foi encontrada qualquer referência que utilizasse o método da eliminação de agentes de sacrifício para este desenvolvimento.

Quando o material de matrizes porosas é “bioinerte” não ocorre o ciclo bioquímico e/ou biológico de crescimento e reparo tecidual, contudo, a presença de material bioativo em contato direto com o meio biológico melhora a capacidade osteogênica e osseocondutora [114].

Alguns materiais, como o óxido de titânio, são utilizados em implante ósseo em função da biocompatibilidade e alta confiabilidade mecânica. Entretanto, o óxido de titânio é considerado quase bioinerte e assim pode não favorecer o crescimento ósseo para o interior do implante poroso, o que dificultaria sua fixação e levaria a uma falha prematura do implante. Este problema pode ser evitado modificando a superfície do implante para torná-lo bioativo, permitindo assim a formação de ligações químicas entre o osso e o material [27].

Para combinar a resistência mecânica dos materiais bioinertes com a bioatividade dos materiais bioativos existem diversas técnicas. Este trabalho é focado em uma delas que consiste na preparação de materiais compostos ou compósitos, nos quais o material bioativo está homogeneamente disperso em uma matriz resistente do material biotolerável. Esta forma apresenta como principais dificuldades a necessidade de obter uma boa união interfacial entre o componente bioativo e a matriz biotolerável para evitar a concentração de defeitos na interface que conduziria à falha do material [115]. No caso deste trabalho, o material bioativo utilizado foi o biosilicato e assim ele é estudado a seguir.

## 2.15 Biosilicato e Biovidro

Até os anos 60, o conceito de um material que não seria rejeitado ou rodeado por tecido fibroso após a implantação no corpo humano parecia inimaginável. Foi em 1969 quando Hench e colaboradores [15], na Flórida, não só atingiu essa meta, mas foi além. Pela primeira vez, de fato, eles desenvolveram um vidro especial de fosfosilicato de soda-cal capaz de se ligar ao osso vivo sem a formação de uma cicatriz na interface com o tecido. Essa composição sortuda foi apenas a primeira a ser descoberta numa família de vidros bioativos chamados biovidros. Entre eles, o chamado *bioglass* 45S5, cujas proporções são de 45% de SiO<sub>2</sub>, 24,5% de CaO, 24,5% de Na<sub>2</sub>O e 6% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (% em peso), é o mais bioativo, sendo capaz de ter uma boa ligação tanto com tecidos duros, quanto tecidos moles [27]. Sabe-se hoje que esse material é angiogênico [116][117], bacteriostático [118] e anti-inflamatório [119].

O desenvolvimento de uma ligação estável entre os vidros bioativos e o tecido ósseo mostra o envolvimento de uma sequência de reações com 11 etapas. As primeiras cinco etapas ocorrem na superfície do material e levam à cristalização de uma camada biologicamente reativa de hidroxiapatita (HA). HA é química e estruturalmente equivalente à fase mineral do osso e proporciona a interface de ligação com o tecido ósseo circundante. O índice de bioatividade do *bioglass* 45S5 é de 12,5, ao passo que a hidroxiapatita natural exibe índice de bioatividade de 3,1 [27]. Isso significa que enquanto o *bioglass* 45S5 leva cerca de 8 dias para que 50% de sua superfície esteja ligada às células do tecido, a hidroxiapatita leva cerca de 32 dias, sob as mesmas condições.

Deste ponto de vista, os estudos recentes têm demonstrado que os produtos iônicos da dissolução do vidro bioativo ativam e exercem um controle direto sobre os genes que regulam o ciclo dos osteoblastos [120]. A consequência clínica é o aumento da formação de osso novo com um rápido preenchimento do defeito ósseo. Isto quer dizer que quanto maior a solubilidade de um vidro bioativo, mais pronunciado o efeito sobre o crescimento ósseo.

Os processos de precipitação e cristalização da HA podem ser observados por meio de testes *in vitro*, que se baseiam em uma solução

acelular (fluido corporal simulado, SBF) com íons em concentrações que imitam o fluido humano extracelular [121].

Desde que foi descoberto, o *bioglass* 45S5 tem sido amplamente empregado para várias aplicações clínicas, incluindo dental, maxilo-facial e ortopedia [122]. Nos últimos anos o interesse de muitos investigadores tem se focado na possibilidade de usar vidros bioativos para o desenvolvimento de *scaffolds* para regeneração óssea [123].

Apesar dos excelentes resultados, uma característica do *bioglass* o impede de ser um material ainda melhor: suas propriedades mecânicas. Muitos esforços são feitos com a intenção de melhorar as propriedades mecânicas das cerâmicas bioativas. O biosilicato é resultado de um desses esforços.

Os estudos envolvendo o biosilicato tiveram início na década de 1990 com os trabalhos de doutorado de Peitl Filho [124], resultando em um depósito de patente no ano de 1997 [125]. O seu desenvolvimento na forma particulada em 2003 por Ravagnani e colaboradores [126] também resultou em um depósito de patente em nível internacional - Estados Unidos da América, Japão, China, Coréia, Rússia, Indonésia e Europa [127][128].

O biosilicato apresenta propriedades mecânicas superiores às dos vidros e outras vitrocerâmicas bioativas que se encontram atualmente disponíveis, já que pode se apresentar também na forma total ou parcialmente cristalizada, mantendo elevado índice de bioatividade [129][130] próximo ao do *bioglass*. Desta forma é possível afirmar que, excetuando-se as melhores propriedades mecânicas de sua versão cristalizada, o *bioglass* e o biosilicato são equivalentes. Alguns trabalhos, no entanto mostram um desempenho até melhor do biosilicato cristalino devido à sua maior solubilidade [129][130].

## **2.16 Testes de Bioatividade *in Vitro***

Alternativas aos testes *in vivo* vêm sendo constantemente pesquisadas por causa das dificuldades experimentais e os problemas éticos que os testes *in vivo* carregam. Diversos procedimentos *in vitro* foram propostos buscando

reproduzir, da maneira mais fiel possível, os processos observados *in vivo*. A maioria dos materiais bioativos desenvolvidos até o momento apresenta a capacidade de formar em sua superfície uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA) quando em contato com os tecidos vivos, o que lhes possibilita a ligação com o tecido ósseo [62]. Essa capacidade é o principal indicador de bioatividade e é isso que testes *in vitro* procuram avaliar.

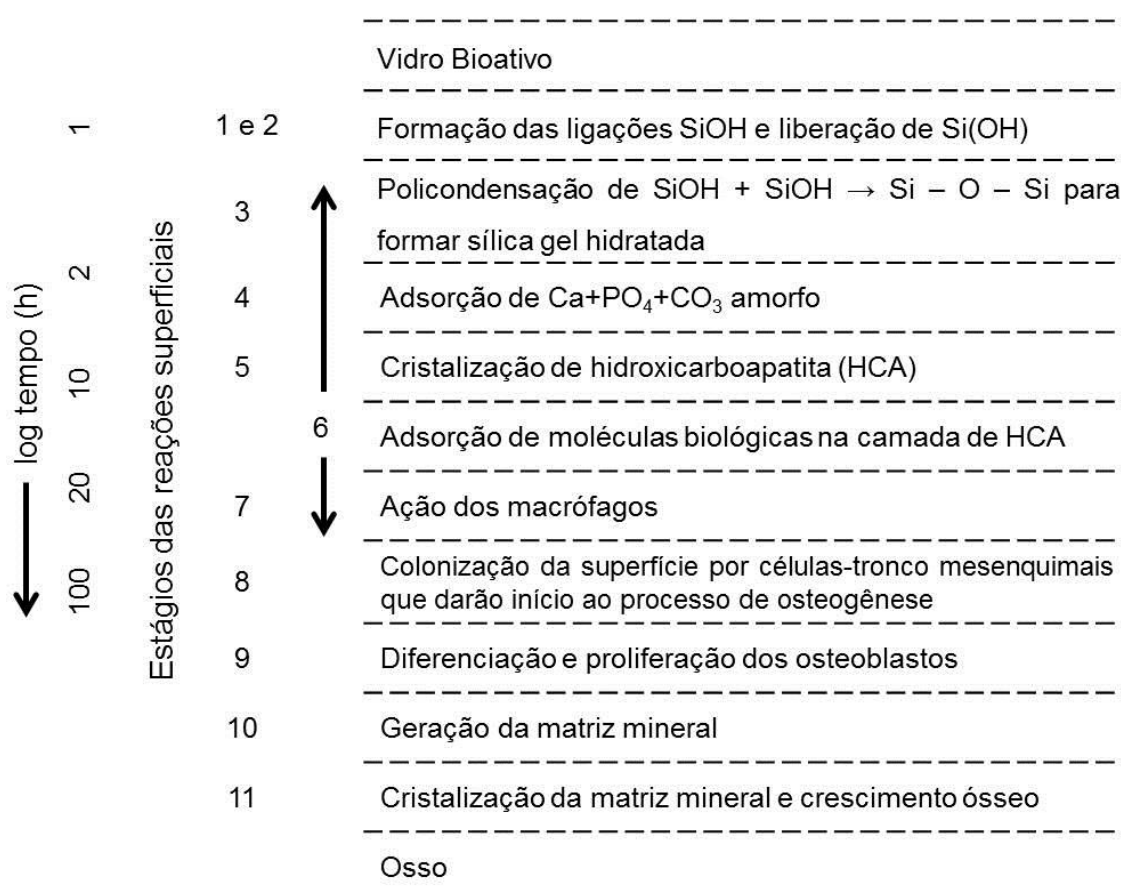
A solução atualmente aceita para os testes *in vitro* é a que foi desenvolvida no início da década de 1990 por Kokubo e colaboradores [131]. Ela está padronizada e é parte da norma ISO 23.317 (2007) “*Implants for surgery — In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials*”. A solução é denominada SBF (*Simulated Body Fluid* ou Fluido Corporal Simulado) e é acelular, livre de proteínas e apresenta um pH de 7,40. Possui concentração de íons semelhantes àsquelas que são encontradas no plasma sanguíneo humano, com a utilização adicional de tris (hidroximetil) aminometano, utilizado como agente tamponante. A Tabela 2.5 apresenta a composição dessa solução.

**Tabela 2.5** Concentração de íons (mM) na solução de SBF original e de acordo com a ISO 23.317, comparadas com a do plasma sanguíneo humano 0.

Íons	SBF Original	SBF (pH 7,4) ISO 23317	Plasma Sanguíneo (pH 7,2 até 7,4)
Na <sup>+</sup>	142,0	142,0	142,0
K <sup>+</sup>	5,0	5,0	5,0
Mg <sup>2+</sup>	1,5	1,5	1,5
Ca <sup>2+</sup>	2,5	2,5	2,5
Cl <sup>-</sup>	148,8	147,8	103,0
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4,2	4,2	27,0
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,0	1,0	1,0
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	-	0,5	0,5

## 2.17 Reatividade dos Biovidros

A reatividade da superfície original de vidros bioativos foi amplamente descrita por Hench [62] e Kokubo 0. A Figura 2.16 resume a sequência de reações com 11 etapas que acontecem na superfície de um vidro bioativo quando em contato com fluidos corporais.

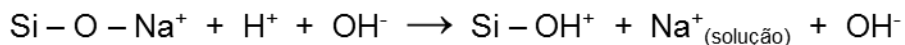


**Figura 2.16** As reações superficiais ocorrendo na interface biovidro/fluido corpóreo. Adaptado de Hench e West [62].

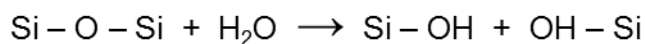
A sequência desses estágios apresentada de forma esquemática na Figura 2.16 pode ser descrita como segue:

- **Estágio 1** – Imediatamente após a exposição da superfície do biovidro aos fluidos corporais, ou da mesma forma ao SBF, começa a troca de

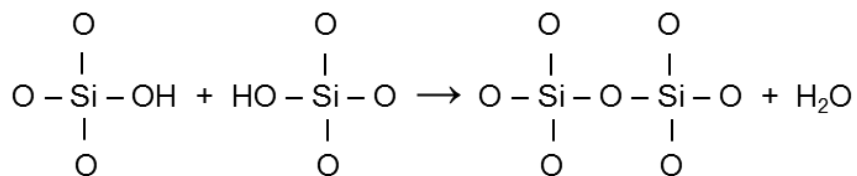
íons de sódio  $\text{Na}^+$  da superfície pelos íons de hidrogênio ( $\text{H}^+$  ou  $\text{H}_3\text{O}^+$ ) da solução. Esta reação cria uma superfície pobre em álcalis, cuja carga líquida passa a ser negativa. Este estágio é controlado pelos processos de difusão e exibe uma dependência temporal na forma de  $t^{-1/2}$ . A reação que ocorre neste primeiro estágio é a seguinte:



- **Estágio 2** – As ligações do tipo  $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$  começam a se romper e ocorre a formação de novas ligações entre  $\text{Si}$  e  $\text{OH}$  (silanóis) na interface biovidro/fluido corpóreo. Como consequência, a superfície começa a perder sílica na forma de  $\text{Si}(\text{OH})_4$  para a solução. Esse estágio é geralmente controlado pelas reações interfaciais e mostra uma dependência do tempo na forma de  $t^{1.0}$ . A reação que ocorre neste segundo estágio é representada da seguinte forma:



- **Estágio 3** – Nesta etapa ocorre o início da condensação e repolimerização de uma camada rica em  $\text{SiO}_2$  na superfície pobre em álcalis e alcalinos terrosos da seguinte maneira:

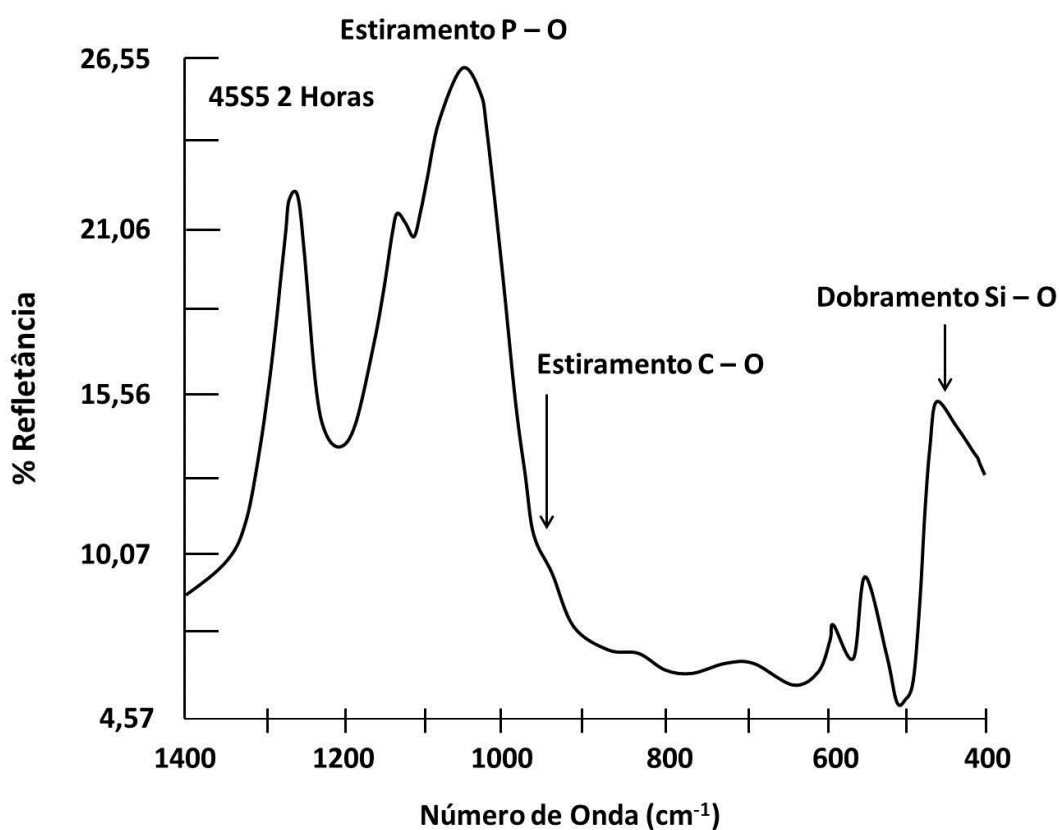


- **Estágio 4** – Neste estágio ocorre a migração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  do vidro para sua superfície através da camada rica em  $\text{SiO}_2$  formando um filme fino rico em  $\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5$  no topo dessa camada. O processo continua com o crescimento desse filme amorfo pela incorporação de cálcio solúvel e fosfato oriundos da solução.



- **Estágio 5** – Aqui o filme amorfo de  $\text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5$  cristaliza-se no momento da incorporação de  $\text{OH}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ , ou ânions de flúor da solução para formar uma camada mista de hidroxila, carbonato e fluorapatita, a chamada hidroxiapatita carbonatada (HCA). Essa fase é a mesma formada em condições fisiológicas no processo de reparação óssea.

Em vidros com bioatividade classe A essas cinco etapas se completam em menos de duas horas, como mostra a Figura 2.17.



**Figura 2.17** Espectro de infravermelho da superfície do *bioglass* 45S5 após duas horas em SBF a 37°C. Os dois picos associados à ligação P - O indicam a presença da apatita cristalina enquanto o pequeno pico associado a C - O indica a incorporação de ânions carbonatos pela rede da apatita. Isto indica a presença de uma fina camada de HCA que após 10 horas poderá chegar a 4  $\mu\text{m}$  de espessura e dominar todo espectro de infravermelho. Adaptado de Hench e Wilson [132].

Simultaneamente às quatro primeiras etapas de reação ocorre a adsorção de proteínas e de outras moléculas biológicas, o que contribui para a natureza biológica da camada de HCA. Entre 3 e 6 horas *in vitro*, esta camada de fosfato irá se cristalizar na camada de HCA. Esta fase é química e estruturalmente idêntica à natural e exatamente por esse motivo os tecidos do corpo são capazes de se ligar diretamente a ela.

As etapas de 6 a 11 completam o processo de cicatrização da região em recuperação e são descritas a seguir:

- **Estágio 6** – Tem início a adsorção de moléculas orgânicas nos defeitos superficiais da camada de HCA ou nas partes ainda expostas da camada de sílica-gel negativamente carregadas.

- **Estágio 7** – Inicia-se a ação dos macrófagos.

- **Estágio 8** – Combinação da superfície com as células mesenquimais que darão início ao processo de osteogênese.

- **Estágio 9** – Diferenciação das células mesenquimais em células osteogênicas, como os osteoblastos.

- **Estágio 10** – Geração da matriz mineral.

- **Estágio 11** – Cristalização da Matriz.

As reações na superfície que dão origem à camada de HCA e a contínua incorporação de espécies como proteínas e outros compostos a essa camada permitem que, no momento em que as células osteogênicas - como os osteoblastos - se infiltram na região do defeito ósseo, o que normalmente leva entre 24 a 72 horas, elas vão encontrar uma superfície similar à do osso, inclusive com os componentes orgânicos incorporados, e não um material estranho.

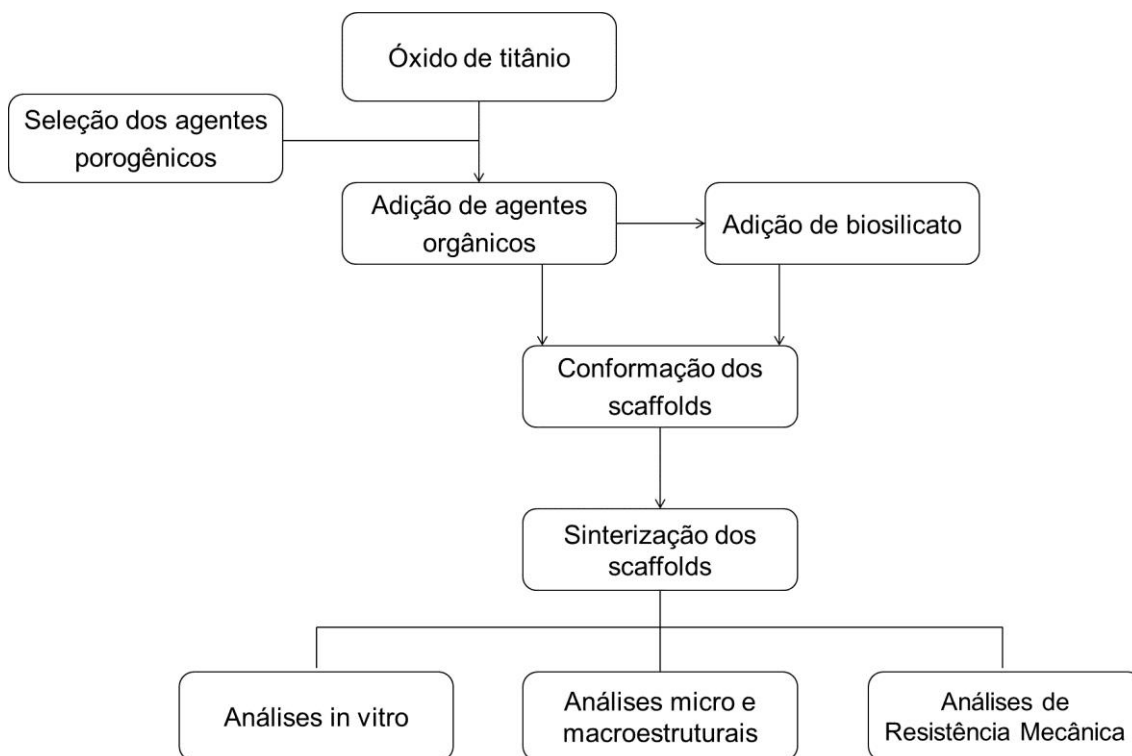
Assim, é por esta sequência de eventos que o vidro bioativo viabiliza o processo de reparação acelerando a criação de uma ligação direta do material com os tecidos.

A força de ligação interfacial da maioria das cerâmicas bioativas em uso clínico é equivalente ou superior a do tecido ósseo ao qual elas se ligam, pois as fraturas ocorrem sempre no osso ou na cerâmica e nunca na interface [62]. Esse fato é que diferencia os materiais bioativos de todos os demais.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para obter *scaffolds* bioativos de óxido de titânio, pastilhas de óxido de titânio e biosilicato foram manufaturadas com a incorporação de partículas orgânicas para a formação de poros. Os corpos porosos foram avaliados quanto às características de porosidade, bioatividade e resistência mecânica à compressão.

Este trabalho teve como ideia principal reunir as propriedades mecânicas e biocompatíveis do óxido de titânio e associá-las com as propriedades de bioatividade do biosilicato. A manufatura dos *scaffolds* foi feita por meio da mistura dos componentes na forma de pó, seguida de compactação por prensagem uniaxial e sinterização. Para tanto, diversos agentes orgânicos foram testados antes da adição do biosilicato. O diagrama de fluxo da metodologia empregada neste trabalho é ilustrado na Figura 3.1.



**Figura 3.1** Diagrama de fluxo das atividades realizadas.

### 3.1 Óxido de Titânio

Como principal componente estrutural dos *scaffolds* foi utilizado o óxido de titânio da marca VETEC com 99,5% de pureza. Este material em pó foi utilizado com a mesma granulometria com a qual foi adquirido e para sua caracterização foram realizadas as seguintes análises:

- Difração de raios x para determinação das fases presentes após a sinterização a 1500°C do pó compactado. A análise foi feita no equipamento Siemens D5005 e a identificação de fases propriamente dita foi realizada utilizando o banco de dados JCPDS.
- Picnometria de gás hélio para determinação da densidade real no equipamento Ultrapycnometer 1000 da Quantachrome.
- Distribuição de tamanho de partículas via sedimentação para determinação do tamanho médio de partículas no equipamento Sedigraph 5000ET da Micromeritics.
- BET para determinação da área superficial no equipamento Micromeritics ASAP 2020 V3.2H.

### 3.2 Seleção de Agentes Porogênicos

Uma grande variedade de agentes formadores de poros tem sido empregada na fabricação de cerâmicas macroporosas, incluindo materiais orgânicos naturais, e sintéticos, líquidos, sais e até mesmo metais [79]. Idealmente os agentes formadores de poros devem possuir baixo coeficiente de expansão térmica, serem facilmente removíveis, não gerarem gases tóxicos e não deixarem resíduos que possam afetar negativamente a bioatividade do *scaffold*.

Dos diversos agentes possíveis de serem utilizados, foram selecionados para testes preliminares os seguintes: esponja vegetal, serragem de madeira, polietileno, poliuretano, gelatina, dextrina e carboximetilcelulose.

### 3.2.1. Esponja Vegetal

Esponja vegetal do tipo *Luffa cylindrica* foi escolhida como um possível agente formador de poros no  $\text{TiO}_2$  pois é um material abundante, de fonte renovável, biodegradável, de baixo custo e com forte apelo ecológico [133].

A esponja de *Luffa*, com densidade de  $0,92 \text{ g/cm}^3$  [134] foi cortada com o auxílio de uma tesoura em pedaços retidos na peneira de malha 30 mesh da série Tyler (0,6 mm). Este material possui perda de massa até a temperatura de  $580^\circ\text{C}$  [134].

### 3.2.2. Poliuretano

As esponjas de poliuretano são bastante utilizadas na conformação de cerâmicas macroporosas para aplicações médicas pelo método de réplica. Neste caso foi utilizado o poliuretano em pó da marca WEG com tamanho de partículas entre 0,25 e 0,42 mm. Sua densidade aparente encontrada na literatura é de  $1,20 \text{ g/cm}^3$  e sua perda de massa ocorre até aproximadamente  $420^\circ\text{C}$  [135].

### 3.2.3. Gelatina

A gelatina possui composição química quase idêntica ao colágeno e sua seleção como material de *scaffolds* vem sendo relatada como vantajosa, podendo contornar as preocupações de imunogenicidade e transmissão de agentes patógenos associadas com colágeno [136]. Neste trabalho foi utilizada gelatina industrial da marca Royal com tamanho de partículas entre 0,42 e 0,60 mm. A densidade encontrada para este material é de aproximadamente  $1,3 \text{ g/cm}^3$  e apresenta perda de massa considerável até  $440^\circ\text{C}$  [137].

### 3.2.4. Serragem

A escolha de serragem de madeira é interessante do ponto de vista ambiental, já que é um resíduo gerado em grandes quantidades e sem destino específico.

Inicialmente, apenas a variedade cambará (*Qualea* sp.), com densidade reportada na literatura de  $0,70 \text{ g/cm}^3$  [138], foi utilizada nos testes com serragem para a manufatura dos *scaffolds*. A serragem, obtida num comércio de São Carlos – SP, foi peneirada e a faixa granulométrica retida entre as peneiras 50 e 30 mesh da série Tyler (entre 0,30 e 0,60 mm) foi escolhida. Em seguida, a serragem foi umedecida com água na proporção 1:1 em peso.

Após os testes iniciais, serragens de pinus (*Pinus* sp.), jequitibá (*Cariniana* sp.) e cedro (*Cedrela* sp.) foram também utilizadas na manufatura de *scaffolds* para verificar se alguma diferença em termos de porosidade seria observada entre eles. A densidade encontrada para essas serragens é de  $0,48 \text{ g/cm}^3$  [139],  $0,67 \text{ g/cm}^3$  [140] e  $0,55 \text{ g/cm}^3$  [141], respectivamente. Da mesma forma como foi feito com a serragem de cambará, estes materiais foram peneirados separadamente.

As curvas termogravimétricas das serragens são muito semelhantes, com faixas de temperatura de perda de massa muito próximas. A estabilização da perda de massa da serragem de pinus acontece até os  $450^\circ\text{C}$  [142].

### 3.2.5. Polietileno

O polietileno utilizado como formador de poros possuía ultra alto peso molecular (PEUAPM ou UHMWPE) e foi fornecido pela empresa Baumer. O PEUAPM é um polietileno de alta densidade ( $0,94 \text{ g/cm}^3$ ) branco e opaco, com uma temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) que varia entre  $-100^\circ\text{C}$  e  $-125^\circ\text{C}$  e uma temperatura de fusão ( $T_m$ ) de  $135^\circ\text{C}$  [143]. Por ser quase totalmente

inerte, este polímero não apresenta riscos para uso em aplicações biológicas. Apresenta perda de massa até aproximadamente 480°C [144].

O polietileno, que se apresentava em blocos, foi triturado e moído em moinho criogênico até atingir tamanhos entre 0,3 e 0,6 mm (peneiras de malha 50 e 30 mesh, respectivamente).

### **3.2.6. Carboximetilcelulose**

Carboximetilcelulose é um dos derivados de celulose solúveis em água, que tem imensa aplicação no campo alimentício e farmacêutico devido à sua viscosidade, não toxicidade e natureza hipoalergênica [145]. Sua perda de massa se estabiliza na temperatura de 500°C [146].

Para este desenvolvimento foi utilizado um pó fino de CMC do laboratório Sigma – Aldrich – C 5678 com densidade 1,59 g/cm<sup>3</sup> que foi umedecido com água na proporção 1:1 em peso.

### **3.2.7. Dextrina**

A dextrina é um hidrato de carbono simples, com um peso molecular baixo. É amplamente utilizada na indústria, devido à sua não toxicidade e seu baixo preço, e o fato de se tornar pegajosa após a adição de água faz com que seja um ótimo ligante em aplicações cerâmicas. Análises térmicas realizadas revelaram que a dextrina apresenta perda acentuada de massa até a temperatura aproximada de 320°C [147].

Foi utilizada dextrina do laboratório Nitrogenius – AMIDEX com densidade de 0,6 g/cm<sup>3</sup>. Este material se encontrava na forma de um pó bastante fino.

### 3.3 Biosilicato

O biosilicato utilizado não precisou ser produzido especificamente para esse trabalho. Ele foi adquirido do Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) da UFSCar, que possuía quantidades suficientes para atender às demandas desta pesquisa. Além da densidade de  $2,79 \text{ g/cm}^3$  [148] diversas outras caracterizações foram realizadas neste material em trabalhos anteriores [153].

O biosilicato disponível encontrava-se na forma de pó e foi moído em almofariz de ágata exclusivo para moagem de biovidros. Após a moagem foi peneirado a seco com o auxílio de pincel macio tipo “pelo de marta” e malhas de peneiras de náilon com abertura de  $38 \mu\text{m}$ .

### 3.4 Manufatura dos Scaffolds de $\text{TiO}_2$

Na tentativa de preparação dos primeiros *scaffolds* foram realizadas diversas misturas do óxido de titânio com os diferentes agentes porogênicos escolhidos, utilizando dextrina e água como ligantes. Em seguida as misturas foram prensadas uniaxialmente e queimadas em duas etapas, sendo a primeira etapa necessária para a eliminação dos agentes porogênicos e a segunda etapa essencial para a sinterização do óxido de titânio.

Para as composições iniciais, foram adicionados agentes porogênicos nas proporções mostradas na Tabela 3.1. O restante do volume era composto quase exclusivamente por óxido de titânio, com uma pequena fração de dextrina e água para auxiliar o processo de prensagem. Os agentes orgânicos foram adicionados ao  $\text{TiO}_2$  em quantidades diferentes devido à diferença de densidade entre eles, que fez com que alguns ocupassem um volume muito maior do que outros.

Os componentes foram misturados homogeneamente com o auxílio de um béquer e uma espátula. Após a mistura, as composições foram passadas por uma peneira de náilon com abertura de  $0,6 \text{ mm}$  para garantir que qualquer aglomerado que tivesse se formado fosse desfeito.



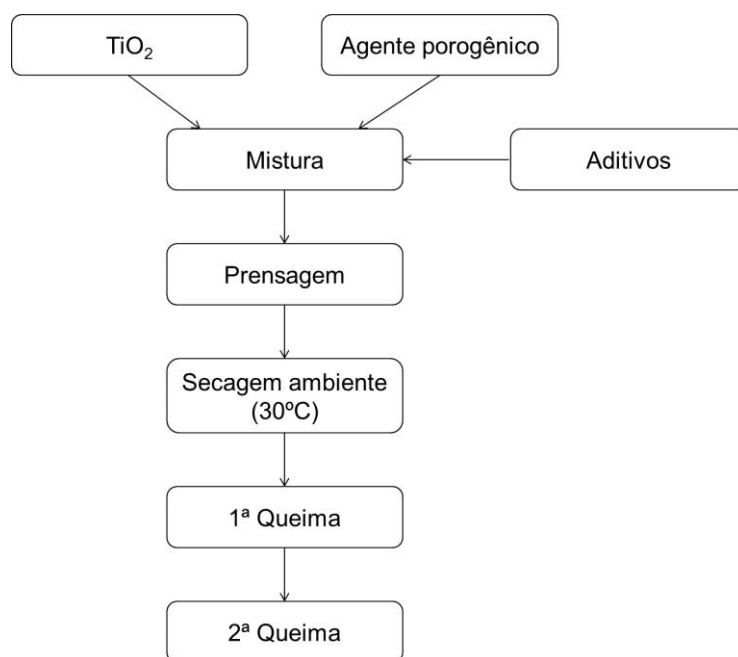
**Tabela 3.1** Tipo e quantidade de agentes porogênicos utilizados na tentativa de fabricação dos primeiros *scaffolds*.

Composições	Tipo de porogênico	Quantidade de porogênico (% vol.)
COMPOSIÇÃO A	Esponja Vegetal	40
COMPOSIÇÃO B	Poliuretano	40
COMPOSIÇÃO C	Gelatina	60
COMPOSIÇÃO D	Serragem Cambará	60
COMPOSIÇÃO E	Polietileno	60
COMPOSIÇÃO F	CMC	70
COMPOSIÇÃO G	Dextrina	75

As misturas foram colocadas em um molde cilíndrico de aço de 15 mm de diâmetro em quantidades suficientes para obter pastilhas com 6 mm de espessura. Em seguida, foi feita a prensagem em prensa pneumática durante 10 s, utilizando-se pressões de 45, 70 e 90 MPa. Este procedimento foi realizado no Laboratório de Ensino de Cerâmica do DEMa/UFSCar.

A secagem das pastilhas foi feita em temperatura ambiente durante 24h, e depois deste período as mesmas foram levadas para queima e sinterização, conforme descrito no item 3.6. O fluxograma do processo todo pode ser visto na Figura 3.2.

Após os testes iniciais, os agentes porogênicos que produziram as amostras com facilidade de processamento e manutenção do formato e estrutura foram escolhidos para dar continuidade ao trabalho. Para obter a porosidade desejada, diferentes quantidades destes materiais foram utilizadas para a obtenção dos *scaffolds*. Para auxiliar o processo de conformação e obtenção de poros, CMC úmido foi também adicionado em cada mistura em proporções que variaram. A manufatura das pastilhas foi feita da mesma maneira já descrita neste subcapítulo. Para a definição da curva de queima, análises termogravimétricas foram realizadas nos materiais orgânicos envolvidos nesta etapa.



**Figura 3.2** Fluxograma do processo de manufatura dos scaffolds.

### 3.5 Manufatura dos *Scaffolds* de $\text{TiO}_2$ e Biosilicato

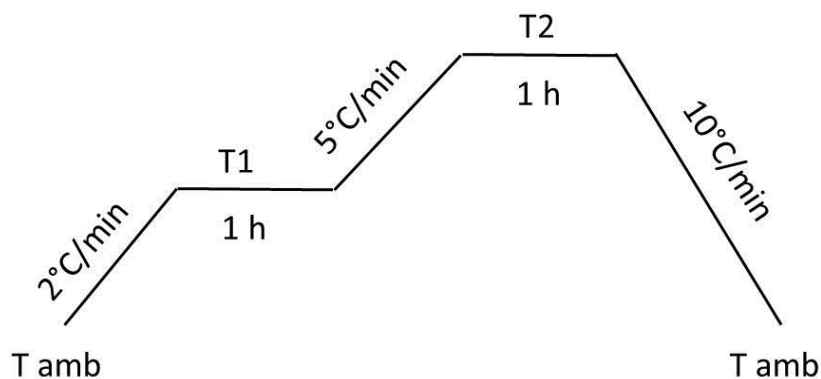
Os *scaffolds* de  $\text{TiO}_2$  e biosilicato foram preparados pela adição de 10% em peso de biosilicato em pó (com relação à quantidade de  $\text{TiO}_2$ ) na mistura de  $\text{TiO}_2$  e agentes porogênicos. Em seguida foram manufaturadas pastilhas, conforme item 3.4, que foram caracterizadas posteriormente.

### 3.6 Curva de Queima

A queima das pastilhas foi realizada em 3 estágios em forno mufla, que podem ser mais bem visualizados no esquema mostrado na Figura 3.3.

No primeiro estágio as pastilhas foram aquecidas a uma taxa de aquecimento de  $2^\circ\text{C}/\text{min}$  até a temperatura necessária para degradação e remoção dos agentes porogênicos ( $T_1$ ), na qual permaneceram por 1 hora. Em seguida, no segundo estágio as pastilhas continuaram sendo aquecidas com uma taxa de  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  até a temperatura de sinterização mais adequada para o

TiO<sub>2</sub> (T2), de forma a obter uma estrutura porosa e consistente. Na temperatura de sinterização as amostras foram mantidas por 1 hora. No último estágio ocorreu o resfriamento a 10°C/min até a temperatura ambiente.



**Figura 3.3** Estágios de queima das pastilhas para obtenção dos *scaffolds* (Tamb: temperatura ambiente; T1: temperatura de remoção dos agentes porogênicos; T2: temperatura de sinterização do TiO<sub>2</sub>).

### 3.7 Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica (ATG) determina a variação de massa de um material em função da temperatura e do tempo, sob um controle de temperatura programado. A fim de definir a melhor estratégia de remoção dos agentes porogênicos escolhidos na primeira etapa de fabricação dos corpos porosos (serragem e polietileno), análises termogravimétricas foram realizadas. Por ATG determinou-se a faixa de temperatura na qual estes componentes são removidos, auxiliando desta forma à correta programação da curva de queima dos *scaffolds*.

As análises foram realizadas no equipamento de análise térmica (Netzsch STA 409) do Laboratório de Solidificação do DEMa/UFSCar. Foram utilizados cadinhos de platina (amostra e referência), atmosfera inerte de argônio e taxa de aquecimento de 5°C/min da temperatura ambiente até aproximadamente 1000°C.

### 3.8 Densidade Aparente, Porosidade Aparente e Porosidade Total

Após a sinterização das pastilhas foram calculadas a densidade e a porosidade aparente das amostras pelo método de densidade por imersão, baseado no princípio de Arquimedes (ASTM C373-88, 1999), utilizando uma balança Mettler Toledo, modelo AB 204 e aparato de suporte de becker e bandeja disponibilizado pelo Laboratório de Ensino de Cerâmica do DEMa/UFSCar.

Três amostras de cada tipo foram pesadas obtendo-se a massa seca ( $M_s$ ) de cada uma. Posteriormente as amostras foram imersas em água ou álcool isopropílico por 24 horas, para em seguida serem determinadas a massa imersa ( $M_i$ ) e a massa úmida ( $M_u$ ). Com estes dados foi possível calcular a porosidade aparente ( $P_{ap}$ ) e a densidade aparente ( $D_{ap}$ ) por meio das equações 3.1 e 3.2, respectivamente. Os valores obtidos representam a média aritmética de três amostras para cada condição.

$$P_{ap} = \frac{(M_u - M_s)}{(M_u - M_i)} \times 100 \quad 3.1$$

$$D_{ap} = \frac{M_s}{(M_u - M_i)} \times \rho_L \quad 3.2$$

onde  $\rho_L$  é a densidade do líquido (no caso a água ou álcool isopropílico).

Conhecendo-se a densidade aparente do *scaffold* ( $D_{ap}$ ), é possível calcular sua porosidade total ( $P_T$ ) por meio das equações 3.3 e 3.4.

$$P_T = 100 - (\%TiO_2) \quad 3.3$$

onde  $\%TiO_2$  é a porcentagem de  $TiO_2$  no *scaffold*.

A porcentagem de  $TiO_2$  é definida como:

$$\%TiO_2 = \frac{D_{ap}}{D_{TiO_2}} \times 100 \quad 3.4$$

onde  $D_{ap}$  é a densidade aparente do *scaffold* e  $D_{TiO_2}$  é a densidade teórica do  $TiO_2$ .

### 3.9 Estereomicroscopia

As análises via estereomicroscopia foram realizadas para observação da superfície externa dos *scaffolds* obtidos. Para isso foi utilizado o equipamento da marca Leica, modelo MZ12 com sistema de iluminação do tipo “pescoço de ganso” do Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais (CCDM) da UFSCar.

### 3.10 Microscopia Eletrônica de Varredura

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para observações da microestrutura dos *scaffolds*, incluindo tamanho, formato e interconectividade dos poros. Além disso, foi possível observar a distribuição do biosilicato na matriz de  $TiO_2$  e as microestruturas finais após os testes de bioatividade *in vitro*. Por meio do espectrômetro de energia dispersiva (EDS) acoplado ao MEV, microanálises pontuais de diversas regiões puderam ser realizadas.

Os *scaffolds* tiveram suas superfícies externa e de fratura observadas por MEV. Para a observação da região interna (região da fratura) os *scaffolds* foram fraturados embutidos à vácuo em resina epóxi de baixa viscosidade (Epoxicure<sup>TM</sup> – Buehler). Em seguida as amostras foram desbastadas e polidas com lixas de carbetto de silício na sequência de #400, #600 e #1200 mesh e,

por fim, pasta de diamante de 0,5  $\mu\text{m}$ . Tanto no caso da observação da superfície externa quanto da superfície de fratura as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro por *sputtering*.

Foram utilizados os microscópios eletrônicos de varredura TMP Philips (XL-30) e FEG Philips (XL-30) acoplado com EDS Oxford Instruments do Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) da UFSCar. Além destes, o microscópio FEI (PHENON™) Do Laboratório de Materiais Vítreos (LAMA V) da UFSCar também foi usado neste estudo.

### 3.11 Resistência à Tração por Compressão Diametral

O ensaio mecânico de resistência à tração por compressão diametral foi realizado baseado na norma ABNT NBR 7222:2011 a fim de comparar as diferenças de valores entre *scaffolds* com diferentes porosidades e fabricados com ou sem a adição de biosilicato.

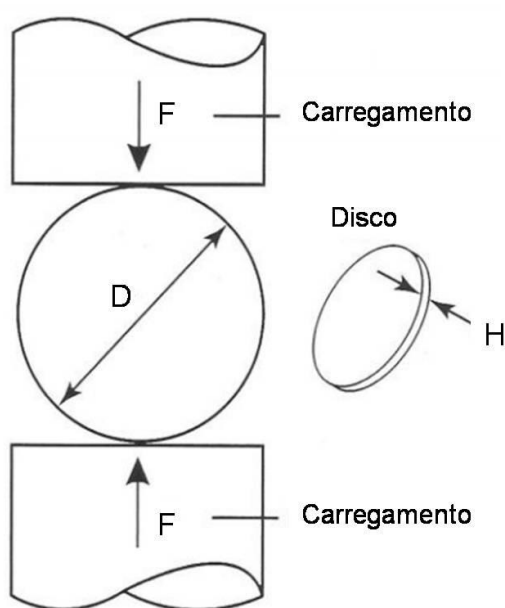
Para este ensaio foram confeccionados pastilhas cilíndricas de 15 mm de diâmetro e 5 mm de espessura da mesma forma como descrito no item 3.4. Foram ensaiadas 3 pastilhas de cada conjunto de amostras na máquina universal de ensaios Instron 5500R, do Laboratório de Propriedades Mecânicas do Dema/UFSCar, e o resultado foi obtido através da média aritmética dos corpos-de-prova. As amostras foram posicionadas no equipamento de forma que a aplicação de carga ocorresse diametralmente. A velocidade de aplicação da carga foi de 1,3 mm/min. O ensaio foi conduzido até o momento em que o posicionamento da amostra, alterado pela aplicação da carga, não comprometesse os resultados.

A resistência à compressão diametral pode ser calculada pela Equação 3.5:

$$\sigma_R = \frac{2F}{100\pi DH} \quad 3.5$$

onde  $\sigma_R$ : resistência à tração(MPa); F: carga de ruptura (N); D: diâmetro do corpo-de-prova(cm); H: altura do corpo-de-prova (cm).

A Figura 3.4 mostra esquematicamente o ensaio de compressão diametral.



**Figura 3.4** Ensaio de compressão para corpo-de-prova cilíndrico.

### 3.12 Testes de Bioatividade *in Vitro*

Os testes de bioatividade *in vitro* foram realizados para verificar a possibilidade e velocidade de formação de HCA na superfície dos *scaffolds* de  $TiO_2$  e biosilicato e também nos *scaffolds* compostos apenas por  $TiO_2$ . Estes testes tiveram como base a exposição dos materiais à solução de SBF descrita por Kokubo [131].

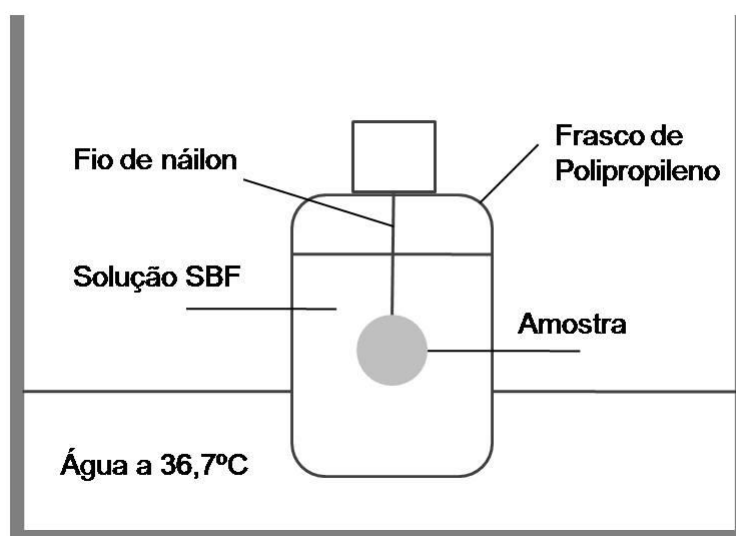
Para a realização dos testes foram conformadas pastilhas com 3 mm de espessura. Estas pastilhas foram limpas em álcool isopropílico absoluto (QHEMIS – P.A.) permanecendo em limpador ultrasônico por 1 minuto. Após a secagem elas foram amarradas com fios de náilon de 0,10 mm e suspensas no

interior de pequenos frascos de polipropileno contendo a solução de SBF. A vedação destes frascos é importante para evitar a evaporação da solução e mudanças em sua concentração.

O preparo do SBF é um processo delicado e seguiu uma sequência rigorosa de passos, conforme descrito na norma ISO 23.317 (2007), evitando que qualquer precipitação de sais ocorresse. A razão entre a área superficial das pastilhas e o volume da solução SBF foi padronizada em  $0,1 \text{ cm}^{-1}$ , já que um aumento desta razão leva a um aumento excessivo da velocidade das reações devido ao aumento do pH da solução durante a reação [131].

Os frascos contendo as pastilhas suspensas e a solução de SBF foram então colocados em banho-maria a uma temperatura de  $36,7^\circ\text{C}$  ( a mesma do corpo humano), onde permaneceram por tempos variando entre 1, 4 e 12 dias. Para isso, foi utilizado o banho-maria Nova Técnica modelo CT 269 com controle rigorosa de temperatura (controlador Gefran 500), com variação de temperatura de  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ . A Figura 3.5 mostra o esquema utilizado no teste de bioatividade.

Após a exposição ao SBF as amostras foram retiradas do frasco e mergulhadas em acetona para a paralisação das reações. Em seguida, foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura para detectar ou não a formação da camada de HCA em meio a microestrutura típica dos *scaffolds*.



**Figura 3.5** Esquema utilizado nos testes de bioatividade.

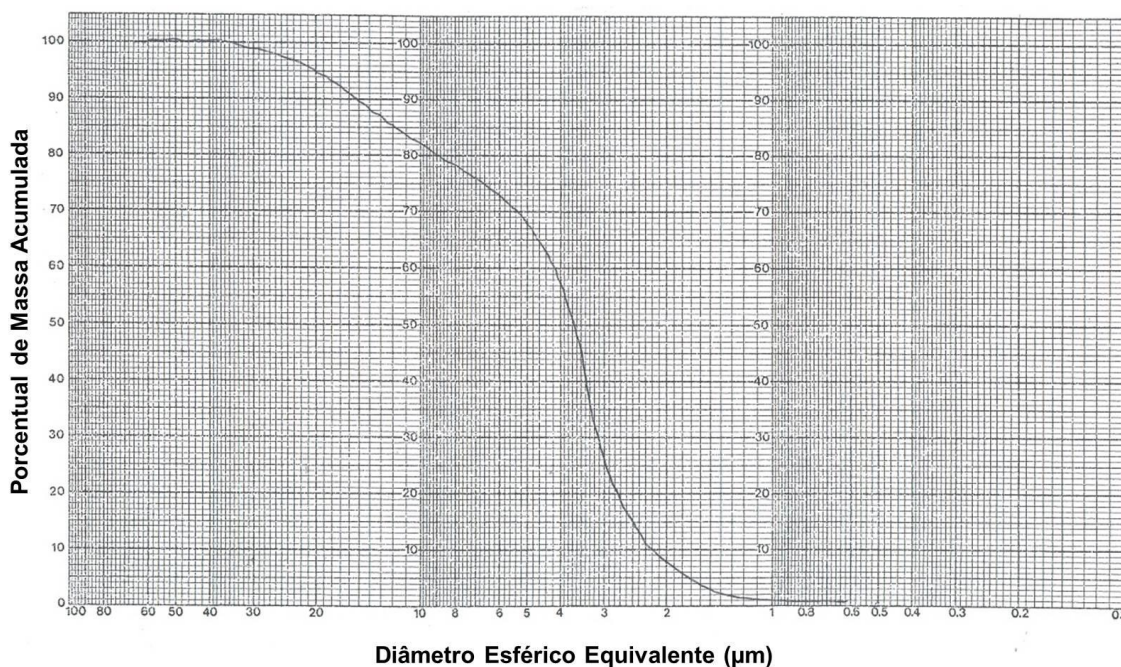


## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As metodologias descritas no capítulo anterior foram aplicadas na confecção de *scaffolds* de óxido de titânio e biosilicato. O desenvolvimento e o processo de fabricação dos *scaffolds* visaram à obtenção de poros com morfologia adequada para facilitar o crescimento de tecidos vivos em seu interior, resistência mecânica para manuseio e aplicações *in vivo*, e bioatividade para promover interação célula-implante.

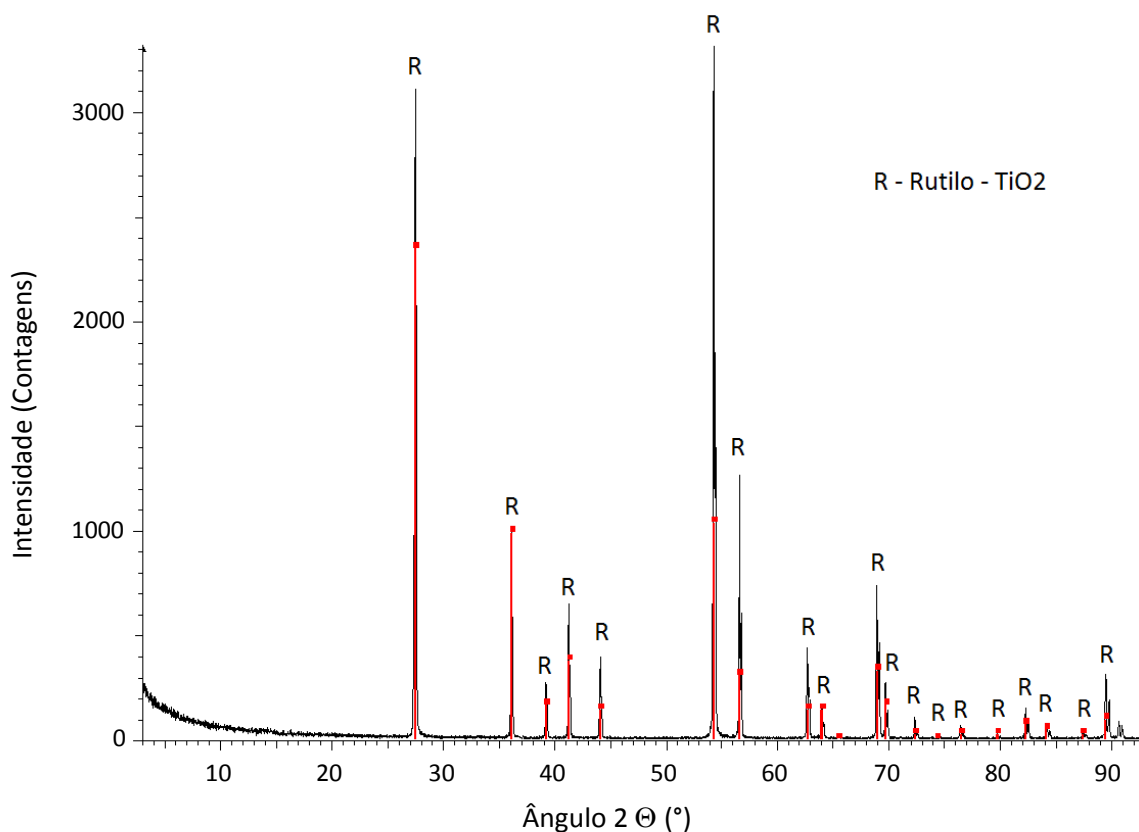
### 4.1 Caracterização do Óxido de Titânio

A curva de distribuição de tamanho de partículas do  $\text{TiO}_2$  foi obtida por sedimentação e é mostrada na Figura 4.1. O valor encontrado para o diâmetro médio de partículas foi de  $3,65 \pm 0,01 \mu\text{m}$ .



**Figura 4.1** Distribuição de tamanho de partículas do  $\text{TiO}_2$  utilizado para preparação dos *scaffolds*.

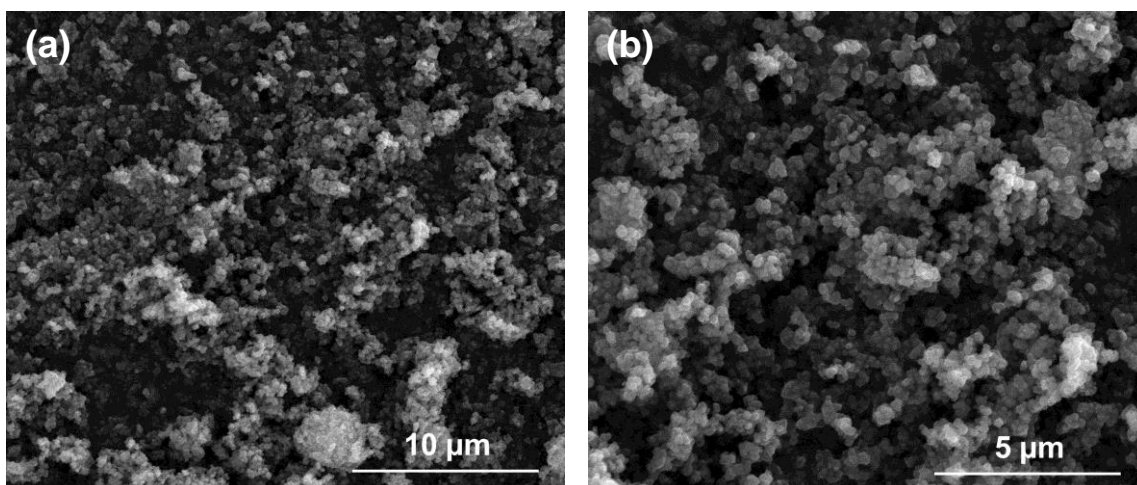
A difração de raios x do  $\text{TiO}_2$  compactado e sinterizado a  $1500^\circ\text{C}$  revelou o rutilo como única fase cristalina presente no material, como pode ser observado no difratograma mostrado na Figura 4.2.



**Figura 4.2** Difratograma do óxido de titânio mostrando o rutilo como única fase presente.

A densidade do pó de óxido de titânio foi determinada por picnometria de gás hélio e apresentou como resultado o valor de  $4,077 \pm 0,003 \text{ g/cm}^3$ . Já a análise pelo método de BET determinou um valor de área superficial específica de  $6,612 \text{ m}^2/\text{g}$ .

A morfologia do pó de óxido de titânio foi obtida no microscópio eletrônico de varredura (MEV) e pode ser vista na Figura 4.3. Nas imagens é possível observar que as partículas do pó de  $\text{TiO}_2$  possuem morfologia bem uniforme apesar da presença de aglomerados.



**Figura 4.3** Distribuição e morfologia do pó de óxido de titânio visualizados no MEV com aumento de (a) 10.000x e (b) 20.000x.

## 4.2 Preparação das Composições Iniciais

Na tentativa de fabricar os primeiros *scaffolds* foram preparadas misturas contendo  $\text{TiO}_2$  e os compostos orgânicos seguintes: esponja vegetal, poliuretano, gelatina, serragem de camarão, polietileno, CMC e dextrina. Estas misturas foram compactadas com pressões que variaram entre 45, 70 e 90 MPa, de forma que a condição mais adequada de prensagem fosse determinada.

Para o processo de queima dos corpos-de-prova, dois patamares de temperatura foram utilizados, como especificado no item 3.6. O primeiro patamar foi definido de acordo com as temperaturas limites nas quais ocorre a remoção dos agentes orgânicos. Estas variaram de  $320^\circ\text{C}$ , no caso da dextrina, até  $580^\circ\text{C}$ , para a esponja vegetal. Desta forma, para garantir que todos os compostos porogênicos fossem removidos, a temperatura do primeiro patamar foi fixada em  $580^\circ\text{C}$ . A temperatura do segundo patamar foi escolhida como  $1500^\circ\text{C}$  para garantir a completa sinterização do  $\text{TiO}_2$ .

Assim, os primeiros resultados obtidos foram essenciais para definir o melhor agente orgânico a ser utilizado e as condições da conformação por prensagem e queima para a fabricação dos *scaffolds* almejados.

No caso das misturas contendo esponja vegetal e gelatina, as amostras preparadas (pastilhas ou discos) não mantiveram a geometria da conformação, tornando-se somente um amontoado de pós após os processos de queima à 1500°C. Apesar da preparação das pastilhas ter sido realizada com pressões variando entre 45, 70 e 90 MPa e serem queimadas na faixa típica de sinterização do TiO<sub>2</sub> nenhuma pastilha manteve a estrutura intacta após a queima. O motivo para este acontecimento pode estar relacionado com as características físicas dos agentes porogênicos, como por exemplo, a granulometria grosseira (grãos maiores que 0,60 mm para a esponja e entre 0,42 e 0,60 mm para a gelatina), com a quantidade utilizada, ou ainda com as características químicas, já que durante a queima estes materiais estavam propensos a liberar um excesso de gases suficiente para abalar a estrutura da cerâmica de TiO<sub>2</sub>.

Com as pastilhas preparadas a partir da mistura contendo poliuretano foram obtidas estruturas consistentes após a queima. As pressões utilizadas na prensagem não causaram deformações nas pastilhas, entretanto, é possível que mesmo a menor pressão utilizada tenha sido excessiva ou a quantidade de poliuretano utilizada tenha sido baixa, pois as pastilhas conformadas se apresentaram mais compactas do que as conformadas com os demais materiais porogênicos, de forma que não foram observados poros a olho nu nas superfícies das pastilhas obtidas. Também é possível que a granulometria apresentada pelo poliuretano fosse muito fina (grãos entre 0,25 e 0,42 mm) para o uso deste material como agente porogênico nos *scaffolds* em questão.

As pastilhas fabricadas a partir das composições com dextrina e CMC também apresentaram estruturas consistentes após a queima. Entretanto, o CMC e a dextrina se mostraram muito difíceis de conformar, já que quando misturados com água revelam características de goma e ficam pegajosos, sendo de difícil dispersão homogênea no pó de TiO<sub>2</sub>. Além disso, como as partículas destes orgânicos se deformam facilmente, as pastilhas se apresentaram muito assimétricas devido à deformação ocorrida durante a ejeção da matriz de prensagem. Assim, apesar de possível a obtenção de corpos porosos utilizando dextrina e CMC como agentes porogênicos, a

dificuldade no processamento excluiu a possibilidade destes materiais serem os principais formadores de poros dos *scaffolds* desejados.

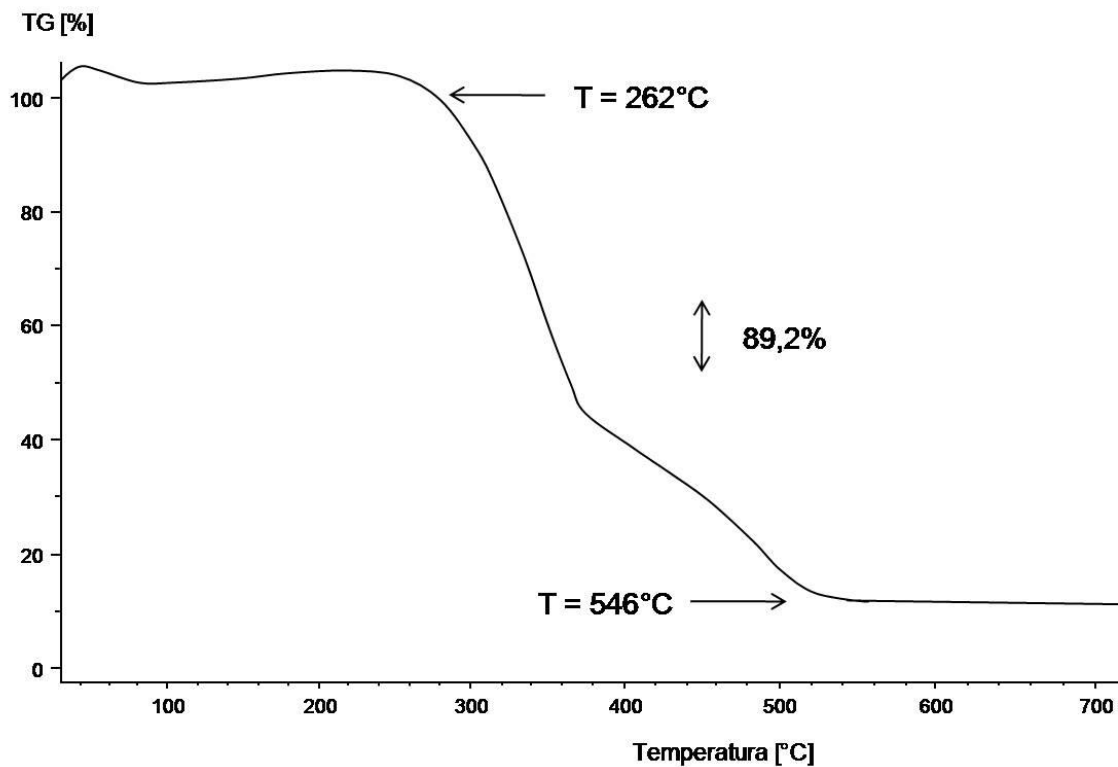
Finalmente, a serragem de cambará e o polietileno foram os materiais que melhor se adaptaram à técnica de conformação. Desde as primeiras manufaturas foram obtidas peças que aparentavam grande quantidade de poros, podendo ser visualizados a olho nu na superfície de todos os corpos. Além disso, serragem e polietileno puderam ser adicionados ao  $\text{TiO}_2$  e conformados muito facilmente, formando uma mistura homogênea com estrutura igualmente homogênea após a queima a  $1500^\circ\text{C}$ . Das pressões de conformação utilizadas, 70 MPa foi a que permitiu conseguir corpos-de-prova consistentes e com menor deformação, como pode ser visto na Figura 4.4. As amostras, mesmo antes da queima, puderam ser manuseadas com as mãos sem que sua estrutura fosse abalada, mostrando que possuíam resistência mecânica suficiente para manuseio em aplicações clínicas. Após a queima, os discos puderam ser cortados facilmente com uma serra de aço.



**Figura 4.4** Pastilhas obtidas com o uso de 60% em volume de serragem de cambará (à esquerda) e polietileno (à direita).

### 4.3 Análises Termogravimétricas

A análise termogravimétrica foi realizada com o objetivo de determinar a melhor temperatura de remoção dos agentes porogênicos escolhidos, serragem de cambará e polietileno. Os dados obtidos permitiram definir a melhor programação de queima do forno. Os resultados da análise são mostrados na Figura 4.5 e Figura 4.6. Nas figuras ficam evidenciados os intervalos de temperatura nos quais ocorre a maior perda de massa dos componentes.



**Figura 4.5** Análise termogravimétrica da serragem de cambará.

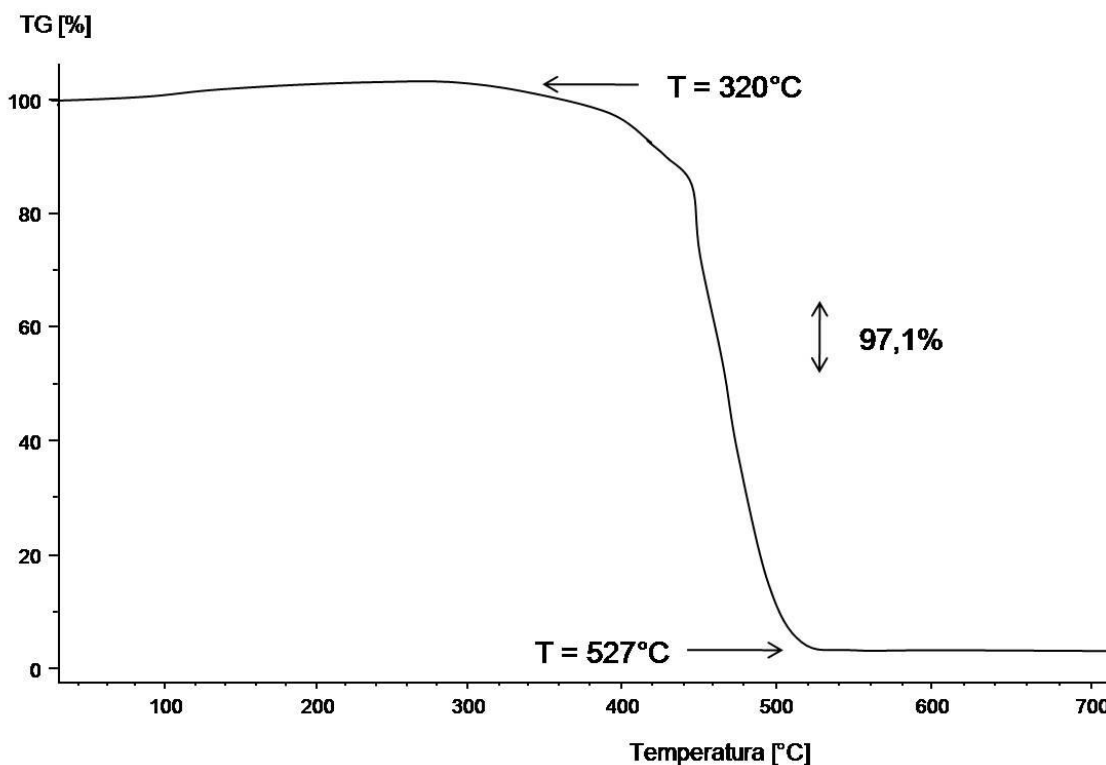
Na Figura 4.5 é possível observar que a perda de massa da serragem de cambará inicia quando a temperatura do equipamento atinge 262°C e continua até 546°C, ponto no qual o material já perdeu 89,2% de sua massa inicial. Em estudo com madeira de pinus, Heikkinen [149] verificou, por meio de curvas de termogravimetria derivada (DTG), que o pico principal da degradação

de toda espécie de madeira corresponde a perdas de componentes voláteis da celulose.

A celulose é o principal constituinte químico da madeira, sendo responsável por 40 a 45% em peso da matéria seca da maioria das madeiras e decompondo-se em temperaturas compreendidas entre 315 e 400°C [150]. Já as hemiceluloses representam, em média, 20 a 30% da massa seca da madeira [151] e sua degradação térmica ocorre entre 190 e 360°C [152]. Por fim, a lignina, que corresponde entre 20 e 30% da massa da madeira tem decomposição térmica ocorrendo temperaturas a partir de 100°C até temperaturas próximas a 900°C [150].

Para o polietileno estudado, o processo de degradação térmica começa com 320°C e continua até a temperatura de 527°C, atingindo uma perda de massa de 97,1%, como mostrado na Figura 4.6.

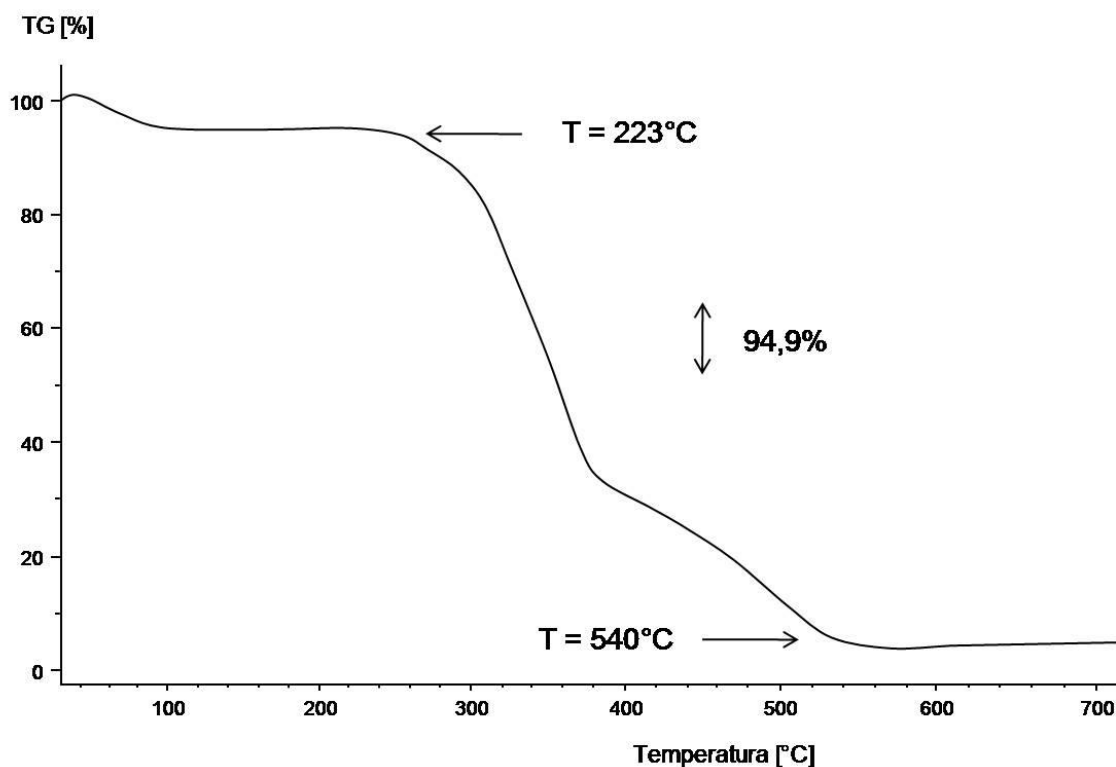
Apesar das análises revelarem que as temperaturas de degradação dos materiais são diferentes das encontradas na literatura, elas ainda estão abaixo da temperatura utilizada no primeiro patamar de queima dos *scaffolds*, 580°C.



**Figura 4.6** Análise termogravimétrica do polietileno.

Nos testes iniciais apenas a serragem da variedade cambará foi utilizada. Entretanto, de forma a comparar o comportamento de tipos diferentes de madeiras, serragens de pinus, jequitibá e cedro foram também usadas na fabricação dos *scaffolds*. Sendo assim, optou-se por realizar a análise termogravimétrica em mais um tipo de serragem para efeito de comparação. A variedade escolhida para a análise foi a pinus. Conforme a Figura 4.7 mostra, a serragem de pinus não apresentou perda de massa até a temperatura de 223°C, sendo que a partir daí observou-se uma diminuição acentuada até 540°C. Nesse intervalo de temperatura houve 94,9% de perda de massa.

As análises realizadas nas serragens e no polietileno revelaram que a serragem de cambará possui a maior temperatura de degradação (546°C), sendo ainda muito próxima às temperaturas de degradação do polietileno (527°C) e da serragem de pinus (540°C). Levando em conta estes dados, adotou-se 560°C como a temperatura do primeiro patamar de queima dos *scaffolds*.



**Figura 4.7** Análise termogravimétrica da serragem de pinus.



#### 4.4 Obtenção e Caracterização dos *Scaffolds* de TiO<sub>2</sub>

Após os testes iniciais para obtenção dos *scaffolds*, partiu-se para a etapa de ajustar a quantidade de agente porogênico necessária para a obtenção da porosidade e tamanho de poros desejados.

Nos primeiros *scaffolds* manufaturados com sucesso, polietileno e serragem foram utilizados isoladamente como formadores de poros. Contudo, a fim contribuir com a conformação dos corpos-de-prova e aumentar a quantidade de poros formadas, CMC foi utilizado como um agente porogênico auxiliar.

O CMC original encontrava-se na forma de pós muito finos que não contribuiriam com a formação dos poros grandes desejados. Entretanto, em contato com a água este polímero se expande e aumenta em volume, adquirindo a forma de um gel com consistência mole e pegajosa. E foi na forma expandida que este material foi utilizado em pequenas quantidades para auxiliar e não dificultar o processo de conformação dos *scaffolds*.

Com o objetivo de obter porosidades maiores que 50% a 60% em volume e sabendo que a porosidade é formada por vazios deixados pela eliminação térmica de materiais que se encontravam ali presentes, admite-se que a quantidade de agente porogênicos necessária para produzir esta quantidade de poros deve ultrapassar o valor de 50% a 60% em volume. Além disso, visando obter tamanhos de poros maiores que 200 µm, os agentes porogênicos possuíam tamanhos maiores que este, variando entre 300 e 600 µm.

##### 4.4.1 Processamento com Serragem

*Scaffolds* foram produzidos a partir da adição de 60% em volume de serragem de cambará com 20% de CMC, ambos úmidos (1:1 em peso), ao TiO<sub>2</sub> em pó. A adição de água à serragem mostrou-se importante, pois a água provoca o intumescimento (inchaço) da serragem, aumentando sensivelmente

seu volume e melhorando a trabalhabilidade para a conformação. Nesta mistura também foi adicionado 0,09 g de dextrina para atuar na função de ligante. Em seguida, a composição foi conformada com pressão de compactação de 70 MPa e temperatura de queima com patamares em 560°C e 1500°C.

A porosidade aparente obtida nestes *scaffolds*, de acordo com o princípio de Arquimedes, foi de 47% enquanto a porosidade total calculada foi de 50%. Esta pequena diferença de 3% entre porosidade aparente e total mostra que os poros se encontravam em sua quase totalidade abertos. O fato de os poros serem abertos é uma característica importante, já que poros abertos tornam acessível o contato entre o interior e o exterior das amostras e, do ponto de vista da Engenharia de Tecidos, auxilia a formação de tecido ósseo no interior do material [74].

Os resultados de porosidade revelaram que os valores obtidos são menores do que a quantidade em volume de agentes porogênicos adicionados (80%). Esta diferença se deve ao fato de que os poros deixados após a remoção dos materiais orgânicos passaram por uma redução de volume durante a queima e sinterização do TiO<sub>2</sub>. Isto porque no processo de sinterização as partículas se unem em um contato mais íntimo reduzindo a porosidade, o tamanho dos poros e levando à retração do corpo cerâmico. Tempo e temperatura de queima contribuem com este fenômeno [154].

Para garantir que qualquer outro tipo de serragem poderia ser utilizado neste desenvolvimento, serragens derivadas de outras três variedades de árvores foram utilizadas na fabricação de *scaffolds*: pinus, jequitibá e cedro. As mesmas quantidades de serragem úmida, CMC e dextrina fizeram parte da composição preparada. A Tabela 4.1 mostra os resultados de porosidade aparente e porosidade total obtidos.

É possível observar que a diferença de porosidade entre os tipos diferentes de serragem estudados foi muito pequena, estendendo a validade deste método de conformação para outras variedades de serragem além da cambará.

**Tabela 4.1** Porosidade aparente e porosidade total dos *scaffolds* preparados a partir de serragem de pinus, jequitibá e cedro.

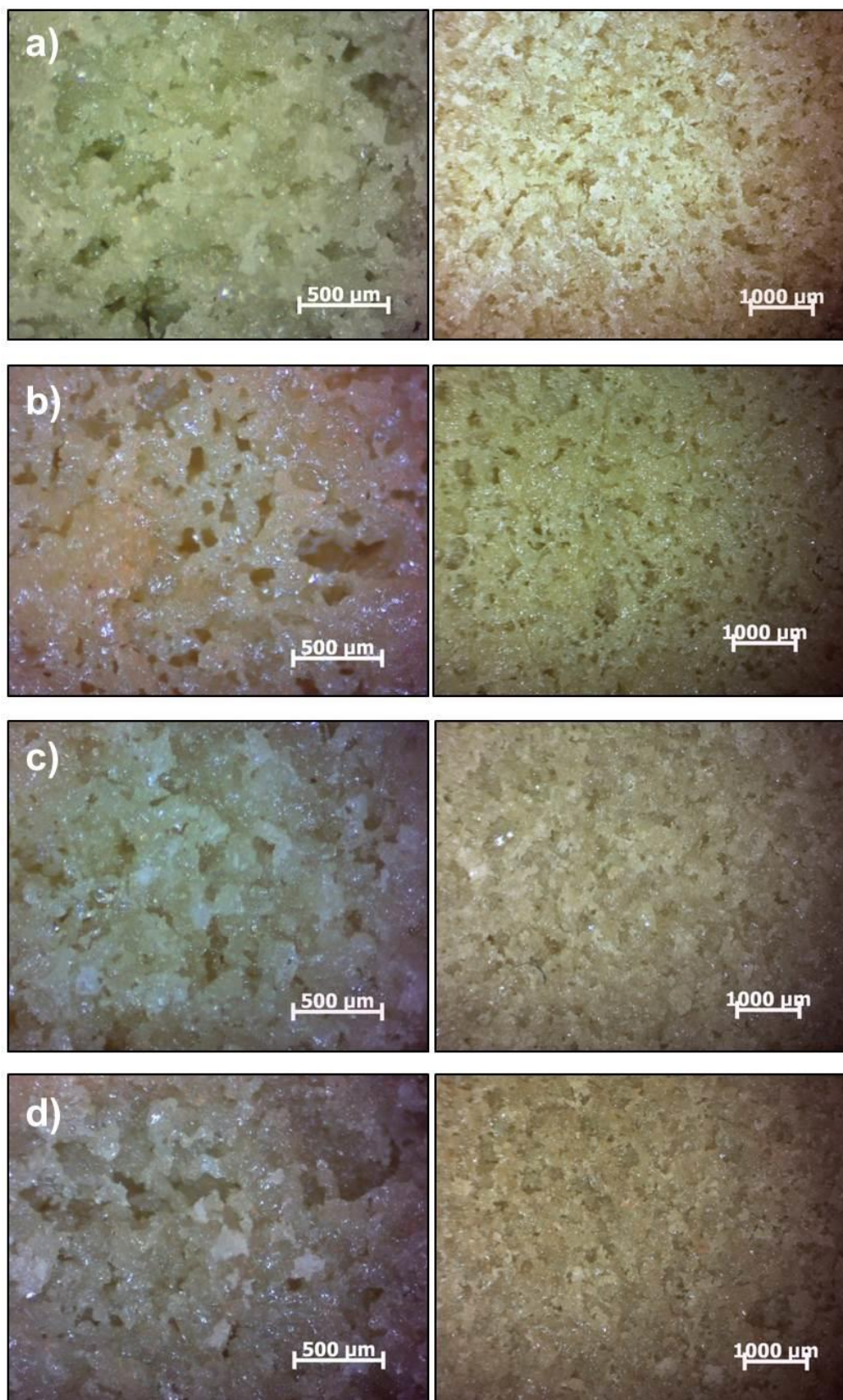
Tipo de Serragem	Porosidade Aparente (%)	Porosidade Total (%)
Pinus	47	50
Jequitibá	46	50
Cedro	47	48

As superfícies dos *scaffolds* obtidos podem ser visualizadas nas imagens obtidas no estereomicroscópio, organizadas na Figura 4.8. Nota-se que estas superfícies são parecidas com esponjas, sendo bem irregulares e com poros possíveis de serem visualizados com pequenos aumentos no microscópio.

Para verificar a possibilidade de consolidar a matriz cerâmica a uma temperatura menor que 1500°C a composição produzida com 60% serragem de cambará e 20% CMC foi queimada diminuindo-se a temperatura do segundo patamar para 1400°C. A estrutura obtida mostrou-se consistente e com boa resistência para manuseio. A porosidade aparente resultou num valor de 47% e a porosidade total 50%.

Apesar de os valores de porosidade terem sido os mesmo para amostras queimadas a 1500°C e 1400°C, o fato de o TiO<sub>2</sub> poder ser sinterizado em temperaturas mais baixas agrega vantagens econômicas na produção de *scaffolds*, já que menores temperaturas de queima podem ser utilizadas.

Com o intuito de aumentar a porcentagem de poros nos *scaffolds*, a quantidade de serragem nas amostras foi aumentada para 70% e em seguida 75%. Em contrapartida, a quantidade de CMC precisou ser diminuída, pois quantidades de agentes porogênicos acima das descritas levaram à obtenção de corpos com retração de queima muito elevada, indo na contramão do aumento de porosidade almejado. A Tabela 4.2 mostra as quantidades de agentes porogênicos utilizados e a porcentagem de poros presentes nas amostras.



**Figura 4.8** Imagens obtidas no estéreo da superfície das amostras preparadas com serragens de (a) cambará, (b) pinus, (c) jequitibá e (d) cedro.

**Tabela 4.2** Porosidade aparente e porosidade total dos *scaffolds* preparados a partir de serragem de cambará e CMC.

Quantidade de Agentes Porogênicos	Porosidade Aparente (%)	Porosidade Total (%)
60% Serragem - 20% CMC	47	50
70% Serragem - 15% CMC	54	56
75% Serragem - 15% CMC	58	60

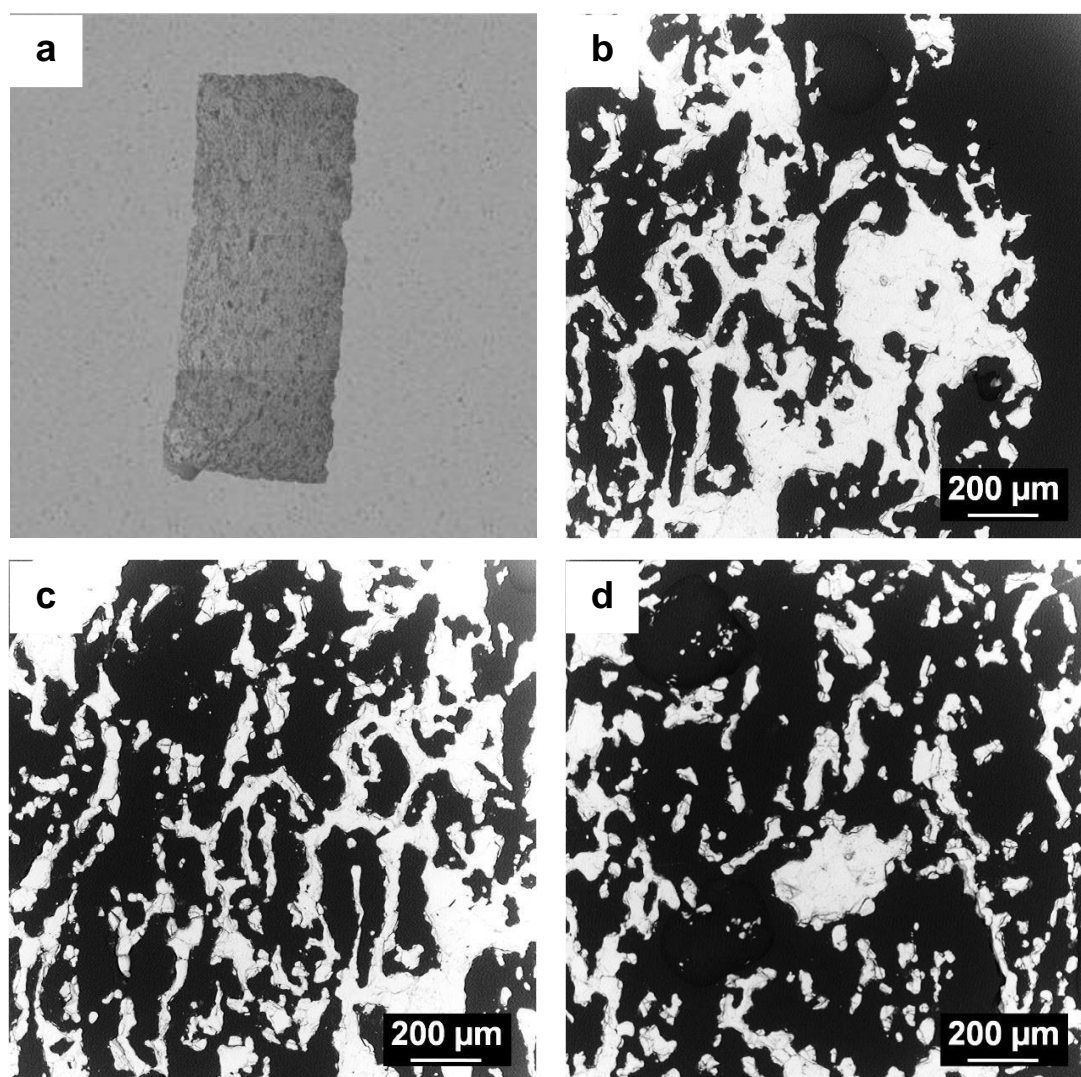
Houve um aumento considerável de porosidade entre as amostras preparadas com 60% serragem - 20% CMC e 70% serragem - 15% CMC, variando de 47 a 54% no caso da porosidade aparente e de 50 a 56% na porosidade total. Da mesma forma, o aumento na quantidade de poros também foi observado para a amostra preparada com 75% Serragem - 15% CMC, atingindo o valor de 58% de porosidade aparente e 60% de porosidade total. Estes valores obtidos para a última amostra são bastante satisfatórios, especialmente em comparação com os valores comumente encontrados na literatura, que geralmente descrevem porosidades de 50% em volume ou menos para o método de eliminação por queima [85][86][87]. Em geral, é bem aceito que os poros devem possuir uma porosidade total superior a 50%, para garantir a vascularização até a região central do *scaffold* [50].

A Figura 4.9 e a Figura 4.10 apresentam as micrografias dos *scaffolds* obtidos com 75% de serragem de cambará e 15% de CMC.

As imagens da amostra embutida em resina epóxi facilitam a visualização do tamanho e interconectividade dos poros enquanto as imagens da superfície fraturada auxiliam o entendimento da estrutura tridimensional dos poros e da estrutura da cerâmica em geral.

A Figura 4.9 mostra a microestrutura interna das amostras, revelando uma distribuição homogênea de poros, tão bem como o alto grau de interconectividade entre eles. Interconectividade é uma característica decisiva para permitir uma adequada vascularização e penetração celular *in vivo* [50].

O crescimento celular em um *scaffold* depende do quanto os nutrientes podem permear através da estrutura porosa. A permeabilidade dos *scaffolds*, uma propriedade diretamente relacionada com o grau de interconectividade dos poros, é um fator chave que influencia a capacidade dos *scaffolds* de aumentar a regeneração do tecido ósseo [155]. Permeabilidade quantifica a capacidade de um meio poroso para transmitir fluido através dos seus poros ou canais interligados, quando submetido à pressão, e, por conseguinte, controla o fluxo de nutrientes para as células que migram através dos andaimes [155].



**Figura 4.9** Superfície embutida em resina epóxi do *scaffold* de  $\text{TiO}_2$  obtido com 75% de serragem cambará e 15% de CMC.

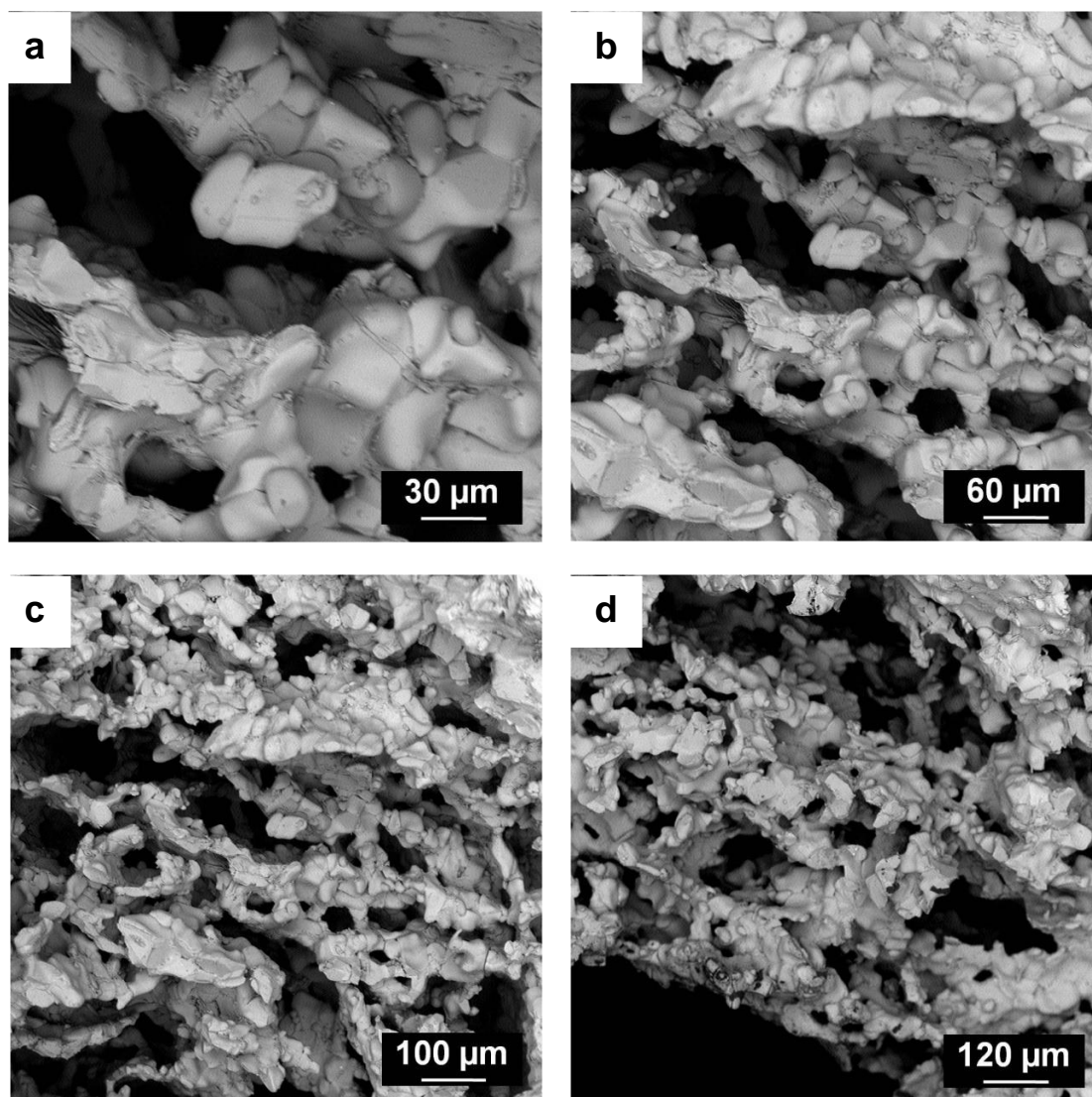
Para a avaliação do tamanho médio de poros e da distribuição dos tamanhos de poros, a técnica de porosimetria de mercúrio é a mais largamente utilizada. Entretanto, este método somente permite medir com precisão poros menores que 200  $\mu\text{m}$  [148]. Além disso, este modelo ignora a existência de uma rede de poros interconectados no interior do meio poroso. Sendo assim, quando o material cerâmico possui uma estrutura celular, no lugar do tamanho médio de poros mede-se a abertura média das células, diretamente a partir das imagens de microscopia obtidas.

No caso dos *scaffolds* deste trabalho a estrutura produzida é altamente porosa, mas não apresenta uma estrutura celular e a medida direta do tamanho dos poros é difícil, uma vez que esta estrutura não é formada por poros individualizados, mas sim por uma rede de canais interconectados. Desta forma, apenas uma aproximação do tamanho de poros foi observada.

A Figura 4.10 mostra o corte transversal (superfície de fratura) da amostra. Assim como nas imagens da amostra embutida também é possível observar que os poros, em sua maioria, são abertos e largamente interconectados, com tamanho de poros variando de aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  até tamanhos maiores que 200  $\mu\text{m}$ . Muitos autores concordam em fixar um tamanho mínimo de poros de 100  $\mu\text{m}$  para permitir uma rápida infiltração celular dentro do *scaffold* todo [50][82].

A presença de pequenos poros observados é devida à evacuação de gases durante a remoção dos agentes orgânicos. Estes poros, que resultam em uma área superficial grande, são cruciais para promoverem a difusão de fluidos e nutrientes por meio de capilaridade [155].

Na Figura 4.10a uma maior ampliação da amostra mostra com mais detalhes a textura do *scaffold* subjacente aos poros. É possível observar as paredes bem sinterizadas entre os poros, que são finas e densas. Uma boa densificação da estrutura de poros é determinante para maximizar a resistência mecânica do *scaffold*. Finalmente, a textura rugosa que cobre a estrutura dos *scaffolds* é adequada para favorecer a absorção de metabólitos biológicos tão bem quanto a ligação e proliferação de células progenitoras ósseas [156].



**Figura 4.10** Superfície de fratura do *scaffold* de  $\text{TiO}_2$  obtido com 75% de serragem camará e 15% de CMC.

#### 4.4.2 Processamento com Polietileno

Foram produzidos *scaffolds* por meio da utilização de PEUAPM e CMC úmido como agentes formadores de poros. Para isso, eles foram adicionados ao pó de  $\text{TiO}_2$  na quantidade de 50% em volume de polietileno e 25% em volume de CMC úmido, juntamente com 0,09 g de dextrina. A mistura foi conformada com pressão de compactação de 70 MPa e temperatura de queima com patamares em 560°C e 1400°C.



As amostras obtidas apresentaram diversas rachaduras em sua superfície. Isto porque o elevado volume de polietileno adicionado como material de sacrifício leva ao desenvolvimento de uma grande quantidade de gás durante a sinterização. Além disso, a taxa de queima pode não ter sido lenta o suficiente para permitir a consolidação da cerâmica ao passo em que o polietileno era removido. Outro ponto é que a diferença nos coeficientes de expansão térmica entre as fases orgânicas e inorgânicas também podem induzir trincas na estrutura porosa durante a pirólise, que ocorre em baixas temperaturas ( $< 560^{\circ}\text{C}$ ).

A porosidade aparente obtida nestes *scaffolds*, de acordo com o princípio de Arquimedes, foi de 60% enquanto a porosidade total calculada foi de 61%. Da mesma forma como ocorreu nos *scaffolds* preparados a partir da serragem de cambará, a diferença entre porosidade aparente e porosidade total foi muito pequena, indicando que poucos poros se encontravam fechados.

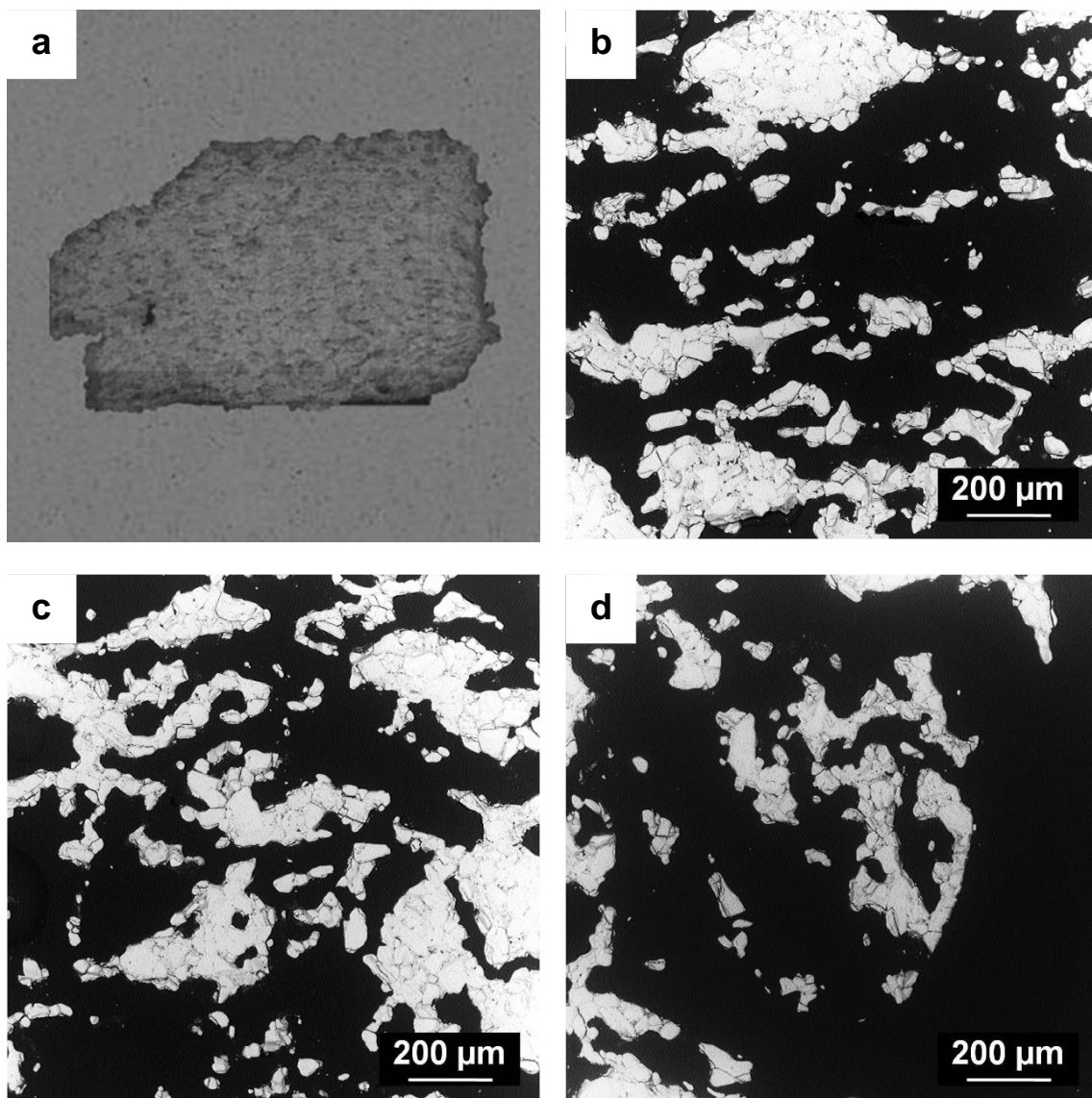
Quando comparados com as amostras feitas com serragem, observa-se que os corpos fabricados com polietileno possuem uma quantidade muito maior de poros com uma quantidade menor de agentes porogênicos. Isso mostra que o processo de densificação foi mais efetivo no caso das amostras preparadas com serragem.

Os corpos-de-prova produzidos apresentaram resistência mecânica suficiente para manuseio antes e após a queima, com a ressalva de que apresentavam certo esfarelamento se manuseados com força excessiva. O corte com serra de aço também foi possível e facilmente realizado.

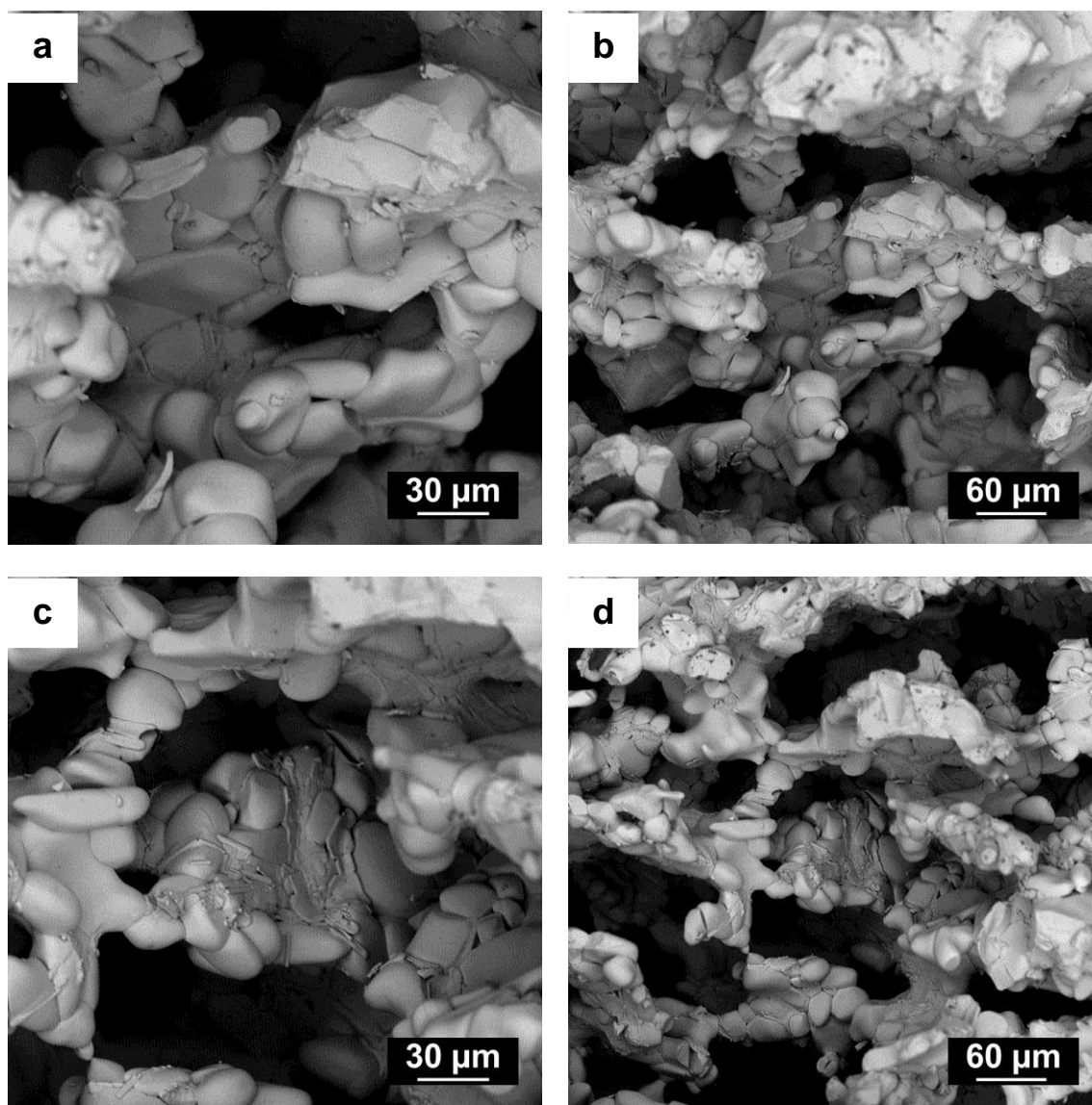
A Figura 4.11 e a Figura 4.12 apresentam as micrografias dos *scaffolds* obtidos com 50% de polietileno 25% de CMC. A primeira mostra imagens da amostra embutida em resina epóxi, enquanto a segunda engloba as imagens obtidas da superfície fraturada.

Nas imagens da amostra embutida em resina epóxi (Figura 4.11) a microestrutura da região interna revela que os poros estavam distribuídos homogeneamente por toda a estrutura, encontrando-se abertos e altamente interconectados. Estas características também podem ser visualizadas na

superfície de fratura dos *scaffolds* (Figura 4.12). Além disso, estas imagens permitem assegurar que os tamanhos dos poros atingiram valores acima de 200  $\mu\text{m}$ . A microestrutura mostrou grãos bem sinterizados entre si, com as paredes do *scaffold* densificadas entre os poros e textura rugosa, tornando este um material promissor para o uso em Engenharia de Tecidos.



**Figura 4.11** Superfície embutida em resina epóxi do *scaffold* de  $\text{TiO}_2$  obtido com 50% de polietileno e 25% de CMC.



**Figura 4.12** Superfície de fratura do *scaffold* de  $\text{TiO}_2$  obtido com 50% de polietileno e 25% de CMC.

#### 4.5 Obtenção e Caracterização dos *Scaffolds* de $\text{TiO}_2$ com Biosilicato

*Scaffolds* de  $\text{TiO}_2$  foram produzidos a partir das composições feitas com serragem de cambará e CMC. Apesar de o PEUAPM ter se mostrado um material adequado para produção dos corpos porosos de  $\text{TiO}_2$ , este estudo prosseguiu apenas com a utilização de serragem de madeira. Isto porque a facilidade de obtenção de serragem foi muito maior, sendo este material um

rejeito produzido em grandes quantidades e sem finalidade específica. Além disso, a serragem de madeira pôde ser utilizada sem passar por tratamentos físicos, além da separação granulométrica por peneiramento, enquanto o polietileno necessitava ser moído. Por fim, as amostras obtidas com polietileno apresentaram trincas em sua superfície, ao passo que as obtidas com serragem não.

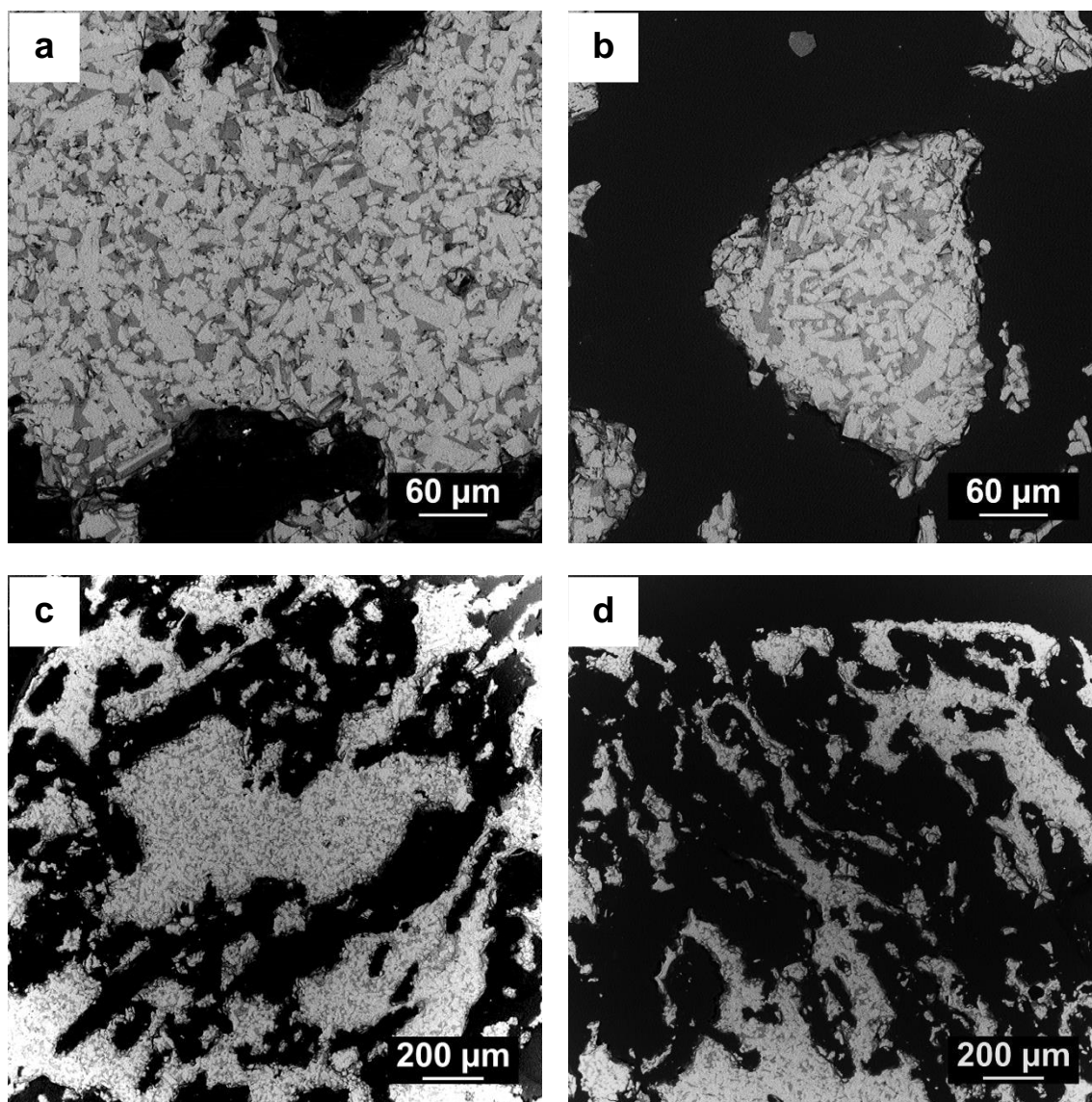
Assim, as composições preparadas com 60% de serragem e 20% de CMC e com 75% de serragem e 15% de CMC úmidos foram utilizadas como bases para a preparação das composições do *scaffold* com biosilicato. Para isso, 10% em peso (em relação à massa de  $\text{TiO}_2$ ) de biosilicato foi adicionada à mistura e conformada nas mesmas condições de prensagem e queima das amostras anteriores.

Inicialmente, acreditava-se que o melhor caminho para fabricar *scaffolds* de  $\text{TiO}_2$  com biosilicato seria pela infiltração deste último aos *scaffolds* já preparados de  $\text{TiO}_2$  utilizando os métodos de imersão e jateamento, seguidos por uma nova queima dos *scaffolds*. No caso do método de imersão, uma barbotina contendo o biosilicato seria preparada para imersão dos *scaffolds*; no método do jateamento, partículas de biosilicato seriam impulsionadas por ar comprimido contra as peças de  $\text{TiO}_2$ . Entretanto, a adição de biosilicato em pó na mistura de  $\text{TiO}_2$  com agentes porogênicos mostrou-se bastante eficiente para a manufatura dos *scaffolds* de  $\text{TiO}_2$  com biosilicato, sendo realizada em uma única etapa de conformação e queima, com economia de tempo, recursos e facilidade na preparação. Desta forma, a necessidade de realização de métodos de infiltração foi eliminada e um método inovador de fabricação foi desenvolvido.

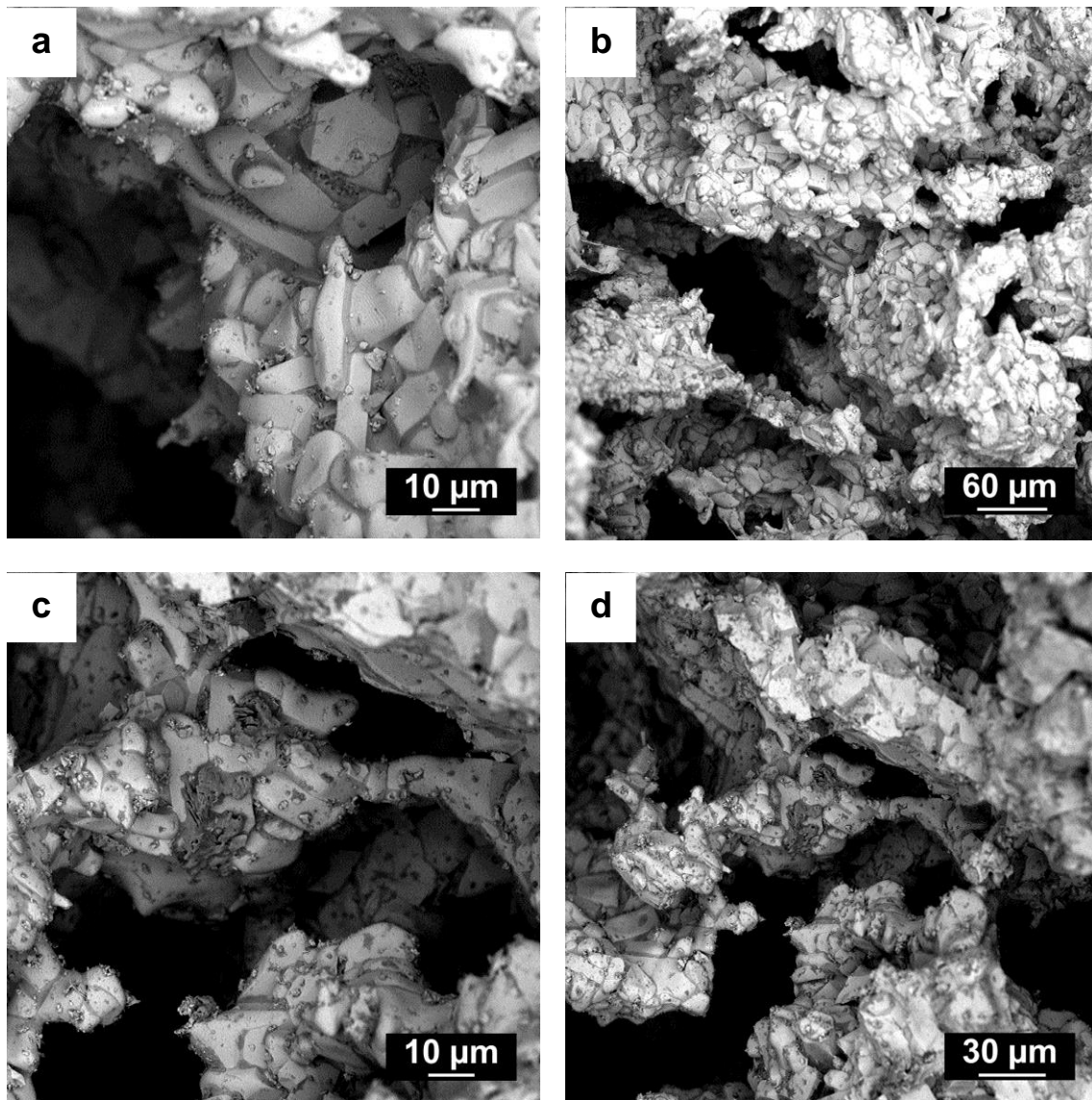
As primeiras pastilhas obtidas, queimadas a  $1400^\circ\text{C}$ , apresentaram uma elevada contração e deformação. Assim, a fim de evitar estes defeitos e favorecer a obtenção de poros com o tamanho e na quantidade desejada, a temperatura de queima foi continuamente diminuída para  $1300^\circ\text{C}$  e  $1200^\circ\text{C}$ . Este processo favoreceu a obtenção de estruturas consistentes e com pequena retração quando a temperatura de queima utilizada foi de  $1200^\circ\text{C}$ .

A Figura 4.13 e a Figura 4.14 mostram o modo como o biosilicato foi incorporado à estrutura de  $\text{TiO}_2$ , por meio de imagens obtidas via MEV, sendo que a primeira corresponde à amostra embutida em resina epóxi e a segunda à amostra fraturada.

Na Figura 4.13 o  $\text{TiO}_2$  é visto com coloração mais clara e o biosilicato com coloração acinzentada, mais escura. A microestrutura obtida é uma mistura das duas fases cerâmicas presentes, sendo que o biosilicato ficou homogeneamente disperso na estrutura principal de  $\text{TiO}_2$ .



**Figura 4.13** Superfície embutida em resina epóxi do *scaffold* de  $\text{TiO}_2$  com biosilicato.



**Figura 4.14** Superfície de fratura do *scaffold* de TiO<sub>2</sub> com biosilicato.

Na Figura 4.14a é possível observar fase vítrea ligando as partículas de TiO<sub>2</sub>. Esta fase vítrea foi formada após o processo de queima, pelo amolecimento e resfriamento das partículas de biosilicato. O surgimento de uma fase líquida durante a queima pode explicar a possibilidade de diminuir a temperatura de sinterização do TiO<sub>2</sub> de 1400°C para 1200°C, já que o início da formação de uma fase líquida leva ao início da sinterização. À medida que o líquido se forma (rápida ou gradualmente), ele molha a superfície das partículas, saindo dos locais em que ele foi formado e se espalhando pela estrutura. Por isso uma quantidade tão pequena de biosilicato encontra-se

disperso por toda a estrutura de  $\text{TiO}_2$ . Acredita-se que apenas uma pequena parte do biosilicato tenha fundido durante a queima, necessitando de maior temperatura e tempo de permanência para formar maior quantidade de fase líquida. A retração observada nas amostras a  $1400^\circ\text{C}$  e  $1300^\circ\text{C}$  também pode ser explicada pela própria geração de líquido.

As porosidades aparente e total obtidas para os *scaffolds* de  $\text{TiO}_2$  com biosilicato são mostradas na Tabela 4.3. As porosidades determinadas para estas amostras foram maiores do que as encontradas para as amostras sem biosilicato. Enquanto amostras com 60% de serragem apresentaram porosidade de 46%, a presença de biosilicato aumentou este valor para 52%. Da mesma forma, amostras com 75% de serragem tiveram a quantidade de poros aumentada de 58% para 63%. Este aumento no volume de poros pode ser explicado pela menor temperatura de queima utilizada nas amostras com biosilicato, já que a diminuição da porosidade é dependente de tempo e temperatura.

**Tabela 4.3** Porosidade aparente e porosidade total dos *scaffolds* preparados com biosilicato.

Quantidade de Agentes Porogênicos	Porosidade Aparente (%)	Porosidade Total (%)
60% Serragem 20% CMC	52	53
75% Serragem 15% CMC	63	63

A diferença entre porosidade aparente e total foi da mesma forma pequena e revela que os poros se encontravam em sua quase totalidade abertos e acessíveis.

Nas imagens das microestruturas das amostras (Figura 4.13 e Figura 4.14) é possível observar que os poros, em sua maioria abertos, estão homogeneamente distribuídos na estrutura, apresentando um elevado grau de interconectividade e tamanhos maiores que  $200\ \mu\text{m}$ .

#### 4.6 Resistência à Tração por Compressão Diametral

As propriedades mecânicas do *scaffold* devem ser similares ao do osso onde será implantado, de tal forma que a mobilização do local lesionado ocorra da maneira mais rápida possível. O *scaffold* deve proporcionar estabilidade mecânica à região onde o material for colocado durante o período em que o novo tecido ósseo é formado, uma vez que o processo de regeneração depende não apenas do estímulo biológico, mas também do estímulo mecânico. Desta forma é importante conhecer as características mecânicas do material produzido.

Os *scaffolds* foram caracterizados com relação à resistência à tração por compressão diametral. A Tabela 4.4 mostra os resultados do ensaio mecânico que foi realizado nas amostras com biosilicato e sem biosilicato. As análises foram realizadas com a aplicação de carga ocorrendo na direção do diâmetro das pastilhas.

**Tabela 4.4** Resultados de resistência mecânica obtidos no ensaio de tração por compressão diametral.

Amostras	Resistência à Tração (MPa)
60% serragem 20% CMC	1,43 ± 0,20
70% serragem 15% CMC	0,88 ± 0,14
75% serragem 15% CMC	0,58 ± 0,11
60% serragem 20% CMC + biosilicato	3,94 ± 0,52
75% serragem 15% CMC + biosilicato	2,66 ± 0,32

Com relação aos *scaffolds* de TiO<sub>2</sub> fabricados sem a adição de biosilicato foi observado que com o aumento do volume de poros a resistência à compressão apresentou uma queda. O maior valor encontrado foi de 1,43 MPa para a amostra com 46% de porosidade aparente (60% serragem 20% CMC), passando pelo valor de 0,88 MPa para a amostra com 54% de



porosidade (70% serragem 15% CMC), e por fim, para a amostra com 58% de porosidade (75% serragem 15% CMC) a resistência à compressão foi de 0,58 MPa.

Esta diminuição na resistência mecânica já era esperada visto que os poros são tratados como defeitos da estrutura cerâmica. Como tal, os poros são concentradores de tensão local e sua presença faz com que a resistência mecânica dos materiais diminua ao passo em que o volume de poros aumenta.

Com a adição de biosilicato as amostras apresentaram resistência mecânica ainda maior, atingindo o valor de 3,94 MPa para as amostras com 53% de porosidade aparente (60% serragem 20% CMC) e 2,66 MPa para as amostras com 63% de porosidade (75% serragem 15% CMC). O aumento da resistência mecânica com relação às amostras sem biosilicato pode estar relacionada com a formação de fase líquida durante a queima, visto que a fase líquida aumenta a união entre as partículas. Além disso, o biosilicato é uma vitrocerâmica com propriedades mecânicas superiores.

As cerâmicas porosas de  $\text{TiO}_2$  apresentam resistência à compressão elevada quando comparadas com outros materiais comuns de *scaffolds* osseocondutores, como cerâmicas de fosfato de cálcio (CaP), vidros bioativos e compósitos CaP/polímeros. Os valores de resistência à compressão reportados para *scaffolds* de CaP e compósitos de CaP/polímeros com porosidades próximas à 85% estão geralmente bem abaixo de 2 MPa, frequentemente dentro do alcance de 0,1 a 1 MPa [108][109][110][111].

Tiainen e colaboradores [99] obtiveram valores de resistência à compressão de aproximadamente 2,5 MPa para *scaffolds* de  $\text{TiO}_2$  com porosidade geral de 85% fabricados pelo método da esponja polimérica. Posteriormente, Tiainen realizou estudos *in vivo* com estes *scaffolds* de  $\text{TiO}_2$  com 83% de porosidade, tamanho de poros de 400  $\mu\text{m}$  e resistência à compressão de 1,68 MPa [112]. Haugen e colaboradores [113] analisaram o desempenho *in vivo* de *scaffolds* de  $\text{TiO}_2$  com porosidade de 91% e resistência à compressão ao redor de 1,2 MPa fabricados também pelo método da esponja polimérica. Este scaffold apresentou-se bem integrado aos ossos e sem formação de efeitos adversos como necrose ou inflamação. Outros

pesquisadores [107] obtiveram *scaffolds* de  $\text{TiO}_2$  com resistência à compressão de 3,4 MPa por meio do aumento no tempo de sinterização das peças (acima de 5 horas) sem alteração significativa nas características dos poros.

Toda a bibliografia encontrada para os *scaffolds* citados utilizou o ensaio de resistência à compressão como responsável pelos valores de resistência mecânica determinados, sendo a carga do equipamento aplicada na direção das faces das amostras cilíndricas, e não no seu diâmetro. Baino e colaboradores [157] relataram que a resistência mecânica dos *scaffolds* é superior quando a carga é aplicada ao longo da direção de compactação. Uma vez que os limites de resistência à tração dos materiais cerâmicos correspondem a um décimo das suas resistências à compressão [158], é possível afirmar que a resistência mecânica dos *scaffolds* produzidos neste trabalho é superior às encontradas na literatura para *scaffolds* de  $\text{TiO}_2$ . Os valores de resistência à compressão encontrados por Athanasiou [75] para o osso esponjoso estavam entre 2 e 5 MPa.

É interessante notar que as estruturas eram capazes de suportar cargas mais elevadas, uma vez que a tensão limite de resistência à tração foi determinada com base na carga máxima que os corpos-de-prova suportavam sem alterar seu posicionamento em relação ao equipamento e não com base em sua completa desagregação, o que não chegava a ocorrer.

#### 4.7 Testes de Bioatividade in Vitro

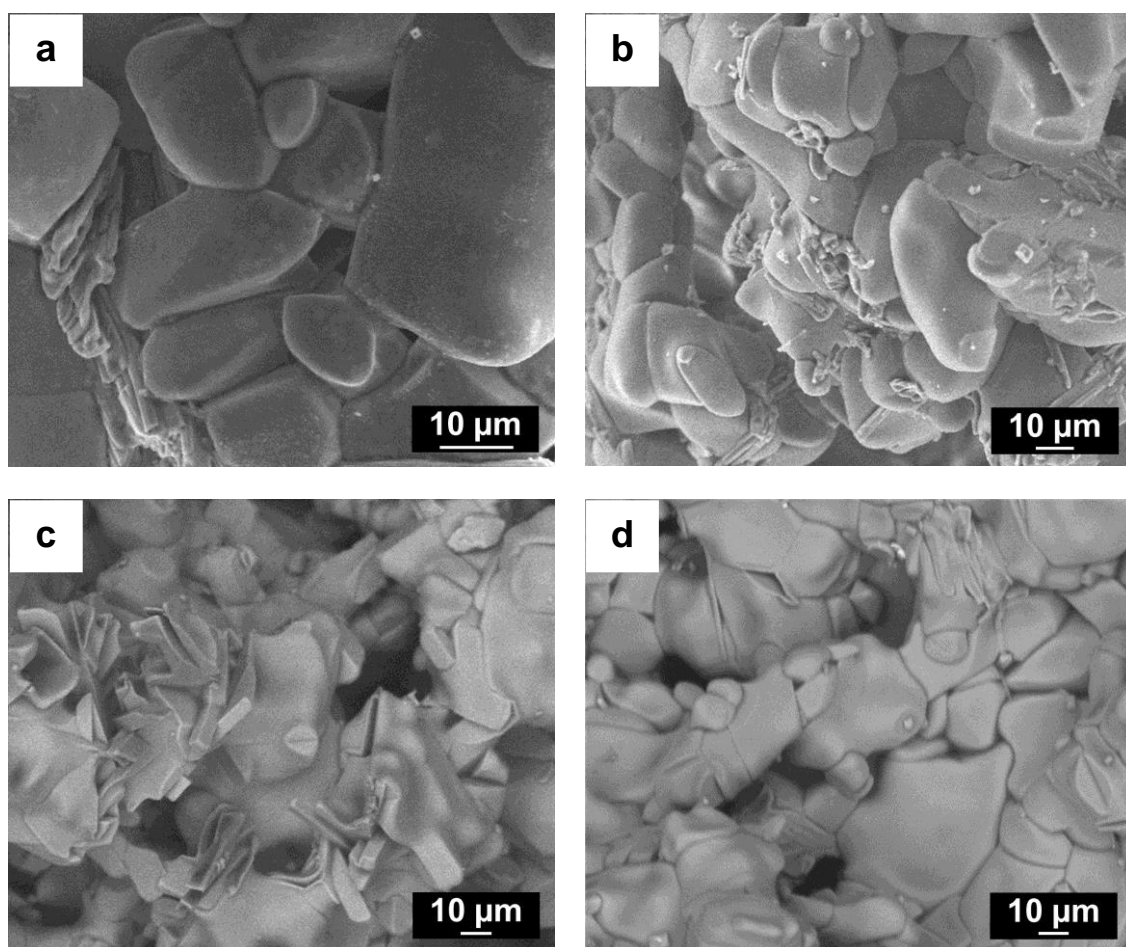
A investigação sobre a bioatividade das amostras foi abordada por meio de testes *in vitro* em SBF, já que a maioria dos materiais bioativos apresenta a capacidade de formar em sua superfície uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA) quando em contato com os tecidos vivos, e essa capacidade é o principal indicador de bioatividade.

Nesta pesquisa os testes *in vitro* foram realizados com o intuito de analisar a influência da adição de biosilicato na formação de HCA nos *scaffolds* de  $\text{TiO}_2$  e o tempo necessário para que isso ocorra. Estas análises são

particularmente relevantes, uma vez que o óxido de titânio não é um material bioativo e o biosilicato foi adicionado às composições dos *scaffolds* em quantidades muito pequenas.

Os *scaffolds* preparados com 75% de serragem sem o biosilicato permaneceram na solução de SBF durante 12 dias, visto que a chance de que HCA fosse observada antes disso era muito baixa. Já as amostras fabricadas com biosilicato e a mesma quantidade de serragem ficaram imersas durante períodos de tempo distintos; algumas amostras permaneceram 1 dia em solução, outras durante 4 dias, e as demais por 12 dias. Após os diferentes tempos de exposição em SBF, as amostras foram analisadas por MEV.

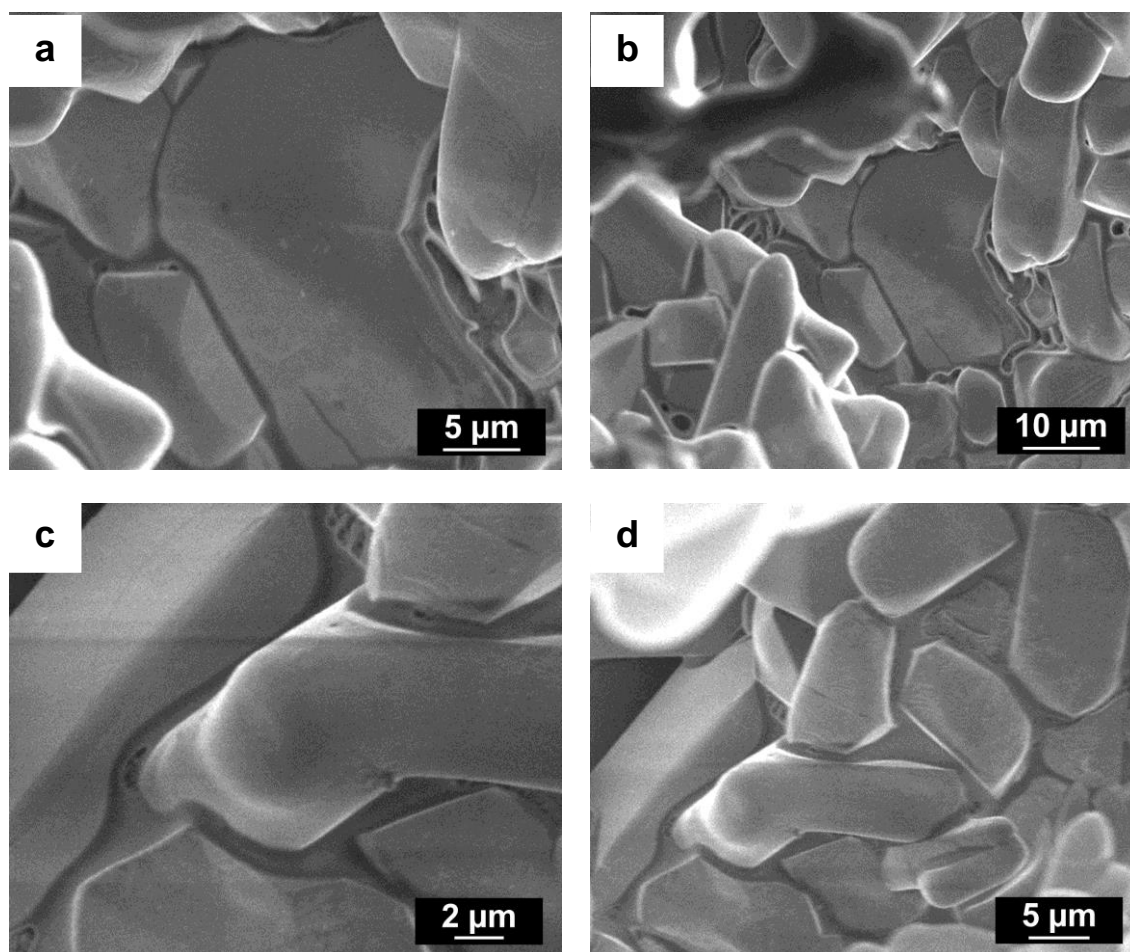
A Figura 4.15 mostra as imagens obtidas por MEV dos *scaffolds* de  $\text{TiO}_2$  sem biosilicato após 12 dias de imersão em SBF.



**Figura 4.15** Scaffold de  $\text{TiO}_2$  sem biosilicato após 12 dias de imersão no SBF.

É possível observar na Figura 4.15 que a microestrutura do material permanece inalterada após a imersão e, apesar do elevado tempo de exposição ao SBF, os *scaffolds* de  $\text{TiO}_2$  não apresentaram qualquer indício da formação de HCA. É importante ressaltar que a não formação desta camada não indica que o *scaffold* fabricado não forneceria suporte para a formação e o crescimento de tecido ósseo, visto que a existência de poros com dimensões adequadas permite a proliferação de tecido através dos espaços vazios e favorece o entrelaçamento entre tecido e implante. A união ao osso é mecânica e o crescimento do osso através dos poros permite uma fixação biológica.

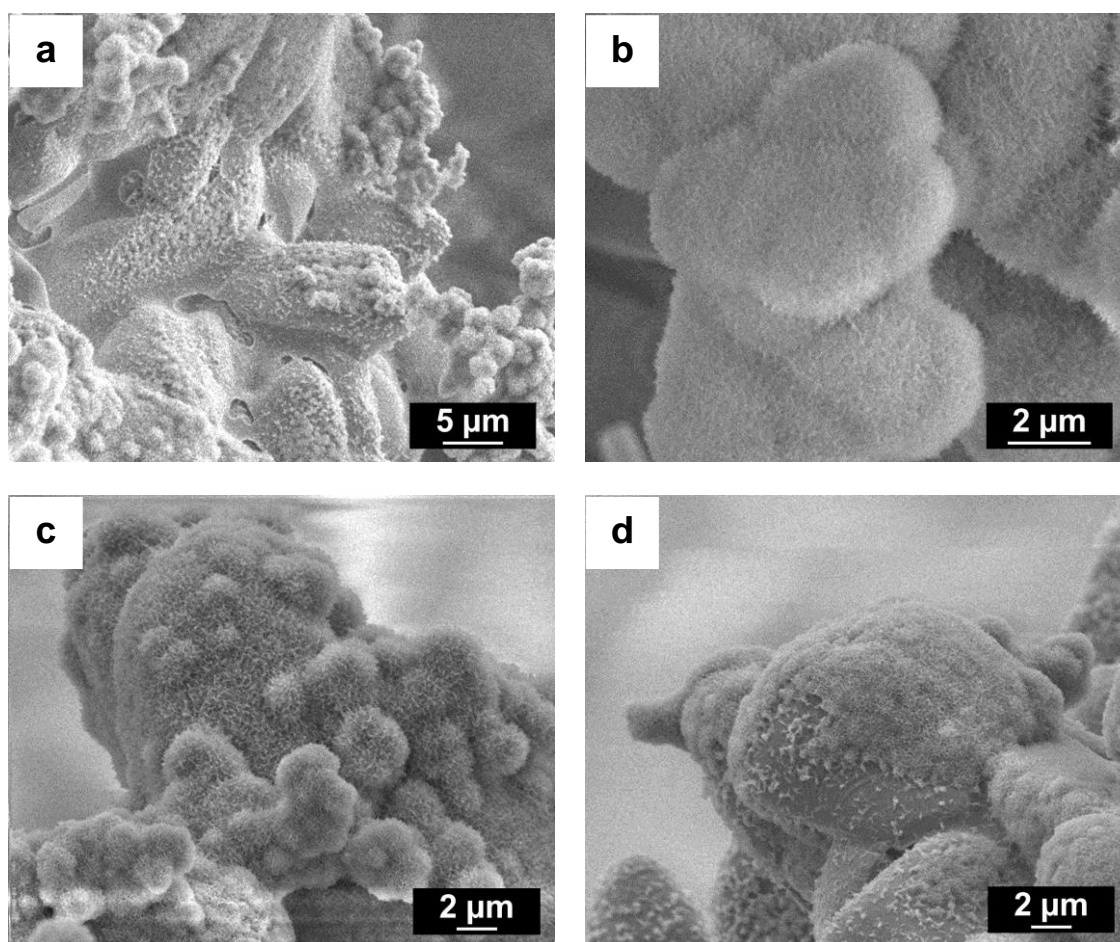
A Figura 4.16 mostra as imagens obtidas por MEV dos *scaffolds* de  $\text{TiO}_2$  com biosilicato após 1 dia de imersão em SBF. Nas imagens pode ser observada com detalhes a presença de biosilicato preenchendo todos os contornos de grão.



**Figura 4.16** *Scaffold* de  $\text{TiO}_2$  com biosilicato após 1 dia de imersão no SBF.

Ainda é possível verificar na Figura 4.16 que com apenas 1 dia de exposição ao SBF ainda não é possível visualizar a nucleação de HCA na amostra. A não formação de HCA durante este período é justificada pela pequena quantidade de biosilicato adicionada ao  $\text{TiO}_2$ , visto que no biosilicato puro HCA é formada antes de 24h de teste [159].

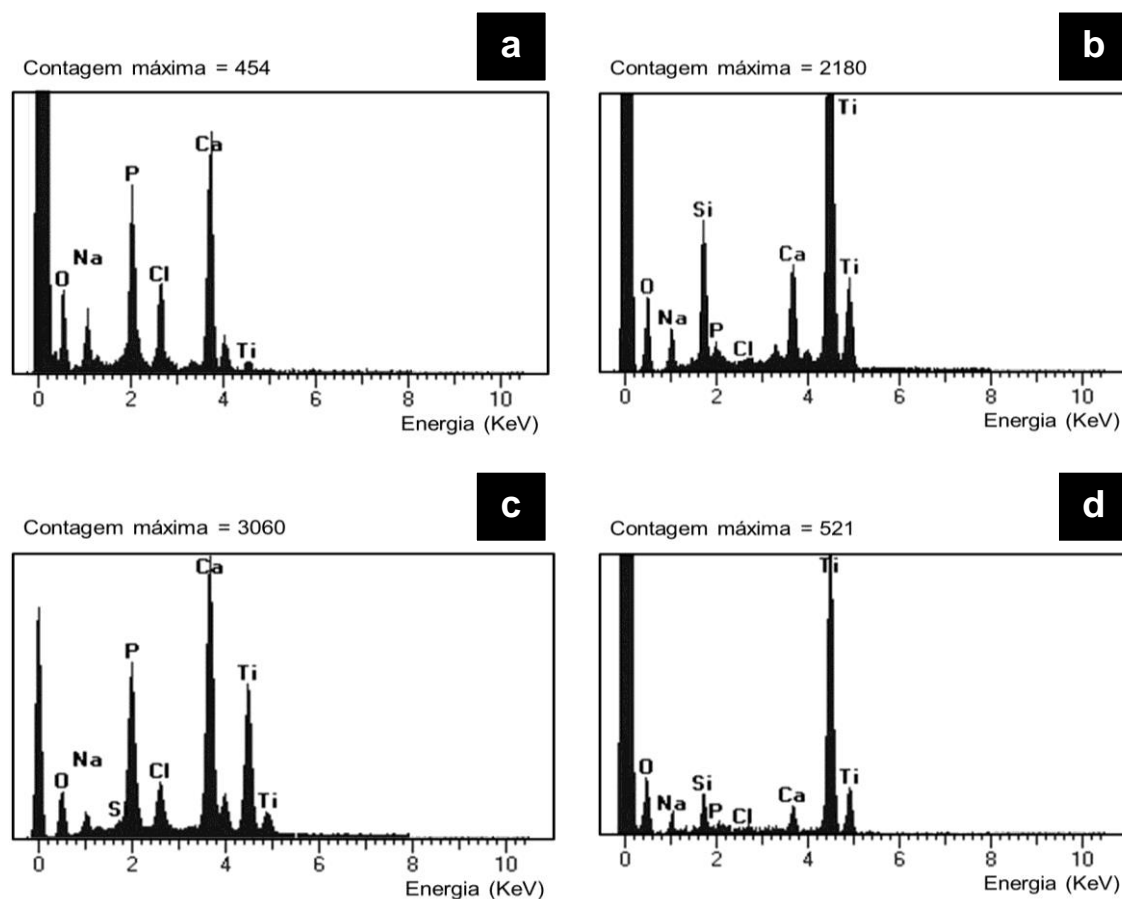
As micrografias da superfície e do interior (fratura) dos *scaffolds* de  $\text{TiO}_2$  com biosilicato após 4 dias de imersão em SBF são vistas na Figura 4.17.



**Figura 4.17** *Scaffold* de  $\text{TiO}_2$  com biosilicato após 4 dias de imersão no SBF. (a) e (b) mostram o interior dos *scaffolds* fraturados enquanto (c) e (d) mostram sua superfície.

Na Figura 4.17 é possível observar a formação de aglomerados esféricos com a morfologia típica da hidroxiapatita precipitada em SBF, sendo que a precipitação de hidroxiapatita atinge também a superfície interna dos

poros. A presença de HCA pode ser confirmada pela realização de EDS nas amostras, cujo resultado é visto na Figura 4.18.



**Figura 4.18** Espectros de EDS do *scaffold* de  $\text{TiO}_2$  com biosilicato após 4 dias de imersão no SBF.

Cada uma das imagens da Figura 4.18 corresponde a uma região da amostra exposta durante 4 dias ao SBF. O fósforo (P) e o cálcio (Ca) encontrados em diferentes concentrações em cada região são os principais elementos constituintes da hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), confirmando a formação da camada de HCA. Os demais elementos observados em grandes quantidades, titânio (Ti) e silício (Si), constituem o óxido de titânio e biosilicato.

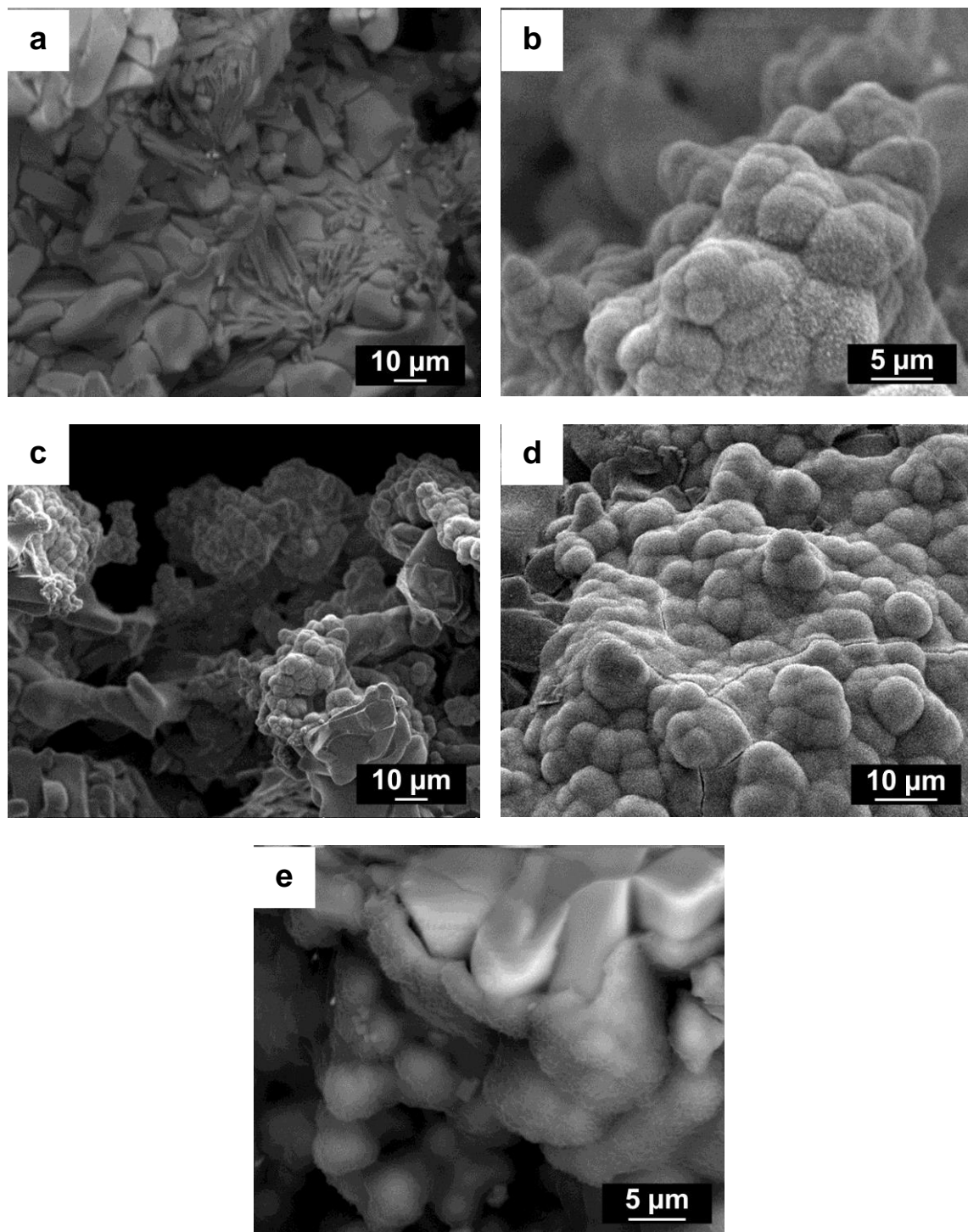
Conforme observado por Silva Jr. e Oréface [160] a cinética de deposição da camada de HCA pode ser controlada pela fração volumétrica da fase bioativa, já que a relação entre a fração dos componentes e a cinética de indução para precipitação da camada de hidroxiapatita carbonatada está

associada ao tempo necessário para que ocorra uma supersaturação da solução com os íons liberados pelas partículas do sistema. Assim eles propõem que os compósitos com pequena fração volumétrica de fase bioativa se comportam *in vitro* da seguinte maneira: as partículas do material bioativo dispostas na superfície dos compósitos contribuem de maneira quase imediata com a liberação de íons móveis ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{PO}_4^{-3}$ ) presentes em sua estrutura para a solução SBF; o aumento de concentração resultante dessa liberação inicial não é suficiente para induzir a precipitação de HCA; com o passar do tempo, íons oriundos de partículas mais distantes das superfícies são liberados para a solução através de processos de migração pelas interfaces dos compósitos; finalmente a concentração da solução SBF atinge níveis de supersaturação que podem, então, levar a precipitação da camada de HCA.

A precipitação de HCA pode ser ainda melhor observada na Figura 4.19 que se refere a um *scaffold* de  $\text{TiO}_2$  com biosilicato imerso em SBF durante 12 dias. Nota-se que o aumento do tempo de imersão torna a camada de HCA mais uniforme por toda a extensão do *scaffold*. É interessante observar que na Figura 4.19b e Figura 4.19d são vistos com maior ampliação os aglomerados esféricos típicos da morfologia da hidroxiapatita. A Figura 4.19e por fim mostra detalhadamente uma camada de HCA por cima do *scaffold*. A formação de HCA foi observada desde a superfície da amostra até distâncias que variaram entre 0,5 e 1mm abaixo da superfície.

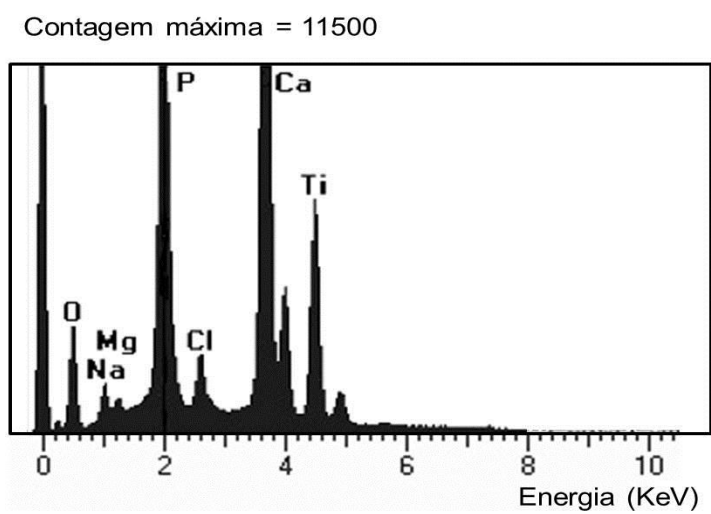
Pelos resultados obtidos verifica-se que a camada de HCA depositada nos *scaffolds* aumentou com o tempo de incubação, e isso também pode ser confirmado pela EDS realizada na amostra imersa durante 12 dias, cujo espectro é mostrado na Figura 4.20. A presença de fósforo e cálcio foi determinada em maiores quantidades do que as encontradas na amostra incubada por 4 dias.

A técnica de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) não pôde ser utilizada para detecção da presença de hidroxiapatita carbonatada devido à natureza porosa dos *scaffolds*.



**Figura 4.19** Scaffold de  $\text{TiO}_2$  com biosilicato após 12 dias de imersão no SBF. (a) e (b) mostram o interior dos scaffolds fraturados enquanto (c), (d) e (e) mostram sua superfície.





**Figura 4.20** Espectros de EDS do *scaffold* de TiO<sub>2</sub> com biosilicato após 12 dias de imersão no SBF.



## 5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos foi possível concluir que:

1. A técnica de adição e eliminação de agentes porogênicos foi utilizada com sucesso para a manufatura de *scaffolds* de TiO<sub>2</sub> e biosilicato, provando ser uma técnica simples e reprodutível para obtenção de corpos com porosidade e resistência mecânica satisfatórias.
2. Os melhores resultados para o método utilizado foram alcançados com a serragem e o polietileno como agentes porogênicos. O uso inovador da serragem neste tipo de aplicação mostrou-se bastante promissor.
3. Foram obtidas peças com porosidade ao redor de 60% com estrutura de poros homogeneamente distribuídos pela microestrutura, com tamanhos maiores que 200 µm e altamente interconectados. Estas eram características desejadas para a aplicação em reparo ósseo proposta.
4. A adição de biosilicato ao TiO<sub>2</sub> para a produção de *scaffolds* mostrou-se bastante promissora dos pontos de vista de conformação, porosidade, resistência mecânica e bioatividade. A presença de biosilicato no pó de TiO<sub>2</sub> permitiu que fossem obtidas peças consistentes utilizando-se temperaturas de queimas mais baixas, que passaram de 1400°C para 1200°C.
5. A resistência à tração dos *scaffolds* produzidos apresentaram valores maiores que os encontrados na literatura para a resistência à compressão em *scaffolds* de TiO<sub>2</sub>. Tal característica supre a necessidade de resistência mínima necessária para manuseio e aplicação em sistemas vivos, entretanto, as condições para realização do ensaio precisam ser melhores definidas. Além disso, a definição do

local de aplicação do scaffold é essencial para a delimitação do valor de resistência mecânica desejado.

6. Os testes de bioatividade *in vitro* revelaram que em 4 dias de exposição ao SBF já era observada uma vasta camada de HCA nas amostras contendo biosilicato, provando que o material tem potencial para estimular a regeneração do tecido ósseo.

Os resultados obtidos levaram à conclusão de que os *scaffolds* produzidos têm potencial para uso em regeneração óssea, possuindo porosidade, resistência mecânica e bioatividade para auxiliar na fixação e migração de células que geram o tecido desejado.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Durante o desenvolvimento de toda pesquisa surgem questionamentos e considerações que poderiam levar ao aperfeiçoamento do trabalho. Assim, de forma a contribuir com a continuidade e melhoria deste projeto, são dadas algumas sugestões:

- Comparar as fases cristalinas do  $\text{TiO}_2$  (anatase, rutilo e brookita) em termos de biocompatibilidade.
- Estudar os efeitos da adição de biosilicato ao  $\text{TiO}_2$  com o uso de polietileno como agente porogênico.
- Avaliar as alterações nas propriedades e características dos *scaffolds* causados pela variação na quantidade de biosilicato adicionado ao  $\text{TiO}_2$ .
- Realizar testes mecânicos mais abrangentes que possam fornecer um padrão de comportamento de tração com relação à quantidade de poros presentes e direção da carga aplicada.
- Realizar testes mais completos de bioatividade *in vitro* extrapolando as medidas para vários tempos, de forma a estudar a cinética de compatibilização com meios biológicos.
- Realizar testes *in vitro* em cultura de células osteoblásticas para avaliação da citotoxicidade do *scaffold*.
- Se os resultados dos testes em cultura celular forem positivos, realizar testes *in vivo* com o uso de um modelo de defeito ósseo crítico.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] DAWSON, J. I.; OREFFO, R. O. C. Bridging the Regeneration Gap: Stem Cells, Biomaterials and Clinical Translation in Bone Tissue Engineering. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 31, p. 124-131, 2008.
- [2] BROWN, K. L. B.; CRUESS, R. L. Bone and Cartilage Transplantation in Orthopedic Surgery – A Review. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 64, p. 270-279, 1982.
- [3] GALDINO, A. G. S. **Produção e Caracterização de Arcabouços Porosos de Compósitos Hidroxiapatita-Titânia (HA-TiO<sub>2</sub>) para Uso em Engenharia Tecidual Óssea**. 148 p. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia Elétrica, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2011. Disponível em <[libdigi.unicamp.br](http://libdigi.unicamp.br)>. Acesso em 5 jan. 2012.
- [4] HUTMACHER, D. W. Scaffold Design and Fabrication Technologies for Engineering Tissues — State of the Art and Future Perspectives. **Journal of Biomaterial Science Polymer Edition**, v. 12, n. 1, p. 107-124, 2001.
- [5] THURSTON, A. J. Paré and Prosthetics: The Early History of Artificial Limbs. **ANZ Journal of Surgery**, v. 77, p. 1114-1119, 2007.
- [6] SANTONI – RUGIU, P.; SYKES, P. J. **A History of Plastic Surgery**. Berlin/ Heidelberg/ New York: Springer, cap. 11, p. 287-298, 2007.
- [7] KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; dos REIS, R. R.; ALVES, O. L. Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de uma Área Interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23(4), p. 518-522, 2000.

- [8] CHINAGLIA, C. R. **Aumento da Bioatividade da Superfície do Titânio por meio da Deposição de um Vidro Altamente Bioativo**. 65p. Projeto de Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, 2011.
- [9] HUEBSCH, N.; MOONE, D. J. Inspiration and Application in the Evolution of Biomaterials. **Nature**, v. 462, p. 426-432, Nov. 2009.
- [10] WILLIAMS, D. F. **Definitions in biomaterials**. Amsterdam: Ed. Elsevier, p. 66-71, 1987.
- [11] RATNER, B. D.; BRYANT, S. J. Biomaterials: Where We Have Been and Where We are Going. **Annual Review of Biomedical Engineering**. v. 6, P. 41-75, Ago. 2004.
- [12] ALBREKTSSON, T.; BRÅNEMARK, P. I.; HANSSON, H. A.; LINDSTRÖM, J. Osseointegrated Titanium Implants: Requirements for Ensuring a Long-Lasting. **Acta Orthopaedica**, Copenhagen, n. 52, p. 155-170, 1981.
- [13] RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**. San Diego: Academic Press, 1996.
- [14] CAMILO, C.C. **Implantes de Alumina em Gradiente Funcional de Porosidade Recobertos com Hidroxiapatita e Biovidro: Avaliação da Osseointegração**. 197 p. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2010. Disponível em <[www.teses.usp.br](http://www.teses.usp.br)>. Acesso em 28 mar. 2011.
- [15] HENCH, L. L., WILSON, J., **Introduction to Bioceramics**. Singapore: Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., p. 1-15, 1993.



- [16] SAKIYAMA-ELBERT, S.; HUBBELL, J. FUNCTIONAL BIOMATERIALS: Design of Novel Biomaterials. **Annual Review of Material Research**, v. 31, p.183-201, 2001.
- [17] HENCH, L. L. Bioglass®: A Short History and Bibliography. **Journal of Australian Ceramic Society**, v. 40, p. 1-42, 2004.
- [18] HENCH, L. L. The story of Bioglass. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. v. 17, p. 967-978, 2006.
- [19] SHORS, E. C. Coraline Bone Graft Substitutes. **Orthopedic Clinics of North America**, v. 30, p. 599-613, 1999.
- [20] HOLLINGER, J. O.; BATTISTONE, G. C. Biodegradable Bone Repair Materials. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 207, p. 290-305, 1986.
- [21] DREESMAN, H. Über Knochenplombierung. **Beitr. Klin. Chir.**, v. 9, p. 803, 1894.
- [22] SANTOS, L. A. **Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área médico-odontológica**. 247 p. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2002. Disponível em [www.bibliotecadigital.unicamp.br](http://www.bibliotecadigital.unicamp.br). Acesso em 22 jun. 2013.
- [23] KRIEGER, S. **Biocerâmica**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2003.
- [24] AZEVEDO, V. V. C.; Chaves, S. A.; BEZERRA, D. C.; COSTA, A. C. F. M. Materiais Cerâmicos Utilizados para Implantes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processo**, v. 2.3, p. 35-42, 2007.

- [25] RAMAKRISHNA, S.; HUANG, Z. M.; KUMAR, G. V.; BATCHELOR, A. W.; MAYER, J. **An Introduction to Biocomposites**, v. 1, London: Imperial College Press, 223p, 2004.
- [26] GROSS, K. A.; BERNDT, C. C.; GOLDSCHLAG, D. D.; IACONO, V. In Vitro Changes of Hydroxyapatite Coatings. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 12, n. 5, p. 589-597, 1997.
- [27] HENCH, L. L. Bioceramics. **Journal of the American Ceramic Society**, Easton, v.81, n.7, p.1705-1728, 1998.
- [28] SIMSKE, S.J.; AYERS, R.A.; BATEMAN, T.A. Porous Materials for Bone Engineering. **Materials Science Forum**, v. 250, p.151-182, 1997.
- [29] HULBERT, S. F.; YOUNG, F. A.; MATHEWS, R. S. Potential of Ceramic Materials as Permanently Implantable Skeletal Prostheses. **Journal Biomedical Materials Research**, v. 4, p. 433-437, 1970.
- [30] TEN CATE, A. R. **Histologia Bucal: Desenvolvimento, Estrutura e Função**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 5ª edição, p. 439, 2001.
- [31] KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral**. São Paulo: Panamericana, p. 381, 1999.
- [32] MARTINI, F. H.; NATH, J. L.; BARTHOLOMEW, E. F. Fundamentals of **Anatomy and Physiology**. San Francisco: Benjamin Cummings, 9ª Edição, cap. 6, 2011.
- [33] RODRIGUES, M. E. S. **Análise do Risco de Fratura Óssea por Ultrasonometria e Ensaio Mecânico de Compressão**. 131 p. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de

- São Carlos, Universidade de São Paulo, 2003. Disponível em <[www.teses.usp.br](http://www.teses.usp.br)>. Acesso em 28 mar. 2014.
- [34] AMA/CME–American Medical Association/ Continuing Medical Education. Disponível em <[www.ama-cmeonline.com](http://www.ama-cmeonline.com)>. Acesso em 10 ago. 2011.
- [35] Só Biologia. Disponível em <[www.sobiologia.com.br](http://www.sobiologia.com.br)> Acesso em 26 set. 2013.
- [36] SCHEFFLER, M.; COLOMBO, P. **Cellular Ceramics**, Weinheim: Wiley-VchVerlag GmbH & Co., 670 p., 2005.
- [37] BURG, K. J. L.; PORTER, S.; KELLAM, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 21, p. 2347-2359, 2000.
- [38] THIEME, M.; WIETERS, K. P.; BERGNER, F.; SCHARNWEBER, D.; WORCH, H.; NDOP, J.; KIM, T. J.; GRILL, W. Titanium Powder Sintering for Preparation of a Porous Functionally Graded Material Destined for Orthopaedic Implants. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 12, p. 225-231, 2001.
- [39] ROSA, V.; BONA, A. D.; CAVALCANTI, B. N.; NÖR, J. E. Tissue Engineering: From Research to Dental Clinics. **Dental Materials**, v. 28, p. 341-348, 2012.
- [40] HOHLFELD, J. ROESSINGH, A. B.; HIRT-BURRI, N.; CHAUBERT, P.; GERBER, S.; SCALETTA, C.; et al. Tissue Engineered Fetal Skin Constructs for Pediatric Burns. **The Lancet**, v. 366, n. 3-9, p. 840–842, 2005.
- [41] WARNKE, P. H.; SPRINGER, I. N.; WILTFANG, J.; ACIL, Y.; EUFINGER H.; WEHMOLLER, M.; et al. Growth and Transplantation of a Custom

- Vascularized Bone Graft in a Man. **The Lancet**, v. 364, n. 28, p. 766–770, 2004.
- [42] NIKLASON, L.E.; GAO, J.; ABBOTT, W. M.; HIRSCHI, K. K.; HOUSER, S.; MARINI, R.; et al. Functional Arteries Grown in Vitro. **Science**, v. 284, p. 489-493, 1999.
- [43] CAO, Y.; VACANTI, J. P.; PAIGE, K. T.; UPTON, J.; VACANTI, C. A. Transplantation of Chondrocytes Utilizing a Polymer-cell Construct to Produce Tissue-Engineered Cartilage in the Shape of a Human Ear. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 100, n. 2, 297-302, 1997.
- [44] ABUKAWA, H.; TERAJ, H.; HANNOUCHE, D.; VACANTI, J. P.; KABAN, L. B.; TROULIS, M. J. Formation of a Mandibular Condyle in Vitro by Tissue Engineering. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 61, p. 94-100, 2003.
- [45] PARK, C. H.; RIOS, H. F.; JIN, Q.; BLAND, M. E.; FLANAGAN, C. L.; HOLLISTER, S. J.; et al. Biomimetic Hybrid Scaffolds for Engineering Human Tooth–Ligament Interfaces. **Biomaterials**, v. 31, p. 5945-5952, 2010.
- [46] SAKAI, V. T.; ZHANG, Z.; DONG, Z.; NEIVA, K. G.; MACHADO, M.; SHI, S.; et al. SHED Differentiate into Functional Odontoblast and Endothelium. **Journal of Dental Research**, v. 89, p. 791-796, 2010.
- [47] CHEN, H.; TANG, Z.; LIU, J.; SUN, K.; CHANG, S. R.; PETERS; M. C.; et al. Acellular Synthesis of a Human Enamel-like Microstructure. **Advanced Materials**, v. 18, p. 1846-185, 2006.
- [48] DUAILIBI, M. T.; DUAILIBI, S. E.; YOUNG, C. S.; BARTLETT, J. D.; VACANTI, J. P.; YELICK, P. C. Bioengineered Teeth from Cultured Rat Tooth Bud Cells. **Journal of Dental Research**, v. 83, p. 523-528, 2004.

- [49] LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, p. 130-133, 1993.
- [50] KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D Biomaterial Scaffolds and Osteogenesis. **Biomaterials**, v. 26, p. 5474-5491, 2005.
- [51] COSTA, R. C. C. **Avaliação in Vitro e in Vivo de Matrizes de Quitosana como Arcabouço Tridimensional para Regeneração Óssea**. 174 p. Tese (Doutorado em Patologia) – Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Universidade Federal da Bahia, 2008.
- [52] HANNICKEL, A et. al. Novo Arcabouço à Base de Osso Mineral e Vidro Bioativo. **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**. p. 67-72, 2011. Tradução do artigo “Novel Hybrid Scaffolds Based on Bone Mineral and Bioactive Glass” originalmente publicado no **Proceedings of the 22<sup>nd</sup> International Symposium on Ceramics in Medicine**, p. 181-184, Daegu, 2009.
- [53] CAMILO, C. C. et. al. Escafoides para Implantes Ósseos em Alumina/ Hidroxiapatita/ Biovidro: Análises Mecânicas e in Vitro. In: **Anais do 4<sup>o</sup> Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais**, Caxambu-MG, 2006.
- [54] PURQUERIO, B. M.; FORTULAN, C.; CAMILO, C. C. Corpos Porosos Estruturais para Aplicação em Engenharia de Tecidos. **Patente (PI 0605628-8)**, 2006.
- [55] XU, H. H.; QUINN, J. B.; TAKAGI, S.; CHOW, L. C.; EICHMILLER, F. C. Strong and Macroporous Calcium Phosphate Cement: Effects of Porosity and Fiber Reinforcement on Mechanical Properties. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 57, p. 457-466, 2001.

- [56] SACHLOS, E.; CZERNUSZKA, J. T. Making Tissue Engineering Scaffolds Work: Review on the Applications of Solid Freeform Fabrication Technology to the Production of Tissue Engineering Scaffolds. **European Cells and Materials**, v. 5, p. 29-40, 2003.
- [57] VANDER, A. J.; SHERMAN, J. H.; LUCIANO, D. S. **Human Physiology**. New York: McGraw Hill, 1985.
- [58] GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of Medical Physiology**. Philadelphia: WB Saunders, 3ª Edição, 1996.
- [59] SOUZA, T. H. S. **Projeto Conceitual de Implante Bioativo com Gradiente de Estrutura Funcional em Poli(Metacrilato de Metila) e Hidroxiapatita. Análises *in Vitro* e *in Vivo***. 151 p. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2009. Disponível em <[www.teses.usp.br](http://www.teses.usp.br)>. Acesso em 30abr. 2012.
- [60] BRANEMARK, P. I.; ZARB, G. A.; ALBREKTSSON, T. **Prótesis Tejido – Integradas: La Oseointegración en la Odontología Clínica**. Berlin: Quintessenz Verlags-GmbH, 1987.
- [61] WORTHINGTON, P.; LANG, B. R.; LAVELLE, W. E. **Osseointegration in Dentistry: An Introduction**. Illinois: Quintessence, cap. 2 - 4, 1994.
- [62] HENCH, L. L.; WEST, J. K. Biological Application of Bioactive Glasses. **Life Chemistry Reports**, Amsterdam, v. 13, p. 187-241, 1996.
- [63] TILOCCA, A. Models of Structure, Dynamics and Reactivity of Bioglasses: a Review. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 33, p. 6817–7044, 2010.

- [64] KOKUBO, T. **Bioceramics and Their Clinical Applications**. Woodhead Publishing Ltd, 784 p., 2008.
- [65] BACCHI, C. E. et. al. **Patologia: Processos Gerais**. Rio de Janeiro: Atheneu, 5ª Edição, 2010.
- [66] ANDERSON, J. M. Biological Response to Materials. **Annual Review of Materials Research**, Palo Alto, v. 31, p. 81-110, 2001.
- [67] GRISS, P.; von ANDRIAN-WERBURG, H. KREMPIEN, B.; HEIMKE, G. Biological activity and histocompatibility of dense  $Al_2O_3/MgO$  ceramic implants in rats. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.7, n.3, p.453-462, 1973.
- [68] BOBYN, J. D.; PILLIAR, R. M.; CAMERON, H. U.; WEATHERLY, G. C. The optimum pore size for the fixation of porous-surfaced metal implants by the ingrowth of bone. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 150, p. 263-270, 1980.
- [69] VACCARO, A. R. The Role of the Osteoconductive Scaffold in Synthetic Bone Graft. **Orthopedics**, v. 25, p. S571-S578, 2002.
- [70] OH, S. H.; PARK, I. K.; KIM, J. M.; LEE, J. H. In Vitro and in Vivo Characteristics of PCL Scaffolds with Pore Size Gradient Fabricated by a Centrifugation Method. **Biomaterials**, v.28, n.9, p.1664-1671, 2004.
- [71] HOLLY, C. E.; SCHOICHET, M. S.; DAVIES, J. E. Engineering Three-Dimensional Bone Tissue in Vitro Using Biodegradable Scaffolds: Investigating Initial Cell-Seeding Density and Culture Period. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 51, n. 3, p. 376-382, 2000.

- [72] HOLLISTER, S. J.; LIN, C. Y.; SAITO, E.; SCHEK, R. D.; TABOAS, J. M.; WILLIAMS, J. M.; et al. Engineering Craniofacial Scaffolds. **Orthodontics and Craniofacial Research**, v. 8, p. 162-173, 2005.
- [73] BUCHOLZ, R. Nonallograft Osteoconductive Bone Graft Substitutes. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 395, p. 44-52, 2002.
- [74] OTSUKI, B.; TAKEMOTO, M.; FUJIBAYASHI, S.; NEO, M.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T. Pore Throat Size and Connectivity Determine Bone and Tissue Ingrowth into Porous Implants: Three Dimensional Micro-CT Based Structural Analyses of Porous Bioactive Implants. **Biomaterials**, v. 27, n. 35, p. 5892-58900, 2006.
- [75] ATHANASIOU, K. A.; ZHU, C. F.; LANCTOT, D. R.; AGRAWAL, G. M.; WANG, X. Fundamentals of Biomechanics in Tissue Engineering of Bone. **Tissue Engineering**, v. 6 (4), p. 361-381, 2004.
- [76] YASZEMSKI, M. J.; PAYNE, R. G.; HAYES, W. C.; LANGER, R.; MIKOS, A. G. Evolution of Bone Transplantation: Molecular, Cellular and Tissue Strategies to Engineer Human Bone. **Biomaterials**, v. 17 (2), p. 175-185, 1996.
- [77] GIBSON, L. J.; ASHBY, M. F. **Solids Cellular: Structure and Properties**. Cambridge: Cambridge University Press, 2<sup>a</sup> Edição, p. 429-452, 1997.
- [78] KIENAPFEL, H.; SPREY, C.; WILKE, A.; GRISS, P. Implant Fixation by Bone Ingrowth. **The Journal of Arthroplasty**, v. 14, n. 13, p. 355-368, 1999.
- [79] STUDART, A. R.; GONZENBACH, U. T.; TERVOORT, E.; GAUCKLER, L. J. Processing Routes to Macroporous Ceramics: A Review. **Journal of American Ceramic Society**, v. 89, n. 6, p. 1771-1789, 2006.



- [80] INNOCENTINI, M. D. M.; SEPULVEDA, P.; SALVINI, V. R. ; PANDOLFELLI, V. C. ; COURRY, J. R. Permeability and Structure of Cellular Ceramics: A Comparison Between Two Preparation Techniques. **Journal of American Ceramic Society**, v. 81 (12), p. 3349-3352, 1998.
- [81] SEPULVEDA, P. Gelcasting Foams for Porous Ceramics. **American Ceramic Society Bulletin**, v. 76 (10), p. 61-65, 1997.
- [82] VITALE-BROVARONE, C; VERNE, E.; APPENDINO, P. Macroporous Bioactive Glass–Ceramics Scaffolds for Tissue Engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, p. 1069–1078, 2006.
- [83] LYCKFELDT, O.; FERREIRA, J. M. F. Processing of Porous Ceramics by Starch Consolidation. **Journal of European Ceramic Society**, v. 18 (2), p. 131–140, 1998.
- [84] VITALE-BROVARONE, C.; BAINO, F.; MIOLA, M.; MORTERA, R.; ONIDA, B.; VERNE, E. Glass–Ceramic Scaffolds Containing Silica Mesophases for Bone Grafting and Drug Delivery, **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, n. 20, p. 809–820, 2009.
- [85] ANDRADE, J. C. T.; CAVILLI, J. A.; KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A. Behaviour of Dense and Porous Hydroxyapatite Implants and Tissue Response in Rat Femoral Defects, **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 62, p. 30–36, 2002.
- [86] KOMLEV, V. S.; BARINOV, S. M. Porous Hydroxyapatite Ceramics of Bimodal Pore Size Distribution, **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.13, p. 295–299, 2002.
- [87] VITALE-BROVARONE, C.; VERNE, E.; BOSETTI, M.; APPENDINO, P.; CANNAS, M. Microstructural and in Vivo Characterization of  $\text{SiO}_2\text{--Na}_2\text{O}$ –

- CaO–MgO Glass–Ceramic Bioactive Scaffolds for Bone Substitutes, **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 16, p. 909–917, 2005.
- [88] HOTTA, Y.; ALBERIUS, P. C. A.; BERGSTROM, L. Coated Polystyrene Particles as Templates for Ordered Macroporous Silica Structures with Controlled Wall Thickness. **Journal of Materials Chemicals**, v. 13 (3), p. 496–501, 2003.
- [89] RODRIGUEZ-LORENZO, L. M.; VALLET-REGI, M.; FERREIRA, J. M. F. Fabrication of Porous Hydroxyapatite Bodies by a New Direct Consolidation Method: Starch Consolidation. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 60(2), p. 232-240, 2002.
- [90] CHIANG, Y. M.; BIRNIE III, D.; KINGERY, W. D. **Physical Ceramics – Principles for Ceramic Science and Engineering**, New York: Jon Wiley and Sons, 544p, 1997.
- [91] BRAUN, J. H.; BAIDINS, A.; MARGANSKI, R. E. TiO<sub>2</sub> Pigment Technology: A Review. **Progress in Organic Coatings**, n. 20, p.105-138, 1992.
- [92] CARTER, C. B.; NORTON, M. G. **Ceramic Materials: Science and Engineering**, New York: Spring Business Media, LLC, 716 p. 2007.
- [93] LI, P.; KANGASNIEMI, I.; GROOT, K.; KOKUBO, T. Bonelike Hydroxyapatite Induction by a Gel-Derived Titania on a Titanium Substrate. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 77, p. 1307-1312, 1994.
- [94] SABETRASEKH, R.; TIAINEN, H.; RESELAND, J. E.; WILL, J.; et. al. Impact of Trace Elements on Biocompatibility of Titanium Scaffolds. **Biomedical Materials**, v. 5, 2010.

- [95] JOKINEN, M.; PÄTSI, M.; RAHALA, H. et. al. Influence of Sol and Surface Properties on In Vitro Bioactivity of Sol-Gel-Derived TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub> Films Deposited by Dip-coating Method. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 42, p. 295-302, 1998.
- [96] RINCON, A. G.; PULGARIN, C. Bactericidal Action of Illuminated TiO<sub>2</sub> on Pure *Escherichia Coli* and Natural Bacterial Consortia: Post-Irradiation Events in the Dark and Assessment of the Effective Disinfection Time. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 49, p. 99-112, 2004.
- [97] HAUGEN, H.; WILL, J.; KOHLER, A.; HOPFNER, U.; AIGNER, J.; WINTERMANTEL, E. Ceramic TiO<sub>2</sub> Foams: Characterization of a Potential Scaffold. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 24, p. 661-668, 2004.
- [98] FOSTAD, G.; HAFELL, B.; FØRDE, A.; DITTMANN, R.; et. al. TiO<sub>2</sub> Scaffolds – A Correlation Study Between Processing Parameters, Micro CT Analysis and Mechanical Strength. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 29, p. 2773-2781, 2009.
- [99] TIAINEN, H.; LYGSTADAAS, S. P.; ELLINGSEN, J. E.; HAUGEN, H. J. Ultra-Porous Titanium Oxide Scaffold with High Compressive Strength. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, p. 2783-2792, 2010.
- [100]JIANG, P.; LIN, H.; XING, R.; JIANG, J.; QU, F. Synthesis of Multifunctional Macroporous-Mesoporous TiO<sub>2</sub>-Bioglasses for Bone Tissue Engineering. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 61, p. 421-428, 2012.
- [101]SABETRASEKH, R.; TIAINEN, H.; LYGSTADAAS, S. P.; RESELAND, J.; HAUGEN H. A Novel Ultra-porous Titanium Dioxide Ceramic with

Excellent Biocompatibility. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 25, p. 559-580, 2011.

[102] WEBSTER, T. J.; ERGUN, C.; DOREMUS, R. H.; SIEGEL, R. W.; BIZIOS, R. Specific Proteins Mediate Enhanced Osteoblast Adhesion on Nanophase Ceramics. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 51, p. 475-483, 2000.

[103] SAVAIANO, J. K.; WEBSTER, T. J. Altered Responses of Chondrocytes to Nanophase PLGA/ Nanophasetitania composites. **Biomaterials**, v. 25, p. 1205-1213, 2004.

[104] GUTWEIN L. G.; WEBSTER, T. J. Increased Viable Osteoblast Density in the Presence of Nanophase Compared to Conventional Alumina and Titania Particles. **Biomaterial**, v. 25, p. 4175-4183, 2004.

[105] LINDSTRÖM, S.; ILES, A.; PERSSON, J. et. al. Nanoporous Titania Coating of Microwell Chips for Stem Cell Culture and Analysis. **Journal of Biomechanical Science and Engineering**, v 5, n. 3, p. 272-279, 2004.

[106] BERNIER, M. C.; EL KIRAT, K.; BESSE, M.; MORANDAT, S.; VAYSSADE, M. Preosteoblasts and Fibroblasts Respond Differently to Anatase Titanium Dioxide Nanoparticles: A Cytotoxicity and Inflammation Study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, p. 68-74, 2012.

[107] TIAINEN, H.; WIEDMER, D.; HAUGEN, H. J. Processing of Highly Porous TiO<sub>2</sub> Bone Scaffolds with Improved Compressive Strength. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 33, p. 15-24, 2013.

[108] REZWAN, K.; CHEN, Q. Z.; BLAKER, J. J.; BOCCACCINI, A. R. Biodegradable and Bioactive Porous Polymer/Inorganic Composite

- Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Biomaterials**, v. 27, p. 3413-3431, 2006.
- [109] WAGONER JOHNSON, A. J.; HERSCHLER, B. A. A Review of the Mechanical Behavior of CaP and CaP/Polymer Composites for Applications in Bone Replacement and Repair. **Acta Biomaterialia**, v. 7, p. 16-30, 2011.
- [110] MIAO, X.; TAN, D. M.; LI, J.; XIAO, Y.; CRAWFORD, R. Mechanical and Biological Properties of Hydroxyapatite/Tricalcium Phosphate Scaffolds Coated with Poly(lactic-co-glycolic acid). **Acta Biomaterialia**, v. 4, p. 638-645, 2008.
- [111] ZHAO, J.; LU, X.; DUAN, K.; GUO, L. Y.; ZHOU, S. B.; WENG, J. Improving Mechanical and Biological Properties of Macroporous HA Scaffolds Through Composite Coatings. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 74, p. 159-166, 2009.
- [112] TIAINEN, H.; WOHLFAHRT, J. C.; VERKET, A.; LYGSTADAAS, S. P.; HAUGEN, H. J. Bone Formation in TiO<sub>2</sub> Bone Scaffolds in Extraction Sockets of Minipigs. **Acta Biomaterialia**, v. 8, p. 2384-2391, 2012.
- [113] HAUGEN, H. J.; MONJO, M.; RUBERT, M.; VERKET, A.; et. al. Porous Ceramic Titanium Dioxide Scaffolds Promote Bone Formation in Rabbit Peri-implant Cortical Defect Model. **Acta Biomaterialia**, v. 9, p. 5390-5399, 2013.
- [114] ALDINI, N. N.; FINI, M.; GIAVARESI, G.; TORRICELLI, P. et al. Improvement in Zirconia Osseointegration by Means of a Biological Glass Coating: An in Vitro and in Vivo Investigation. **Journal of Biomedical Materials Research**, New York, v.61, n.2, p.282-289, 2002.

- [115] KIM, C. Y.; CLARK, A. E.; HENCH, L. L. Early Stages of Calcium–Phosphate Layer Formation in Bioglasses, **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 113, p. 195–202, 1989.
- [116] DAY, R. M. Bioactive Glass Stimulates the Secretion of Angiogenic Growth Factors and Angiogenesis in Vitro. **Tissue Engineering**, v. 11, p. 768-777, 2005.
- [117] JELL, G.; STEVENS, M. M. Gene Activation by Bioactive Glasses. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, p. 997-1002, 2006.
- [118] ALLAN, I.; NEWMAN, H.; WILSON, M. Antibacterial Activity of Particulate Bioglass against Supra and Subgingival Bacteria. **Biomaterials**, v. 22, p. 1683-1687, 2001.
- [119] RECTENWALD, J. E. et al. Bioglass Attenuates a Proinflammatory Response in Mouse Peritoneal Endotoxemia. **Shock - Injury, Inflammation, and Sepsis: Laboratory and Clinical Approaches**, v. 17(2), p. 135-138, 2002.
- [120] XYNOS, I. D.; EDGAR, A. J. BUTTERY, L. D.; HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Gene-Expression Profiling of Human Osteoblasts Following Treatment with the Ionic Products of Bioglass® 45S5 Dissolution. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 55, n. 2, p. 151–157, 2000.
- [121] KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, p. 2907–2915, 2006.
- [122] WILSON, J.; DOUEK, E.; RUST, K. Bioglass® Middle Ear Devices: Ten Year Clinical Results. In: WILSON, J.; HENCH, L. L. GREENSPAN, D. (eds.). **Bioceramics**. Oxford: Elsevier Science, v. 8, p. 239-245, 1995.

- [123] CHEN, Q. Z.; THOMPSON, I. D.; BOCCACCINI, A. R. 45S5 Bioglass®-Derived Glass–Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 11, p. 2414-2425, 2006.
- [124] PEITL FILHO, O. **Vitro-cerâmica Bioativa de Alto Desempenho**. 370 p. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, 1995.
- [125] USBIOMATERIALS, C. et al. Bioactive Ceramics and Method of Preparing Bioactive Ceramics. **Patente (WO/1997/041079)**, 1997.
- [126] RAVAGNANI, C. **Biosilicato para Promoção da Saúde Oral**. 161 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, 2003.
- [127] FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS. Processo de Preparação de Biosilicatos Particulados Bioativos e Reabsorvíveis, Composições para Preparar Ditos Biosilicatos, Biosilicatos Particulados Bioativos e Reabsorvíveis e Uso dos Mesmos no Tratamento de Afecções Bucais. **Patente (INPI/2004/PI0300644-1)**, 2004.
- [128] FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, Processand Compositions for Preparing Particulate, Bioactive or Resorbable Biosilicates for Use in the Treatmentof Oral Ailments. **Patente (WO/2004/074199)**, 2004.
- [129] NETO, J. M. **Osteogênese in Vitro sobre uma Nova Vitrocerâmica Bioativa 100% Cristalina (Biosilicato®)**. 85p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia, Universidade de São Paulo, 2007.
- [130] GRANITO, R. N. **Potencial Osteogênico in Vivo de uma Nova Vitrocerâmica Bioativa (Biosilicato®)**. 127 p. Tese (Doutorado em

Fisioterapia) – Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, 2009.

- [131] KOKUBO, T.; KUSHITANI, H. Solutions Able to Reproduce in Vivo Surface-Structure Change in Bioactivity Glass-Ceramic A/W. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 24, n. 6, p. 721-734, 1990.
- [132] HENCH, L. L. Bioactive Glasses. In: HENCH, L. L.; WILSON, J. **An Introduction to Bioceramics**. 1. ed. [S.l.]: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., v. 1, 1999. p. 48.
- [133] BLEDZKI, A. K.; GASSAN, J. Composites Reinforced with Cellulose Based Fibers. **Progress in Polymer Science**, v. 24, p. 221-272, 1999.
- [134] TANOBE, V. O. A. **Caracterização de Fibras de Esponjas de *Luffa Cylindrica* para Utilização em Compósitos com Matriz Polimérica**. 161 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade Federal do Paraná, 2003.
- [135] SILVEIRA, C. B.; ESCOBAR, J. A.; QUINTERO, M. W. et. al. Decomposição Térmica de Espumas de Poliuretano para Fabricação de Vitrocerâmica Celular de  $\text{Li}_2\text{O-ZrO}_2\text{-SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$  (LZSA). **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1104-1107, 2007.
- [136] LIU, X.; SMITH, L. A.; HU, J.; MA, P. X. Biomimetic Nanofibrous Gelatin/Apatite Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Biomaterials**, v. 30, p. 2252-2258, 2009.
- [137] SADEGHI, M.; HEIDARI, B. Crosslinked Graft Copolymer of Methacrylic Acid and Gelatin as a Novel Hydrogel with pH-Responsiveness Properties. **Materials**, v. 4, p. 543-552, 2011.



- [138] WALK GREEN. **Angelyn (Qualea Spp)**. Disponível em <[www.walkgreenproducts.com](http://www.walkgreenproducts.com)>. Acesso em 18 set. 2014.
- [139] ANDREW, I. A.; BURLEY, J. Variation of Wood Quality of Pinus Merkusii Jungh and de Vriese: Five Trees 16-1 Years Old in Zambia. **Rhodesian Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 2, p. 183-202, 1972.
- [140] INDÚSTRIA MADEIREIRA ULIANA. **Madeiras Brasileiras: Jequitibá Rosa**. Disponível em <[www.mad-uliana.com.br](http://www.mad-uliana.com.br)>. Acesso em 18 set. 2014.
- [141] LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 352 p., 1992.
- [142] HILLIG, E.; IWAKIRI, S.; ANDRADE, M. Z.; ZATTERA, A. J. Caracterização de Compósitos Produzidos com Polietileno de Alta Densidade (HDPE) e Serragem da Indústria Moveleira. **Revista Árvore**, v. 32, n. 2, p. 299-310, 2008.
- [143] COUGHLAN, J. J.; HUG, D. P. Ultra High Molecular Weight Polyethylene. In: **Encyclopedia of Polymer Science and Engineering**, New York: John Wiley & Sons, p.490-494, 1986.
- [144] AHMAD, M.; WAHIT, M. U.; KADIR, M. R. A.; DAHLAN, K. Z. M.; JAWAID, M. Thermal and Mechanical Properties of Ultrahigh Molecular weight Polyethylene/High-Density Polyethylene/Polyethylene Glycol Blends. **Journal of Polymer Engineering**, v. 33, p. 599-614, 2013.
- [145] BISWAL, D. R.; SINGH, R. P. Characterization of Carboxymethyl Cellulose and Polyacrylamide Graft Copolymer. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, n. 4, p. 379-387, 2004.

- [146] ASWATHY, R. G. et. al. Multifunctional Biocompatible Fluorescent Carboxymethyl cellulose Nanoparticles. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 3, p. 254-261, 2012.
- [147] DAS D.; DAS, R.; GHOSH, P. et. al. Dextrin Cross Linked with Poly(HEMA): A Novel Hydrogel for Colon Specific Delivery of Ornidazole. **RSC Advances**, v. 3, p. 25340-25350, 2013.
- [148] CROVACE, M. C. **Obtenção de Estruturas Porosas Altamente Bioativas via Sinterização do Biosilicato<sup>®</sup>**. 141 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, 2009.
- [149] HEIKKINEN, J. M.; HORDIJK, J. C.; JONG, W.; SPLIETHOFF, H. Thermogravimetry as a Tool to Classify Waste Components to be Used for Energy Generation. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 1, n. 2, p. 883-900, 2004.
- [150] YANG, H. Characteristics of hemicellulose, Cellulose and Lignin Pyrolysis. **Fuel**, v.86, p.1781–1788, 2007.
- [151] SJÖSTRÖM, E. **Wood chemistry fundamentals and applications**. London: Academic Press, 293 p., 1993.
- [152] SHEN, R.; GU, S.; BRIDGWATER, A. V. The thermal Performance of the Polysaccharides Extracted from Hardwood: Cellulose and Hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v.82, p. 39-45, 2010.
- [153] PEITL FILHO, O. et al. Compositional and microstructural design of highly bioactive  $P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2$  glass-ceramics. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 1, p. 321-332, 2012.

- [154]VAN VLACK, L. H. **Propriedades dos Materiais Cerâmicos**. Tradução de Cid Silveira e Shiroyuki Oniki. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., 318 p., 1973.
- [155]OCHOA, I.; SANZ-HERRERA, J. A.; GARCIA-AZNAR, J. M.; DOBLARE, M. YUNOS, D. M; BOCCACCINI, A. R. Permeability Evaluation of 45S5 Bioglass<sup>®</sup>-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Journal of Biomechanics**, v. 42, p. 257-260, 2009.
- [156]DELIGIANNI, D. D.; KATSALA, N. D.; KOUTSOUKOS, P. G.; YIANNIS, F. Effect of Surface Roughness of Hydroxyapatite on Human Bone Marrow Cell Adhesion, Proliferation, Differentiation and Detachment Strength. **Biomaterials**, v. 22, n. 1, p. 87-96, 2001.
- [157]BAINO, F.; VERNÉ, E.; VITALE-BROVARONE, C. 3-D High-Strength Glass–Ceramic Scaffolds Containing Fluoroapatite for Load-Bearing Bone Portions Replacement. **Materials Science Engineering**, v. C29, p. 2055-2062, 2009.
- [158]CALLISTER JR., W. D. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução**. Rio de Janeiro: LTC, 5ª Edição, p. 283, 2002.
- [159]RENNO, A. C. M.; BOSSINI, P. S.; CROVACE, M. C.; RODRIGUES, A. C. M.; ZANOTTO, E. D.; PARIZOTTO, N. A. Characterization and in Vivo Biological Performance of Biosilicate. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-7, 2013.
- [160]SILVA JR. P. E.; ORÉFICE, R. L. Compósitos Bioativos Obtidos a Partir da Inserção de Vidro Bioativo em Matriz de Poli(Metacrilato de Metila). **Polímeros**, v. 11, n. 3, p. 109-115, 2001.