



LUISA QUEIROZ VASCONCELOS

Análise físico-química e histomorfométrica do compósito pseudo-Wollastonita e β -Fosfato Tricálcico em diferentes concentrações após implantação *in vivo* para regeneração óssea

Salvador
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



PROCESSOS INTERATIVOS
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO • ICS • UFBA



LUISA QUEIROZ VASCONCELOS

**Análise físico-química e histomorfométrica do compósito pseudo-
Wollastonita e β -Fosfato Tricálcico em diferentes concentrações
após implantação *in vivo* para regeneração óssea**

Salvador
2019

LUISA QUEIROZ VASCONCELOS

Análise físico-química e histomorfométrica do compósito pseudo-Wollastonita e β -Fosfato Tricálcico em diferentes concentrações após implantação *in vivo* para regeneração óssea

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas

Orientador: Prof. Dr. Roberto Paulo Correia de Araújo

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Isabela Cerqueira Barreto

Salvador
2019

Ficha catalográfica: Keite Birne de Lira CRB-5/1953

Vasconcelos, Luisa Queiroz

Análise físico-química e histomorfométrica do compósito wollastonita/fosfato tricálcico em diferentes concentrações após implantação *in vivo* para regeneração óssea. – Salvador, 2019.

98f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Paulo Correia de Araújo

Coorientadora: Profa. Dra. Isabela Cerqueira Barreto

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Salvador, 2019.

1. Regeneração óssea. 2. Silicato de cálcio. 3. Cerâmica. I. Araújo, Roberto Paulo Correia de. II. Barreto, Isabela Cerqueira. III. Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas IV. Título

CDD – 620.14 21. ed.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



TERMO DE APROVAÇÃO DA DEFESA PÚBLICA DE TESE

LUIZA QUEIROZ VASCONCELOS

Análise físico-química e histomorfométrica do compósito Wollastonita/Fosfato Tricálcico em diferentes concentrações após implantação in vivo para regeneração óssea

COMISSÃO EXAMINADORA:

PROF DR ROBERTO PAULO CORREIA DE ARAÚJO (Universidade Federal da Bahia)

PROFA DRA ISABELA CERQUEIRA BARRETO (Universidade Federal da Bahia)

PROF DR FÚLVIO BORGES MIGUEL (Universidade Federal do Recôncavo da Bahia)

PROF DR MARCUS VINÍCIUS LIA FOOK (Universidade Federal de Campina Grande)

PROFA DRA ELIANA CRISTINA DA SILVA RIGO (Universidade de São Paulo)

A Deus, a meu filho e à minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho e me ajudar a seguir em frente. Minha base, firme rocha...

A meu filho, Mateus, por me mostrar todos os dias, em atos e palavras, o que é um amor puro e inocente. Obrigada por entender minhas ausências. Luto diariamente por você.

A meus pais, Faustino e Hildélia, que tanto amo e que são meus exemplos de força, coragem e luta. Meus exemplos de homem e de mulher na terra.

A meus irmãos, que sempre estão do meu lado, me apoiando e me incentivando. Em especial, à minha irmã Marcia: *Mau*, sou eternamente grata a você.

A meus sobrinhos, que são, na verdade, irmãos, por entenderem a distância e por torcerem pelo meu sucesso.

À Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Paim Rosa, pela orientação, pelo exemplo profissional, pela mulher que é. Penso diariamente em você. *“Se a vida fosse fácil como a gente quer. Se o futuro a gente pudesse prever. Eu estaria agora tomando um café. Sentado com os amigos em frente à TV. Eu olharia as aves como eu nunca olhei. Daria um abraço apertado em meus avós. Diria eu te amo a quem nunca pensei. Talvez é o que o universo espera de nós. Eu quero ser curado e ajudar a curar. Eu quero ser melhor do que eu nunca fui. Fazer o que eu posso para me ajudar. Ser justo e paciente como era Jesus. Eu quero dar mais valor até à luz do Sol. Que eu esteja preparado para quem me conduz. Que eu seja eternamente como um girassol. De costas para o escuro e de frente para a luz.”* (Whindersson Nunes)

Ao Prof. Roberto Paulo de Araújo e à Prof^ª. Isabela Barreto por aceitarem me orientar e me conduzirem como se estivessem caminhando desde o início a meu lado neste percurso.

Aos colegas do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais (LBTB) – em especial Chenia, Victor, Ana Emília, Maurício, George e professora Eliana – por estarem sempre dispostos a ajudar no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada!

Ao Prof. Aryon de Almeida Barbosa Júnior pela gentileza ao analisar os espécimes.

Ao professor Raúl Carrodegua por gentilmente disponibilizar o biomaterial.

À técnica de laboratório Elisângela pela dedicação no processamento dos espécimes.

A Zé por cuidar com respeito e responsabilidade todos os animais deste experimento.

À equipe de profissionais do PIOS, pela dedicação e atenção com seus alunos.

Aos colegas de turma do PIOS.

À Faculdade de Odontologia da UFBA por me mostrar, pela primeira vez, o universo científico.

À CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

*“Tudo o que fizerem, façam de todo o coração, como para o
senhor, e não para os homens”
(Colossenses 3:23)*

VASCONCELOS, Luisa Queiroz. **Análise físico-química e histomorfométrica do compósito pseudo-wollastonita e β -fosfato tricálcico em diferentes concentrações após implantação *in vivo* para regeneração óssea.** 92 fls. il. 2019. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2019.

Resumo

Objetivo – Avaliar, após implantação *in vivo* em defeito ósseo crítico em calvária de rato, o comportamento osteogênico de um compósito constituído de diferentes concentrações de p-wollastonita e β -fosfato tricálcico para aplicação na bioengenharia tecidual óssea. *Materiais e métodos* – A amostra foi composta por 40 ratos Wistar, machos, adultos, distribuídos aleatoriamente para compor quatro grupos, com cinco animais em cada grupo, avaliados aos 15 e 45 dias após implantação dos compósitos: Grupo 20/80 – defeito ósseo crítico preenchido com grânulos do compósito 20% p-wollastonita e 80% β -fosfato tricálcico; Grupo 60/40 – defeito ósseo crítico preenchido com grânulos do compósito 60% p-wollastonita e 40% β -fosfato tricálcico; Grupo 80/20 – defeito ósseo crítico preenchido com grânulos do compósito 80% p-wollastonita e 20% β -fosfato tricálcico; Grupo de controle – defeito ósseo crítico preenchido com coágulo. *Resultados* – A análise histológica evidenciou neoformação óssea restrita às bordas do defeito ósseo em todos os grupos experimentais, aos 15 dias. A histomorfometria apontou que os grupos 20/80, 60/40 e 80/20 e o grupo de controle formaram percentuais de neoformação óssea similares aos 15 dias. Aos 45 dias o grupo 60/40 apresentou 65% de neoformação óssea. Houve formação de septos fibrosos penetrando as partículas do biomaterial em todos os grupos. Além disso, o defeito ósseo foi preenchido em diversas camadas de grânulos em ambos pontos biológicos. *Conclusão* – Os compósitos constituídos de diferentes concentrações de p-wollastonita e β -fosfato tricálcico podem ser considerados bioativos e biocompatíveis. Dentre os grupos experimentais grupo 60/40 apresentou maiores percentuais de neoformação óssea e permitiu restituir espessura e volume ósseo com dimensões similares a bordas da calvária do animal.

Palavras-chave: Regeneração óssea. Silicato de cálcio. Cerâmica.

VASCONCELOS, Luisa Queiroz. **Physicochemical and histomorphometric analysis of wollastonite composite/tricalcium phosphate at different concentrations after *in vivo* implantation for bone regeneration.** 92 fl. il. 2019. Thesis (Doctorate) – Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, 2019.

Abstract

Objective – To evaluate, after *in vivo* implantation in critical bone defect in rat calvaria, the osteogenic behavior of a composite consisting of different concentrations of p-wollastonite and tricalcium β -phosphate for application in bone tissue bioengineering. *Materials and methods* – The sample consisted of 40 adult Male Wistar rats randomly distributed to compose four groups, with five animals in each group, evaluated at 15 and 45 days after composite implantation: Group 20/80 – critical bone defect filled with composite granules 20% p-wollastonite and 80% tricalcium β -phosphate; Group 60/40 - critical bone defect filled with composite granules 60% p-wollastonite and 40% tricalcium β -phosphate; Group 80/20 - critical bone defect filled with composite granules 80% p-wollastonite and 20% tricalcium β -phosphate; Control group - critical bone defect filled with clot. *Results* – Histological analysis showed bone neoformation restricted to the edges of the bone defect in all experimental groups at 15 days. Histomorphometry showed that groups 20/80, 60/40 and 80/20 and the control group formed similar percentages of bone neoformation at 15 days. At 45 days, the 60/40 group presented 65% bone neoformation. Fibrous septa was formation penetrating the biomaterial particles in all groups. In addition, the bone defect was filled in several layers of granules at both biological points. *Conclusion* – Composites consisting of different concentrations of p-wollastonite and tricalcium β -phosphate can be considered bioactive and biocompatible. Among the experimental groups group 60/40 presented higher percentages of bone neoformation and allowed to restore bone thickness and volume with dimensions similar to the edges of the calvaria of the animal.

Keywords: Bone regeneration. Calcium silicate. Ceramic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura** 1 Representação das etapas de deposição de HAP dos biovidros em fluido biológico.
- Figura** 2 Representação esquemática do processo de dissolução dos fosfatos de cálcio após implantação. 1 e 2: início e continuação do processo de reabsorção. 3: equilíbrio iônico entre implante e tecido. 4: adsorção de proteínas. 5 e 6: adesão e proliferação celular. 7: deposição de HAP. 8: osso neoformado.

ARTIGO 1

- Figura** 1 Fotomicrografias obtidas da borda do defeito ósseo após 15 dias de implantação dos biomateriais nos G 20/80 (a-d), G 60/40 (e-h), G 80/20 (f-m). Matriz osteoide (OM), grânulo (GR), veia central (VC), região de dura-máter (DM), tecido conjuntivo frouxo (LCT), vaso sanguíneo (*), célula gigante multinucleada (cabeça de seta), osteócitos (seta preta). HE (a, c, e, g, i, l) e PIFG (b, d, f, h, j, m)
- Figura** 2 Fotomicrografias obtidas do centro do defeito ósseo após 15 dias de implantação dos biomateriais nos G 20/80 (a-d), G 60/40 (e-h), G 80/20 (f-m). Veia central (CV), grânulo (GR), região de dura-máter (DM), tecido conjuntivo frouxo (LCT), veia central (VC), vaso sanguíneo (*), células gigantes multinucleadas (cabeça de seta), vaso sanguíneo (*), células gigantes multinucleadas (cabeça de seta). HE (a, c, e, g, i, l) e PIFG (b, d, f, h, j, m).
- Figura** 3 Fotomicrografias obtidas da borda do defeito ósseo após 45 dias de implantação dos biomateriais nos G 20/80 (a-d), G 60/40 (e-h) e G 80/20 (f-m). Borda óssea (BE), grânulo (GR), matriz osteoide (OM), tecido conjuntivo frouxo (LCT), vaso sanguíneo (*), célula gigante multinucleada (cabeça de seta), osteócitos (seta preta). HE (a, c, e, g, i, l) e PIFG (b, d, f, h, j, m).
- Figura** 4 Fotomicrografias obtidas do centro do defeito ósseo após 45 dias de implantação dos biomateriais nas bordas do defeito ósseo nos G 20/80 (a-d), G 60/40 (e-h), G 80/20 (f-m). Matriz osteoide (OM), grânulo (GR), veia central (VC), região de dura-máter (DM), tecido conjuntivo frouxo (LCT), vaso sanguíneo (*), célula gigante multinucleada (cabeça de seta), osteócitos (seta preta). HE (a, c, e, g, i, l) e PIFG (b, d, f, h, j, m).
- Figura** 5 Fotomicrografia do defeito preenchido por grânulos nos grupos no centro do defeito ósseo G20/80, G 60/40 e G 80/20, ao longo do experimento. As fotomicrografias “a” representam o ponto biológico de 15 dias e a letra “b” representa o ponto biológico de 45 dias. HE.

Figura 6 Fotomicrografias do padrão de deposição de fibras colágenas de forma concêntrica ao redor do grânulo no centro do defeito ósseo no grupo G 20/80, ponto biológico 45 dias. Grânulo (GR), tecido conjuntivo frouxo (LCT), fibras colágenas (seta preta). HE.

Figura 7 Fotomicrografia que demonstra disposição das células inflamatórias com destaque para as células gigantes multinucleadas ao redor e dentro dos grânulos no centro do defeito ósseo no grupo G20/80, ponto biológico 45 dias. Grânulo (GR), tecido conjuntivo frouxo (LCT), vaso sanguíneo (*), célula gigante multinucleadas (seta preta). HE.

ARTIGO 2

Figura 1 Fotomicrografias da superfície dos grânulos por MEV A, B e C, respectivamente, correspondem a micrografias da superfície das amostras de grânulos do biomaterial composto de W e β -TCP). As micrografias dos grânulos nas concentrações 20/80 mostram formas sólidas, variadas e aleatórias (a e b).

Figura 2 Fotomicrografias da superfície dos grânulos por MEV A, B e C, respectivamente, correspondem a micrografias da superfície das amostras de grânulos do biomaterial composto de W e β -TCP). As micrografias dos grânulos nas concentrações 60/40 mostram formas sólidas, variadas e aleatórias (a e b).

Figura 3 Fotomicrografias da superfície dos grânulos por MEV A, B e C, respectivamente, correspondem a micrografias da superfície das amostras de grânulos do biomaterial composto de W e β -TCP). As micrografias dos grânulos nas concentrações 80/20 mostram formas sólidas, variadas e aleatórias (a e b).

Figura 4 Difrátogramas de raios X do compósito 20-80.

Figura 5 Difrátogramas de raios X do compósito 60-40

Figura 6 Difrátogramas de raios X do compósito 80-20

Figura 7 Imagens de MEV e mapeamento elementar dos compósitos 20-80, 60-40 e 80-20.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- Tabela** 1 Composição química dos compósitos em diferentes concentrações e temperaturas utilizadas para obtê-las.
- Tabela** 2 Dados de área (mm^2) de preenchimento do defeito por neoformação óssea em relação ao total. Médias, desvio padrão e percentual.
- Tabela** 3 Dados da extensão linear (mm) de preenchimento do defeito por neoformação óssea em relação ao total. Médias, desvio padrão e percentual.

ARTIGO 2

- Tabela** 1 Quantidades de matérias-primas, temperatura e tempo, empregadas na preparação dos materiais experimentais.
- Tabela** 2 A composição química e de fases encontrada para os materiais experimentais.

LISTA DE FÓRMULAS, ABREVIATURAS E SIGLAS

λ	Ângulo de difração
θ	Ângulo de incidência
Al_2O_3	Óxido de alumínio
BO	Borda óssea
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Estrutura molecular fosfato tricálcico
CaP	Fosfatos de cálcio
CaSiO_3	Estrutura molecular do metassilicato de cálcio
DM	Dura-máter
FC	Fluído corpóreo
Fe_2O_3	Óxido de ferro
Gr	Grânulos
HAP	Hidroxiapatita
K_2O	Óxido de potássio
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MgO	Óxido de magnésio
MnO	Óxido de manganês
MO	Matriz osteoide
pH	Potencial de hidrogênio
PIFG	Picrosirius-Red
p-W	Pseudowollastonita
SiO_2	Dióxido de silício
TC	Tecido conjuntivo
TCF	Tecido conjuntivo fibroso
TCP	Fosfato tricálcico
TiO_2	Óxido de titânio
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
UFBA	Universidade Federal da Bahia
VC	Veia central
W	Wollastonita

SUMÁRIO

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
1.1 INTRODUÇÃO	18
1.1.1 Tecido ósseo	18
1.2 BIOMATERIAIS	21
1.2.1 Materiais cerâmicos.....	23
1.2.2 Wollastonita (W)	24
1.2.3 Fosfato Tricálcico (TCP).....	26
1.2.4 Compósito de W-TCP	27
2 JUSTIFICATIVA	30
3 HIPÓTESES.....	32
3.1 Hipótese alternativa.....	33
3.2 Hipótese nula	33
4 OBJETIVOS.....	34
4.1 OBJETIVO GERAL	35
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
5 ARTIGOS.....	36
5.1 ARTIGO 1	37
5.2 ARTIGO 2	57
6 DISCUSSÃO.....	75
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
REFERÊNCIAS.....	81
ANEXO.....	86

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de biomateriais para o reparo do tecido ósseo tem grande relevância devido à crescente incidência de desordens ósseas em todo o mundo. Os principais biomateriais para a regeneração óssea atuam através da estimulação bioquímica e, para isso, é necessário associar diferentes materiais na tentativa de aperfeiçoar as propriedades dos biomateriais, uma vez que as células respondem a uma variedade de substâncias químicas e biológicas que, individualmente ou combinadas, são capazes de melhorar migração, adesão, proliferação e diferenciação celular.^{1,2}

Dentre os biomateriais, a wollastonita (W) e o fosfato tricálcico (TCP) vêm se destacando entre as cerâmicas. O TCP é um fosfato de cálcio com características cristalográficas e químicas semelhantes à estrutura óssea do corpo humano. A W é um silicato de cálcio bioativo que promove melhorias nas propriedades biomecânicas dos fosfatos de cálcio devido à degradabilidade e à alta bioatividade que possui.^{2,3}

O silício presente na W está relacionado com uma maior osteogênese e um maior reforço às forças de tração. Estudos científicos associam um melhor desempenho biológico da W devido à participação do silício em processos fisiológicos importantes, já que se encontra presente na zona ativa de crescimento ósseo e está relacionado com o ciclo celular dos osteoblastos.^{2,4,5} A W e o TCP, como biomateriais, são biologicamente compatíveis e permitem substituições em sua estrutura química, o que resulta em diferentes respostas clínicas e formas de apresentação. A estratégia de associar a W com o TCP possibilita desenvolver um substituto ósseo com biodegradabilidade e osteogênese similar ao processo fisiológico de reparação óssea.

1.1.1 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é uma estrutura dinâmica e com notável capacidade regenerativa. É um tecido conjuntivo especializado, mineralizado, formado por matriz extracelular (MEC) impregnada de cálcio e fosfato (matriz óssea) e células que produzem e regulam seu desenvolvimento.¹ A MEC tem como função preencher os espaços não ocupados por células, fornecer nutrientes e resistência aos tecidos, funcionar como uma estrutura de ancoragem e migração celular e prover ambiente para sinalização celular.^{2,3}

A parte orgânica da MEC é formada por fibras colágenas constituídas de colágeno do tipo I e por uma quantidade pequena de proteoglicanos e glicoproteínas que possuem participação na mineralização da matriz óssea.² A porção inorgânica da matriz óssea é a parte

que se encontra mineralizada por íons cálcio e íons fosfatos, além da presença de magnésio e de outros íons em quantidades menores como: bicarbonato, potássio, sódio e citrato.⁴

A combinação da fase mineral e da fase orgânica confere ao tecido ósseo propriedades únicas, que o tornam resistente às forças mecânicas. Quando ocorre uma fratura, o processo de reparo ocorre por meio da formação de osso novo, e não pela formação de tecido fibroso. Para esse processo, algumas condições básicas devem ser respeitadas, como amplo suprimento sanguíneo, boa estabilidade mecânica e fornecimento de um arcabouço que permita migração e acomodação celular.^{4, 5, 6}

As células do tecido ósseo podem ser agrupadas em duas séries diferentes: células da linhagem osteoblástica, responsáveis pelo processo de formação e mineralização da matriz óssea, e células da linhagem osteoclástica, relacionadas com a sua reabsorção. Os osteoblastos são células mononucleadas, de origem mesenquimal, que se apresentam como células polarizadas, com núcleo esférico e citoplasma basófilo. Os osteoblastos, quando atingem a maturidade, encontram-se na superfície óssea e apresentam-se como células cúbicas dispostas em paliçada. Quando os osteoblastos terminam o período de secreção ativa, achatam-se e transformam-se em células de revestimento ósseo ou em osteócitos.^{4, 5, 6}

Os osteoblastos sintetizam a matriz orgânica, constituída por proteínas colagênicas e não colagênicas, tais como, colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, osteonectina, proteoglicanas, fosfoproteínas e citocinas. Esses componentes interagem entre si e organizam-se, fornecendo um arcabouço que possibilita a deposição de sais minerais, além do fato de algumas dessas moléculas atuarem diretamente na mineralização. Além disso, os osteoblastos sintetizam fatores de crescimento, que ficam incorporados à matriz óssea, desempenhando um papel determinante, tanto na formação de tecido ósseo como na diferenciação e na atividade dos osteoclastos. Essas células são responsáveis pela transmissão de sinais para remodelação, pois possuem receptores para hormônios e secretam fatores locais que agem na proliferação, diferenciação e atividade osteoblástica.^{5, 6}

Os osteoclastos são células gigantes, multinucleadas, formadas pela fusão de células mononucleadas da linhagem hematopoiética, altamente especializadas nos processos de reabsorção da matriz óssea, o que lhes confere características e capacidades únicas. Trata-se de um processo altamente organizado e sequencial, constituído por duas fases consecutivas.^{5, 6}

A primeira fase da reabsorção óssea consiste em um processo de acidificação do tecido ósseo através da produção de cátions H^+ e ânions Cl^- , o que provoca a dissolução dos cristais de hidroxiapatita e a consequente libertação de cálcio (Ca^{2+}) e de fosfato (HPO_4). Em uma segunda fase, ocorre a degradação completa da fase orgânica por ação de enzimas proteolíticas,

responsáveis pela degradação das proteínas colagênicas e não colagênicas da matriz. Os produtos da degradação da matriz orgânica são internalizados e transportados para o interior do osteoclasto, sendo posteriormente conduzidos para o meio extracelular.^{4, 5, 6}

O processo de reparo é regido por uma variedade de células, proteínas, enzimas e fatores de crescimento, tais como: células mesenquimais, fibroblastos, fibronectina, integrina, fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina, fatores de crescimento do endotélio vascular, fatores de crescimento derivados de plaquetas, proteínas ósseas morfogenéticas (BMP), dentre outros.^{7, 8, 9, 10}

O reparo ósseo apresenta duas fases. A primeira fase ocorre nos 15 dias iniciais de reparo ósseo, sendo possível observar duas etapas. Na primeira delas, a resposta inflamatória é do tipo aguda, caracterizada pela redução de irrigação sanguínea com alteração do metabolismo local e liberação de mediadores químicos. A segunda etapa é caracterizada pela inflamação crônica granulomatosa com a tentativa de remoção dos corpos estranhos e do tecido necrosado e pela mitose celular, com migração e ativação dos fibroblastos.^{5, 9, 10}

Na segunda fase, que pode durar de 3 a 6 semanas, a reparação ocorre por um pico de produção das fibras colágenas pelos fibroblastos de uma forma desorganizada.^{1, 5} Além disso, desenvolve-se um calo ao redor da fratura e se inicia a ossificação do osteoide. O pH tecidual local se eleva, bem como a deposição de cálcio. Nessa fase de reparação, a matriz osteoide possui pequena quantidade de material inorgânico, sendo classificada como osso imaturo ou primário. Entre 6 e 12 semanas após a fratura, forma-se uma ponte óssea sólida que atravessa o espaço existente, e o osso readquire resistência mecânica. Entre 12 e 26 semanas, o osso é classificado como secundário, maduro ou lamelar, pois o calo amadurece e origina uma matriz osteoide mais mineralizada e com fibras colágenas dispostas em lamelas paralelas, organizadas de forma espiralada concêntrica. Ainda nessa fase, ocorre o remodelamento, e as proeminências ósseas são remodeladas, sendo restaurada a arquitetura óssea normal, constituída de osso compacto ou esponjoso.^{6, 7, 8}

Lesões ósseas de dimensões críticas são caracterizadas por comprometimento da irrigação sanguínea e de células, em decorrência da ausência de um arcabouço tridimensional que favorece no reparo. Nessa condição, o reparo se dá por deposição de tecido conjuntivo fibroso. Faz-se necessário, então, a implantação de um suporte que oriente a migração de células e de fatores osteogênicos para que ocorra a deposição de novo tecido ósseo.¹¹

Um modelo experimental bastante utilizado para avaliação da regeneração óssea é a confecção de defeito em calvária de rato.¹³ Esse sítio é utilizado, pois tem baixa vascularização

e pequena quantidade de osso esponjoso. Além disso, permite confeccionar defeitos ósseos de tamanhos diferentes, que podem simular defeitos extensos ou até críticos.^{14, 15}

Ao confeccionar o defeito ósseo crítico em calvária de rato, as corticais externa e interna do osso parietal são envolvidas, o que permite um único sentido para a osteogênese, saindo das bordas do defeito ósseo até o seu centro. Por isto, a anatomia e a função da região lesionada necessitam de uma estrutura que oriente a migração celular e favoreça a adesão celular. Portanto, defeitos ósseos críticos possibilitam avaliar as propriedades de biocompatibilidade e a capacidade osteocondutora de um biomaterial.^{10, 6, 15}

Diante dessa necessidade, os biomateriais podem ser uma opção terapêutica, uma vez que são produzidos com composição ou arquitetura que visam mimetizar o tecido ósseo. Os biomateriais devem proporcionar a construção de um arcabouço com conexões internas que promovam um meio favorável para o fluxo de células e nutrientes, assim como para a adesão e a proliferação celular. A porosidade e o tamanho das partículas afetam a taxa de degradação do biomaterial e suas propriedades biomecânicas.¹²

Outro fator que ganha destaque nas discussões relacionadas aos substitutos ósseos está relacionado ao tamanho e à conformação do biomaterial. Qual o melhor tamanho e o melhor formato que o material deve apresentar para que seja osteocondutor? Constitui-se, portanto, um dos grandes desafios da bioengenharia tecidual óssea desenvolver um arcabouço tridimensional que simule as condições físico-químicas do tecido ósseo para que ocorra adesão, migração, proliferação e diferenciação celular.¹⁶

1.2 BIOMATERIAIS

Biomaterial é definido como qualquer material, de origem natural ou sintética, que substitui ou acrescenta uma função natural de uma parte ou de um todo de uma estrutura viva. O biomaterial, ao ser aplicado, deve manter suas propriedades e características estruturais, mas, simultaneamente, substituir a função para a qual foi criado. Além disso, ele tem de permitir uma boa adesão celular à sua superfície, ter propriedades mecânicas adequadas, permitir que a fácil produção possa ser feita em grandes quantidades e com custos aceitáveis, além de ser esterilizável, hemostático e não ser oncogênico.¹⁷

Dispositivos biomédicos (como biossensores, tubos de circulação sanguínea, sistemas de hemodiálise), materiais implantáveis (como suturas, placas, substitutos ósseos, tendões, telas ou malhas, válvulas cardíacas, lentes, dentes), dispositivos para a liberação de medicamentos (na forma de filmes, implantes subdérmicos e partículas), órgãos artificiais (como coração, rim,

fígado, pâncreas, pulmões, pele) e curativos, dentre muitos outros, são exemplos de biomateriais aplicados à saúde.¹⁷

Os biomateriais podem ser classificados quanto à sua composição química e ao seu comportamento biológico.¹⁸ Quanto à composição química, podem ser classificados em metais e ligas metálicas, cerâmicos, polímeros e compósitos. Quanto ao comportamento biológico a classificação vai ser baseada na resposta do tecido hospedeiro.^{18,19} Assim, os materiais podem ser:

- **Bioinertes** – Pertencem a esse grupo os materiais que mantêm as propriedades físicas e químicas, sem troca iônica, quando expostos ao meio fisiológico com a formação de cápsula fibrosa ao redor do material devido à mínima resposta inflamatória entre o biomaterial e o meio biológico.¹⁸
- **Bioativos** – Nesse grupo, os materiais produzem uma resposta tecidual específica o que promove ligações químicas com o tecido adjacente, sem formar tecido conjuntivo, o que promove fixação estável entre eles.¹⁸
- **Biodegradáveis ou biorreabsorvíveis** – São biomateriais que, ao entrarem em contato com os tecidos, são degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo de forma gradual.¹⁸

As biocerâmicas são classificadas em bioinertes e bioativas. Como exemplos de biocerâmicas bioinertes pode-se citar a alumina, zircônia e dióxido de titânio. A hidroxiapatita, o fosfato tricálcico e os biovidros são exemplos de biocerâmicas bioativas. Portanto, a composição química e a resposta biológica do biomaterial ou biocerâmicas devem proporcionar a construção de um arcabouço com conexões internas que promovam um meio favorável para o fluxo de células e nutrientes, assim como propiciem adesão e proliferação de células. A porosidade e o tamanho de partícula também irão afetar a taxa de degradação do biomaterial e as propriedades biomecânicas do implante.^{18,19}

1. 2.1 MATERIAIS CERÂMICOS

A engenharia de materiais classifica os materiais sólidos em convencionais e avançados. Os materiais sólidos convencionais são classificados em: metal, cerâmica e polímero. Tal classificação se baseia em sua composição química e em sua estrutura atômica. Os materiais sólidos avançados são classificados em: materiais com aplicações de alta tecnologia, biomateriais, materiais inteligentes e os de nanoengenharia.¹⁷

As propriedades de alguns materiais estão diretamente relacionadas às suas estruturas cristalinas, sua estrutura atômica e sua composição química. Todos os metais, alguns materiais cerâmicos e alguns polímeros formam estruturas cristalinas sob condições normais de solidificação. Os materiais que não se cristalizam com estrutura atômica organizada são denominados de materiais não cristalinos ou amorfos.¹⁷

O termo cerâmica vem da palavra grega “keramikos”, que significa "material queimado". As cerâmicas são materiais inorgânicos, não metálicos, de composição altamente variada, adquiridos após tratamento térmico em alta temperatura. Elas são compostas por pelo menos dois elementos, que geralmente possuem estrutura complexa, como materiais inorgânicos, mono e policristalinos, vidros e vitrocerâmicas.¹⁸

No grupo das cerâmicas, existem as que são à base de silicatos, que são compostos principalmente por sílica e oxigênio, normalmente caracterizadas por arranjos de tetraedros de $(\text{SiO}_4)^{4-}$. A sílica também pode existir como um sólido ou vidro, tendo um alto grau de aleatoriedade atômica, que é característico do líquido. Tal material é chamado sílica fundida ou sílica vítrea.^{17, 18}

A sílica é o material cerâmico mais utilizado e que constitui a base de muitos vidros e vitrocerâmicas. As vitrocerâmicas são materiais inorgânicos policristalinos, com uma fase vítrea que é produzida a partir de duas fases. A primeira envolve a fusão dos átomos do material, e a segunda, a cristalização do material através da nucleação e do crescimento do cristal. A natureza da fase do cristal, desenvolvida na síntese, terá influência sobre a capacidade de reabsorção do biomaterial.¹⁷

O processo de biorreabsorção ocorre quando a vitrocerâmica é introduzida em fluido biológico (SBF), e a superfície do biovidro sofre dissolução parcial de cálcio e fosfato e deposição de apatita em sua superfície do implante, o que promove a ligação química com o tecido ósseo (Figura 1).¹⁸

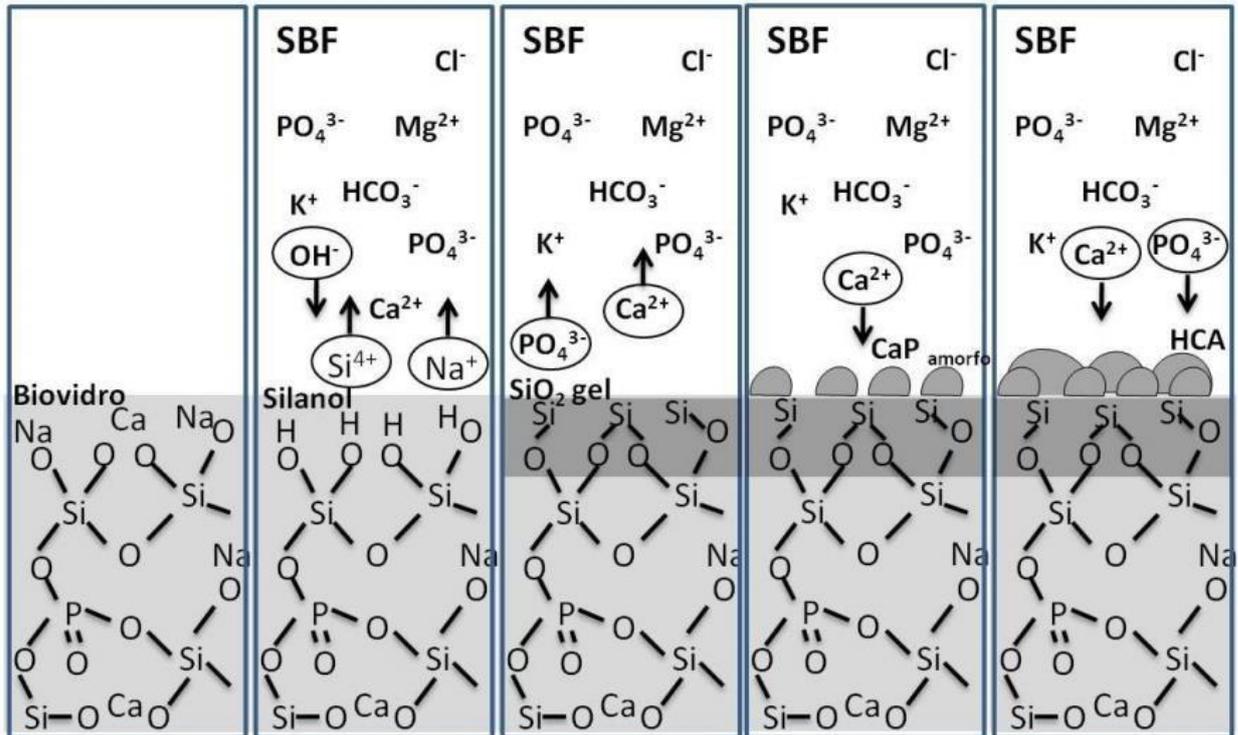


Figura 1 – Representação das etapas de deposição de HAP dos biovidros em fluido biológico (SBF).

Fonte: Daguano (2011).

A utilização de biovidros teve origem no final da década de 60 por Larry Hench a partir do desenvolvimento de materiais à base de vidros silicatos, em um trabalho pioneiro que resultou na produção do Bioglass® 45S5. A principal característica dos vidros do sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ é sua capacidade de promover uma rápida e durável ligação química, através da interface apatítica com o tecido ósseo, o que lhe valeu a designação de vidro bioativo. Com isso, nasceu o conceito de bioatividade e acelerou-se toda a investigação realizada no campo dos materiais para regeneração óssea.^{19, 20}

1.2.2 WOLLASTONITA (W)

A W é um silicato de cálcio que apresenta duas isoformas. A parawollastonita ($\beta\text{-CaSiO}_3$), também chamada de W, é a isoforma de baixa temperatura e a pseudowollastonita é a isomorfa de alta temperatura ($\sim 1125^\circ\text{C}$).^{21, 22} A W pode ter origem natural ou sintética, sendo que a sintética apresenta pureza química e estrutura mais cristalina, o que caracteriza a principal diferença entre estes dois tipos.^{23, 24} A W de origem natural apresenta composição teórica de 48% CaO (óxido de cálcio) e 52% SiO_2 (dióxido de silício), podendo estar associada a outros minerais, como o alumínio (Al), ferro (Fe), magnésio (Mg), titânio (Ti), manganês (Mn) e

potássio (K), além de ser o único mineral natural com a capacidade de se organizar em forma acicular ou de agulha.^{23, 24, 26}

A W apresenta boa resistência mecânica e térmica, e sua utilização em compósitos cerâmicos propicia melhorias em suas propriedades biomecânicas, como: Baixa contração e ponto de fusão, alcalinidade e atoxicidade. Tais características são importantes para biomateriais utilizados como para enxerto ósseo.^{25, 27}

A W de origem natural é formada pelo processo chamado de metamorfismo, resultante da variação de calor e pressão do calcário e da sílica. A W sintética possui características físico-químicas estáveis, o que possibilita produzir os três tipos presentes na natureza, porém a pseudo-wollastonita (p-W) é a única das W que se forma em altas temperaturas.^{23, 24} A p-W é uma sílica estável a temperaturas de síntese acima de 1030°C, polimórfica e possui estrutura cristalina capaz de ser bioativa.^{28, 29} A W e a p-W, quando em contato com os fluídos corpóreos, formam uma camada de apatita por meio da troca iônica entre H_3O^+ (íon hidrônio) dos fluídos corpóreos e os íons de cálcio da p-W na sua superfície. Como resultado, ocorre a formação de uma camada de hidrogel de sílica amorfa e aumento do pH de 9,0 para 10,5.²⁹ A alcalinização do meio e a formação da camada de hidrogel de sílica explicam sua superior bioatividade, quando comparada a de outros biomateriais.^{29, 30, 31}

A elevada bioatividade da p-W deve-se a sua maior reatividade com os fluídos biológicos. A área superficial do biomaterial é onde ocorre o primeiro contato com o meio onde foi implantado, o que influenciará na interação entre o biomaterial e os fluídos biológicos, a adsorção de proteínas e adesão celular. A morfologia superficial do biomaterial tem papel importante na interação entre tecido por modular a atividade celular circunjacente com a superfície do implante.³²

A biodegradabilidade e a bioatividade encontradas na p-W resultam, então, da ligação física e química à estrutura óssea. De Aza e colaboradores (2000)²¹ demonstraram que a p-W, quando implantada em tíbias de rato, liga-se ao osso mediada por proteína e pelo mecanismo estes que os autores definiram como dissolução–precipitação–transformação. A dissolução–precipitação é o processo responsável pela formação da camada de HAP, por meio da dissolução parcial da sílica amorfa e logo após a precipitação de HAP na superfície do biomaterial, até que não haja mais trocas iônicas. O processo de transformação seria a fase de remodelação óssea.³³

A presença do silício na composição da W traz aspectos biológicos importantes, uma vez que ele desempenha papel primário na formação da matriz óssea com ligações entre o colágeno e os proteoglicanos.³⁰ Além disso, estudos têm sugerido que as adições de silício em

biomateriais influenciam no metabolismo celular, já que esse íon participa do processo de mineralização, promove a expressão de genes relacionados com a atividade óssea, estimula a proliferação celular dos osteoblastos e promove a neoformação óssea.^{31, 34, 35}

1.2.3 FOSFATO TRICÁLCICO (TCP)

Biomateriais à base de fosfato de cálcio são estudados e descritos como opção de enxerto para tecido ósseo desde 1894, quando Dreesman relatou o uso de gesso como possível substituto ósseo. Na década de 1960, diversos comportamentos biológicos relacionados à utilização de biomateriais foram elucidados pelos trabalhos desenvolvidos por Hench. Isso porque os achados constataram que a fase mineral de alguns biomateriais era similar à dos dentes e ossos humanos. Essa semelhança é explicada pela natureza química desses biomateriais que, por serem formados basicamente por íons cálcio e fosfato, participam ativamente do equilíbrio iônico entre os fosfatos de cálcio e os fluídos biológicos.⁴⁴

O β -TCP ocorre no cálculo dentário, salivar e urinário, em lesões cariosas e calcificações em tecido mole. Apresenta fórmula química $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e pode ser sintetizado a partir do fosfato de cálcio amorfo ou hidroxiapatita deficiente de cálcio, em quatro formas cristalinas, a depender da temperatura de transição. As fases α e β são quimicamente idênticas, embora, em meio biológico, comportam-se de forma diferente. A fase β é mais usada em compostos monofásicos ou bifásicos, pois possui um maior índice de solubilidade do que a fase α e por possuir maior energia específica superficial. Os TCP podem ser obtidos por diferentes vias de síntese, o que possibilita a aquisição com características particulares e respostas biológicas diferentes. As vias mais utilizadas para sua síntese são a via úmida e a reação de estado sólido.³² Na reação de estado sólido, o material é aquecido em temperatura superior a 1000 °C.⁴⁰

Entre 1120 e 1180 °C, há conversão de β -TCP para α -TCP. O β -TCP permite a substituição do íon cálcio por íon magnésio em sua estrutura, o que promove o aumento da temperatura de transição da fase β para a fase α , tornando-o mais estável a temperaturas acima de 1400 °C, enquanto que, em sua composição sem substituições iônicas, há transição da fase α -TCP para α' -TCP. O aparecimento da fase γ -TCP só é possível sob condições de elevada pressão, e a fase α' -TCP não é conhecida devido à dificuldade de preparação.^{36, 38, 39}

As cerâmicas de TCP apresentam instabilidade pela solubilidade quando em presença de umidade. A solubilidade dos fosfatos de cálcio em água é uma das principais vantagens quando utilizados *in vivo*. De uma forma geral, a dissolução está relacionada com a razão molar Ca/P.³² Quanto maior concentração molar de cálcio, menos solúvel serão os fosfatos de cálcio.

O pH é outro fator que influencia na degradação da cerâmica *in vivo*, conforme o pH diminui, mais solúvel se torna o fosfato de cálcio, pela troca iônica com o meio fisiológico.³⁶ Estes fatores determinam a biodegradabilidade dos fosfatos de cálcio.

A solubilização dos cristais de fosfato de cálcio promove a sua troca iônica com o meio biológico, o que leva à redução do pH, que influencia na migração celular, adsorção de proteínas e deposição de cálcio e fosfato na forma de HAP (Figura 2).³⁵ Os TCP são reabsorvidos entre 6 e 15 semanas após implantados, diferente da HAP, que pode levar 4 ou 5 anos para ser reabsorvido.^{36, 37, 41}

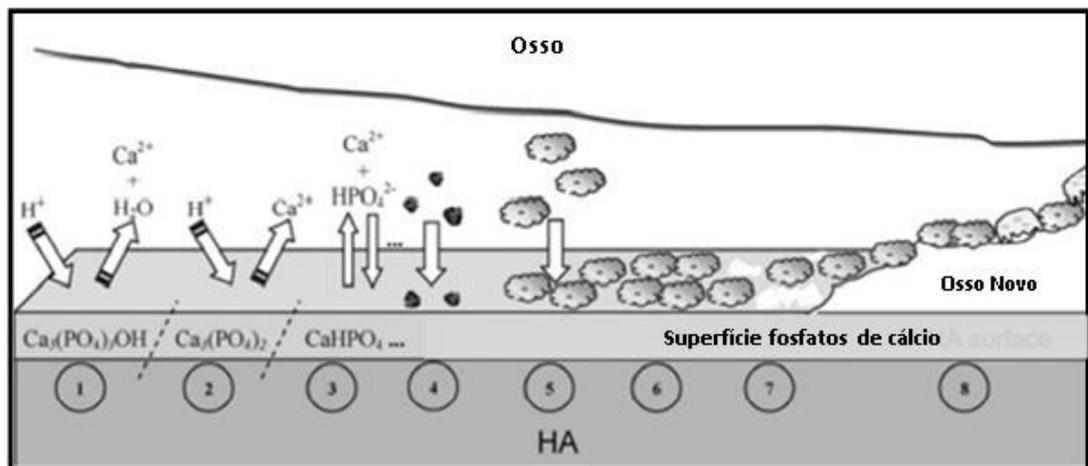


Figura 2 – Representação esquemática do processo de dissolução dos fosfatos de cálcio após implantação; 1 e 2: início e continuação do processo de reabsorção; 3: Equilíbrio iônico entre implante e tecido; 4: adsorção de proteínas; 5 e 6: adesão e proliferação celular; 7: deposição de HAP; 8: osso neoformado

Fonte: Adaptado de Bertazzo (2010).

1.2.4 COMPÓSITO DE W-TCP

A síntese do composto W-TCP pode ocorrer por meio de altas temperaturas eutéticas. Nesse processo, ocorre a fusão dos seus componentes e a produção de um sistema eutético de W-TCP. Esse sistema, então, será constituído por átomos que estão distribuídos de maneira desordenada, formando uma estrutura amorfa.^{33, 35} Contudo este processo resulta na formação de espaços diminutos intrapartículas, menores do que 100 μm , resultando em uma matriz cuja porosidade não contribui para a migração celular e osteogênese no interior do arcabouço tridimensional.⁴⁵ Outra desvantagem dessa via de síntese é que ela necessita de várias etapas e altas temperaturas por um longo tempo.^{45, 46}

Outro processo de síntese de compostos é a técnica sol-gel. Tal método de via úmida utiliza alcóxidos metálicos ou sais inorgânicos como fonte de cátions e ânions, água como

agente de hidrólise e alcoóis como solventes. A utilização do processo sol-gel para a obtenção de recobrimentos de fosfatos de cálcio é bastante recente, porém este método apresenta controle das características do recobrimento; baixas temperaturas de processo; permite a obtenção de diferentes fosfatos de cálcio; possibilidade de recobrimento de substratos metálicos e também poliméricos; simplicidade do equipamento tecnológico empregado; baixo custo.³⁶

De Aza e colaboradores (1995)²⁹ desenvolveram uma cerâmica bioativa, formada por p-W e α -TCP, denominada de Bioeutectic®. Esse compósito é sintetizado através de uma lenta solidificação, a uma temperatura eutética de 1500 °C, por um período de quatro horas. Quando esse sistema está por volta de 1250 °C, há a transição de uma fase cristalina para uma fase amorfa. Ao final desse processo, obtém-se um composto binário com 60% p-W e 40% α -TCP. Por levar a wollastonita a temperaturas bem elevadas, a p-W torna-se um biovidro e se funde a α -TCP. Sua estrutura é densa e se organiza em colônias quase esféricas, com tamanho médio de $20 \pm 5 \mu\text{m}$ e diâmetro de 10-0,9 μm .³⁴

O potencial osteocondutor e a bioatividade do Bioeutectic® vêm sendo testados em diversos modelos experimentais. Foram realizados experimentos *in vitro* com cultura de osteoblastos em fluido corpóreo simulado (FCS) e saliva da glândula parótida.^{34, 35} Esses trabalhos avaliaram as propriedades físico-químicas, bem como o potencial osteocondutor desse compósito. Nos testes *in vivo*, o Bioeutectic® foi implantado em tíbia de coelho adulto e fêmur de rato e, em ambos os modelos, os resultados mostraram uma rápida dissolução do α -TCP em pseudoapatitas e adesão de células osteoblásticas, mediada por proteínas.^{34, 35} A principal desvantagem das TCP está relacionada à sua resistência mecânica, que é igual ou menor do que a porção esponjosa do osso, e à rápida biodegradabilidade. A p-W funcionou como reforço mecânico para a α -TCP e proporcionou bioatividade ao composto, com a liberação do Si, Ca e P para o meio fisiológico.^{32, 34, 35}

A sinterização é uma via de aquisição do compósito W-TCP. Trata-se de um processo de aquecimento abaixo do ponto de fusão, em condições controladas, para produzir estruturas metálicas, cerâmicas e compósitos metais-cerâmicos. Esse aquecimento promove a união por coalescência entre as partículas, isto é, fusão das superfícies adjacentes, estruturas cristalinas e peça sólida coerente.⁴⁷

A sinterização permite determinar o estado de agregação das partículas, o que possibilita a elaboração de matrizes tridimensionais, com conexões intra e interpartículas que favoreçam a osteogênese. A porosidade de um material utilizado como suporte e matriz para migração e ancoragem celular deve simular o sistema de comunicação vascular ósseo, de modo que os poros cheguem na ordem do diâmetro harvesiano (50 a 250 μm).^{35, 48, 49}

Contudo, durante o resfriamento, o volume específico do material diminui gradualmente. Em determinada temperatura, chega-se ao equilíbrio entre a fusão de cristais e o estado o líquido. Nessa fase, se houver mudança de temperatura, pode ocorrer cristalização e redução do volume específico do material, o que pode diminuir a bioatividade, ou haverá a formação de um líquido super-resfriado, o que leva à formação da fase vítrea.^{48, 52, 53} A cristalização parcial de sistemas vítreos possibilita melhorias nas propriedades mecânicas com redução da bioatividade ou até torná-lo inerte.⁴⁸

Os biovidros com maiores teores de silício podem ser submetidos a tratamentos térmicos em temperaturas mais elevadas, sem cristalizar totalmente, do que aqueles que possuem óxidos modificadores. É bem estabelecido que a redução da relação entre área superficial e volume do material é a força motriz para a sinterização de materiais cerâmicos. A superfície de um material é considerada um defeito superficial, sendo uma região de alta energia. Dessa maneira, durante a sinterização, ocorre a aproximação de partículas, levando à formação de pescoço entre elas e à contração volumétrica do material. Ao fim do processo, há expressiva redução de sua área superficial específica, fazendo com que o sistema alcance uma condição de menor energia livre. Essa redução da área superficial também acarreta na diminuição da bioatividade do biovidro.^{50, 51, 54, 55} Portanto, as rotas de síntese mostram uma profunda influência dos métodos de preparação sobre as propriedades das biocerâmicas.

2 JUSTIFICATIVA

Especialistas afirmam que o número de fraturas e diagnósticos de doenças ósseas deve ultrapassar 5 milhões até 2050, de forma que esses quadros devem mobilizar ainda mais recursos econômicos em escala mundial. Além disso, o aumento da longevidade da população mundial faz com que o tecido ósseo sofra processos degenerativos ou traumas.¹²

Lesões ósseas de dimensões críticas são caracterizadas por comprometimento da irrigação sanguínea e de células, em decorrência da ausência de um arcabouço tridimensional que auxilie seu reparo. Nessa condição, o reparo se dá por deposição de tecido conjuntivo fibroso, que não fornece a organização estrutural ao tecido. Faz-se necessária, então, a implantação de um arcabouço que oriente a migração de células e de fatores osteogênicos, para que ocorra a deposição de novo tecido ósseo.¹¹ A bioengenharia tecidual associa diferentes áreas do conhecimento – ciências exatas (engenharias, química e física), biológicas e da saúde, a fim de desenvolver ou aperfeiçoar biomateriais que estimulem a regeneração tecidual.

Nesse contexto, associar materiais com características diferentes possibilita a construção de um arcabouço com melhores propriedades químicas, físicas e biológicas, por serem utilizados os aspectos favoráveis individuais de cada composto para tal construção. Esse arcabouço deve contribuir para implantação, migração e proliferação celular, fundamentais para a regeneração tecidual. Portanto, utilizar um compósito à base de p-W, silicato de cálcio bioativo e biodegradável, e β -TCP, fase mais estável dos fosfatos tricálcico e biorreabsorvíveis, em diferentes concentrações, permite analisar a resposta tecidual e o comportamento do compósito de p-W/ β -TCP após implantação em defeito ósseo crítico.

3 HIPÓTESES

3.1 HIPÓTESE ALTERNATIVA

O compósito ρ -W e β -TCP, em diferentes concentrações, aplicado no modelo experimental de defeito ósseo crítico, permite apresentar biocompatibilidade e osteocondução.

3.2 HIPÓTESE NULA

O compósito ρ -W e β -TCP, em diferentes concentrações, aplicado no modelo experimental de defeito ósseo crítico, não permite apresentar biocompatibilidade e osteocondução.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, após implantação *in vivo*, em defeito ósseo crítico em calvária de rato, o comportamento osteogênico do compósito de p-wollastonita e β -fosfato tricálcico em diferentes concentrações para aplicação na terapia tecidual óssea.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar, por meio de análise histomorfométrica, a resposta biológica do compósito pseudo-wollastonita e β -fosfato tricálcico, em diferentes concentrações, após implantação em defeito ósseo crítico.
- Descrever as características físico-químicas do compósito pseudo-wollastonita e β -fosfato tricálcico no formato de grânulos em diferentes concentrações para a regeneração óssea.

5 ARTIGOS

5.1 ARTIGO 1

Periódico: *Biomaterials Science*

Qualis: A1

Análise histomorfológica e histomorfométrica do compósito wollastonita e fosfato tricálcico em diferentes concentrações após implantação *in vivo*

Histomorphological and histomorphometric analysis of wollastonite composite and tricalcium phosphate at different concentrations after in vivo implantation

Luisa Queiroz Vasconcelos¹
 Aryon de Almeida Barbosa Junior²
 Raúl García Carrodeguas³
 Isabela Cerqueira Barreto⁴
 Fabiana Paim Rosa⁵
 Roberto P. C. Araújo⁶

Resumo

A wollastonita e o fosfato tricálcico são biomateriais que contribuem para a osteogênese. O desenvolvimento de um compósito a partir desses dois biomateriais confere as propriedades de bioatividade e biodegradação. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio da histomorfometria, após implantação *in vivo*, em defeito ósseo crítico em calvária de rato, o comportamento osteogênico de um novo compósito constituído de diferentes concentrações de p-wollastonita e β -fosfato tricálcico. Foram utilizados 40 ratos, distribuídos aleatoriamente para compor quatro grupos, com cinco animais em cada grupo com pontos biológicos de 15 e 45 dias: G20/80 – defeito ósseo crítico preenchido com grânulos 20% p-wollastonita e 80% β -fosfato tricálcico; G60/40 – defeito ósseo crítico preenchido com grânulos 60% p-wollastonita e 40% β -fosfato tricálcico; G80/20 – defeito ósseo crítico preenchido com grânulos 80% p-wollastonita e 20% β -fosfato tricálcico; GC – defeito ósseo crítico preenchido com coágulo. A análise histomorfológica evidenciou que, em todos os grupos, os compósitos foram biocompatíveis e bioativos. O G60/40 apresentou melhores resultados com 65% de preenchimento por matriz osteoide aos 45 dias. Os demais grupos formaram percentuais de neoformação óssea similares em ambos os pontos biológicos. Os compósitos estudados são biocompatíveis, preenchedores e osteocondutores.

Palavras-chave: Materiais biocompatíveis. Silicato de cálcio. Fosfato de cálcio, Regeneração óssea.

¹ Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: luisa-queiroz@gmail.com

² Instituto de Patologia Geral e Cutânea S/C LTDA, Salvador, Bahia, Brasil.

³ Noricum S. L., San Sebastián de los Reyes, Madrid, España.

⁴ Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.

⁵ Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.

⁶ Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.

INTRODUÇÃO

A utilização de biomateriais na odontologia e na medicina tem sido uma aliada para a devolução da saúde, da função e da estética de áreas com grandes perdas ósseas. Os substitutos ósseos, definidos como biomateriais, de origem natural ou sintética, são destinados a interagir com sistemas biológicos, de forma transitória ou permanente, com o objetivo de ativar, aumentar ou substituir tecidos biológicos ou órgãos.^{1, 2} Para isso, faz-se necessário o entendimento de respostas biológicas, a partir das propriedades físicas, mecânicas e químicas desses biomateriais. A bioengenharia tecidual utiliza conhecimentos das ciências biológicas e das engenharias para desenvolver novas tecnologias, técnicas e substitutos teciduais.¹

Lesões ósseas de dimensões críticas são caracterizadas por comprometimento da irrigação sanguínea e de células, em decorrência da ausência de um arcabouço que auxilie no reparo. Nessa condição, o reparo se dá por deposição de tecido conjuntivo fibroso, o que não fornece organização estrutural ao tecido, tornando necessária a implantação de um arcabouço que oriente a migração de células e de fatores osteogênicos para que ocorra a deposição de novo tecido ósseo.³ Diante dessa necessidade, os biomateriais podem ser uma opção terapêutica, uma vez que são produzidos com composição ou arquitetura similares às do tecido ósseo. Além disso, possuem boa disponibilidade, fácil esterilização e menor chance de causar morbidades. Para que seja viável a utilização desses materiais como substitutos ósseos, é necessário haver biocompatibilidade, osteocondução e biodegradação.^{1, 3}

O fosfato tricálcico (TCP) e a wollastonita (W) vêm se destacando entre os biomateriais. O TCP é uma cerâmica não imunogênica, com biodegradabilidade e biocompatibilidade similares às da estrutura óssea. A W é um silicato de cálcio bioativo que promove melhorias nas propriedades biomecânicas dos fosfatos de cálcio devido à alta degradabilidade e à bioatividade inerentes a suas propriedades. O silício presente na W está relacionado com uma maior osteogênese devido à participação em processos fisiológicos importantes, como ciclo celular dos osteoblastos.^{3, 4, 5}

A estratégia de associar a W com o TCP, em diferentes concentrações, possibilita o desenvolvimento de um substituto ósseo com biodegradabilidade e osteogênese similares às do processo fisiológico de reparação óssea. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar, após implantação *in vivo*, o comportamento osteogênico de um novo compósito constituído de ρ -wollastonita (ρ -W) e β -fosfato tricálcico (β -TCP) em diferentes concentrações para aplicação na terapia tecidual óssea.

MATERIAIS E MÉTODO

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisas no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal da Bahia (UFBA), com número de protocolo 128/2017 e aprovação seguindo as Normas Éticas de Pesquisas em Animais (Lei nº. 11.794 de 2008), bem como as Normas Nacionais de Biossegurança e as diretrizes do Instituto Nacional de Saúde para o cuidado e uso de animais de laboratório (NIH Publicação n ° 85-23, ver. 1985).

Biomateriais

Síntese e caracterização físico-química

Os biomateriais de W-TCP (80-20, 60-40 e 20-80) foram preparados, caracterizados e fornecidos pelo Instituto de Cerâmica e Vidro (ICV-CSIC, Madrid, Espanha). As composições dos biomateriais foram escolhidas para obter diferentes graus de reabsorção, tendo em mente que a W é mais solúvel e bioativa do que TCP em fluídos fisiológico.⁵

Durante a preparação do compósito ρ -W/ β -TCP, foram utilizadas wollastonita natural, CaSiO_3 (NYCO, NYAD M1250, Batch Number M1404227J01), cuja composição molar foi de 52,94% de SiO_2 e 44,94 de CaO, e fosfato tricálcico, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Sigma-Aldrich, Ref. 21218, Lote Número BCBM7330V) em diferentes quantidades a depender da concentração desejada de W e TCP. Os compósitos foram secos a 60 °C por 24 h. Após secagem, os materiais foram sinterizados a uma temperatura fixa de 1250 °C, mas em tempos diferentes, de acordo com a concentração desejada (Tabela 1). Após sinterização, utilizou-se microscopia eletrônica de varredura (MEV) para caracterização dos grânulos. Observa-se que os grânulos com 20 % de ρ -W/ 80% de β -TCP consistiram principalmente de β cristalino, α -TCP e W-2M, nessa ordem de abundância, e pequenas quantidades de PS-W cristalino, e fase vítrea amorfa. Por outro lado, com 60 % de ρ -W/ 40% de β -TCP e 80 % de ρ -W/ 20% de β -TCP, os grânulos foram compostos de PS-W cristalino e β -TCP, e fase vítrea amorfa. Os compósitos apresentaram porosidade intragranular de 42% e intergranular de 19%.

Material	Quantidade MP		Composição química esperada (%m/m)				Condições de sinterização	
	W (g)	TCP (g)	CaO	SiO ₂	P ₂ O ₅	Outros	T(°C)	t(min)
80-20	80,0	20,0	51,34	10,61	35,72	2,33	1250	5
60-40	60,0	40,0	48,25	31,87	17,89	1,99	1250	60
20-80	20,0	80,0	46,70	42,52	8,85	1,93	1250	180

Tabela 1 – Composição química dos compósitos em diferentes concentrações e temperaturas utilizadas para obtê-las

Procedimentos experimentais

Técnica cirúrgica

Quarenta ratos Wistar albinos, machos, adultos, com peso corporal entre 350 e 400g, foram distribuídos, aleatoriamente, em oito grupos experimentais, com cinco animais em cada: G20/80 – defeito ósseo crítico preenchido com grânulos 20% p-wollastonita e 80% β -fosfato tricálcico; G60/40 – defeito ósseo crítico preenchido com grânulos 60% p-wollastonita e 40% β -fosfato tricálcico; G80/20 – defeito ósseo crítico preenchido com grânulos 80% p-wollastonita e 20% β -fosfato tricálcico; GC – defeito ósseo crítico preenchido com coágulo. Os grupos foram avaliados nos pontos biológicos de 15 e 45 dias. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em caixas plásticas individuais, identificadas conforme grupo experimental e o ponto biológico; e receberam ração e água *ad libitum*.

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de xilazina (0,06 ml/kg) e cloridrato de cetamina (0,12 ml/kg). Após a anestesia, foi realizada a tricotomia e a antisepsia da região da calvária com álcool iodado. Posteriormente, foi confeccionado um defeito ósseo crítico de aproximadamente 8,0 mm de diâmetro na porção mediana da calvária com uma fresa trefina. Esse defeito foi preenchido de acordo com os grupos experimentais pré-estabelecidos e citados na etapa anterior. Ao atingir o ponto biológico de 15 e 45 dias, os animais foram eutanasiados por aprofundamento da anestesia, de acordo com a Resolução Normativa nº 37/2018 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Processamento dos espécimes

Os espécimes foram fixados em formaldeído tamponado a 4% por 72 horas, seccionados ao meio, obtendo-se a porção anterior e a posterior. A porção posterior foi descalcificada com EDTA a 5%, por 7 dias, e depois foi incluída em parafina. A porção anterior permaneceu em formol para ser emblocada em resina. Cada espécime foi cortado em 5 µm de espessura e corado com Hematoxilina-Eosina (HE) e Picrossírius-Red (PIFG), para a análise histológica por microscopia óptica. As imagens histológicas foram obtidas com câmera digital (*DFC310FX – Leica®*) acoplada ao microscópio óptico (*DM6 B – Leica®*).

Análise estatística

Na análise histomorfométrica, utilizou-se o *software Leica Application Suite (LAS) v. 4.12 (Leica®)* para quantificar o preenchimento linear (mm) e a área (mm²) do defeito ósseo crítico por neoformação óssea. Para comparar as diferenças entre os grupos experimentais, fixando o ponto biológico e testando diferentes grupos, utilizou-se os testes não paramétricos *Kruskal-Wallis test* (entre três grupos) e o *Mann-Whitney test* (entre dois grupos). Para comparar as diferenças entre os grupos experimentais fixando o grupo e testando diferentes pontos biológicos, utilizou-se o teste não paramétrico *Wilcoxon Signed Ranks test*. As análises foram realizadas com uso do *software IBM SPSS Statistics v. 20 for Windows 2010*, com nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Análise histológica

G 20/80

Aos 15 e 45 dias, foi possível observar a matriz osteoide reacional nas bordas do defeito com espessura proporcional ao osso antigo e com presença de osteócitos (Figura 1). Em ambos os pontos biológicos não houve deposição de matriz osteoide no centro do defeito, porém deposição de tecido conjuntivo recém-formado circunjacente ao biomaterial, vasos sanguíneos e presença de células gigantes multinucleadas (Figura 2). Os grânulos encontraram-se aspecto mais evidentes de biodegradáveis aos 45 dias do que aos 15 dias de pós-operatório (Figuras 1 e 3), com presença de inflamação aguda e crônica granulomatosa ao redor deles (Figuras 3 e 4). Em ambos os pontos biológicos, foi observada a presença de

septos no interior do biomaterial (Figura 1). Aos 15 e 45 dias, o defeito foi preenchido por toda a extensão em múltiplas camadas de grânulos (Figura 5). Aos 45 dias, observou-se, no interstício dos grânulos, a presença de células mesenquimais. A deposição de fibras colágenas ocorreu em camadas concêntricas mais densas e organizadas na periferia dos grânulos; no centro dos grânulos, fibras colágenas com organização frouxa (Figura 6). Foi possível visualizar, aos 45 dias, células inflamatórias com destaque para as células gigantes ao redor e dentro dos grânulos (Figura 7).

Grupo 60/40

Observou-se, no ponto biológico de 15 dias, deposição de matriz osteoide de aspecto reacional, a partir das bordas do defeito ósseo e em direção centrípeta (Figura 1). Aos 45 dias, a deposição de osteoide foi notada além das bordas ósseas na região central do defeito, circunjacente e no interior das partículas do biomaterial, preenchendo todo o defeito (Figuras 2 e 4). É possível distinguir regiões, aos 45 dias, de matriz osteoide com característica mais organizada e densa da matriz imatura. Além disso, observou-se a formação de medula óssea por toda a extensão linear do defeito (Figura 4). Tanto aos 15 quanto aos 45 dias, os grânulos ocuparam toda a extensão do defeito, dispostos em múltiplas camadas (Figura 5), com diferentes tamanhos e com aspecto discretamente basofílico (Figuras 2 e 4), reticulado no centro e, por vezes, circundados por osteoblastos. Aos 45 dias, notou-se que os grânulos apresentaram menor diâmetro e foram substituídos ora por tecido conjuntivo, ora por matriz osteoide em relação aos 15 dias.

Grupo 80/20

Aos 15 e 45 dias, observou-se discreta formação de matriz osteoide reacional nas bordas do defeito (Figura 1). Porém foi possível observar o preenchimento de todo o defeito por múltiplas camadas de grânulos e em diferentes tamanhos (Figura 5). Adjacente aos grânulos, houve reação inflamatória crônica do tipo granulomatosa, acentuada com a presença de macrófagos e células gigantes (Figuras 1 e 4). Aos 45 dias, observaram-se finos septos de fibras colágenas permeando e penetrando nos grânulos em direção centrípeta, com fibras colágenas mais densas, organizadas em camadas paralelas e com tecido conjuntivo frouxo em meio as fibras colágenas (Figura 4). Aos 45 dias, houve formação de vasos

sanguíneos interligando os grânulos sendo possível observar pequenas áreas de matriz osteoide nas regiões mais periféricas do defeito, com presença de osteócitos (Figura 4).

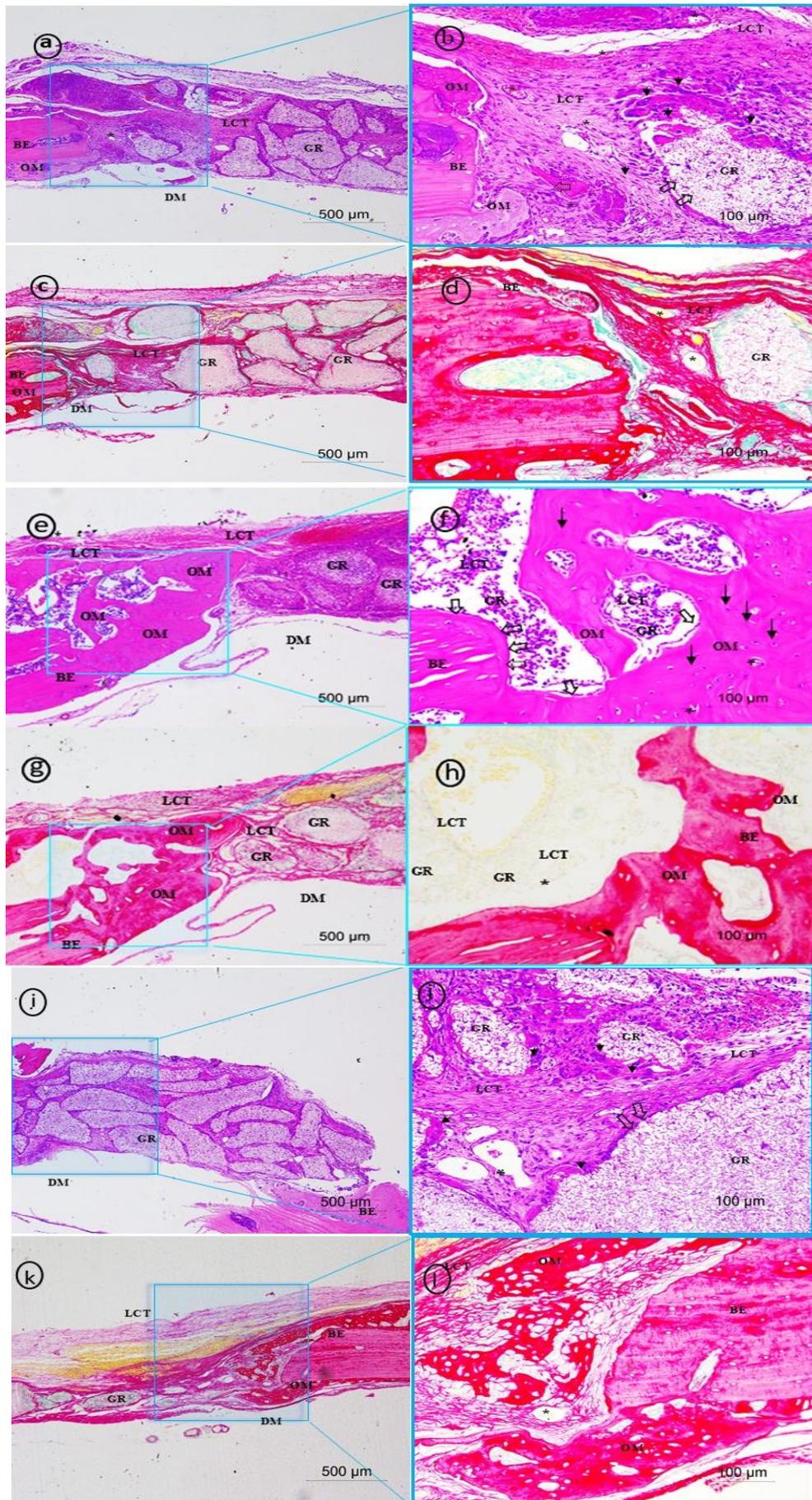


Figura 1 – Fotomicrografias obtidas da borda do defeito após 15 dias de implantação dos biomateriais nos G 20/80 (a-d), G 60/40 (e-h), G 80/20 (f-m). Matriz osteoide (OM), grânulo (GR), veia central (VC), região de dura-máter (DM), tecido conjuntivo frouxo (LCT), vaso sanguíneo (*), célula gigante multinucleada (cabeça de seta), osteócitos (seta preta). HE (a, c, e, g, i, l) e PIFG (b, d, f, h, j, m).

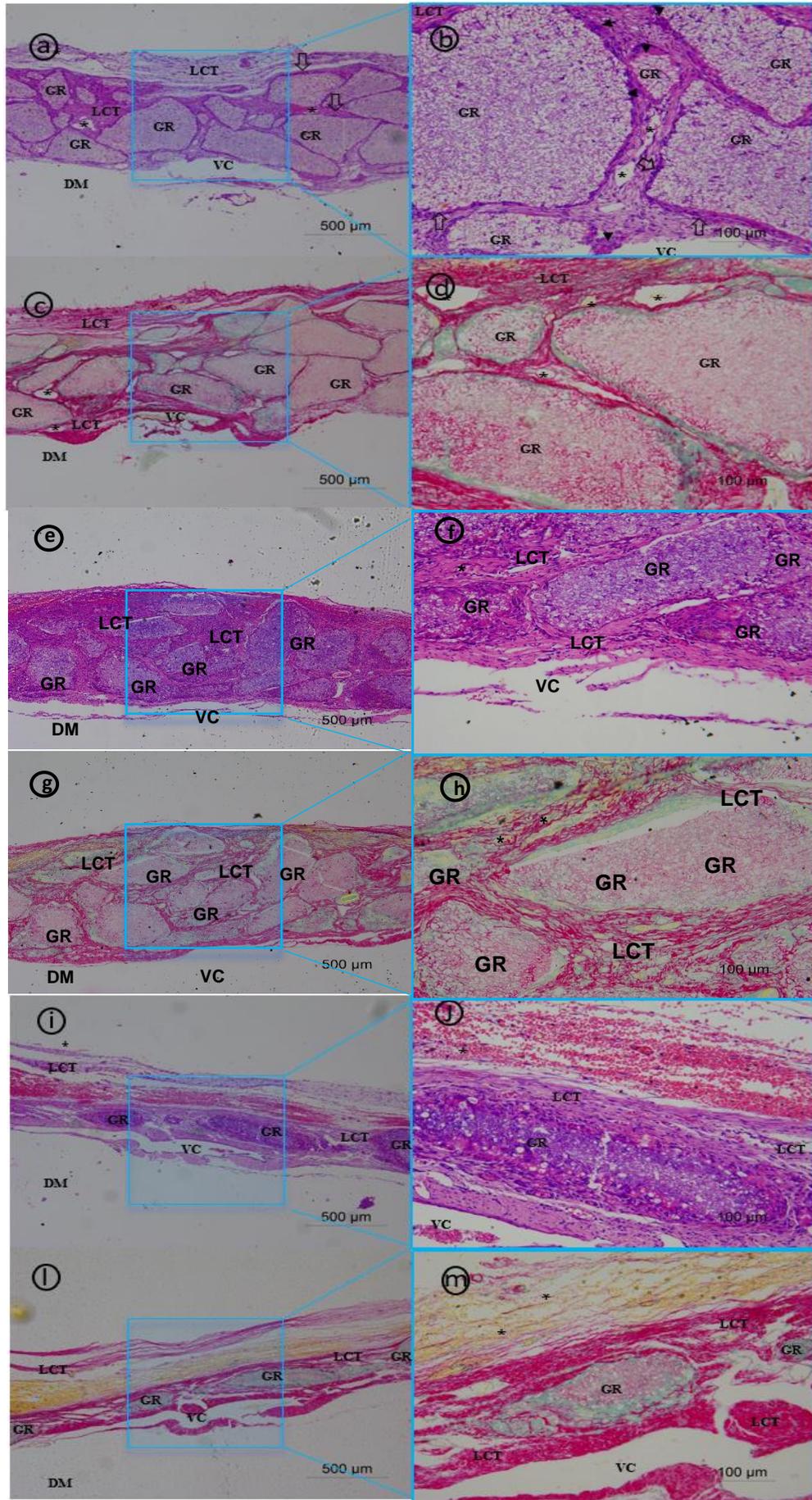


Figura 2 – Fotomicrografias obtidas do centro do defeito ósseo após 15 dias de implantação dos biomateriais nos G 20/80 (a-d), G 60/40 (e-h), G 80/20 (f-m). Veia central (VC), grânulo (GR), região de dura-máter (DM), tecido conjuntivo frouxo (LCT), veia central (VC), vaso sanguíneo (*), células gigantes multinucleadas (cabeça de seta), vaso sanguíneo (*), célula gigante multinucleada (cabeça de seta). HE (a, c, e, g, i, l) e PIFG (b, d, f, h, j, m).

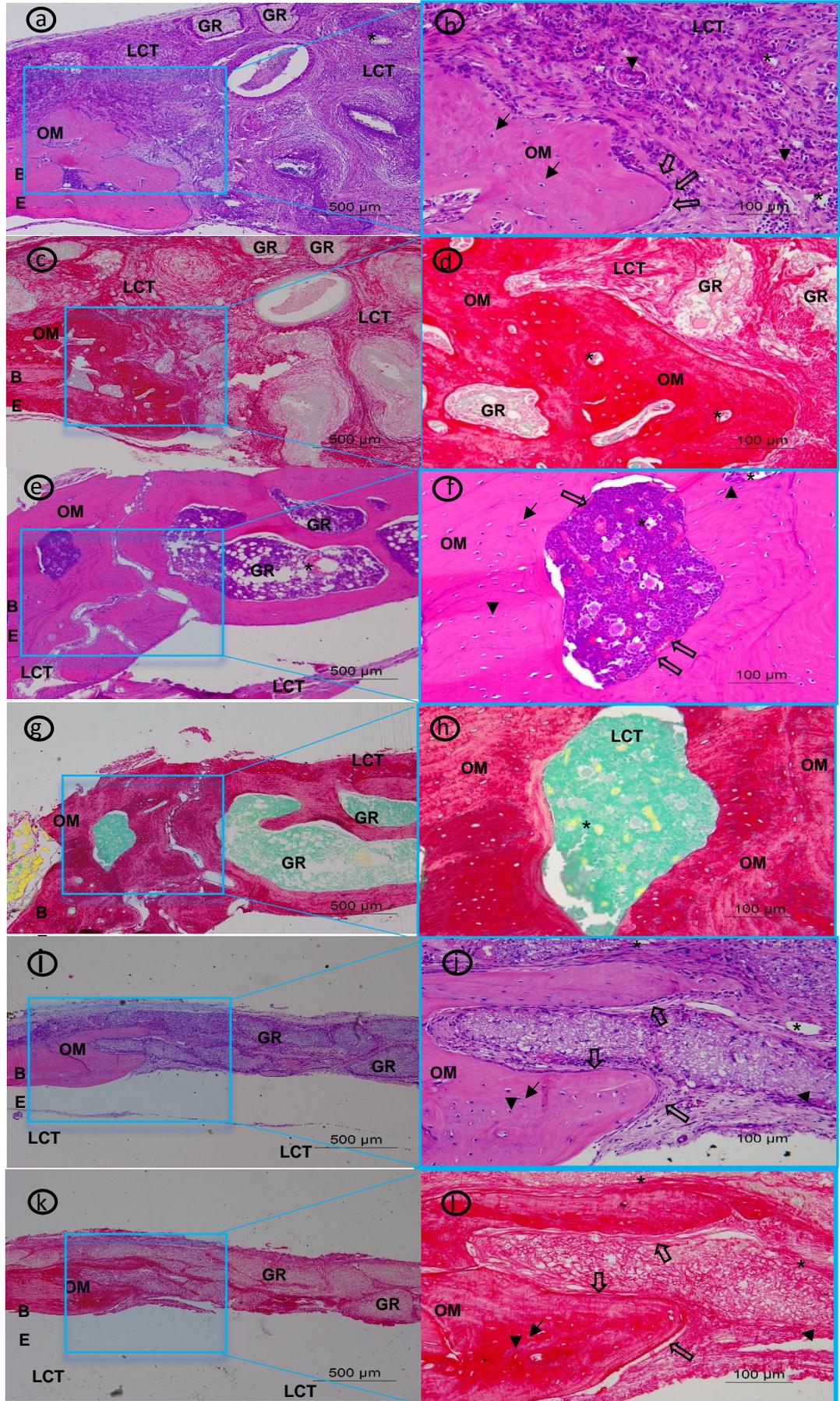


Figura 3 – Fotomicrografias obtidas da borda do defeito ósseo após 45 dias de implantação dos biomateriais nas bordas do defeito ósseo nos G 20/80 (a-d), G 60/40 (e-h) e G 80/20 (f-m). Borda óssea (BE), grânulo (GR), matriz osteoide (OM), tecido conjuntivo frouxo (LCT), vaso sanguíneo (*), célula gigante multinucleada (cabeça de seta), osteócitos (seta preta). HE (a, c, e, g, i, l) e PIFG (b, d, f, h, j, m).

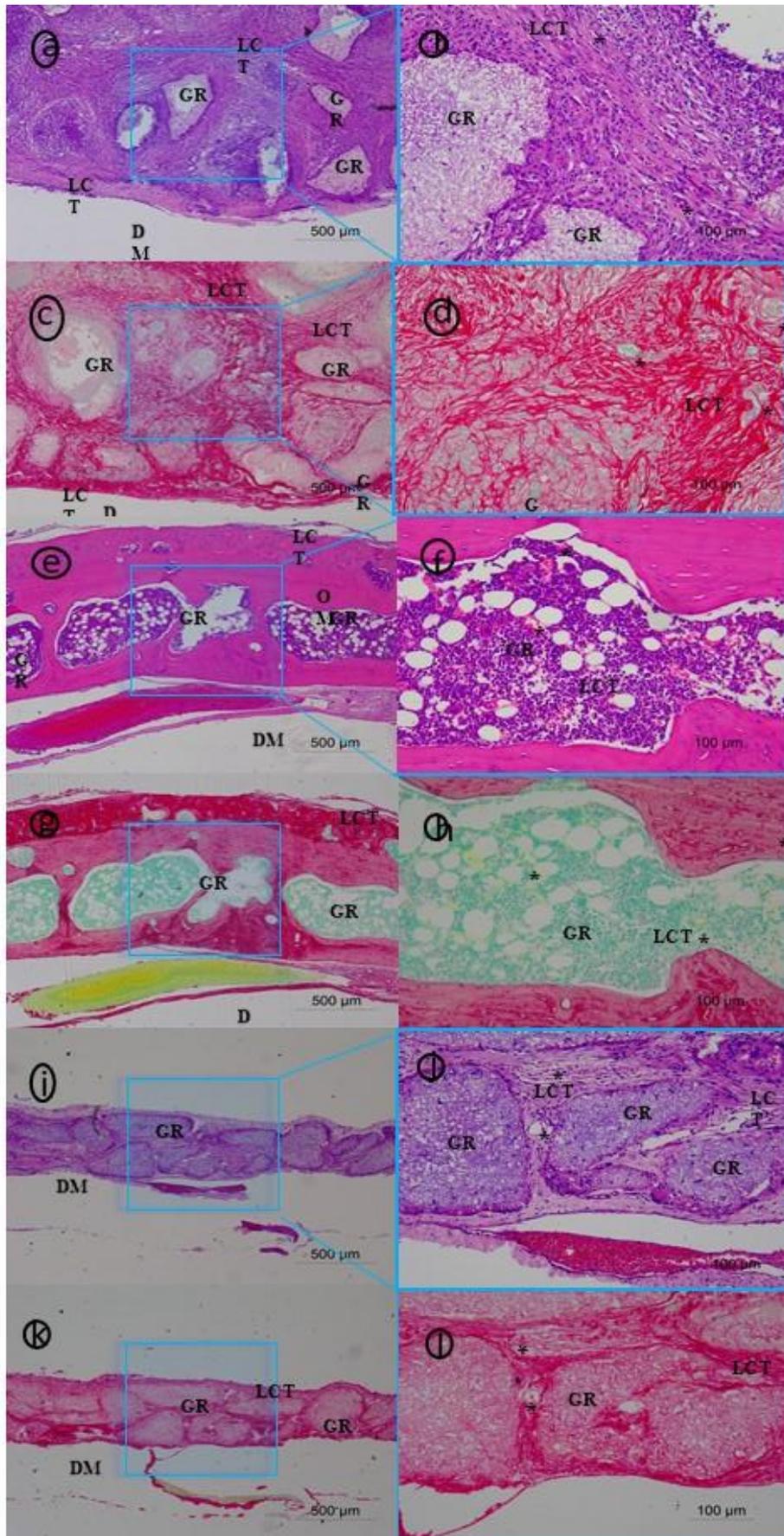


Figura 4 –Fotomicrografias obtidas do centro do defeito ósseo após 45 dias de implantação dos biomateriais no centro do defeito ósseo nos G 20/80 (a-d), G 60/40 (e-h), G 80/20 (f-m). Matriz osteoide (OM), grânulo (GR), veia central (VC), região de dura-máter (DM), tecido conjuntivo frouxo (LCT), vaso sanguíneo (*), célula gigante multinucleada (cabeça de seta), osteócitos (seta preta). HE (a, c, e, g, i, l) e PIFG (b, d, f, h, j, m).

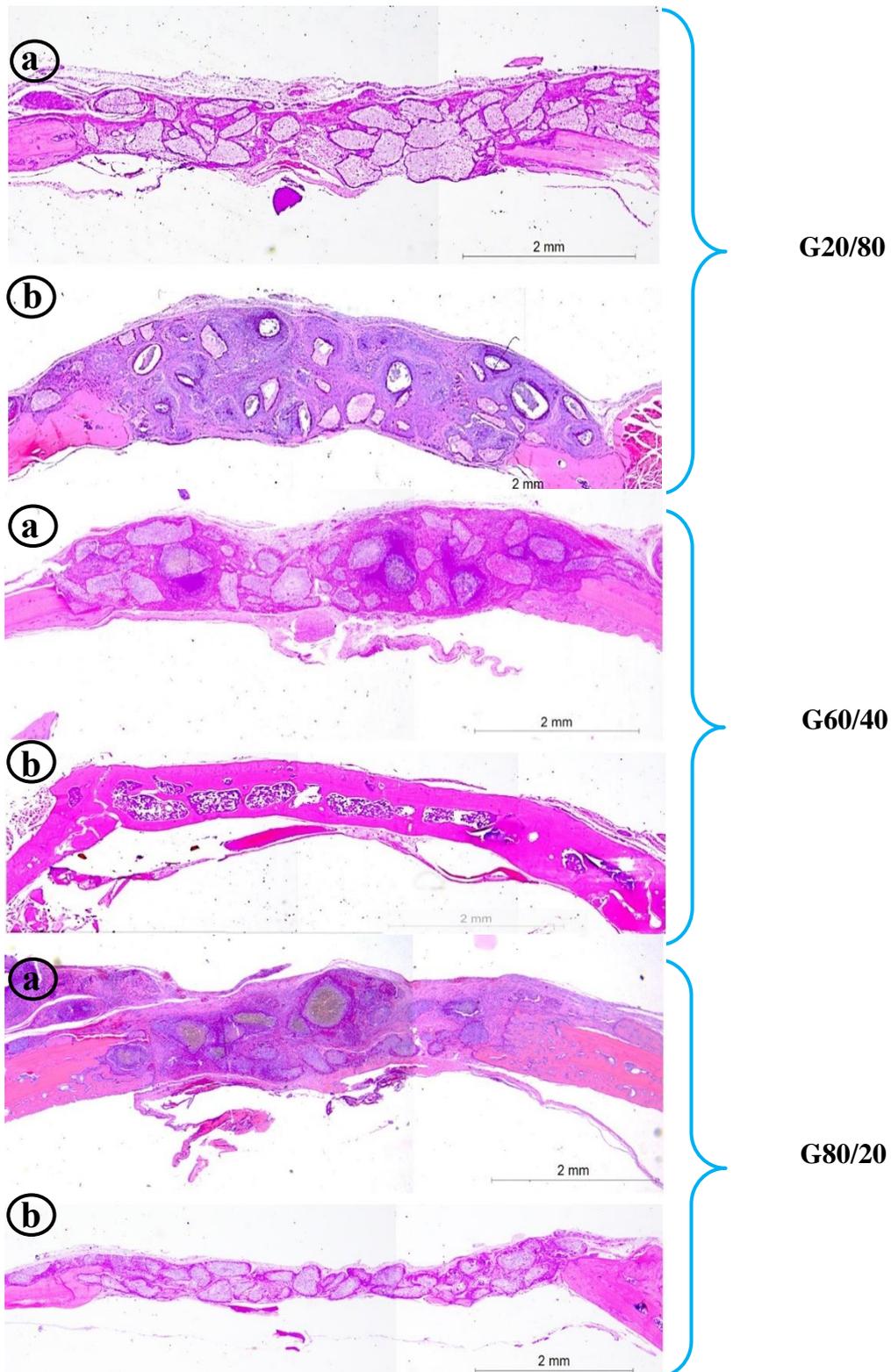


Figura 5 – Fotomicrografias dos defeitos preenchidos por grânulos nos grupos G 20/80, G60/40 e G80/20, ao longo do experimento. As figuras “a” representam o ponto biológico de 15 dias e a letra “b” representa o ponto biológico de 45 dias. HE.

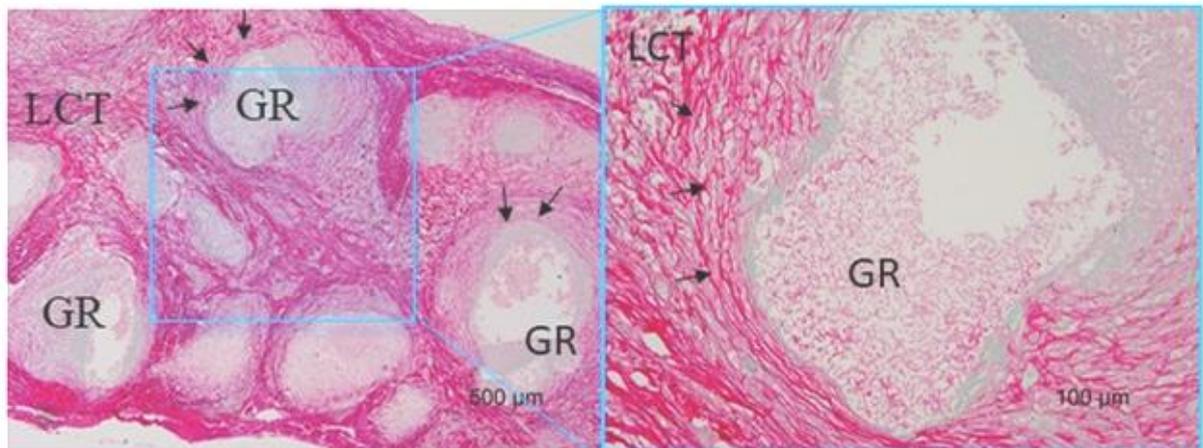


Figura 6 – Fotomicrografias do padrão de deposição de fibras colágenas de forma concêntrica ao redor do grânulo no centro do defeito ósseo no grupo G20/80, ponto biológico 45 dias. Grânulo (GR), tecido conjuntivo frouxo (LCT), fibras colágenas (seta preta). PIFG.

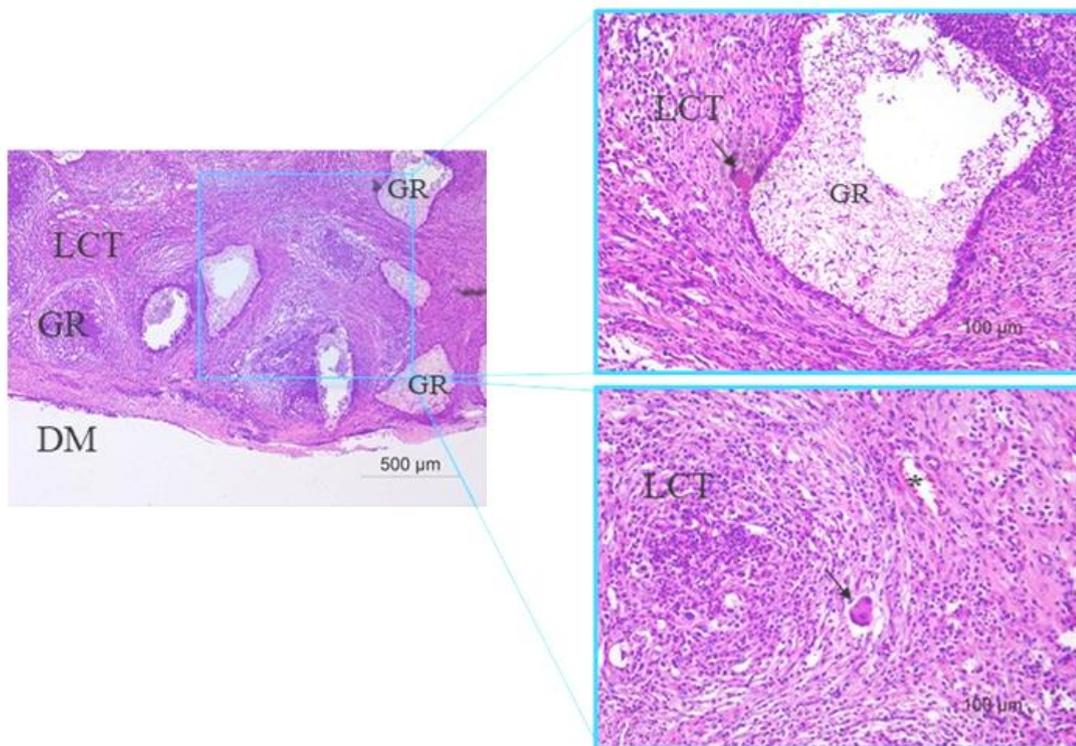


Figura 7 – Fotomicrografias que mostram disposição das células inflamatórias com destaque para as células gigantes multinucleadas ao redor e dentro dos grânulos no centro do defeito ósseo no grupo G20/80, ponto biológico 45 dias. Grânulo (GR), tecido conjuntivo frouxo (LCT), vaso sanguíneo (*), célula gigante multinucleadas (seta preta). HE.

Análise histomorfométrica e estatística

A análise da área preenchida por matriz osteoide neoformada entre grupos não apontou diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos (Mann-Whitney $p = 0.044$), como é demonstrado na Tabela 2.

Pontos biológicos					
Grupo	15 dias		45 dias		Wilcoxon Test
G20/80	0,18±0,32 (7,79%)		0,52±0,15 (16,15%)		$p=0,893$
G60/40	0,47±0,58 (16,64%)		4,48±1,62 (65,25%)		$p=0,109$
G80/20	0,35±0,32 (16,55%)		0,17±0,20 (5,80%)		$p=0,715$
Testes de comparação entre grupos					
K.W. Test	15 dias		45 dias		
	G20/80 x G60/40 x G80/20	$p=0,997$	G20/80 x G60/40 x G80/20	$p=0,331$	
Mann-Whitney Test	G20/80 x G60/40	$p=0,921$	G20/80 x G60/40	$p=0,249$	
	G20/80 x G80/20	$p=0,798$	G20/80 x G80/20	$p=1,000$	
	G60/40 x G80/20	$p=0,921$	G60/40 x G80/20	$p=0,163$	

Tabela 2 – Dados de área (mm²) de preenchimento do defeito por neoformação óssea em relação ao total. Médias, desvio padrão e percentual.

A análise da extensão linear de matriz osteoide neoformada entre grupos não apontou diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos (Mann-Whitney $p = 0.044$), como é demonstrado na Tabela 3.

Pontos biológicos					
Grupo	15 dias		45 dias		Wilcoxon Test
G20/80	0,83±1,33 (13,64%)		0,94±0,28 (13,49%)		$p=0,686$
G60/40	1,39±1,43 (20,22%)		8,41±0,13 (100,00%)		$p=0,109$
G80/20	1,36±1,19 (34,84%)		0,81±0,96 (11,93%)		$p=0,465$
K.W. Test					
	15 dias		45 dias		
	G20/80 x G60/40 x G80/20		G20/80 x G60/40 x G80/20		$p=0,263$
	$p=0,970$				
Mann-Whitney Test					
	G20/80 x G60/40		G20/80 x G60/40		$p=0,249$
	G20/80 x G80/20		G20/80 x G80/20		$p=0,371$
	G60/40 x G80/20		G60/40 x G80/20		$p=0,163$
	$p=0,921$		$p=0,798$		
	$p=0,921$				

Tabela 3 – Dados da extensão linear (mm) de preenchimento do defeito por neoformação óssea em relação ao total. Médias, desvio padrão e percentual.

DISCUSSÃO

Os enxertos autógenos constituem uma excelente opção de substituto ósseo, uma vez que são osteocondutores e osteoindutores. No entanto, para a utilização desse tipo de enxerto, é necessário um procedimento cirúrgico adicional na região doadora do tecido e, muitas vezes, a quantidade adquirida de osso é insuficiente. Portanto, uma opção para casos que necessitem de substituto ósseo é o enxerto aloplástico. O enxerto aloplástico precisa ter propriedades, composição química e degradação adequadas; ser atóxico, possuir biodegradabilidade, ser eficaz. Deve ainda fornecer suporte mecânico para a colonização celular, estimular a migração, adesão e diferenciação de células osteoprogenitoras e favorecer a angiogênese.⁵ Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento osteogênico de um novo compósito constituído de diferentes concentrações de p-W e β -TCP como uma opção terapêutica de enxerto ósseo.

Foi utilizado o modelo experimental de defeito ósseo crítico em ratos, pois, uma vez que a lesão óssea tem morfologia e dimensões críticas, associadas a deficiência na vascularização, é necessária uma terapêutica alternativa e complementar para garantir a regeneração óssea. Dentre os diferentes materiais utilizados nas últimas décadas, a associação da W com o α -TCP vem sendo desenvolvida para que haja melhor compreensão da função biológica (biocompatibilidade, osteogênese, osteoindução e osteocondução) necessária para ser utilizado como enxertia óssea.^{1, 4, 6}

Os compósitos mostraram-se circundados por reação granulomatosa nos grupos em que os grânulos nas concentrações 20/80, 60/40 e 80/20 foram implantados aos 15 dias. Ao implantar um biomaterial, espera-se uma resposta inflamatória local, devido ao rompimento de vasos sanguíneos em decorrência da lesão tecidual e pela presença do material em contato com os fluidos corpóreos.^{2,3,6} Desta forma, o biomaterial estudado foi biocompatível.

A formação de septos fibrosos e a presença de células inflamatórias na porção interna dos grânulos como células gigantes corroboram o estudo realizado por Furusawa e colaboradores (1998)⁸ em ratos tratados com Biogran® (vidro bioativo, Orthovita, Malvern, PA), pois foi observado que, em uma semana de reparo, havia células osteogênitoras nas fissuras dos grânulos do biomaterial. Na terceira semana, observaram que o centro dos grânulos foi preenchido por células osteogênicas e, após 4 semanas, houve reabsorção do centro do grânulo, fagocitose e formação de matriz osteoide.

No nosso estudo, foi observado, aos 15 e 45 dias, que o tamanho e o formato dos grânulos, em ambos os grupos do compósito p-W/ β -TCP, no defeito ósseo, permitiram a disposição deles, em sua maioria, em múltiplas camadas, com formação de interconexões e porosidade, o que contribuiu para a neoangiogênese em uma fase inicial e mais tardia da reparação. A deposição de matriz osteoide concentrou-se apenas nas bordas do defeito, nas concentrações de 20/80 e 80/20, em ambos pontos biológicos. No entanto, o grupo 60/40 apresentou deposição de matriz osteoide nas bordas e ao longo de todo o defeito ósseo, inclusive no centro. Coathup e colaboradores (2018)⁹ informam que não há consenso nos estudos com foco na regeneração óssea sobre um nível ideal de porosidade formada pelos biomateriais que propicie a migração e a fixação celular. Em outro estudo, Fetner e colaboradores (1994)¹⁰ utilizaram biovidro (PerioGlas®) com granulometrias diferentes (90-310 μ m e 500-710 μ m) para regeneração óssea por meio de defeito realizado em mandíbula de macaco, e os resultados não revelaram diferença no processo de reparo entre os materiais.

Contudo, na década de 90, Grégoire, Orly e Mentanteau¹¹ já correlacionavam o tamanho da partícula do biomaterial como um fator relevante no processo de fagocitose e, conseqüentemente, em uma melhor bioatividade e melhor adesão de células ósseas. Pois, após

a fagocitose das partículas, há um aumento na transcrição gênica e biossíntese proteica, que é caracterizada por uma maior atividade metabólica. O tamanho de poro deve estar entre 100 e 300 μm . Nessa faixa de tamanho, cria-se um microambiente que favorece a neoformação óssea, uma vez, que ocorre a proliferação de capilares para suprir as necessidades metabólicas das células e acomodação celular do tecido ósseo.

A caracterização dos grânulos através da análise morfológica demonstra que a forma de ambos os compósitos é bastante diferente. Wollastonita tem uma forma acicular e a β -TCP apresenta tamanho menor em relação a wollastonita. A heterogeneidade na forma dos grânulos propicia a formação de um arcabouço com diferentes tamanhos de poros. Os poros menores que 75-100 μm resultam no crescimento do tecido osteoide não mineralizado. Além disso, poros menores que 5 μm permitem a neovascularização e o crescimento de fibroblasto de 5 a 15 μm 2, 5, 8

O compósito utilizado neste estudo tinha o formato de grânulo, o que já fornece uma distribuição e a formação de um arcabouço com espaços entre os grânulos de diferentes tamanhos e formas. Tal característica apresentada nesse formato irá influenciar na condução de células e, conseqüentemente, na resposta tecidual para deposição de matriz osteoide. Nota-se que, nas diferentes concentrações estudadas do compósito p-W e β -TCP, aos 15 dias, não houve deposição de matriz osteoide além das bordas. Porém, aos 45 dias, é possível observar deposição de matriz osteoide além das bordas do defeito ósseo nas concentrações 20/80 e 80/20; na concentração 60/40 houve produção de matriz osteoide por toda a extensão. Os achados observados na histomorfologia mostram que esse compósito no formato de grânulo propiciou a osteocondução de células e fatores de crescimento.

Outra característica física do compósito estudado que pode ter influenciado na pequena produção de matriz osteoide aos 15 dias é o tamanho da área superficial das partículas disponíveis para reagir com células e com o fluido biológico. Quanto maior o tamanho das partículas, maior será o tempo de reabsorção do biomaterial. Tal aspecto pode ter resultado em uma reparação total do defeito por um tecido conjuntivo fibroso, aos 15 dias. Esses achados são compatíveis com o trabalho desenvolvido por Almeida (2013)¹² durante a avaliação da biocompatibilidade e biofuncionalidade de grânulos de β -TCP e β -TCP/biovidro. Durante a sinterização, ocorre a aproximação de partículas, levando à contração volumétrica do material. Ao fim do processo, há expressiva redução de sua área superficial específica, fazendo com que o sistema alcance uma condição de menor energia livre. Essa redução da área superficial também acarreta diminuição da bioatividade do vidro.

Os grânulos preencherem todo o defeito ósseo, em ambos os grupos estudados, com aparência reticular, sugestiva de processo de degradação, aos 15 dias. O aspecto dos grânulos

descritos anteriormente está relacionado com a alta solubilidade da W e da β -TCP. Alguns grânulos apresentaram, em seu interior, septos fibrosos em meio ao processo de degradação. Isso pode ter ocorrido pelo fato de a superfície desse compósito apresentar alta porosidade, o que aumenta a reatividade superficial do biomaterial no interstício.^{6, 7, 12, 13}

Observa-se que os grânulos, nos grupos 20/80 e 80/20, aos 45 dias de pós-operatório, apresentam grande quantidade de septos internos, com presença de células inflamatórias, inclusive células gigantes multinucleadas, com aspecto de degradabilidade e deposição de fibras colágenas concêntricas ao redor dos grânulos. Já no grupo 60/40, aos 45 dias de pós-operatório, observa-se que grânulos foram substituídos por matriz osteoide. Mesmo formando um arcabouço dependente da distribuição dos grânulos a proporção de wollastonita e TCP influencia o padrão de resposta biológica, além disso, as propriedades químicas inerentes aos diferentes compósitos estudados mostram que o fato de não ter havido rejeição pelo organismo, o que seria caracterizado por resposta inflamatória aguda exacerbada, comprova que os biomateriais avaliados no nosso estudo foram biocompatíveis.^{12, 14, 16}

CONCLUSÃO

O compósito p-wollastonita e o β -fosfato tricálcico, nas concentrações de 20/80, 60/40 e 80/20, foram considerados biocompatíveis e bioativos.

Aos 45 dias, o G 60/40 preencheu por completo o defeito ósseo com matriz osteoide neoformada em espessura e altura da borda óssea. O arcabouço formado pela distribuição dos grânulos favoreceu migração e adesão celular ao longo de toda a extensão do defeito ósseo e em todos os grupos e pontos biológicos estudados.

Referências

1. Guastaldi AC, Aparecida AH. Fosfato de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimento. *Quim Nova*, 2010;33(6):1352-8.
2. Miguel FB, Cardoso AKMV, Barbosa Junior AA, Elcio Marcantonio Junior E, Goissis G, Rosa FP. Morphological assessment of the behavior of three dimension alanionic collagen matrices in bone regeneration in rats. *J Biomed Mater Res*. 2006 Aug; 78s(2):334-9.
3. Carrodeguas RG, De Aza PN, De Aza. Main contributions to bioceramics. *Boletin de la Sociedad Espanola de Ceramica y Vidrio*. 2011 Nov-Dic; 50(6):301-9.
4. Tedeja A, Piña C, Martínez S, Avila G. Cerámicas bioeutecticas W-TCP. *Revista Mexicana de Física*. 2004 abr;50(2):187-92.
5. Barbosa WT, De Almeida KV, De Lima GG, Rodriguez MA, Lia Fook MV, Carrodeguas RG, et al. Synthesis and in vivo evaluation of a scaffold containing wollastonite/ β -TCP for bone repair in a rabbit tibial defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2019 Aug 8; 1-10. DOI 10.1002/jbm.b.34462.
6. Artas G, Gul M, Acikan I, Kirtay M, Bozoglan A, Simsek S, et al. A comparison of different bone graft materials in peri-implant guided bone regeneration. *Braz. oral res* [online]. 2018 [cited 2019 Oct 13];32:59. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-83242018000100250&lng=en&nrm=iso. DOI 10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0059.
7. Gaspar AMM, Saska S, Carrodeguas RG, De Aza AH, Péna P, De Aza PN, et al. Biological response to wollastonite doped α -tricalcium phosphate implants in hard and soft tissues in rats. *Key Engineering Materials*. 2009; 396/398:7-10.
8. Furusawa T, Mizunuma K, Yamashita S, Takahashi T. Investigation of early bone formation using resorbable bioactive glass in the rat mandible. *Int J Oral and Maxillofac Implants*. 1998;13(5):672-6.
9. Coathup MJ, Hing KA, Samizadeh S, Chan O, Fang YS, Champion C, et al. Effect of increased strut porosity of calcium phosphate bone graft substitute biomaterials on osteoinduction. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2012; 100A(6):1550-5. DOI 10.1002/jbm.a.34094.
10. Fetner AE, Hartigan M, Low SB. Periodontal repair using Perioglass in non human primates: clinical and histologic observations. *Compend Cont Educ Dent* 1994;5:932-8.
11. Grégoire M, Orly I, Menanteau, J. The influence of calcium phosphate biomaterial on human bone cell activities. An in vitro approach. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1990; 24(2):165-77.
12. Almeida RS. Avaliação da implantação de grânulos de β -TCP associado ou não à biovidro fosfatado para regeneração de defeito ósseo [dissertação]. Instituto de

Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, 2013.

13. Pérez RA, Won J-E, Knowles JC, Kim HW. naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013; 65(4):471-96.
14. Santos GG, Vasconcelos LQ, Poy SCS, Almeida RdosS, Barbosa Júnior AA, Santos SRdeA, et al. Influence of the geometry of nanostructure dhydroxyapatiteand alginate composites in the initial phase of bone repair. *Acta Cir. Bras.* [online]. 2019; 34(2):201900203.
15. Alimi M, Navarro-Ramirez R, Parikh K, Njoku I, Hofstetter CP, Tsiouris AJ, et al. Radiographic and clinical out come of silicate-substituted calcium phosphate (Si-CaP) Ceramic bone graft in spinal fusion procedures. *Clinical Spine Surgery*. 2017;30(6): E845-E52. DOI 10.1097/bsd.0000000000000432
16. Santos GG, Vasconcelos LQ, Barbosa Junior AA, Santos SRAS, Rossi AM, Miguel FB, Rosa FP. Análise da influência de duas faixas granulométricas de microesferas de hidroxiapatita e alginato na fase inicial do reparo ósseo. *Rev. Ciênc. Méd. Biol.*, 2016;15(3):363-369.

5.2 ARTIGO 2

Periódico: *ACS Applied Materials & Interfaces*
Qualis: A1

Características físico-químicas do compósito wollastonita e fosfato tricálcico no formato de grânulos em diferentes concentrações para a regeneração óssea

Physicochemical characteristics of the wollastonite and tricalcium phosphate composite in the form of granules at different concentrations for bone regeneration

Luisa Queiroz Vasconcelos⁷
Maurício Mitsua Monção⁷
Aryon de Almeida Barbosa Júnior⁸
Raúl García Carrodegua⁹
Isabela Cerqueira Barreto¹⁰
Fabiana Paim Rosa¹¹
Roberto P. C. Araújo¹²

Resumo

Biomateriais para enxertia óssea são utilizados com frequência em cirurgias bucais e maxilofaciais. A busca de um material ideal para melhorar a regeneração óssea tem sido objeto de pesquisa da bioengenharia tecidual, uma vez que esse biomaterial precisa fornecer uma estrutura de suporte que foi perdida e que funcione como um veículo de entrega de fatores de crescimento e viabilidade celular. Para isso, a composição química, as propriedades físicas dos biomateriais, como formato, dimensões e porosidade, são fatores que influenciam na biocompatibilidade, na biodegradabilidade e nos potenciais osteoindutivos e osteocondutores. Diante dessa necessidade, o objetivo deste trabalho é descrever as características físico-químicas do compósito wollastonita e do fosfato tricálcico, em diferentes concentrações, para reparação tecidual óssea

Palavras-chave: Bioengenharia tecidual, Biomaterial, Fosfato de cálcio, Silicato de cálcio.

⁷ Health Sciences Institute, Federal University of Bahia. Salvador – BA, Brazil. E-mail: luisa-queiroz@hotmail.com

⁸ Institute of General and Cutaneous Pathology. Salvador – BA, Brazil.

⁹ Heliocón Medical S.L., Madrid, España.

¹⁰ ¹¹ ¹² Health Sciences Institute, Federal University of Bahia. Salvador – BA, Brazil.

INTRODUÇÃO

Existem relatos sobre a utilização de materiais para substituir, reparar ou potencializar funções, tecidos ou órgãos, de forma a aumentar a longevidade ou melhorar a qualidade de vida desde os primórdios. No início, o uso de tais materiais não considerava a biocompatibilidade entre os tecidos, uma vez que se priorizava somente a função mecânica. Com isso, havia alto índice de rejeição dos biomateriais, o que causava taxas de insucesso elevadas.¹ Diante disso, a bioengenharia tecidual procura por melhores substitutos que mimetizem estruturas biológicas.²

O controle da interface biomaterial e tecido vivo é muito importante, uma vez que existe uma grande diferença entre as propriedades físicas desses componentes. A utilização das cerâmicas como biomateriais advém de sua similaridade com o meio fisiológico, devido à sua constituição básica de íons que também são encontrados no meio fisiológico.^{3,4,5} Materiais cerâmicos pertencem a uma classe de materiais inorgânicos e não metálicos com ligações mistas iônicas-covalentes, como vidros e vitrocerâmicas. Devido ao carácter das ligações, geralmente exibem elevada dureza, alta temperatura de fusão e expressiva estabilidade mecânica e química.^{2,3,6}

Os materiais cerâmicos, na área biomédica, necessitam possuir alta pureza e controle granulométrico, usualmente obtidos a partir do beneficiamento das matérias-primas empregadas em sua produção.^{5,6} Dentre as cerâmicas mais estudadas para aplicações biomédicas estão os vidros ou vitrocerâmicas bioativas, que são capazes de interagir fortemente com tecidos vivos. A wollastonita é uma representante do grupo das vitrocerâmicas de interesse na área da biomedicina e possui, em sua composição, a sílica, sendo que esse elemento se encontra envolvido em vários processos biológicos. Além disso, melhora as propriedades mecânicas de outras cerâmicas, como o fosfato tricálcico. O fosfato tricálcico na fase β é mais utilizado em compósitos bifásicos, pois possui maior solubilidade do que a fase α .^{5,6,7} Diante disso, o objetivo deste trabalho é descrever as características físico-químicas do compósito wollastonita e fosfato tricálcico, em diferentes concentrações, desenvolvido para reparo tecidual ósseo.

MATERIAIS E MÉTODOS

SÍNTESES DOS COMPÓSITOS ρ -W/ β -TCP

Os biomateriais de W-TCP (80-20, 60-40 e 20-80) foram preparados, caracterizados e fornecidos pelo Instituto de Cerâmica e Vidro (ICV-CSIC, Madrid, Espanha). As composições

dos biomateriais foram escolhidas para obter diferentes graus de reabsorção, tendo em mente que a W é mais solúvel e bioativa do que TCP em fluídos fisiológico. ⁴

Durante a preparação do compósito ρ -W/ β -TCP, foram usadas wollastonita natural, CaSiO_3 (NYCO, NYAD M1250, Batch Number M1404227J01), cuja composição molar foi de 52,94% de SiO_2 e 44,94 de CaO, e fosfato tricálcico, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Sigma-Aldrich, Ref. 21218, Lote Número BCBM7330V) em diferentes quantidades, a depender da concentração de W e TCP desejada, como é apresentado na Tabela 1.

Após pesar as quantidades específicas das matérias-primas de cada concentração, os compósitos foram moídos com auxílio de esferas em zircônia (3,0 milímetros de diâmetro) no moinho de atrito por 15 minutos e foi adicionado isopropil. Os compósitos foram secos a 60 °C por 24 h. Após secagem, os materiais foram sinterizados a uma temperatura fixa de 1250 °C, mas em tempos diferentes de acordo com a concentração desejada (Tabela 1). A temperatura foi escolhida com base no estudo de Almeida (2017)¹. A autora realizou estudos dilatométricos prévios, que indicaram uma taxa de densificação máxima para as três composições experimentais ao redor de 1250 °C. Essa temperatura cai dentro do campo binário do diagrama de equilíbrio de fases do sistema W-TCP ⁶, onde apenas duas fases cristalinas devem existir em condições de equilíbrio termodinâmico (ps-CaSiO_3 e $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$).

Diferentes tempos foram usados para cada composição, a fim de permitir a sinterização e, ao mesmo tempo, evitar a formação excessiva de vidro, que é formado por meio de fusões locais em maior quantidade nas composições mais ricas em W. Após sinterização, os compósitos passaram por um processo de trituração com auxílio de almofariz e pistilo, o que permitiu uma nova granulometria na escala de 0,6 - 0,4 milímetros.

Material	Quantidade MP		Composição química esperada (%m/m)				Condições de sinterização	
	W (g)	TCP (g)	CaO	SiO ₂	P ₂ O ₅	Outros	T(°C)	t(min)
80-20	80,0	20,0	51,34	10,61	35,72	2,33	1250	5
60-40	60,0	40,0	48,25	31,87	17,89	1,99	1250	60
20-80	20,0	80,0	46,70	42,52	8,85	1,93	1250	180

Tabela 1 – Quantidade de matérias-primas, temperatura e tempo empregada na preparação dos materiais experimentais.

CARACTERIZAÇÃO DOS COMPÓSITOS ρ -W/ β -TCP

Análises químicas quantitativas

As amostras foram moídas em moinho de ágata até se obter um pó com dimensão menor do que 75 μm . Após moagem, foram pesadas e misturadas com $\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$ de grau espectral. A mistura foi fundida em cadinho de Pt/Au e formada em discos em um forno controlado especial Perl'X3 (Philips). As curvas de calibração foram preparadas a partir de padrões de composição certificada.

Os padrões de difração de raio-X foram registrados em um difratômetro de pó D8 Advance (Bruker AXS Inc.) com detetor LinxEye Super Speed. As condições empregadas para o registro foram: faixa angular de 10 até 70° 2 θ , tamanho de passo de 0,05° 2 θ , tempo de passo de 1,050 s, λ $\text{CuK}\alpha$, tensão e corrente anódica 40 kV e 40 mA, respectivamente. As amostras foram previamente moídas como foi indicado no parágrafo anterior.

As análises quantitativas de fases cristalinas e amorfa foram realizadas pelo método Rietveld, usando-se o *software* GSAS-II (TOBY; VON DREELE, 2013)⁷. Para a estimativa do conteúdo amorfo, foi usado coríndon (10 % m/m) como padrão interno (DE LA TORRE; BRUQUE; ARANDA, 2001)⁸. A morfologia superficial dos grânulos foi estudada em um microscópio eletrônico de varredura de bancada TM-1000 (Hitachi Hi-Tech).

Análises químicas qualitativas

A identificação qualitativa das fases cristalinas foi realizada com o *software* X'Pert HighScore Plus v. 2.2b (PANanalytical B.V.). Para o estudo da microestrutura, os grânulos dos materiais foram embutidos em resina epóxi sob vácuo e, após a polimerização da resina, os blocos foram cortados com serra circular de diamante, e as superfícies de corte polidas e recobertas com prata para o exame no microscópio eletrônico de varredura (FE-SEM Hitachi modelo S-4700) e análise de EDX.

Após a análise quantitativa e qualitativa, as amostras foram levadas para o Laboratório de Caracterização de Materiais (LCM), do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, para a obtenção das micrografias por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para melhor compreensão dos aspectos superficiais através da análise quantitativa das partículas e poros dos grupos. As amostras foram colocadas em uma fita de carbono dupla face, fixadas em

um porta-amostra com superfície lisa. Foram, então, colocadas em um metalizador (Quorum Technologies, modelo Q150R) e submetidas ao processo de metalização por pulverização catódica, com deposição de um filme de ouro sobre a superfície das amostras a serem analisadas. Os parâmetros de deposição iônica estabelecidos foram os seguintes: temperatura ambiente a 25°C, corrente de 20mA, tensão de 2kV e tempo de deposição de 120 segundos, fornecendo um filme de ouro na superfície das partículas da ordem de 25nm. Para obtenção das micrografias, o presente estudo utilizou-se do microscópio eletrônico de varredura da marca TESCAN, modelo VEGA 3 LMU, pelo método de elétrons secundários, com distância de trabalho de 15mm e tensão de aceleração dos elétrons de 10 kV. As micrografias foram obtidas com diferentes aumentos da MEV. As imagens obtidas foram processadas e analisadas e com auxílio do *software* livre ImageJ (versão Java 1.7 32-bit) de domínio público.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises químicas qualitativas

Na imagem de MEV, é possível observar que os aspectos superficiais dos grânulos são similares nas três concentrações (Figuras 1, 2 e 3). A porosidade total, inter e intragranular dos materiais variou entre 17 e 26 % (20/80), 38 e 44 % (60/20), 61 e 64% (80/20). A porosidade intragranular diminuiu com o aumento do conteúdo de W no material, provavelmente devido ao maior desenvolvimento da fase vítrea amorfa, que contribui para a densificação.⁴

Neste estudo, foi utilizado o isopropil como veículo de mistura entre as massas. Além do isopropil, podem-se utilizar outros meios, como a água e outros álcoois. O veículo de mistura tem influência direta no tipo de poro intragranular que é formado durante a evaporação. A água dá origem a poros lamelares, enquanto os álcoois formam canais dendríticos e prismáticos. É possível identificar, nas Figuras 1, 2 e 3 (A, B e C) aspectos detalhados da microestrutura porosa, formada pelas micropartículas interconectadas do biomaterial granulado, adquiridas por MEV. O poro intragranular é um dos fatores relacionados com a degradação do biomaterial quando implantado *in vivo*.^{2,3,7}

Ainda nas Figuras 1, 2 e 3 (a e b), é possível observar que os grânulos são irregulares, múltiplos, facetados e angulares.⁵ Os espaços formados entre os grânulos vão influenciar na propriedade osteocondutora do biomaterial. Quando o biomaterial tem o formato de grânulo, a distribuição ao longo da área a ser tratada propicia devolução da espessura e do volume do tecido ósseo.^{8,9} Isso ocorre, pois, mesmo com a delimitação de uma faixa granulométrica, possuem formas diferentes, o que permite a distribuição heterogênea do material no defeito

ósseo.^{4,5} A heterogeneidade inerente aos grânulos pode ser visualizada nos resultados adquiridos com MEV nas Figuras 1, 2 e 3. O poros entre os grânulos devem simular a porção esponjosa óssea para promover a migração, proliferação celular, difusão de metabólitos e oxigênio, ou seja, o arcabouço formado pelas partículas deve criar um ambiente adequado para a viabilidade celular e a proliferação.^{6, 8, 10}

Nas figuras 1, 2 e 3 (a e b), nota-se que os grânulos possuem dimensões horizontais que variaram entre 500 e 1000 μm . Não há um consenso sobre o tamanho ideal que os grânulos devam possuir.¹¹ Contudo existem trabalhos que apresentaram resultados favoráveis para a regeneração óssea com partículas com dimensões similares às do presente estudo. Coathup e colaboradores (2013)¹¹ apresentaram estudo com formação óssea mais significativa em grupos que tinham partículas entre 1.000 e 2.000 μm . No estudo de Eweida e colaboradores (2017)¹², entre outros fatores relacionados com a neovascularização e neoformação de tecido ósseo, foi analisado um compósito à base de hidroxiapatita e sílica, com duas apresentações de tamanhos diferentes de partículas. Compararam-se compósitos com partículas de 200 μm em pó com partículas de 1.200 μm em forma de grânulos.

Além da presença de porosidade, a composição química do biomaterial influencia a migração, a adesão celular e a neoformação tecidual.^{13, 14} Os resultados da análise química por MEV corresponderam à composição química esperada para cada material experimental, calculada a partir das quantidades e da composição das matérias-primas empregadas na preparação dos materiais. Observa-se, na Tabela 2, que, em todas as concentrações, houve formação de fase amorfa, sendo que o grupo que possuía maior concentração de wollastonita foi o que apresentou maior taxa de fase amorfa, com 44%. Já o material 20/80 foi único que formou α -TCP com 6%. Os resultados obtidos pelo MEV foram similares aos obtidos no difratogramas.

Material	Composição química (%-m/m)				Composição de fases (%-m/m)						Porosidade (%)	
	CaO	SiO ₂	P ₂ O ₅	Outros*	ps- W	W- 2M	β - TCP	α - TCP	Am	R _w (%)	Inter	Intra
20–80	52,6	10,5	36,7	0,2	5	12	59	6	18	8,25	38	26
60–40	49,2	31,5	18,4	0,9	34	nd	25	nd	41	12,32	42	20
80–20	47,6	42,1	9,2	1,1	42	nd	12	nd	44	12,65	44	17

Tabela 2 – A composição química e de fases encontrada para os materiais experimentais

* MgO+Al₂O₃+K₂O+Na₂O+Fe₂O₃+TiO₂. nd: não detectado; Am: fase amorfa; R_w: indicador da qualidade do ajuste do modelo. Rietveld usado na determinação quantitativa de fases beta 2.

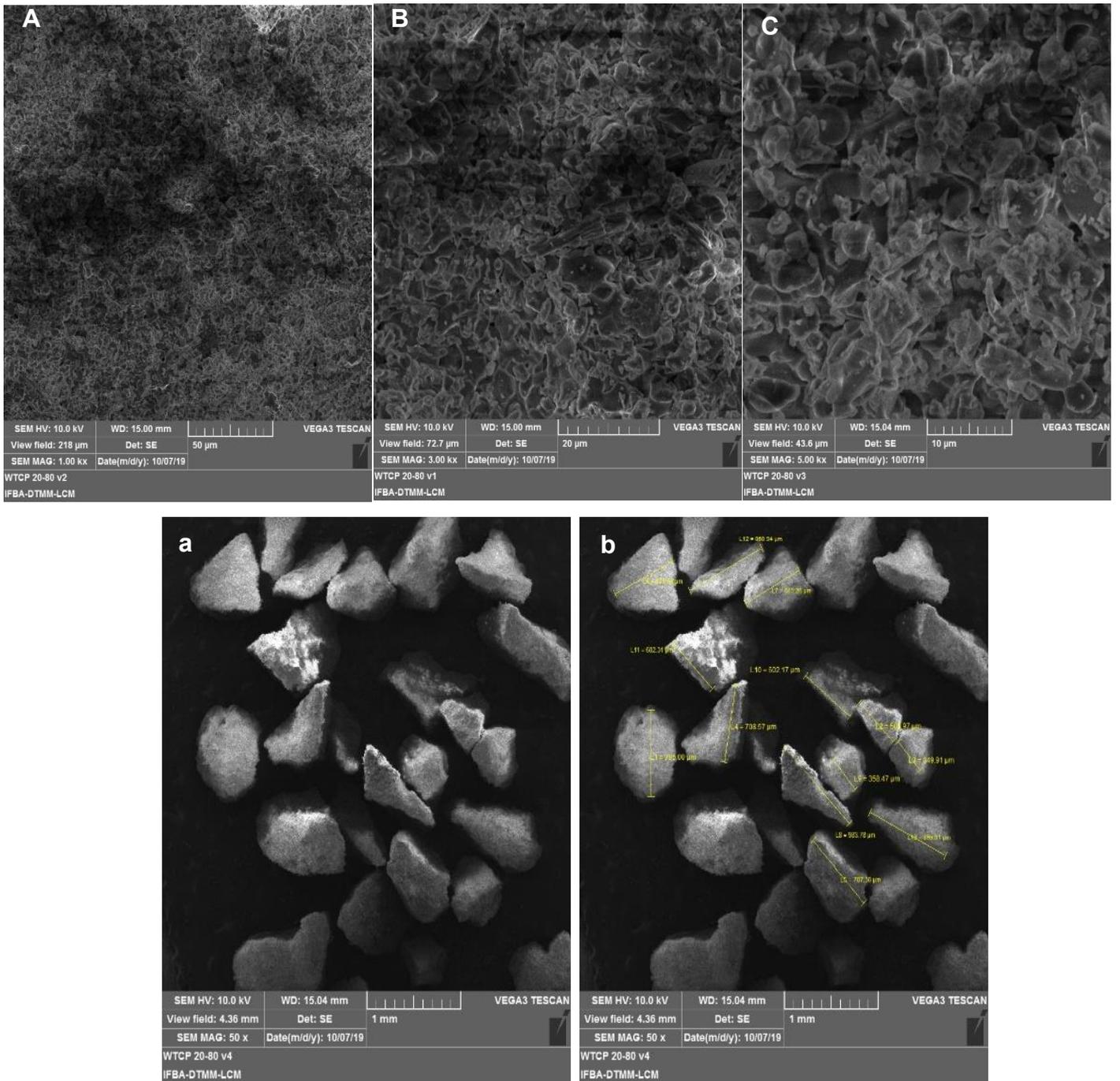


Figura 1 – Fotomicrografias da superfície dos grânulos por MEV A, B e C, respectivamente, correspondem a micrografias da superfície das amostras de grânulos do biomaterial composto de W e β -TCP. As micrografias dos grânulos nas concentrações 20/80 mostram formas sólidas, variadas e aleatórias (a e b).

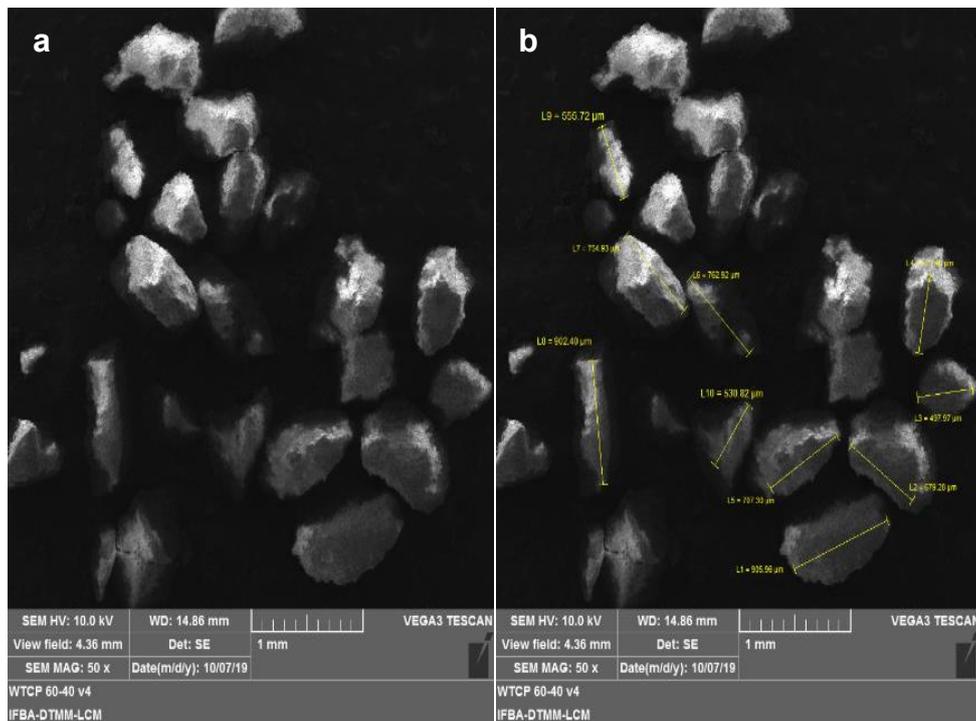
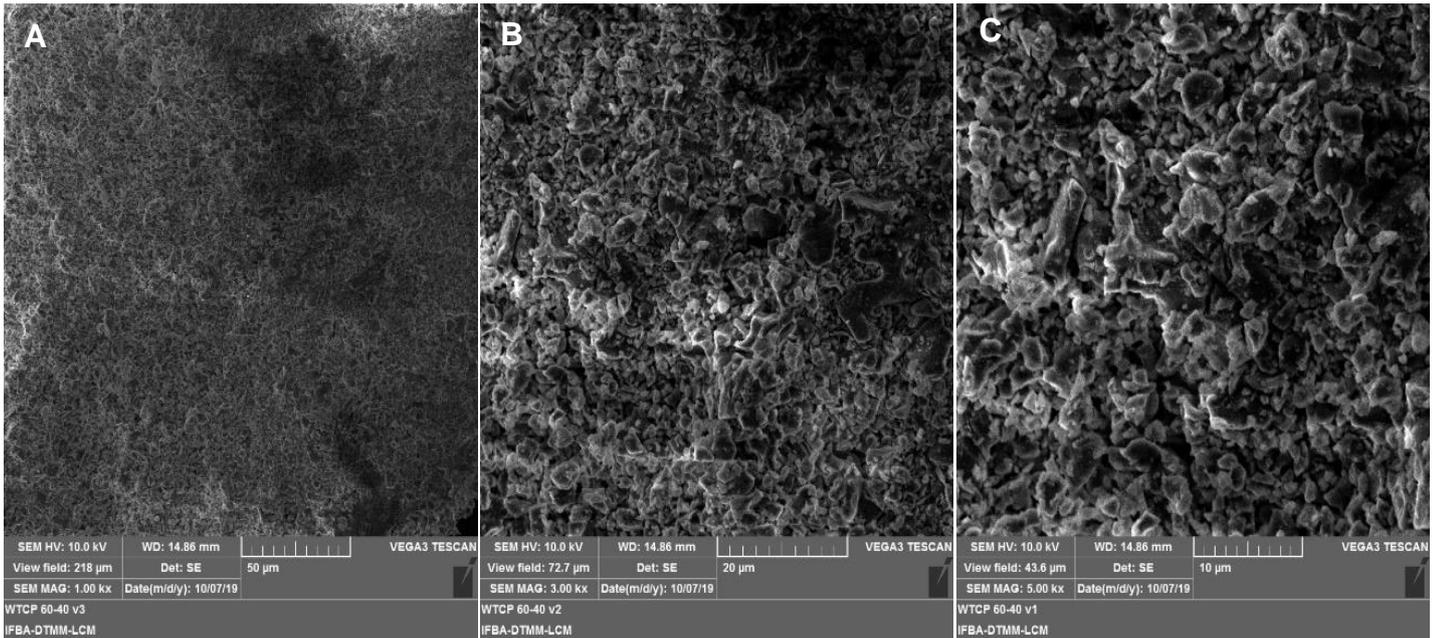


Figura 2 – Fotomicrografias da superfície dos grânulos por MEV A, B e C, respectivamente, correspondem a micrografias da superfície das amostras de grânulos do biomaterial composto de W e β -TCP. As micrografias dos grânulos nas concentrações 60/40 mostram formas sólidas, variadas e aleatórias (a e b).

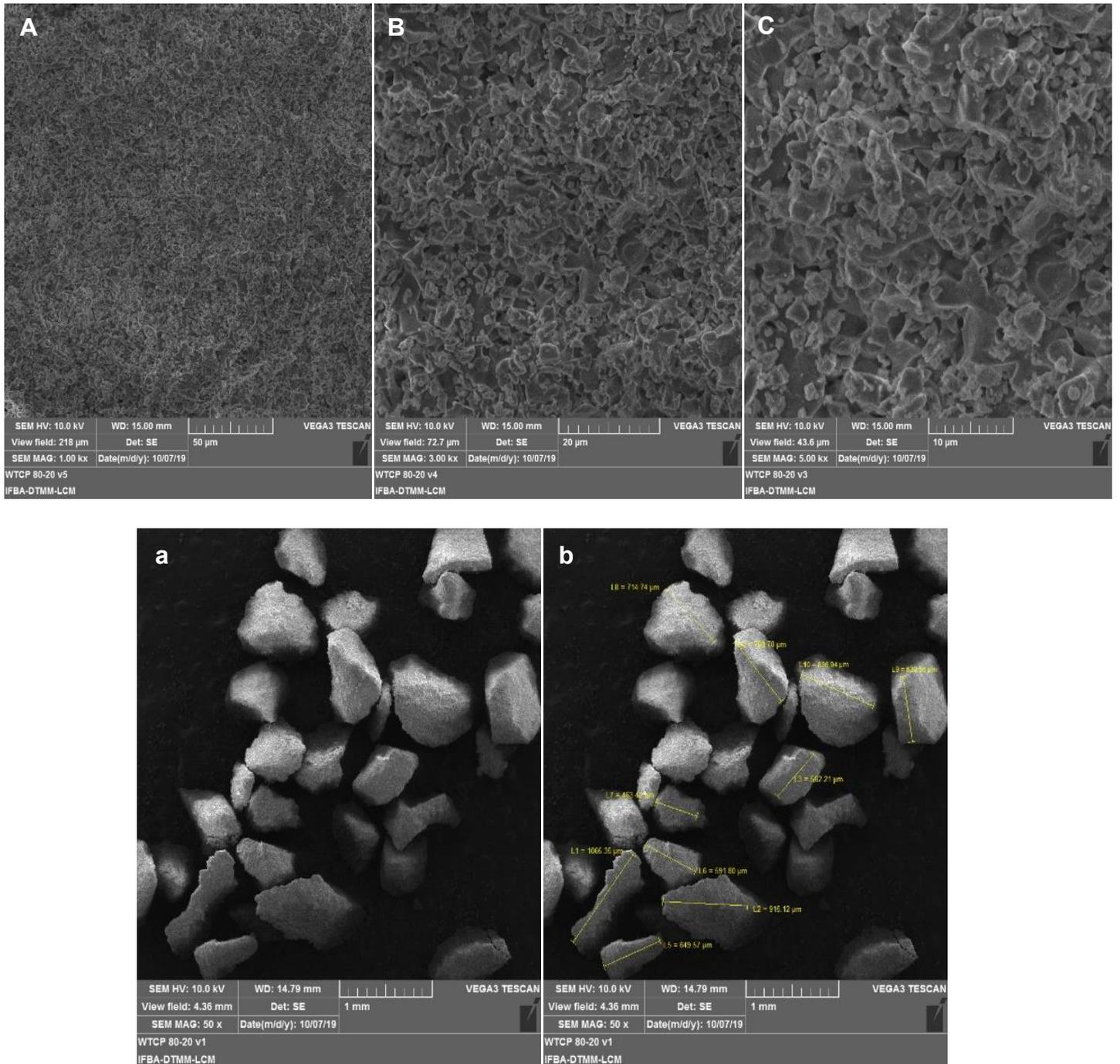


Figura 3 – Fotomicrografias da superfície dos grânulos por MEV A, B e C, respectivamente, correspondem a micrografias da superfície das amostras de grânulos do biomaterial composto de W e β -TCP. As micrografias dos grânulos nas concentrações 80/20 mostram formas sólidas, variadas e aleatórias (a e b)

Os difratogramas de raios X das amostras experimentais, apresentados nas figuras de 4 até 6, mostraram que o material 20-80 consistia de β - e α -TCP, W-2M, e ps-W. Por outro lado, os grânulos 60-40 e 80-20 foram compostos de ps-W e β -TCP. A microestrutura dos três materiais experimentais consistiu em grãos da fase cristalina e da fase vítrea amorfa. Os

resultados da quantificação das fases cristalinas e amorfas existentes em cada material são apresentados na Tabela 2. Como era esperado, a quantidade de fase vítrea amorfa aumentou com a quantidade de W empregada na preparação dos materiais. Tal achado pode ser explicado pelo fato de, em sistemas de vidros bioativos com silício e fósforo, o silício é que atua como elemento formador de redes.⁶ Além disso, o silício é um agente modificador de fase, o que permite a cristalização parcial de sistemas vítreos e promove melhorias nas propriedades mecânicas. Contudo a cristalização parcial de vidros pode diminuir o nível de bioatividade do biomaterial ou até torná-lo inerte.^{2, 6, 7}

Corroborando a ideia anterior, os vidros com maiores teores de silício podem ser submetidos a tratamentos térmicos em temperaturas mais elevadas sem cristalizar totalmente, diferentemente daqueles que possuem óxidos modificadores. É bem estabelecido que a redução da relação entre área superficial e volume do material é a força motriz para a sinterização de materiais cerâmicos. A superfície de um material é considerada um defeito superficial, sendo uma região de alta energia.^{7, 8} Dessa maneira, durante a sinterização, ocorre a aproximação de partículas, levando à formação de pescoço entre elas e à contração volumétrica do material. Ao fim do processo, há expressiva redução de sua área superficial específica, fazendo com que o sistema alcance uma condição de menor energia livre. Essa redução da área superficial também acarreta a diminuição da bioatividade do vidro

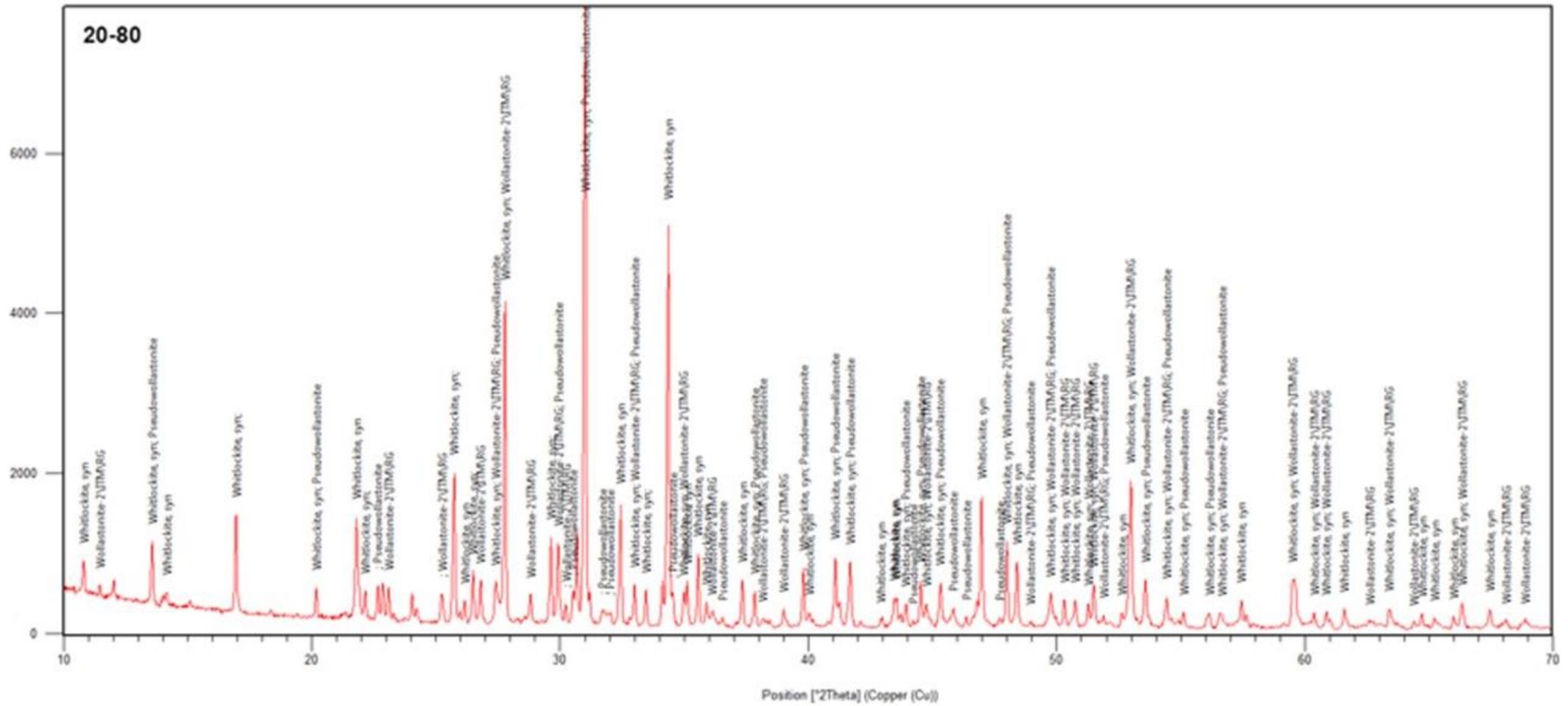


Figura 4 – Difratoqramas de raios X do compósito 20-80

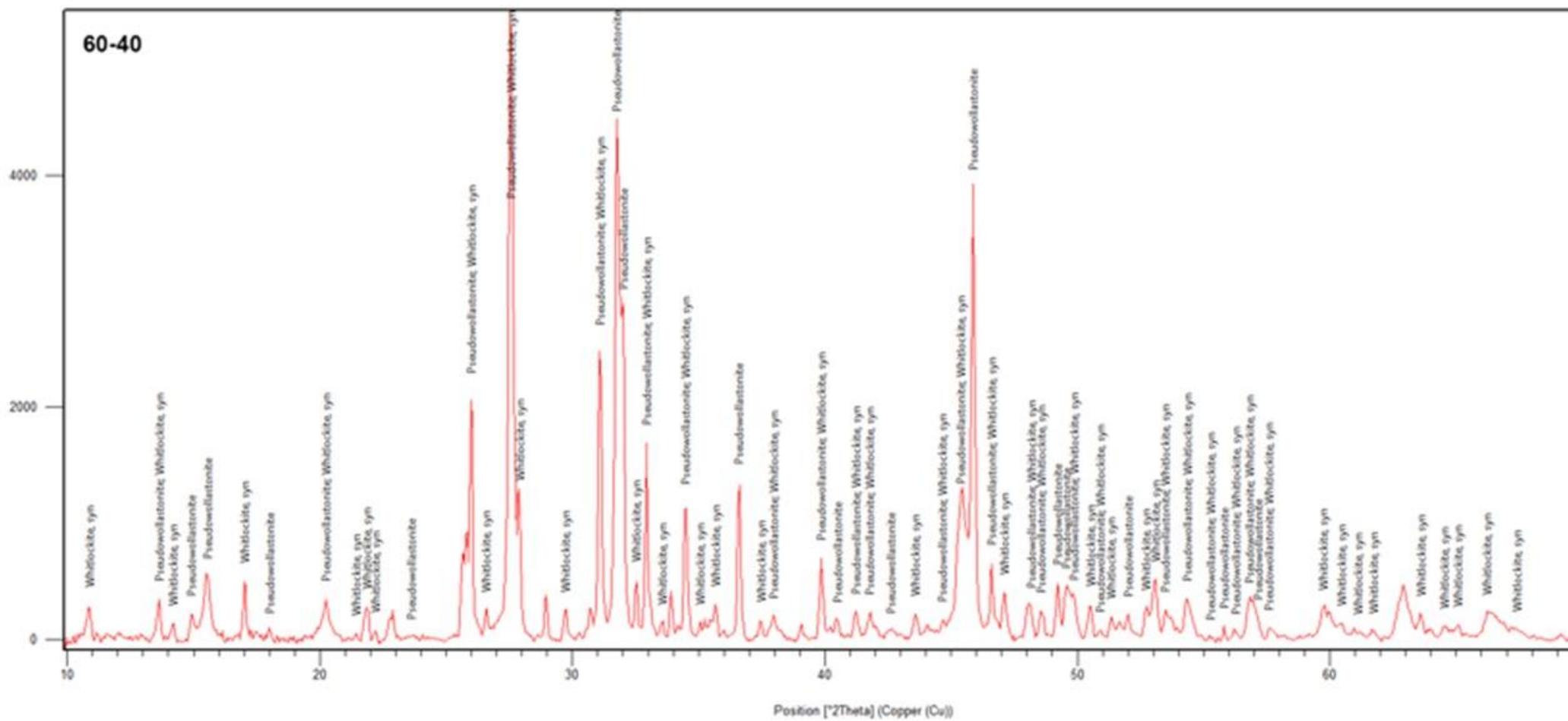


Figura 5 – Difratomogramas de raios X do compósito 60-40.

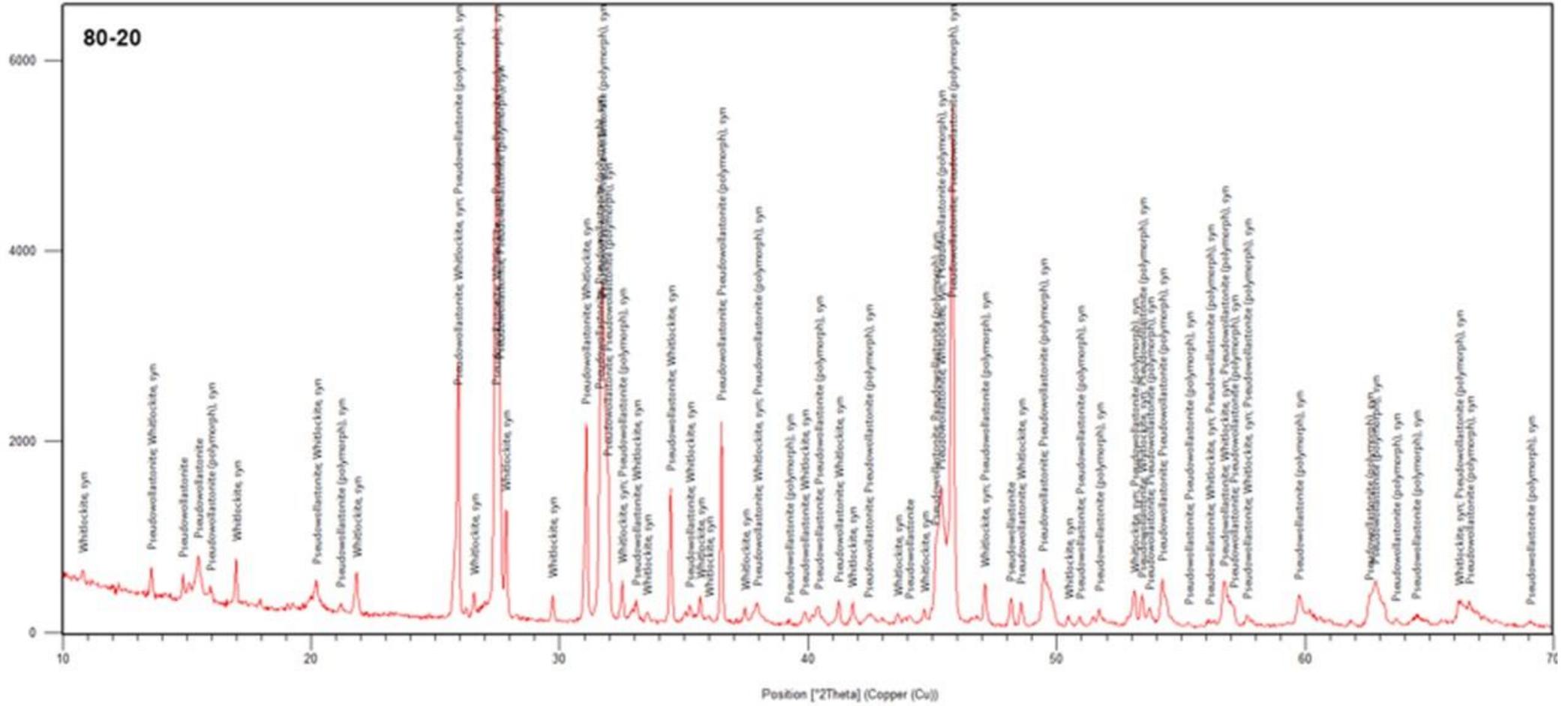


Figura 6 – Difrato gramas de raios X do compósito 80-20

Na Figura 7, são apresentadas imagens de MEV acompanhadas de imagens de mapeamento elementar de Ca, P e Si. Na figura correspondente ao material 20-80, é possível observar uma fibra longa, rica em Ca e Si e carente de P, rodeada de grãos irregulares ricos em Ca e P e carentes de Si, que devem corresponder com TCP (α - ou β -). Tanto a fibra como os grãos estão rodeados por áreas que contêm tanto Ca, como Si e P, correspondentes à fase vítrea amorfa. De jeito similar, foi possível identificar a matriz vítrea amorfa (áreas contendo Ca, Si e P) na qual aparecem insertados cristais de W (áreas ricas em Ca e Si e carentes de P) e de TCP (áreas ricas em Ca e P e carentes em Si).^{7, 8, 9, 14, 15}

Quando uma vitrocerâmica de fase residual vítrea é introduzida em meio a um fluido corpóreo, ocorre a dissolução parcial do cálcio e do fósforo, o que irá promover uma rápida e durável ligação química, por meio de uma interface composta de apatita e de tecido ósseo.^{7, 8} Portanto, espera-se que os compósitos com as concentrações elevadas de TCP apresentem maior bioatividade.^{6, 9}

As cerâmicas que contêm fosfato de cálcio possuem solubilidade dependente da razão Ca:P. Quando há um aumento da razão Ca:P, a solubilidade da cerâmica diminui e, conseqüentemente, a biodegradação também. Além disso, a velocidade de biodegradação está relacionada com a área superficial do material. Quanto maior a área superficial menor será a velocidade de degradação da cerâmica.^{5, 10, 11, 12} Portanto, associar TCP com a wollastonita poderá aumentar a velocidade de degradação do compósito no formato de grânulo.

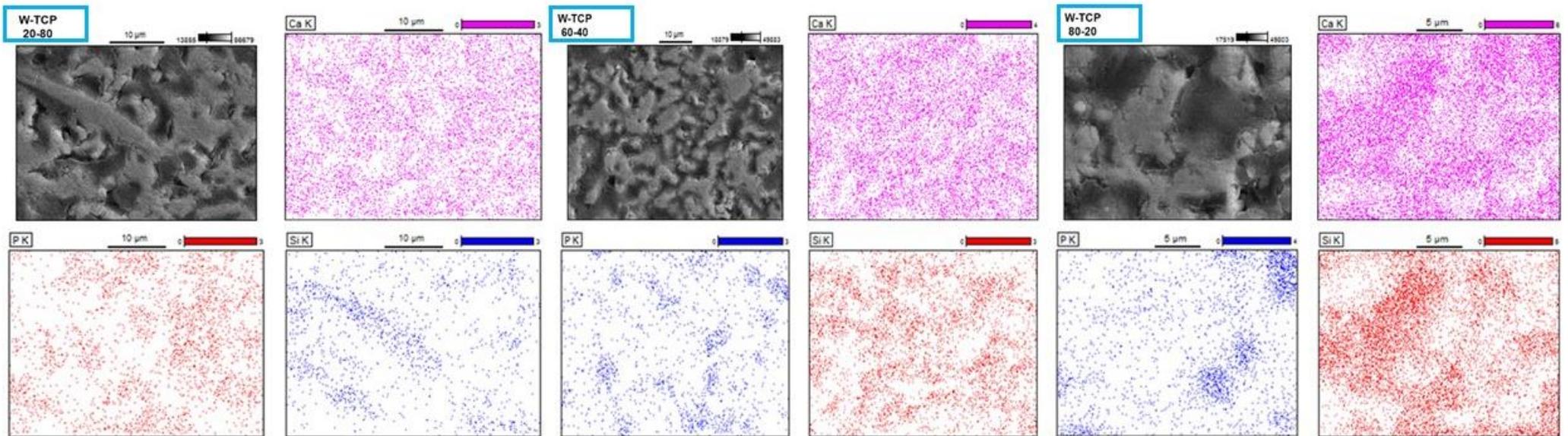


Figura 7 – Imagens de MEV e mapeamento elemental dos compósitos 20-80, 60-40 e 80-20.

CONCLUSÃO

O material apresentado neste trabalho possui propriedades físico-químicas de uma vitrocerâmica bifásica e contém proporções específicas de ρ - wollastonita e β - fosfato tricálcico. A concentração, a área superficial, os poros inter e intragranulares, as fases vítreas e cristalinas foram demonstradas.

Referências

1. Barbosa WT, de Almeida KV, de Lima GG, Rodriguez MA, Lia Fook MV, Carrodeguas RG, et al. Synthesis and in vivo evaluation of a scaffold containing wollastonite/ β -TCP for bone repair in a rabbit tibial defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2019 Aug; 8: 1-10. DOI 10.1002/jbm.b.34462.
2. Thompson FC, Matsumoto MA, Bigueti CC, Rennó ACM, De Andrade Holgado L, Santiago Junior JF, et al. Distinct healing pattern of maxillary sinus augmentation using the vitroc ceramic Biosilicate®: Study in rabbits. *Materials Science and Engineering C*. 2019;99: 726-34. DOI 10.1016/j.msec.2019.02.011.
3. Chang BS, Lee CK, Hong KS, Youn HJ, Ryu HS, Chung SS, et al. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials*. 2002;21:1291-8.
4. Barbosa WT, De Almeida KV, De Lima GG, Rodriguez MA, Lia Fook MV, Carrodeguas RG, et al. Synthesis and in vivo evaluation of a scaffold containing wollastonite/ β -TCP for bone repair in a rabbit tibial defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2019 Aug 8; 1-10. DOI 10.1002/jbm.b.34462.
5. Carrodeguas RGG, De Aza AH, Jimenez J, De Aza PN, Pena P, López-Bravo A, et al. Preparation and in vitro characterization of wollastonite doped tricalcium phosphate bioceramics. *Key Engineering Materials* [Internet]. 2008 [Acesso em 2013 out 25];361-363:23740. Disponível em: <http://www.scientific.net/KEM.361-363.237>.
6. De Aza, PN, Gitian F, De Aza S. Phase Diagram of wollastonite-tricalcium phosphate. *Journal of the American Ceramic Society* [Internet]. 1995 [acesso em 2013 out 25]; 78(6):1653-6. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1151-2916.1995.tb08865.x>.
7. Toby BH, Von Dreele RB. GSAS-II : The Genesis of a Modern Open-Source All Purpose Crystallography Software Package. *Journal of Applied Crystallography* [Internet]. Mar 2013 [acesso em 2014 nov 11];46(2):54409. Disponível em: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?aj5212>
8. De La Torre, AG, Bruque S, Aranda MG. Rietveld quantitative amorphous content analysis. *Journal of Applied Crystallography*. 2001 Apr;34(2):196-202.
9. Fernandes M, Correia DM, Ribeiro C, Castro N, Correia V, Lanceros-Mendez, S. Bioinspired three-dimensional magneto-active scaffolds for bone tissue engineering. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2019. DOI 10.1021/acsami.9b14001.
10. Roshan-Ghias A, Terrier A, Bourban PE, Pioletti DP. In: vivo *cyclic loading* as a potent stimulatory signal for bone formation inside tissue engineering scaffold. *Eur Cell Mater*. 2010;19:41-49.
11. Coathup MJ, Cai Q, Campion C, Buckland T, Blunn GW. The effect of particle size on the osteointegration of injectable silicate-substituted calcium phosphate bone substitute materials. *J biomater res Hoboken*. 2013 Aug; 101(6):902-10.

12. Eweida A, Schulte M, Frisch O, Kneser U, Harhaus L. The impact of various scaffold components on vascularized bone constructs. *J Craniomaxillofac Surg.* June]2017; 45:881-90.
13. Hoffman CM, Han J, Calvi LM. Impact of aging on bone, marrow and their interactions. *Bone.* 2019; 119:1-7.
14. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Critical reviews in biomedical engineering.* 2012; 40(5): 363-408.
15. Perera FH, Martínez-Vázquez FJ, Miranda P, Ortiz, AL, Pajares A. Clarifying the effect of sintering conditions on the microstructure and mechanical properties of β -tricalcium phosphate. *Ceram Int.* 2010 Aug; 36(6):1929-35.

6 DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi descrever as características físico-químicas e o comportamento *in vivo* de um compósito constituído de ρ -wollastonita e β -fosfato tricálcico, nas concentrações 20% de ρ -wollastonita e 80% β -fosfato tricálcico, 60% ρ -wollastonita e 40% β -fosfato tricálcico e 80% ρ -wollastonita e 20% β -fosfato tricálcico. Os biomateriais desenvolvidos para o reparo ósseo devem ser bioativos, biodegradáveis, biocompatíveis e osteocondutores.^{3, 33, 35, 51} Por isso, o compósito estudado teve a associação da ρ -wollastonita ao β -fosfato tricálcico, com o intuito de aperfeiçoar as propriedades inerentes a cada uma dessas cerâmicas.

O processo de síntese utilizado neste estudo foi do tipo sol-gel, com temperatura fixa de 1250°C para as três concentrações. Como resultado, houve a formação de uma vitrocerâmica com fase vítrea e fase cristalina. A proporção entre as p-W e W-2W tiveram influência na concentração de silício presente na W. O compósito com maior concentração de W apresentou maior quantidade de fase vítrea. As cerâmicas vítreas não apresentam organização estrutural, o que as torna mais bioativas do que as estruturas cristalinas, e, com isso, possuem alta taxa de solubilidade.^{33, 43, 51, 55} Foi possível observar que, aos 15 dias de ponto biológico, a deposição de matriz osteoide foi restrita às bordas ósseas do defeito. Além disso, a resposta inflamatória foi notório e do tipo granulomatosa em ambos os grupos estudados.

O padrão de resposta inflamatória pode ter relação com a presença das fases vítreas e cristalinas presentes nos compósitos, como também da forma de seus constituintes.^{21, 43, 55} O β -fosfato tricálcico, quando aquecido a uma temperatura acima de 1125°C, pode passar para a fase α -fosfato tricálcico. Todavia, no nosso estudo o TCP observado foi do tipo β . Ambas as fases possuem a mesma composição, mas a fase β do fosfato tricálcico é mais estável, a estrutura cristalina e a solubilidade diferente da verificada na fase α . Uma estratégia para tornar a fase α do fosfato tricálcico mais estável é a incorporação do silício à sua estrutura, formando o silicato tricálcico. O silicato tricálcico reduz a dissolução do α -fosfato tricálcico pela formação do gel na superfície do biomaterial, o que prejudica a formação da hidroxiapatita.^{12, 33, 43, 55} A pequena produção de matriz osteoide, em ambos os pontos biológicos, na concentração 80 % ρ -wollastonita e 20% β -fosfato tricálcico, pode ter sofrido influência da produção do silicato tricálcico, assim como as outras concentrações, mas em menor proporção.

Quando uma vitrocerâmica de fase residual vítrea entra em contato com fluido corpóreo, ocorre a dissolução parcial do cálcio e do fosfato, o que irá promover uma rápida e durável ligação química, através de uma interface composta de apatita com o tecido ósseo.^{7, 8}

Os achados histológicos mostraram que as três concentrações do compósito ρ -wollastonita e β -fosfato tricálcico foram bioativas e osteocondutoras.^{12, 21} Em ambos os pontos biológicos, foi possível observar resposta inflamatória do tipo granulomatosa, neoangiogênese, aspecto reticular nos grânulos, íntima relação celular da superfície com o interior do grânulo, deposição de fibras colágenas com diferentes padrões de organização, grânulos em processo de degradação e deposição de matriz osteoide na região solubilizada. A concentração 60% ρ -wollastonita e 40% β -fosfato tricálcico foi a que mais se destacou como um biomaterial para reparo ósseo. A proporção entre a wollastonita e o fosfato tricálcico propiciou uma atividade osteoblástica mais intensa, tendo como resultado o preenchimento total do defeito ósseo com matriz osteoide aos 45 dias de ponto biológico.

O preenchimento do defeito ósseo com 100% de deposição de matriz osteoide na concentração 60% ρ -wollastonita e 40% β -fosfato tricálcico, aos 45 dias, também teve influência da distribuição dos grânulos ao longo do defeito ósseo crítico, uma vez que a heterogeneidade dos grânulos possibilitou a formação de espaços intergrânulos com dimensões espaciais, o que permitiu migração, adesão, sinalização, nutrição e sinalização celular.^{43, 51, 55} As concentrações 20% ρ -wollastonita e 80% β -fosfato tricálcico e 80% ρ -wollastonita e 20% β -fosfato tricálcico também apresentaram histologicamente um arcabouço com característica condutora, mas a proporção dos compostos pode ter influenciado na deposição de matriz osteoide.

As concentrações 20% ρ -wollastonita e 80% β -fosfato tricálcico e 80% ρ -wollastonita e 20% β -fosfato tricálcico apresentaram taxas de deposição de matriz osteoide similares às do grupo de controle. Contudo responderam biologicamente como bons biomateriais preenchedores, pois preencheram todo o defeito com fibras colágenas em diferentes níveis de organização, substituindo os grânulos à medida que eles eram solubilizados. Portanto, o padrão de resposta tecidual sofre influência em decorrência das propriedades físico-químicas do biomaterial.^{33, 51}

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O compósito p-wollastonita e β fosfato tricálcico, nas concentrações de 20/80, 60/40 e 80/20 pode ser considerado bioativo e biocompatível. Os grânulos formaram um arcabouço com volume que permitiu preencher toda a extensão do defeito. Além disso, aos 45 dias, o G60/40 preencheu o defeito ósseo com matriz osteoide neoformada (65%) além de devolver espessura e altura compatíveis com a borda óssea. O arcabouço formado pela distribuição dos grânulos permitiu migração e adesão de fibroblastos ao longo de toda a extensão do defeito ósseo e em todos os grupos e pontos biológicos estudados.

Referências

1. Moreira BSA. Biomecânica da fratura e o processo de cicatrização. *Cadernos Unisuam*. 2013; 3(1):101-7.
2. Motisuke M, Mestres G, Reno CO, Carrodegua RG, Zavaglia CAC, Ginebra M-P. Influence of Si substitution on there activity of alpha-tricalcium phosphate. *Materials Science &Engineering C-Materials for Biological Applications*. Jun 2017; 75:816-21.
3. De Siqueira L, De paula CG, Gouveia RF, Motisuke M, Triches ES. Evaluation of thesintering temperature on the mechanical behavior of beta-tricalcium phosphate/calcium silicate scaffolds obtained by gel casting method. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2019 Feb; 90:635-43.
4. Mescher A. *Junqueira's basic histology text& atlas*. 14th ed. Asia: McGrawHill; 2016.
5. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev Bras Ciênc Farm*. 2005 jan-mar; 41(1).
6. García-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone*. 2015 Dec; 81:112-21.
7. Dimitri P, Rosen C. The Central Nervous System and bone metabolism: an evolving story. *CalcifTissue Int*. 2017 May; 100(5):476-85.
8. Guimarães KB, Vasconcelos BCE, Limeira Júnior FA, Sousa FB, Andrade ES de S, Vasconcellos RJH. Histomorphometric evaluation of calcium phosphate bone grafts on bone repair. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2011 Aug; 77(4):447-54.
9. Carvalho ACA. Reparo ósseo de defeito crítico em calvária de rato com microesferas de hidroxiapatita e selante de fibrina [dissertação]. Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, 2010.
10. Rolim AEH. Avaliação de microesferas, dopadas ou não com estrôncio no reparo de defeito ósseo crítico, em calvária de rato [dissertação]. Universidade Federal da Bahia, 2010.
11. Siqueira, RL, Zanotto ED. Biosilicato ®: Histórico de uma vitrocerâmica Brasileira de Elevada bioatividade. *Quim Nova*. 2011; 34(7).
12. Griffon DF Evaluation of osteoprodutive biomaterials: allograft, boneinducingagent, bioactiveglass, and ceramics [dissertation]. Department of Clinical Veterinary Sciences, Division of Surgery Faculty of Veterinary Medicine Universityof Helsinki, 2002.
13. Téllez JH, Guerrero AF, Torres BJM. Estudio de hidroxiapatita natural vs sintética em suaceptación bilógica y eficácia regenerativa ósea em modelo animal. *Oral Revista*. 2010; 32.
14. Miguel FB, Barbosa Júnior AdeA, De Paula FL, Barreto IC, Goissis G, Rosa FP. Regeneration of critical bone defects with anioniccollagen matrix as scaffolds. *J Mater Sci Mater Med*. 2013; 24: 2567-75, 2013.

15. Barreto IC. Utilização de ranelato de estrôncio associado a biometrias para regeneração óssea [tese]. Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, 2011.
16. Podporska J, Błazewicz M, Trybalska B, Zych L. A novel ceramic with medical application. *Processing and Application of Ceramics*. 2008; 2(1):19-22.
17. Callister JR, William D. *Ciência e engenharia de materiais: uma introdução*. 5.ed. Rio de Janeiro: LTC; 2014.
18. Daguano JKM de F. Biovidros e vitrocerâmicos bioativos do sistema $3CaO \cdot P_2O_5 - SiO_2 - MgO$ para aplicações biomédicas: processamento e caracterizações estruturais mecânicas e biológicas [tese]. Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2011. DOI 10.11606/T.97.2011.tde-03102012-114712.
19. Santos RBM. Síntese e caracterização de pós nanoestruturados de fosfatos de cálcio e nanocompósitos hidroxiapatita/sílica-gel [dissertação]. Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade do Estado de Santa Catarina, 2009. 95p.
20. Pires, ALR, Bierhalz ACK, Moraes AM. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. *Química Nova* [online]. 2015. [acesso em 2019 set 19]; 38(70):957-71. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422015000700957&lng=en&nrm=iso.
21. De Aza PN, Luklinska, ZB, Martinez A, Anseau MR, Guitian F, De Aza S. Morphological and structural study of pseudowollastonite implants in bone. *Journal of Microscopy*. 2000 Jan; 197(1): 60-7.
22. Yan X, Huang X, Yu C, Deng H, Wang Y, Zhang Z, et al. The in-vitro bio activity of mesoporous bioactive glasses. *Biomaterials*. 2006; 27:3396-403.
23. Factori IM. Processamento e propriedade de compósito de poliamida 6.6 reforçada com partículas de vidro reciclado [dissertação]. Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, 2009.
24. Anjaneyulu U, Sasikumar S. Bioactive nanocrystalline wollastonite synthesized by sol-gel combustion method by using egg shell waste as calcium source. *Bull Mater Sci*. 2014 Apr; 37(2):207-12.
25. Cho JS, Chung C, Rhee S. Bioactivity and osteoconductivity of biphasic calcium phosphates. *Bioceram Dev*. 2011; 1:1-3.
26. Santos LJ, Nunes ECD, Saito NA. Análise das propriedades de compósitos de polipropileno com wollastonita em comparação ao talco. In: 22 CBECiMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais; 2016; Natal: CBECiMat; 2016.
27. Magallanes-Perdoro M, De Aza AH, Carrodegua RD, De Aza S. Estudios "in vitro" de biomateriales de composición eutéctica en el sistema fosfato tricálcico- wollastonita. Madrid: Instituto de Cerámica y Vidrio; 2010.

28. Carrodeguas RG, De Aza AH, Jimenez J, De Aza PN, Pena P, López-Bravo A, et al. Preparation and in vitro characterization of wollastonite doped tricalcium phosphate bioceramics. *Key Engineering Materials*. 2008; 361-363:237-40.
29. De Aza PN, Guitian F, De Aza S. Bioactivity of wollastonite ceramics: in vitro evaluation. *Scripta Metallurgica et Materialia*. 1994;(8);1001-5.
30. Al-Noaman A, Simon CFR, Hill RG. Bioactiveglass-s to ichimetric wollastonite glassalloys to reduce TEC of bioactive glasscoatings for dental implants. *Materials Letters*. 2013;94:69-71.
31. Motisuke M, Santos Veronica R, Bazanini Naiana C, Bertran CA.. Apatite bone cementre in forced with calcium silicate fibers. *Journal of materials science-materials in medicine*. 2014 Oct;25(10): 2357-63.
32. Alonso LM. Avaliação de cimentos ósseos de fosfatos de cálcio com adições de aluminato e silicato de cálcio [doutorado]. Universidade Federal da Bahia, Escola de Engenharia, 2011.
33. De Aza, P, Peña JI, Luklinska ZB, Meseguer-Olmo L. Bioeutectic® ceramics for biomedical application obtained by laser floating zone method. In: vivo evaluation. *Materials*. 2014;7:2395-410.
34. De Aza AH, Velasquez P, Alemany MI, Peña P. In situ bone-like apatite formation from a bioeutectic ceramic in SBF Dynamic Flow. *J Am Ceram Soc*. 2007;90(4):1200-7.
35. Carrodeguas RG, De Aza PN, De Aza. Main contributions to bioceramics. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*. 2011 Nov-Dic; 50(6):301-9.
36. Guastaldi AC, Aparecida AH. Fosfato de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimento. *Quim Nova*, 2010;33(6):1352-8.
37. Gomes LC, Di Lello BC, Campos JB, Sampaio M. *Síntese e caracterização* de fosfatos de cálcio a partir da casca de ovo de galinha. *Cerâmica*. 2012 dez; 58(348):448-52.
38. Tanaka R, Shuiti Yamazaki J, Sendyk WR, Perez Teixeira V, França CM, Incorporação dos enxertos ósseos em bloco: processo biológico e considerações relevantes. *ConScientiae Saúde*, 2008;7(3):323-7.
39. Pires AK, Bierhalz ACK, Moraes, AM. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. *Quim Nova*. 2015;38(7):957-71.
40. Chow LC. Next generation calcium phosphate-based biomaterials. *Dent Mater J*. 2009;28:1-10.
41. Macon ALB, Kim TB, Valliant EM, Goetschius K, Brow RK, Day DE, et al. A unified in vitro evaluation for apatite-forming ability of bioactive glasses and their variants. *J Mater Sci Mater Med*. 2015;26:115 .

42. Domingues JA. Influência dos “whiskerts” de wollastonita em cimento de fosfato de cálcio no comportamento de células osteoblásticas [dissertação]. Instituto de Biologia Universidade Estadual de Campinas, 2013.
43. Bertazzo S, Zambuzzi WF, Campos DDP, Ferreira CV, Bertran CA. A simple method for enhancing cell adhesion to hydroxyapatite surface. Clin. Oral Impl. Res. 2010; 21:1411-1413.
44. Almeida RS. Avaliação da implantação de grânulos de β -TCP associado ou não à biovidro fosfatado para regeneração de defeito ósseo [dissertação]. Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, 2013.
45. Salman SM, Salama SN, Abo-Masollam HA. The crystallization behaviour and bioactivity of wollastonite glass-ceramic based on Na₂O–K₂O–CaO–SiO₂–F glass system. Journal of Asian Ceramic Societies. 2015;3:255- 61.
46. Podporska J, Blazewicz M, Trybalska B, Zych L. A novel ceramic with medical application. Processing and application of ceramics. 2008; 2(1)19-22.
47. Brito IGF, Medeiros KFM, Lourenço JM. Um estudo teórico sobre a sinterização na metalurgia do pó. Holos. 2007; 3(23):204-11.
48. Campos LS, Rosa FP. Avaliação da hidroxiapatita no reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos. Rev Ciênc Méd Biol. 2012 jan-maio;11(2):177-83.
49. Silva SN, Pereira MM. Comparação in vitro da reatividade de diferentes biocerâmicas na forma de pós e grânulos. Coalaob. 2012 ago.
50. Cunha LR, Balducci-Roslindo E, Minarelli-Gaspar AM. Efeito do fosfato tricálcio na reparação de defeito ósseo em tíbias de ratos. Revista de Odontologia da UNESP. 2007;36(4):293-8.
51. Teramoto H, Kawai A, Sugihara S, Yoshida A, Inoue H. Resorption of apatite-wollastonite containing glass-ceramic and β -tricalcium phosphate *in vivo*. Acta Med Okayama, 2005;59(5):201-7.
52. Garzón LB. Estudio histológico de las reacciones biológicas del tejido óseo frente a biomateriales basados en wollastonita [tesis]. Departamento de Anatomía e Histología Humanas, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca, 2012.
53. Tedeja A, Piña C, Martínez S, Avila G. Cerámicas bioeutecticas W-TCP. Revista Mexicana de Física. 2004 abr;50(2):187-92.
54. Barbosa WT, de Almeida KV, de Lima GG, Rodriguez MA, Lia Fook MV, Carrodeguas RG, et al. Synthesis and in vivo evaluation of a scaffold containing wollastonite/ β -TCP for bone repair in a rabbit tibial defect model. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2019 Aug; 8: 1-10. DOI 10.1002/jbm.b.34462.
55. Toby BH, Von Dreele RB. GSAS-II : The genesis of a modern open-source all purpose crystallography software package. Journal of Applied Crystallography [Internet]. Mar 2013

[acesso em 2014 nov 11];46(2):54409. Disponível em: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?aj5212>

ANEXO 1- Aprovação da pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde (ICS)
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICS)



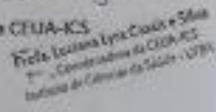
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Análise Histomorfométrica e Caracterização Fisiocoquímica do Composto Wollastonita/TCP após Implantação in vivo para Regeneração Óssea", registrada com o nº 128/2017, sob a responsabilidade de Dra. Fabiana Palm Rosa - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO Instituto de Ciências da Saúde (CEUA-ICS), em reunião de 19/01/2018.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização		01/10/2017 – 01/01/2020
Espécie/linhagem/raça		<i>Rattus norvegicus</i> /Wistar
Número de animais		75
Peso/idade		300 a 450g; 3 a 4 meses
Sexo		Macho
Origem		Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)



Prof. Dra. Luciana Lyra Casais e Silva
Coordenadora da CEUA-ICS



Av. Belator Miguel Calmon S/N - Instituto de Ciências da Saúde - 4º andar, Vale da Carreta CEP 40110-200 - Salvador - Bahia - Brasil - Telefone: 55-(71) 3283-8958 - E-mail: ceua@ufba.br - Site: www.ceua.ufba.br

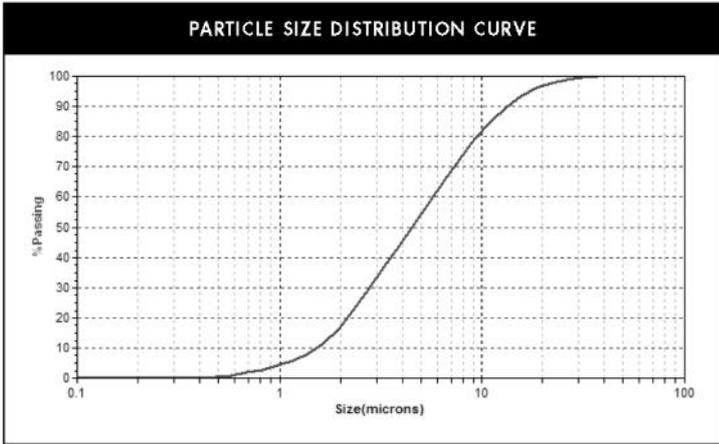
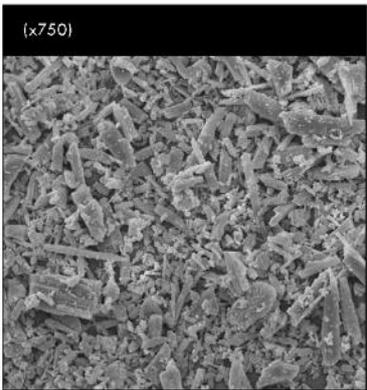
ANEXO 2- Especificação do fabricante da wollastonita utilizada na síntese do compósito.

 Brand of the S&B Group	<h1>Wollastonite</h1> <h2>NYAD[®] M1250</h2>																													
	<ul style="list-style-type: none"> • State-of-the-art processing operations • World-class chemical modification technology • Industry leader • World-wide distribution network • Customer-focused global technical support • Premium quality wollastonite <p>Wollastonite is a naturally occurring mineral, is non-hazardous, and is not regulated by shipping agencies. Based upon toxicological studies, there is no evidence of any significant health risks to workers</p> <p>NORTH AMERICAN OPERATION P.O. Box 368, 803 Mountain View Dr. Willsboro, New York, 12996-0368 USA Tel.: 518-963-4262 Fax: 518-963-1110 ISO 9001/14001 CERTIFIED</p> <p>LATIN AMERICAN OPERATION Hermosillo, Sonora, Mexico Tel.: 52-662-289-1000 Fax: 52-662-289-1090 ISO 9001/14001 CERTIFIED</p> <p>For any further information, please contact: info@nycominerals.com</p> <p><small>This data contains general information and describes typical properties only. It is offered for use by persons qualified to determine for themselves the suitability of our products for particular purposes. No guarantee is made or liability assumed, the application of this data and the products described herein being at the sole risk of the user.</small></p>																													
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>TYPICAL PROPERTIES</th> <th>VALUE</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>APPEARANCE</td> <td>WHITE</td> </tr> <tr> <td>MORPHOLOGY</td> <td>ACICULAR</td> </tr> <tr> <td>MOLECULAR WEIGHT</td> <td>116</td> </tr> <tr> <td>SPECIFIC GRAVITY</td> <td>2.9</td> </tr> <tr> <td>REFRACTIVE INDEX</td> <td>1.63</td> </tr> <tr> <td>pH (10% SLURRY)</td> <td>9.9</td> </tr> <tr> <td>WATER SOLUBILITY (g/100cc)</td> <td>0.0095</td> </tr> <tr> <td>DENSITY (lbs./cu. ft.)</td> <td>181</td> </tr> <tr> <td>BULKING VALUE (gal./lbs.)</td> <td>0.0413</td> </tr> <tr> <td>MOHS HARDNESS</td> <td>4.5</td> </tr> <tr> <td>COEFFICIENT OF EXPANSION (mm/mm/°C)</td> <td>6.5 X 10⁻⁶</td> </tr> <tr> <td>MELTING POINT (°C) - theoretical</td> <td>1540</td> </tr> <tr> <td>MELTING POINT (°C) -by ASTM D1857</td> <td>1410</td> </tr> </tbody> </table>		TYPICAL PROPERTIES	VALUE	APPEARANCE	WHITE	MORPHOLOGY	ACICULAR	MOLECULAR WEIGHT	116	SPECIFIC GRAVITY	2.9	REFRACTIVE INDEX	1.63	pH (10% SLURRY)	9.9	WATER SOLUBILITY (g/100cc)	0.0095	DENSITY (lbs./cu. ft.)	181	BULKING VALUE (gal./lbs.)	0.0413	MOHS HARDNESS	4.5	COEFFICIENT OF EXPANSION (mm/mm/°C)	6.5 X 10 ⁻⁶	MELTING POINT (°C) - theoretical	1540	MELTING POINT (°C) -by ASTM D1857	1410
TYPICAL PROPERTIES	VALUE																													
APPEARANCE	WHITE																													
MORPHOLOGY	ACICULAR																													
MOLECULAR WEIGHT	116																													
SPECIFIC GRAVITY	2.9																													
REFRACTIVE INDEX	1.63																													
pH (10% SLURRY)	9.9																													
WATER SOLUBILITY (g/100cc)	0.0095																													
DENSITY (lbs./cu. ft.)	181																													
BULKING VALUE (gal./lbs.)	0.0413																													
MOHS HARDNESS	4.5																													
COEFFICIENT OF EXPANSION (mm/mm/°C)	6.5 X 10 ⁻⁶																													
MELTING POINT (°C) - theoretical	1540																													
MELTING POINT (°C) -by ASTM D1857	1410																													
	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">CHEMICAL COMPOSITION: CaSiO₃</th> </tr> <tr> <th>COMPONENT</th> <th>TYPICAL VALUE (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>CaO</td> <td>44.94</td> </tr> <tr> <td>SiO₂</td> <td>52.94</td> </tr> <tr> <td>Fe₂O₃</td> <td>0.28</td> </tr> <tr> <td>Al₂O₃</td> <td>0.30</td> </tr> <tr> <td>MnO</td> <td>0.04</td> </tr> <tr> <td>MgO</td> <td>0.75</td> </tr> <tr> <td>TiO₂</td> <td>0.05</td> </tr> <tr> <td>K₂O</td> <td>0.23</td> </tr> <tr> <td>Wt. Loss (1000°C)</td> <td>0.47</td> </tr> </tbody> </table>		CHEMICAL COMPOSITION: CaSiO ₃		COMPONENT	TYPICAL VALUE (%)	CaO	44.94	SiO ₂	52.94	Fe ₂ O ₃	0.28	Al ₂ O ₃	0.30	MnO	0.04	MgO	0.75	TiO ₂	0.05	K ₂ O	0.23	Wt. Loss (1000°C)	0.47						
CHEMICAL COMPOSITION: CaSiO ₃																														
COMPONENT	TYPICAL VALUE (%)																													
CaO	44.94																													
SiO ₂	52.94																													
Fe ₂ O ₃	0.28																													
Al ₂ O ₃	0.30																													
MnO	0.04																													
MgO	0.75																													
TiO ₂	0.05																													
K ₂ O	0.23																													
Wt. Loss (1000°C)	0.47																													
www.nycominerals.com																														

ANEXO 3 - Especificação do fabricante da wollastonita utilizada na síntese do compósito.

 Brand of the S&B Group	Wollastonite
	NYAD® M1250

TYPICAL PROPERTY	TYPICAL VALUE
G. E. BRIGHTNESS	89
OIL ABSORPTION (lbs. /100 lbs.)	27
FINENESS OF GRIND	6
BULK DENSITY	
LOOSE (lbs. /cu.ft.)	39
(g/cc)	0.62
TAPPED (lbs. /cu.ft.)	54.0
(g/cc)	0.87
MEDIAN PARTICLE SIZE (µm) (MICROTRAC)	4
SURFACE AREA (m ² /g) (BET)	3.0
MINUS 400 U. S. MESH SCREEN (%)	100
MOISTURE (%)	0.15



www.nycominerals.com

ANEXO 4- Especificação do fabricante do cálcio de fosfato utilizada na síntese do com Pósito.

SIGMA-ALDRICH

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name: CALCIUM PHOSPHATE
purum p.a., >= 96.0 % KT calc. as $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

Product Number: 21218

Batch Number: BCBM7330V

Brand: Sigma-Aldrich

CAS Number: 7758-87-4

Formula: $\text{Ca}_3\text{O}_8\text{P}_2$

Formula Weight: 310.18

Quality Release Date: 18 MAR 2014

Recommended Retest Date: JAN 2020

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO FAINTLY BEIGE	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER
TITRATION (KT) EDTA 0.1M	96.0 - 104.0 %	97.4 %
REMARKS ON TITRATION	CALC. AS $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	CALC. AS $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
LOSS ON IGNITION	≤ 0.1 %	0.1 %
METAL TRACE ANALYSIS (ICP)	CORRESPONDS TO REQUIREMENTS	PASSED
CADMIUM (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
COBALT (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
COPPER (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
IRON (ICP)	≤ 200 MG/KG	< 200 MG/KG
POTASSIUM (ICP)	≤ 100 MG/KG	< 100 MG/KG
SODIUM (ICP)	≤ 1000 MG/KG	< 1000 MG/KG
NICKEL (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
LEAD (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
ZINC (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
TOTAL SULFUR AS SO_4 (ICP)	≤ 1000 MG/KG	< 1000 MG/KG
CHLORIDE (CL)	≤ 500 MG/KG	< 200 MG/KG
SULFATE (SO_4)	≤ 1000 MG/KG	< 50 MG/KG



Dr. Claudia Geitner
Manager Quality Control
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.



Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós Graduação
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas
Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela. CEP: 40110-100
Salvador, Bahia, Brasil

<http://www.ppgorgsistem.ics.ufba.br>