



**UFPE**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

DÉBORA ANTUNES SILVA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PASTILHAS DE  
HIDROXIAPATITA POROSA IMPREGNADA DE COLÁGENO COMO ENXERTO  
ÓSSEO**

Recife

2022

**DÉBORA ANTUNES SILVA**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PASTILHAS DE  
HIDROXIAPATITA POROSA IMPREGNADA DE COLÁGENO COMO ENXERTO  
ÓSSEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências, Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Morfotecnologia, em 28/02/22.

Área de concentração: Morfologia e Inovações Tecnológicas

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Yara  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Sampaio de Andrade Lima

Recife

2022

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Débora Antunes

Desenvolvimento e caracterização de pastilhas de hidroxiapatita porosa impregnada de colágeno como enxerto ósseo / Débora Antunes Silva. - 2022.

71 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Yara.

Coorientadora: Profa. Dra. Cláudia Sampaio de Andrade Lima.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, Recife, 2022.

Inclui referências e anexos.

1. Biotecnologia. 2. Materiais biomédicos. 3. Biodegradação. I. Yara, Ricardo (orientador). II. Lima, Cláudia Sampaio de Andrade (coorientadora). III. Título.

660.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-108-2022

DÉBORA ANTUNES SILVA

**"DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PASTILHAS DE  
HIDROXIAPATITA POROSA IMPREGNADA DE COLÁGENO COMO ENXERTO  
ÓSSEO"**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Morfotecnologia.

Aprovada em: 28/02/2022

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr Ricardo Yara  
(Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. . Rosa Valeria Da Silva Amorim  
(Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. : Dijanah Cota Machado  
(Examinadora Externa)  
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr : Edson Renan Barros de Santana  
(Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

## **AGRADECIMENTOS**

Após dois anos de esforço e empenho, estou aqui finalizando mais um ciclo em minha vida e gostaria de agradecer a algumas pessoas que fizeram parte desse trajeto e realização de um sonho. Através dessas sinceras palavras agradeço a Deus por não me deixar fraquejar, nem desistir e por tudo o que sou e tenho. Minha enorme gratidão à minha família, à minha mãe lêda pelas palavras de apoio e por sempre me passar calma e confiança.

Ao meu pai Jefferson, é quase inefável esse agradecimento, pois, foi através de sua dedicação, esforço e conhecimento que me apoiou e ajudou em inúmeras etapas da minha dissertação, sem ele eu não estaria aqui finalizando essa etapa. Obrigada por não desistir de mim. Agradeço aos amigos Marília, Paula e Hugo pelo ombro amigo e conselhos frente às dificuldades e por vibrarem junto comigo a cada conquista.

Sou muito agradecida ao meu orientador Ricardo e coorientadora Cláudia pela confiança e por acreditarem no meu projeto. Gratidão ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da UFPE e aos professores de dentro e fora do programa pelos ensinamentos. Sinto-me imensamente grata ao universo pela oportunidade de realizar mais uma pós-graduação e que mesmo com falhas, sei que dei o meu melhor e estou com o sentimento de dever cumprido.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,  
mas, pensar o que ninguém ainda pensou sobre  
aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

## RESUMO

O enxerto ósseo autólogo é considerado a melhor opção entre os demais tipos, pois, utiliza osso do próprio paciente, sendo considerado padrão ouro para regeneração, segurança e eficácia. Entretanto, possui limitações relacionadas à quantidade de material disponível para a enxertia. A hidroxiapatita tem sido empregada cada vez mais na medicina e odontologia como opção por ser um biomaterial que induz a osteogênese, característica relevante para a substituição de ossos autólogos. Este trabalho pretende obter pastilhas de hidroxiapatita porosa, confeccionadas a partir de uma tecnologia inovadora, utilizando micro-ondas e impregnada de colágeno parcialmente hidrolisado (gelatina). O objetivo é desenvolver um biocompósito para ser utilizado como enxerto sintético e facilitar a proliferação celular. A hidroxiapatita foi sintetizada por adição de ácido fosfórico sobre uma solução de cloreto de cálcio, transformada em pó cerâmico por aquecimento a 600 °C, impregnada com citrato de cálcio e posteriormente impregnada com colágeno parcialmente hidrolisado. Foram preparadas pastilhas porosas do biocompósito por fusão em moldes de gesso onde foi utilizada energia de micro-ondas para desidratação e renaturação das fibras de colágeno parcialmente hidrolisado. As hidroxiapatitas foram submetidas a análises por difração de raios X e espectroscópicas por FTIR, antes e após incorporação de citrato de cálcio e colágeno, para caracterização do biomaterial obtido. De acordo com o que apresentaram os espectros de FTIR das amostras dos compósitos de hidroxiapatita / citrato de cálcio, não foi possível avaliar a interação entre as estruturas cristalinas do citrato de cálcio com a hidroxiapatita. O espectros de FTIR das amostras dos compósitos de hidroxiapatita (Rota 1) / gelatina sugere o encapsulamento de parte das partículas da hidroxiapatita pela gelatina. O Difratoograma de Raios X do precipitado calcinado obtido pela rota de síntese 3 apresentou perfil cristalográfico similar ao padrão ICSD-26204.

**Palavras-chave:** Materiais Biocompatíveis; Hidroxiapatita; Implantes Biodegradáveis; Osteogênese.

## ABSTRACT

The autologous bone graft is considered the best option among the other types, as it uses the patient's own bone, being considered the gold standard for regeneration, safety and efficacy. However, it has limitations related to the amount of material available for grafting. Hydroxyapatite has been increasingly used in medicine and dentistry as an option for being a biomaterial that induces osteogenesis, a relevant characteristic for the replacement of autologous bones. This work intends to obtain porous hydroxyapatite tablets, made from an innovative technology, using microwave and impregnated with partially hydrolyzed collagen (gelatin). The goal is to develop a biocomposite to be used as a synthetic graft and facilitate cell proliferation. Hydroxyapatite was synthesized by adding phosphoric acid over a calcium chloride solution, transformed into ceramic powder by heating at 600 °C, impregnated with calcium citrate and subsequently impregnated with partially hydrolyzed collagen. Porous pellets of the biocomposite were prepared by fusion in plaster molds where microwave energy was used for dehydration and renaturation of the partially hydrolyzed collagen fibers. The hydroxyapatites were submitted to X Ray Diffraction and FTIR spectroscopic analysis, before and after incorporation of calcium citrate and collagen, to characterize the biomaterial obtained. According to what presented the FTIR spectra of the samples of the composites of hydroxyapatite / calcium citrate, it was not possible to evaluate the interaction between the crystal structures of the calcium citrate with the hydroxyapatite. The FTIR spectra of the samples of the hydroxyapatite composites (Route 1) / gelatin suggests the encapsulation of part of the hydroxyapatite particles by gelatin; The X Ray Diffractogram of the calcined precipitate obtained by Synthesis route 3 presented a crystallographic profile similar to the ICSD-26204.

**Keywords:** Biocompatible materials; Hydroxyapatite; Biodegradable implants; Osteogenesis

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - MEV estrutura mesoporosa de espuma de hidroxiapatita	21
Figura 2 - Representação da técnica de modelagem por gelcasting	22
Figura 3 - Célula hexagonal de HAp contendo íons $\text{Ca}^{+2}$ ligados ao fosfato	23
Figura 4 - Representação esquemática das fibras de colágeno (tropocolágeno)	26
Figura 5 - Representação da desnaturação/renaturação do colágeno	27
Figura 6 - Representação das estruturas que formam as fibras de colágeno	29
Figura 7 - Estrutura hierárquica do osso em várias escalas de comprimento	31
Figura 8 - Esquema do experimento de hidroxiapatita	39
Figura 9 - Corpos de prova do compósito de hidroxiapatita/gelatina	41
Figura 10 - Forno de micro-ondas do Laboratório LBQ – UFPE	42
Figura 11 - Forno de micro-ondas do Laboratório LBQ – UFPE	42
Figura 12 - Máquina universal de ensaio do LEB – UFPE	43
Figura 13 - Avaliação das hidroxiapatitas hidratada	46
Figura 14 - Avaliação das hidroxiapatitas calcinada	46
Figura 15 - Espectro de FTIR dos compósitos de hidroxiapatita : citrato	47
Figura 16 - Avaliação dos compósitos de hidroxiapatita : colágeno	48
Figura 17 - Difração de Raios-X das hidroxiapatitas hidratadas - Rotas 1, 2 e 3	49
Figura 18 - Perfil cristalográfico da hidroxiapatitas calcinadas a 600 °C - Rota 3	50
Figura 19 - Difração de Raios-X das hidroxiapatitas calcinadas / citrato de cálcio	50
Figura 20 - Tensões complexas desenvolvidas em uma carga de compressão	51
Figura 21 - Ensaio de resistência mecânica a compressão	52
Figura 22 - Corpos de prova após o ensaio de resistência mecânica a compressão	53
Figura 23 - Curva de tensão com região de adensamento de poros	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Utilizações clínicas de biocerâmicas	24
Tabela 2 - Fosfatos de cálcio em sistemas biológicos	25
Tabela 3 - Condições de síntese de hidroxiapatita e rendimento	45
Tabela 4 - Resultado do ensaio de resistência a compressão	53
Tabela 5 - Resultado do ensaio de aquecimento em forno de micro-ondas	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCP	FOSFATO DE CÁLCIO BIFÁSICO
BMP'S	PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA
B-TCP	BETA FOSFATO TRICÁLCICO
CA/P	RAZÃO CÁLCIO/FOSFORO
CHO	CHINESE HAMSTER OVARY
CP	FOSFATO DE CÁLCIO
DRX	DIFRAÇÃO DE RAIOS X
FHAP	FLUORAPATITA
FTIR	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO
HAP	HIDROXIAPATITA
HAP-OH	HIDROXIAPATITA HIDRATADA
IGF	FATOR DE CRESCIMENTO INSULÍNICO
IL-1	INTERLEUCINA 1
IL-2	INTERLEUCINA 2
ISO	INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION
SPS	PLASMA DE FAÍSCA
TCP	FOSFATO TRICÁLCICO
TGF-B	FATOR DE TRANSFORMAÇÃO DO CRESCIMENTO BETA
P.A	PARA ANÁLISE
PCL	POLICAPROLACTONA
PDGF	FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS
PH	POTENCIAL HIDROGENIÔNICO
PLGA	ÁCIDO POLILÁTICO-CO-GLICÓLICO
PLLA	ÁCIDO POLI-L-LÁCTICO
PU	POLIURETANO
MEV	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2 OBJETIVOS</b>	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b>	17
3.1 BIOMATERIAIS	17
3.2 BIOCERÂMICAS	19
3.3 FOSFATOS DE CÁLCIO E HIDROXIAPATITA	22
3.4 COLÁGENO	25
3.5 TECIDO ÓSSEO	29
3.6 TÉCNICA DE MICRO-ONDAS	32
3.7 RESPOSTA BIOLÓGICA	35
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	36
4.1 PREPARAÇÃO DO PÓ DE HIDROXIAPATITA – ROTA 1	36
4.2 PREPARAÇÃO DO PÓ DE HIDROXIAPATITA – ROTA 2	37
4.3 PREPARAÇÃO DO PÓ DE HIDROXIAPATITA – ROTA 3	37
4.4 PREPARAÇÃO DO COMPÓSITO DE HIDROXIAPATITA/CITRATO	40
4.5 PREPARAÇÃO DOS CORPOS DE PROVA DO COMPÓSITO	40
4.6 TRATAMENTO TÉRMICO UTILIZANDO MICRO-ONDAS	41
4.7 CARACTERIZAÇÃO	42
<b>4.7.1 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)</b>	42
<b>4.7.2 Difração de Raios X</b>	42
<b>4.7.3 Resistência mecânica a compressão</b>	43
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	45
5.1 SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA	45

5.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (FTIR)	46
5.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)	49
5.4 RESISTÊNCIA MECÂNICA A COMPRESSÃO	51
<b>6 CONCLUSÃO</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>59</b>
<b>ANEXO A - FOLHA DE SUBMISSÃO DE ARTIGO</b>	<b>71</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos 40 anos, o desenvolvimento de novos materiais para uso biomédico apresenta-se como uma das áreas mais promissoras da pesquisa científica. Este movimento se deve principalmente a dois fatores: forte demanda da sociedade urbana por novas terapias para o tratamento de doenças degenerativas, traumas e tumores; e ao rápido desenvolvimento de novas técnicas de produção e caracterização das propriedades físico-químicas e biológicas de biomateriais (YANG et al., 2011).

Os Biomateriais, particularmente os substitutos ósseos utilizados em cirurgia ortopédica, traumatológica e maxilofacial, podem ser obtidos de origem natural ou sintética e utilizados com o objetivo de tratar, aumentar ou restabelecer a função de qualquer tecido biológico que tenha sido lesionado ou perdido (GUTIERRES et al., 2006). Eles são classificados de acordo com a sua origem, mecanismo de ação e comportamento fisiológico. Os biomateriais devem ser inertes do ponto de vista farmacológico, não causar modificações físicas no tecido onde estão sendo inseridos, nem causar reações alérgicas ou tipo corpo estranho, além de poderem ser obtidos em quantidades e formas necessárias para o preenchimento do defeito a ser corrigido, apresentando também propriedades biomecânicas, biológicas e físico-químicas apropriadas (DIAS, 2014). Ademais, devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros, de modo a estimular uma resposta adequada. Os biomateriais sintéticos utilizados para estes fins podem ser metálicos, poliméricos, compósitos, cerâmicos ou vidros bioativos (KAWACHI, 2000).

Devido à sua similaridade química e estrutural com a fase mineral presente em ossos e dentes, a hidroxiapatita é o principal material de escolha para a reposição do tecido ósseo em aplicações médicas, ortopédicas e odontológicas, como recobrimento ou materiais densos. Trata-se de um material que apresenta ausência de toxicidade local e sistêmica, ausência de respostas inflamatórias e aparente habilidade em se ligar ao tecido hospedeiro (GUASTALDI; APARECIDA, 2010). Porém, os biocompósitos produzidos com pós de hidroxiapatita apresentam fracas propriedades mecânicas que limitam seu uso em aplicações de suporte de

carga. A síntese de corpos cerâmicos de hidroxiapatita de alta densidade é uma maneira de superar essa limitação (HENCH, 1991).

Há quase um século a humanidade tem conhecimento da susceptibilidade biológica das apatitas. Em 1969 alguns pesquisadores na Flórida propuseram um vidro bioativo inspirado na liberação de Cálcio (Ca) e Fósforo (P) que promoveria a ligação do vidro com o osso (HENCH, 1991; RATNER, et al., 1996).

Os biomateriais para enxertia participam de processos de modelagem, remodelagem e reparação do tecido ósseo a ser formado e podem ser classificados como osteogênicos, osteoindutores e osteocondutores. Os osteogênicos são materiais orgânicos capazes de estimular a formação de osso diretamente a partir de osteoblastos. Os osteoindutores são aqueles capazes de induzir a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos ou condroblastos, aumentando a formação óssea no local ou mesmo estimular a formação de osso em um sítio heterotópico (URIST, 1965; URIST et al., 1985). Os materiais osteocondutores (geralmente inorgânicos) permitem o crescimento de um novo tecido ósseo na sua superfície, requerendo a presença de tecido ósseo pré-existente como fonte de células osteoprogenitoras (MASTERS, 1988).

A síntese de uma mistura de Fosfato Tricálcio ( $\beta$ -TCP) e hidroxiapatita (HAp), chamada de Fosfato de Cálcio Bifásico (BCP) foi desenvolvida há cerca de cinquenta anos por grupos de pesquisa, que estudavam formas de viabilizar comercialmente produtos contendo HAp, para procedimentos médicos reparadores ou para substituição óssea. O BCP é um material bioativo, biocompatível com tecidos duros, moles e cartilagosos, podendo ser empregado em diferentes tecidos do corpo humano (ósseo, cartilaginoso, conjuntivo e muscular). O mecanismo fundamental de bioatividade do BCP envolve a dissolução, seguida da reprecipitação em forma de uma hidroxiapatita carbonatada (DACULS, 2003).

O osso mineralizado consiste em uma matriz de proteína que compreende predominantemente, mas não exclusivamente, fibras de *colágeno tipo I* que são dispostas em camadas e em feixes lineares orientados. Este andaime de matriz de proteína é revestido com uma camada de mineral, predominantemente Fosfato de Cálcio (CP) na forma de cristais de hidroxiapatita (WEINER, 1992; WEITZMANN, 2013). Os biomateriais a base de colágeno associados à hidroxiapatita, apresentam resultados promissores, pois essa associação intensifica a biomecânica e a

bioatividade devido à semelhança estrutural com a matriz extracelular óssea (KANE et al., 2015), fornecendo assim suporte para adesão e proliferação dos osteoblastos e células mesenquimais indiferenciadas (KANE et al., 2015). Além disso, estudos demonstram que a união desses biocompostos apresenta a capacidade de induzir a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos (LYONS et al., 2013; LYONS et al., 2014, MURPHY et al., 2014). Essa capacidade de induzir a osteogênese na ausência da adição de fatores de crescimento ainda não está bem compreendida (KIKUCHI, 2013).

O enxerto ósseo autólogo é considerado padrão ouro em termos de regeneração, segurança e eficácia, fornecendo substrato para novas células osteogênicas, assim permitindo a cicatrização e remodelagem do osso lesado (GÓMEZ-BARRENA et al., 2011). No entanto, a técnica induz dor, potencial infecção e limitação do volume ósseo doador, além de integração incompleta do osso enxertado (DELLOVE et al., 2007). Neste sentido, biomateriais porosos estão sendo sintetizados para atuar como matrizes em que os tecidos adjacentes os envolvam e cresçam, permitindo a proliferação celular, reparo e regeneração tecidual, sejam estes de natureza óssea, muscular, endotelial ou vascular (HUBBELL, 1995; CONSTANTINO, 1994).

Portanto, um dos grandes desafios para a medicina regenerativa e para o sistema de saúde é o de desenvolver materiais biomiméticos para procedimentos em neurocirurgia, ortopedia, implantodontia e cirurgia buco-maxilo-facial com eficiência igual ou superior ao enxerto autólogo (CALAZANS-MAIA et al., 2017).

Desta forma, o objeto deste trabalho é verificar a viabilidade da obtenção de pastilhas de um biocompósito poroso com alta resistência mecânica, utilizando pós cerâmicos de hidroxiapatita obtidos pelo processo de co-precipitação, impregnada com colágeno parcialmente hidrolisado (gelatina), solidificada e insolubilizada por tratamento térmico utilizando micro-ondas, para obter um substrato que facilite o crescimento de novas células osteogênicas no local do enxerto, que permita a cicatrização e a remodelagem de ossos lesados.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Obter pastilhas porosas de alta resistência mecânica com um biocompósito de pós de hidroxiapatita obtida por co-precipitação, impregnado com colágeno parcialmente hidrolisado para uso em enxertia óssea como suporte de adesão e proliferação celular.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter pó de hidroxiapatita cristalizado com tamanho de partículas uniforme;
- Avaliar os métodos para conformação de corpos cerâmicos verdes e selecionar o mais adequado para a obtenção de pastilhas porosas de um biocompósito a partir de pós de hidroxiapatita;
- Avaliar e selecionar o método de secagem adequado para a obtenção de pastilhas porosas do biocompósito sem defeitos estruturais;
- Avaliar o tempo de aquecimento em micro-ondas para a obtenção de pastilhas porosas do biocompósito de hidroxiapatita com boa resistência mecânica e insolúveis em água;
- Realizar ensaios de impregnação de colágeno parcialmente hidrolisado para obtenção das pastilhas porosas do biocompósito de hidroxiapatita;
- Caracterizar o biocompósito quanto à morfologia, estrutura, porosidade e resistência mecânica.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 BIOMATERIAIS

Avanços significativos na ciência de biomateriais permitiram o desenvolvimento de novos substitutos biológicos para a engenharia de tecidos. O design e a fabricação do arcabouço têm papéis essenciais no projeto de biomateriais, medicina regenerativa e engenharia de tecidos. Os biomateriais são estruturas ou andaimes sintéticos que permitem o crescimento de células em implantes fisiologicamente funcionais (ARTAS et al., 2018).

Os materiais biológicos, como enxertos de origem autógena (retirada do próprio indivíduo), têm sido utilizados a cada ano mais de 2 milhões de cirurgias ortopédicas (CALORI et al., 2011) e é considerado o padrão ouro para uso como biomaterial, graças às propriedades favoráveis (osteogênese, osteocondução e osteoindução), além de oferecer baixo risco de rejeição (ARTAS et al., 2018). Contudo, o enxerto autógeno apresenta certas limitações, como a localização de retirada do enxerto, extensão do enxerto e tamanho do defeito a ser reparado. Para superar tais limitações, os materiais sintéticos têm sido empregados como substitutos para restauração de tecido ósseo, podendo até reduzir ou suspender o uso do material de origem biológica (FILHO, et al., 2007; SILVA, et al., 2011; LIMA, et al., 2011, OCAK et al., 2017).

Os biomateriais são materiais que podem ter origem natural ou sintética, têm sido empregados como dispositivos que entram em contato com o tecido biológico, objetivando reparar perdas teciduais, processos de degeneração ou funções perdidas por traumatismo. Pesquisas apontam efeitos benéficos desses materiais, apesar de serem comuns às respostas imunológicas do receptor, em maior ou menor grau (HENKEL, 2013).

Um dos primeiros polímeros usados como biomaterial para engenharia de tecido ósseo foi baseado em um copolímero hidrolítico de ácido polilático-co-glicólico (PLGA), mas seu uso para regeneração de grandes defeitos ósseos foi controverso, pois eventos inflamatórios foram observados (CHANG et al., 2013; BALDWIN et al., 2019). Outros relatos da utilização de materiais cerâmicos, classificados como biomateriais, foi por Albee em 1930, onde foi utilizada uma cerâmica a base de

fosfato tricálcico para regeneração de tecido ósseo e neoformação óssea (ALBEE, 1930). Apenas 50 anos depois surgiram inúmeros tipos de cerâmicas a partir do fosfato de cálcio, como exemplo os materiais de implante em cirurgias na área de medicina e odontologia. Inventar um andaime que imita de perto o osso natural em estrutura, função e propriedades mecânicas pode ter enormes implicações clínicas. A pesquisa associada à necessidade clínica em dispositivos de implante ósseo melhorou nossa compreensão da biologia da substituição óssea, permitindo uma seleção, projeto e montagem mais informados de andaimes biocompatíveis ( BISHT et al., 2021).

As biocerâmicas e pós cerâmicos são materiais que incluem Alumina, Zircônia, Vidros Bioativos, Vitrocerâmicas, Hidroxiapatita (HAp), Fosfato Tricálcico (TCP), Fosfatos de Cálcio reabsorvíveis, entre outros. Os pós cerâmicos de Fosfato de cálcio têm sido usados na odontologia para preencher defeitos ósseos, materiais de reparo radicular, materiais de preenchimento apical, selagem de perfurações, como cimentos endodônticos e como auxiliares na regeneração, com certas vantagens como biocompatibilidade, estabilidade dimensional e ausência de toxicidade. Eles têm uma compatibilidade com a hidroxiapatita óssea, uma atividade osteocondutora intrínseca e têm uma capacidade de induzir respostas regenerativas no corpo humano. Em Endodontia, podem ser amplamente classificados em Fosfato de Cálcio / Tricálcio / Base de Hidroxiapatita, Base de Silicato de Cálcio ou misturas de Silicato de Cálcio e Fosfatos (RAGHAVENDRA et al., 2017).

Além dos biomateriais cerâmicos, alguns materiais têm sido utilizados na fabricação de arcabouços, como os polímeros sintéticos: polietileno, policaprolactona (PCL), ácido poli-L-láctico (PLLA), esponjas de poli epsilon-caprolactoneco-L-lactídeo (ROSETI et al., 2017; SOKOLOVA et al., 2020) e polímeros naturais como o alginato, colágeno, elastina, glicosaminoglicano, quitosana e ácido hialurônico (DAMADZADEH et al., 2010; GHAHRAMANPOOR et al., 2011; SOHN, 2019). Este arcabouço desempenha um papel importante na neoformação óssea, para isso, é preciso cumprir alguns requisitos, como ter uma alta porosidade, tamanho de poros adequados, superfícies pertinentes para a adesão celular, diferenciação, proliferação, bem como ser biocompatível e integral para manter a estrutura de tecido premeditado. É necessário também que o

biomaterial seja reabsorvível, para evitar um segundo acesso cirúrgico (WANG et al., 2007; VAN DER STOCK et al., 2011).

Os biomateriais de enxertia participam na atividade de modelagem, remodelagem e reparação óssea a ser formado e estimulado. Para exercer a função regenerativa, qualquer tipo de enxerto deve possuir uma das três características para obter osso neoformado, sendo um deles o processo de osteogênese que consiste na formação e desenvolvimento ósseo, levando a formação de osso em tecido mole ou ativando o crescimento ósseo pré-existente. Há também a atividade da osteoindução, capaz de estimular a osteogênese, podendo ativar o processo regenerativo ósseo e a atividade osteocondutora que permite a agregação de um novo tecido ósseo na sua superfície. Contudo, é necessário haver a presença de tecido ósseo pré-existente como fonte de células osteoprogenitoras (KRISCHELDORF, 2009; ROSETI et al., 2017).

Biomateriais a partir do fosfato de cálcio estão entre os mais utilizados na reposição e regeneração óssea por apresentarem boas propriedades como a baixa toxicidade e baixa resposta inflamatória. Os fosfatos de cálcio são utilizados de formas variadas, sendo elas em reparos ósseos e em associação com biopolímeros como o colágeno. (RODELLA et al., 2011). Dentre os fosfatos cálcicos, a hidroxiapatita é o biomaterial que possui uma baixa taxa de biodegradação em solução aquosa e é o principal mineral que constitui ossos e dentes. A hidroxiapatita vem sendo vastamente estudada e aplicada em cirurgias reparadoras, e apresenta resultados animadores (PIGOSSI et al., 2015).

### 3.2 BIOCERÂMICA

Desde os anos 20 que os materiais biocerâmicos têm demonstrado grande interesse, mostrando benefícios na restauração da função e estética em áreas de perda de tecido ósseo (ESTEVES, 2014). Segundo Dorozhkin (2015), após o desenvolvimento inicial da biocerâmica, que era apenas tolerada no ambiente fisiológico, um novo conceito de biocerâmica regenerativa foi desenvolvido e tais formulações tornaram-se parte integrante da abordagem da engenharia de tecidos. Estruturas porosas baseadas em fosfatos de cálcio foram projetadas para induzir a formação e vascularização óssea e capazes de abrigar várias biomoléculas e/ou

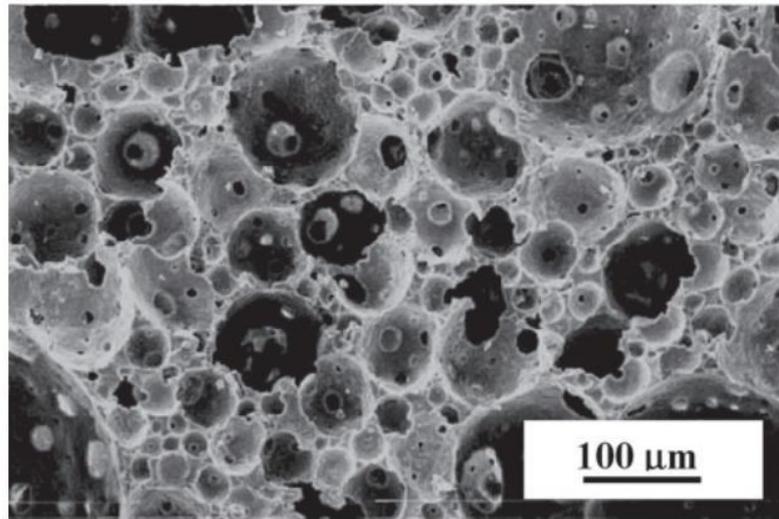
células, onde foi dado ênfase para as formulações capazes de formar ligações químicas diretas com os ossos adjacentes. Posteriormente, pelos controles estruturais e composicionais, tornou-se possível verificar se os implantes à base de  $\text{CaPO}_4$  permaneciam biologicamente estáveis uma vez incorporados à estrutura esquelética ou se eram reabsorvidos com o tempo. As aplicações biomédicas de biocerâmicas à base de  $\text{CaPO}_4$  incluem aumentos ósseos, enxertos ósseos artificiais, reconstrução maxilofacial, fusão espinhal, reparos de doenças periodontais e preenchimentos ósseos após cirurgia de tumor (DOROZHKIN, 2015).

Os materiais sintéticos para enxertia geralmente se integram mal ao tecido do hospedeiro e falham com o tempo devido ao desgaste e fadiga ou resposta corporal adversa (HOLLISTER, 2005; ORWOLL, 2017). Além disso, todos os implantes ortopédicos modernos precisam ter três das habilidades mais críticas dos tecidos vivos: promover auto reparação, manter a manutenção do suprimento de sangue e auto modificar sua estrutura e propriedades em resposta a aspectos externos, como uma carga mecânica (JONES; HENCH, 2003). Os ossos não apenas possuem todas essas propriedades, mas, além disso, são autogerados, hierárquicos, multifuncionais, não lineares, compostos e biodegradáveis; portanto, os enxertos ósseos artificiais ideais devem possuir propriedades semelhantes (VALLET-REGÍ e GONZÁLEZ-CALBET, 2004; NETO e FERREIRA, 2018).

Para atingir o objetivo de reconstrução de tecido ósseo, os materiais para enxertia devem atender a uma série de requisitos específicos, tais como uma rugosidade superficial para facilitar a semeadura e a fixação de células (HOLTHAUS et al., 2013); uma resistência mecânica e rigidez suficientes para se opor às forças de contração e, posteriormente, para a remodelação de tecidos danificados (VITALE-BROVARONE et al., 2009); uma alta porosidade e dimensões de poro adequadas para permitir a migração celular, a vascularização, bem como a difusão de nutrientes (ROSETI et al., 2017).

Para permitir o crescimento adequado do tecido, vascularização e distribuição de nutrientes, esses materiais devem ter uma rede porosa altamente interconectada, formada por uma combinação de macro e microporos (Figura 1), em que mais de 60% dos poros devem ter um tamanho variando de 100  $\mu\text{m}$  a 400  $\mu\text{m}$  e pelo menos 20% deve ser menor que 20  $\mu\text{m}$  (DOROZHKIN, 2015).

Figura 1 – MEV estrutura mesoporosa de espuma de hidroxiapatita.



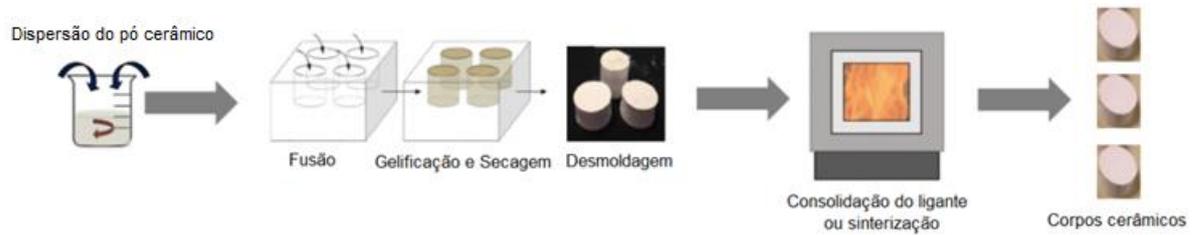
Fonte: adaptado de SEPULVEDA, 2002.

A fabricação de estruturas porosas é uma tarefa desafiadora em que vários métodos são utilizados e que podem ser diferenciados em termos de morfologia, tamanho e fração volumétrica de poros dos produtos e, conseqüentemente, de suas propriedades (REZWAN et al., 2006). O funcionamento regenerativo da hidroxiapatita nos tecidos em estruturas de implantes depende de vários parâmetros mecânicos, estruturais, morfológicos, químicos e biológicos (AQUINO-GUERRA e LINHARES, 2020).

De uma maneira geral, a obtenção de cerâmicas porosas segue algumas rotas clássicas, das quais podem ser citadas: queima de partículas orgânicas, réplica, *gelcasting* de espumas cerâmicas e fundição em moldes (Figura 2), eletrofiliação, separação de fase, separação de fase por indução térmica, impregnação de espumas de Poliuretano (PU), fusão por extrusão, forjamento, prensagem a frio ou a quente, espuma de gás supercrítico, sinterização etc. (ROMANO; PANDOLFELLI, 2006; BIGGEMANN et al., 2021).

O *gelcasting* de espumas cerâmicas consiste basicamente na produção de uma suspensão cerâmica com monômeros vinílicos, di-vinílicos, proteínas, colágeno parcialmente hidrolisado ou polímeros que polimerizam *in situ*, consolidando em seguida o material (ORTEGA et al., 2000).

Figura 2 – Representação da técnica de modelagem por gelcasting .



**Fonte:** Adaptado de HOOSHMAND, 2019.

O processo gelcasting tem demonstrado uma grande superioridade na produção de materiais cerâmicos com elevada resistência a verde<sup>1</sup>. Este processo foi inicialmente aplicado a produção de materiais de alta densidade e se baseia na introdução de monômeros orgânicos a uma suspensão aquosa do pó cerâmico, que através da polimerização *in situ* produzem um reticulado tridimensional que consolida a matriz cerâmica (ROMANO; PANDOLFELLI, 2006).

### 3.3 FOSFATO DE CÁLCIO E HIDROXIAPATITA

Os fosfatos de cálcio são constituídos por três elementos químicos principais: cálcio, fósforo e oxigênio, além do hidrogênio que também pode ser encontrado como constituinte do ânion. As proporções entre estes elementos e o grau de hidratação geram uma série de compostos que são classificados a partir do ânion fosfato presente como orto ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), meta ( $\text{PO}_3^{1-}$ ), piro ( $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ ) e polifosfatos [ $(\text{PO}_3)^n$ ]. Os ânions multivalentes são identificados pelo número de íons hidrogênio ligados como o mono- $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2]$ , di- ( $\text{CaHPO}_4$ ), tri-  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$  e tetra- ( $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ) fosfato de cálcio, onde os prefixos —mono, —di, —tri e —tetra indicam o número de íons hidrogênio que foram substituídos pelo íon cálcio (DOROZHKIN, 2011).

Os fosfatos de cálcio naturais ou sintéticos abrangem uma ampla família de materiais cerâmicos, e se destacam entre os biomateriais e biocerâmicas por serem biocompatíveis e disponibilizarem íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e hidrogeno fosfato ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) quando em contato com os tecidos vivos (EPPLÉ et al., 2010; MAWUNTU e YUSUF, 2019).

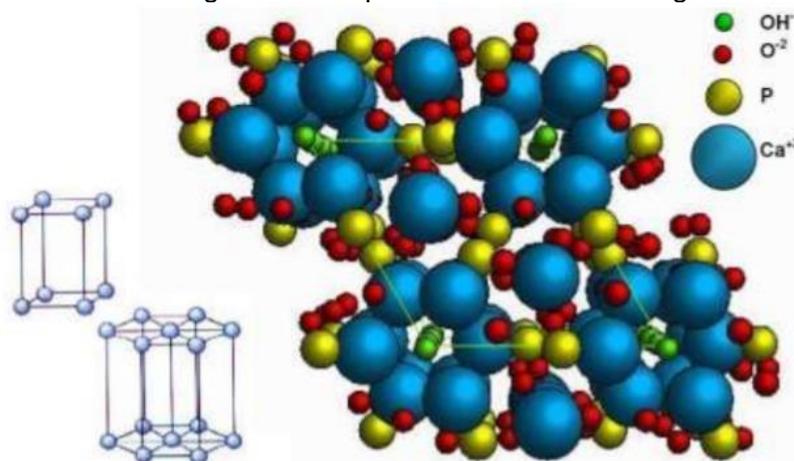
<sup>1</sup> Corpos Cerâmicos Verde é um termo utilizado para se referir a peças moldadas, seca ao ar sem tratamento térmico de sinterização.

As biocerâmicas são classificadas de acordo com sua interação com os tecidos, como bioinertes ou bioativas, sendo as últimas subdivididas em reabsorvíveis ou não reabsorvíveis (MACHADO, 2019). Os materiais bioinertes não formam ligações bioquímicas interfaciais com os tecidos com os quais estão em contato, não apresentando quase nenhuma influência sobre eles; já os bioativos possuem essa habilidade de ligação interfacial ao tecido ósseo, como é o caso da hidroxiapatita e dos biovidros (YELTEN, 2011).

Os materiais bioativos são aceitos pelo tecido hospedeiro e não produzem reações tóxicas ou nocivas. As características dos materiais reabsorvíveis possibilitam aplicações de preenchimento de cavidades ósseas, servindo como suporte e condutor ósseo. Esses materiais, quando implantados, são absorvidos e transformados naturalmente em novo tecido ósseo.

Os suportes de fosfato de cálcio são considerados como material interessante, pois são bioativos e auxiliam na adesão e proliferação celular, apesar de possuírem baixa resistência mecânica. As biocerâmicas de fosfato de cálcio são caracterizadas pela estabilidade química, pureza elevada, homogeneidade, distribuição de fases, tamanho e forma do grão, cristalinidade, tamanho de poros e distribuição uniforme de porosidade. Fazem parte do grupo de materiais bioativos a hidroxiapatita (HAp - Figura 3),  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  e a fluorapatita (FHAp),  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_3\text{F}_2$  (PRAKASAN et al., 2015; ORYAN et al., 2017).

Figura 3– Célula hexagonal de HAp contendo íons  $\text{Ca}^{+2}$  ligados ao fosfato



**Fonte:** Adaptado de BATISTA, 2016.

A hidroxiapatita é um mineral de origem natural encontrado em ossos e dentes, apresenta excelentes propriedades como a biocompatibilidade, a

osteointegração, e a capacidade de absorver moléculas, podendo ser utilizado como substituto ósseo humano em próteses e implantes (RUFFINI et al., 2018). A Tabela I apresenta algumas das utilizações clínicas das biocerâmicas. A estrutura deste biomaterial é similar a fluorapatita (com o grupo  $\text{OH}^{1-}$  ocupando os sítios do  $\text{F}^{1-}$ ) (LOGAN, 1995), esses minerais constituem em vários tipos de rochas ígneas e metamórficas, especificamente em calcários cristalinos (ELLIOT, 1994).

Tabela 1 – Utilizações clínicas de Biocerâmicas

<b>APLICAÇÕES CLÍNICAS</b>	<b>BIOCERÂMICAS</b>
Ortopédica	Alumina, Zircônia ou Vidros bioativos
Preenchimento de espaços ósseos	Fosfato de cálcio, Fosfato Tricálcico
Implantes dentários	Alumina, Hidroxiapatita, Vidros bioativos
Obliteração de bolsa periodontal	Hidroxiapatita, Fosfato de cálcio, tricálcico
Rebordo alveolar em ossos maxilar	e Vidros bioativos Hidroxiapatita, Ossos autógenos e Vidros bioativos
Reconstrução maxilofacial	Hidroxiapatita, Alumina, Compósitos PE-Hidroxiapatita, Vidros bioativo
Otorrinolaringologia	Hidroxiapatita, Alumina, Compósitos PE-Hidroxiapatita, Vidros bioativo

**Fonte:** Adaptado de BONAN, 2014

Os fosfatos de cálcio, principalmente a hidroxiapatita, constituem-se como os maiores componente do tecido duro humano e de sistemas biológicos, como mostra a Tabela 2, com até 69% da massa óssea natural (BEST, 2008; NETO e FERREIRA, 2018), além de diferentes proporções, os tecidos dentários, representado até 96% do esmalte, 45% da dentina na forma de apatita carbonatada nanocristalina e 65% do cimento (CHEN et al., 2008; FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

Tabela 2 – Fosfatos de cálcio em sistemas biológicos.

Fosfato de Cálcio	Fórmula Química	Ocorrência
Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Esmalte, dentina, cálculo renal, osso
Fluorapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{F})_2$	Esmalte, dentina, cálculo renal, osso
Cloroapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{Cl})_2$	Esmalte, dentina, cálculo renal, osso
Fosfato de cálcio anidro	$\text{CaHPO}_4$	Tártaro e osso Decompostos
Fosfato de cálcio diidratado	$\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Tártaro e osso Decompostos
Fosfato tricálcico	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Cálculo dental e renal, pedras salivares
Fosfato de cálcio amorfo	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Cálculo dental e renal
Fosfato octacálcico	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Cálculo dental e renal

**Fonte:** Adaptado de GUASTALDI e APARECIDA, 2010.

Os biomateriais sintéticos originados de fosfato de cálcio (CP), fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) e hidroxiapatita (HAp) estão sendo empregados na síntese de arcabouços celular (DAMADZADEH et al., 2010; NETO e FERREIRA, 2018; MACHADO, 2019). Para a síntese da hidroxiapatita, vários processos podem ser empregados, e os suportes para enxertia conformados por prensagem a quente do pó (RAYNAUD et al., 2002;), prensagem isostática de pós-quente, ou por técnicas de fusão de dispersões em moldes de gesso (DESCAMP et al., 2013; BOILET et al., 2013).

Os blocos formados podem ser obtidos em técnicas que utilizam altas temperaturas utilizando-se plasma de faísca (SPS) (GU et al., 2002) e sinterização de corpos cerâmicos verdes em diferentes configurações de micro-ondas. Para este último, vale ressaltar os equipamentos de micro-ondas híbridos (CURAN, 2010 e 2011) e os micro-ondas multimodo que possibilitam a manufatura de biocerâmica a baixo custo com boa resistência mecânica (WANG et al, 2006; VELJOVIĆ, 2010).

### 3.4 COLÁGENO

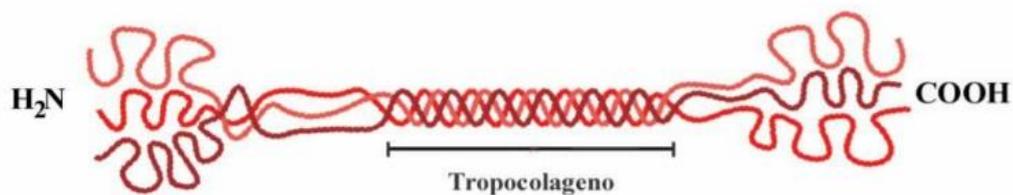
O colágeno é um produto de alto valor agregado e tem sido amplamente utilizado na indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética e de biomateriais, sendo obtido de diversas fontes pela sua abundância em tecidos animais (bovinos, suínos,

caprinos, ovinos, peixes, anfíbios, entre outros) (FAUZI et al., 2016; MASILAMANI et al., 2016; KRISHNAMOORTHY, 2017). Dentre os vários organismos utilizados para obtenção de colágeno, destacam-se os peixes, especialmente devido a sua disponibilidade, ausência de risco de transmissão de doenças, barreiras religiosas, alto rendimento no processo de extração e ausência de toxicidade (SENARATNE, 2006; KRISHNAMOORTHY, 2017).

Na estrutura corporal de mamíferos, o colágeno é a proteína mais abundante, e representa de 20 a 30% do total de proteínas corporais, além de constituir o principal elemento estrutural de órgãos e tecidos de vertebrados (SENARATNE, 2006; CHUNG & UITTO, 2010). Os tipos de colágeno diferem entre si em termos de organização molecular, estabilidade, elasticidade, antigenicidade e imunogenicidade, afetando na funcionalidade do tecido manipulado (CHANG & BUEHLER, 2014; FAUZI et al., 2016; ELANGO et al., 2017).

A molécula de colágeno é uma glicoproteína composta por três cadeias polipeptídicas helicoidais, cada uma com aproximadamente 1000 aminoácidos denominada cadeia  $\alpha$  ou tropocolágeno (Figura 4), que são classificadas de acordo com as características da estrutura primária das cadeias  $\alpha$  que formam a tripla hélice (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002; FERRIER, 2019).

Figura 4 – Representação esquemática das fibras de colágeno (tropocolágeno).



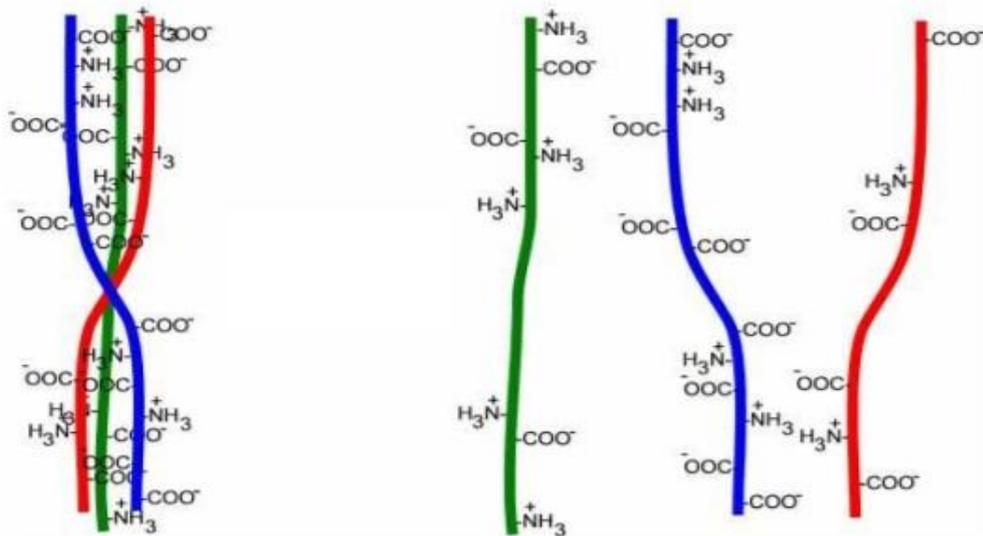
Fonte: Adaptado de BATISTA, 2008.

Dentre as principais características que distinguem os tipos de colágeno, podem ser citadas as suas propriedades mecânicas singulares, o fato de ser quimicamente inerte, sua composição incomum de aminoácidos e sua habilidade para se transformar em colágeno parcialmente hidrolisado por desnaturação. O colágeno parcialmente hidrolisado possui baixo peso molecular e maior solubilidade,

sendo resultante do aquecimento do colágeno em água ou em soluções aquosas de ácidos ou bases (NEKLYUDOV, 2002; VIDAL et al, 2018).

A desnaturação das fibras do colágeno, obtida por processos químicos, enzimáticos ou térmicos em água, com a perda da sua estrutura tridimensional, forma o colágeno parcialmente hidrolisado. Em altas temperaturas ou por processos enzimáticos, as ligações intermoleculares do colágeno são quebradas e a estrutura cristalina altamente organizada da proteína passa a um estado aleatório (Figura 5), denominado de gelatina (BATISTA, 2008; VIDAL et al, 2018). Nesse processo há a ruptura de ligações de hidrogênio entre as três cadeias polipeptídicas do tropocolágeno e em seguida ocorre a ruptura intramolecular da ligação de hidrogênio da cadeia  $\alpha$  (BERNAL; STANLEY, 1987). É possível a renaturação das fibras do colágeno, ou seja, a recuperação de sua estrutura em tripla hélice por desidratação e aquecimento prolongado do colágeno parcialmente hidrolisado (SENA, 2004; LENNINGER, J., 1998).

Figura 5– Representação da desnaturação / renaturação do colágeno



Fonte: Adaptado de BATISTA, 2008.

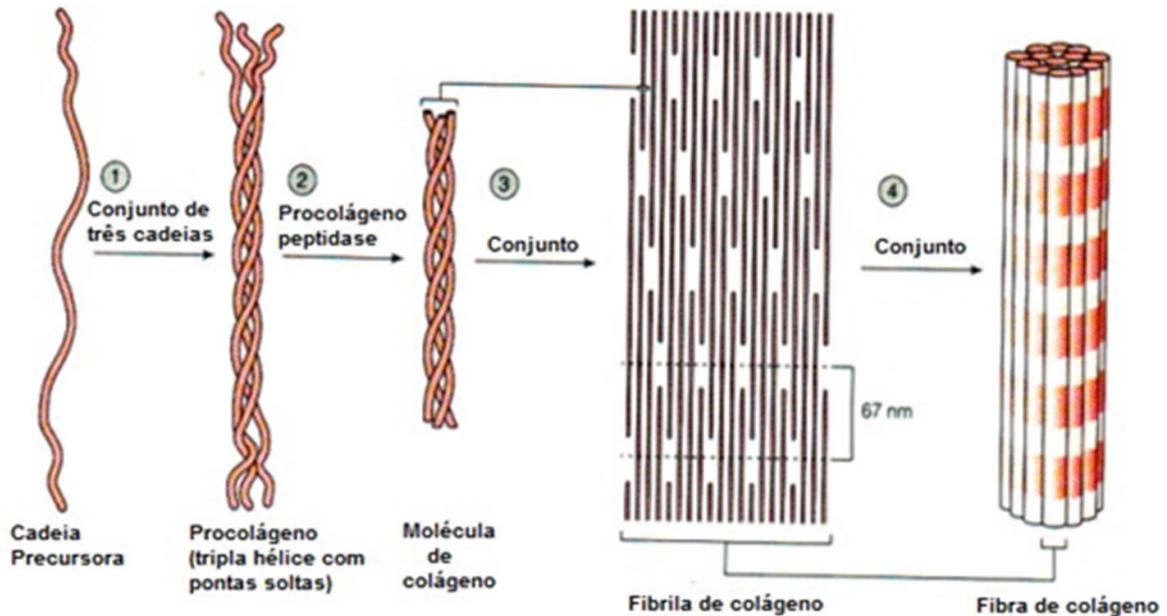
Até o presente momento, foram identificados 29 tipos distintos de colágeno, muitos dos quais com características únicas e alguns com características inter-relacionadas; contudo, todos são formados por subunidades polipeptídicas designadas de cadeias (CHUNG & UITTO, 2010). Nove deles são frequentemente

disponíveis, incluindo os colágenos dos Tipos I, II, III, IV, V, VII, IX, XI e XII (FAUZI et al., 2016) e podem ser divididos em tipos fibrilares e colágenos não fibrilares. Os tipos fibrilares I, II e III formam fibrilas de colágeno típicas com uma periodicidade axial de 67 nm e são os colágenos mais encontrados. É uma proteína macromolecular, constituída por três cadeias polipeptídicas de tamanhos iguais que, em sua porção central, estão sob a forma helicoidal e, nas extremidades amínicas e carboxílicas, permanecem na forma globular (AN; LIN; BRODSKY, 2016).

O colágeno do Tipo I é o biopolímero mais utilizado na área de engenharia de tecidos para produção de biomateriais devido à sua excelente biocompatibilidade e propriedades biodegradáveis, ajudando a compor ossos, dentina, tendões, cápsulas de órgãos, córnea, vasos sanguíneos e derme, além de desempenharem um papel importante na morfogênese e no metabolismo celular de novos tecidos, conferindo propriedades mecânicas e bioquímicas (MYLLYHARJU; KIVIRIKKO, 2004; SÖDERHÄLL et al., 2007; DUTIEL et al., 2016).

A diversidade biológica do colágeno é baseada em variações da sequência primária de aminoácidos, associada a um pequeno número de modificações na cadeia lateral. Pontes intra e intermoleculares se formam na matriz colagenosa devido a ligações cruzadas covalentes. Possíveis ligações covalentes presentes na matriz incluem ligações de éster, de amida e ligações peptídicas envolvendo grupos carboxílicos de cadeias laterais dos ácidos aspártico e glutâmico, além de grupos amino da lisina (HARRINGTON, 1966). Pontes dissulfeto, embora não numerosas devido ao baixo conteúdo de cisteína no colágeno, também têm um papel na estrutura protéica (TANZER, 1976). Proteínas colagenosas usualmente formam agregados supramoleculares (fibrilas, filamentos ou redes), sozinhas ou em conjunto com outras matrizes extracelulares (figura 6).

Figura 6 - Representação das estruturas que formam a fibra de colágeno



Fonte: Adaptado de WOLF, 2018.

A gelatina é o colágeno parcialmente hidrolisado em forma de um hidrocoloide, importante e com ampla utilização em aplicações alimentícias. Em geral, a gelatina de bovinos tem sido amplamente utilizada devido ao seu alto ponto de fusão, ponto de gelificação e termo reversibilidade (GUDMUNDSSON, 2002; VIDAL et al, 2018). É uma proteína de alto peso molecular e solúvel em água. Todos os aminoácidos estão presentes na gelatina, exceto o triptofano e têm baixo teor de metionina, cistina e tirosina devido à degradação durante o processo de extração (CHAPMAN; HALL, 1997 JAMILAH; HARVINDER 2002; VIDAL et al, 2018). A composição e sequência de aminoácidos na gelatina são diferentes de uma fonte para outra, mas sempre consistem em grandes quantidades de glicina, prolina e hidroxiprolina (GILSENAN; ROSS-MURPHY, 2000, WAHYUNINGSIHA et al., 2018).

### 3.5 TECIDO ÓSSEO

O osso é um órgão complexo com um design entrelaçado. A matriz interna denominada osso esponjoso, é uma rede porosa formada por trabéculas, medula vermelha e vasculatura que atua como local da hematopoiese, proporcionando força, flexibilidade e diminuindo o peso do osso. A matriz externa, osso cortical, é

uma região densa com canais vasculares capaz de suportar uma alta carga mecânica e resistir a forças de flexão e torção. A camada mais externa do osso, o periósteo, é uma fina membrana vascular que abriga os osteoblastos e células progenitoras e é capaz de formar novo osso. A matriz extracelular fornece um suporte para a deposição óssea, fortalece a construção e abriga fatores de sinalização que são cruciais para a formação, crescimento, remodelação e reabsorção óssea (VALTANEN et al., 2021).

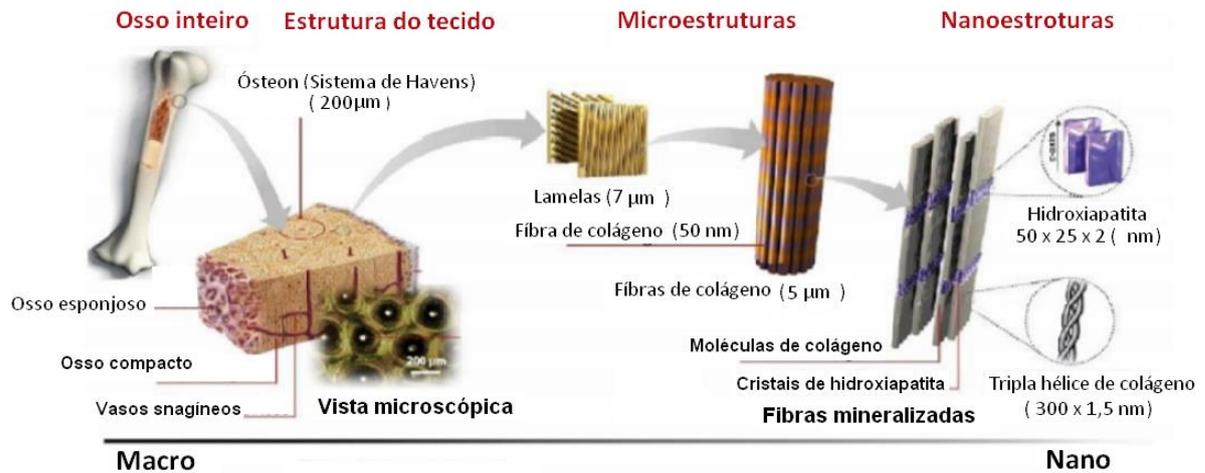
O tecido ósseo é um dos mais dinâmicos tecidos do corpo. Devido a sua capacidade de remodelação, altera suas configurações e propriedades em resposta a demandas mecânicas e metabólicas integradas, o que previne o acúmulo de danos microscópicos e minimiza a possibilidade de fratura. Este tecido possui a habilidade de se autorregenerar, ou seja, caso o tecido ósseo seja lesionado, ele é substituído por um novo tecido idêntico ao anterior, com as mesmas propriedades metabólicas. Diferente da pele, por exemplo, que quando lesionada é rapidamente substituída por um tecido rico em fibroblastos e altamente inespecífico, caracterizando uma cicatrização ou reparo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A anatomia óssea humana tem a arquitetura de um material nanocompósito, feito de 60 a 70% de componente mineral, até 30% de componentes orgânicos (principalmente colágeno tipo I), que varia dependendo da função e do tipo de osso e aproximadamente 10% de água. O componente mineral, geralmente definido como apatita biológica e às vezes representado erroneamente como hidroxiapatita natural, incorpora substituições múltiplas. (MICULESCU et al., 2018).

A matriz orgânica é excepcionalmente arranjada, em sua maior parte constituída por colágeno tipo I e uma fase mineral formada, predominantemente, por cristais de fosfato de cálcio, mais especificamente, a hidroxiapatita (Figura 7). A fase mineral juntamente com a fase orgânica, valida ao tecido ósseo certas propriedades que o tornam muito resistente mecanicamente (WEITZMANN et al., 2013).

Os osteoblastos maduros metabolicamente ativos atuam na formação óssea, com isso, proteínas que são produzidas pelos osteoblastos como o colágeno tipo I e algumas proteínas não colágenas como a osteonectina, osteocalcina e a sialoproteína têm fundamental importância na ligação dos cristais à matriz colágena da hidroxiapatita (TSAY et al., 2010; MATTHEW et al., 2013).

Figura 7 - Estrutura hierárquica do osso em várias escalas de comprimento



Fonte: CARVALHO, 2017.

Sobre a presença de compostos inorgânicos no organismo, os íons mais encontrados são os fosfatos e íons de cálcio. Estão também presentes os íons bicarbonatos, magnésio, potássio, sódio e citratos, em pequenas quantidades. Os citratos são responsáveis pela captura de íons cálcio formando um complexo que permite a formação da hidroxiapatita do osso (REY et al., 2009).

O citrato é abundante no osso, representando até 5 % em peso dos componentes orgânicos desse tecido, com uma densidade de aproximadamente 1 molécula por  $2\ \text{nm}^2$ , o que implica que mais de 15% da área de superfície de apatita disponível no osso é coberta por moléculas de citrato (XEI et al., 2010). Este íon é um intermediário no “Ciclo do Ácido Tricarboxílico” e é usado por todos os organismos aeróbios para produzir energia química utilizável. A estreita associação entre esse composto e o osso foi apontada pela primeira vez por Dickens em 1941, que mostrou que aproximadamente 90% da massa de citrato do corpo humano reside em tecidos mineralizados. Mas, a descoberta mais valiosa foi que, devido à sua alta afinidade de ligação ao cálcio armazenado no tecido duro, o citrato atua com um papel fundamental na regulação das funções metabólicas e na manutenção da integridade estrutural do osso. Além disso, a presença de citrato no osso é crucial para prevenir a precipitação do cálcio, seja quando o tecido ósseo é reabsorvido em resposta ao cálcio sérico reduzido ou quando o processo de biomineralização começa. No entanto, o papel do citrato na condução das propriedades estruturais e

funcionais do osso saudável em humanos foi apenas parcialmente elucidado (DIKENS, 1941 apud GRANCHI et al., 2019).

Hu et al. (2010) mostraram que o citrato não é um agente solubilizante na matriz óssea, mas está firmemente ligado à apatita como parte integrante da estrutura do nanocristal. Simultaneamente, Xie e Nancollas (2010) propuseram um modelo trifásico para explicar como o citrato pode influenciar o tamanho, o crescimento longitudinal e a espessura dos nanocristais de apatita.

Usando uma combinação de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de estado sólido, Difração de Raios-X (DRX) de pó e os princípios de cálculos de estrutura eletrônica, Davies et al. (2014) postulou que os ânions citratos poderiam ser incorporados em uma camada hidratada da estrutura do Fosfato de Cálcio. Esta configuração de ligação favorece o crescimento dos cristais minerais em uma morfologia tipo placa e explica sua propensão para formar pilhas (DAVIES et al., 2014; COSTELLO et al., 2014). Mais recentemente, Delgado-Lopez et al. (2017) focaram na fase inicial de mineralização, levando em consideração a interação entre citrato e colágeno. Por meio de uma caracterização aprofundada baseada em espalhamento de Raios-X e técnicas de imagem, eles descobriram que o colágeno e o citrato atuam sinergicamente para favorecer a morfologia das placas, uma vez que ambos contribuíram para a manutenção da fase amorfa transitória. Os aglomerados amorfos de CP são representados como esferulitos ou glóbulos que gradualmente ocupam as zonas de lacuna das fibrilas de colágeno alinhadas (LOTSARI et al., 2018).

### 3.6 TÉCNICA DE MICROONDAS

A preocupação em desenvolver estratégias sustentáveis na área da Química e afins é observada pelo número crescente de publicações científicas em revistas conceituadas na área de Química Verde. Algumas delas são o ACS-Catalysis, ChemSusChem e Green Chemistry, sendo este último referência na publicação de trabalhos neste domínio e voltado especialmente para o desenvolvimento de tecnologias dirigidas à redução de resíduos nocivos ao meio ambiente.

Observa-se, com frequência, que a palavra-chave "Green Chemistry" ou Química Verde, vem frequentemente atrelada a pesquisas correlacionadas ao

desenvolvimento sustentável, biodiversidade, biocombustíveis, tecnologias limpas de processos industriais com minimização ou eliminação de resíduos e efluentes tóxicos, tanto ao nível industrial como também em laboratórios de pesquisa. Dentre as técnicas mais atuais, destaca-se a irradiação assistida por micro-ondas e as reações ativadas por ultrassom, bem como processos envolvendo células fotovoltaicas e a combustível (TASUKUI e RESENDE, 2014) .

O processamento de materiais baseado no aquecimento por meio de energia de micro-ondas vem ganhando a cada dia mais destaque e importância em várias aplicações industriais, em virtude de uma série de vantagens em potenciais frente aos métodos convencionais de aquecimento. Na sinterização de materiais cerâmicos o uso de micro-ondas permite redução no tempo de processamento, economia de energia e melhora na uniformidade microestrutural dos corpos cerâmicos. Entretanto, os benefícios do uso das micro-ondas só são obtidos quando a sinterização é realizada com o controle e entendimento científico de uma série de parâmetros e aspectos envolvidos no processo (MENESES; SOUTO; KIMINAMI, 2007).

Segundo Menezes (2007), o recente interesse no processamento de materiais é evidenciado pelo grande número de simpósios e congressos que vêm sendo dedicados ao processamento de materiais utilizando energia de micro-ondas por intermédio da: Sociedade de Pesquisa em Materiais (MRS - Materials Research Society); Sociedade Americana de Cerâmica (American Ceramic Society); Grupo de Pesquisa em Microondas (Microwave Working Group); Associação Europeia para Pesquisa e Ensino em Energia de Micro-ondas (Association for Microwave Power in Europe for Research and Education); do Instituto Internacional de Energia de Micro-ondas (International Microwave Power Institute); do Instituto de Aplicação de Ondas Eletromagnéticas (Institute of Electromagnetic Wave Application); do Instituto de Engenheiros da Austrália (Institution of Engineers, Australia) entre outros.

Apesar do uso de micro-ondas ter se disseminado por todo o mundo, a aplicação dessa tecnologia no processamento de materiais é um desenvolvimento relativamente novo. O uso de energia de micro-ondas no processamento de materiais tem o potencial de oferecer vantagens similares às observadas quando de sua aplicação no processamento de alimentos (THOSTENSON; CHOU, 1999 apud MENESES; SOUTO; KIMINAMI, 2007).

No processamento térmico convencional, a energia é transferida por radiação para a superfície do material e em seguida, por meio de processos de condução e convecção, o calor é conduzido para o interior do material. No processamento com micro-ondas, a energia é depositada diretamente no interior do material através de processos de interação molecular e atômica com o campo eletromagnético, onde ocorre um aquecimento volumétrico do material, permitindo altas taxas de aquecimento e poucos ciclos de processo (CLARK; SUTTON, 1996; TSUKUI e REZENDE, 2014).

O processamento de materiais por micro-ondas está em fase de ascensão e muitos usos bem-sucedidos já foram registrados na produção de materiais. Por exemplo, Roy et al. (1990) demonstraram que o módulo de ruptura Fe-Ni é 60% maior do que o de amostras convencionais após 10-30 min de processamento de micro-ondas. Janney et al. (1997) confirmaram que a energia de ativação na sinterização por micro-ondas é menor em comparação com a sinterização convencional. Subrata et al. (2007) utilizaram com sucesso as micro-ondas na aglomeração de cerâmicas odontológicas. Duarte, (2009) sintetizou hidroxiapatita a baixa temperatura em 15 min de processamento utilizando energia de micro-ondas.

As microondas aquecem o material por dentro e podem levar à economia de enormes quantidades de energia, uma vez que não é necessário aquecer o recipiente ou o ar entre a fonte de calor e o material de carga. O processamento de micro-ondas pode facilitar a taxa de densificação e uniformidade do tamanho de partícula e pode promover a melhoria nas propriedades microestruturais de materiais que não podem ser observados em processos convencionais (LIAO et al., 2016).

As propriedades da hidroxiapatita demonstram-se adequadas para aplicações cirúrgicas. Entretanto, sua utilização para fins ortopédicos é limitada devido a sua baixa resistência mecânica, especialmente sob tensão. Os compósitos de hidroxiapatita porosa impregnados com colágeno parcialmente hidrolisado em solução obtidos por aquecimento em energia de micro-ondas podem apresentar boa resistência mecânica e baixa citotoxicidade.

### 3.7 RESPOSTA BIOLÓGICA

Para garantir uma boa aplicação do biomaterial no organismo, dois fatores são extremamente influentes, como o biomaterial ser biofuncional, que está relacionado com a capacidade do biomaterial exercer certa função no organismo e a sua biocompatibilidade, que é analisada através de reações que ocorrem em superfícies de implantes durante a implantação e ao longo do tempo (PROUBASTA, 1997). Após a implantação do biomaterial, o corpo manda uma resposta biológica do tipo inflamatória, onde há a formação de um hematoma com acúmulo de água e glicoproteínas que revestem o implante. Inúmeras células se aglomeram no local através da quimiotaxia, que são elas os neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos. (DAVIES, 2000).

As primeiras células a chegarem à região implantada são os neutrófilos, que são atraídos pelas plaquetas através de substâncias quimiotáticas. Eles então se aderem à parede do endotélio pela ligação com receptores de membrana, as selectinas. Os neutrófilos produzem radicais livres, auxiliando na destruição de bactérias e são gradualmente substituídos por macrófagos. Após 48 - 96 horas os macrófagos invadem a região implantada, que são as principais células antes dos fibroblastos migrarem no local. Os macrófagos têm contribuição importante na secreção de citocinas, fatores de crescimento, osteoclastos, angiogênese, fibroplasia e síntese da matriz extracelular, fundamentais para a transição para a fase proliferativa (BROUGHTON et al., 2006).

Finalmente, as citocinas entram em ação (IL-1 e IL-2) e alguns fatores de crescimento (TGF- $\beta$ , IGF, BMP's, PDGF) promovem a diferenciação das células mesenquimais pluripotentes com a formação da matriz óssea e do osso imaturo. A maturação e remodelação óssea que encerram esse desenvolvimento destacam a paridade que existe com a fisiologia da formação do calo ósseo, após a uma fratura (ANDERSON, 2001).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a preparação das pastilhas do compósito de hidroxiapatita impregnada com colágeno parcialmente hidrolisado foram utilizados os materiais: ácido fosfórico P.A. (fabricante Moderna); Cloreto de cálcio anidro P.A. (fabricante Neon); Hidróxido de amônio P.A. (fabricante Merck); ácido cítrico P.A. (fabricante Neon); Carbonato de cálcio P.A. (fabricante Neon); colágeno parcialmente hidrolisado (gelatina) (fabricante Mondelez Internacional) e Gesso pedra tipo II (odontológico) (fabricante Gesso Rio).

A hidroxiapatita foi sintetizada pelo método direto de co-precipitação química utilizando os reagentes da Equação 1 (10 moles de  $\text{CaCl}_2$  : 6 moles de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), por ser um método simples de fácil reprodução e com fácil controle das proporções dos reagentes, cujo esquema do experimento está resumido na figura 8. Os métodos úmidos apresentam um melhor controle da morfologia e dos tamanhos de partícula (RATNAYAKE; MUCALO E DIAS, 2016; QI et al., 2017; HAIDER et al., 2017).



O produto obtido pela reação estequiométrica dos reagentes da equação 1 é uma hidroxiapatita com a relação mássica Ca/P de 2,08, no entanto, foi utilizado a razão molar dos reagentes (Ca/P) é de 1,67 segundo as proporções utilizadas por Saeri et al., (2003) e Carvalho (2017), fazendo reagir volumes iguais de uma solução 0,4 M. L<sup>-1</sup> de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  com uma solução 0,3 M. L<sup>-1</sup> de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  para obtenção de hidroxiapatita com características similares às encontradas no sistema ósseo.

### 4.1 PREPARAÇÃO DO PÓ DE HIDROXIAPATITA – ROTA 1

O pó cerâmico de hidroxiapatita foi sintetizado pelo método de co-precipitação pela adição, sob agitação constante e à temperatura ambiente, de 500 mL de uma solução contendo 14,7 g de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (0,3 Moles) sobre 500 mL de outra solução contendo 29,45 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,4 Moles). Foram adicionados em seguida 180 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  a 15 %, suficiente para obter o pH alcalino (pH entre 10 e 12), quando um precipitado branco de fosfato de cálcio foi formado. O precipitado foi mantido em

suspensão sob agitação por 1 hora, e em seguida mantido em repouso por 24 horas para envelhecimento<sup>2</sup> e crescimento dos cristais de hidroxiapatita (HAp).

O precipitado gelatinoso assim obtido foi filtrado à vácuo sob 12 mm Hg durante 2 horas, lavado com água desmineralizada até reação negativa de cloretos com solução 0,1N de nitrato de prata e secado a 110° C, representando a espécie HAp-0H (Hidroxiapatita hidratada 1).

#### 4.2 PREPARAÇÃO DO PÓ DE HIDROXIAPATITA – ROTA 2

O pó cerâmico de hidroxiapatita foi sintetizado pelo método de co-precipitação pela adição, sob agitação constante e à temperatura ambiente, de 1000 mL de uma solução contendo 14,7 g de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,3Moles) sobre 500 mL de outra solução contendo 29,45 g de CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (0,4Moles). O pH da solução foi ajustado para 9,82 com a adição vagarosa de 130 mL de NH<sub>4</sub>OH e em seguida, ajustado para 10,0 após adição de mais 60 mL de NH<sub>4</sub>OH, totalizando 180 mL de NH<sub>4</sub>OH. Após envelhecimento de 24 horas, foi agitada durante 60 minutos e aquecida até a temperatura de 90 °C, objetivando aumentar o tamanho do grão e facilitar o processo de filtração. Passou por envelhecimento durante 72 horas.

O precipitado foi lavado com água desmineralizada até reação negativa de cloretos com solução 0,1N de nitrato de prata, e sacado em estufa a temperatura de 110 °C, representando a espécie HAp-0H (Hidroxiapatita hidratada 2).

#### 4.3 PREPARAÇÃO DO PÓ DE HIDROXIAPATITA – ROTA 3

O pó cerâmico de hidroxiapatita foi sintetizado pelo método de co-precipitação pela adição de 29,45 g de CaCl<sub>2</sub> (0,4Moles) em 1000 mL de água desmineralizada sob agitação constante a 80 °C, em seguida foi adicionado 180 mL de NH<sub>4</sub>OH e ajustou-se o pH para 10,5, em seguida foi adicionado 14,7 g de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> concentrado (0,3 Moles) gota a gota. A temperatura foi mantida a 80 °C sob agitação durante 01

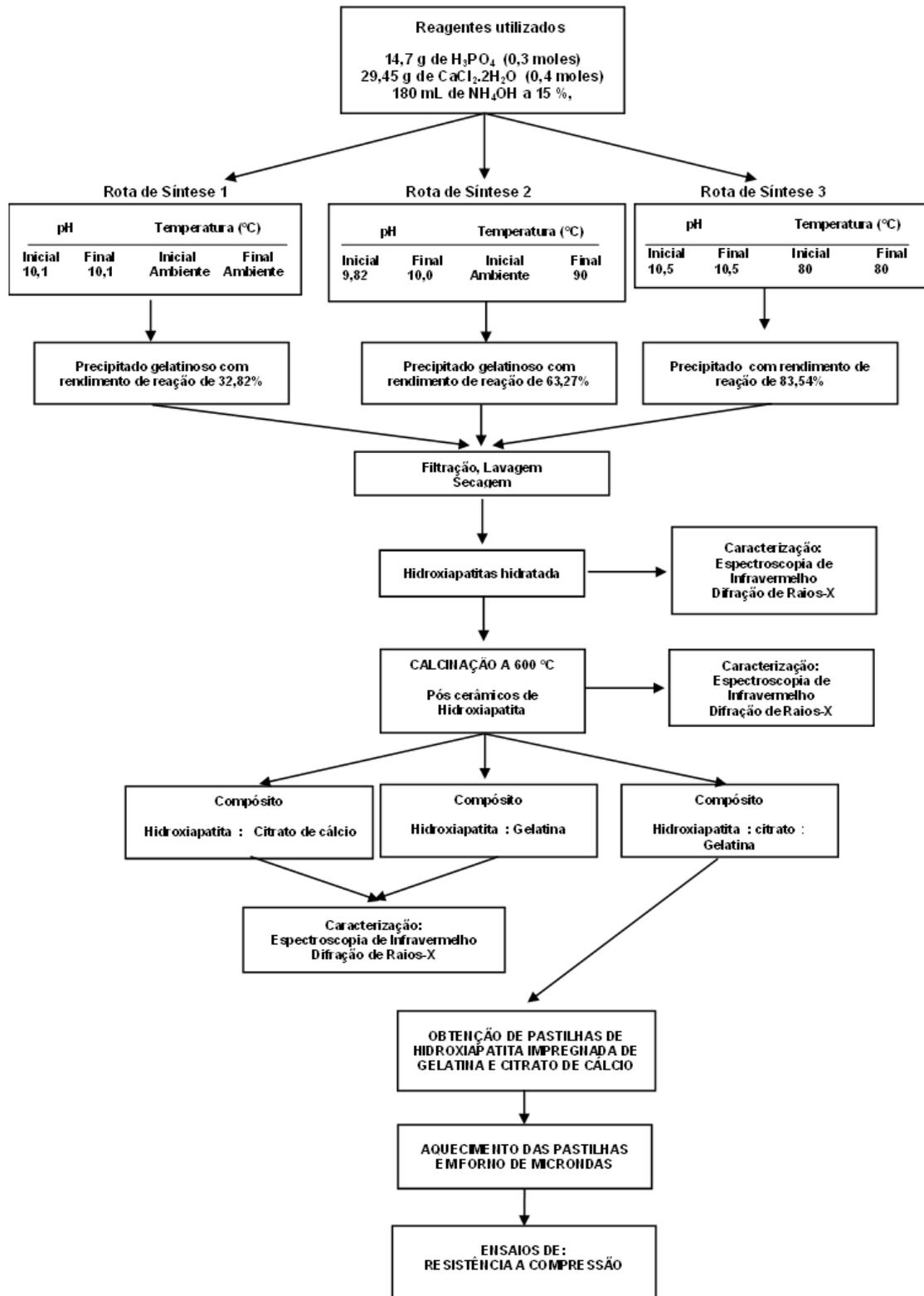
---

<sup>2</sup> Envelhecimento: Processo de repouso em condições ideais para manter as características morfológicas e estruturais da hidroxiapatita.

hora. A dispersão foi envelhecida por 72 horas; o precipitado foi filtrado a vácuo e lavado com água desmineralizada até reação negativa de cloreto com solução 0,1N de nitrato de prata. Em seguida, foi levado à estufa e seco a temperatura de 110 °C, representando a espécie HAp-OH (Hidroxiapatita hidratada 3).

Os pós assim obtidos (HAp-OH) foram calcinados em forno mufla a uma taxa de aquecimento de 20 graus por minuto, durante 30 minutos até 600 °C para a obtenção de pós cerâmicos de hidroxiapatita (HAp) que foram caracterizados por Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e Difração de Raios X (DRX) antes e após a calcinação. Foram utilizados na preparação de um compósito contendo citrato de cálcio impregnado de colágeno parcialmente hidrolisado, confeccionado pastilhas para ensaio que foram submetidas a uma sequência de aquecimento em forno de micro-ondas com intervalos de 15 segundos a potência máximo e os corpos de prova foram submetidos ao ensaio de Resistência a Compressão.

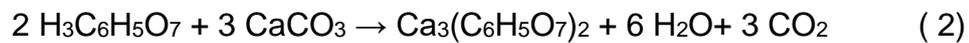
Figura 8 – Esquema dos experimentos de síntese de hidroxiapatita



Fonte: a autora, 2021.

#### 4.4 PREPARAÇÃO DO COMPÓSITO DE HIDROXIAPATITA/CITRATO

Foi preparado 50 mL de solução de citrato de cálcio a concentração equivalente a 20 g L<sup>-1</sup> pela reação de 0,61 g de carbonato de cálcio P.A e 0,77 g de ácido cítrico P.A. (Equação 2). 5 g do pó cerâmico de hidroxiapatita foi empastado com 5 mL desta solução, o que corresponde a 0,11 g de citrato para cada 5 g de HAP, levado a estufa a 110 °C por 4 horas para evaporação da água, obtendo-se assim um compósito de cristais cerâmicos de hidroxiapatita impregnada com 2,2 % de cristais de citrato de cálcio, correspondente ao teor de citrato encontrado no sistema ósseo. Os pós assim obtidos foram caracterizados por Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR); Difração de Raios X (DRX).



#### 4.5 PREPARAÇÃO DOS CORPOS DE PROVA DO COMPÓSITO

Para a confecção das pastilhas porosas do compósito, foi utilizada a técnica de gelcasting para a fabricação de corpos cerâmicos verde<sup>3</sup> por dispersão do pó cerâmico de HAp com citrato de cálcio impregnado com colágeno parcialmente hidrolisado, obtendo-se assim uma pasta gelatinosa consistente, que foi em seguida fundida em moldes vazados e dispostas sobre uma placa de gesso odontológico com as proporções de água/gesso indicada pelo fabricante.

Foi utilizado a hidroxiapatita obtida pela síntese da rota 3, que apresentou a melhor cristalinidade verificada através da Difração de Raios X. Preparou-se uma dispersão em água com a consistência de 60% de sólidos sendo 50% de compósito de hidroxiapatita/citrato e 10% de colágeno parcialmente hidrolisado previamente dissolvido na água quente para conferir plasticidade e gelificação da dispersão, bem como agente de adesão das partículas e promoção de resistência mecânica do compósito pela renaturação parcial do colágeno parcialmente hidrolisado, em forma de fibras do colágeno.

As quantidades de materiais para a dispersão consistiram de 30 gramas do compósito de hidroxiapatita/citrato obtido pela rota 3, com uma solução de 5 gramas de colágeno parcialmente hidrolisado dissolvido em 25 ml de água formando um hidrogel, que foi despejado em moldes cilíndricos vazados com diâmetro de 15 mm

e altura de 30 mm e depositados sobre uma placa de gesso para redução do excesso de água. Após 24 horas, os corpos de prova (figura 9) foram desenhados e secos ao ar.

Figura 9 – Corpos de prova do compósito de hidroxiapatita/gelatina para ensaio



Fonte: a autora, 2022

#### 4.6 TRATAMENTO TÉRMICO UTILIZANDO MICROONDAS

Os corpos de prova foram submetidos a uma sequência de 5 ciclos de aquecimento em forno de micro-ondas comum na potência máxima instalado no laboratório de Biofísica química (LBQ) da UFPE (Figuras 10 e 11), sendo cada ciclo de aquecimento de 15 segundos e 5 minutos de resfriamento ao ar livre para conferir aos corpos de prova insolubilidade em água e resistência mecânica.

As pastilhas do compósito de hidroxiapatita/citrato/colágeno aquecidas em forno de micro-ondas foram caracterizadas por testes de resistência a compressão em máquina universal de ensaios para avaliação do grau de resistência alcançado pela pastilha em função dos tempos testados de exposição às micro-ondas.

Figuras 10 e 11 – Forno de micro-ondas do Laboratório LBQ – UFPE



Fonte: a autora, 2022

## 4.7 CARACTERIZAÇÃO

### 4.7.1 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

O infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é um método de espectroscopia por infravermelho, na qual a radiação é passada através de uma amostra. Parte da radiação é absorvida pela amostra e outra parte é transmitida. O espectro resultante cria uma impressão molecular da amostra com picos de absorção que corresponde à frequência de vibrações entre as ligações dos átomos que compõe o material, logo, servindo para vários tipos de análise como a consistência de um material, qualidade e quantidade. Utilizar o FTIR apresenta algumas vantagens como velocidade, simplicidade mecânica, sensibilidade e precisão (KEMPFERT, 2001).

As análises FTIR foram conduzidas com o espectrômetro FTIR CARY 360 Agilent (resolução 4  $\text{cm}^{-1}$ ; ganho 1; com Range de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ ). As amostras foram preparadas por meio da técnica de absorbância em módulo ATR-MICROd.

### 4.7.2 Difração de Raios X

O difratômetro de Raios X é um aparelho utilizado para determinar os ângulos nos quais ocorre a difração de radiação incidente sobre uma amostra em forma de pó e com características policristalinas, o que possibilita a determinação de estruturas cristalinas. O tamanho e a geometria de celas unitárias dos cristais podem ser obtidos a partir das posições angulares dos picos de difração, enquanto arranjos

dos átomos no interior da cela unitária está associada às intensidades relativas desses picos.

Os pós foram analisados por Difratoimetria de Raio X (DRX), em um difratômetro XRD 6000 da Shimadzu (Quioto, Japão), operando com radiação de  $K\alpha$  Cu ( $1.5406 \text{ \AA}$ ) a 40 kV e 30 mA, com monocromador de grafite, varredura de  $1^\circ/\text{min}$  e intervalo  $2\theta$  de 2 a 50 graus.

#### 4.7.3 Resistência mecânica a compressão

Para a determinação da Resistência Mecânica a Compressão os corpos de prova do compósito foram inicialmente submetidos a uma inspeção visual direta com a finalidade de verificar sua integridade e acabamento superficial após a extração dos moldes. Foram descartados corpos de prova que apresentaram defeitos tais como quebra de bordas, bolhas de ar ou falta de preenchimento.

Foram selecionados 5 corpos de prova com formato cilíndrico medindo 15 mm de diâmetro por 30 mm de altura com peso médio de 4,1 g.

Para realizar o ensaio de avaliação da resistência mecânica a compressão foi utilizada uma máquina universal de ensaio do fabricante Time Groupe Inc, modelo WDW 300 E, instalada no Laboratório de Engenharia Biomédica da UFPE (figura 12), utilizando uma célula de carga de 300 kN; precisão da carga de 0,5% e precisão FS de 0,0001 %.

Figura 12 – Máquina universal de ensaio do LEB – UFPE



Fonte: a autora, 2022.

O ensaio é realizado através de um controle em malha fechada da carga de ensaio, do deslocamento da mesa e da deformação da amostra. O progresso do ensaio é realizado por um controle inteligente com parâmetros definido pelo usuário.

Os resultados do ensaio são salvos em arquivos operacionais, contendo as condições de ensaio e os resultados do teste. O controle do teste de ensaio, alteração de velocidade da mesa, a introdução de parâmetros pode ser introduzida e coletados pelo software de fácil manuseio.

Os parâmetros utilizados para a realização do ensaio consistiram na aplicação de uma carga de 4 kN e velocidade da mesa de 5 mm/min. Com os resultados do ensaio podemos determinar a carga máxima de resistência a compressão dos corpos de prova obtida através da curva de Tensão x Deformação.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA

Foram obtidos precipitados de hidroxiapatita hidratada nas três (03) rotas, sendo em quantidades diferentes para cada uma dessas rotas, como pode ser observado nos resultados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Condições de síntese de hidroxiapatita e rendimento

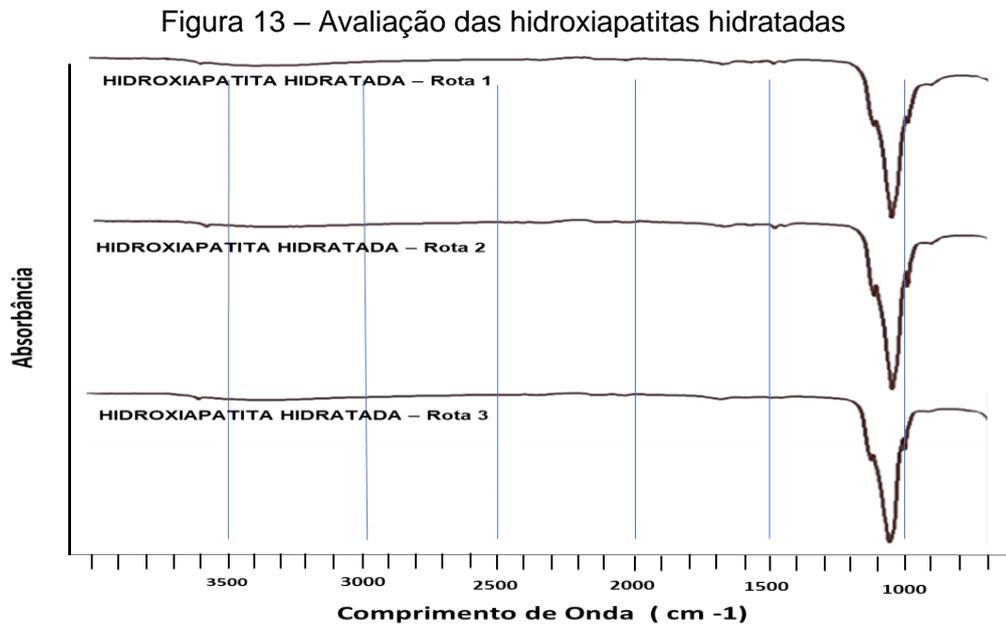
SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA POR CO-PRECIPITAÇÃO QUÍMICA							
ROTA	REAGENTES	TEMPERATURA (°C)		pH		QUANTIDADE DE PRECIPITADO (g)	RENDIMENTO DA REAÇÃO (%)
		INICIAL	FINAL	INICIAL	FINAL		
1	14,7 g de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> em 500 mL de água 29,45 g de CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O em 500 mL de água 180 mL de NH <sub>4</sub> OH a 15 %,	ambiente	ambiente	10,1	10,1	6,64	32,82
2	14,7 g de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> em 500 mL de água 29,45 g de CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O em 500 mL de água 180 mL de NH <sub>4</sub> OH a 15 %,	ambiente	90	9,82	10	12,8	63,27
3	14,7 g de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> em 500 mL de água 29,45 g de CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O em 500 mL de água 180 mL de NH <sub>4</sub> OH a 15 %,	80	80	10,5	10,5	16,9	83,54
RENDIMENTO TEÓRICO DA REAÇÃO (Ca/P = 1,67)						20,23	100

Fonte: a autora, 2021.

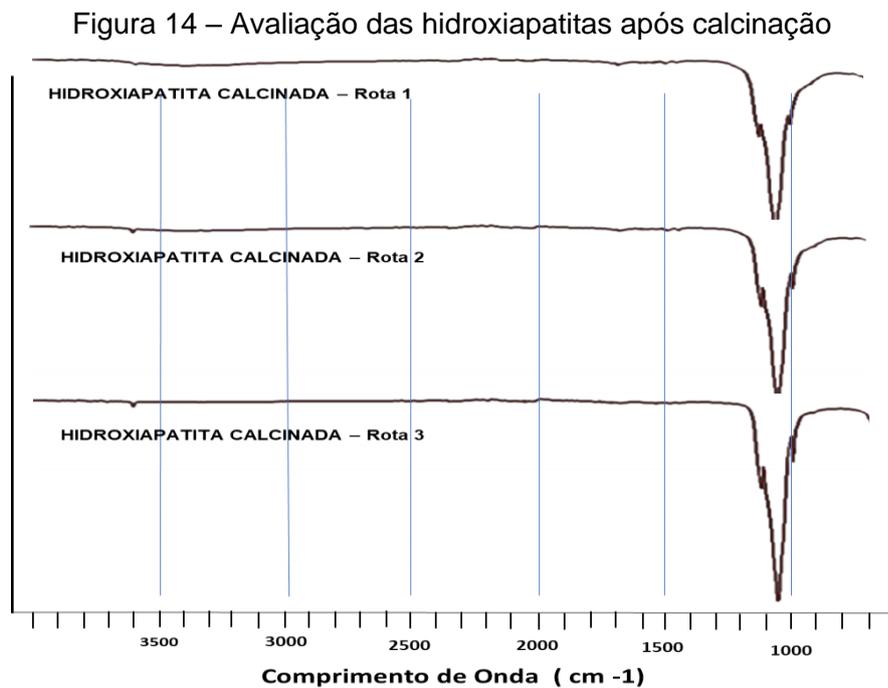
As condições de reação (temperatura e pH) mostraram grande influência no rendimento de transformação dos fosfatos de cálcio em precipitado de hidroxiapatita, uma vez que as condições para obtenção de apatitas sintéticas para implantes ósseos ocorrem em um ambiente com deficiência de cálcio (Ca/P = 1,67), similar a relação encontrada em apatitas naturais que tem grande influência na interação entre os componentes que formam a estrutura óssea.

## 5.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (FTIR)

Os precipitados obtidos em cada rota após serem lavados e secos, foram caracterizados por ensaios de FTIR antes e após a calcinação cujos espectros são mostrados nas figuras 13 e 14 respectivamente.



Fonte: a autora, 2021.



Fonte: a autora, 2021.

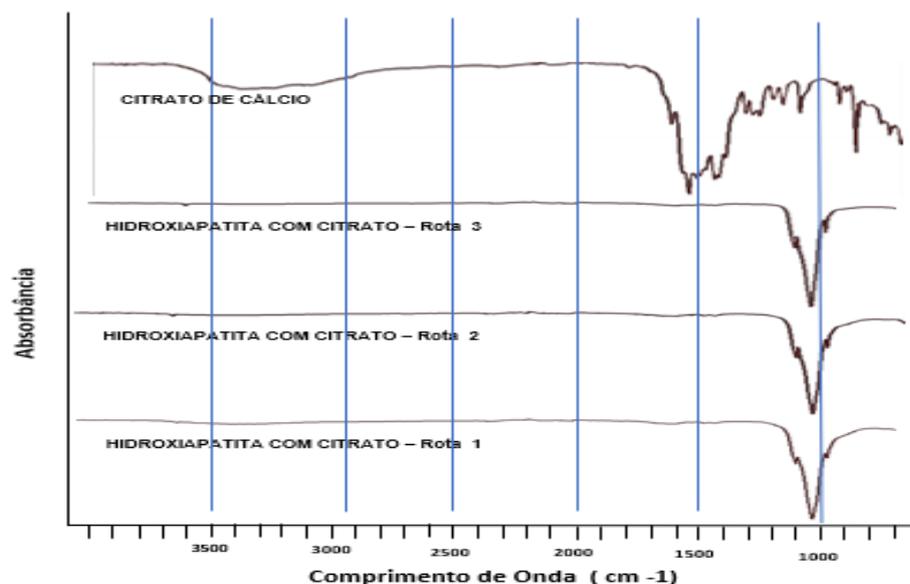
Comparando os espectros de Absorbância das amostras antes e após a calcinação, verificamos que os precipitados de hidroxiapatita obtida em todas as rotas não apresentaram picos nas regiões que indicam a presença de carbonatos nem água ou hidroxila incorporada a estrutura cristalina.

Segundo Bose (2003), para hidroxiapatitas sintetizadas por precipitação a temperatura acima de 75°C e posteriormente tratadas termicamente, pode-se afirmar que não há moléculas de água presentes na rede cristalina. Isto pode ser confirmado pela análise dos espectros de FTIR (Figura 14), que revela a ausência do sinal grande que deveria estar localizado a 3.550  $\text{cm}^{-1}$  que é atribuída aos sinais da água de cristalização, isto é, moléculas de água retidas na célula unitária da apatita.

Após a calcinação, foram preparados compósitos com parte das amostras de hidroxiapatitas com citrato de cálcio e colágeno parcialmente hidrolisado, utilizando as proporções de cada componente (hidroxiapatita : Citrato e hidroxiapatita : colágeno) similares ao encontrado no osso natural.

Os espectros de FTIR para caracterização dos compósitos hidroxiapatita : citrato de cálcio e hidroxiapatita : colágeno são mostrados nas Figuras 15 e 16 respectivamente.

Figura 15 – Espectro de FTIR do compósito hidroxiapatita : Citrato de cálcio



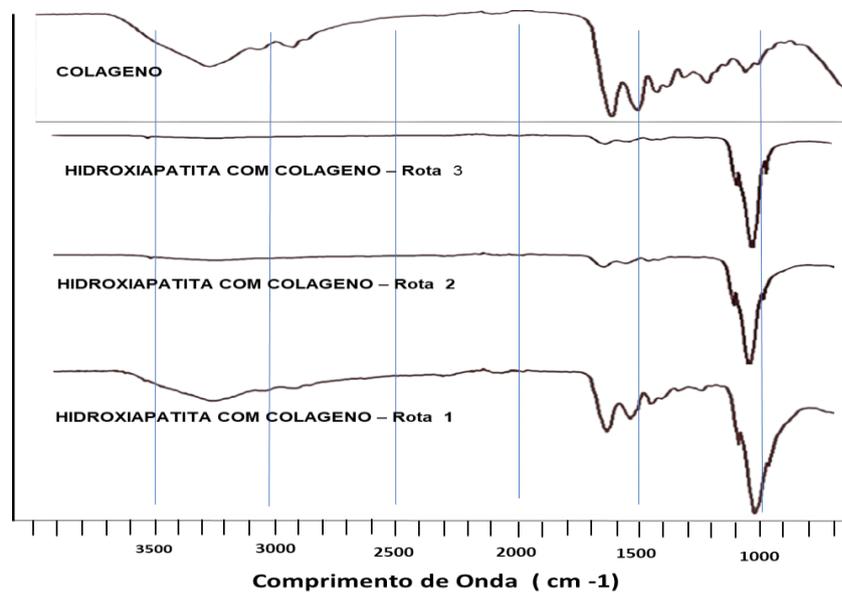
Fonte: a autora, 2021.

O espectro da amostra de citrato de cálcio apresenta uma banda larga em  $3400\text{ cm}^{-1}$  que é atribuída ao alongamento do grupo OH, que resulta da hidratação pela água. O espectro também mostra picos em  $1580$  e  $1400\text{ cm}^{-1}$  devido ao anti-simétrico e vibrações simétricas do grupo COO, respectivamente.

De acordo com o que apresenta a figura 15, não foi possível avaliar pelo espectro de FTIR a possível interação entre as estruturas cristalinas do citrato de cálcio com a estrutura do fosfato da hidroxiapatita.

De acordo com o que apresenta a figura 18, é possível identificar a presença de hidroxilas na região de comprimento de onda entre  $3700$  e  $3200\text{ cm}^{-1}$  sugerindo a presença de água de hidratação. Os espectros também mostram picos característicos de ligações tipo amida na região de comprimento de onda entre  $1650$  e  $1450\text{ cm}^{-1}$ , característico de radicais amida. Os picos são mais evidentes na hidroxiapatita calcinada obtida na rota 1, sugerindo o encapsulamento das partículas da hidroxiapatita pelo colágeno parcialmente hidrolisado.

Figura 16 – Avaliação dos compósitos de hidroxiapatita : colágeno

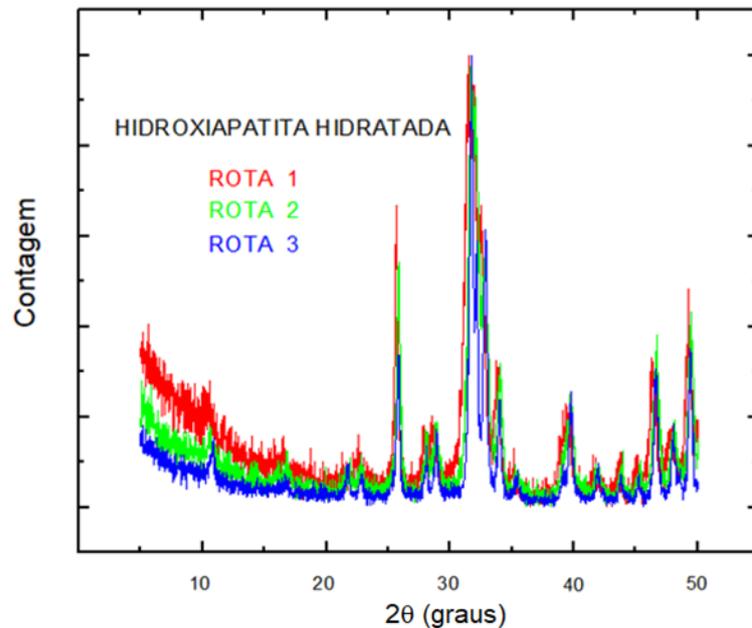


Fonte: a autora, 2021.

### 5.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

Os difratogramas de raios X dos precipitados de hidroxiapatita hidratada obtidos nas 3 rotas de síntese utilizadas são apresentados na figura 17.

Figura 17 – Difração de raios X das hidroxiapatitas hidratadas - Rotas 1, 2 e 3

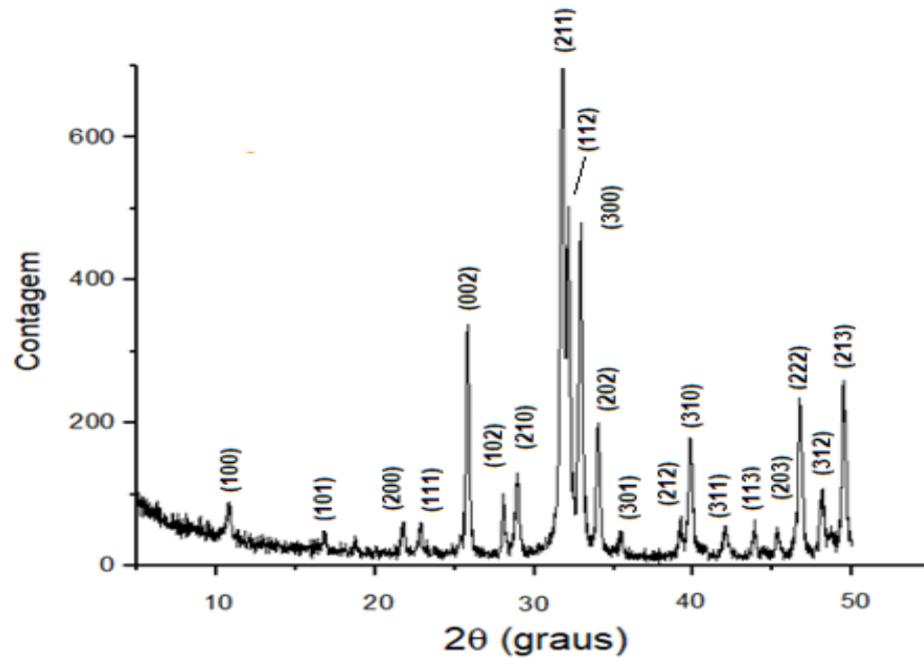


**Fonte:** a autora, 2021.

Os difratogramas mostram que todas as rotas utilizadas produziram precipitados com as mesmas características de difração, demonstrando que apresentam predominantemente a mesma fase mineral. O precipitado obtido pela rota 1 mostra a presença de certa quantidade de material amorfo, enquanto o precipitado obtido pela rota 3 apresenta uma linha de base mais baixa, mais reta e com menos ruído e picos definidos, indicando um precipitado de maior cristalinidade.

O difratograma de raios X do precipitado calcinado obtido pela rota de síntese 3 mostrado na figura 18, apresentou perfil cristalográfico similar ao padrão ICSD-26204, que foi utilizado por Amorim (2020).

Figura 18 – Perfil cristalográfico da hidroxiapatitas calcinadas a 600 °C - Rota 3

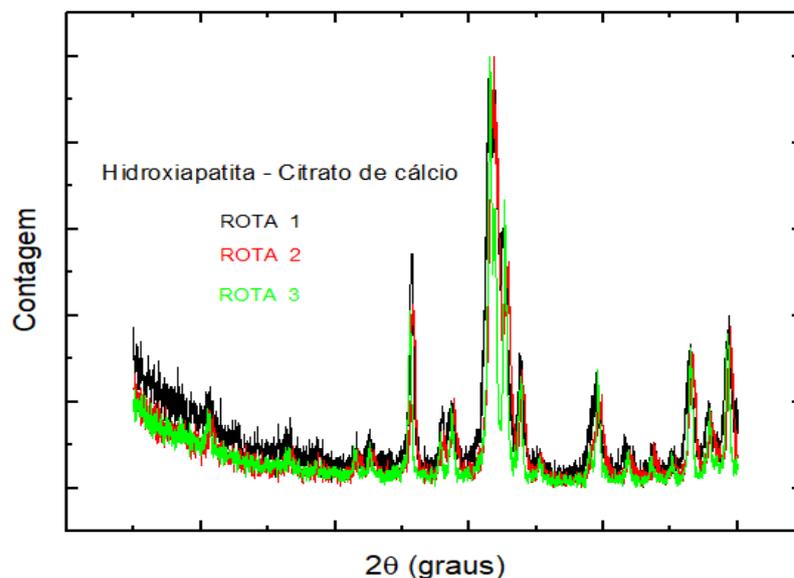


Fonte: a autora, 2021

Não foram encontrados picos que indicassem a formação de fosfato tricálcico (TCP) ou de carbonato de cálcio devido ao alto grau de transformação alcançado.

A figura 19 mostra o difratograma dos compósitos hidroxiapatita calcinada / citrato de cálcio, onde foram adicionados citrato na proporção similar ao encontrado em ossos naturais.

Figura 19 – Difração de raios X das hidroxiapatitas calcinadas / citrato de cálcio



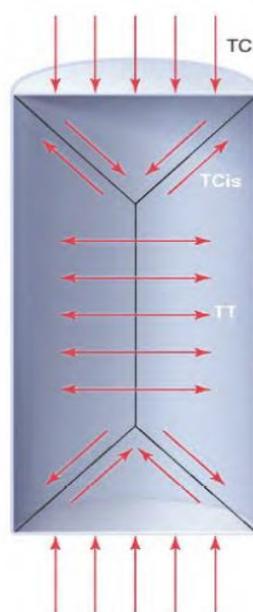
Fonte: a autora, 2021.

Não foram observados picos de citrato de cálcio livre. Não foi possível encontrar picos no difratograma sugestivos de estruturas cristalinas resultantes da interação entre o citrato de cálcio e os fosfatos da hidroxiapatita, sugerindo que os íons citrato foram incorporados a uma camada hidratada da estrutura da hidroxiapatita, podendo ser comprovado usando uma combinação de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de estado sólido, difração de raios X (DRX) de pó e os princípios de cálculos de estrutura eletrônica.

#### 5.4 RESISTÊNCIA MECÂNICA A COMPRESSÃO

Quando um objeto é testado em compressão, a falha pode ocorrer como resultado de tensões complexas no interior deste objeto. As forças de compressão aplicadas em cada extremidade do espécime são transformadas em tensões de cisalhamento ao longo de uma área em forma de cone localizada em cada extremidade do cilindro (figura 20) e, como resultado da ação dos dois cones nesse cilindro, são transformadas em tensões de tração na porção central da massa do corpo. Por causa desta configuração de tensões no corpo, torna-se necessário adotar tamanhos e dimensões padronizados para se obterem resultados reproduzíveis (SAKAGUSHI, 2012).

Figura 20 – Tensões complexas desenvolvidas em uma carga de compressão



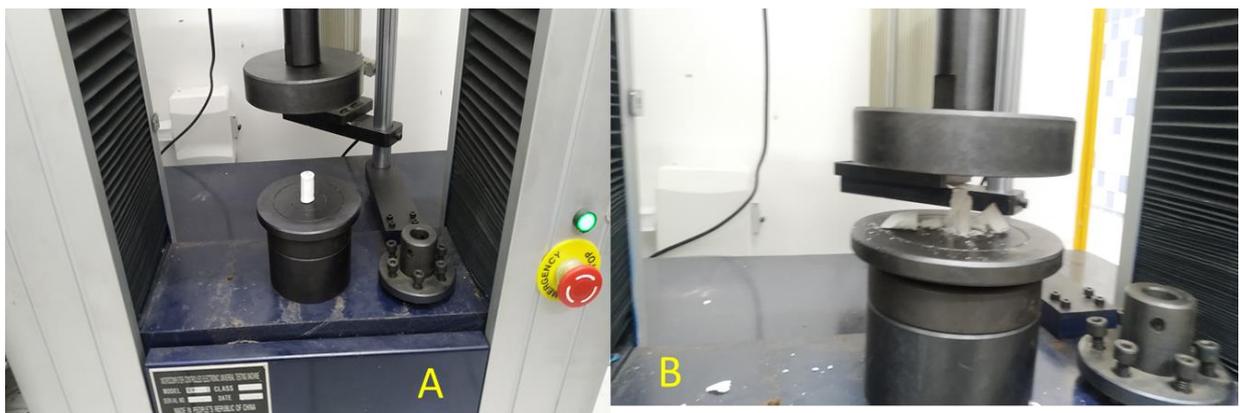
Fonte: Adaptado de SAKAGUSHI, 2012.

De acordo com Sakaguchi, 2012, no esquema de distribuição de forças da figura 20, verifica-se que, para o teste de resistência a compressão, se um corpo de prova cilíndrico for muito curto, a distribuição de tensões se torna mais complicada como resultado da formação de cones de tensões sobrepostos nas extremidades do cilindro. Se o espécime for muito comprido, pode ocorrer encurvamento durante o ensaio. Portanto, o cilindro para o ensaio deve ter um comprimento equivalente ao dobro ou até 5 vezes o seu diâmetro para se conseguir resultados mais satisfatórios. O teste de compressão é o mais adequado para comparar materiais que são frágeis e geralmente pouco resistentes em tração.

Os corpos de prova confeccionados para o teste de compressão do compósito de hidroxiapatita/citrato/colágeno tiveram seu comprimento aproximadamente o dobro do seu diâmetro. As faces dos cones foram cuidadosamente lixadas para ficarem planas para evitar problemas de cisalhamento e inclinação dos corpos de prova durante o carregamento evitando a geração de falsos resultados.

A figura 21 mostra o corpo de prova centralizado no disco inferior (A); e a quebra estilhaçada devido a uniformidade de tensões internas durante o carregamento (B). A figura 22 mostra a forma de quebra dos demais corpos de prova ensaiados.

Figura 21 – Ensaio de resistência mecânica a compressão

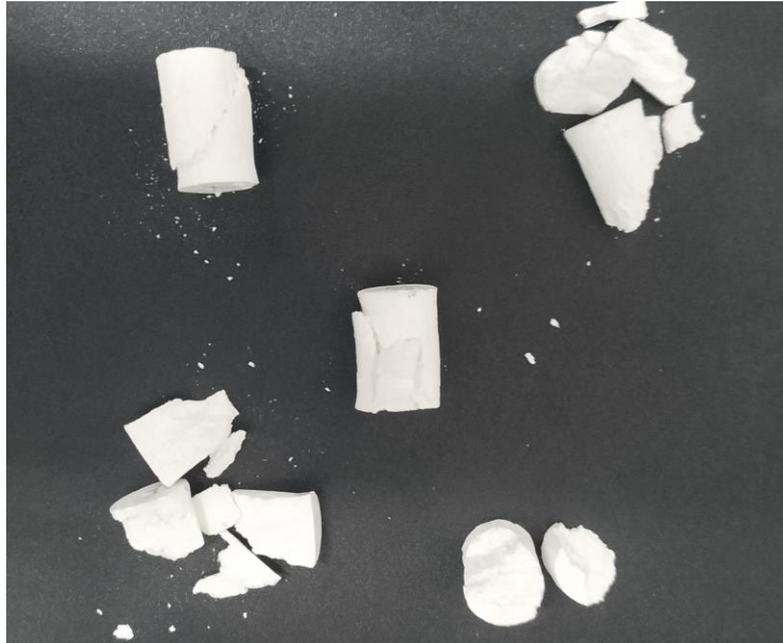


**A - Corpo de prova antes do ensaio.**

**B - Corpos de prova rompido após o ensaio**

**Fonte:** a autora, 2022.

Figura 22 – Corpos de prova após o ensaio de resistência mecânica a compressão



Fonte: a autora, 2022.

Os resultados obtidos no ensaio mecânico de resistência a compressão são apresentados na Tabela 4. Foram ensaiados 2 corpos de prova sem tratamento em forno de micro-ondas e 3 corpos de prova tratados termicamente.

Tabela 4 – Resultado do ensaio de resistência a compressão

<b>ENSAIO DE RESISTÊNCIA MECÂNICA A COMPRESSÃO</b>				
<b>Corpo de prova</b>	<b>Área da seção (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>Força máxima aplicada (kN)</b>	<b>Tensão de ruptura (Mpa)</b>	<b>Tratamento térmico em micro-ondas</b>
1	381,89	1,782	4,67	não
2	380,80	1,789	4,70	não
<b>Valor médio</b>			<b>4,685</b>	
3	392,74	2,083	5,28	sim
4	375,3	2,080	5,35	sim
5	375,95	2,244	5,97	sim
<b>Média</b>			<b>5,533</b>	

Fonte: a autora, 2022.

O osso é um composto natural poroso e denso, sua composição não homogênea e anisotrópica fornece diferentes valores para módulos de elasticidade quando o osso é testado em variados locais. As propriedades medidas neste tecido

serão dependentes da direção realizada, sendo assim ele apresenta um valor para o módulo no sentido transversal diferente do valor do módulo no sentido longitudinal. Esses valores diferentes devem-se em parte, a composição não homogênea e as fibras colágenas que formam diferentes agrupamentos dependendo do tipo do osso (SIQUEIRA, 2009).

Segundo a literatura, o osso cortical apresenta resistência à compressão de 137,8 Mpa, enquanto o osso trabeculado apresenta resistência à compressão de 41,4 MPa. A Resistência à Compressão é dada pela força aplicada para causar fratura, ou carga correspondente a 2% de deformação permanente (região elasto-plástica) dividida pela área da seção transversal original do cilindro (GRAAF, 2012).

A resistência a compressão do compósito hidroxiapatita/citrato/colágeno apresentou valores baixos quando comparados com a resistência a compressão de osso natural e a alguns substitutos de ossos comerciais . Segundo Habraken et al. (2007) são comercializados produtos substituto ósseo de alta resistência mecânica tais como Calcibon (60-70 MPa), Biosorb (15-150 MPa), Biopex (80 MPa) e Cementek (20 MPa). Estes produtos são bastante compactos. Por outro lado existem alguns substitutos comerciais que apresentam valores semelhantes aos encontrados para o compósito hidroxiapatita/citrato/colágeno com os valores obtidos experimentalmente como, por exemplo, o Pro-Osteon (2-4 MPa) e o Endobon (1-20 MPa) (HABRAKEN et al., 2007).

Uma potencial aplicação para este compósito é na regeneração de ossos esponjosos. Apesar de não apresentarem elevada resistência mecânica, diversos autores relataram que dispositivos semelhantes ao produzido foram capazes de agir como moldes durante as primeiras fases de regeneração óssea, sendo biodegradado e substituído pela nova matriz óssea a uma velocidade compatível com a formação do novo tecido.

Ao final do tratamento térmico em forno de micro-ondas foi observado aquecimento dos corpos de prova em cada fase do tratamento, e perda de peso sugerindo vibração de moléculas de água, seguida de perda de peso, como mostra a tabela de dados dos materiais e dos corpos de prova ensaiados (Tabela 5).

Tabela 5 – Resultado do ensaio de aquecimento em forno de micro-ondas

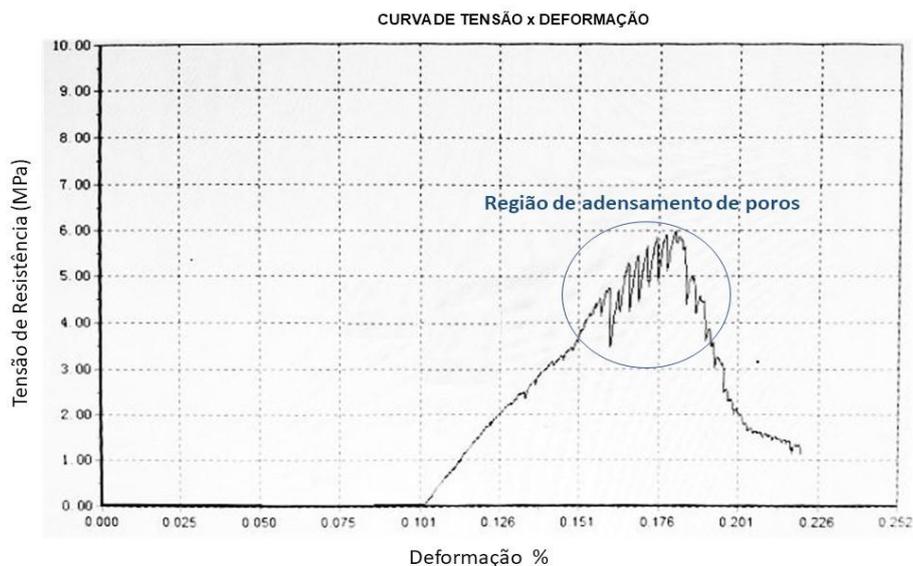
DADOS DOS MATERIAIS E DOS CORPOS DE PROVA DO COMPÓSITO					
Densidade da hidroxiapatita		3,156 g/cm <sup>3</sup>			
Densidade da gelatina		1,020 g/cm <sup>3</sup>			
Corpo de prova	Dimensões (cm)	Peso a verde (g)	Peso após tratamento térmico (g)	Densidade a verde (g/cm <sup>3</sup> )	Densidade após tratamento térmico (g/cm <sup>3</sup> )
1	1,42 x 2,72	3,9636	-	1,037	-
2	1,40 x 2,72	4,3137	-	1,133	-
3	1,45 x 2,69	4,0679	3,9756	1,043	1,019
4	1,39x 2,70	4,1286	4,0499	1,088	1,067
5	1,39 x 2,69	4,1084	4,0065	1,099	1,072
VALOR MÉDIO				1,0798	1,0600

Fonte: a autora, 2022.

Foi avaliado que os corpos de prova do compósito hidroxiapatita/citrato/colágeno apresentavam densidade bastante reduzida em relação à densidade dos materiais de partida, sugerindo um corpo de prova bastante poroso, o que pode justificar sua baixa resistência mecânica a compressão.

A sugestão de material com grande quantidade de poros também pode ser avaliada através da curva de Tensão x Deformação do ensaio de resistência mecânica à compressão, como mostrado na figura 23.

Figura 23 – Curva de tensão com região de adensamento de poros



Fonte: a autora, 2022.

A curva acima mostra uma sequência de queda de tensão durante o carregamento, característico de acomodação de estruturas internas do corpo de prova até o adensamento total e atingir a tensão de ruptura à compressão.

## 6 CONCLUSÃO

Nas últimas décadas, o setor de biomateriais não só cresceu em número de produtos disponíveis e em desenvolvimento, mas também avançou economicamente de maneira significativa. Entretanto, apesar da grande disponibilidade atual de biomateriais, os desenvolvimentos nesta área são ainda uma necessidade, visto que boa parte dos dispositivos tecnologicamente mais avançados está restrita ao uso somente por uma pequena parcela da população.

Apesar do uso de biomateriais já estar bem consolidado nas mais diversas aplicações, o desenvolvimento de biomateriais inovadores de aplicação na área de engenharia de tecidos e culturas de células têm papel de grande relevância e demandarão muitos esforços e investimentos.

De acordo com os resultados alcançados neste trabalho, o compósito de hidroxiapatita/citrato/colágeno parcialmente hidrolisado obtido mostrou grande potencial para uso em enxertia óssea como suporte de adesão e proliferação celular, apresentando-se como material poroso e com resistência mecânica similar a produtos comerciais.

A rota de síntese do pó cerâmico de hidroxiapatita com aquecimento e em meio fortemente alcalino mostrou-se adequada para a obtenção de material denso de alta cristalinidade e com bom rendimento de reação estequiométrica.

O método de *gelcasting* para a confecção dos corpos de prova utilizando peças em gesso para reduzir o excesso de água apresentou excelentes resultados formando corpos de prova porosos com dimensões estáveis, sem defeitos de bolhas, falta de preenchimento ou distorções.

A dispersão do pó cerâmico de hidroxiapatita em uma solução de colágeno parcialmente hidrolisado com as proporções similares às encontradas no osso natural, produziu um gel elástico, que forma corpos firmes e flexíveis após 24 horas de conformados, sugerindo a possibilidade de conformação de *scaffolds* para substituição e enxertia óssea com formas complexas, diferente da maioria dos produtos comerciais.

O processo de tratamento térmico utilizando a radiação em forno de micro-ondas nas condições proposta, (5 ciclos de aquecimento de 15 segundos em potência máxima de radiação e 5 minutos de intervalo entre ciclo) com o objetivo de

aquecimento gradual do material para redução do teor de água e promover a retrogradação das fibras de colágeno, promovendo a formação parcial de tripla hélice do colágeno foi capaz de promover um pequeno adensamento dos corpos de prova, porém, com um incremento de 0,848 MPa na resistência mecânica a compressão do compósito, correspondente a um aumento de 18,1 % da resistência a compressão do material, indicando o enrijecimento da matriz de colágeno.

Este aumento substancial na resistência mecânica desse compósito sugere a necessidade de trabalhos futuros de aprimoramento do processo de tratamento térmico utilizando a radiação de forno de micro-ondas para materiais formulados com matriz de colágeno parcialmente hidrolisado.

Também é sugestivo a realização de trabalhos futuros para avaliar a morfologia do grão de hidroxiapatita obtida pelo método de síntese da rota 3 desenvolvida neste trabalho, bem como a avaliação do efeito da distribuição e tamanho de poros em corpos de prova produzidos com o gel similar ao produzido neste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- ALBBE, F. H. Studies in bone growth triple calcium phosphate as stimulus to osteogenesis. *Annals of Surgery*. v. 71, p. 32-36, 1920.
- AN, B., LIN, Y-S. & BRODSKY, B. (2016). Collagen interactions: Drug design and deliver. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97: 69-84.
- ANDERSON. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Res* 2001;31:81-110
- ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*. v. 21, Issue 7, April 2000, Pages 667-681 [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00242-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00242-2)
- AQUINO-GUERRA, A., LINARES, C.F. Hidroxiapatita: síntesis y caracterización. *Unidad de Síntesis de Materiales y Metales de Transición. Facultad de Ciencias y Tecnología. Universidad de Carabo. Venezuela V. 9. N. 3. Septiembre - 2020*
- ARTAS,G.; GUL, M.; ACIKAN, I.; KIRTAY, M.; BOZOGLAN, A.; YAMAN S. S. F.; DUNDAR . A comparison of different bone graft materials in peri-implant guided bone regeneration. *Braz. Oral Res*. 2018;32:e 59.
- BALDWIN, P., D. J. LI, D. A. AUSTON, H. S. MIR, R. S. YOON, AND K. J. KOVAL. Autograft, allograft, and boné graft substitutes. *J. Orthop. Trauma* 33:203–213, 2019.
- BATISTA, T. M. Mineralização in vitro de matrizes de colágeno aniônico derivadas de tecidos biológicos. 2008. 115 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- BATISTA, T.S.A., SANTOS-FILHO, J.B. Calcita, Hidroxiapatita e  $\beta$ -Fosfato tricálcico como absorvedores de ultravioleta. E-Book 1 ed. Aracajú (2016) 193.p. IFS.
- BEST, S. M., PORTER, A. E., THIAN, E. S. HUANG, J. EUR, J. *Ceram. Soc.* 28 (2008) 1319-1327
- BERNAL, V.M.; STANLEY, D.W. Stability of Bovine Muscle Connective Tissues. *J. Food Sci.*, Chicago, v. 52, n. 4, p. 876– 878, 1987.
- BIGGEMANN, J.; KÖLLNER D.; SIMON S.; HEIK P.; HOFFMANN P. AND FEY,T. Porous Functional Graded Bioceramics with Integrated Interface Textures. *Ceramics* 2021, 4, 681–695. <https://doi.org/10.3390/ceramics4040048>
- BISHT, B., HOPE A., MUKHERJEE A. , and PAUL, M. K. Advances in the Fabrication of Scaffold and 3D Printing of Biomimetic Bone Graft. *Annals of Biomedical Engineering Society*. Published on line: 05 March 2021.
- BOILET L., DESCAMPS M., RGUITI E., TRICOTEAUX A., LU, J., PETIT, F., et al. Processing and properties of transparent hydroxyapatite and tricalcium phosphate obtained by hip process. *CERAM INT* 2013;39(1):283–8

BONAN, R. F., BONAN, P. R. F., BATISTA, A. U. D., OLIVEIRA, J. E., MENEZES, R. R., MEDEIROS, E. S.. Métodos de reforço microestrutural da hidroxiapatita. *Cerâmica* 60 (2014) 402-410

BOSE, S. AND SAHA, S. K. Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Nanopowders by Emulsion Technique. *Chem. Mater.* 2003, v. 15. p. 4464–4469  
<https://doi.org/10.1021/cm0303437>

BROUGHTON, G., 2ND, JANIS, J. E., & ATTINGER, C. E. (2006). The basic science of wound healing. *Plastic and reconstructive surgery*, 117(7 Suppl), 12S–34S.

CALASANS-MAIA, M. D.; MOURÃO, C. F. A. B. RESENDE, R. F. B. Avaliação clínica de compósito constituídos por fosfato de cálcio nanoestruturado e biopolímero associado à células osteoprogenitoras como alternativa à biocerâmica para a uso na rede SUS na regeneração óssea. *Com. Ciências Saúde.* 2017; 28(1):79-84

CARVALHO, E.V. Apatitas nanoparticuladas incorporadas a matrizes poliméricas para aplicação odontológica. 2017,135f. Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de química. Programa de pós-graduação em química, Fortaleza, Ceará, 2017.

CATIRSE, A. B.; REIS, A. C. ; NASCIMENTO, C. SOUZA, F. C. In: Manual de materiais dentários. USP – Faculdade de Odontologia. Ribeirão Preto, 2020. p.15.

CHAPMAN AND HALL. Thickening and gelling agents for food, 2nd edition, Blackie Academic & Professional, 1997. London, p. 150-153

CHANG, N.J., LIN, C.C., LI, C.F., WANG, D.A., ISSARIYAKU. N., YEH, M.L. The combined effects of continuous passive motion treatment and acellular PLGA implants on osteochondral regeneration in the rabbit. *Biomaterials* 2012;33:3153e63.

CHANG, S.W. & BUEHLER, M.J. (2014). Molecular biomechanics of collagen molecules. *Materials Today*, 17(2): 70-76.

CHEN, P. Y., LIN, A. Y. M., LIN, Y. S., SEKI, Y., STOKES, A. G., PEYRAS, J., OLEVSKY, E. A., MEYERS, M. A., MCKITTRICK, J., MECH, J.. *Behavior Biomed. Mater.* 1 (2008) 208-226.

CHUNG, H. J. & UITTO, J. (2010). Type VII Collagen: The Anchoring Fibril Protein at Fault in Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Dermatologic Clinics*, 28(1): 93-105.

CLARK, D. E., SUTTON, W. H. Microwave processing of materials. *Annu. Rev. Mater. Sci.* 26 (1996) 299

COSTA, A.C.F.M. et al. Hidroxiapatita: obtenção, caracterização e aplicações. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos.* v.43, p.29-38, 2009.

COSTA, F.R.T. Microscopia eletrônica de varredura: potencialidades e aplicações. UFMA. 2016.

COSTELLO, L.C.; CHELLAIAH, M.; ZOU, J.; FRANKLIN, R.B.; REYNOLDS, M.A. The status of citrate in the hydroxyapatite/collagen complex of bone, and its role in bone formation. *J. Regen. Med. Tissue Eng.* 2014, 3, 4.

CONSTANTINO, P. D., FRIEDMAN, C. D. "Synthetic Bone Graft Substitutes", Craniofacial Skeletal Augmentation and Replacement, *Otolaryngologic Clinics of North America*, Vol. 27, n.5, pp 1037-1074, Oct. 1994.

CURRAN, D.J., FLEMING, T.J., TOWLER, M.R., HAMPSHIRE, S. Mechanical properties of hydroxyapatite–zirconia compacts sintered by two different sintering methods. *J Mater Sci Mater Med* 2010;21(4):1109–20.

CURRAN, D.J., FLEMING, T.J., TOWLER, M.R., HAMPSHIRE, S. Mechanical parameters of strontium doped hydroxyapatite sintered using microwave and conventional methods. *J Mech Behav Biomed Mater* 2011;8:2063–73.

DACULSI G, LABOUX O, MALARD O, WEISS P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J Mater Sci Mater Med.* 2003;14:195–2003.

DAMADZADEH, B., JABARI, H., SKRIFVARS, M., AIROLA, K., MORITZ, N., VALLITTU, P.K. Effect of ceramic filler content on the mechanical and thermal behaviour of poly-L-lactic acid and poly-L-lactic-co-glycolic acid composites for medical applications. *J Mater Sci Mater Med.* v.21, n.9, p.2523-2531, 2010.

DAVIES, J. E. Histodynamics of endosseous wound healing. In: Davies J.E., editors. *Bone engineering*. Canada: EM2. 2000. pp. 1-11

DAVIES, J. E.; MÜLLER, K.H.; WONG, W.C.; PICKARD, C.J.; REID, D.G.; SKEPPER, J.N.; DUER, M.J. Citrate bridges between mineral platelets in bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014, 111, E1354–E1363

DELLOYE, C., CORNU, O., DRUEZ, V., BARBIER, O. Bone allografts: What they can offer and what they cannot. *J Bone Joint Surg Br.* v.89, n.5, p.574-579, 2007.

DELGADO-LÓPEZ, J.M.; BERTOLOTTI, F.; LYNGSØ, J.; PEDERSEN, J.S.; CERVELLINO, A.; MASCIOCCHI, N.; GUAGLIARDI, A. The synergic role of collagen and citrate in stabilizing amorphous calcium phosphate precursors with platy morphology. *Acta Biomater.* 2017, 49, 555–562.

DESCAMPS, M., BOILET, L., MOREAU, G., TRICOTEAUX, A., LU, J., LERICHE, A. et al. Processing and properties of biphasic calcium phosphates bioceramics obtained by pressureless sintering and hot isostatic pressing. *J Eur Ceram Soc* 2013;33(7):1263–70.

DIAS, E. C. L.; COTRIM, K. C.; CONZ M. B. Associação da regeneração óssea guiada (ROG) e hidroxiapatita sintética (HA) para resolver complicações no tratamento com implantes dentários: relato de caso clínico com análise histológica. *Relato de caso clínico: Caderno científico. ImplantNews* 2014;11(4):469-73.

DICKENS, F. The citric acid content of animal tissues, with reference to its occurrence in bone and tumour. *Biochem. J.* 1941, 35, 1011–1023.

DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphates - Occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications. *Biomater.* Vol.1. pp 121-164, 2011.

DUTEIL, L.; QUEILLE-ROUSSEL C.; MAUBERT Y.; ESDAILE, BRUNO-BONNET, J. C. ; LACOUR, J.-P. Specific natural bioactive type 1 collagen peptides oral intake reverse skin aging signs in mature women. *Journal of Aging Research & Clinical Practice* V, 5, N. 2, 2016

ELANGO, J., BU, Y., BIN, B., GEEVARETNAM, J., ROBINSON, J.S. & WU, W. (2017). Effect of chemical and biological cross-linkers on mechanical and functional properties of shark catfish skin collagen films. *Food Bioscience*, 17: 42-51.

ELLIOT, J. C. Structure and chemistry of the Apatites and other Calcium Orthophosphates. *Studies in inorganic chemistry* v. 18, Elsevier Science B.V. 1994.

EPPLE M, GANESAN K, HEUMANN R, KLESING J, KOVTUN A, NEUMANN S, ET AL. Application of calcium phosphate nanoparticles in biomedicine. *Journal of Materials Chemistry*. vol. 20, pp.18-23, 2010.

ESTEVES, T. Características dos Materiais de Regeneração Óssea existentes em Portugal. Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz. (2014)..

FABRI, M.; CELOTTI, G. C.; RAVAGLIOLI, A. Hydroxiapatite-Based Prous Aggregates: Physico-Chemical Nature, Structure, Texture and Architecture. *Biomaterials*, v.16, p. 225, 1995

FAUZI, M.B., LOKANATHAN, Y., AMINUDDIN, B.S., RUSZYMAH, B.H.I. & CHOWDHURY, R.S. (2016). Ovine tendon collagen: Extraction, characterisation and fabrication of thinfilms for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering C*, 68:163–171.

FILHO, E, A. et al. Biomateriais: deposição de hidroxiapatita sobre superfície de Ti-cp modificada por aspersão térmica. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1229-1232, 2007.7.

FERRIER, D. R.. *Bioquímica ilustrada*. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019

FLORENCIO-SILVA, R.; SASSO, G. R. S.; SASSO-CERRI, E.; SIMÕES, M. J.; CERRI, P. S. *Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells*. Hindawi Publishing Corporation *BioMed Research International* Volume 2015, Article ID 421746, 17 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/4217>

GHAHRAMANPOOR, M.K., HASSANI, N.S.A., ABDOUSS, M., BAGHERI, F., BAGHABAN, E.M. A hydrophobically-modified alginate gel system: utility in the repair of articular cartilage defects. *J Mater Sci Mater Med* 2011;22:2365e75

GILSENAN, P.M. AND ROSS-MURPHY, S.B. Rheological characterisation of gelatins from mammalian and marine sources. *Food Hydrocolloids* 2000. 14: 191-195.

GÓMEZ-BARRENA, E. Bone regeneration: stem cell therapies and clinical studies in orthopaedics and traumatology. *J Cell Mol Med.* 2011. v.15, n.6, p.1266-86, 2011.

GRAAF, G. M. M. V. Avaliação da resistência mecânica à compressão axial de diferentes formulações de poliuretana de mamona com carbonato de cálcio e de quitosana com fosfato de cálcio. 101f. (Dissertação de Mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo 2012.

GRANCHI, D., BALDIN N., ULIVIERI, F. M., CAUDARELLA R. Role of Citrate in Pathophysiology and Medical Management of Bone Diseases. *Nutrients Journal* 2019, 11, 2576; doi:10.3390/nu11112576

GUASTALDI, A. C., APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Quím. Nova* vol.33 no.6 São Paulo 2010.

GU, Y.W., LOH, N.H., KHOR, K.A., TO, R. SB., CHEANG, P. Plasma sintering of hydroxyapatite powders. *Biomaterials* 2002;23(1):37–43.

GUDMUNDSSON, M.. Rheological properties of fish gelatin. *Journal of Food Science* 2002. 67 (6): 2172-2176

GUTIERRES, M., LOPES, M. A., HUSSAIN, M.S., et al., “Substitutos Ósseos Conceitos Gerais e Estado Actual”, *Arquivos de Medicina*, v. 19, n. 4, pp. 1 – 10, 2006.

HABRAKEN, W.J.E.M., WOLKE, J.G.C., JANSEN, J.A. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug for drug delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, v. 59, p. 234-248

HAIDER, A. et al., Recent Advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite. A review. *The Royal Society of Chemistry*, v.7, n 13, p. 7442-7458, 2017.

HENCH, L.L., 1991. Bioceramic: From concept to clinic. *J. Am. Ceramic Soc.*, 74: 1487-1510

HENKEL, J., WOODRUFF, M. A., EPARI, D. R., et al., “Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions – A 21<sup>st</sup> Century Perspective”, *Bone Research*, v. 3, pp. 216 – 248, 2013.

HOLMBOM, J., SODERGARD, A., EKHOLM, E., MARTSON, M., KUUSILEHTO, A., SAUKKO, P., et al. Long-term evaluation of porous poly(epsilon-caprolactone-co-L-lactide) as a bone-filling material. *J Biomed Mater Res A* 2005;75:308e15.

HOOSHMAND, S., NORDIN, J., AKHTAR, F. Porous alumina ceramics by gel casting: Effect of type of sacrificial template on the properties. *Int J Ceramic Eng Sci.* 2019;1:77–84.

HU, Y.Y.; RAWAL, A.; SCHMIDT-ROHR, K. Strongly bound citrate stabilizes the apatite nanocrystals in bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107, 22425–22429.

HUBBELL, J. A., "Biomaterials in Tissue Engineering", *Biotechnology*, 13, June, 1995.

JAMILAH, B. AND HARVINDER, K.G. Properties of gelatins from skins of fish-black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food Chemistry* 2002. 77: 81-84

JANNEY, M.A.; KIMREY, H.D.; ALLEN, W.R.; KIGGANS, J.O. Enhanced diffusion in sapphire during microwave heating. *J. Mater. Sci.* 1997, 32, 1347–1355.

JUNQUEIRA, L.C. E CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 10ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2004

KANE, R.J. Hydroxyapatite reinforced collagen scaffolds with improved architecture and mechanical properties. *Acta Biomater.* v.17, n.[S.I], p.16-25, 2015.

KAWACHI, E.Y., et al. *Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de uma Área Interdisciplinar*, Química Nova, IQ/UNICAMP- SP, 2000.

KEMPFERT, K.D.; JIANG, E.Y.; OAS, S.; COFFIN, J. *Detectors for Fourier Transform Spectroscopy*. Thermo Nicolet Spectroscopy Research Center, Madison, WI, USA. 2001.

KIKUCHI, M. Hydroxyapatite/collagen bone-like nanocomposite. *Biol Pharm Bull.* v.36, n.11, p.1666-1669, 2013.

KRICHELDORF, F. Substitutos ósseos-Quando utilizá-los? In: Carvalho, PSP. (Ed.). *Osseointegração 20 anos, Visão contemporânea da implantodontia*. São Paulo: Quintessence, p.97-122, 2009.

KRISHNAMOORTHY, J., RAMASAMY, P., SHANMUGAM, V. & SHANMUGAM, A. (2017). Isolation and partial characterization of collagen from outer skin of *Sepia pharaonis* (Ehrenberg, 1831) from Puducherry coast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 10: 39-45.

LEGEROS, R. Z. Properties of Osteoconductive Biomaterials: Calcium Phosphates. section i symposium: bioactive materials in orthopaedic surgery. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007): February 2002 - Volume 395 - Issue - pp 81-98*

LEHNINGER, A. L.; NELSON, L. D.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica*. 3 ed. São Paulo: SARVIER, 2002, 1009 p

LEVITT, G. E.. Forming methods for apatite prothesis. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 3, n. 4, p. 683-685, 1969.

LIAO, Y., LAN, J., ZHANG, C., HONG, T., YANG, Y., HUANG, K., ZHU, H. A Phase-Shifting Method for Improving the Heating Uniformity of Microwave Processing Materials. *Materials* 2016, 9, 309; doi:10.3390/ma9050309

LIMA, C. J. et al. Resposta do tecido subcutâneo de camundongos à implantação de um novo biovidro à base de óxido de nióbio. *Matéria*, Rio de Janeiro, v. 16, n. 1, p. 574-582, 2011.

LIU, D. M. Porous Hydroxyapatite Bioceramics. In: *Trans Tech Publications*. (Ed.) *Porous Ceramic Materials*. Switzerland: Trans Tech Publications, p. 209, 1996.

LOGAN T. J. Ma Q.Y.; Traina S.J. Lead immobilization from Aqueous Solutions and Contaminated Soils Using Phosphate Rocks. *Environ. Sci. Technol.*, v. 29, p. 1118-1126, 1995

LOTSARI, A.; RAJASEKHARAN, A.K.; HALVARSSON, M.; ANDERSSON, M. Transformation of amorphous calcium phosphate to bone-like apatite. *Nat. Commun.* 2018, 9, 4170

LYONS, F.G. et al. The healing of bony defects by cell-free collagen-based scaffolds compared to stem cell-seeded tissue engineered constructs. *Biomaterials*. v.31, n.35, p.9232–9243, 2013.

LYONS, F.G., GLEESON, J.P, PARTAP, S., COGHLAN, K., O'BRIEN, F.J. Novel microhydroxyapatite particles in a collagen scaffold: a bioactive bone void filler? *Clin Orthop Rel Res*. v.472, n. 4, p.1318–1328, 2014.

MACHADO, M. (2019). *Regeneração Óssea em Medicina Dentária- Estado da Arte*. Instituto Unversitário Egas Moniz

MASILAMANI, D., MADHAN, B., SHANMUGAM, G., PALANIVEL, S. & NARAYAN, B. (2016). Extraction of collagen from raw trimming wastes of tannery: a waste to wealth approach. *Journal of Cleaner Production*, 113: 338-344.

MATTHEW, B., GREENBLATT, M.B., SHIM, J-H. Osteoimmunology: A Brief Introduction. *Immune Network*. v.13, n.4, p.111-115, 2013.

MAWUNTU, V. J. AND YUSUF, Y. Porous structure engineering of bioceramic hydroxyapatite-based scaffolds using PVA, PVP, and PEO as polymeric porogens. *Journal of Asian Ceramic Societies* 2019, vol. 7, no. 2, 161-169.

MENEZES, R. R., SOUTO, P. M., KIMINAMI, R. H. G. A. Sinterização de cerâmicas em microondas. Parte I: Aspectos fundamentais. *Cerâmica* 53 (2007) 1-10

MICULESCU F., MOCANU A., MAIDANIUC A., DASCĂLU C., MICULESCU M., VOICU, Ș. I., CIOCOIU, R. Biomimetic Calcium Phosphates Derived from Marine and Land Bioresources. In: *Hydroxyapatite - Advances in Composite Nanomaterials, Biomedical Applications and Its Technological Facets*. 2017 (6). <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.71489>

MONROE, E. A.; Votava, W.; Bass, D. B.; McMullen, J. New calcium phosphate ceramic material for bone and tooth implants. *Journal of Dental Research*, v. 50, n. 4, p. 860-862, 1971.

- MURPHY, C.M. et al. A collagen–hydroxyapatite scaffold allows for binding and codelivery of recombinant bone morphogenetic proteins and bisphosphonates. *Acta Biomater.* v.10, n.5, p.2250–2258, 2014.
- MYLLYHARJU, J. & KIVIRIKKO, K.I. (2004). Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends in Genetics*, 20: 33-43.
- NERY, E.B.; Lynch, K. L.; Hirthe, W. M.; Muller, K. H. Bioceramics implants in surgically produced infrabony defects. *Journal of Periodontology*, v. 46, n. 6, p. 328-339, 1975.
- NETO, A. S. AND FERREIRA J. M. F. Synthetic and Marine-Derived Porous Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials* 2018, V.11, P. 1702; doi:10.3390/ma11091702
- OCAK H, KUTUK N, DEMETOGLU U, BALCIOGLU E, OZDAMAR S, ALKAN A. Comparison of bovine bone-autogenic bone mixture versus platelet-rich fibrin for maxillary sinus grafting: histologic and histomorphologic study. *J Oral Implantol.* 2017 Jun;43(3):194-201.
- ORTEGA, F. S., INOSTROZA, P. A. S., PANDOLFELLI, V. C. Avaliação de sistemas gelificantes para a produção de cerâmicas porosas através da técnica “gelcasting” de espumas *Cerâmica* 46, 300 (2000) 225.
- ORWOLL, E. S. Clinical practice guidelines for osteoporosis: Translating data to patients *Ann. Intern. Med.* 166:852–853, 2017.
- ORYAN, A.; ALIDADI, S.; BIGHAM-SADEGH A.; MEIMANDI-PARIZI, A. Chitosan/gelatin/platelet gel enriched by a combination of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate in healing of a radial bone defect model in rat. *International Journal of Biological Macromolecules.* V. 101, August 2017, P. 630-637.
- PIGOSSI, S. C. et al. Bacterial cellulose-hydroxyapatite composite with osteogenic growth peptide (OGP) or penapeptide OGP on bone regeneration in critical size calvarial defect model. *J Biomed Mater Res A.* v. 103, n. 10, p. 3397-3406, 2015.
- PRAKASAM, M.; LOCS, J.; SALMA-ANCANE, K.; LOCA, D.; LARGETEAU, A.; BERZINA-CIMDINA, L. FABRICATION, Properties and Applications of Dense Hydroxyapatite: A Review. *J. Funct. Biomater.* 2015, 6, 1099-1140. <https://doi.org/10.3390/jfb6041099>
- PROUBASTA J, Mur JG, Planell JA. Biocompatibilidad, materiales implantables, tipos de implante. In: *Fundamentos de Biomecânica y Biomateriales*, Ediciones Ergon. Madrid. 1997. pp. 271-350.
- QI. M.L., et al., Hydroxyapatite Fiber. A review of synthesis methods. *The Journal of Minerals, Metals and Materials Society.* V 69, n. 8, p. 1354-1360, 2017.
- RATNAYAKE, J.T.B.; MUCALO, M.; DIAS, G.J. Substituted hydroxyapatites for bone regeneration. A review of courente trends. *Journal of Biomedical Materials Reserch Pert B; Aplied Biomaterials*, v. 105.n.5,p 1285-1299, 2016.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E.; An Introduction to Materials in Medicine, Academic Press: New York, 1996.

RAVAGLIOLI, A.; KRAJEWSKI, A. Bioceramics: Materials properties applications. New York: Chapman & Hall, 1992.

RAYNAUD, S. CHAMPION, E. LAFON, J.P. BERNACHE-ASSOLLANT, D. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio III. Mechanical properties and degradation in solution of hot pressed ceramics. *Biomaterials* 2002;4:1081–9.

REY, C., COMBES, C., DROUET, C., & GLIMCHER, M. J. Bone mineral: update on chemical composition and structure. *Osteoporos Int* (2009) 20:1013–1021. DOI 10.1007/s00198-009-0860-y

REZWAN, K. , CHEN, Q. Z. , BLAKER, J. J. , BOCCACCINI, A. R.\_ Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006 Jun;27(18):3413-31. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.039.

RODELLA, L.F., FAVERO, G., LABANCA, M. Biomaterials in Maxillofacial Surgery: Membranes and Grafts. *Int J Biomed Sci*. v.7, n.2, p.81-88, 2011.

ROMANO, R. C. O., PANDOLFELLI, V. C. Obtenção e propriedades de cerâmicas porosas pela técnica de incorporação de espuma. *Cerâmica* 52 (2006) 213-219

ROSETI, L., V. PARISI, M. PETRETTA, C. CAVALLO, G. DESANDO, I. BARTOLOTTI, AND B. GRIGOLO. Scaffolds for bone tissue engineering: State of the art and new perspectives. *Mater. Sci. Eng. C* 78:1246–1262, 2017

ROY, R.; AGRAWAL, D.; CHENG, J.; GEDEVANISHVILI, S. Full sintering of powdered-metal bodies in a microwave field. *Nature* 1990, 399, 668–670  
 RYAN, A. J. GLEESON, J. P. MATSIKO , A. THOMPSON, E. M. O'BRIEN, E. F. J. Effect of different hydroxyapatite incorporation methods on the structural and biological properties of porous collagen scaffolds for bone repair. *J Anat*. 2015 Dec; 227(6): 732–745.

RUFFINI, A.; SPRIO, S.; PRETI, L. AND TAMPIERI, A. Synthesis of Nanostructured Hydroxyapatite via Controlled Hydrothermal Route in Biomaterial-supported Tissue Reconstruction or Regeneration. *IntechOpen*, 2018.

SAERI, M.R.; AFSHAR, A.; GHORBANI, M.; EHSANI, N.; SORRELL, C.C.. The wet precipitation process of hydroxyapatite. *Materials Letters*, v. 57, n. 24-25, p. 4064-4069, ago. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-577x\(03\)00266-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-577x(03)00266-0).

SAKAGUSHI, R.L., POWERS, J.M. Graig, materiais dentários restauradores 13 ed.. tradução de Cintia Garcia Cardoso et al.. Rio de Janeiro. Elsevier, 2012. 416p.: il.; 24cm

SENA, L. A. Produção e caracterização de compósitos hidroxiapatita – colágeno para aplicações biomédicas. 2004. 107f. Tese (Doutorado em Engenharia

Metalúrgica e de Materiais) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto Alberto Luiz Coimbra, Rio de Janeiro, 2004.

SENARATNE, L.S., PARK, P.J. & KIM, S.K. (2006). Isolation and characterization of collagen from brownbacked toadfish (*Lagocephalusgloveri*) skin. *Bioresource Technology*, 97:191-197.

SEPULVEDA, P., BRESSIANI, A.H., BRESSIANI, J.C., MESEGUER, L. AND KÖNIG, B., JR. (2002), In vivo evaluation of hydroxyapatite foams. *J. Biomed. Mater. Res.*, 62: 587-592. <https://doi.org/10.1002/jbm.10173>

SILVA, C. L. A. et al. Caracterização microestrutural do compósito hidroxiapatia bovina-biovidro. *Rev. Militar Ciênc. Tecnol.*, Rio de Janeiro, v. 28, n. 1, p. 8-23, 2011.8.

SIQUEIRA, L. C. B. Formulação e Caracterização de Biomateriais Compósitos com Hidroxiapatita. 136f. (Dissertação de Mestrado). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2009

SÖDERHÄLL, C., MARENHOLZ, I., KERSCHER, T., RUSCHENDORF, F., ESPARZA-GORDILLO, J., WORM, M., GRUBER, C., MAYR, G., ALBRECHT, M., ROHDE, K., SCHULZ, H., WAHN, U., HUBNER, N. & LEE, Y. (2007). Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with atopic dermatitis. *PLOS Biology*, 5:1952-1961

SOHN, H. S., AND J. K. OH. Review of bone graft and bone substitutes with an emphasis on fracture surgeries. *Biomater. Res.* 23:9, 2019.

SOKOLOVA, V., K. KOSTKA, K. T. SHALUMON, O. PRYMAK, J.- P. CHEN, AND M. EPPLE. Synthesis and characterization of PLGA/HAP scaffolds with DNA-functionalised calcium phosphate nanoparticles for bone tissue engineering. *J. Mater. Sci.* 31:1–12, 2020.

SUBRATA, S.; RAM MOHAN, V.C.; DELREGNO, G.E. Method of Microwave Processing Ceramics and Microwave Hybrid Heating System for Same. U.S. Patent 2007/0023971 A1, 1 February 2007.

THOSTENSON, E. T., CHOU, T. W. Microwave processing: fundamentals and applications. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* (1999) 30.1055 - 1071

TSAY, J. et al. Bone loss caused by iron overload in a murine model: importance of oxidative stress. *Blood*. v.116, n.14, p.2582-2589, 2010.

TSUKUI, A.; REZENDE, C. M. Extração Assistida por Micro-ondas e Química Verde. *Rev. Virtual Quim.*, 2014, 6 (6), 1713-1725.

URIST M.R., HUO Y.K., BROWNWLL A.G., et al. Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81(2):371-5.

URIST, M.R. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 1965. Vol. 150, Issue 3698, pp. 893-899 DOI: 10.1126/science.150.3698.893

VACCARO, A. R. The Role of the Osteoconductive Scaffold in Synthetic Bone Graft. *Orthopedics* 2002; 25 (suppl 5): S71- 8.

VALTANEN, R. S. A; YANG A, Y. P.; GURTNER G. C. B.; , MALONEY, W. J. A.; LOWENBERG, D. W. Synthetic and Bone tissue engineering graft substitutes: What is the future?. R.S. Valtanen, Y.P. Yang and G.C. Gurtner et al. / *Injury* 52S2 (2021) S72–S77

VAN DER STOK J, VAN LIESHOUT EMM, EL-MASSOUDI Y, VAN KRALINGEN GH, PATKA P. Bone substitutes in the Netherlands – a systematic literature review. *Acta Biomater* 2011;7(February (2)):739–50. [1878–7568].

VELJOVIĆ, D., ZALITE, I., PALCEVSKIS, E., SMICIKLAS, I., PETROVIĆ, R., JANAČKOVIĆ, D. Microwave sintering of fine grained HAP and HAP/TCP bioceramics. *Ceram Int* 2010;2:595–603.

VIDAL, A. R.; ,T. E; MELLO, R. O.; SCHMIDT, M. M.; KUBOTA, E. H. DEMIATE, I. M. ; ZIELINSKI, A. A.; DORNELLES, F. R. C. P. Effects of enzymatic hydrolysis (Flavourzyme<sup>®</sup>) assisted by ultrasound in the structural and functional properties of hydrolyzates from different bovine colagens *Food Sci. Technol, Campinas*. 38(Suppl. 1): 103-108, Dec. 2018

WAHYUNINGSIHA, R.; RUSMANA, NURLIYANIA, PERTIWININGRUMA, Ambar; ROHMANB, Abdul; FITRIYANTOA, Nanung A.; ERWANTOA, Yuny. Optimization of Acid Soluble Collagen Extraction from Indonesian Local “Kacang” Goat Skin and Physico-Chemical Properties Characterization. *Chemical engineering transactions* vol. 63, 2018.

WANG, H., LI, Y., ZUO, Y., LI, J., MA, S., CHENG, L. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. V.28, n. p. 3338-3348, 2007.

WANG, X.L., FAN, H.S., XIAO, Y.M., ZHANG, X.D. Fabrication and characterization of porous hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate ceramics by microwave sintering. *Mater Lett* 2006;60(4):455–8.

WEINER, S. AND TRAUB, W. “Bone structure: from angstroms to microns,” *The FASEB Journal*, vol. 6, no. 3, pp. 879–885, 1992.

WEITZMANN, M.N. The Role of Inflammatory Cytokines, the RANKL/OPG Axis, and the Immunoskeletal Interface in Physiological Bone Turnover and Osteoporosis. *Scientifica (Cairo)*. 2013. doi: 10.1155/2013/125705.

WOLF, K.L. Propriedades físico-químicas e mecânicas de biofilmes elaborados a partir de fibra e pó de colágeno. *Dissertação. unesp - São José do Rio Preto : [s.n], 2007..*

XIE, B.; NANCOLLAS, G.H. How to control the size and morphology of apatite nanocrystals in bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107, 22369–22370.

YANG, L.; ZHANG, L.; AND WEBSTER, T. J. *Adv. Eng. Materials*, 2011, 13 No. 6, B197-217.

YELTEN, A., YILMAZ, S., OKTAR, F. N. *Ceram. Int.* 38 (2011) 2659-2665.

## ANEXO A – FOLHA DE SUBMISSÃO DE ARTIGO

Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials



Journal of Biomedical  
Materials Research  
Part B: Applied Biomaterials

### DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF COLLAGEN- IMPREGNATED POROUS HYDROXYAPATITE TABLETS AS A BONE GRAFT

Journal:	<i>Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Silva, Débora; UFPE, Centro de Biociências Silva, Jefferson; ITBCIO Lima, Cláudia; UFPE, Departamento de Biofísica e Radiobiologia – CB Yara, Ricardo; UFPE, Departamento de Engenharia Biomédica - CTG
Keywords:	Biocompatible Materials, Hydroxyapatite, Biodegradable Implants, osteogenesis

SCHOLARONE™  
Manuscripts