

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas -  
Mestrado Profissional

Anderson Damasceno Gomes

**Preparo e caracterização de *scaffolds* de hidroxiapatita/vidro bioativo/colágeno para  
utilização em engenharia de tecidos**

Belo Horizonte

2022

Anderson Damasceno Gomes

**Preparo e caracterização de *scaffolds* de hidroxiapatita/vidro bioativo/colágeno para utilização em engenharia de tecidos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas – Mestrado Profissional da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas, área de Concentração Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Henrique Martins Nunes

Coorientadora: Dra. Agda Aline Rocha de Oliveira

Belo Horizonte

2022

G633p

Gomes, Anderson Damasceno.

Preparo e caracterização de *scaffolds* de hidroxiapatita/vidro bioativo/ colágeno para utilização em engenharia de tecidos [recurso eletrônico] / Anderson Damasceno Gomes. - 2022.

1 recurso online (67 f. : il., color.) : pdf.

Orientador: Eduardo Henrique Martins Nunes.

Coorientadora: Agda Aline Rocha de Oliveira.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Bibliografia: f. 57-67.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Engenharia metalúrgica - Teses. 2. Biomateriais - Teses. 3. Colágeno - Teses. 4. Hidroxiapatita - Teses. 5. Propriedades estruturais - Teses. 6. Tratamento térmico - Teses. 7. Vidros bioativos - Teses. I. Nunes, Eduardo Henrique Martins. II. Oliveira, Agda Aline Rocha de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. IV. Título.

CDU: 669(043)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA METALÚRGICA, MATERIAIS  
E DE MINAS/MP



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Preparo e caracterização de scaffolds de hidroxiapatita/vidro bioativo/colágeno para utilização em engenharia de tecidos**

**ANDERSON DAMASCENO GOMES**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA METALÚRGICA, MATERIAIS E DE MINAS/MP, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ENGENHARIA METALÚRGICA, MATERIAIS E DE MINAS, área de concentração ENGENHARIA DE MATERIAIS.

Aprovada em 12 de dezembro de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Eduardo Henrique Martins Nunes - Orientador  
Depto. de Eng. Metalúrgica e de Materiais - UFMG

Profa. Agda Aline Rocha de Oliveira  
JHS Biomateriais

Prof. Marcello Rosa Dumont  
CEFET-MG

Prof. Manuel Houmard  
UFMG

Belo Horizonte, 12 de dezembro de 2022.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço o apoio financeiro da CAPES (PROEX) e do CNPq (403191/2021-1 e 304415/2021-9). Agradeço à JHS Biomateriais pelo fornecimento dos materiais utilizados neste trabalho. Agradeço o apoio técnico do CeNano2 I/CEMUCASI (Prof. Herman Mansur e Dra. Alexandra Mansur), Samuel Lima, Prof. Vicente Buono e Centro de Microscopia da UFMG e também a Hellen Aparecida Andrade. Agradeço ao Diogo M. M. dos Santos, pelas suas contribuições e várias ajudas e conselhos ao longo desta jornada.

Meu agradecimento especial aos professores Dr. Marcello Dumont (CEFET-MG) e Dr. Manuel Houmard, pelas contribuições dadas ao longo da realização deste trabalho. Agradecimento especial também a professora Dra. Agda, que sempre me incentivou e conduziu de perto como co-orientadora a realização deste trabalho tão especial.

Não posso deixar de agradecer ao professor Dr. Eduardo Nunes, por me receber tão bem no programa de pós-graduação, por se disponibilizar a me orientar com tanta maestria e brilhantismo, recebendo bem minhas sugestões para realização deste trabalho e entendendo minhas dificuldades encontradas ao longo do curso e especialmente, me ajudando a contorná-las para que eu pudesse concluir esta etapa tão esperada.

Agradeço também aos meus amigos e familiares, em especial meus pais e minha esposa, por entenderem os momentos de ausência de nossos encontros, para que eu pudesse dedicar um pouco mais neste importante trabalho.

Por último, mas não menos importante, agradeço a Deus por me permitir continuar incansável em busca de conhecimento e aprendizado, por ter colocado pessoas especiais no meu caminho que só tendem a somar neste meu propósito.

## Resumo

Vidros bioativos (VBs) e hidroxiapatita (HAp) são biomateriais amplamente utilizados na engenharia de tecidos devido à sua boa biocompatibilidade. No entanto, estes materiais podem sofrer perda de forma e migração sob carga, razão pela qual são normalmente imobilizados em matrizes poliméricas. Neste trabalho, o vidro bioativo e as partículas de hidroxiapatita foram inicialmente misturados após a sua dispersão em etanol. As misturas em 3 diferentes relações de massa HA/VB (75/25, 85/15 e 95/05) preparadas foram então tratadas termicamente no ar a temperaturas que variaram entre 600 °C e 800 °C. As alterações estruturais induzidas por estes tratamentos foram investigadas uma vez que está bem estabelecido que a reação entre HAp e VB pode ocorrer a estas temperaturas, levando à formação de compostos com propriedades diferentes. Observamos que o VB utilizado possui tamanho médio de partícula e área de superfície de cerca de 122  $\mu\text{m}$  e 44  $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ , enquanto 12  $\mu\text{m}$  e 6  $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$  foram medidos para a HAp. Ensaio de calorimetria exploratória diferencial revelaram que o vidro bioativo possui temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de início de cristalização ( $T_x$ ) e temperatura de cristalização ( $T_c$ ) em torno de 720 °C, 790 °C, e 860 °C, respectivamente. Foi mantida a relação em massa de HAp/BG em 75/25 e a temperatura de tratamento térmico em 800 °C devido à alta biocompatibilidade e área de superfície específica do vidro bioativo. As biocerâmicas produzidas foram posteriormente incorporadas em matriz de colágeno e esterilizadas com óxido de etileno. Não foram observados resíduos derivados do processo de esterilização nas amostras preparadas, o que merece ser destacado. Uma distribuição uniforme de hidroxiapatita, vidro bioativo e colágeno foi observada nas matrizes compósitas, revelando que estes materiais foram preparados com sucesso. Foi revelada na imersão em SBF, uma formação notável de HAp, o que aponta para a sua boa biocompatibilidade. Este trabalho traz novos conhecimentos sobre a preparação de *scaffolds* mistos cerâmico-poliméricos para utilização em engenharia de tecidos.

Palavras-chave: Hidroxiapatita. Vidro bioativo. Colágeno. Tratamento térmico. Propriedades estruturais. Ensaio *in-vitro*.

## Abstract

Bioactive glasses (BGs) and hydroxyapatite (HAp) are biomaterials widely used in tissue engineering due to their good biocompatibility. However, these materials can undergo shape loss and migration under load, which is why they are commonly immobilized in polymeric matrices. In this work, bioactive glass and hydroxyapatite particles were initially mixed after dispersing them in ethanol. The mixtures in 3 different HA/VB mass ratios (75/25, 85/15 and 95/05) prepared were then heat treated in air at temperatures ranging between 600 °C and 800 °C. The structural changes induced by these treatments have been investigated because it is well established that the reaction between HAp and BG can occur at these temperatures, leading to compounds with different properties. We observed that BG has an average particle size and surface area of about 122  $\mu\text{m}$  and 44  $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ , while 12  $\mu\text{m}$  and 6  $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$  were evaluated for HAp. DSC tests revealed that BG has  $T_g$ ,  $T_x$ , and  $T_c$  of about 720 °C, 790 °C, and 860 °C, respectively. A HAp/BG mass ratio of 75/25 and a heat treatment temperature of 800 °C were maintained due to the high biocompatibility and specific surface area of the bioactive glass. After preparing the composite scaffolds, they were sterilized with EO. No residues derived from the sterilization process were observed in the prepared samples, which deserves to be highlighted. MEV and micro-CT images revealed the uniform distribution of HAp, BG, and Col in the composite scaffolds, revealing that the mixing, freezing, and freeze-drying steps were successfully performed. It was revealed in immersion in SBF, a remarkable formation of HAp, which points to their good biocompatibility and potential application in tissue engineering.

Keywords: Hydroxyapatite. Bioactive glass. Collagen. Heat treatment. Structural properties.

*In-vitro* assays.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Esquema representativo de matriz, canalículos e lamelas. Fonte: [13].	16
<b>Figura 2:</b> Sistema vascular do osso. (a) Diagrama esquemático de vasos sanguíneos hierarquicamente estruturados no osso. O suprimento de sangue é derivado das artérias medulares, que estão conectadas aos vasos sanguíneos periosteais. O sangue medular passa então a existir por meio de veias que penetram no córtex ósseo. (b) Imagem de fotomicrografia mostrando vasos sanguíneos penetrando osso cortical humano (largura da imagem: 1,5 mm). (c) Vista em corte transversal de osso humano mostrando a penetração de vasos sanguíneos no centro dos canais de Havers. (d) Imagem de microtomografia computadorizada de tíbia de camundongo mostrando os vasos medulares usando um agente de contraste radiopaco (largura da imagem: 3,5 mm). (e) imagem renderizada em 3D da rede de vasos sanguíneos da mesma tíbia de camundongo da figura (d), após um processo de descalcificação. Fonte: [16].	18
<b>Figura 3:</b> Estágios de consolidação óssea e moléculas de sinalização envolvidas. Fonte: Adaptado de [23].	19
<b>Figura 4:</b> Estrutura cristalina da HAp. (a) Projeção da célula unitária de HAp de acordo com o plano (0 0 1); (b) projeção mostrando a disposição dos octaedros [Ca(1)O <sub>6</sub> ] na estrutura da HAp; (c) projeção mostrando a sequência do octaédrico [Ca (1) O <sub>6</sub> ] e do tetraédrico [PO <sub>4</sub> ] na estrutura da HAp; e (d) projeção mostrando a sequência do octaédrico: [Ca (1) O <sub>6</sub> ] e [Ca (2) O <sub>6</sub> ], e também tetraédrico [PO <sub>4</sub> ] na estrutura da HAp. Fonte: [28].	21
<b>Figura 5:</b> Diagrama ternário SiO <sub>2</sub> -CaO-Na <sub>2</sub> O mostrando as composições típicas dos VBs. Fonte: [38].	23
<b>Figura 6:</b> Índice de bioatividade (I <sub>B</sub> ) em função da composição em peso dos VBs. A região A é denominada limite de bioatividade. Materiais da região B comportam-se como quase inertes com o surgimento de cápsula fibrosa ao redor do implante. Na região C estão materiais reabsorvíveis. Materiais com composição na região D não são utilizados como implantes. Fonte: Adaptado de [18]	24
<b>Figura 7:</b> Representação esquemática da estrutura de um VB obtido por sol-gel. Fonte: [46].	25
<b>Figura 8:</b> Curvas DTA de pós puros de HAp(a), de VB (Bioglass®) (b) e de pó compósito HAp / VB (HB73) (c). Fonte: [67]	34
<b>Figura 9:</b> Espectros de FTIR de VB Bioglass® , HAp e compósito HAp/VB (HB73) calcinados a 700, 800 e 900°C.* aponta os picos característicos de β-TCP, Fonte: [67]	35
<b>Figura 10:</b> (a) padrões DRX e (b) espectros de FTIR de HAp e VB. Os planos de cristal indicados na Figura 1a são atribuídos a HAp de acordo como Cartão JCPDS n. ° 24-0033.	42
<b>Figura 11:</b> N <sub>2</sub> isotermas de sorção tomadas para (a) HAp e (b) VB. Os símbolos aberto e fechado estão relacionados com os ramos de adsorção e de dessorção, respectivamente.	43
<b>Figura 12:</b> (a) Distribuição granulométrica das partículas obtidas para HAp e VB por granulometria	



laser. (b) Micrografias de MEV recolhidos para estes materiais.....	44
<b>Figura 13:</b> (a) Termogramas e (b-c) perfis DSC tomados para HAp e VB. O inset apresentado na Figura 4c realça a temperatura de transição vítrea( $T_g$ ), a temperatura de início de cristalização ( $T_x$ ) e a temperatura máxima de cristalização ( $T_c$ ) avaliada para o VB .....	45
<b>Figura 14:</b> (a) padrões DRX e (b) espectros FTIR recolhidos para HAp e VB após tratamento térmico a 600 °C, 700 °C, ou 800 °C. Os cartões JCPDS No. 24-0033, 09-0348, e 09-0169 foram utilizados como referências para HAp, $\alpha$ -TCP, e $\beta$ -TCP, respectivamente .....	46
<b>Figura 15:</b> (a) espectros FTIR e (b) padrões DRX tomados para misturas HAp/VB com diferentes relações de massa e tratadas termicamente a 600 °C, 700 °C, ou 800 °C. Os cartões JCPDS No. 24-0033, 09-0348, e 09-0169 foram utilizados como referências para HAp, $\alpha$ -TCP, e $\beta$ -TCP, respectivamente.....	47
<b>Figura 16:</b> (a) Termogramas e (b) perfis DSC de misturas HAp/VB com diferentes composições.....	48
<b>Figura 17:</b> (a) Volume específico dos poros e (b) área superficial específica avaliada para misturas HAp/VB com diferentes composições e tratadas termicamente a várias temperaturas .....	50
<b>Figura 18:</b> (a) micrografias MEV e (b) espectro FTIR do scaffold HAp/VB/Col. Inset: Espectro FTIR da amostra de Col utilizada neste estudo.....	52
<b>Figura 19:</b> Modelos tridimensionais de scaffolds compostos HAp/VB/Col obtidos a partir de ensaios micro-CT.....	53
<b>Figura 20:</b> (a) espectros de FTIR e (b) padrões DRX de <i>scaffolds</i> HAp/VB/Col embebidos em SBF para tempos diferentes. (c) MicrográficosMEV de <i>scaffolds</i> compostos embebidos em SBF durante 7 dias .....	54
<b>Figura 21:</b> Modelos tridimensionais de <i>scaffolds</i> HAp/VB/Col embebidos em SBF durante 7 dias...	55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Índice de bioatividade ( $I_B$ ) e propriedades mecânicas observadas em diferentes biomateriais. Fonte: [17].....	30
<b>Tabela 2:</b> Concentração detectada e valor de referência para resíduos em produtos de saúde esterilizados por EO. *Concentrações avaliadas com cromatografia gasosa pela SGS Société Générale de Surveillance. **Valores de referência descritos na Portaria Interministerial Brasileira nº 482, de 16 de abril de 1999.....	51

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	12
2.	OBJETIVOS .....	15
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1.	Tecido ósseo.....	16
3.2.	Biomateriais.....	20
3.2.1.	Hidroxiapatita.....	20
3.2.2.	Vidro bioativo.....	22
3.2.3.	Colágeno.....	27
3.3.	Compósitos de Hidroxiapatita-vidro bioativo .....	29
4.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	39
4.1.	Matérias primas .....	39
4.2.	Misturas dos pós HAp/VB .....	39
4.3.	<i>Scaffolds</i> de HAp/VB/Col .....	39
4.4.	Caracterizações.....	40
4.5.	Ensaio <i>in-vitro</i> .....	40
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42
5.1.	Biocerâmicas de partida .....	42
5.2.	Misturas HAp/VB .....	47
5.3.	<i>Scaffolds</i> HAp/VB/Col.....	50
5.4.	Ensaio <i>in-vitro</i> .....	53
6.	CONCLUSÕES.....	56
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57

## 1. INTRODUÇÃO

Em muitos casos quando um paciente apresenta perda ou defeitos ósseos, principalmente quando requer a aplicação de implantes, é necessário o uso de enxertos que ajudam a restaurar a perda óssea. Estima-se que mais de 2 milhões de enxertos ósseos são realizados anualmente em todo o mundo [1]. Atualmente existem várias técnicas para a regeneração do tecido ósseo que requerem o uso de autoenxertos (colheita de osso do corpo de um paciente e usá-lo em outro lugar como um enxerto ósseo em seu corpo [2]), aloenxertos (refere-se ao osso colhido de um doador vivo ou de um cadáver que é então transplantado para o paciente que precisa de um enxerto ósseo [2]) ou xenoenxertos (enxertos ósseos derivados de outras espécies que não a humana, como a bovina, por exemplo [3]). Dificuldades como disponibilidade e compatibilidade de tecidos, infecções e longos períodos de recuperação, requerem o uso de materiais sintéticos que sejam bioativos, biocompatíveis, osteocondutores e osteoindutores, com propriedades adequadas para interagir com tecido biológico [4].

Embora os enxertos tenham sido usados por décadas para melhorar os reparos ósseos, nenhum dos enxertos ósseos atualmente disponíveis possui todas as características desejáveis que tal biomaterial deveria ter. Os problemas associados aos enxertos transplantados aumentaram o interesse em enxertos ósseos sinteticamente melhorados. Os fosfatos de cálcio (CaP) tem recebido bastante atenção para aplicações relacionadas ao osso devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e semelhança na estrutura com a composição inorgânica dos minerais ósseos. O uso de CaP é motivado pelo fato de que o principal componente inorgânico do osso é a hidroxiapatita de cálcio, um subconjunto do grupo de CaP. Melhorias dos processos de fabricação, que eliminam falhas estruturais ou melhoram características microestruturais ou estruturas compostas, são alternativas para melhorar a força intrínseca das biocerâmicas sintéticas [5].

Materiais de fosfato de cálcio e hidroxiapatita (HAp), em particular, parecem assim ser idealmente adequados para implantes ósseos, devido à sua semelhança com a composição química dos tecidos ósseos, sua biocompatibilidade, falta de resposta inflamatória e capacidade osteocondutora. A HAp permite uma resposta biológica específica na interface tecido-implante, que leva à formação de ligações entre o osso e os materiais implantados (bioatividade) [6].

A história da HAp começou em 1926 por Jong et al. quando a fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  foi observada em relação a HAp mineral do osso. A HAp sintética é semelhante à apatita biológica (mineral ósseo), mas há diferenças na composição química e na cristalinidade. Desde então, a HAp foi amplamente investigada [7].

A hidroxiapatita é um material bioativo, mas sua integração com tecido ósseo pode ser melhorada. A baixa degradabilidade do implante de hidroxiapatita no ambiente fisiológico restringe sua substituição ou ressorção por um novo osso, o que leva à falha em uma interface ou em um implante. Essa falha poderia ser superada associando a hidroxiapatita com um vidro bioativo (VB) como segunda fase. Os vidros bioativos têm uma bioatividade maior do que a hidroxiapatita e formam uma boa ligação com o osso vizinho. Sua bioatividade pode ser observada tanto em condições *in-vivo* quanto *in-vitro*. Íons liberados de vidros bioativos promovem o crescimento celular, melhoram o processo de osteoblasto e angiogênese. A capacidade de formação óssea do vidro bioativo é muito rápida, e forma uma nova ligação em poucas horas [8].

Os materiais bioativos são materiais duráveis que podem se ligar quimicamente aos ossos circundantes e, em alguns casos, até mesmo aos tecidos moles. Quando materiais bioativos são implantados no corpo, uma camada porosa biologicamente ativa é formada que é um substrato muito favorável para o novo crescimento do tecido ósseo. O material é ideal como enchimento e recobrimento de cimento ósseo devido à sua atividade biológica, gerando uma reação positiva no ambiente biológico dos implantes [9].

Há várias tentativas de combinar a HAp com vidros bioativos (VBs) de diferentes composições a fim de produzir compósitos com propriedades biológicas melhoradas. A reação entre a HAp e o VB pode ocorrer em diferentes temperaturas de sinterização, sendo a composição da fase final função do VB e da HAp utilizados e da temperatura de sinterização [10]. Compósitos formados pela sinterização de HAp com pequena adição de vidro (à base de fosfato ou sílica) produzem a transformação do HAp em  $\alpha$ - e  $\beta$ -TCP (trifosfato de cálcio); este processo depende da composição do vidro e do tratamento térmico. Além disso, os compósitos à base de fosfato podem exibir propriedades mecânicas e comportamento bioativo muito melhorados em comparação com a HAp pura. Devido à importância do silício na formação e mineralização óssea, e a possibilidade de produzir fases solúveis de fosfato de cálcio, é muito interessante estudar as propriedades de misturas de HAp e vidros à base de

silicato [6].

Na sinterização, a reação entre a hidroxiapatita e o vidro bioativo, e conseqüentemente as alterações da composição da fase inicial, podem ocorrer mesmo no caso de pequenas variações na composição do vidro ou do CaP e/ou temperatura de sinterização, resultando em compósitos com características físicas diferentes, propriedades químicas e estruturais que afetam diversamente sua bioatividade [11].

Quando incorporado o compósito de HAp e VB em uma matriz de colágeno (Col), podemos melhorar ainda mais as propriedades biológicas do biomaterial. O colágeno tipo I é a proteína mais abundante do corpo humano e um dos principais componentes do osso. É constituído por hidroxiprolina com a estrutura de uma hélice tripla. Tem uma longa história como material para aplicações biomédicas devido às suas características tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades biológicas e papel natural na formação de tecidos. O colágeno é um biomaterial útil devido à sua alta afinidade com a água, biodegradação controlável, propriedades hemostáticas, baixa resposta inflamatória do hospedeiro, não-citotóxico e aptidão para facilitar a adesão celular. Uma propriedade significativa do colágeno é a sua integridade estrutural para servir como um modelo para deposição de fosfatos de cálcio no osso, o que torna um material muito conveniente para engenharia de tecido ósseo[12].

## 2. OBJETIVOS

Esse trabalho tem como objetivo principal investigar a obtenção de uma matriz compósita HAp/VB/Col (hidroxiapatita/vidro bioativo/colágeno) que exiba propriedades microestruturais e bioatividade adequadas para utilização em engenharia de tecidos ósseos. Os objetivos específicos são:

- Caracterizar as matérias-primas (HAp e VB) utilizadas na fabricação dos compósitos de acordo com suas distribuições de tamanho e morfologia de partículas, áreas superficiais específicas e composições de fases.
- Preparar compósitos com relação mássica HAp/VB de 95/05, 85/15 e 75/25 p/p.
- Submeter as amostras a tratamentos térmicos de 600°C, 700°C e 800°C, para evitar a densificação do vidro bioativo.
- Analisar a influência do tratamento térmico e composição química sobre as propriedades microestruturais e biológicas dos compósitos obtidos.
- Indicar a amostra com as melhores características entre os avaliados, sugerindo a melhor proporção HAp/VB e tratamento térmico para produção de compósitos com potencial para serem utilizados em engenharia de tecidos ósseos, associado a uma matriz colagênica.

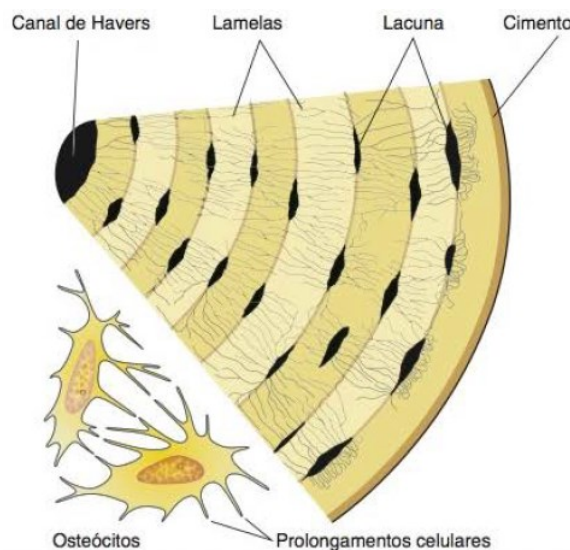
### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Tecido ósseo

O tecido ósseo representa, de modo geral, o principal constituinte do esqueleto dos vertebrados, proporcionando além de sustentação, a proteção de órgãos integrantes de sistemas vitais à manutenção do funcionamento e homeostase do organismo vivo. Alguns ossos alojam a medula vermelha, parte do sistema hematocitopoiético. Os ossos apresentam também a inserção da musculatura esquelética, atuando na transmissão do movimento e atuam como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de forma controlada [13].

O tecido ósseo é um tipo específico de tecido conjuntivo, o qual surge a partir da calcificação da matriz extracelular, também conhecida como matriz óssea (Figura 1). Dentre as células presentes no tecido ósseo encontram-se os osteócitos, estes restritos às cavidades ou lacunas devido ao processo de mineralização, osteoblastos, responsáveis por secretar a matriz óssea e osteoclastos que reabsorvem a matriz óssea atuando no processo de remodelagem óssea. A matriz óssea limita a difusão de substâncias de maneira que a nutrição dos osteócitos depende da existência de canalículos na matriz, os quais permitiram o transporte de moléculas a partir dos capilares sanguíneos. Os ossos são recobertos internamente e externamente por camadas de tecido contendo células osteogênicas, respectivamente, o endóstio e perióstio [13].

**Figura 1:** Esquema representativo de matriz, canalículos e lamelas.



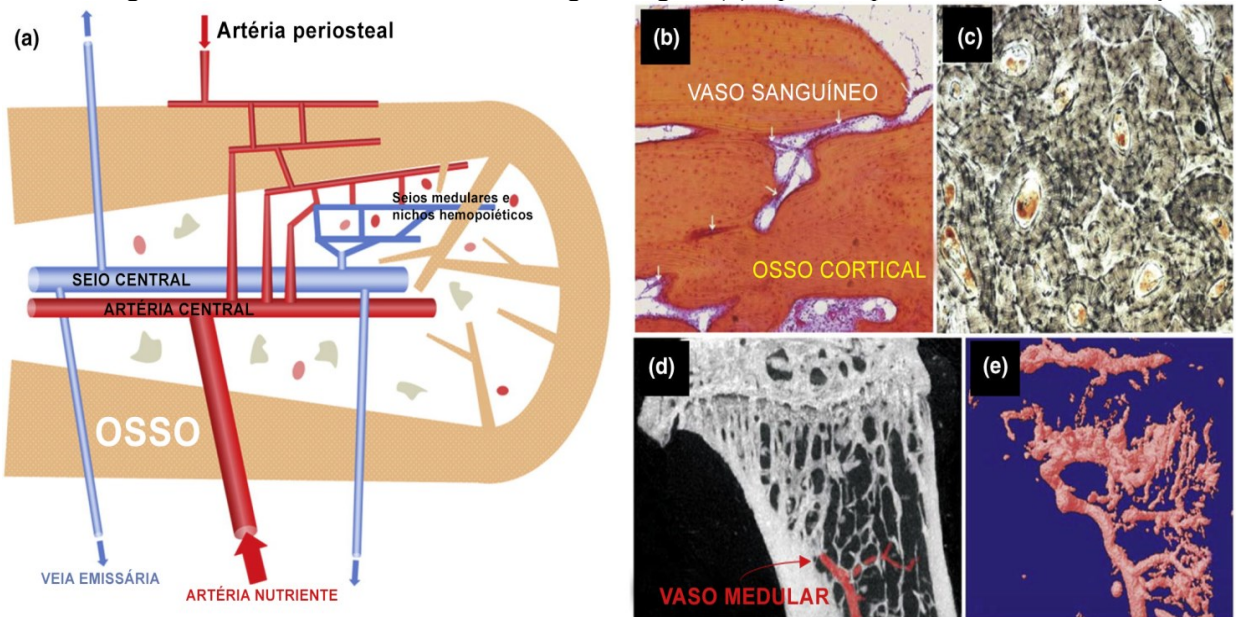


O sistema vascular é fundamental na manutenção do tecido ósseo saudável, uma vez que fornece continuamente oxigênio, nutrientes e células osteoprogenitoras que são necessárias para o crescimento e remodelamento do esqueleto [14].

A superfície externa do osso é coberta pelo perióstio (peri = "ao redor"; oste- = "osso"), enquanto a camada interna é coberta pelo endóstio (end- = "dentro"; oste- = "osso"). O perióstio é um tecido conjuntivo que contém uma alta densidade de vasos sanguíneos, fibras nervosas, osteoblastos e osteoclastos. A superfície interna do osso e os canais vasculares são cobertos por uma estrutura membranosa do endóstio, que contém um revestimento protetor de células que cobre a superfície óssea. O endóstio também contém fibras de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos que podem fornecer nutrientes [15].

O osso longo adulto inclui quatro tipos diferentes de redes vasculares: diáfise, perióstio, metafisária e epifisária. Depois que as artérias entram no osso através de vários forames dos tecidos circundantes, esses vasos sanguíneos penetram pelos canais de Volkmann e Havers e se ramificam por todo o osso cortical (Figura 2c). Entre esses vasos, a artéria diafisária é o maior vaso e fornece mais de 50 % do sangue total que entra nos ossos longos. Essa artéria diafisária entra na diáfise obliquamente através do forame nutrição do osso e se divide em ramos ao longo da cavidade medular (Figura 2a). Esses ramos atingem a epífise e se dividem em ramificações menores. As artérias metafisárias entram nos ossos longos ao longo da metafise, enquanto as artérias epifisárias compõem as arcadas vasculares periarticulares. O sangue venoso é drenado através do seio venoso central e sai do osso pelas veias do colo do osso cortical (Figura 2b). Este sistema vascular fornece nutrientes, oxigênio e células osteoprogenitoras para as regiões terminais do tecido esquelético [16].

**Figura 2:** Sistema vascular do osso. (a) Diagrama esquemático de vasos sanguíneos hierarquicamente estruturados no osso. O suprimento de sangue é derivado das artérias medulares, que estão conectadas aos vasos sanguíneos periosteais. O sangue medular passa então a existir por meio de veias que penetram no córtex ósseo. (b) Imagem de fotomicrografia mostrando vasos sanguíneos penetrando osso cortical humano (largura da imagem: 1,5 mm). (c) Vista em corte transversal de osso humano mostrando a penetração de vasos sanguíneos no centro dos canais de Havers. (d) Imagem de microtomografia computadorizada de tíbia de camundongo mostrando os vasos medulares usando um agente de contraste radiopaco (largura da imagem: 3,5 mm). (e) imagem renderizada em 3D da rede de vasos sanguíneos da mesma tíbia de camundongo da figura (d), após um processo de descalcificação.



Fonte: [16]

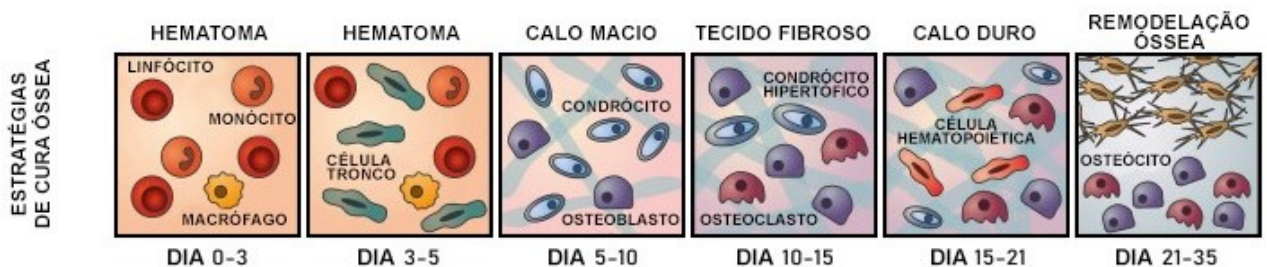
A vascularização é essencial no reparo ósseo adulto, onde a angiogênese e a osteogênese ocorrem de uma maneira acoplada que se assemelha aos mecanismos de desenvolvimento do tecido ósseo embrionário [17]. Após uma fratura, uma resposta inflamatória ativa fatores de crescimento e citocinas que recrutam células osteoprogenitoras para o local danificado. O coágulo inicial é uma matriz temporária para a invasão das redes vasculares e é substituído por fibrocartilagem e remodelado em osso [18]. Durante a remodelação óssea, os osteoclastos removem o tecido ósseo necrótico, enquanto a angiogênese ocorre ativamente para restaurar a circulação sanguínea normal. Com base neste mecanismo de reparo ósseo, o tecido esquelético regenerado tem propriedades físico-químicas comparáveis aos tecidos originais, com formação mínima de cicatriz fibrosa [19].

A cicatrização óssea envolve vários estágios (Figura 3). A fase inicial da consolidação óssea envolve a formação de um hematoma e o subsequente início de uma resposta inflamatória. As células-tronco mesenquimais (MSCs) e os condrócitos são recrutados para o dano ao tecido, este último secretando colágeno e outras proteínas da matriz que formam um calo mole. Esta

estrutura cartilaginosa estabiliza a fratura e serve como um modelo para a formação de novo osso. Ao mesmo tempo, novos vasos sanguíneos primários se formam para garantir o suprimento de sangue ao tecido de nova formação. Um tecido fibroso denso é formado dentro do calo mole e os condrócitos tornam-se hipertróficos enquanto as MSCs se diferenciam em osteoblastos. A mineralização do tecido fibroso resulta em cartilagem calcificada (calo duro) [20].

Finalmente, o calo ósseo sofre remodelação. Os osteoclastos reabsorvem a cartilagem mineralizada, enquanto os osteoblastos depositam osso lamelar maduro. A vasculatura primária regride e é substituída por vasos sanguíneos maduros [21]. Durante esta fase de remodelação óssea, os processos de degradação da matriz e formação óssea, que dependem de osteoclastos e osteoblastos, respectivamente, precisam ser finamente equilibrados. Embora os estágios iniciais de consolidação óssea levem cerca de 1 mês a 2 meses em humanos, a remodelação completa do osso regenerado pode levar vários anos, dependendo das condições biomecânicas[22].

**Figura 3:** Estágios de consolidação óssea e moléculas de sinalização envolvidas.



Fonte: Adaptado de [23].

O osso humano possui uma forte capacidade regenerativa que permite a restauração de sua função e estrutura após dano [21]. No entanto, enxertos ósseos ou materiais de substituição óssea são necessários para apoiar a regeneração do tecido ósseo quando esta capacidade regenerativa é comprometida, seja, por exemplo, doenças ósseas degenerativas ou formação de defeitos ósseos que excedem um certo tamanho crítico. Em comparação com os enxertos ósseos nativos, que contêm uma infinidade de fatores osteogênicos, a capacidade regenerativa de materiais substitutos ósseos artificiais, como implantes de metal, biocerâmicas de fosfato de cálcio ou preenchimentos poliméricos, é muito limitada [23].

Substitutos ósseos são estruturas que atuam como carga para cavidades e suporte transitório

para formação óssea. Existem muitos estudos que tratam da utilização de biomateriais para esse fim, como é o caso de compósitos de HAp e VB com potencial aplicação na medicina regenerativa e engenharia de tecidos [24].

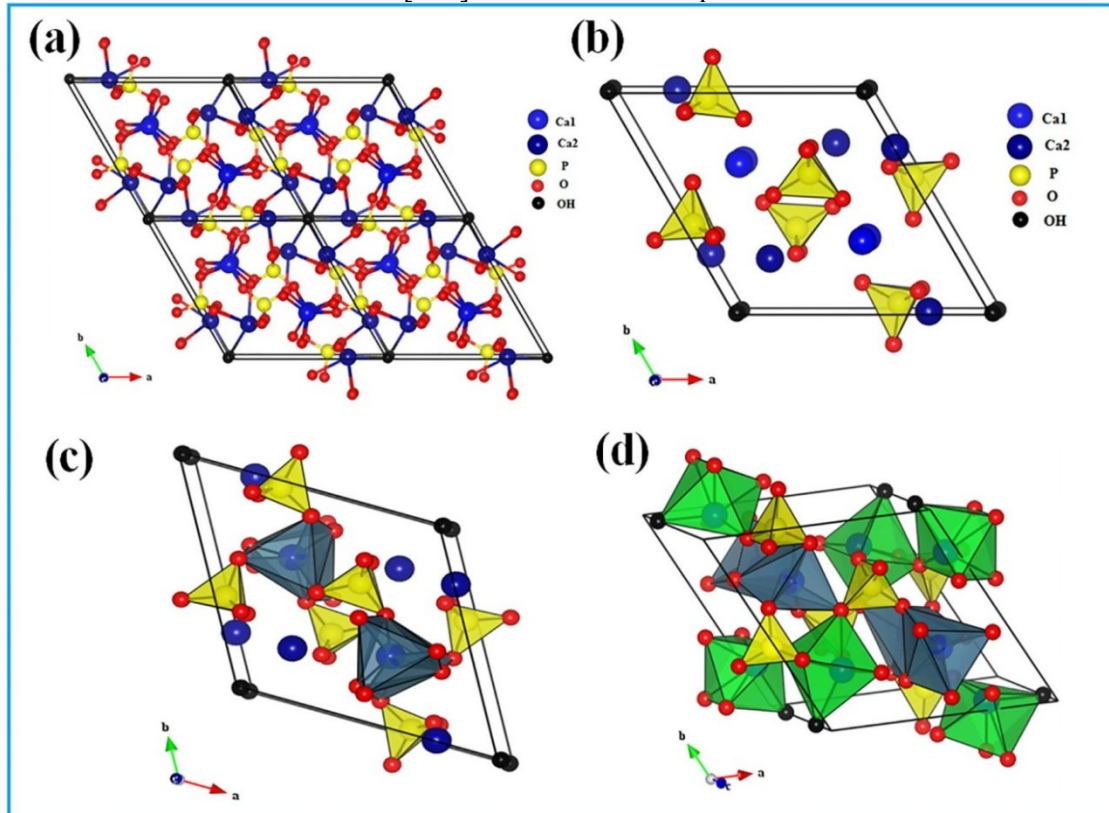
### **3.2. Biomateriais**

Quaisquer substâncias naturais ou sintéticas que podem ser usadas para restaurar ou reparar as funções dos tecidos vivos no corpo, são conhecidas como biomateriais [25]. Os materiais podem ser classificados, de maneira geral, como cerâmicos, metálicos e poliméricos. Na engenharia de tecidos são utilizados biomateriais, que podem ser classificados de acordo com sua origem, reação biológica e aplicação a que se destinam. Biomateriais podem ser de origem natural ou artificial, sendo classificados como materiais autógenos, aqueles cuja origem advém de áreas doadoras do próprio indivíduo, homogêneos, aqueles que advêm de indivíduos da mesma espécie, e heterogêneos, aqueles provenientes de indivíduos de espécies diferentes ou materiais de origem artificial. Com relação à reação biológica, um biomaterial pode ser classificado como tolerado quando caracterizado pela presença de tecido conjuntivo fibroso envolvendo o implante. Um biomaterial inerte é caracterizado pela formação física de contato, enquanto os bioativos são reconhecidos pela presença de uma interação físico-química entre implante e tecido. Os biomateriais reabsorvíveis são caracterizados pela dissolução progressiva do material. Quanto à aplicação, um biomaterial pode destinar-se à substituição de tecidos moles, tecidos duros ou tecidos do sistema cardiovascular [26].

#### **3.2.1. Hidroxiapatita**

A porção inorgânica do tecido ósseo é composta basicamente por fosfato de cálcio, no qual os átomos se arranjam na estrutura cristalina da HAp ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). O termo apatita refere-se à estrutura hexagonal do composto. A estabilidade da apatita é conferida pela rede de grupos  $\text{PO}_4^-$  [27]. A HAp é um fosfato de cálcio hidratado, principal componente de ossos e dentes de vertebrados. Isso lhe confere bioatividade e propriedades de reabsorção. Sua célula unitária consiste em grupos de cálcio, fosfato e hidroxila, empacotados em arranjo estrutural conforme mostrado na Figura 4[26].

**Figura 4:** Estrutura cristalina da HAp. (a) Projeção da célula unitária de HAp de acordo com o plano (0 0 1); (b) projeção mostrando a disposição dos octaedros [Ca(1)O<sub>6</sub>] na estrutura da HAp; (c) projeção mostrando a sequência do octaédrico [Ca (1) O<sub>6</sub>] e do tetraédrico [PO<sub>4</sub>] na estrutura da HAp; e (d) projeção mostrando a sequência do octaédrico: [Ca (1) O<sub>6</sub>] e [Ca (2) O<sub>6</sub>], e também tetraédrico [PO<sub>4</sub>] na estrutura da HAp.



Fonte: [28].

Além disso, a hidroxiapatita sintética possui propriedades semelhante a natural em termo de estabilidade natural, físico-química, resistência a desgaste e biocompatibilidade em osteocondutividade e osseointegração [29]. Entretanto, a implementação de HAp porosa em campos biomédicos é limitada devido às suas propriedades mecânicas não adequadas [30]. Para suprir as desvantagens da HAp porosa, especialmente em baixa resistência em sistemas de alta carga, muitas pesquisas foram realizadas sobre a adição de outros biomateriais à matriz HAp, entre eles o grafeno [31], metais como magnésio [32], polímeros [33] ou até mesmo outras cerâmicas como o vidro bioativo [24]. O VB é uma das adições proeminentes que pode ser facilmente incorporada na HAp [30].

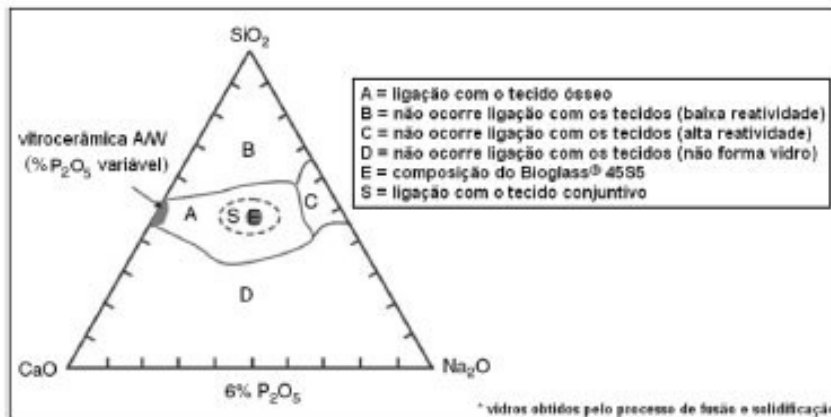
A HAP-91<sup>®</sup> (Hidroxiapatita Porosa Absorvível) utilizada nesse estudo é um biomaterial produzido pela empresa JHS Laboratório Químico Ltda., sintetizado a partir da reação química do hidróxido de cálcio (Ca(OH)<sub>2</sub>) com o ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). O produto possui um teor de 95% de HAp, sendo os outros 5% compostos por fosfatos. Por ser biocompatível e

possuir características de osteoindução (quimiotaxia) e osteocondução (haptotaxia), é um produto bastante utilizado como substituinte ósseo, enxertado na região onde se faz necessário a formação óssea. Quando a HAP-91<sup>®</sup> é inserida junto ao osso, ela funciona como suporte para regeneração do tecido ósseo. A HAP-91<sup>®</sup> permite que o tecido de regeneração se forme dentro de sua estrutura de poros, evitando seu encapsulamento por tecido conjuntivo fibroso e aumentando a velocidade de crescimento tecidual. Além disso, provém suporte nutricional ao tecido formado dentro de seus poros, produzindo uma continuidade com o osso ao seu redor [34].

### 3.2.2. Vidro bioativo

O desenvolvimento dos VBs ocorreu com Larry Hench em 1969. Desde então, diversas formas desse material foram empregadas na engenharia de tecidos, com aplicações variando entre preenchimento de cavidades ósseas, espaçadores intervertebrais e tratamentos odontológicos, dentre outras. Os VBs surgiram através do *Bioglass*<sup>®</sup> 45S5, com composição química dada por  $45\text{SiO}_2-6\text{P}_2\text{O}_5-24,5\text{CaO}-24,5\text{Na}_2\text{O}$ . O *Bioglass*<sup>®</sup> 45S5 é considerado o modelo padrão dos biovidros, possuindo elevada capacidade de estimulação óssea. Entretanto, sua baixa resistência mecânica levou à busca por novas composições no intuito de se obter materiais com maior estabilidade mecânica [35]. Mesmo que a dissolução dos vidros e a formação da camada cristalina de HAp se prolonguem por um período de tempo bastante longo, a nucleação dos primeiros cristais de HAp tem se mostrado bastante rápida e dependendo da porcentagem molar de  $\text{SiO}_2$  no vidro [36-37]. De fato, se o conteúdo molar for inferior a 53% em mol, o HAp cristaliza em menos de 2 horas e o vidro pode se unir, por meio dessa interface do HAp, tanto ao osso quanto aos tecidos moles colagenosos. Quando a presença de óxido de silício é aumentada em até 58% em mol, a cristalização é mais lenta e leva dois dias para acontecer. Esses tipos de vidro se unem apenas ao tecido ósseo. Se o teor de sílica for superior a 60%, o vidro deixa de ser bioativo e não se liga ao osso nem aos tecidos moles. Não há evidência de HAp cristalina após quatro semanas de imersão, mesmo que haja a formação da camada amorfa de cálcio-fosfato [37] (Figura 5).

**Figura 5:** Diagrama ternário SiO<sub>2</sub>-CaO-Na<sub>2</sub>O mostrando as composições típicas dos VBs.



Fonte: [38].

O conceito de bioatividade refere-se à capacidade que um material possui de induzir uma resposta biológica específica em sua interface com o tecido adjacente, permitindo a formação de uma forte ligação com o mesmo. Cabe salientar que o tempo de formação, o mecanismo envolvido e a espessura da ligação variam de acordo com o material utilizado e com suas características [35].

A bioatividade de um material depende da sua estrutura e da presença de grupos funcionais como os hidroxila no caso da HAp, e de grupos que promovem reações de troca iônica e solução-precipitação como no VB [27]. A bioatividade dos VBs é dependente da cinética de modificação da sua superfície. Quando presentes em meios fisiológicos, esses materiais experimentam a formação de uma camada de HAp carbonatada (HAC) biologicamente ativa e que proporciona a interface de ligação com os tecidos. A HAC é quimicamente e estruturalmente equivalente à fase mineral do tecido ósseo, sendo capaz de proporcionar o desenvolvimento de uma interface aderente que resiste a grandes esforços mecânicos. Em muitos casos, a resistência interfacial de adesão é equivalente ou maior do que a força coesiva do material implantado ou do substrato tissular. Em alguns casos é observada a ruptura mecânica no implante ou na medula óssea, mas não na interface. Cabe salientar que há forte dependência da composição do material e da sua bioatividade [39]

O nível de bioatividade de um material, em termos de interação com o osso hospedeiro, pode ser estimado através do índice de bioatividade, IB, que é definido como [34]:

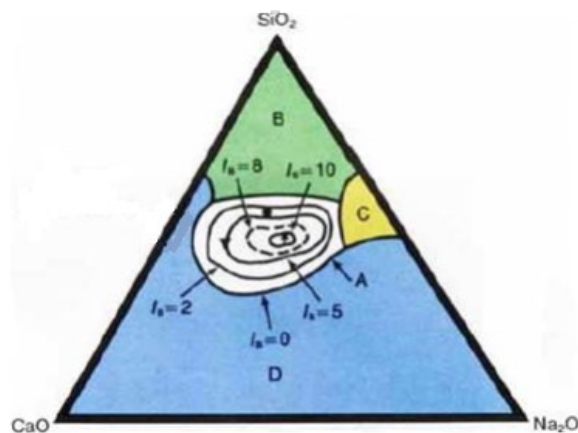
$$I_B = \frac{100}{t_{0,5}^{06}}$$



onde  $t_{0,5bb}$  é o número de dias necessários para que 50% da superfície do material se ligue ao tecido vivo.

Foi relatado que a espessura da zona de união entre um implante bioativo e o osso é proporcional ao valor de IB [37], [39]. Normalmente, a bioatividade de um vidro está estritamente correlacionada com a taxa de crescimento da camada de HAp em sua superfície, tanto *in-vitro* quanto *in vivo*. O processo de formação da HAp começa quando o vidro bioativo é implantado no corpo humano (cenário *in vivo*) ou é embebido em soluções (testes *in-vitro*) que mimetizam a composição de fluidos corporais (principalmente plasma sanguíneo), como o fluido corporal simulado (SBF) desenvolvido por Kokubo et al. [40], [41] e posteriormente, padronizado através da ISO 23317: 2014 Implantes para cirurgia — Avaliação *in-vitro* da capacidade de formação de apatita dos materiais de implante (Figura 6).

**Figura 6:** Índice de bioatividade ( $I_B$ ) em função da composição em peso dos VBs. A região A é denominada limite de bioatividade. Materiais da região B comportam-se como quase inertes com o surgimento de cápsula fibrosa ao redor do implante. Na região C estão materiais reabsorvíveis. Materiais com composição na região D não são utilizados como implantes.



Fonte: Adaptado de [18]

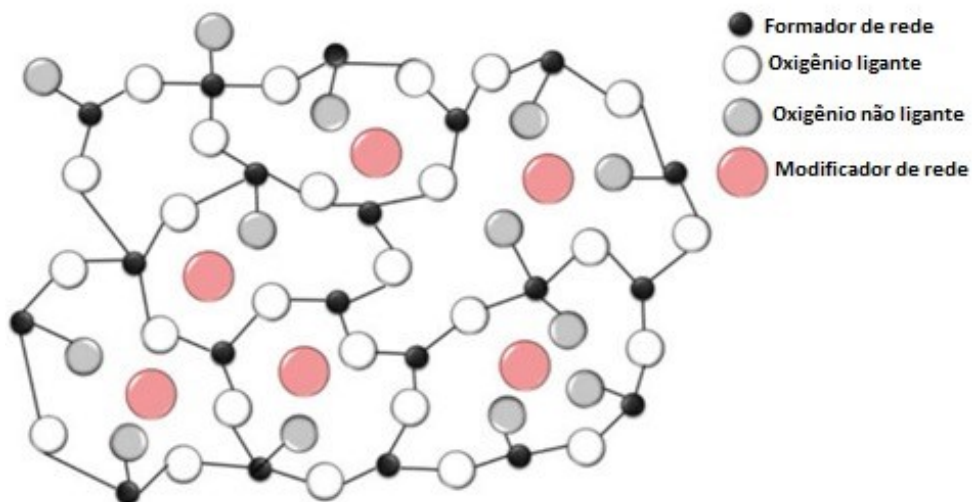
Os VBs são materiais promissores para a reparação óssea com alta bioatividade e biocompatibilidade, além de potencial ação osteoindutora (osteogênese comprovada experimental e clinicamente). Estudos *in-vitro* demonstraram que os VBs são biodegradáveis, biocompatíveis e bioativos. Sua habilidade em se associar ao tecido ósseo é atribuída à formação de uma camada de HAC sobre a superfície do VB em contato com fluidos corpóreos. Durante a cristalização da camada de HAC pode ocorrer a mineralização de fibras colágenas, promovendo dessa forma uma forte união na interface osso/biomaterial. A formação dessa camada de HAC é condição essencial para materiais artificiais exibirem bioatividade [42].



Duas metodologias são comumente utilizadas na obtenção de VBs: método de fusão/têmpera e tecnologia sol-gel [43].

A rota sol-gel se baseia na mistura de um precursor inorgânico com uma solução contendo um solvente, água e um agente catalizador ácido ou básico. Esse método tem sido amplamente utilizado para preparar novos VBs. Normalmente, os precursores comuns para vidros sol-gel à base de sílica incluem alcóxidos, como tetraetil ortossilicato (TEOS), trietil fosfato (TEP) ou ácido fosfórico, além de sais de cálcio. O processo sol-gel tem início com uma suspensão coloidal (sol), composta por partículas nanométricas dispersas em um meio líquido. Através da subsequente formação de ligações cruzadas, o sol fluido pode se transformar em um gel rígido. A etapa de gelificação é seguida pelas de envelhecimento, secagem e tratamento térmico em temperaturas que normalmente variam entre 600°C e 800 °C. As principais vantagens da técnica sol-gel não são apenas a baixa temperatura de processamento, mas também a composição homogênea dos materiais obtidos em comparação com o método tradicional de fusão/têmpera. Além disso, o método sol-gel pode ser utilizado para a preparação de VBs com elevada área específica de superfície, sendo esse um dos principais fatores para promover as interações entre os VBs e o ambiente fisiológico, o que causa uma rápida formação da camada de HAC. Além disso, VBs derivados do método sol-gel podem ser produzidos com tamanho nanométrico de partícula [44]. No entanto, o método sol-gel pode requerer vários dias para a transição do estado sol para gel [45]. Na Figura 5 é exibido um esquema da estrutura de um VB obtido por tecnologia sol-gel.

**Figura 7:** Representação esquemática da estrutura de um VB obtido por sol-gel.



Fonte: [46]

A maioria dos vidros monolíticos é produzida por meio do processo clássico de fusão-têmpera e alguns podem ser convertidos em vidro-cerâmica por tratamentos térmicos controlados. Tais tratamentos são geralmente realizados em temperaturas relativamente baixas, não muito longe da transição vítrea,  $T_g$ , para induzir a nucleação interna, seguido por um segundo estágio em uma temperatura um pouco mais alta para promover a cristalização de diferentes fases. Outro processo, menos frequente, baseado no processamento do pó é às vezes usado, no qual os pós de vidro são moldados e então sinterizados e simultaneamente cristalizados. Os parâmetros de processamento são selecionados de forma que o vidro amoleça antes da cristalização e passe por um fluxo viscoso e densificação antes que o processo de cristalização seja concluído. A sinterização e a cristalização geralmente ocorrem simultaneamente, e as superfícies livres de vidro estimulam a cristalização, portanto, o controle preciso da composição química, tamanho de partícula, temperatura e tempo são essenciais [47].

A maioria dos VBs exibe a tendência de cristalizar parcialmente durante a sinterização, transformando-se em materiais vitrocerâmicos. O exemplo mais famoso é o 45S5 Bioglass®, para o qual a distribuição  $Q_n$  (Si) ( $n$  = número de oxigênios em ponte) resulta em uma estrutura dominada por cadeias de metassilicatos  $Q_2$  que são ocasionalmente reticulados por meio de unidades  $Q_3$ , enquanto as espécies  $Q_1$  encerram a distribuição das cadeias. O resultado final é uma rede de silicato altamente rompida com alta reatividade em ambiente fisiológico, bem como baixa temperatura de transição vítrea e maior tendência de desvitrificação ao aquecimento devido à baixa estabilidade química da rede. Quando um vidro se desvitrifica, as fases cristalinas que se nuclearam e crescem dentro da matriz amorfa não apenas melhoram a resistência do material, mas também o tornam quimicamente mais estável. Nesse sentido, uma das maiores preocupações relacionadas à sinterização de VBs é de fato a subsequente diminuição do potencial bioativo, uma vez que os fenômenos de liberação de íons envolvidos no mecanismo de bioatividade estão relacionados principalmente à fase amorfa. Como resultado, a janela de sinterização ideal para o processamento de VB é convencionalmente definida entre a temperatura de transição vítrea e o início da cristalização do material. Dentro desta faixa, a temperatura não é alta o suficiente para induzir a desvitrificação do sistema, mas sim o suficiente para permitir a formação de gargalos de sinterização entre as partículas de vidro adjacentes por meio de fluxo viscoso e mecanismos difusivos, preservando idealmente a bioatividade do vidro [48].

Segundo Nawaz e colaboradores, é importante entender o mecanismo de transformação

estrutural que ocorre durante o tratamento térmico de vidros bioativos 45S5. Os efeitos do tratamento térmico e da cinética de cristalização de vidros bioativos 45S5 derivados de fusão foram estudados ao longo dos anos. Estudos revelaram que cinco grandes transformações estruturais ocorrem durante o tratamento térmico de vidros bioativos 45S5 até 1000 °C: uma primeira transição vítrea, separação de fase dos vidros, dois processos de cristalização e uma segunda transição vítrea. A literatura disponível sobre o comportamento de cristalização do vidro bioativo 45S5 relata a formação de  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$  como fase cristalina principal quando o vidro bioativo 45S5 é tratado termicamente acima de 600 °C. Algumas fases menores de  $\text{Na}_2\text{CaSi}_3\text{O}_8$ ,  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$  e fases de fosfato de cálcio semelhante a apatita também foram detectadas. No entanto, a verdadeira composição dos cristais que aparecem durante os tratamentos térmicos do vidro bioativo ainda permanece obscura [49].

### 3.2.3. Colágeno

O colágeno tipo I é a proteína mais abundante do corpo humano e um dos principais componentes do osso. É constituído por hidroxiprolina com a estrutura de uma hélice tripla. Tem uma longa história como material para aplicações biomédicas devido às suas características tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades biológicas e papel natural na formação de tecidos. O colágeno é um biomaterial útil devido à sua alta afinidade com a água, biodegradação controlável, propriedades hemostáticas, baixa resposta inflamatória do hospedeiro, não-citotoxicidade e aptidão para facilitar a adesão celular. Uma propriedade significativa do colágeno é a sua integridade estrutural para servir como um modelo para deposição de fosfatos de cálcio no osso, o que torna um material muito conveniente para engenharia de tecido ósseo [12].

Atualmente, há uma variedade de membranas de colágeno reabsorvíveis disponíveis comercialmente, incluindo membranas de colágeno nativo, membranas reticuladas, de origem de bovina, suína, de camada simples ou camada dupla, entre outras [50-51].

As membranas de colágeno naturais (MCN) são materiais nativos, minimamente processado, exibindo uma estrutura de colágeno tridimensional natural de colágeno tipo I e podem apresentar uma proporção menor de colágeno tipo III. O processo inclui várias etapas de lavagem com diferentes soluções de pH para obter neutralização e desantigenização. No final do processo, um procedimento de liofilização e esterilização é aplicado. Em termos de

biocompatibilidade, integração de tecidos e complicações pós-operatórias, os resultados da revisão de Garcia sugerem que as MCN apresentam melhores resultados. A estrutura porosa do MCN é adequada para a formação de vasos sanguíneos transmembrana, o que também pode facilitar a reabsorção da membrana [52]. Calciolari et al. mostraram que as MCN, derivadas do colágeno suíno tipo I e III, são biocompatíveis e inertes, não provocam reação inflamatória ou de corpo estranho e são capazes de promover o processo de regeneração óssea [53].

Em relação à origem do colágeno, MC produzidas a partir de colágeno tipo I e III de tecido porcino e bovino são os tipos mais comuns de colágenos xenogênicos para uso em técnicas de RTG [54]. Ramires avaliou e comparou a eficácia das membranas colágenas bovinas e suínas como barreiras à invasão do tecido conjuntivo durante o reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos e concluiu que ambas as membranas promoveram a RTG [55]. Neto avaliou a biocompatibilidade e biodegradação de uma membrana de colágeno bovino (Lyostypt®, São Gonçalo, Brasil) em comparação a uma membrana de colágeno suíno (Bio-Gide®) implantada no tecido subcutâneo de camundongos e concluiu que ambas as membranas são biocompatíveis, uma vez que suas reações teciduais foram compatíveis com o processo inflamatório fisiológico [56].

Considerando dispositivos médicos produzidos a partir de colágeno liofilizado, ácidos, como ácido acético, ácido cítrico e ácido clorídrico, de baixa concentração podem ser usados para solubilizar e reconstituir as fibras de colágeno. Yang et al. concluíram que o ácido cítrico tem o melhor efeito para extrair o colágeno, sendo o ácido acético em segundo lugar e o ácido clorídrico por último [57]. No entanto, de acordo com Skierka e Higham, o ácido mais eficaz para a solubilização do colágeno foi o ácido acético e o solvente menos eficaz foi o HCl [58]. Uma solução 0,5 M de ácido acético foi o meio de reconstituição e solubilização do colágeno na produção do material.

Muitos biomateriais à base de colágeno são comercializados no estado seco. A secagem tem forte impacto na estrutura do material resultante e pode ser usado para gerar poros de tamanho e forma definidos e também prolonga a vida útil antes do uso. Não menos importante, a maioria dos procedimentos para esterilizar materiais de colágeno só pode ser aplicada quando os materiais estão secos [50].

A liofilização é uma tecnologia comum para remover água de preparações aquosas de colágeno e gerar uma estrutura porosa. O colágeno é congelado em gradientes de temperatura adequados entre  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e as forças capilares são suprimidas pela formação de cristais de gelo. Por sublimação do gelo sob vácuo, a água é removida. A estrutura porosa final refere-se à estrutura dos cristais de gelo no estado congelado. Esta técnica permite fabricar poros de tamanho definido. A liofilização é usada para fabricar esponjas com aplicações planas ou cilíndricas para aplicações hemostáticas no tratamento de feridas e odontologia[54]. O material estudado neste trabalho é seco por liofilização, onde acontece também a remoção do ácido acético utilizado em sua reconstituição/ solubilização.

Cada material de colágeno usado em clínicas ou em cultura de células deve estar livre de todas as formas de vida ou componentes infecciosos. A tecnologia de descontaminação utilizada depende das etapas do preparo e da possível contaminação prévia. Se o procedimento de esterilização não for aplicado ao material finalmente embalado no final do processo, as etapas subsequentes após o procedimento de esterilização devem ser realizadas em condições assépticas[50].

### **3.3. Compósitos de hidroxiapatita-vidro bioativo**

Fosfatos de cálcio e, em especial a HAp, estão entre os biomateriais mais empregados em engenharia de tecidos ósseos. A similaridade química da HAp sintética com a fase mineral do osso permite o crescimento ósseo, favorecendo o processo de osteocondução. Contudo, o baixo índice de bioatividade e a baixa velocidade de degradação da HA são fatores limitantes para sua aplicação como enxerto ósseo. O índice de bioatividade ( $I_B$ ) de um material pode ser relacionado com o tempo,  $t$ , em dias, para que mais de 50% de sua superfície esteja ligada às células do tecido[38]. Diferentemente da HAp, os VBs possuem elevado índice de bioatividade, apresentando osteoindução e favorecendo a colonização da sua superfície por células mesenquimais [59]. A Tabela 1 apresenta comparativo do índice de bioatividade e propriedades mecânicas para diferentes biomateriais.

**Tabela 1:** Índice de bioatividade ( $I_B$ ) e propriedades mecânicas observadas em diferentes biomateriais.

Biocerâmicas	Bioglass® 45S5	Bioglass® 52S4.6	Cerabone® A/W	Ceravital®	Bioverit® I	HA <sub>s</sub>	BioloX® Forte	Biosilicato® (monolítico)
Índice de bioatividade ( $I_B$ )	12,5	10,5	6	5,6	$I_B < 8$	3,1	0	$I_B > 8$
Resistência à flexão (MPa)	40	40	215	100-150	140-180	50-200	466	120-210
Resistência à compressão (MPa)	?	?	1080	500	500	500-100	4400	?
Módulo de elasticidade (GPa)	60	60	120	100-160	70-90	80-110	380	70-80
Estrutura	fase vítrea	fase vítrea	$\beta$ -CaSiO <sub>3</sub> ( <sup>1</sup> )apatita fase vítrea	( <sup>1</sup> )apatita fase vítrea	( <sup>1</sup> )flogopita ( <sup>1</sup> )apatita fase vítrea	( <sup>2</sup> )apatita	$\alpha$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1N2C3S
Usinabilidade	baixa	baixa	baixa	baixa	boa	baixa	baixa	média

?: dado não encontrado na literatura. Cerabone® A/W: vitrocerâmica /  $\beta$ -CaSiO<sub>3</sub>; *beta*-wollastonita / (<sup>1</sup>): composição não definida. Ceravital®: vitrocerâmica / (<sup>1</sup>): composição não definida. Bioverit® I: vitrocerâmica / (<sup>1</sup>): composição não definida. HA<sub>s</sub>: hidroxiapatita sintética / (<sup>2</sup>): (Ca)<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>. Biosilicato®: vitrocerâmica com cristalinidade próxima a 100%. 1N2C3S: silicato de sódio e cálcio (1N = sódio; 2C = cálcio; 3S = silício)

Fonte: [17].

Pesquisadores já experimentaram combinar a HAp e o VB para desenvolver biomateriais compósitos com propriedades mecânicas e biológicas melhoradas [60]. Ibrahim et al. [30] obtiveram compósito HAp/VB a partir da mistura desses materiais. HAp comercial e pó de 45S5 foram misturados dentro de um frasco de polietileno por 24 horas com diferentes proporções de peso de HAp para 45S5 (10:0, 0,8:0,2, 9,4:0,6, 9:1). A mistura foi então prensada em forma de pellet em molde de aço inoxidável de 10 mm de diâmetro aplicando um peso de 5 toneladas. O pellet de corpo verde foi sinterizado a 800 °C por três horas de imersão a fim de preservar as propriedades do vidro após tratamento térmico. Os padrões de DRX da amostra de HAp reforçada com 2% em massa e 6% em massa de 45S5 contém hidroxiapatita e  $\beta$ -TCP como a fase secundária. Silicato de fosfato de cálcio (Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub>, ICDD # 73-1181) presente como a fase primária para amostra de HAp reforçada com 10% em massa de 45S5. A existência de novas fases indica que há interação entre o 45S5 e a HAp. Partículas de pó fino tendem a aglomerar-se provavelmente devido à força de Van der Waals e aos efeitos da umidade circundante [19]. Partículas de 45S5 incorporadas foram observadas com adição de até 10% em peso na matriz HAp. A morfologia da fase vítrea foi obviamente observada na amostra com 2% em massa de 45S5. No entanto, a fase vítrea não é tão observada, pois a temperatura de sinterização usada neste trabalho foi inferior a 800 °C.

A adição de pó de vidro bioativo tende a aumentar a cinética de sinterização devido à menor energia necessária [17, 20]. No entanto, uma ligeira diminuição no valor da resistência à compressão é obtida para a amostra de HAp com adição de 10% em massa de 45S5. A decomposição dos óxidos usados na fabricação do 45S5 durante a sinterização do compósito pode induzir a formação de poros e vazios com impacto nas propriedades mecânicas. O compósito com melhoria nas propriedades mecânicas é fabricado com sucesso em baixa

temperatura de sinterização, 800 °C, via reforço com pó 45S5 BG fabricado. Valor do intervalo de resistência à compressão para amostras que contêm entre 6% e 10% em massa de 45S5, que está dentro do requisito de osso crítico, indica possibilidade positiva de ser testado em aplicação médica.

Tancred *et al.* relataram que o preparo de compósito HAp/VB mediante adição de 2,5% em massa de VB não produziu um aumento na resistência em relação à HAp pura, mas resultaram em matrizes de HAp contendo frações apreciáveis de  $\beta$ -TCP e  $\alpha$ -TCP. Amostras contendo mais que 10% em massa de VB provocaram grande degradação da HAp, resultando em compósitos porosos e com elevadas quantidades de  $\alpha$  e  $\beta$ -pirofosfato de cálcio, o que os tornou mecanicamente instáveis [10].

Kapoor e Batra prepararam compósitos de HAp contendo entre 2,5% e 10% em peso de VB fosfatado composto por 40% Na<sub>2</sub>O – 30% CaO – 30% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (proporção em massa). Os compósitos continham quantidades variáveis da fase  $\beta$ -TCP, dependendo da fração de VB adicionado. Os materiais compósitos atingiram maiores valores de resistência à compressão em relação à HAp pura sinterizada, sendo que o compósito contendo 10% em peso de VB apresentou o maior nível de bioatividade [61].

Salih *et al.* observaram em seu trabalho que a quantidade de  $\beta$ -TCP formada em amostras de HAp/VB aumentou com a elevação da porcentagem de VB. Ainda, o aumento do teor de VB fez com que a fase  $\beta$ -TCP se transformasse em  $\alpha$ -TCP em temperaturas mais baixas. Este resultado justifica a diminuição da resistência à flexão observada para as amostras que continham 5% em peso de VB em relação a amostras que possuíam 2,5% em peso de VB. Quanto à bioatividade, os autores examinaram a reposta dos materiais produzidos a células humanas do tipo osteoblastos. Todos os materiais favoreceram a proliferação celular após 7 dias de cultura. Embora o crescimento celular tenha sido menor do que o observado para o grupo controle, não se observou um efeito deletério do compósito contendo 5 % de VB em comparação com a HAp pura. Assim, a modulação do teor de VB em compósitos HAp/VB poderia ser usada para produzir não apenas resistência mecânica aprimorada, mas também uma biocompatibilidade aprimorada [62].

Compósitos obtidos pelo tratamento térmico de misturas do VB 55S (composição peso (%)):

41CaO–55SiO<sub>2</sub>–4P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) obtido por sol-gel e HAp foram caracterizados por um aumento na porosidade e no tamanho dos poros em relação aos materiais puros [6, 63]. O método sol-gel consiste na preparação de uma solução composta por metais e precursores de sais orgânicos metálicos, seguida da formação de um gel e, por último, de um tratamento térmico adequado para a secagem e converter os pós de gel em pós de vidro / vitrocerâmica. Esse protocolo possibilita a obtenção de vidros com uma faixa composicional de bioatividade ampliada, juntamente com uma composição muito controlada, homogeneidade e pureza superiores [43]. Além disso, os pós de vidro derivados do sol-gel exibem alta porosidade e tamanho de partícula extremamente fino (submicrométrico), o que resulta em uma área superficial específica maior e, portanto, em uma degradabilidade significativa. A alta osteocondutividade de tais sistemas também foi confirmada [24]. Além disso, uma microestrutura heterogênea é geralmente observada. Deve-se notar que, para realizar tais sistemas, dois caminhos diferentes podem ser seguidos: é possível sintetizar o vidro, adicioná-lo aos pós de HAp e, em seguida, tratar termicamente a amostra, ou pode-se misturar o pó de HAp e o gel diretamente e, posteriormente, calcinar a mistura para converter o gel em um sol e sinterizar o compósito ao mesmo tempo. A alta reatividade vidro/gel e sua forte tendência de cristalização podem induzir a transformação da HAp em TCP, além da formação de silicatos como wollastonita, pseudowollastonita (CaSiO<sub>3</sub>) e silicocarnotita (Ca<sub>5</sub>[(SiO<sub>4</sub>)(PO<sub>4</sub>)](PO<sub>4</sub>)), dependendo da porcentagem de vidro/gel nas amostras e do tratamento térmico empregado. A solubilidade, bioatividade e porosidade dos compósitos podem ser adaptadas a requisitos clínicos específicos, alterando-se a quantidade de VB adicionada [24].

Parkhomey *et al.* [64] prepararam compósitos porosos de vitrocerâmica à base de hidroxiapatita biogênica (osso bovino) ou vidro borossilicato de sódio a partir de materiais particulados com diferentes tamanhos de partícula. Foi utilizada a rota tradicional de fusão/têmpera conduzida a 1100 °C para obtenção dos materiais à base de HAp, enquanto os compósitos contendo vidro borossilicato de sódio (49 %SiO<sub>2</sub> – 28 %Na<sub>2</sub>O – 23 %B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, composição em massa) foram preparados por prensagem e sinterização ao ar a 800 °C. A análise comparativa da estrutura e propriedades físicas e mecânicas dos compósitos obtidos demonstrou que durante a etapa de sinterização dos compósitos à base de vidro de fosfato ocorre uma transformação de fase e a interação dos fosfatos com a fase vítrea, resultando na formação de uma vitrocerâmica. A análise da estrutura porosa de compósitos vitrocerâmicos mostrou uma diferença significativa na distribuição do tamanho de poros, dependendo da composição do material. Foi observado que os compósitos à base de hidroxiapatita biogênica



são mais estáveis mecanicamente do que materiais à base do vidro de fosfato. Ainda, compósitos preparados a partir de material com partículas inferiores a 50  $\mu\text{m}$  exibem maiores resistências mecânicas do que os obtidos a partir de partículas superiores a 160  $\mu\text{m}$  devido a uma sinterização mais fácil.

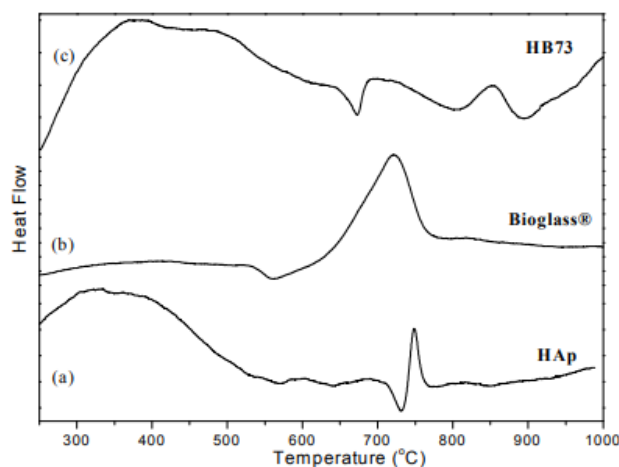
Com o intuito de explorar as possibilidades de reforço microestrutural da HAp, Bonan *et al.* [65] descreveram método de síntese com adição de VB, visando melhorias tanto das propriedades mecânicas quanto da bioatividade da HAp. A melhoria das propriedades mecânicas do compósito HAp-VB está relacionada principalmente à redução de porosidade, sendo diretamente dependente da temperatura de sinterização e da quantidade de VB adicionada. Não houve relatos quanto ao ganho de bioatividade do material compósito.

Oktar e Golle [66] avaliaram a resistência à compressão, densidade e dureza do compósito HAp-VB com VB contendo dois (45,5 % $\text{P}_2\text{O}_5$  e 54,5 % $\text{CaO}$  – % em massa) ou três óxidos (45 % $\text{P}_2\text{O}_5$ , 28 % $\text{CaO}$  e 27 % $\text{Na}_2\text{O}$  – % em massa). Foram adicionados 5% e 10% de VB e empregadas temperaturas de sinterização de 1200 e 1300 °C. Os autores observaram que a melhoria das propriedades avaliadas foi dependente de fatores como temperatura de sinterização, a quantidade e o tipo de VB utilizado. Entretanto, se notou a ocorrência da cristalização da fase vítrea durante os tratamentos térmicos, o que não é interessante para a bioatividade do produto final.

Chatzistavrou *et al.* [67] examinaram os efeitos da carga de VB e do tratamento térmico sobre as propriedades biológicas do compósito HAp/VB. Nesse estudo, foram utilizados os compostos contendo 70% em massa de hidroxiapatita e 30% em massa de vidro bioativo (HB73). A HAp era um produto comercialmente disponível de hidroxiapatita estequiométrica pura (SIGMA-ALDRICH) e o vidro bioativo utilizado foi o Biovidro® (Enxerto ósseo sintético de Perioglass Particulado, Biomateriais dos EUA), que contém 45% de  $\text{SiO}_2$ , 24,5% de  $\text{Na}_2\text{O}$ , 24,5% de  $\text{CaO}$  e 6% de  $\text{P}_2\text{O}_5$ , em massa. O material preparado foi submetido a técnicas de termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA) para avaliação do comportamento térmico dos materiais estudados. Pellets com as quantidades desejadas de pós HAp e VB foram preparados por prensagem em prensa a vácuo. Metade dos pellets produzidos foram sinterizados a 1000 °C por 3 horas, com taxa de aquecimento de 10 °C/min<sup>-1</sup>, enquanto o restante serviu de controle. A bioatividade foi examinada após a imersão dos controles e dos pellets HAp / VB sinterizados em Fluido Corporal Simulado (SBF), e as

medições pós imersão em SBF foram realizadas através da espectroscopia de infravermelho por Transformado de Fourier (FTIR), coletados no modo de transmitância, na região MIR [67]. Os termogramas DTA de HA puro, VB puro (Bioglass®) e pó composto HAp/VB, apresentaram as temperaturas características destes materiais. Particularmente, o vidro bioativo apresentou uma transição vítrea a 560 °C, cristalização entre 700 °C e 800 °C e até 1000 °C, permaneceu estável. As fases formadas foram acompanhadas pela análise dos espectros de FTIR. De acordo com os resultados do FTIR, identificou-se duas fases presentes na amostra cristalizada aquecida a 700 °C e 800 °C. O silicato de cálcio e sódio ( $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ ) foi evidenciado como a principal fase cristalina presente, enquanto uma segunda fase cristalina apareceu, como um fosfato de cálcio ou uma fase apatita ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ). A curva DTA do HAp confirma sua estabilidade térmica, pois para aquecimento até 1000 °C apresentou uma fraca transformação (pequena variação <0,5% na curva TG) a 750 °C, onde se observa um evento exotérmico (Fig. 8a). Nos espectros FTIR de HAp aquecido a 800 °C e 900 °C, em temperaturas superiores à temperatura de transformação, de 750°C, constata-se um importante aumento da cristalinidade, enquanto o aparecimento de novos eventos térmicos em  $540\text{ cm}^{-1}$ ,  $1032\text{ cm}^{-1}$ ,  $1078\text{ cm}^{-1}$ ,  $1088\text{ cm}^{-1}$  e  $1120\text{ cm}^{-1}$  e inflexões em  $550\text{ cm}^{-1}$ ,  $612\text{ cm}^{-1}$  e  $1060\text{ cm}^{-1}$ , indicam o início da formação da fase  $\beta$ -TCP (Fig. 9). Por outro lado, a HAp aquecida em temperaturas mais baixas até 750 °C não apresentou nenhuma alteração, em comparação com HAp não aquecido (Fig.9b) [67].

**Figura 8:** Curvas DTA de pós puros de HAp(a), de VB (Bioglass®) (b) e de pó composto HAp / VB (HB73) (c).

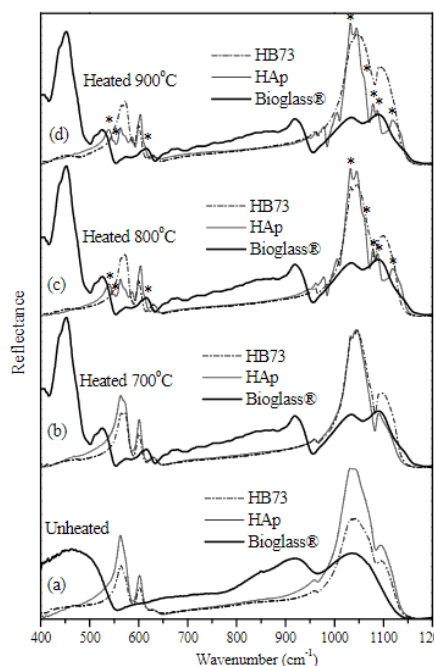


Fonte: [67]

O espectro de FTIR de HAp / VB não tratado termicamente é exatamente o mesmo do respectivo espectro de HAp não aquecido, pois a participação do HAp no pó do composto é

importante (70%) enquanto simultaneamente o Bioglass® com a menor proporção (30%) apresenta em o respectivo espectro, eventos fracos e largos que não podem ser identificados no espectro de HB73 devido à sobreposição (Fig. 9a). A curva DTA do pó composto HAp/VB apresenta duas temperaturas características de 730°C e 850°C, onde dois processos exotérmicos estão ocorrendo (Fig. 8c). O pico exotérmico a 730°C é atribuído ao processo de cristalização do Bioglass®. Este evento exotérmico é mais amplo em comparação com o respectivo pico do Bioglass® puro e é atribuído à sua pequena participação na amostra do composto. Como resultado, o respectivo espectro de mistura aquecida nesta temperatura não revela os picos característicos do Bioglass® aquecido na mesma temperatura (Fig. 9). O segundo pequeno pico exotérmico a 850°C, leva a um ligeiro aumento da cristalinidade da amostra do composto. Isso pode ser seguido a partir dos espectros de refletância de amostras de HB73 tratadas termicamente a 700 °C, 800 °C e 900 °C que revelam que não há interação significativa entre esses dois materiais que poderiam causar a formação óbvia de novas fases, uma vez que não há alteração clara nesses espectros que poderia ser atribuído a uma nova fase. Há apenas um pequeno aumento da nitidez dos picos, devido ao respectivo aumento da cristalinidade da amostra (Fig. 9b, c, d). Ao contrário, deve-se mencionar que a participação do Bioglass® na amostra do composto resulta em um retardo característico do importante aumento da cristalinidade da HAp e também no surgimento da fase  $\beta$ -TCP [67].

**Figura 9:** Espectros de FTIR de VB Bioglass®, HAp e composto HAp/VB (HB73) calcinados a 700, 800 e 900°C. \* aponta os picos característicos de  $\beta$ -TCP



Fonte: [67]

Embora não seja observada a formação de nenhuma nova fase no pó compósito HB73 aquecido para 900 °C com taxa de aquecimento 10 °C/min, o espectro FTIR de HAp/VB sinterizado a 1000 °C por 3 horas com a mesma taxa de aquecimento, confirma o aparecimento da fase  $\beta$ -TCP. O comportamento bioativo do compósito HB73 foi examinado e comparado com o respectivo de HAp por imersão de pellets de HB73 e HA em SBF por diferentes períodos de tempo. Estudando *in-vitro* o comportamento bioativo da Hidroxiapatita/Biovidro® em forma de pellets, foi observada uma formação mais rápida de HAC nos pellets de HAp/VB não aquecidos. Este comportamento é exclusivamente atribuído à maior solubilidade do Biovidro não aquecido. Além disso, foi observado que a sinterização em 1000 °C de HB73 e a maior cristalinidade resultante reduzem a taxa de formação da camada de HAC, causando um atraso na resposta bioativa, uma vez que a solubilidade e o mecanismo de formação de HAC resultante foram diminuídos com o aumento no tamanho do cristalito e cristalinidade dos pellets dos compósitos devido à menor área superficial de contato com a solução. Esta observação é compatível com a conclusão de que a cristalização e sinterização de Biovidro® pode influenciar sua bioatividade [67].

Lee *et al.* utilizaram particulados de HAp após calcinação a 1200 °C, seguido de etapas de moagem e peneiramento até 220  $\mu$ m. O VB com uma composição molar de 53,9% SiO<sub>2</sub>, 22,6% Na<sub>2</sub>O, 21,7% CaO e 1,7% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> foi fabricado a partir dos precursores SiO<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>, CaCO<sub>3</sub> e P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. A seguir, o material preparado foi pulverizado. Os particulados de HAp e VB foram misturados úmidos em etanol em várias proporções (30 %, 40 % e 50 % em peso). Em seguida foram secos, peneirados e embalados em um molde de carbono e depois prensados a quente a 30 MPa sob nitrogênio a várias temperaturas (entre 600 e 800 °C) por 1 hora. Para fins de comparação, pós da mistura HAp-VB também foram sinterizados sob pressão a várias temperaturas (600 °C e 1000 °C) por 1 hora. A estrutura cristalina e a morfologia dos compósitos foram caracterizadas por difração de raios X e microscopia eletrônica de varredura, respectivamente. A densidade dos espécimes foi medida pelo método de Arquimedes. A resistência mecânica dos compósitos foi observada usando uma configuração de flexão de quatro pontos. A bioatividade dos compósitos foi avaliada pela formação de apatita em sua superfície em um fluido corporal simulado (SBF). Além disso as respostas celulares *in-vitro* aos compostos HAp-VB foram avaliadas em termos de proliferação celular pelo método MTT e a detecção do fenótipo osteoblástico expresso, através da atividade da fosfatase alcalina [68].

Pelo processo normal de sinterização, era quase impossível obter compósitos HAp-VB densos com as composições usadas neste estudo (30% – 50% VB). No entanto, a prensagem a quente dos compósitos melhorou significativamente sua sinterabilidade. O compósito sinterizado sem pressão era extremamente poroso, enquanto o prensado a quente era completamente densificado. Este contraste marcante na morfologia dependendo da técnica de sinterização também foi observado para as outras composições (40 % e 50 % VB). As amostras sinterizadas sem pressão revelaram porosidades aparentes variando de aproximadamente 35 % a 40 % dependendo da composição e da temperatura de sinterização. Mesmo quando a temperatura de sinterização foi aumentada, o aumento na densificação foi apenas mínimo (porosidades de ~ 30 % ainda foram observadas acima de 1000 °C). Esta baixa sinterabilidade foi descrita em outro lugar como um dos problemas críticos associados aos compósitos HAp-VB [69], [70].

De especial consideração nos compósitos HAp-VB é a reação térmica entre os dois componentes e a degradação de fase consequente. Quando a amostra HAp– 30 % VB foi sinterizada sem pressão a 750 °C, uma pequena quantidade da fase de fosfato  $\beta$ -tricálcico ( $\beta$ -TCP) foi detectada. A amostra obtida nesta temperatura era extremamente porosa e conforme a temperatura de sinterização foi aumentada para 1000 °C, a porosidade foi reduzida ligeiramente. Entretanto, muitas fases secundárias (silicato de sódio e cálcio, wollastonita e  $\beta$ -TCP) foram formadas junto com o consumo da fase de apatita. Tendências semelhantes foram observadas nas outras composições, embora tenha havido uma ligeira diferença nos conteúdos das fases secundárias. Por outro lado, a prensagem a quente da composição HAp-30 % VB possibilitou a obtenção de um compósito denso com apenas uma ligeira formação de uma fase secundária (silicato de cálcio e sódio)[69-70].

As propriedades biológicas dos compósitos HAp-VB densificados foram investigados em termos de sua capacidade de formação de apatita e respostas celulares osteoblásticas *in-vitro*. HA pura densificada foi usado como um controle e o espécime HAp – 30% VB foi testado como um representante dos compósitos desenvolvidos. Embora existam algumas limitações associadas a este teste *in-vitro*, os dados sugerem que o compósito HAp-VB tem melhor bioatividade do que a HAp pura, uma vez que a capacidade de formação de apatita no SBF é geralmente usada como um índice de bioatividade e, assim, é frequentemente usado para prever a capacidade de formação de osso *in-vivo*. Junto com este teste de SBF, as respostas celulares osteoblásticas do compósito HA–VB foram examinados. A viabilidade das células

quantificada pelo método MTT foi observada para ser comparável em ambos os substratos (HAp puro e HAp-VB composto) após 3 dias de cultivo. No entanto, observou-se que as células no compósito possuem um nível significativamente mais alto de atividade osteoblástica ( $p < 0,05$ ), conforme avaliado por sua expressão de fosfatase alcalina. Como a fosfatase alcalina é um fenótipo bem conhecido de células osteoblásticas, é geralmente considerado como uma medida importante da atividade funcional osteoblástica e da capacidade de formação óssea subsequente[71].

A produção de compósitos HAp-VB é especialmente interessante, pois é possível superar os limites intrínsecos das fases vítrea e cristalina quando consideradas isoladamente. O objetivo principal é ajustar a taxa de biodegradação e a bioatividade do sistema resultante, variando as frações de volume dos dois constituintes. Além disso, o uso de VBs pode ser explorado para incorporar íons de interesse biológico dentro da rede da HAp, como silício, estrôncio e magnésio, dentre outros, para simular o comportamento da apatita biológica, ou seja, a parte mineral do osso, que é tipicamente não estequiométrica e caracterizada por várias substituições iônicas [72].

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Matérias primas

HAP-91® e Activebone® foram fornecidos pela JHS Biomateriais (Minas Gerais - Brasil). HAP-91® é o nome comercial de um espécime de HAp obtido após a reação de hidróxido de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) com ácido ortofosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Este método é chamado precipitação úmida ou precipitação aquosa e tem sido amplamente utilizado na preparação de HAp sintético por ter um bom rendimento e baixo custo [73]. Activebone® é um VB 58S obtido por processo sol-gel [74] e possui a seguinte composição mássica:  $58\text{SiO}_2 - 33\text{CaO} - 9\text{P}_2\text{O}_5$ . Uma fibra bovina tipo I Col, também fornecida pela JHS Biomateriais, foi utilizada como matriz polimérica neste estudo. Etanol (EtOH, P.A., Synth) e ácido acético (HAc, P.A., Synth) foram empregados como solventes para preparar misturas de pó HAp/VB e *scaffolds* de HAp/VB/Col.

### 4.2. Misturas dos pós HAp/VB

HAP-91® e Activebone® foram inicialmente pulverizados e misturados em relações de massa de 75/25, 85/15, e 95/5 (HAp/VB). As misturas obtidas foram dispersas em EtOH e mantidas sob agitação durante 24 h à temperatura ambiente para fins de homogeneização. As suspensões alcoólicas foram secas a 100 °C durante 2 h, e depois tratadas termicamente no ar a 600 °C, 700 °C ou 800 °C durante 3 h, utilizando uma taxa de aquecimento de 2 °C.min<sup>-1</sup>. As amostras foram resfriadas até a temperatura ambiente no interior do forno. As amostras obtidas foram designadas como A/B\_X, onde A/B representa a razão de massa HAp/VB e X é a temperatura de tratamento térmico.

### 4.3. *Scaffolds* de HAp/VB/Col

O Col foi inicialmente dissolvido sob agitação e à temperatura ambiente numa solução aquosa de HAc (0,5 M) como descrito na literatura [75]. A mistura de HAp/VB foi então adicionada a esta solução e mantida sob agitação durante 2 h. Foi mantida a relação HAp/VB em 75/25 durante a preparação dos *scaffolds* compósitos. Dessa forma, a razão mássica (%massa) HAp/VB/Col nos compósitos foi ajustada para 56,2/18,8/25,0. A suspensão preparada foi congelada a -40 °C e depois liofilizada sob vácuo. As amostras obtidas foram subsequentemente esterilizadas com

gás óxido de etileno a cerca de 50 °C durante 6 h. Este método de esterilização ganhou muita atenção nos últimos anos devido à sua atividade bactericida, esporicida e virucida [76]. Foi relatado que a esterilização inadequada dos produtos de saúde pode levar a problemas de infecção e mortalidade/morbilidade nos pacientes [77].

#### 4.4. Caracterizações

A difração de raios X (DRX) foi realizada em difratômetro Philips-PANalytical PW1710 com passo de 0,06° (2 $\theta$ ) e usando CuK $\alpha$  ( $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ ) como fonte de radiação. A espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) foi realizada em espectrômetro Bruker Alpha utilizando um acessório de reflexão total atenuada (ATR) e um cristal de diamante como elemento refletor. Estes testes foram realizados com uma resolução de 4 cm $^{-1}$  e 128 varreduras. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada em microscópio FEI Quanta 200 a uma tensão de aceleração de 15 kV. As amostras de pó foram inicialmente dispersas em EtOH sob sonicação à temperatura ambiente durante 5 minutos. Em seguida, foram pingadas em substratos de silício e secas ao ar. Os *scaffolds* à base de Col foram fixados na base de alumínio com fita de carbono e revestidos com um revestimento de carbono com 10 nm de espessura. Análises de espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS) foram realizadas com um detector EDAX (Si-Li) acoplado ao microscópio eletrônico. Termogravimetria (TG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foram conduzidas em um analisador térmico simultâneo Perkin Elmer STA-6000 a uma taxa de aquecimento de 10 °C.min $^{-1}$  até 1000 °C e sob fluxo N $_2$  (500 mL.min $^{-1}$ ). A granulometria por difração a laser foi realizada em um granulômetro Cilas 1064 utilizando água como meio dispersante. A adsorção N $_2$  foi realizada a 77 K em um aparelho Quantachrome Nova 2200e utilizando amostras desgaseificadas sob vácuo a 120 °C por até 12 h. A área superficial específica (ASE) e o volume de poros foram avaliados pelos métodos de Brunauer-Emmett-Teller (BET) e Barrett-Joyner-Halenda (BJH). A microtomografia computadorizada de raios X (micro-CT) foi conduzida em sistema Bruker SkyScan 1174 a uma tensão de 40 kV e um tamanho de pixel de cerca de 12  $\mu\text{m}$ .

#### 4.5. Ensaios *in-vitro*

A presença de resíduos nas amostras esterilizadas por óxido de etileno foi investigada de acordo com os procedimentos descritos nas diretrizes da Organização Internacional de



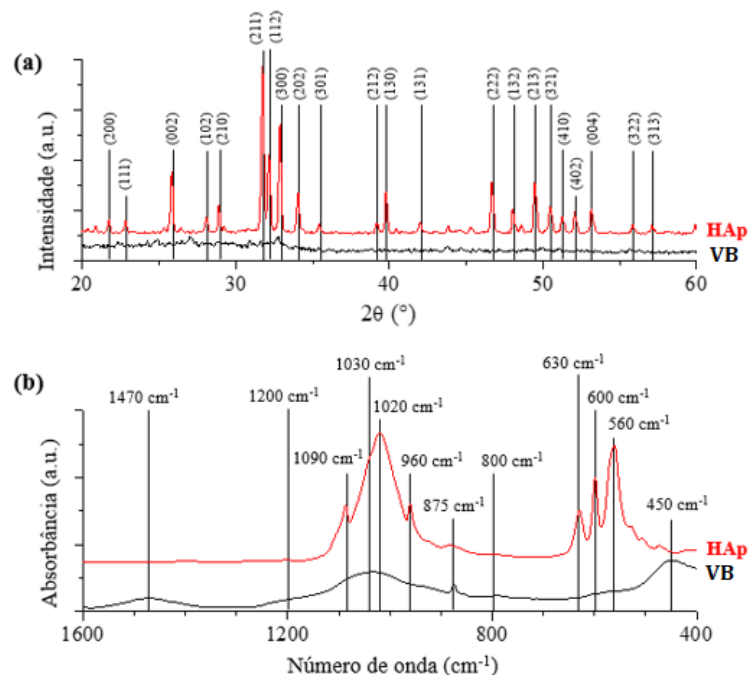
Normalização (ISO 10993-7 - Resíduos de esterilização por óxido de etileno) e do American National Standards Institute (ANSI/AAMI ST-30 Determinando resíduos de etileno cloridrina e etilenoglicol em dispositivos médicos). A eficiência do processo de esterilização foi avaliada através do exame da população de bactérias mesófilas totais e leveduras nos compósitos preparados. Estes ensaios foram realizados seguindo as recomendações das normas ISO (ISO 11737-2:2019 - Esterilização de produtos de saúde - Métodos microbiológicos - Parte 2: Testes de esterilidade realizados na definição, validação e manutenção de um processo de esterilização; ISO 10993-7:2008 - Avaliação biológica de dispositivos médicos - Parte 7: Resíduos da esterilização por óxido de etileno). Os *scaffolds* à base de Col foram embebidos em fluido corporal simulado (SBF) a 37 °C e uma concentração de 1 g.L<sup>-1</sup> por até 7 dias. O SBF foi preparado conforme sugerido por Kokubo e Takadama. [78] e também na ISO 23317:2014 (Implantes para cirurgia - Avaliação *in-vitro* para capacidade de formação de apatita de materiais de implantes). Os espécimes foram subsequentemente retirados da SBF, enxaguados com água, secos ao ar a 35 °C, e examinados pelo DRX, FTIR, e MEV-EDS.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Biocerâmicas de partida

É mostrado na Figura 10a os padrões de DRX obtidos para HAp e VB. As linhas de difração realçadas nesta figura são atribuídas à HAp (JCPDS No. 24-0033). O VB não exibiu quaisquer picos de difração, revelando que possui rede amorfa. Foi reportado na literatura que a natureza amorfa do VB confere boa bioatividade a este material [79, 80]. Chen *et al.* [81] relataram que amostras parcialmente cristalizadas de VB mostram taxa de dissolução mais lenta do que amostras amorfas, o que afeta negativamente a adesão e proliferação celular. A Figura 10b mostra os espectros de FTIR obtidos para HAp e VB. As principais bandas de absorção da HAp em  $560\text{ cm}^{-1}$ ,  $600\text{ cm}^{-1}$ ,  $630\text{ cm}^{-1}$ ,  $960\text{ cm}^{-1}$ , e  $1020\text{ cm}^{-1}$  foram atribuídas a grupos  $\text{PO}_3^{4-}$  [82–85]. A banda em  $1090\text{ cm}^{-1}$ , também observada para a HAp, é relacionada a grupos  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  [86]. As bandas de absorção em  $450\text{ cm}^{-1}$ ,  $800\text{ cm}^{-1}$  e  $1030\text{ cm}^{-1}$ , e também o ombro em torno de  $1200\text{ cm}^{-1}$  são atribuídos a ligações Si-O presentes na rede do VB [87,88]. As bandas em  $875\text{ cm}^{-1}$  e  $1470\text{ cm}^{-1}$  foram atribuídas a grupos  $\text{CO}_2$  [85,89,90]. Estes resultados revelam que as amostras utilizadas neste trabalho são HAp e VB de elevada pureza.

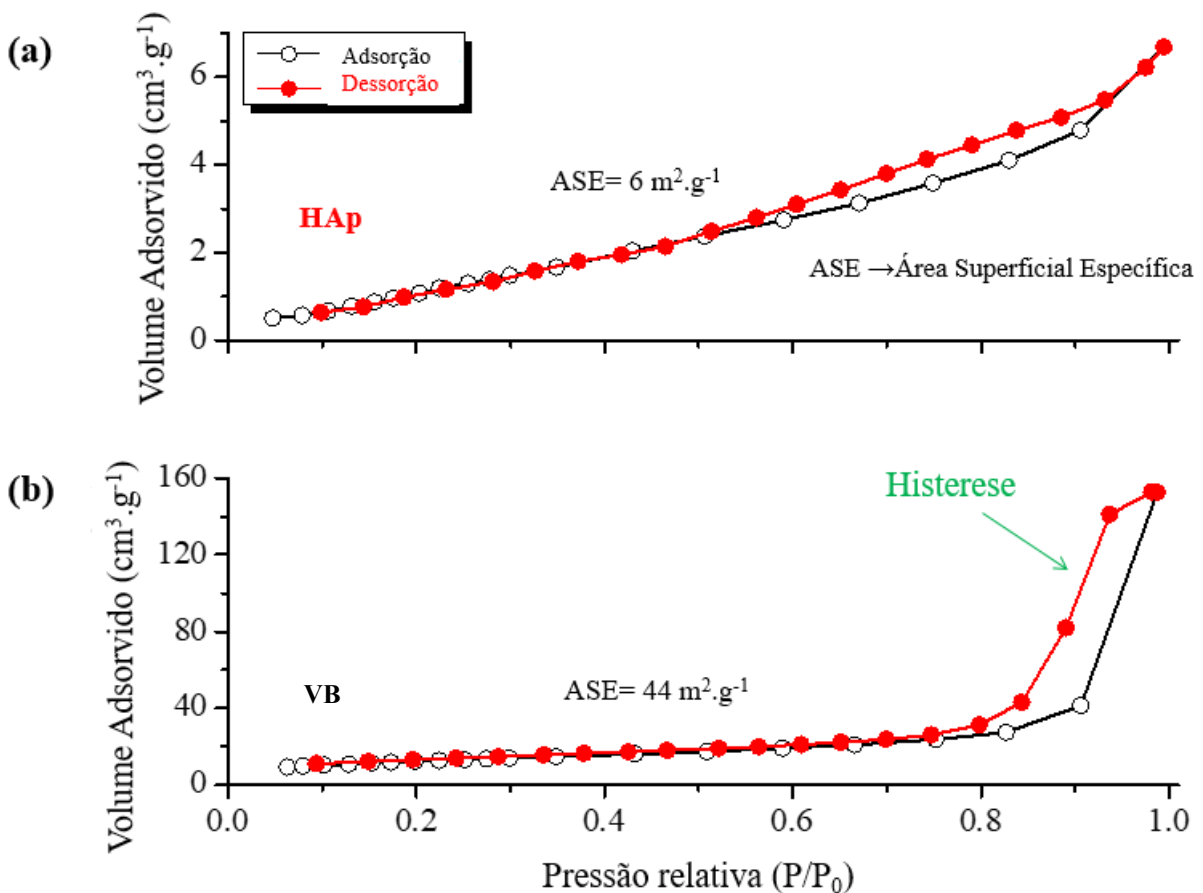
**Figura 10:** (a) padrões DRX e (b) espectros de FTIR de HAp e VB. Os planos de cristal indicados na Figura 10a são atribuídos a HAp de acordo com o arquivo JCPDS nº 24-0033.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 11 apresenta as isotermas de adsorção  $N_2$  obtidas para HAp e VB. Foi obtida uma isoterma do tipo III para HAp, enquanto o VB mostrou uma isoterma do tipo IV. As isotermas do tipo III são associadas a sólidos macroporosos, enquanto que as isotermas do tipo IV são atribuídas a materiais mesoporosos. A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) classificou os poros de acordo com os seus tamanhos da seguinte forma: microporos são menores que 2 nm, mesoporos têm entre 2 nm e 50 nm, e macroporos são maiores que 50 nm [91,92].  $N_2$  são observados nestas isotermas, revelando que tanto HAp como VB têm mesoporos nas suas estruturas. No entanto, a presença de mesoporos é mais perceptível no VB visto que o *loop* de histerese é mais largo para este material. Os valores de ASE obtidos para HAp e VB foram de  $6 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  e  $44 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ , respectivamente. Eles estão fortemente relacionados com os mesoporos presentes nestes materiais, o que contribui muito para a ASE.

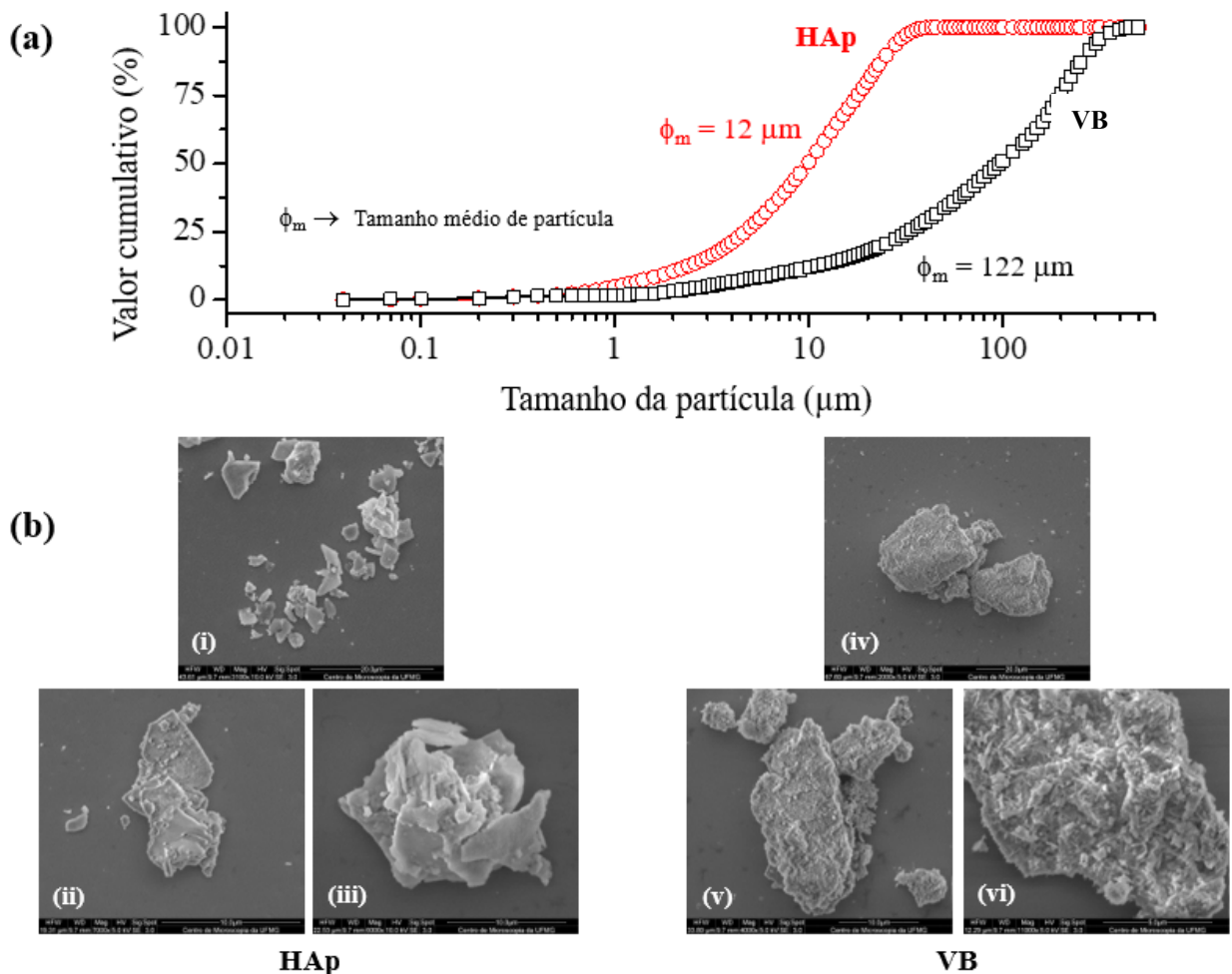
**Figura 11:** Isotermas de sorção de  $N_2$  obtidas para (a) HAp e (b) VB. Os símbolos abertos e fechados estão relacionados aos ramos de adsorção e dessorção, respetivamente.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As distribuições granulométricas de HAp e VB são mostradas na Figura 12a. A distribuição de partículas da HAp é deslocada para tamanhos menores em comparação com o VB, revelando que o primeiro possui partículas mais finas do que o segundo. A dimensão média das partículas ( $\phi_m$ ) inferida para HAp e VB foi de 12  $\mu\text{m}$  e 122  $\mu\text{m}$ , respectivamente. A figura 12b traz micrografias de MEV obtidas para estes materiais. Partículas com formas irregulares e tamanhos diferentes são notadas nestas imagens. Estas análises estão de acordo com a granulometria laser e revelam que o VB tem partículas mais grosseiras em comparação com a HAp.

**Figura 12:** (a) Distribuição granulométrica de partículas obtidas para HAp e VB por granulometria laser. (b) Micrografias de MEV obtidas para estes materiais

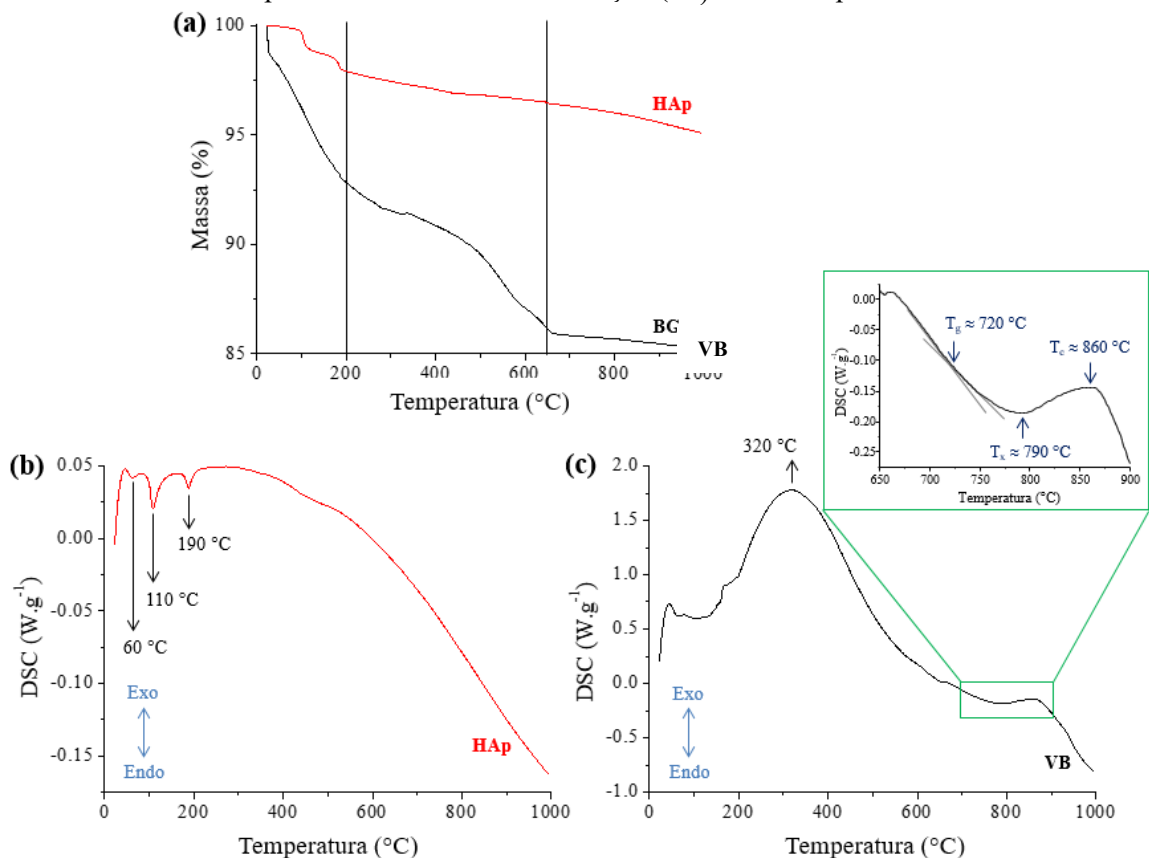


Fonte: elaborado pelo autor.

Os termogramas coletados são mostrados na Figura 13a. Uma maior perda de massa foi observada para o VB até a temperatura de 1000  $^{\circ}\text{C}$ ; cerca de 15% para o VB versus 5% para o

HAp. A perda de massa observada a temperaturas de até 200 °C é devida à remoção de umidade e água fisissorvida [93–95]. O evento térmico entre 200 °C e 650 °C está associado a reações de desidroxilação [96,97] e decomposição de carbonatos [98]. As Figuras 13b e 13c mostram os perfis DSC tomados para HAp e VB. São observados três eventos endotérmicos para HAp (Figura 13b) a cerca de 60 °C, 110 °C e 190 °C, que foram atribuídos à remoção de água fisicamente adsorvida. O VB (Figura 13c) apresentou um amplo pico exotérmico centrado a cerca de 320 °C. De acordo com Huang *et al.* [99], esse evento térmico pode ser devido à remoção de grupos orgânicos do VB. A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) parece estar em torno de 720 °C, enquanto o processo de cristalização parece iniciar em 790 °C. A temperatura de início da cristalização ( $T_x \approx 790$  °C) e a temperatura máxima de cristalização ( $T_c \approx 860$  °C) do VB estão destacadas no subconjunto da Figura 13c. Tais temperaturas são similares às reportadas por Dehaghani *et al.* [100] para nanopartículas de 58S. No entanto, é importante notar que estas temperaturas dependem de diferentes parâmetros, incluindo a taxa de aquecimento empregada e o tamanho das partículas testadas.

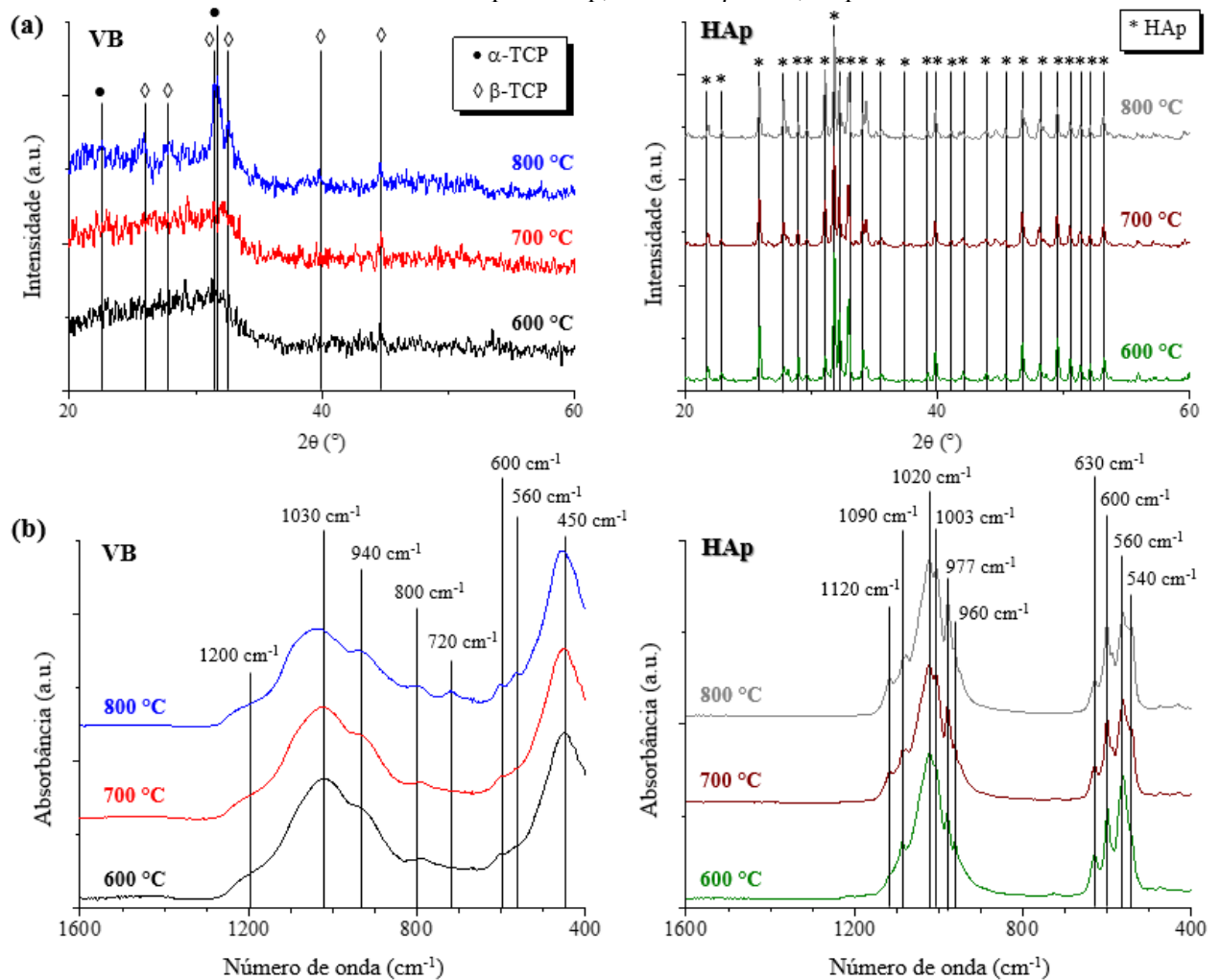
**Figura 13:** (a) Termogramas e (b-c) perfis DSC tomados para HAp e VB. O *inset* apresentado na Figura 13c realça a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), a temperatura de início de cristalização ( $T_x$ ) e a temperatura máxima de cristalização ( $T_c$ ) avaliadas para o VB



Fonte: Elaborado pelo autor.

As Figuras 14a e 14b mostram padrões de DRX e espectros de FTIR obtidos para o VB e HAp após tratamento térmico durante 3 h a 600 °C, 700 °C, ou 800 °C. Os picos de difração atribuídos ao fosfato tricálcico (TCP) são observados para o VB quando calcinado a 800 °C. Os cartões JCPDS No. 09- 0348 e 09-0169 foram utilizados como referências para  $\alpha$ -TCP e  $\beta$ -TCP. As bandas FTIR associadas a estas fases também foram observadas em 560  $\text{cm}^{-1}$ , 720  $\text{cm}^{-1}$ , e 940  $\text{cm}^{-1}$  [101]. Nenhuma alteração substancial foi notada para a HAp quando tratada com calor a temperaturas de até 800 °C. Ooi *et al.* [102] relataram que a HAp só se decompõe em  $\beta$ -TCP quando calcinada a temperaturas acima de 1100 °C. Bandas adicionais foram observadas para a HAp tratada termicamente a 540  $\text{cm}^{-1}$ , 977  $\text{cm}^{-1}$ , 1003  $\text{cm}^{-1}$ , e 1120  $\text{cm}^{-1}$ . Estas bandas foram atribuídas a grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{P}_2\text{O}_4^{7-}$  [103–105].

**Figura 14:** (a) Padrões de DRX e (b) espectros FTIR recolhidos para HAp e VB após tratamento térmico a 600 °C, 700 °C, ou 800 °C. Os cartões JCPDS No. 24-0033, 09-0348, e 09-0169 foram utilizados como referências para HAp,  $\alpha$ -TCP e  $\beta$ -TCP, respectivamente.

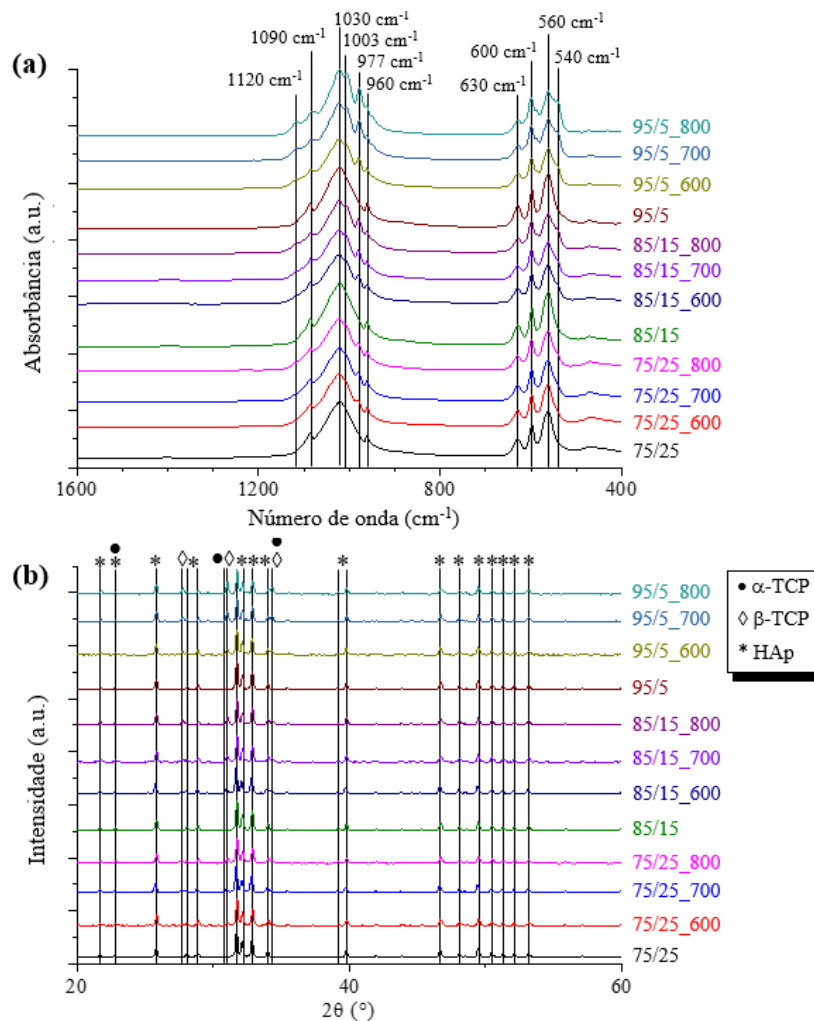


Fonte: elaborado pelo autor.

## 5.2. Misturas HAp/VB

As Figuras 15a e 15b exibem os espectros FTIR e os padrões DRX de misturas em pó HAp/VB com diferentes composições químicas e tratadas termicamente a várias temperaturas. A prevalência de HAp nestas misturas torna os seus espectros de FTIR e DRX semelhantes aos observados para HAp puro (Figuras 14a e 14b). O tratamento térmico destes materiais a 800 °C provocou a formação de  $\alpha$ -TCP e  $\beta$ -TCP, o que é derivado da cristalização do VB (Figura 14). Esta etapa também deu origem a bandas de absorção FTIR atribuídas a grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{P}_2\text{O}_4^{7-}$  em 540  $\text{cm}^{-1}$ , 977  $\text{cm}^{-1}$ , 1003  $\text{cm}^{-1}$ , e 1120  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 15a), que também foram observados para a HAp (Figura 14b).

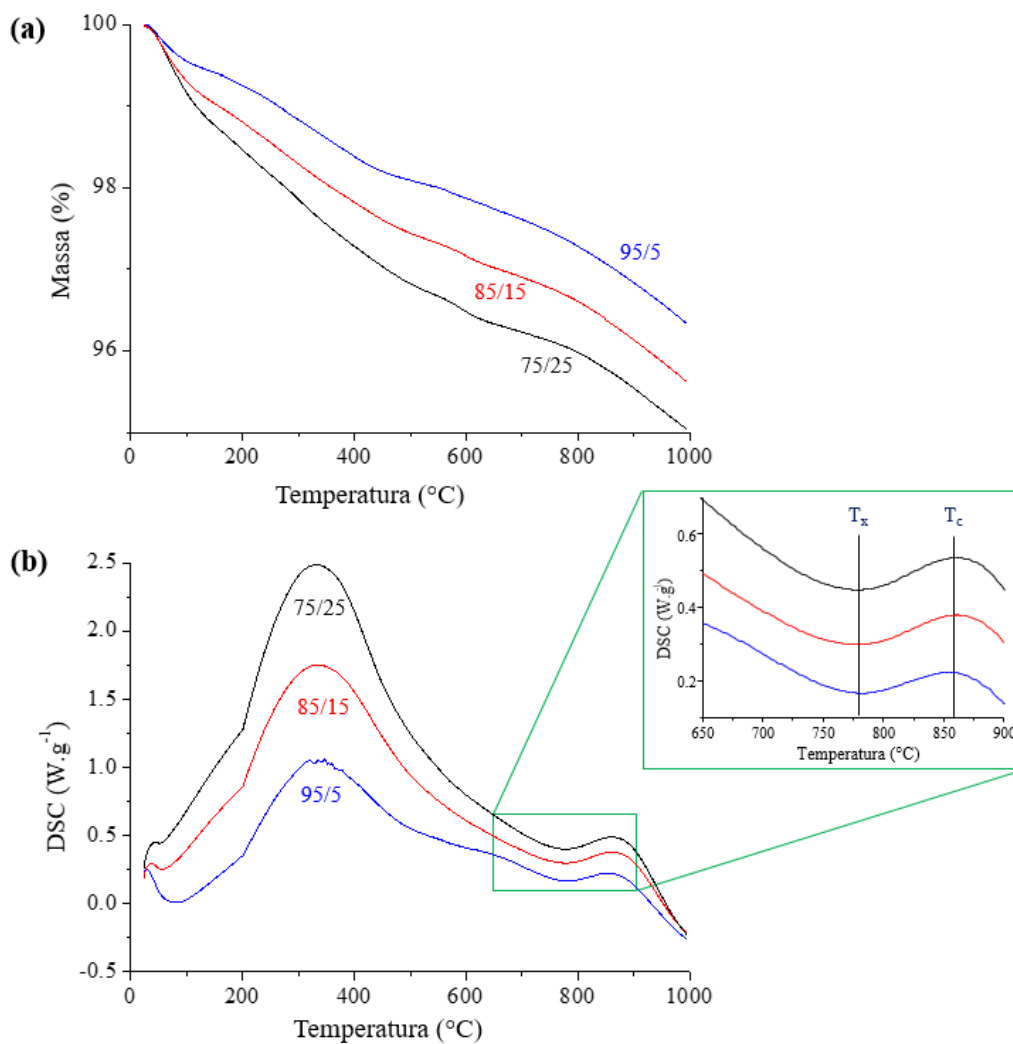
**Figura 15:** (a) Espectros de FTIR e (b) padrões de DRX tomados para misturas HAp/VB com diferentes relações em massa e tratadas termicamente a 600 °C, 700 °C, ou 800 °C. Os cartões JCPDS No. 24-0033, 09-0348, e 09-0169 foram utilizados como referências para HAp,  $\alpha$ -TCP, e  $\beta$ -TCP, respectivamente.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 16a apresenta termogramas de misturas HAp/VB com diferentes composições. Observa-se que quanto maior for a concentração de VB nesta mistura, maior será a perda de massa. Foi observado que o VB apresenta uma perda de massa elevada (cerca de 25%) no intervalo de temperatura avaliado (Figura 13a), razão pela qual a estabilidade térmica da mistura HAp/VB está intimamente relacionada à concentração do VB na mesma. Além disso, conforme observado nos perfis DSC apresentados na Figura 16b, quanto maior for a concentração do VB, mais intenso será o evento exotérmico em cerca de 320 °C. Como mencionado anteriormente, este evento térmico foi atribuído à remoção de grupos orgânicos do VB [99]. Por outro lado, não foram observadas alterações substanciais em  $T_g$ ,  $T_x$ , ou  $T_c$  para misturas HAp/VB com diferentes composições porque se mantiveram estáveis a cerca de 720 °C, 790 °C, e 860 °C, respectivamente.

**Figura 16:** (a) Termogramas e (b) perfis DSC de misturas HAp/VB com diferentes composições

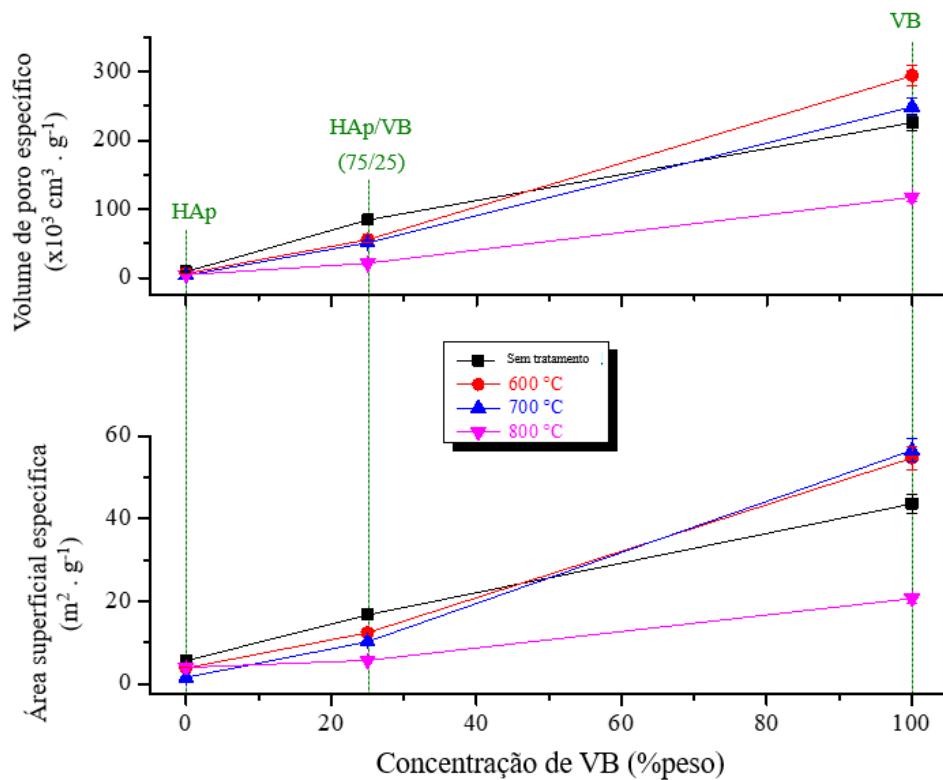


Fonte: Elaborado pelo autor.



A Figura 17 apresenta a área superficial específica e o volume dos poros específicos em função da temperatura de tratamento térmico para misturas HAp/VB com diferentes composições. Pode-se inferir que quanto maior for a carga de VB, maior será a área superficial específica e volume de poros da mistura em pó. Este comportamento está associado à maior área superficial do VB em relação ao HAp ( $44 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$  versus  $6 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$  – Figura 11). Além disso, em geral, quanto maior a temperatura de tratamento térmico, menor a área de superfície e volume de poros da mistura HAp/VB. Este resultado pode ser devido ao fechamento dos poros à medida que a temperatura de tratamento térmico aumenta. Apesar desta diminuição da área superficial e do volume dos poros, foram utilizadas misturas HAp/VB com uma razão de massa de 75/25 e tratadas termicamente a  $800 \text{ }^\circ\text{C}$  para a preparação dos *scaffolds* compósitos à base de Col. Esta escolha foi baseada em alguns aspectos. Primeiro, o valor de  $T_g$  inferido para HAp/VB foi de cerca de  $720 \text{ }^\circ\text{C}$  (Figura 16), o que significa que o fluxo viscoso deve ter lugar para os tratamentos térmicos realizados a  $800 \text{ }^\circ\text{C}$ . Assim, espera-se que o VB possa fluir durante a sinterização realizada a  $800 \text{ }^\circ\text{C}$  e revestir as partículas de HAp, causando um aumento na bioatividade do composto. Foi relatado que o VB tem uma alta afinidade para os componentes orgânicos, o que poderia melhorar a incorporação da mistura HAp/VB na matriz de Col [106]. Em segundo lugar, a relação em massa de 75/25 foi selecionada porque uma alta concentração de VB poderia favorecer a sinterização do fluxo viscoso a  $800 \text{ }^\circ\text{C}$  e contribuir para a bioatividade dos compósitos aqui preparados. Como mencionado anteriormente, o VB possui alta bioatividade e grande área superficial específica.

**Figura 17:** (a) Volume específico dos poros e (b) área superficial específica avaliada para misturas HAp/VB com diferentes composições e tratadas termicamente em várias temperaturas



Fonte: elaborado pelo autor.

### 5.3. *Scaffolds* HAp/VB/Col

A Tabela 2 mostra a concentração de óxido de etileno, etileno cloridrina (2-cloroetanol), e etilenoglicol (1,2-Ethandiol) nos *scaffolds* esterilizados com EO. Observa-se que a concentração desses compostos está abaixo dos limites estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o que merece ser destacado. A presença desses resíduos nos compósitos aqui preparados pode impedir a aplicação prática desses materiais devido à sua alta toxicidade. A Figura 18a mostra micrografias de MEV de *scaffolds* compostos HAp/VB/Col preparados neste trabalho. Fibras de Col são notadas nestas imagens. Como discutido anteriormente, partículas de HAp e VB foram incorporadas em matrizes baseadas em Col visando melhorar a estabilidade mecânica destes pós; embora HAp e VB tenham uma utilização promissora em aplicações biomédicas, eles podem exibir uma perda de forma sob carga, levando à migração de partículas [107]. Grandes partículas de VB também são notadas, o que está de acordo com a distribuição granulométrica exibida na Figura 12 ( $\phi_m = 122 \mu\text{m}$ ). As partículas menores não esféricas atribuídas a HAp podem ser notadas incrustadas no VB.

**Tabela 2:** Concentração detectada e valor de referência para resíduos em produtos de saúde esterilizados por EO. \*Concentrações avaliadas com cromatografia gasosa pela SGS Société Générale de Surveillance. \*\*Valores de referência descritos na Portaria Interministerial Brasileira nº 482, de 16 de abril de 1999.

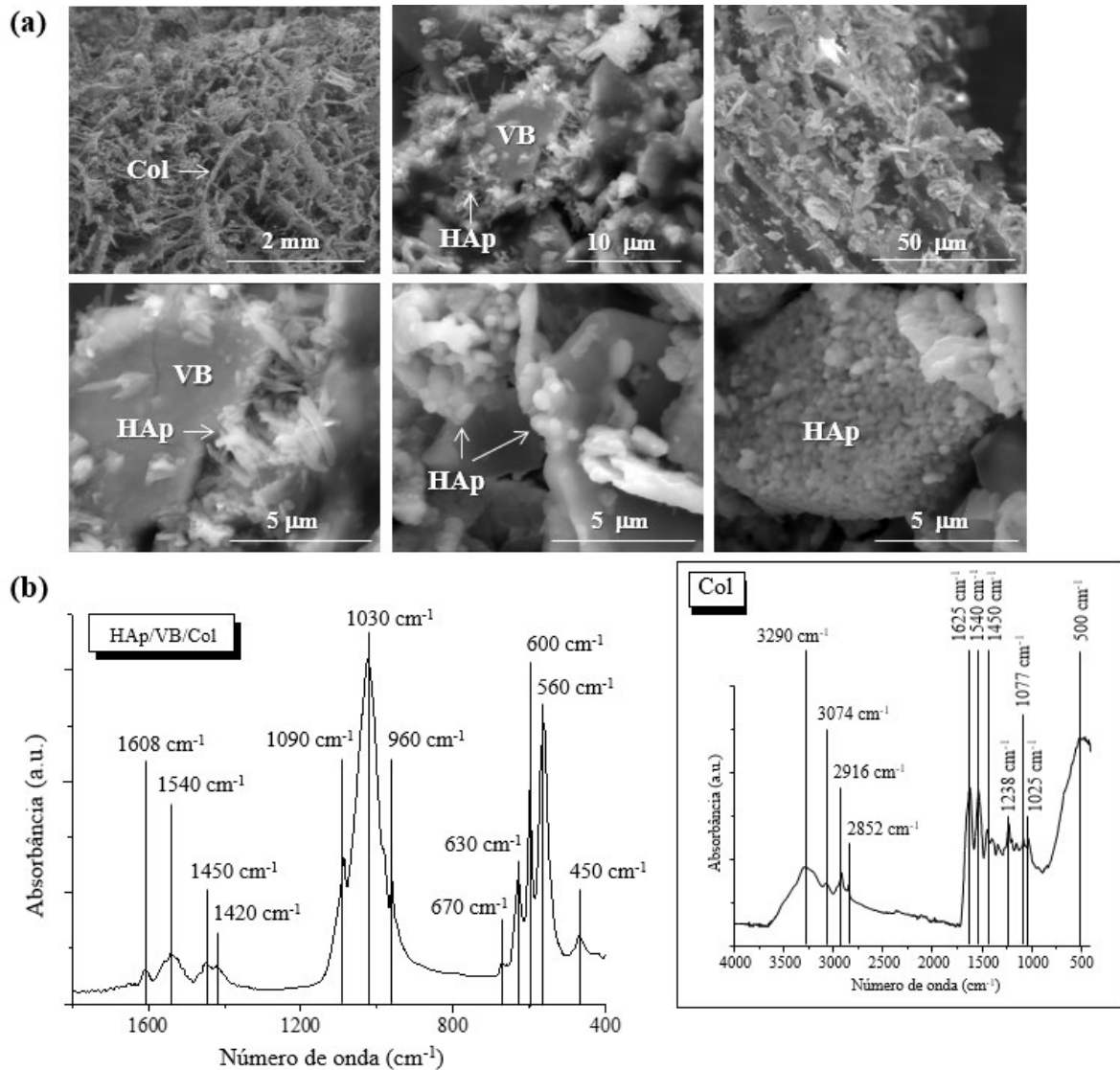
Composto	Concentração (ppm)	
	Detectado*	Referência**
Óxido de etileno	5,7 ± 0,2	250
Etileno Cloridrina	< 5,6	250
Etilenoglicol	1165,1 ± 108,8	5000

Fonte: elaborado pelo autor

A Figura 18b apresenta um espectro típico FTIR tomado para o composto HAp/VB/Col. As bandas de absorção atribuídas tanto para HAp como para VB são observadas neste espectro (Figuras 14 e 15), revelando que foram incorporadas com sucesso na matriz polimérica. Para efeitos de referência, também é apresentado na Figura 18b o espectro FTIR obtido para a amostra Col utilizada neste trabalho. A banda larga de absorção centrada em cerca de 3290  $\text{cm}^{-1}$  foi atribuída aos grupos hidroxila e ligações N-H da amida A [108]. A banda em 3074  $\text{cm}^{-1}$  e o duplete em 2916  $\text{cm}^{-1}$  e 2852  $\text{cm}^{-1}$  são devidos ao modo de estiramento de ligações C-H da amida B [109]. As bandas em 1625  $\text{cm}^{-1}$ , 1540  $\text{cm}^{-1}$ , 1450  $\text{cm}^{-1}$  e 1077  $\text{cm}^{-1}$  podem ser devidas ao alongamento assimétrico dos sais de carboxilato presentes nas ligações amida I, amida II, amida III e éster, respectivamente [110]. As bandas observadas na região espectral de 1400  $\text{cm}^{-1}$  a 1200  $\text{cm}^{-1}$  têm sido relacionadas com vibrações de dobramento de ligações N-H do amido III. A forte banda centrada em cerca de 500  $\text{cm}^{-1}$  pode ser devida às proteínas observadas no Col [108]. Xu *et al.* [111] relataram que a espectroscopia FTIR poderia ser usada para avaliar a conformação da estrutura de Col. De acordo com os autores, durante a extração do Col sua conformação detripla hélice pode ser destruída, o que afeta suas propriedades bioativas. Conseqüentemente, eles investigaram um método alternativo de extração para reter a estrutura da tripla hélice de Col. Os autores avaliaram a relação de intensidade das faixas de absorção em cerca de 1450  $\text{cm}^{-1}$  e 1238  $\text{cm}^{-1}$  para monitorar a conformação de Col. Observaram que estas bandas têm uma intensidade quase igual quando se examinam tecidos vivos, revelando que os Col têm uma configuração de tripla hélice. A intensidade relativa de tais bandas no espectro apresentado na Figura 18 foi de cerca de 0,96,

sugerindo que a configuração de Col com tripla hélice foi destruída até certo ponto quando esta amostra foi extraída do tecido bovino.

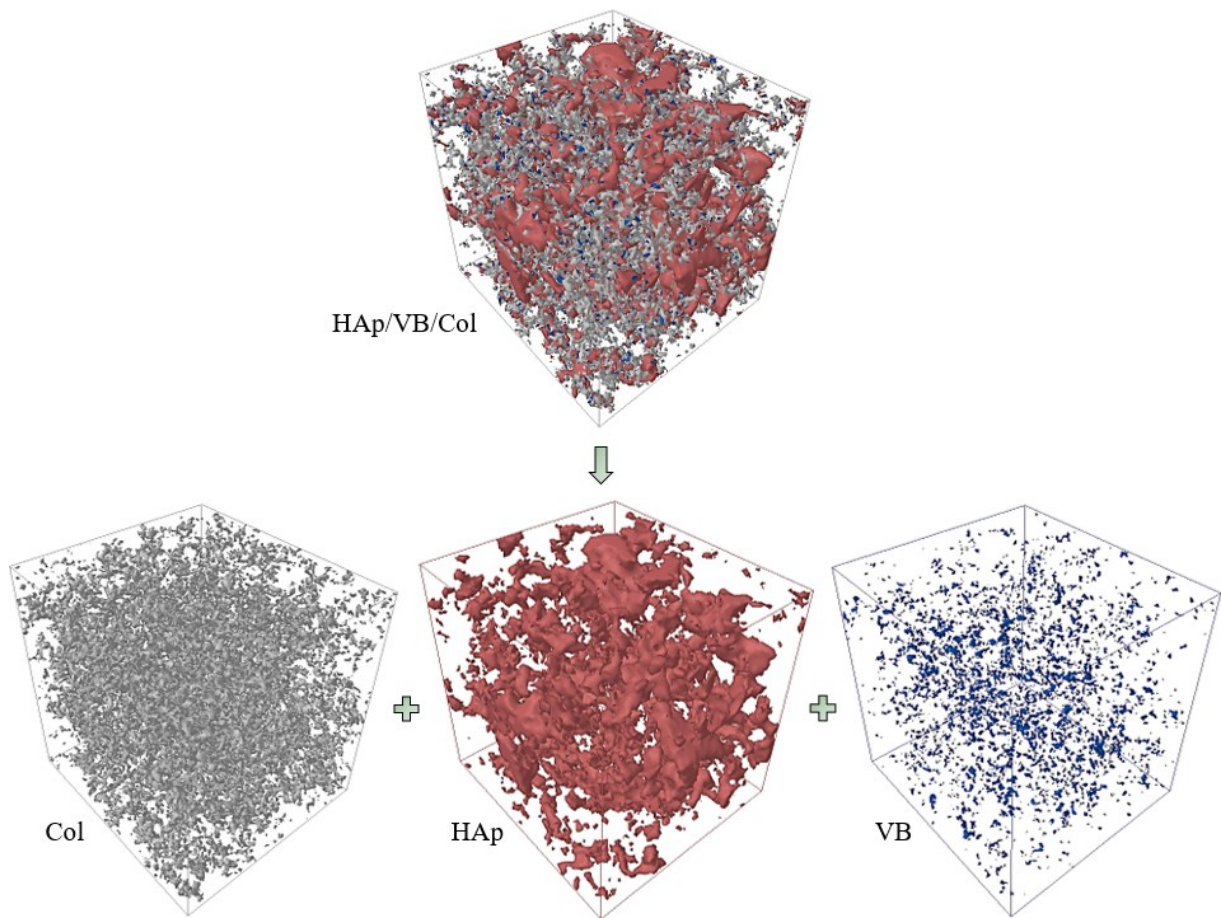
**Figura 18:** (a) Micrografias de MEV e (b) espectro de FTIR de *scaffold* HAp/VB/Col. Inset: Espectro FTIR da amostra de Col utilizada neste estudo



Fonte: elaborado pelo autor.

A Figura 19 mostra uma representação tridimensional do composto HAp/VB/Col obtido a partir de dados de micro-CT. Uma vez que Col, HAp e VB têm composições químicas e densidades diferentes, estas fases têm coeficientes de atenuação de massa de raios X distintos [112]. Este comportamento nos permitiu determinar como estes materiais são dispostos nos *scaffolds* compostos aqui preparados. Uma distribuição quase homogênea destas fases é observada nestes materiais, revelando que a preparação dos *scaffolds* compósitos foi realizada com sucesso. A porosidade inferida para esse material foi acima de 80%.

**Figura 19:** Modelos tridimensionais de scaffolds compostos HAp/VB/Col obtidos a partir de ensaios micro-CT

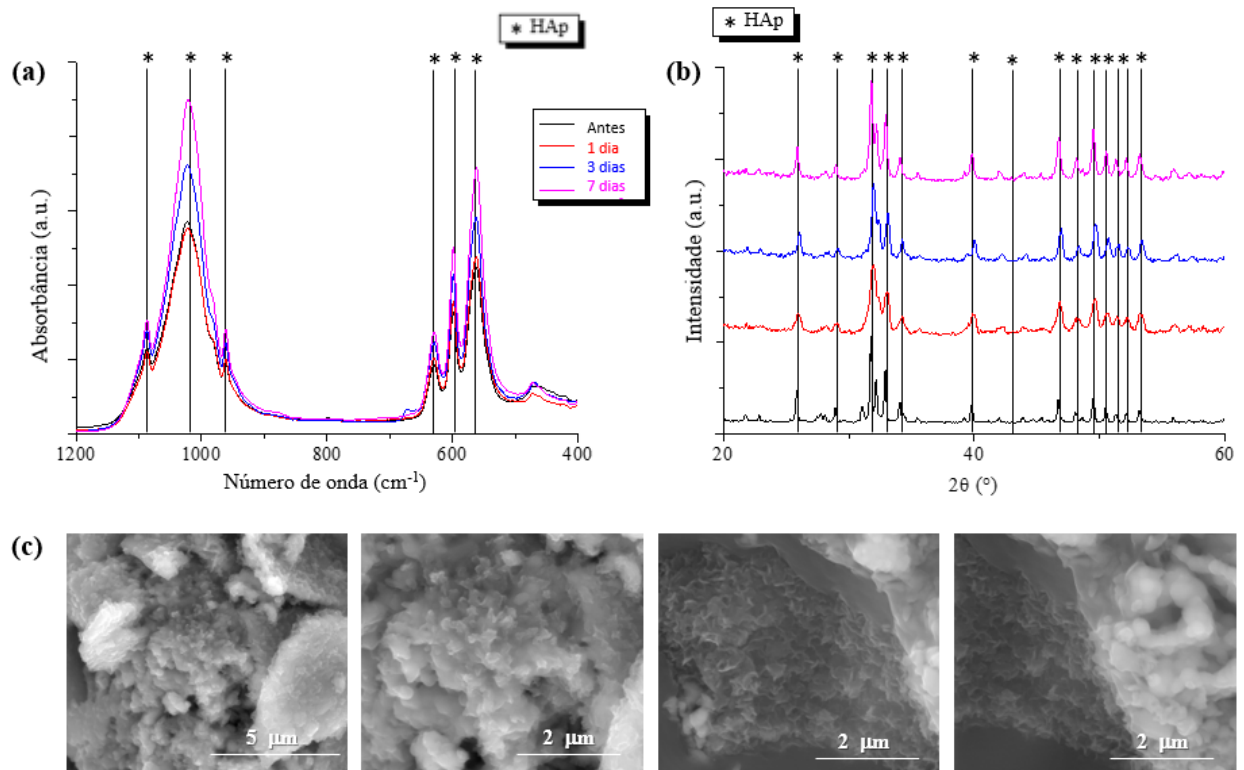


Fonte: elaborado pelo autor.

#### 5.4. Ensaios *in-vitro*

As figuras 20a e 20b exibem espectros FTIR e padrões DRX de *scaffolds* HAp/VB/Col embebidos em SBF para tempos diferentes. Observa-se que quanto maior o tempo de imersão, mais intensas são as bandas de absorção de FTIR atribuídas ao HAp. Este comportamento sugere a formação de HAp à medida que o tempo avança, material derivado da decomposição de Col e VB. Além disso, a HAp sintética inicialmente presente nos *scaffolds* compostos também dá origem à HAp natural, contribuindo também para a formação desta biocerâmica. Conforme demonstrado na Figura 20c, os cristais de HAp foram observados nos *scaffolds* compostos após 7 dias de imersão em SBF.

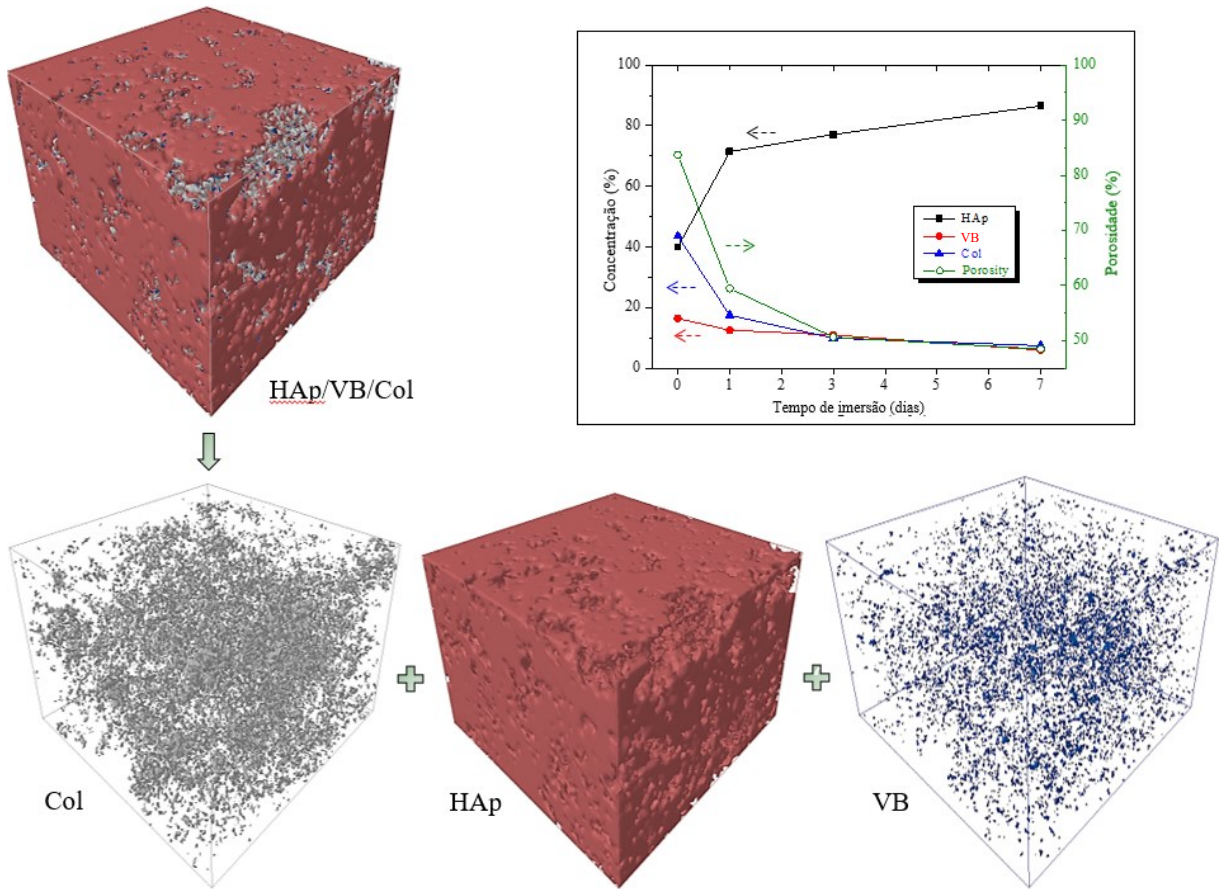
**Figura 20:** (a) Espectros de FTIR e (b) padrões de DRX de *scaffolds* HAp/VB/Col embebidos em SBF para tempos diferentes. (c) Micrografias de MEV de *scaffolds* compostos embebidos em SBF durante 7 dias



Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 21 descreve modelos tridimensionais baseados em dados micro-CT para um *scaffold* mantido imerso em SBF durante 7 dias. O *inset* exibido nesta figura mostra a variação da composição química e da porosidade em função do tempo. Nota-se que a concentração de VB e Col diminuiu ao longo do tempo (de 16,4% para 6,0% para VB, e de 43,6% para 7,5% para Col), enquanto que a quantidade de HAp aumentou muito (de 40% para 86,5%). Esta alteração na composição química foi acompanhada por uma diminuição na porosidade de cerca de 84% para 49%, o que pode ser observado nos modelos tridimensionais apresentados na Figura 21. A formação de HAp nestes *scaffolds* revela a boa biocompatibilidade destes materiais visto que a HAp é responsável por ligar o implante ao osso e assegurar as funções biológicas durante o processo de regeneração [113,114].

**Figura 21:** Modelos tridimensionais de *scaffolds* HAp/VB/Col após imersão em SBF por 7 dias. *Inset:* variação da composição química e da porosidade do *scaffolds* em função do tempo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

## 6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi investigada a preparação de *scaffolds* compostos para utilização em engenharia óssea após incorporação de partículas de HAp e VB numa matriz de Col. Foi inicialmente avaliado o efeito da temperatura de tratamento térmico (de 600 °C a 800 °C) sobre as propriedades estruturais e térmicas das misturas de HAp/VB em pó. Observou-se que o VB tem um tamanho médio de partícula e área de superfície de cerca de 122  $\mu\text{m}$  e 44  $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ , enquanto 12  $\mu\text{m}$  e 6  $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$  foram avaliados para HAp. Os testes DSC revelaram que o VB tem  $T_g$ ,  $T_x$  e  $T_c$  de cerca de 720 °C, 790 °C, e 860 °C, respectivamente. Decidimos manter a relação massa HAp/VB a 75/25 e a temperatura de tratamento térmico a 800 °C devido à elevada biocompatibilidade e área de superfície do VB. Após a preparação dos *scaffolds* compósitos, estes foram esterilizados com EO. Não foram observados resíduos derivados do processo de esterilização nas amostras preparadas, o que merece ser destacado. As imagens de MEV e micro-CT revelaram a distribuição uniforme de HAp, VB e Col nos *scaffolds* compósitos, revelando que as etapas de mistura, congelamento e liofilização foram realizadas com sucesso. A imersão destes materiais em SBF revelou uma formação notável de HAp, o que aponta para a sua boa biocompatibilidade e potencial aplicação na engenharia de tecidos.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] J. S. Han e H. K. Song, “Bone substitutes: From basic to current update”, *Journal of the Korean Fracture Society*, vol. 33, no 4, p. 238–244, 2020, doi: 10.12671/jkfs.2020.33.4.238.
- [2] C. E. Gillman e A. C. Jayasuriya, “FDA-approved bone grafts and bone graft substitute devices in bone regeneration”, *Materials Science and Engineering C*, vol. 130. Elsevier Ltd, 1o de novembro de 2021. doi: 10.1016/j.msec.2021.112466.
- [3] J. Lu et al., “Bone Graft Materials for Alveolar Bone Defects in Orthodontic Tooth Movement”, *Tissue Engineering Part B: Reviews*, mar. 2021, doi: 10.1089/ten.teb.2020.0212.
- [4] B. Zhao et al., “Promoting osteoblast proliferation on polymer bone substitutes with bone-like structure by combining hydroxyapatite and bioactive glass”, *Materials Science and Engineering C*, vol. 96, p. 1–9, 2019, doi: 10.1016/j.msec.2018.11.006.
- [5] H. J. Haugen, S. P. Lyngstadaas, F. Rossi, e G. Perale, “Bone grafts: which is the ideal biomaterial?”, *Journal of Clinical Periodontology*, vol. 46, no S21, p. 92–102, 2019, doi: 10.1111/jcpe.13058.
- [6] S. PADILLA, J. ROMAN, S. SANCHEZSALCEDO, e M. VALLETREGI, “Hydroxyapatite/SiO<sub>2</sub>–CaO–P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> glass materials: *In-vitro* bioactivity and biocompatibility”, *Acta Biomaterialia*, vol. 2, no 3, p. 331–342, maio 2006, doi: 10.1016/j.actbio.2006.01.006.
- [7] H. Khalid e A. A. Chaudhry, *Basics of hydroxyapatite-structure, synthesis, properties, and clinical applications*. Elsevier Ltd, 2019. doi: 10.1016/B978-0-08-102834-6.00004-5.
- [8] S. Yadav, P. Singh, e R. Pyare, “Synthesis, characterization, mechanical and biological properties of biocomposite based on zirconia containing 1393 bioactive glass with hydroxyapatite”, *Ceramics International*, vol. 46, no 8, p. 10442–10451, 2020, doi: 10.1016/j.ceramint.2020.01.043.
- [9] S. Sarin e A. Rekhi, “Bioactive glass: A potential next generation biomaterial”, *SRM Journal of Research in Dental Sciences*, vol. 7, no 1, p. 27, 2016, doi: 10.4103/0976-433X.176482.
- [10] D. C. Tancred, A. J. Carr, e B. A. O. McCormack, “The sintering and mechanical behavior of hydroxyapatite with bioglass additions”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 12, no 1, p. 81–93, 2001, doi: 10.1023/A:1026773522934.

- [11] X. Chatzistavrou, K. Chrissafis, E. Kontonasaki, T. Zorba, P. Koidis, e K. M. Paraskevopoulos, “Sintered Hydroxyapatite / Bioactive Glass Composites: Thermal Analysis and Bioactivity”, *Key Engineering Materials*, vol. 309–311, p. 167–170, maio 2006, doi: 10.4028/www.scientific.net/kem.309-311.167.
- [12] R. Parenteau-Bareil, R. Gauvin, e F. Berthod, “Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications”, *Materials*, vol. 3, no 3, p. 1863–1887, 2010, doi: 10.3390/ma3031863.
- [13] J. Junqueira, Luiz Carlos e Carneiro, *Histologia Básica - Texto e Atlas*, 12.ed. 2013.
- [14] H. C. Schimid J., Wallkamm B., “The significance of angiogenesis in GBR”. 1997.
- [15] B. Clarke, “Normal bone anatomy and physiology.”, *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, vol. 3 Suppl 3, p. 131–139, 2008, doi: 10.2215/CJN.04151206.
- [16] A. Marrella et al., “Engineering vascularized and innervated bone biomaterials for improved skeletal tissue regeneration”, *Materials Today*, vol. 21, no 4, p. 362–376, 2018, doi: 10.1016/j.mattod.2017.10.005.
- [17] B. M. Roux e E. M. Brey, “Engineering clinically relevant volumes of vascularized bone”, vol. 19, no 5, p. 903–914, 2015, doi: 10.1111/jcmm.12569.
- [18] K. D. Hankenson, M. Dishowitz, C. Gray, e M. Schenker, “Angiogenesis in bone regeneration”, *Injury*, vol. 42, no 6, p. 556–561, 2011, doi: 10.1016/j.injury.2011.03.035.
- [19] P. C. Isola, José Geraldo Meirelles Palma; Moraes, “ESTRUTURA E REGENERAÇÃO ÓSSEA – REVISÃO DE LITERATURA”, *REVISTA CIENTÍFICA ELETRÔNICA DE MEDICINA VETERINÁRIA*, Ano IX – Número 18 – Janeiro de 2012 – Periódicos semestral, 2012.
- [20] R. Marsell e T. A. Einhorn, “The biology of fracture healing”, *Injury*, vol. 42, no 6, p. 551–555, 2011, doi: 10.1016/j.injury.2011.03.031.
- [21] T. A. Einhorn e L. C. Gerstenfeld, “Fracture healing : mechanisms and interventions”, *Nature Publishing Group*, vol. 11, no 1, p. 45–54, 2014, doi: 10.1038/nrrheum.2014.164.
- [22] C. S. Bahney et al., “Cellular Biology of Fracture Healing”, no January, 2019, doi: 10.1002/jor.24170.
- [23] L. Andrée, F. Yang, R. Brock, e S. C. G. Leeuwenburgh, “Designing biomaterials for the delivery of RNA therapeutics to 2 stimulate bone healing”, *Materials Today Bio*, p. 100105, 2021, doi: 10.1016/j.mtbio.2021.100105.

- [24] D. Bellucci, A. Sola, e V. Cannillo, “Hydroxyapatite and tricalcium phosphate composites with bioactive glass as second phase: State of the art and current applications”, *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, vol. 104, no 4, p. 1030–1056, 2016, doi: 10.1002/jbm.a.35619.
- [25] “IalZawmliana2020 Mesoporous bioactive glasses for bone healing and biomolecules delivery \_ Enhanced Reader”.
- [26] T. J. Fernandes, E. Mavropoulos, J. B. Campos, L. A. Gobbo, e M. H. Prado Da Silva, “PVP addition during hydroxyapatite synthesis: Effect on albumin adsorption”, *Key Engineering Materials*, vol. 493–494, p. 757–762, 2012, doi: 10.4028/www.scientific.net/KEM.493-494.757.
- [27] C. C. Camilo, C. A. Fortulan, R. A. Ikegami, A. R. Santos, e B. M. De Purquerio, “Manufacturing of porous alumina scaffolds with bio-glass and HAp coating: Mechanical and *in-vitro* evaluation”, *Key Engineering Materials*, vol. 396–398, p. 679–682, 2009, doi: 10.4028/www.scientific.net/KEM.396-398.679.
- [28] A. Fihri, C. Len, R. S. Varma, e A. Solhy, “Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis”, *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 347, p. 48–76, 2017, doi: 10.1016/j.ccr.2017.06.009.
- [29] O. M. Otychenko, T. E. Babutina, O. R. Parkhomey, O. M. Budylyna, L. S. Protsenko, e I. V. Uvarova, “Influence of Thermolysis in the Nitrogen Medium on Physicochemical Properties of Medical Using Material Based on Biogenic Hydroxyapatite”, *Himia, Fizika ta Tehnologija Poverhni*, vol. 8, no 1, p. 10–17, 2017, doi: 10.15407/hftp08.01.010.
- [30] N. F. Ibrahim, H. Mohamad, S. N. F. Mohd Noor, e N. Ahmad, “Mechanical properties of hydroxyapatite reinforced 45S5”, *Solid State Phenomena*, vol. 264 SSP, p. 29–32, 2017, doi: 10.4028/www.scientific.net/SSP.264.29.
- [31] M. Đošić, A. Janković, K. Rhee, e V. Mišković-Stanković, “Graphene reinforced hydroxyapatite biocomposite coatings obtained by electrophoretic deposition on titanium”, *Zastita materijala*, vol. 59, no 2, p. 293–306, 2018, doi: 10.5937/zasmat1802293d.
- [32] R. Radha e D. Sreekanth, “Mechanical and corrosion behaviour of hydroxyapatite reinforced Mg-Sn alloy composite by squeeze casting for biomedical applications”, *Journal of Magnesium and Alloys*, no xxxx, 2019, doi: 10.1016/j.jma.2019.05.010.
- [33] S. Ragunathan, G. Govindasamy, D. R. Raghul, M. Karuppaswamy, e R. K. VijayachandraTogo, “Hydroxyapatite reinforced natural polymer scaffold for bone

- tissue regeneration”, *Materials Today: Proceedings*, vol. 23, no xxxx, p. 111–118, 2019, doi: 10.1016/j.matpr.2019.07.712.
- [34] JHS Biomateriais, “Instrução de uso HAP-91”, 2020. [http://jhs.med.br/wp-content/uploads/2019/10/timbrado\\_Instrução-de-uso-HAP-91.pdf](http://jhs.med.br/wp-content/uploads/2019/10/timbrado_Instrução-de-uso-HAP-91.pdf) (acessado 27 de agosto de 2020).
- [35] J. K. M. F. Daguano, K. Strecker, E. C. Ziemath, S. O. Rogero, M. H. V. Fernandes, e C. Santos, “Effect of partial crystallization on the mechanical properties and cytotoxicity of bioactive glass from the 3CaO.P2O5-SiO2-MgO system”, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 14, p. 78–88, 2012, doi: 10.1016/j.jmbbm.2012.04.024.
- [36] J. Wilson, G. H. Pigott, F. J. Schoent, e L. L. Hench, “Toxicology and biocompatibility of bioglasses”.
- [37] F. Baino, “Bioactive glasses – When glass science and technology meet regenerative medicine”, *Ceramics International*, vol. 44, no 13. Elsevier Ltd, p. 14953–14966, 1o de setembro de 2018. doi: 10.1016/j.ceramint.2018.05.180.
- [38] R. L. Siqueira e E. D. Zanotto, “Biosilicato®: Historico De Uma Vitroceramica Brasileira De Elevada Bioatividade”, *Quimica Nova*, vol. 34, no 7, p. 1231–1241, 2011, doi: 10.1590/S0100-40422011000700023.
- [39] L. L. Hench, “Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceram Soc.* 1993;72:93-98.”, *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 74, p. 1487–1510, 1991, doi: 10.1111/j.1151-2916.1991.tb07132.x.
- [40] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, e T. Yamamum, “Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3”.
- [41] T. Kokubo e H. Takadama, “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?”, *Biomaterials*, vol. 27, no 15, p. 2907–2915, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017.
- [42] T. Kokubo, “Design of bioactive bone substitutes based on biomineralization process”, *Materials Science and Engineering C*, vol. 25, no 2, p. 97–104, 2005, doi: 10.1016/j.msec.2005.01.002.
- [43] A. Lucas-Girot, F. Z. Mezahi, M. Mami, H. Oudadesse, A. Harabi, e M. Le Floch, “Sol-gel synthesis of a new composition of bioactive glass in the quaternary system SiO2-CaO-Na2O-P2O5: Comparison with melting method”, *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 357, no 18, p. 3322–3327, 2011, doi: 10.1016/j.jnoncrysol.2011.06.002.

- [44] F. Sharifianjazi, N. Parvin, e M. Tahriri, “Synthesis and characteristics of sol-gel bioactive SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaO-Ag<sub>2</sub>O glasses”, *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 476, no September, p. 108–113, 2017, doi: 10.1016/j.jnoncrysol.2017.09.035.
- [45] X. V. Bui e T. H. Dang, “Bioactive glass 58S prepared using an innovation sol-gel process”, *Processing and Application of Ceramics*, vol. 13, no 1, p. 98–103, 2019, doi: 10.2298/PAC1901098B.
- [46] B. R. Barrioni, A. Aline, e R. De Oliveira, *Biocompatible Glasses*, vol. 53. 2016. doi: 10.1007/978-3-319-44249-5.
- [47] M. Montazerian, J. F. Schneider, B. E. Yekta, V. K. Marghussian, A. M. Rodrigues, e E. D. Zanotto, “Sol-gel synthesis, structure, sintering and properties of bioactive and inert nano-apatite-zirconia glass-ceramics”, *Ceramics International*, vol. 41, no 9, p. 11024–11045, 2015, doi: 10.1016/j.ceramint.2015.05.047.
- [48] E. Fiume, G. Serino, C. Bignardi, E. Verné, e F. Baino, “Sintering behavior of a six-oxide silicate bioactive glass for scaffold manufacturing”, *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 10, no 22, p. 1–15, 2020, doi: 10.3390/app10228279.
- [49] Q. Nawaz et al., “New insights into the crystallization process of sol-gel-derived 45S5 bioactive glass”, *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 103, no 8, p. 4234–4247, 2020, doi: 10.1111/jace.17124.
- [50] M. Meyer, “Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties”, *BioMedical Engineering Online*, vol. 18, no 1, mar. 2019, doi: 10.1186/s12938-019-0647-0.
- [51] L. Sbricoli, R. Guazzo, M. Annunziata, L. Gobato, E. Bressan, e L. Nastri, “Selection of collagen membranes for bone regeneration: A literature review”, *Materials*, vol. 13, no 3, fev. 2020, doi: 10.3390/ma13030786.
- [52] J. Jiménez Garcia, S. Berghezan, J. M. M. Caramês, M. M. Dard, e D. N. S. Marques, “Effect of cross-linked vs non-cross-linked collagen membranes on bone: A systematic review”, *Journal of Periodontal Research*, vol. 52, no 6. Blackwell Munksgaard, p. 955–964, 1o de dezembro de 2017. doi: 10.1111/jre.12470.
- [53] E. Calciolari et al., “Degradation pattern of a porcine collagen membrane in an in vivo model of guided bone regeneration”, *Journal of Periodontal Research*, vol. 53, no 3, p. 430–439, jun. 2018, doi: 10.1111/jre.12530.
- [54] P. Bunyaratavej e H.-L. Wang, “Collagen Membranes: A Review”, 2001.
- [55] G. A. D. Ramires, J. T. Helena, J. C. S. De Oliveira, L. P. Faverani, e A. P. F. Bassi, “Evaluation of guided bone regeneration in critical defects using bovine and porcine

- collagen membranes: Histomorphometric and immunohistochemical analyses”, *International Journal of Biomaterials*, vol. 2021, 2021, doi: 10.1155/2021/8828194.
- [56] A. M. D. Neto et al., “In vivo comparative evaluation of biocompatibility and biodegradation of bovine and porcine collagen membranes”, *Membranes*, vol. 10, no 12, p. 1–14, dez. 2020, doi: 10.3390/membranes10120423.
- [57] H. Yang e Z. Shu, “The extraction of collagen protein from pigskin”, Available online [www.jocpr.com](http://www.jocpr.com) *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, vol. 6, no 2, p. 683–687, 2014.
- [58] W. P. Nordhauser, Fred M.; Olson, *Sterilization of drugs and devices - Technologies for the 21st century*. 1997.
- [59] F. J. C. Silva, A. C., Aparecida, A. H., Braga, “Compósitos de hidroxiapatita óssea bovina dispersa em biovidro: desenvolvimento da matriz vítrea silicato-fosfato”, em 19o Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais - CBECiMat, 2010, p. 116–122.
- [60] S. Pitjarnit, P. Sriprapha, e W. Nakkiew, “Suitable forming condition of hydroxyapatite and bioactive glass composites for a bone fixation plate using Taguchi experimental design”, vol. 43, p. 466–469, 2016, doi: 10.14456/kkuenj.2016.157.
- [61] S. Kapoor e U. Batra, “Preparation and bioactivity evaluation of bone like hydroxyapatite - bioglass composite”, *World Academy of Science, Engineering and Technology*, vol. 37, no January 2010, p. 968–972, 2010, doi: 10.5281/zenodo.1057766.
- [62] V. Salih, G. Georgiou, J. C. Knowles, e I. Olsen, “Glass reinforced hydroxyapatite for hard tissue surgery - Part II: *In-vitro* evaluation of bone cell growth and function”, *Biomaterials*, vol. 22, no 20, p. 2817–2824, 2001, doi: 10.1016/S0142-9612(01)00026-6.
- [63] S. Padilla, S. Sánchez-Salcedo, e M. Vallet-Regí, “Bioactive and biocompatible pieces of HA/sol-gel glass mixtures obtained by the gel-casting method”, *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, vol. 75, no 1, p. 63–72, 2005, doi: 10.1002/jbm.a.30405.
- [64] O. Parkhomey et al., “Effect of particle size of starting materials on the structure and properties of biogenic hydroxyapatite/glass composites”, *Processing and Application of Ceramics*, vol. 10, no 1, p. 1–8, 2016, doi: 10.2298/PAC1601001P.
- [65] R. F. Bonan, P. R. F. Bonan, A. U. D. Batista, J. E. Oliveira, R. R. Menezes, e E. S. Medeiros, “Métodos de reforço microestrutural da hidroxiapatita (Methods of

- microstructural strengthening of hydroxyapatite )”, *Cerâmica*, vol. 60, p. 402–410, 2014.
- [66] G. Goller, F. N. Oktar, H. Demirkiran, e E. Demirkesen, “Sintering effects on mechanical properties of bioglass reinforced hydroxyapatite composites”, *Ceramics International*, vol. 28, p. 617–621, 2002, doi: 10.4028/www.scientific.net/kem.240-242.939.
- [67] X. Chatzistavrou, K. Chrissafis, E. Kontonasaki, T. Zorba, P. Koidis, e K. M. Paraskevopoulos, “Sintered Hydroxyapatite / Bioactive Glass Composites: Thermal Analysis and Bioactivity”, *Key Engineering Materials*, vol. 309–311, p. 167–170, 2006, doi: 10.4028/www.scientific.net/kem.309-311.167.
- [68] E. J. Lee, H. E. Kim, e H. W. Kim, “Production of hydroxyapatite/bioactive glass biomedical composites by the hot-pressing technique”, *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 89, no 11, p. 3593–3596, 2006, doi: 10.1111/j.1551-2916.2006.01276.x.
- [69] Y. Hu e X. Miao, “Comparison of hydroxyapatite ceramics and hydroxyapatite/borosilicate glass composites prepared by slip casting”, *Ceramics International*, vol. 30, no 7, p. 1787–1791, 2004, doi: 10.1016/j.ceramint.2003.12.119.
- [70] X. Chatzistavrou, T. Zorba, E. Kontonasaki, K. Chrissafis, P. Koidis, e K. M. Paraskevopoulos, “Following bioactive glass behavior beyond melting temperature by thermal and optical methods”, vol. 951, no 5, p. 944–951, 2004, doi: 10.1002/pssa.200306776.
- [71] S. Jo et al., “Regulation of osteoblasts by alkaline phosphatase in ankylosing spondylitis”, *International Journal of Rheumatic Diseases*, vol. 22, no 2, p. 252–261, 2019, doi: 10.1111/1756-185X.13419.
- [72] D. Bellucci, A. Anesi, R. Salvatori, L. Chiarini, e V. Cannillo, “A comparative in vivo evaluation of bioactive glasses and bioactive glass-based composites for bone tissue repair”, *Materials Science and Engineering C*, vol. 79, p. 286–295, 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.05.062.
- [73] N.A.S. Mohd Pu'ad, R.H. Abdul Haq, H. Mohd Noh, H.Z. Abdullah, M.I. Idris, T.C. Lee, Método de Síntese de hidroxiapatita: Uma revisão, *Mater. Hoje Proc.* 29 (2020) 233-239. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.05.536>.
- [74] M. M. Pereira, A.E. Clark, L.L. Hench, Formação de fosfato de cálcio em vidros bioativos derivados de sol-gel vitro, *J. Biomed. Mater. Res.* 28 (1994) 693-698. <https://doi.org/10.1002/jbm.820280606>.

- [75] E. Skierka, M. Sadowska, The influence of different acids and pepsin on the extractability of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*), *Food Chem.* 105 (2007) 1302-1306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.030>.
- [76] G.C.C. Mendes, T.R.S. Brandão, C.L.M. Silva, Esterilização de dispositivos médicos com óxido de etileno: Uma revisão, *Am. J. Infect. Control.* 35 (2007) 574-581. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.10.014>.
- [77] W. A. Rutala, D.J. Weber, Controlo de Infecções: O papel da desinfecção e esterilização, *J. Hosp. Infect.* 43 (1999) 43-55. [https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(99\)90065-8](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(99)90065-8).
- [78] T. Kokubo, H. Takadama, Quão útil é a SBF na previsão da bioactividade óssea in vivo?, *Biomateriais.* 27 (2006) 2907-2915. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>.
- [79] A. Hoppe, N.S. Güldal, A.R. Boccaccini, A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass- ceramics, *Biomaterials.* 32 (2011) 2757-2774. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.004>.
- [80] E. P. Erasmus, O.T. Johnson, I. Sigalas, J. Massera, Effects of sintering temperature on crystallization and fabrication of porous bioactive glass *scaffolds* for bone regeneration, *Sci. Rep.* 7 (2017) 6046. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06337-2>.
- [81] Q.Z. Chen, A. Efthymiou, V. Salih, A.R. Boccaccini, Bioglass® - scaffolds de cerâmica vítrea derivados de vidro: Estudo da proliferação celular e degradação de scaffolds *in-vitro*, *J. Biomed. Mater. Res. - Parte A.* 84 (2008) 1049-1060. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31512>.
- [82] H. Gheisari, E. Karamian, M. Abdollahi, A novel hydroxyapatite - Hardystonite nanocomposite cerâmica, *Ceram. Int.* 41 (2015) 5967-5975. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.01.033>.
- [83] T. Anee Kuriakose, S.N. Kalkura, M. Palanichamy, D. Arivuoli, K. Dierks, G. Bocelli, C. Betzel, Synthesis of stoichiometric nano crystalline hydroxyapatite by ethanol-based sol-gel technique at low temperature, *J. Cryst. Crescimento.* 263 (2004) 517-523. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2003.11.057>.
- [84] A. Chandrasekar, S. Sagadevan, A. Dakshnamoorthy, Síntese e caracterização de nano-hidroxiapatita (n-HAP) utilizando a técnica química húmida, *Int. J. Phys. Sci.* 8 (2013) 1639-1645. <https://doi.org/10.5897/IJPS2013.3990>.
- [85] M. M. Figueiredo, J.A.F. Gamelas, A.G. Martins, Characterization of bone and bone-based graft materials using FTIR spectroscopy, in: T. Theophile (Ed.), *Espectroscópio*



- Infravermelho. - *Life Biomed. Sci.*, IntechOpen, 2012: pp. 315-338. <https://doi.org/10.5772/36379>.
- [86] N. Yao, Y. Zhang, D. Kong, J. Zhu, Y. Tao, T. Qiu, The effect of phosphoric acid concentration on the synthesis of nano-whiskers of calcium metaphosphate by chemical precipitation Method, in: *PIO Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, 2011: pp. 1-4. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/18/6/062022>.
- [87] H.Y. Jung, R.K. Gupta, E.O. Oh, Y.H. Kim, C.M. Whang, Vibrational spectroscopic studies of sol-gel derived physical and chemical bonded ORMOSILs, *J. Non. Cryst. Sólidos*. 351 (2005) 372-379. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2005.01.004>.
- [88] M. Cerruti, D. Greenspan, K. Powers, Effect of pH and ionic strength on the reactivity of Bioglass® 45S5, *Biomaterials*. 26 (2005) 1665-1674. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.009>.
- [89] W. Yan, D. Liu, D. Tan, P. Yuan, M. Chen, FTIR estudo espectroscópico das alterações estruturais do palygorskite sob aquecimento, *Spectrochim. Acta Parte A Mol. Biomol. Espectrosc.* 97 (2012) 1052-1057. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.07.085>.
- [90] J.P. Borrajo, P. González, S. Liste, J. Serra, S. Chiussi, B. León, M. Pérez-Amor, Pulsed laser deposition of bioactive glass films in ammonia and disilane atmospheres, *Appl. Surf. Sci.* 248 (2005) 369-375. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2005.03.084>.
- [91] K.S.W. Sing, Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity, *Pure Appl. Chem.* 54 (1982) 2201-2218. <https://doi.org/10.1351/pac198557040603>.
- [92] M. Thommes, K. Kaneko, A. V. Neimark, J.P. Olivier, F. Rodriguez-Reinoso, J. Rouquerol, K.S.W. Sing, Physisorption of gases, with Special Reference to the Evaluation of Surface Area and Pore Size Distribution (Relatório Técnico IUPAC), *Pure Appl. Chem.* 87 (2015) 1051-1069. <https://doi.org/10.1515/pac-2014-1117>.
- [93] L.M. Mukundan, R. Nirmal, D. Vaikkath, P.D. Nair, Uma nova rota de síntese para o vidro bioactivo de alta superfície sol gel através da lavagem com álcool: um estudo preliminar, *Biomatéria*. 3 (2013). <https://doi.org/10.4161/biom.24288>.
- [94] A. M. Basso, B.P. Nicola, K. Bernardo-Gusmão, S.B.C. Pergher, Tunable effect of the calcination of the silanol groups of KIT-6 and SBA-15 mesoporous materials, *Appl. Sci.* 10 (2020) 970. <https://doi.org/10.3390/app10030970>.
- [95] A. T. Shah, M. Batoool, A.A. Chaudhry, F. Iqbal, A. Javaid, S. Zahid, K. Ilyas, S. bin Qasim, A.F. Khan, A.S. Khan, I. ur Rehman, Effect of calcium hydroxide on

- mechanical strength and biological properties of bioactive glass, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 61 (2016) 617-626. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.03.030>.
- [96] I. S. Berezovska, V. V Yanishpolskii, V.A. Tertykh, Síntese de sílicas mesoporosas dentro de grandes poros de matriz inorgânica, *J. Therm. Anal. Calorim.* 94 (2008) 649-653. <https://doi.org/10.1007/s10973-008-9361-z>.
- [97] E. Garskaite, K.-A. Gross, S.-W. Yang, T.C.-K. Yang, J.-C. Yang, A. Kareiva, Effect of processing conditions on the crystallinity and structure of carbonated calcium hydroxyapatite (CHAp), *CrystEngComm.* 16 (2014) 3950-3959. <https://doi.org/10.1039/C4CE00119B>.
- [98] A. M. Sofronia, R. Baies, E.M. Anghel, C.A. Marinescu, S. Tanasescu, Thermal and structural characterization of synthetic and natural nanocrystalline hydroxyapatite, *Mater. Sci. Eng. C.* 43 (2014) 153-163. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.07.023>.
- [99] K. Huang, S. Cai, G. Xu, M. Ren, X. Wang, R. Zhang, S. Niu, H. Zhao, Sol-gel derivado de vidro mesoporoso 58S bioactivo sobre liga de magnésio AZ31 e comportamento de degradação *in-vitro*, *Surf. Revestimentos Technol.* 240 (2014) 137-144. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2013.12.026>.
- [100] M. Taghian Dehaghani, M. Ahmadian, M. Fathi, Síntese, caracterização e avaliação da bioatividade de nanopólios amorfos e cristalizados de 58S bioglass, *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* 12 (2015) 867-874. <https://doi.org/10.1111/ijac.12293>.
- [101] N. Laohavisuti, B. Boonchom, W. Boonmee, K. Chaiseeda, S. Seesanong, Simple recycling of biowaste eggshells to various calcium phosphates for specific industries, *Sci. Rep.* 11 (2021) 15143. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94643-1>.
- [102] C.Y. Ooi, M. Hamdi, S. Ramesh, Properties of hydroxyapatite produced by annealing of bovine bone, *Ceram. Int.* 33 (2007) 1171-1177. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2006.04.001>.
- [103] A.H. Rajabi-Zamani, A. Behnamghader, A. Kazemzadeh, Síntese de pó de hidroxiapatita carbonatada nanocristalina através do método sol-gel de nonalkoxide, *Mater. Sci. Eng. C.* 28 (2008) 1326-1329. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.02.001>.
- [104] L.M. Miller, V. Vairavamurthy, M.R. Chance, R. Mendelsohn, E.P. Paschalis, F. Betts, A.L. Boskey, In situ analysis of mineral content and crystallinity in bone using infravermared microspectroscopy of the  $\nu_4$  PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> vibration, *Biochim. Biófilos. Acta - Gen. Subj.* 1527 (2001) 11-19. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(01\)00093-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(01)00093-9).
- [105] D.L. Goloshchapov, V.M. Kashkarov, N.A. Rumyantseva, P. V Seredin, A.S. Lenshin, B.L. Agapov, E.P. Domashevskaya, Síntese de hidroxiapatita nanocristalina por

- precipitação usando casca de ovo de galinha, *Ceram. Int.* 39 (2013) 4539-4549. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.11.050>.
- [106] Y. Seo, T. Goto, S.H. Cho, S. Shi, A. 'arkov, T. Yamamoto, T. Sekino, processo de sinterização de mineralização a baixa temperatura para fabricação de vidro bioativo fluoretado contendo hidroxiapatita, *Ceram. Int.* 46 (2020) 25520-25526. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.07.023>.
- [107] D. Bakos, M. Soldán, I. Hernández-Fuentes, Hydroxyapatite-collagen-hyaluronic acid composite, *Biomaterials.* 20 (1999) 191–195. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00163-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00163-X).
- [108] M. H. Santos, R.M. Silva, V.C. Dumont, J.S. Neves, H.S. Mansur, L.G.D. Heneine, Extracção e caracterização de colagénio altamente purificado de pericárdio bovino para potenciais aplicações de bioengenharia, *Mater. Eng. Ci. C.* 33 (2013) 790-800. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.11.003>.
- [109] T. Riaz, R. Zeeshan, F. Zarif, K. Ilyas, N. Muhammad, S.Z. Safi, A. Rahim, S.A.A. Rizvi, I.U. Rehman, FTIR análise de colágeno natural e sintético, *Appl. Spectrosc. Rev.* 53 (2018) 703-746. <https://doi.org/10.1080/05704928.2018.1426595>.
- [110] J. Zhang, R. Duan, Y. Tian, K. Konno, Characterisation of acid-soluble collagen from skin of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), *Food Chem.* 116 (2009) 318-322. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.053>.
- [111] Z. Xu, X. Guan, J. Liu, H. Fan, Y. Chen, Improving collagen extraction through an alternative strategy based on succinic anhydride pretreatment to retain collagen's triple-helix structure, *J. Appl. Polym. Sci.* 134 (2017) 45424. <https://doi.org/10.1002/app.45424>.
- [112] J.H. Hubbell, S.M. Seltzer, X-ray mass attenuation coefficients, NIST - Natl. Inst. Stand. Technol. (2004). <https://doi.org/10.18434/T4D01F>.
- [113] A.P.T. Mohamed N. Rahaman, Delbert E. Day, B. Sonny Bal, Qiang Fu, Steven B. Jung, Lynda F. Bonewald, Bioactive glass in tissue engineering, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 24 (2013) 669-676. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.03.016>. Bioactive.
- [114] M. Elbadawi, Z.J. Wally, I.M. Reaney, Porous hydroxyapatite-bioactive glass *scaffolds* fabricados via extrusão de colméias cerâmicas, *J. Am. Ceram. Soc.* 101 (2018) 3541-3556. <https://doi.org/10.1111/jace.15514>.