

**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS**  
**CURSO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS**

NATÁLIA OLIVEIRA SENA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESPUMAS DE POLI ÁLCOOL VINÍLICO  
E FOSFATO DE CÁLCIO BIFÁSICO PARA POTENCIAL USO NA ENGENHARIA  
DE TECIDO ÓSSEO**

BELO HORIZONTE

2018

NATÁLIA OLIVEIRA SENA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESPUMAS DE POLI ÁLCOOL VINÍLICO  
E FOSFATO DE CÁLCIO BIFÁSICO PARA POTENCIAL USO NA ENGENHARIA  
DE TECIDO ÓSSEO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
no Curso de Graduação em Engenharia de  
Materiais do Centro Federal de Educação  
Tecnológica de Minas Gerais como requisito  
parcial para obtenção do título de Bacharel em  
Engenharia de Materiais

Orientador(a): Dra. Roberta Viana Ferreira  
Coorientador(a): Dr. Paulo Renato Perdigão de Paiva

BELO HORIZONTE

2018

**NATÁLIA OLIVEIRA SENA**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESPUMAS DE POLI ÁLCOOL VINÍLICO  
E FOSFATO DE CÁLCIO BIFÁSICO PARA POTENCIAL USO NA ENGENHARIA  
DE TECIDO ÓSSEO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no Curso de Graduação em Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Materiais.

Aprovada em: \_\_/\_\_/\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Roberta Viana Ferreira – Orientadora

---

Prof. Dr. Paulo Renato Perdigão de Paiva – Coorientador

---

Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva

## RESUMO

Visando melhores propriedades mecânicas, biocompatibilidade e biodegradabilidade, o desenvolvimento de scaffolds compósitos tem sido muito estudado. O objetivo do presente trabalho foi a produção e a caracterização de espumas para potencial uso como scaffolds para tecido ósseo. Utilizou-se 50%(m/m) de poli álcool vinílico (PVA) e 50 % (m/m) de fosfato de cálcio bifásico (BCP), combinando as técnicas de formação de poros por agente de expansão e liofilização, sendo que em uma das rotas foi utilizado glutaraldeído como agente reticulante (espuma RL), e na outra não foi feita a reticulação (espuma NRL). Os compósitos foram caracterizados por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC), Análise termogravimétrica (TGA) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), e, os resultados foram comparados visando avaliar a diferença nas propriedades devido a reticulação com glutaraldeído. As análises de FTIR indicaram que ambas as espumas apresentaram bandas de transmitância típicas de PVA e BCP. A presença de glutaraldeído na espuma RL gerou alteração nas transições térmicas, quando comparada a espuma NRL, aumentando a sua estabilidade. A análise morfológica das espumas, para ambas as rotas, indicou a presença de uma estrutura macroporosa com tamanho de poros variando entre 100 a 800 $\mu$ m. Desta forma, as espumas contendo 50 % (m/m) de PVA e 50 % (m/m) de BCP, tanto reticuladas quanto não reticuladas, apresentam potencial para aplicação em tecido ósseo.

Palavras-chave: Poli álcool vinílico, fosfato de cálcio bifásico, tecido ósseo, scaffold.

## ABSTRACT

Aiming at the mechanical properties, biocompatibility and biodegradability, the development of composite scaffolds were very much studied. The present work had a production and a characterization of foams for potential use as scaffolds for the bone tissue. Use 50% (w / w) of polyvinyl alcohol and 50% (w / w) of biphasic calcium phosphate, combining as the agent formation techniques with the blowing agent and lyophilization, with glutaraldehyde as the crosslinking agent (RL foam), and in the other non-crosslinking agent (NRL foam). The compounds were characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Thermogravimetric Analysis (TGA) and Scanning Electron Microscopy (SEM), and were compared. due to cross-linking with glutaraldehyde. FTIR analyzes indicated that both foams treat the typical transmission bands of PVA and BCP and that the RL foams were not completely crosslinked. The presence of glutaraldehyde in the RL foam generated the thermal transitions when compared to the NRL foam, increasing its stability. The morphological analysis of the foams for both scales indicated the presence of a macroporous structure with pore size ranging from 100 to 800 $\mu$ m, which is conducive to the migration, adhesion and proliferation of osteoblasts. Thus, as foams containing 50% (m / m) PVA and 50% (m / m) BCP, both crosslinked as uncrosslinked, have potential for application in bone tissue.

Keywords: Polyvinyl alcohol, biphasic calcium phosphate, bone tissue, scaffold.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1- Esquema de um corte longitudinal de um osso longo.....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 2- Esquema de regeneração de tecidos utilizando a engenharia de tecidos. ....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 3- Equação da síntese do PVA.....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 4 - Reação de reticulação do PVA com glutaraldeído.....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 5- Fluxograma de produção das espumas.....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 6- Montagem banho maria.....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 7- Liofilização das espumas.....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 8- Difratoograma do PVA.....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 9- Difratoograma do BCP.....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 10- Espectro FTIR para o PVA, BCP e espumas.....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 11 - DSC do PVA puro no (a) primeiro aquecimento e no (b) segundo aquecimento. .....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 12- DSC da espuma RL.....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 13- DSC da espuma NRL.....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 14- Curvas TGA.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 15- Imagens de MEV da espuma RL.....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 16-- Imagens de MEV espuma NRL.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 17- Imagens do MEV da espuma RL na (a) superfície e na (b) fratura.....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 18 – Histogramas da dispersão do tamanho de poro.....</b>	<b>41</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 - Técnicas de processamento de matrizes para engenharia de tecidos. ....</b>	<b>20</b>
<b>Tabela 2- Principais fosfatos de cálcio. ....</b>	<b>24</b>
<b>Tabela 3 – Análise química semiquantitativa do fosfato de cálcio bifásico por FRX.....</b>	<b>32</b>
<b>Tabela 4- Bandas características do PVA. ....</b>	<b>34</b>
<b>Tabela 5 – Bandas vibracionais para o BCP.....</b>	<b>34</b>
<b>Tabela 6 – Eventos que ocasionaram perda de massa .....</b>	<b>38</b>

## LISTA DE SÍMBOLOS

BCP: Fosfato de cálcio bifásico

CaCO<sub>3</sub>: Carbonato de Cálcio

CP: Fosfatos de cálcio

DRX: Difração de Raio X

DSC: Calorimetria Exploratória Diferencial

FRX: Fluorescência de Raio X

FTIR: Espectroscopia por Transformada de Fourier

HA: Hidroxiapatita

HCl: Ácido clorídrico

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

NaOH: Hidróxido de Sódio

PVA: Poli álcool vinílico

TGA: Análise termogravimétrica

TCP: Fosfato tricálcico



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	10
2 OBJETIVOS .....	12
2.1 Objetivo Geral.....	12
2.2 Objetivos Específicos.....	12
3 REVISÃO BILIOGRÁFICA.....	13
3.1 Tecido Ósseo.....	13
3.2 Engenharia de Tecidos.....	16
3.2.1 Scaffolds.....	18
3.3 Poli Álcool Vinílico .....	22
3.4 Fosfato de Cálcio Bifásico .....	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 Materiais.....	26
4.2 Procedimento experimental de preparação da espuma.....	26
4.3 Caracterização.....	29
4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	29
4.3.2 Espectroscopia por Transformada de Fourier (FTIR) .....	29
4.3.3 Difração de Raio X (DRX).....	30
4.3.4 Análise termogravimétrica (TGA) .....	30
4.3.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	31
5.1 Análise Química.....	31
5.1.1 Difração de Raio X (DRX).....	31
5.1.2 Fluorescência de Raio X (FRX).....	32
5.1.3 Espectroscopia por Transformada de Fourier (FTIR) .....	33
5.2 Análise Térmica.....	35
5.2.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	35
5.2.2 Análise Termogravimétrica (TGA).....	37
5.3 Caracterização Morfológica.....	39
5.3.1 Microscopia Eletrônica de varredura (MEV).....	39

6 CONCLUSÕES .....	43
7 TRABALHOS FUTUROS.....	44
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

## 1 INTRODUÇÃO

Os defeitos ósseos decorrentes de traumas, tumores ou doenças atingem todos os anos milhares de pessoas. As técnicas mais utilizadas para o tratamento desses defeitos são autoenxerto e aloenxerto. A primeira tem sua aplicação limitada pela baixa disponibilidade de material, complicações cirúrgicas e prejuízo ao sítio de colheita. A segunda técnica apresenta como grande desvantagem a possibilidade de transmissão de doenças e elevada resposta imune (OLIVEIRA, et al., 2007).

Como alternativa a essas técnicas existe a Engenharia de Tecidos que o objetivo consiste na implantação das construções de tecido no corpo para reparar uma lesão ou substituir a função de um órgão que está lesado. No que tange o tecido ósseo, constitui uma área promissora na reparação e reconstrução de lesões ósseas, através do desenvolvimento de matrizes tridimensionais porosas, habitualmente designadas por scaffolds. (BERTHIAUME, et al., 2011)

As limitações dos enxertos motivaram pesquisadores a desenvolver materiais bioativos, como por exemplo scaffolds porosos, que apresentam resistência mecânica e porosidade adequada para estabilização e fixação das células ósseas. O scaffold funciona como carreador ou suporte para interações celulares e matriz extracelular óssea fornecendo um suporte estrutural para o tecido recém-formado (ZHAO, et al., 2006). A arquitetura e a composição do scaffold são de suma importância para a capacidade de colonização das células. O material deve ser biocompatível, bioreabsorvível, sendo os produtos da degradação metabolizáveis pelo organismo, osteocondutor e, de preferência osteoindutor (SENGERS, 2007). Se tratando da arquitetura, o scaffold deve ser tridimensional e altamente poroso, com uma rede de poros interconectados, para possibilitar o crescimento celular/tecidual e o transporte de nutriente e resíduos metabólicos (BUCKLEY, 2004).

Devido à semelhança com a composição do osso, scaffolds à base de fosfato de cálcio, como hidroxiapatita (HA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), fosfato tricálcico (TCP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) e fosfato de cálcio bifásico (BCP), uma mistura de HA e TCP, receberam mais atenção para aplicações de reparo ósseo. Dentre os fosfatos apresentados, o BCP combina a excelente bioatividade da HA com a taxa de degradação mais rápida do TCP, além de permitir que osteoblastos e osteoclastos atuem de forma mais natural na sua superfície do que a HA ou TCP puros. A introdução de um componente polimérico em uma biocerâmica produz um compósito orgânico-inorgânico que pode ser precursor de um scaffold com melhores propriedades mecânicas (GERHARDT; BOCCACCINI, 2010).

Entre os polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, os poli álcool vinílico (PVA) é um dos polímeros mais utilizados nas aplicações médicas. (NIE, et al., 2012). Ele é amplamente utilizado em aplicações médicas e farmacêuticas, tais como: lentes de contato, sistemas de liberação controlada de fármacos, recobrimento de feridas, aparelhos ortopédicos, órgãos artificiais e scaffolds porosos. (YE, MOHANTY e GHOSH, 2014).

Em um scaffold composto PVA/BCP o polímero pode interagir fortemente com a superfície do fosfato de cálcio, porque o BCP possui grupos hidroxila na sua superfície e o PVA apresenta alta concentração de grupos hidroxila suspensos. O processo de reticulação física do polímero se dá pelo método de liofilização ao estabelecer as ligações de hidrogênio entre os átomos de hidrogênio e oxigênio em duas cadeias poliméricas paralelas. O mecanismo físico de ligação cruzada evita a necessidade de usar reticuladores químicos em scaffolds para aplicação em tecido ósseo. (NIE, et al., 2012).

Esse trabalho visa a produção e caracterização de espumas de poli álcool vinílico com fosfato de cálcio bifásico obtidas através da combinação das técnicas de formação de poros por agente de expansão e liofilização para potencial aplicação como scaffold na Engenharia de Tecidos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Produzir e caracterizar espumas de poli álcool vinílico com fosfato de cálcio bifásico obtidas através da combinação das técnicas de formação de poros por agente de expansão e liofilização para potencial aplicação como scaffold na Engenharia de Tecidos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

1. Realizar a caracterização físico - química e térmica do PVA e BCP puros através das técnicas de Difração de Raio X, Análise Termogravimétrica, Fluorescência de Raio X e Espectroscopia por Transformada de Fourier;
2. Produzir as espumas de PVA/BCP reticuladas e não reticuladas pelo método de formação de poros;
3. Realizar a caracterização térmica, química e morfológica das espuma utilizando as técnicas de Espectroscopia por Transformada de Fourier, Calorimetria Exploratória Diferencial e o Microscopia Eletrônica de Varredura;
4. Avaliar a porosidade das espumas PVA/BCP medindo o tamanho dos poros através do software Image J.

### 3 REVISÃO BILIOGRÁFICA

#### 3.1 Tecido Ósseo

O tecido ósseo é uma forma especializada de tecido conjuntivo, cuja matriz extracelular é mineralizada conferindo-lhe rigidez e algum grau de elasticidade. Além de desempenhar a função de suporte, nesse tecido se encontra a maior reserva primária de cálcio no corpo, com isso ele auxilia na manutenção do pH interno do organismo e na transmissão e condução do impulso elétrico em nervos e músculos (DEMPSTER, 1999).

A matriz óssea é formada por uma porção orgânica e outra inorgânica. A maior parte da porção orgânica é composta principalmente por colágeno do tipo I, e a menor parte constituída por proteoglicanas e proteínas não colágenas. A parte inorgânica é composta basicamente por sais de cálcio e fosfato na forma de cristais de hidroxiapatita (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

A divisão macroscópica do osso se dá em cortical e esponjoso. O osso cortical é denso, presente no eixo de ossos longos, os quais a matriz de colágeno se organiza em lamelas concêntricas, normalmente ao redor de um canal vascular central, formando assim o sistema de Havers. Os canais do centro contêm nervos e vasos sanguíneos e comunicam entre si e com a cavidade medular óssea por meio dos canais de Volkmann. O revestimento da superfície óssea externa é feito pelo perióstio e o da superfície interna pelo endóstio. Ambas as membranas têm a função de nutrir o osso e servir como fonte de osteoblastos para a osteogênese (KAPLAN, 1994).

A matriz do osso esponjoso é mais porosa e se organiza em trabéculas preenchidas por medula óssea vermelha, na qual ocorre produção ativa de células sanguíneas a partir de células mesenquimais. Com isso, o metabolismo do osso esponjoso é mais intenso que do osso cortical (JUDAS, 2012).

A Figura 1 apresenta o corte de um osso longo, identificando o osso compacto e o osso esponjoso.

**Figura 1- Esquema de um corte longitudinal de um osso longo.**



Fonte: Amabis, 2004

No sentido longitudinal, a resistência mecânica do osso cortical compacto está entre 78,8 e 151 MPa na tração e 131 e 224 MPa na compressão. A resistência, no sentido transversal, diminui para 51 a 56 MPa e 106 a 133 MPa, respectivamente. Já o módulo de elasticidade fica entre 17 a 20 GPa no sentido longitudinal e 6 a 13 no sentido transversal. No osso trabecular o comportamento mecânico é mais complexo, sua densidade é oito vezes menos que a do osso compacto e sua porosidade média é de 75%. Sua resistência mecânica varia entre 2 e 5 MPa e seu módulo de elasticidade entre 90 a 400 MPa (ATHANASIOU, 2000).

Em se tratando de crescimento ósseo existem dois processos que o possibilitam: ossificação intramembranosa e ossificação endocondral. A ossificação intramembranosa acontece dentro de uma membrana conjuntiva e forma os ossos da face: frontal, parietal, occipital, temporal, maxilar e mandibular. O local da membrana, no qual a ossificação inicia é denominado centro de ossificação primária. A parte que não sofre ossificação passa a constituir o endóstio e o perióstio (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

A ossificação endocondral inicia-se em uma peça de cartilagem hialina que é formada por meio da condensação do mesênquima e toma forma similar à do osso a ser formado. Em seguida, as células condensadas desta região se diferenciam em condrócitos que elaboram uma substância intercelular na qual se compõe no esboço da peça óssea. A cartilagem hialina se modifica, ocorrendo hipertrofia dos condrócitos, diminuição da matriz cartilaginosa, mineralização e morte dos condrócitos. As cavidades calcificadas são tomadas por capilares sanguíneos e células mesenquimatosas indiferenciadas oriundas do tecido conjuntivo adjacente. Essas células se diferenciam em osteoblastos que depositam matriz óssea sobre os restos de cartilagem calcificada. Esse tipo de ossificação é o principal responsável pela formação de ossos curtos e longos (JUDAS,2012).

As principais células ósseas são osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, todos com origem nas células osteoprogenitoras (LIRANI,2004). Os osteoblastos são os responsáveis pela síntese de secreção da matriz orgânica, o armazenamento de minerais e o revestimento da maioria das superfícies ósseas. O osteoblasto, estando em atividade, hipertrofia deslocando seu núcleo para extremidade mais distante da superfície óssea (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Os osteoclastos são células grandes com vários núcleos, derivadas dos macrófagos e responsáveis pela remoção do osso, processo chamado osteoclasia. Essas células tem os mecanismos necessários para dissolver os materiais ósseos e digerir a matriz orgânica. Os osteoclastos possuem diversos núcleos no interior do citoplasma acidófilo e vacuolizado. Eles são polarizados e com os núcleos deslocados para a periferia celular oposta ao osso (BANKS, 1992).

Os osteócitos são osteoblastos maduros e que se incorporaram a matriz óssea mineralizada e participam da sua manutenção, ou seja, da síntese e da absorção em extensão limitada (LIRANI, 2004).

A capacidade do corpo em substituir células danificadas ou mortas e reparar tecidos depois da inflamação é crítica a sobrevivência. Os tecidos, no que se diz respeito a atividade proliferativa tecidual se dividem em: tecidos de divisão contínua ou tecidos lábeis; tecidos quiescentes ou estáveis; tecidos não divisores ou permanentes. No primeiro grupo as células proliferam-se ao longo de toda a vida, substituindo as lesionadas. Nos tecidos estáveis, normalmente, existe um baixo nível de replicação, no entanto, as células desse tecido podem ser submetidas a divisão rápida, sendo assim capazes de reconstituir o tecido de origem. Os tecidos permanentes possuem células que não podem ser submetidas a divisão mitótica na vida pós-natal, um exemplo são os neurônios (ROBBINS e COTRAN, 2005).



A consolidação óssea é um método muito complexo que é dividido em três estágios: fase inflamatória, reparo e remodelação (JUNQUEIRA,2004). A etapa inflamatória se inicia imediatamente após a fratura e ocorre, em geral, nas três primeiras semanas. No período de 48 horas o exsudado do hematoma possui inúmeros mediadores inflamatórios e fatores angiogênicos (GARTNER, 2007).

A relação entre a fase de reparo pós fratura e o suprimento sanguíneo são de suma importância. A predominância do suprimento medular se eleva à medida que ocorre a progressão do estágio de reparo (JUDAS, 2012).

O tecido ósseo regenerado mineralizado, em geral, deve apresentar porosidade mínima entre 50 a 100  $\mu\text{m}$ . Porosidade com valores abaixo dos citados podem resultar no não crescimento do tecido osteóide, além de penetração nos poros apenas de tecido fibroso (KASTEN et al., 2008).

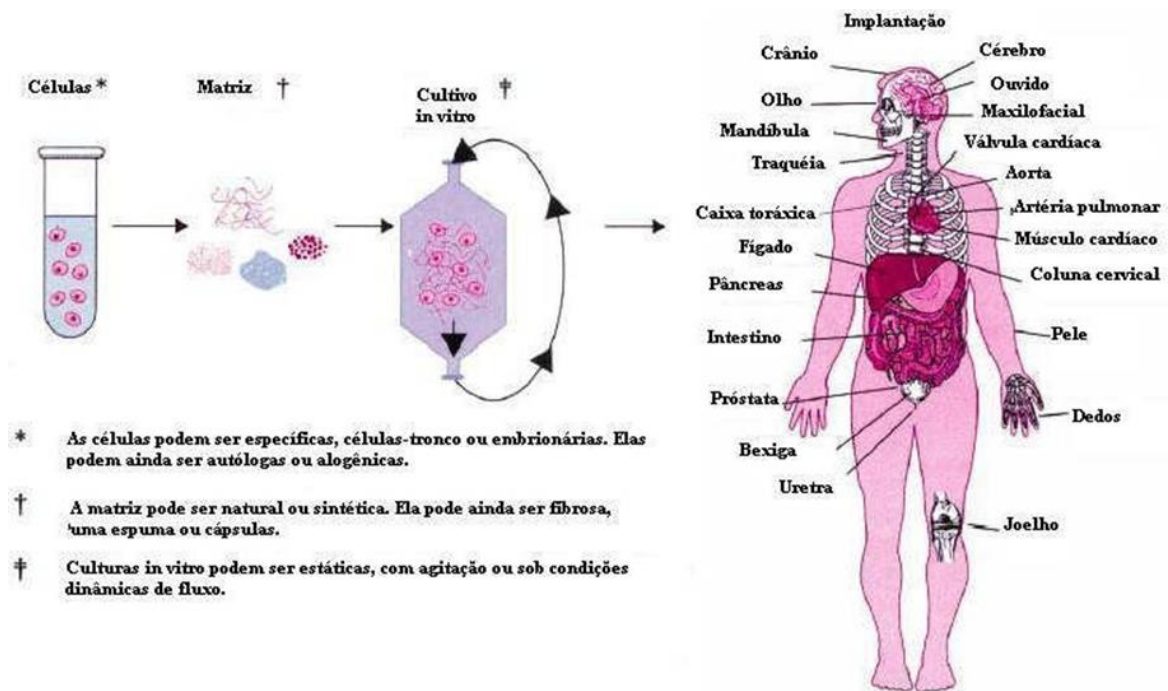
### **3.2 Engenharia de Tecidos**

A engenharia de tecidos é um campo multidisciplinar que integra os princípios das ciências da vida e os princípios da engenharia (LANGER e VACANTI, 2015). A esse campo multidisciplinar no qual usam-se células e materiais para a formação e regeneração de tecidos humanos deu-se pela primeira vez, na década de 1980 o nome de Engenharia de Tecidos. (VACANTI e VACANTI, 2007). A Engenharia de Tecidos faz uso de três instrumentos principais: células, scaffolds e fatores de crescimento. (PATEL, BONDE e SRINIVASAN, 2011)

A substituição de próteses convencionais por matrizes teciduais biodegradáveis que auxiliam a regeneração do tecido danificado ou perdido é uma das possibilidades de aplicação da engenharia de tecidos (KOHN, 2004). O uso do biomaterial provê as bases para o tecido em crescimento, assiste o reparo, proliferação e regeneração do tecido natural, permitindo assim a reconstrução e substituição do tecido danificado (LANGER, 2004).

A Figura 2 mostra de forma esquemática as etapas de regeneração através da engenharia de tecidos. Para o desenvolvimento de um tecido substituto vivo são recolhidas células do indivíduo e cultivadas em laboratório. Essas células são expandidas em uma matriz tridimensional porosa, podendo ser natural ou sintética, na presença de fatores de crescimento e diferenciação.

**Figura 2- Esquema de regeneração de tecidos utilizando a engenharia de tecidos.**



Fonte: Langer, 2004.

O desenvolvimento de tecidos vivos em matrizes é dependente dos arranjos tridimensionais das células, o que requer a produção de materiais com estrutura que defina a forma para o tecido em crescimento e guie a sua formação. Essas matrizes podem ser ou não biodegradáveis, sintetizadas com materiais não tóxicos e até mesmo modificadas quimicamente com intuito de melhorar as propriedades de fixação de células acelerando o crescimento do tecido (LENZA,2002).

A matriz extracelular presente nos tecidos é responsável pelo suporte estrutural físico e químico para as células. Ela é uma estrutura tridimensional porosa constituída por uma rede fibrosa rede fibrosa composta de macromoléculas biológicas, tais como o colágeno e outras proteínas. (FONTES, 2010).

São inúmeros os requisitos a serem satisfeitos para que materiais sejam aplicados como matrizes na engenharia de tecidos. Dentre eles se destacam: (i) estrutura tridimensional com elevada porosidade de macroporos interconectados para possibilitar a migração celular e a nutrição em toda extensão do material; (ii) composições biodegradáveis ou reabsorvíveis, com taxas de degradação e reabsorção adequadas ao crescimento da célula/tecido in vitro ou in vivo, (iii) superfície com característica bioativa para a facilitar adesão, proliferação e diferenciação celular; (iv) propriedades mecânicas compatíveis às condições fisiológicas que será exposto e

ao tecido substituído, assim como os tecidos adjacentes; (iv) boa distribuição espacial e uniformidade de estrutura para promover ancoramento homogêneo de células e; (v) facilidade de processamento em grande variedade de formas e tamanhos (BUCKLEY,2004).

Uma vantagem de se usar matrizes tridimensionais na engenharia de tecidos é que além da substituição do tecido danificado é possível controlar o formato, tamanho e composição do enxerto *in vitro*. Outra vantagem dessas matrizes é a utilização na regeneração *in vivo* de tecidos saudáveis remanescentes, recuperando a estrutura e função dos tecidos através do restabelecimento dos tecidos próximos (LEOR e COHEN, 2004).

### 3.2.1 Scaffolds

Os biomateriais em scaffolds são definidos como aqueles que tem estrutura tridimensional porosa, propriedades bioativas e biodegradáveis que funcionam como base para o crescimento do novo tecido. O seu arcabouço tridimensional deve mimetizar os meios químicos e físicos do tecido saudável e guiar a migração, diferenciação e proliferação tecidual (FONTES,2010)

Os scaffolds, de forma geral, devem possuir propriedades osteocondutivas e excepcionalmente propriedades osteoindutivas e osteogênicas, além de servirem como suporte mecânico (SALGADO et al., 2004).

O scaffold para aplicação em engenharia de tecido ósseo deve atender a uma série de requisitos. É necessário que o dispositivo seja biocompatível e atue como modelo 3D para o crescimento ósseo. Esse crescimento ocorre se existirem poros interconectados com diâmetro de pelo menos 100µm que permitam a migração celular, o crescimento do tecido e a vascularização (RATNER, 2004).

Os scaffolds para regeneração do tecido ósseo são classificados em dois tipos: (i) scaffolds indutores de migração celular e crescimento celular provenientes de tecidos vizinhos; (ii) scaffolds carreadores de células osteogênicas autógenas colonizadas em biorreatores e posteriormente reimplantadas no indivíduo (CHAN et al., 2009).

O desenvolvimento dos scaffolds deve possibilitar a produção de formas variadas para se adequar ao defeito ósseo, permitir esterilização e possuir potencial de comercialização nos padrões internacionais de utilização clínica (JONES, EHRENFRIED e HENCH, 2006).

Um dos fatores críticos para que ocorra a migração celular e a formação da matriz óssea é a porosidade. Segundo Kim, Knowles e Kim (2004) os osteoblastos migram, aderem e

proliferam mais facilmente em poros com tamanhos entre 200 a 400  $\mu\text{m}$  de diâmetro. A explicação para esse fato se dá pela curvatura do poro, que possibilita adequada compressão e tensão nos mecanorreceptores celulares, permitindo que eles migrem para as aberturas de tamanhos específicos (HOU, GRIJPMAN e FEIJEN, 2003; DHANARAJU et al., 2003).

Scaffolds desenvolvidos de materiais orgânicos e inorgânicos biodegradáveis para potencial aplicação na engenharia de tecido óssea devem apresentar macroporosidade. Os poros devem ser interligados de modo que permitam o crescimento ósseo de forma tridimensional por toda estrutura. A conexão entre os poros pode ser otimizada em um estágio *in vitro*, por meio do emprego de condições de cultura dinâmicas (KIM, KNOWLES e KIM, 2004).

As propriedades mecânicas dos scaffolds e do tecido posteriormente formado devem ter a capacidade de suportar as atividades diárias a qual estarão expostos. Os dispositivos *in vitro* devem apresentar resistência mecânica capaz de suportar as pressões hidrostáticas e manter a porosidade adequada para crescimento das células e formação da matriz. Já *in vivo* as propriedades mecânicas devem ser semelhantes ao do tecido ósseo (SALGADO, COUTINHO e REIS, 2004).

O comportamento mecânico dos scaffolds é importante a nível macroscópico e microscópico. Embora o aumento da porosidade e do tamanho dos poros favoreça o crescimento do tecido ósseo, esse aumento pode acarretar na diminuição das propriedades mecânicas, levando até ao comprometimento da integridade do scaffold (KAPLAN 2005).

Sendo assim, a porosidade deve ter um tamanho crítico, sendo menor o suficiente para manter as propriedades mecânicas do scaffold e maior o suficiente para proporcionar adequada atividade biológica (HENRIKSEN et al., 2011).

Com intuito de precaver a fratura inicial do scaffold, as propriedades mecânicas desse devem ter capacidade para suportar as cargas a serem aplicadas. Dessa forma, a porosidade inicial deve ser menor ou a resistência mecânica maior para suportar as cargas durante a degradação. Com isso, segundo Byrne et al. (2007) é necessário encontrar o ponto de equilíbrio entre porosidade a porcentagem de degradação para se definir adequados parâmetros de um scaffold.

A degradação do scaffold deve ser controlada, uma vez que a regeneração e remodelamento ósseo tem duração de alguns meses, permitindo que o novo osso formado ocupe o espaço do biomaterial que foi absorvido (REICHERT et al., 2010).

Inúmeras técnicas têm sido desenvolvidas para sintetização de matrizes porosas tridimensionais. A Tabela 1 apresenta de forma sucinta algumas das técnicas mais utilizadas.

**Tabela 1 - Técnicas de processamento de matrizes para engenharia de tecidos.**

<b>Processo</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Solvent casting e particulate leaching	Tamanho de poros em larga escala. Controle independente de porosidade e tamanho de poros.  Estrutura altamente porosa.	Espessura limitada de membranas (3mm). Interconectividade limitada. Pouco controle da arquitetura interna
Fibre bonding	Alta porosidade	Limitada faixa de polímeros. Solventes residuais
Phase Separation/ Emulsification	Alta porosidade. Permite a incorporação de agentes bioativos	Pouco controle da arquitetura. Limitada faixa de tamanhos de poros
Melt moulding	Controle independente de porosidade e tamanho de poros.  Controle da forma macroscópica.	Altas temperaturas só requeridas para polímeros amorfos
Membrane Lamination	Controle da forma macroscópica. Controle independente de porosidade e tamanho de poros.	Baixa resistência mecânica. Interconectividade limitada.
Polymer/ceramic fibre composite foam	Controle independente de porosidade e tamanho de poros.  Alta resistência à compressão.	Solventes residuais.
High-pressure Processing	Solventes inorgânicos.	Superfície externa nanoporosa. Poros fechados.
Freeze drying	Estrutura altamente porosa. Alta interconectividade dos poros. Estrutura altamente porosa. Alta interconectividade dos poros. Controle da forma macroscópica	Limitada para tamanhos pequenos de poros.
Sol-Gel	Possibilidade de síntese de materiais bioativos.  Material com mesmo grau de homogeneidade que a solução inicial.	Solventes residuais. Grande diminuição do tamanho de poros após secagem por aquecimento

Fonte: Buckley, 2003 (Adaptada)

### 3.2.1.1 Scaffold compósito

Scaffolds compósitos estão sendo largamente utilizados, uma vez que propriedades vantajosas de dois ou mais tipos de materiais podem ser combinados para melhor atender exigências mecânicas e fisiológicas do tecido hospedeiro. (BOCCACCINI, 2003).

A força motriz mais importante por trás do desenvolvimento de scaffolds compósitos polímero/biocerâmica para engenharia de tecido ósseo é a necessidade de conferir comportamento bioativo à matriz polimérica. O grau de bioatividade é ajustável pela fração de volume, tamanho, forma e disposição da fase biocerâmica (WANG et al, 2004).

A adição de fases bioativas a polímeros biodegradáveis pode alterar o comportamento de degradação do polímero permitindo a troca rápida de prótons em água para álcalis na cerâmica (SABIR, 2009). Idealmente, a cinética de degradação e reabsorção dos scaffolds compósitos é projetada para permitir que as células proliferem e segreguem sua própria matriz extracelular, enquanto os scaffolds gradualmente degradem, deixando espaço para o crescimento de novas células e tecidos. O suporte físico fornecido pelo scaffold deve ser mantido até que o tecido projetado tenha integridade mecânica suficiente para se sustentar. (RAMAKRISHNA et al, 2001).

Nie et al 2012 desenvolveu um scaffold poroso de BCP/PVA pelo método de emulsão seguido de liofilização. Os resultados mostraram que as nanopartículas de BCP se dispersaram uniformemente no scaffold e tanto a resistência a compressão quanto a porosidade podem ser controladas pela razão de peso BCP/PVA. No que se refere a degradação os scaffolds apresentam baixa variação de pH e a taxa de biodegradação diminui com a aumento da concentração de PVA. Nos ensaios biológicos foi constatado que a estrutura porosa BCP / PVA não tem efeitos negativos sobre o crescimento e proliferação de células.

Utilizando a técnica de impressão 3D, Song et al (2018) produziu scaffolds compostos de fosfato de cálcio nano-bifásico (BCP), poli álcool vinílico (PVA) e fibrina rica em plaquetas (PRF). Comparando com scaffolds não impressos a estrutura impressa apresentou formas mais específicas e poros interconectados. A incorporação de PRF permitiu a liberação controlada de fatores bioativos e melhorou a biocompatibilidade e a atividade biológica.

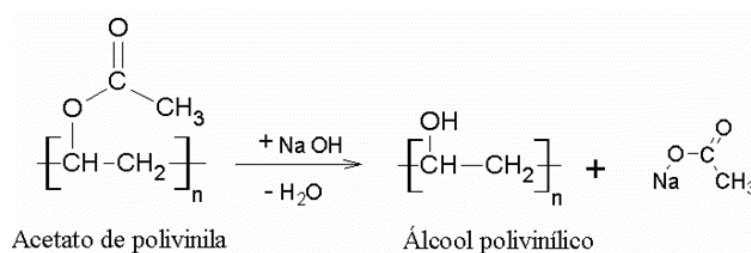
Kumar et al (2014), relata a síntese de biocompósitos poroso composto por álcoois polivinílicos (PVA), nano-hidroxiapatita (n-HA) e nanocristais de celulose (CNC). O estudo mostrou estruturas altamente porosas com boa interconectividade de poros, nas quais o n-HA foi homogeneamente dispersa. Observou-se uma diminuição na fração cristalina e no tamanho de cristalito da nano-hidroxiapatita com a introdução de PVA e do CNC. A análise de

biomineralização *in vitro* revelou a formação de apatita em andaimes de biocompósito PVA / n-HA / CNC quando embebida por 7 e 14 dias em solução de fluido corporal simulado (SBF). Os scaffolds porosos obtidos oferecem bom desempenho mecânico e podem fornecer uma alternativa promissora para uso no campo da engenharia de tecidos ósseos.

### 3.3 Poli Álcool Vinílico

O PVA foi sintetizado pela primeira vez em 1924, por meio da hidrólise do acetato de vinila (Figura 3), que até hoje é o método de obtenção comercial. Ele é um polímero polihidroxilado, solúvel em água e com características interessantes em uma série de aplicações (ARANHA, 2001).

**Figura 3- Equação da síntese do PVA.**



Fonte: Aranha, 2001

A solubilidade do PVA em água é dependente dos seguintes fatores: grau de polimerização e temperatura da solução. Esse polímero quando totalmente hidrolisado, o elevado número de hidroxilas leva a formação de ligações de hidrogênio intensas entre grupos hidroxilas intra e intermoleculares, impedindo sua solubilização em água (ARANHA, 2001).

Variações no peso molecular podem apresentar alterações nas propriedades mecânicas do PVA. Normalmente, esse polímero apresenta elevados valores de módulo de elasticidade e tensão de deformação, sendo essas propriedades diretamente relacionadas ao peso molecular e a temperatura de trabalho (YE, MOHANTY e GHOSH, 2014).

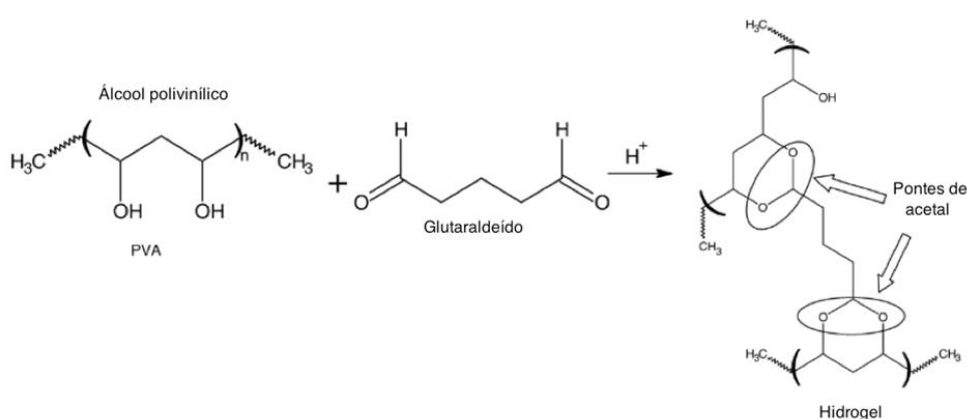
O elevado número de hidroxila na cadeia do PVA facilita a adição de fatores de crescimento, proteínas adesivas e outras moléculas importantes. Isso viabiliza a modificação superficial desse polímero para melhorar a biocompatibilidade celular (NUTTELMANA, HENRYA e ANSETH, 2002).

Para a reticulação do PVA pode se utilizar meios físicos: aplicando ciclos de congelamento, gerando ligações de hidrogênio, cristalização e separação de fases, por meio de

reação química via geração de ligação cruzada através de agentes reticulantes como: glutaraldeído, acetaldeído ou formaldeído e até por irradiação da radiação gama (YE, MOHANTY e GHOSH, 2014).

Os agentes químicos reticulantes, quando usados na presença de ácido sulfúrico, ácido acético ou metanos, são formadas pontes de acetal entre os grupos vinílicos da cadeia, como pode ser analisado na Figura 4. Assim como em todo agente químico, quantidades residuais podem permanecer no gel de PVA. No caso de PVA para aplicações médicas o agente reticulante usado não pode ser tóxico (HASSAN e PEPPAS, 2000).

**Figura 4 - Reação de reticulação do PVA com glutaraldeído.**



Fonte: MANSUR, et al., 2008. (Adaptada)

Devido suas propriedades de biodegradabilidade e não toxidez é utilizado como carreador de medicamentos. Algumas de suas aplicações objetivam alteração de permeabilidade, aumento a permeabilidade a gases, aumento da processabilidade e resistência térmica, biocompatibilidade, permeabilidade e biodegradabilidade (ARANHA, 2001).

A biodegradação do PVA depende diretamente do seu grau de hidrólise e da sua massa molar. Em meio biológico, as cadeias menores e/ou com menor grau de hidrólise são melhor assimiladas (CHIELLINI et al., 2003).

### 3.4 Fosfato de Cálcio Bifásico

Materiais à base de fosfato de cálcio (CP) podem ser comercializados na fórmula de grânulos ou blocos e são produzidos por sinterização. Dentre os diferentes tipos de CPCS se destacam: hidroxiapatita (HA), fosfato tricálcico ( $\alpha$ TCP e  $\beta$ -TCP), fosfato de cálcio bifásico



(BCP), fosfato de cálcio amorfo (ACP), sulfato de cálcio (CS). Esses materiais são fáceis de processar, pois podem ser misturados com líquido para formação de uma pasta moldável, além de serem biocompatíveis (SCHMIDLIN et al.,2011).

Os CPCs têm inúmeras vantagens como: são materiais bioativos, de fabricação em grande escala, de fácil manipulação e são injetáveis para se adequar a defeitos ósseos de forma irregular. A similaridade da sua composição com a do osso e sua biocompatibilidade os tornam excelentes opções para uso na regeneração óssea (LANAO et al., 20013).

Existem diversos tipos de fosfatos de cálcio, sendo que vários são utilizados no reparo de lesões ósseas, como scaffolds, cimentos ósseos, enxertos e constituintes de próteses. Os principais tipos de fosfatos de cálcio são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2- Principais fosfatos de cálcio.**

Nome	Fórmula química	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	Uso	Biodegradação
Fosfato monocalcico monohidratado	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	2,23	Em solução: como fase líquida em certos cimentos	Alta
Fosfato dicálcico dihidratado	CaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2,3	Depósitos finos, cimentos e compósitos.	Alta
Fosfato dicálcico anidro	CaHPO <sub>4</sub>	2,93	Depósitos finos, cimentos e compósitos.	-
Fosfato tricálcico amorfo (ACP)	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·nH <sub>2</sub> O	-	Depósitos finos, cimentos e compósitos.	-
Fosfato tricálcico beta (β-TCP)	β Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	3,07	Biocerâmicas reabsorvíveis, cimentos, compósitos.	Média
Fosfato tricálcico alfa (α-TCP)	α Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	2,86	Biocerâmicas reabsorvíveis, cimentos, com pósitos.	Alta
Fosfato tetracálcico	Ca <sub>4</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> <sup>o</sup>	3,05	Cimentos	-

Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	3,16	Cimentos, compósitos, cerâmicas e filmes finos.	Não biodegradável
------------------------	--	------	--	-------------------

Fonte: PRAKASAM *et al.*, 2015

O material cerâmico deve preferivelmente ter capacidade de promover uma superfície de fosfato de cálcio *in vivo* e *in vitro*, apresentando estrutura de superfície específica. É preferido também, que esse material absorva os agentes biologicamente ativos, como fatores de crescimento. São exemplos eficazes desses materiais fosfato de cálcio, biovidros e materiais que contêm cálcio fosfato e/ou biovidros (GERHARDT; BOCCACCINI, 2010).

O fosfato de cálcio bifásico (BCP) é uma mistura de  $\beta$  -fosfato tricálcio ( $\beta$ -TCP) e hidroxiapatita (HA) (BATISTA, 2010). O desenvolvimento do BCP se deu por pesquisadores que tentavam viabilizar comercialmente materiais contendo hidroxiapatita para procedimentos médicos.

De acordo com Elliot (1994) a inserção de  $\beta$  -fosfato tricálcio  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  à hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  é realizada durante a síntese. A hidroxiapatita por apresentar estrutura monoclinica cristalina, com arranjos de íons  $\text{OH}^-$  é difícil atingir a estequiometria durante o processamento forma-se uma estrutura hexagonal com arranjo de íons  $\text{OH}^-$  alterados por impurezas e água formando a fase secundária  $\beta$  -TCP.

Inúmeros testes já foram feitos com hidroxiapatita e  $\beta$  -fosfato tricálcio confirmando que esses materiais misturados os sozinhos são extremamente biocompatíveis e não apresentam toxicidade (LIMA, 2006). O BCP está presente na fase mineral dos ossos e dentes, sendo altamente utilizado como biomaterial nas mais diversas aplicações, dentre elas médica e ortopédica (BATISTA, 2010).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente foi realizada a caracterização físico-química e térmica do poli álcool vinílico e do fosfato de cálcio bifásico puros por meio de ensaios de difração de raios X (DRX), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

Em seguida foram produzidas amostras de espuma de PVA/BCP pelo método de formação de poros por agente de expansão combinado à técnica de liofilização. Essas amostras foram caracterizadas química, térmica e morfológicamente.

### 4.1 Materiais

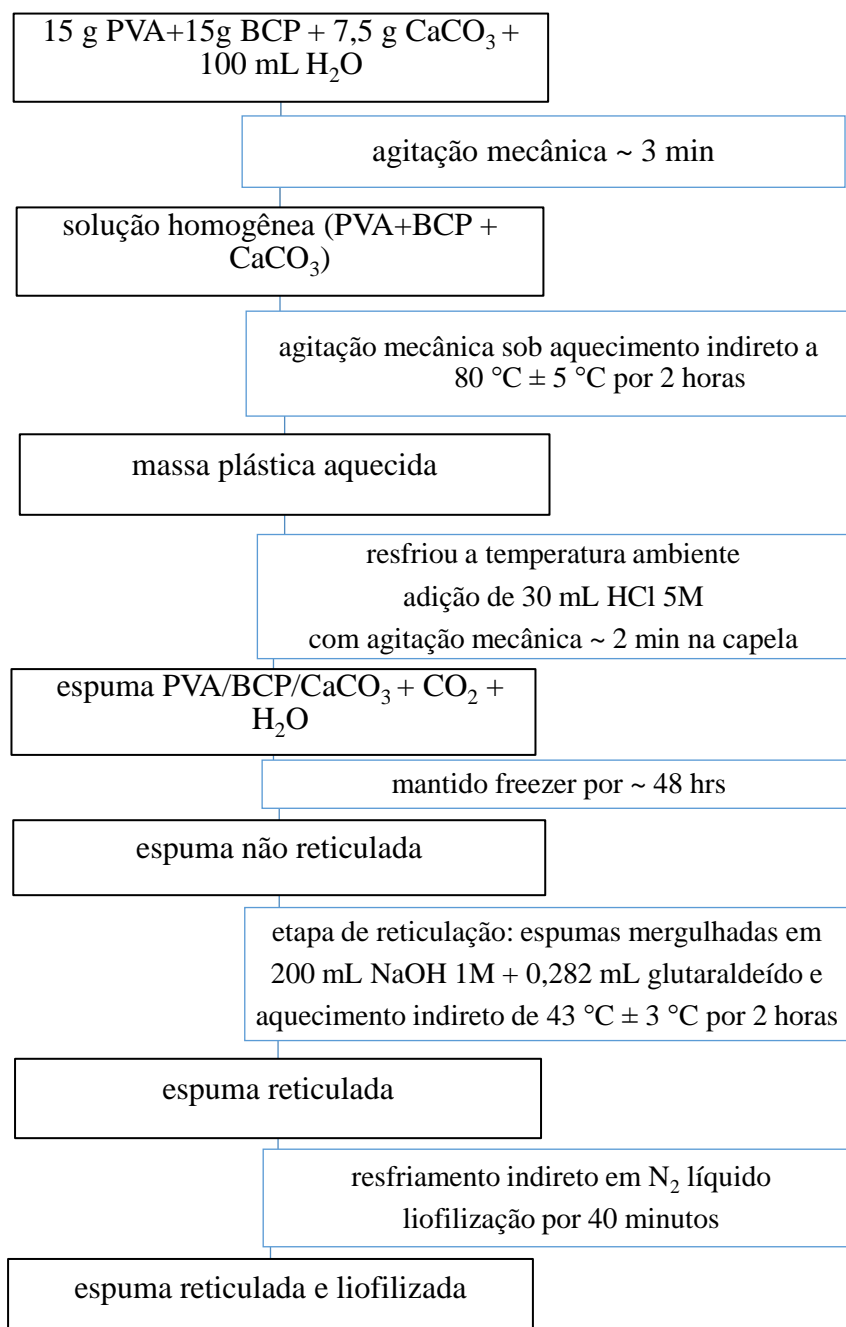
Álcool Polivinílico (PVA) PM = 145.000 grau de hidrólise de 99.0 - 99.8 mol % da marca Fluka (Sigma Aldrich). Carbonato de Cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) PM = 100,09 VETEC (Sigma Aldrich). Solução aquosa de glutaraldeído (Sigma Aldrich) 25% em massa. O pó de BCP (70% hidroxiapatita e 30%  $\beta$ -fosfato tricálcico) com tamanho de grãos variando entre 53 e 38 $\mu\text{m}$ .

### 4.2 Procedimento experimental de preparação da espuma

O procedimento experimental adotado para produção das espumas consistiu na utilização de métodos propostos por Bai et al. (2010), o qual explora um processo econômico de fabricação de espuma de PVA por adição de carbonato de cálcio, como agente de formação de poros, e usando epicloridrina, como agente de reticulação química para promover estabilidade à espuma. No presente trabalho optou-se pela substituição da epicloridrina pelo glutaraldeído, seguindo o método sugerido em Figueiredo, Alves e Borges (2009). A inserção de BCP na espuma de PVA e a produção de espumas não reticuladas quimicamente foram baseadas em Nie et al. (2012).

A Figura 5 apresenta um fluxograma das etapas de produção das espumas.

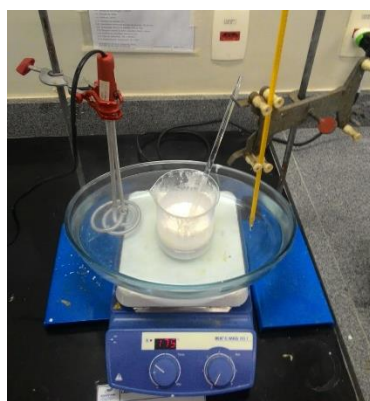
**Figura 5- Fluxograma de produção das espumas**



Fonte: Próprio autor.

A preparação da espuma consistiu da adição de 15 g de PVA, 15g de BCP e 7,5 g de  $\text{CaCO}_3$  a 100 mL de água destilada sob agitação mecânica por aproximadamente 3 minutos para homogeneização da mistura. Em seguida, tal solução foi submetida ao aquecimento indireto (banho de água sob a temperatura de  $80\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ ) durante duas horas. A Figura 6 apresenta a montagem do banho maria.

**Figura 6- Montagem banho maria**



Fonte: Próprio autor.

A massa plástica obtida foi deixada a temperatura ambiente para resfriamento. Logo após, foram adicionados 30 mL de HCl (5 M) sob agitação vigorosa para promover a reação com o carbonato de cálcio e consequente produção de bolhas de  $\text{CO}_2$ .

Em seguida a espuma foi congelada no freezer a  $-18\text{ }^\circ\text{C}$  por cerca de 48 horas. A parte da espuma congelada que passou pelo processo de liofilização durante 40 minutos foi denominada ESPUMA NRL e caracterizada. O restante da espuma moldada congelada foi cortada e mergulhada em 200 mL de NaOH (1 M) contendo cerca de 0,282 mL de glutaraldeído, sob aquecimento indireto (banho de água a temperatura de  $40\text{ }^\circ\text{C} \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$ ) durante 2 horas. Assim, obteve-se a espuma reticulada quimicamente. Parte da amostra foi congelada em nitrogênio líquido e submetida a secagem por liofilização durante aproximadamente 40 minutos. A Figura 7 apresenta a etapa de liofilização das espumas.

**Figura 7- Liofilização das espumas.**



Fonte: Próprio autor.

A amostra obtida após reticulação e liofilização foi denominada ESPUMA RL e caracterizada.

### **4.3 Caracterização**

#### **4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A morfologia das espumas, BCP-PVA-RL e BCP-PVA-NRL foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura TM-3000 Hitashi.. As amostras foram cortadas na seção transversal da espuma, evitando-se a compressão da mesma para não deformar a estrutura, e foram preparadas com recobrimento de ouro visando melhoria na obtenção das imagens.

#### **4.3.2 Espectroscopia por Transformada de Fourier (FTIR)**

A composição química das espumas tanto reticuladas quanto não reticuladas e do PVA e do BCP foi avaliada por meio da Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) utilizando o equipamento Shimadzu, modelo IRPrestige-21 operado em modo ATR, na faixa de comprimento de onda de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $400\text{ cm}^{-1}$  com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ .

### **4.3.3 Difração de Raio X (DRX)**

No intuito de confirmar a composição de fases cristalinas das amostras de PVA e BCP, assim como identificar as fases cristalinas presentes utilizou-se o equipamento da marca SHIMADZU, modelo XRD-7000. Os parâmetros do ensaio foram tensão de 40 kV e corrente elétrica de 30 mA com ângulo de varredura em um intervalo de 10 a 80° (2 $\theta$ ) e passos de 0,02° a cada 0,6 s. As interpretações dos espectros foram efetuadas por comparação com padrões contidos no banco de dados PDF 02 (ICDD, 2003).

### **4.3.4 Análise termogravimétrica (TGA)**

Análise Termogravimétrica (TGA) foi efetuada para analisar o comportamento de variação da massa e de degradação das amostras de PVA, BCP e das espumas RL e espumas NRL. A análise das amostras foi feita no analisador térmico da marca SHIMADZU DTA – 60H. Os parâmetros de ensaio para as amostras foram: taxa de aquecimento 10°C/min, temperatura máxima 900°C, atmosfera utilizada de nitrogênio.

### **4.3.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

A análise do comportamento térmico foi realizada através de calorimetria exploratória diferencial no analisador térmico Shimadzu DSC-60. Foram preparadas quantidades de 8 mg do PVA e das amostras das espumas, realizando-se o primeiro aquecimento, seguido por um resfriamento, e em seguida o segundo aquecimento nas temperaturas entre 30 °C a 300 °C, com rampa de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>, sob atmosfera de nitrogênio.

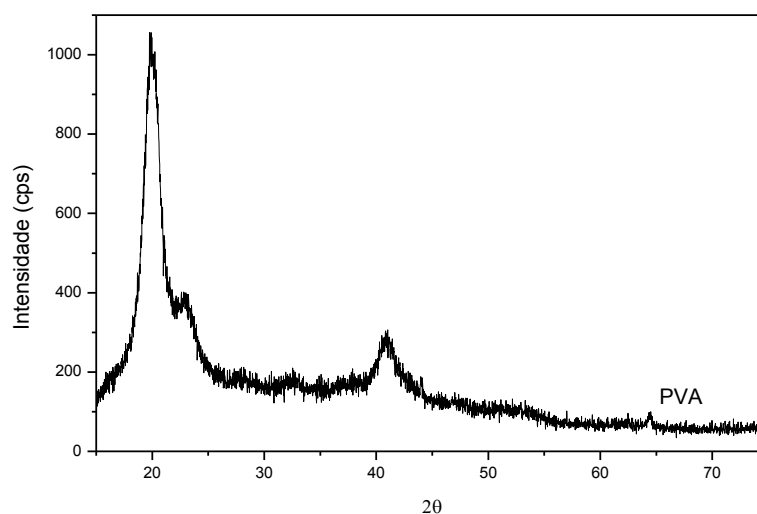
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Análise Química

#### 5.1.1 Difração de Raio X (DRX)

O difratograma para o PVA encontra-se apresentado na Figura 8.

**Figura 8- Difratograma do PVA**

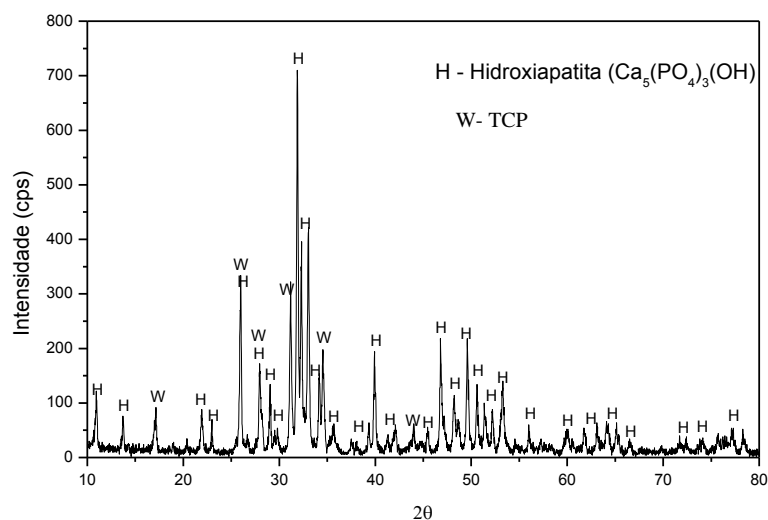


Fonte: Próprio autor.

O PVA apresenta pico de alta intensidade em  $19,7^\circ$  ( $d = 0,448\text{nm}$ ) atribuído ao plano de difração (101), um pico pouco definido em  $22,7^\circ$  relativo ao plano de difração (200) e um pico discreto em  $40,7^\circ$  relativo ao plano de difração (202). Os três picos representam a fase cristalina e logo abaixo destes pode-se observar ampla faixa que caracteriza a fase amorfa do material, semelhante aos resultados obtidos por Souza, 2016. A partir do difratograma estimou-se a cristalinidade de 22 a 24%.

O difratograma para o BCP encontra-se apresentado na Figura 9.



**Figura 9- Difratoograma do BCP**

Fonte: Próprio autor

Os pós de BCP foram avaliados em relação às fases cristalinas presentes que apresentaram um perfil de difratometria com picos indicativos de hidroxiapatita (HA) fase majoritária e traços de beta fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP), ou seja, micropartículas do composto BCP (fosfato de cálcio bifásico). Os resultados obtidos foram semelhantes ao encontrados por Balbuena (2015).

### 5.1.2 Fluorescência de Raio X (FRX)

A porcentagem dos elementos presentes no fosfato de cálcio bifásico obtida a partir das análises da Fluorescência de Raios X está apresentado na Tabela 3.

**Tabela 3 – Análise química semiquantitativa do fosfato de cálcio bifásico por FRX**

Elementos	Porcentagem (massa)
Ca	56%
P	41%

Fonte: Próprio autor

A maior porcentagem encontrada é do elemento cálcio seguida de fósforo, os principais constituintes dos fosfatos de cálcio. Deste modo, pode-se inferir que a amostra possui composição química próxima a dos fosfatos de cálcio e não apresenta elementos contaminantes significativos. (PRAKASAM *et al.*, 2015).

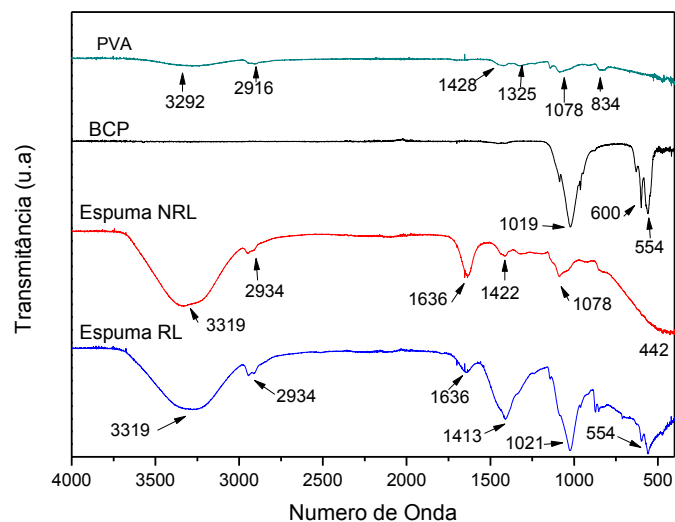
Propriedades como a solubilidade e a taxa de hidrólise têm uma relação direta com a razão cálcio/fósforo (Ca/P). Estas propriedades se incrementam com o decréscimo da relação Ca/P, isto é, quanto menor é a relação Ca/P, maior será a acidez e solubilidade (RATNER *et al.*, 2004). Isto irá influenciar na decisão do uso de um determinado tipo de fosfato de cálcio. Esta relação varia de 0,5 a 2,0, porém fosfatos de cálcio com relação Ca/P menor que 1,0 não são utilizados como biomateriais devido às altas acidez e solubilidade. O material em questão poderá ser utilizado como biomaterial, uma vez que sua relação Ca/P é de aproximadamente 1,4 (RAMAKRISHNA *et al.*, 2001).

### 5.1.3 Espectroscopia por Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR possibilitou observar as bandas características do PVA e do BCP e elucidou a presença dos mesmos na espuma, além de apresentar algumas mudanças estruturais complexas que ocorreram devido à mistura.

O espectro de FTIR do PVA, BCP e espumas é apresentado na Figura 10.

**Figura 10- Espectro FTIR para o PVA, BCP e espumas.**



Fonte: Próprio autor

O espectro obtido apresentou picos característicos do PVA com alta taxa de hidrólise, o que de fato era o reagente em questão. Pode se observar no espectro da Figura 10, dois picos característicos do espectro são 3292  $\text{cm}^{-1}$  e 2916  $\text{cm}^{-1}$ , identificados como vibrações de estiramento de interações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares e vibrações de estiramento de C-H, respectivamente.

O pico 1428  $\text{cm}^{-1}$  refere-se ao dobramento do  $\text{CH}_2$ , já o 1078  $\text{cm}^{-1}$  ao estiramento de C-C e do grupo C-O-C. Esses picos são referentes à própria cadeia polimérica do PVA e estão relacionados às hidroxilas e à cadeia de C-H (KUMAR,2014). As bandas de transmitância detectadas pelo FTIR para o PVA e suas respectivas atribuições estão apresentadas na Tabela 4 .

**Tabela 4- Bandas características do PVA.**

Número de Onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Grupos Característicos
3550-3200	v (OH...OH)
2937-2870	v (CH)
1461-1417	$\delta$ (CH) – $\text{CH}_2$
1325	$\delta$ (OH) – C-OH
1078	v (C-O) – C-OH
834	v (C-C)

Fonte: Bhat et.al 2005

Para o espectro do BCP as bandas relacionadas ao grupo característico são dispostas na Tabela 5.

**Tabela 5 – Bandas vibracionais para o BCP.**

Número de onda( $\text{cm}^{-1}$ )	Grupo Característico
1020	P-O (Estiramento)
600	- $\text{PO}_4$
554	- $\text{PO}_4$

Fonte:( MIRSALEHI *et al.*, 2016)

É possível inferir, com base nesses resultados, que a amostra utilizada apresenta espectro típico das fases  $\beta$ -TCP e HA e aparentemente não possui contaminações. Deste modo, tendo em vista os resultados obtidos pelas técnicas complementares de DRX, FRX e FTIR, pode-se inferir

que o material utilizado no presente trabalho, para a produção das espumas, é fosfato de cálcio bifásico.

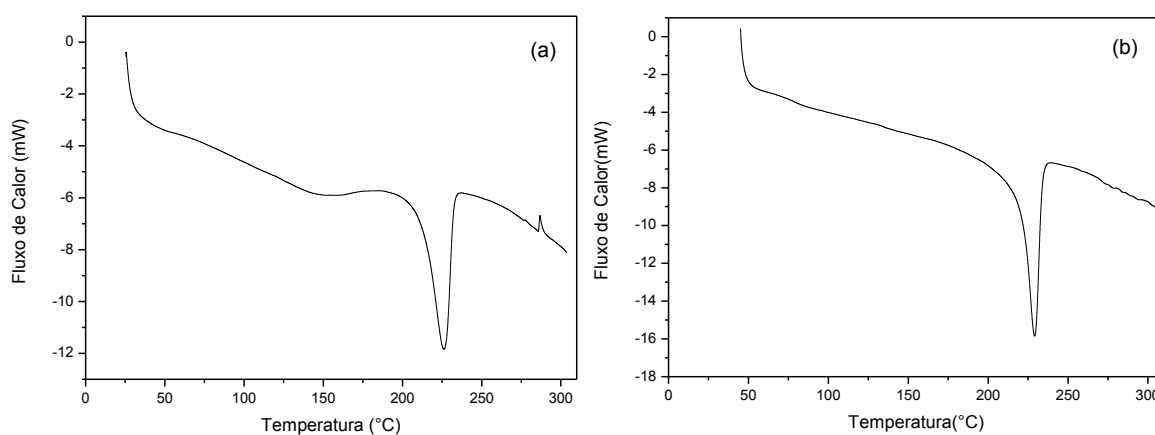
As linhas vermelha e azul da Figura 10 exibem as bandas de absorção características das espumas NRL e RL, respectivamente. Incorporando partículas de BCP no PVA a faixa de absorção ampla associada ao alongamento de OH de PVA se mantém assim como a faixa vibrações de estiramento de C-H. A presença de fase inorgânica foi confirmada pela detecção da faixa de absorção  $554\text{cm}^{-1}$  e  $442\text{cm}^{-1}$  nos espectros dos compósitos, atribuíveis aos grupos fosfato. Novas bandas de absorção entre  $1600\text{cm}^{-1}$  e  $1650\text{cm}^{-1}$  foram observadas. Elas podem indicar a interação entre os grupos funcionais da macromolécula com os íons Ca via interação eletrostática (STIPNIECE et al.,2016). A banda em  $1413\text{cm}^{-1}$  está associada a presença de  $\text{CH}_2$  adjacente a carbonila, esse pico alargado confirma a presença de glutaraldeído que não reagiu (RIGO, 2016).

## 5.2 Análise Térmica

### 5.2.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A Figura 11 (a) apresenta o DSC do PVA puro durante o primeiro aquecimento. A curva apresenta dois picos endotérmicos característicos de PVA, um entre  $100\text{ }^\circ\text{C}$  e  $150\text{ }^\circ\text{C}$ , outro em aproximadamente  $220\text{ }^\circ\text{C}$ . A banda formada entre  $100\text{ }^\circ\text{C}$  e  $148\text{ }^\circ\text{C}$  corresponde à evaporação da água residual presente na amostra. Já o pico pontiagudo entre  $190\text{ }^\circ\text{C}$  e  $220\text{ }^\circ\text{C}$  representa a fusão do PVA (PASTEL e VAVIA, 2010).

**Figura 11 - DSC do PVA puro no (a) primeiro aquecimento e no (b) segundo aquecimento.**

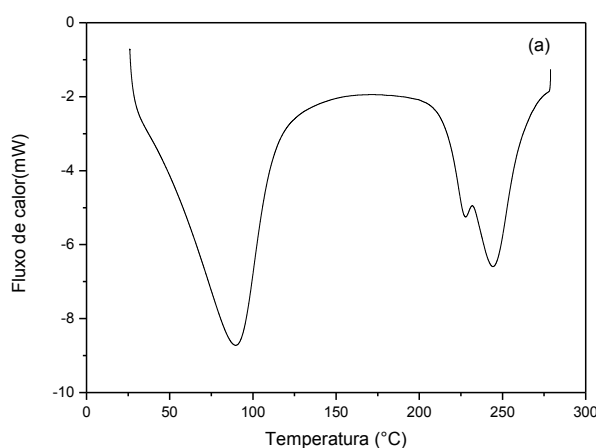


Fonte: Próprio autor.

A Figura 11 (b) corresponde à curva de DSC do PVA puro no segundo aquecimento. Nessa curva, o primeiro pico desaparece, o que confirma a evaporação da água residual durante o primeiro aquecimento, entretanto o segundo pico se mantém, confirmando a fusão do PVA novamente.

A Figura 12 apresenta a curva de DSC para a espuma reticulada e liofilizada.

**Figura 12- DSC da espuma RL.**

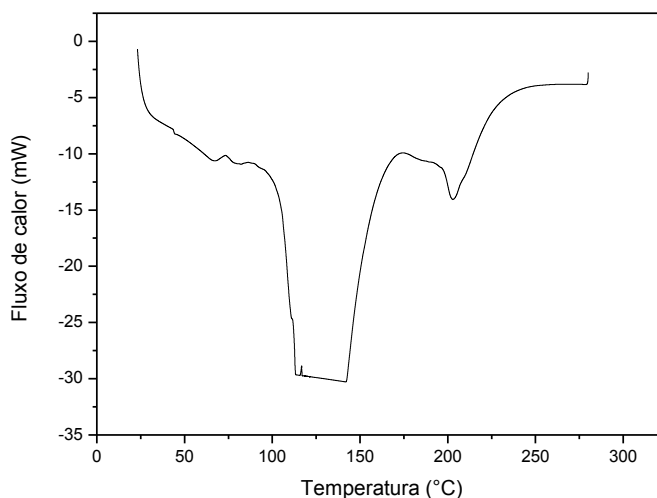


Fonte: Próprio autor

A curva de DSC para a espuma reticulada (Figura 12) apresentou três picos endotérmicos. O primeiro pico a temperaturas próximas de 100°C representa a evaporação da água residual. O segundo e o terceiro pico são referentes a fusão do composto, sendo que a 227°C ocorre a fusão da parte do material que não foi reticulado, e a 245°C a fusão do composto reticulado, isso evidencia que o processo de reticulação não foi completamente eficiente, como já havia indicado o ensaio de FTIR através das bandas referente ao glutaraldéido não reagido.

A presença de BCP na espuma reticulada não alterou as faixas de temperatura de fusão, uma vez que os resultados obtidos foram os mesmos de Rosa 2012, que preparou a espuma sem a fase inorgânica.

A Figura 13 apresenta a curva de DSC para a espuma não reticulada e liofilizada.

**Figura 13- DSC da espuma NRL**

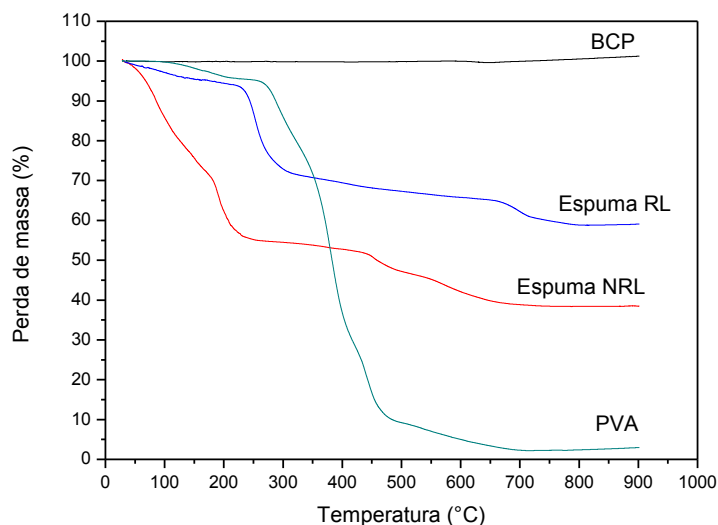
Fonte: Próprio autor

Nessa curva, o primeiro pico é referente a saída de água residual, que quando comparada a espuma reticulada, aconteceu em temperaturas mais elevadas. O aspecto quadrado do pico pode estar relacionado a sensibilidade do equipamento, uma vez que o ensaio foi repetido por três vezes, sendo que na última os parâmetros foram alterados para uma menor taxa de aquecimento. Não foram encontrados na literatura picos com aspectos semelhantes, o que reforça a hipótese da dificuldade do equipamento em realizar a leitura.

O pico a 202°C é referente a fusão do compósito, a diminuição da temperatura de fusão, quando comparado ao polímero puro, sugere que a cristalinidade e perfeição da estrutura de cristal são reduzidas pela carga inorgânica (MAHESHWARI; SAMUEL; NAGIAH, 2014).

### 5.2.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

A Figura 14 apresenta as curvas obtidas por TGA do PVA puro, BCP e as espumas reticulada e não reticulada.

**Figura 14- Curvas TGA**

Fonte: Próprio autor

Como é possível observar, a curva para o fosfato de cálcio bifásico se mantém estável durante toda a faixa de temperatura, isso se dá devido a estabilidade térmica característica do BCP (LANAO et al., 20013).

A Tabela 6 apresenta os eventos que ocasionaram a perda de massa das amostras de PVA e das espumas.

**Tabela 6 – Eventos que ocasionaram perda de massa**

Amostra	Quedas (°C)	% Massa	Evento
PVA	105 – 270	95%	Eliminação partes amorfas
	270-480	9%	Eliminação partes cristalinas
	480-690	2%	Decomposição de resíduo
Espuma RL	34-228	93%	Eliminação de compostos voláteis, em sua maioria água e de partes amorfas da estrutura.
	228-322	71%	Eliminação partes amorfas
	322-670	65%	Eliminação das partes cristalinas
	670 – 750	58%	Decomposição do CaCO <sub>3</sub> residual
Espuma NRL	35-180	70%	Eliminação de compostos voláteis, em sua maioria água
	180-260	55%	Eliminação partes amorfas
	260-460	51%	Eliminação partes cristalinas
	460-670	38%	Eliminação partes cristalinas e decomposição do CaCO <sub>3</sub> residual

Fonte: Próprio Autor

A curva de perda de massa do PVA mostra que o polímero tem uma menor estabilidade térmica, uma propriedade comum aos polímeros lineares de baixo peso molecular. A curva do PVA apresenta duas etapas de degradação: a primeira a 270°C está relacionada com a eliminação das partes amorfas do polímero, enquanto a segunda, a 480°C, corresponde à degradação das partes cristalinas de maior estabilidade térmica (DASSIOS,2012).

A etapa de eliminação de água para a espuma RL representou uma menor perda de massa quando comparada a espuma NRL, isso se deve a presença de glutaraldeído que diminui a hidrofiliabilidade da amostra reticulada. Os eventos de degradação da cadeia polimérica, para espuma RL, ocorreram em temperaturas mais elevadas o que mostrou uma melhor estabilidade térmica em relação a espuma NRL. É possível observar ainda que a perda de massa final da espuma que foi reticulada com glutaraldeído é menor do que a espuma não reticulada. A reticulação química torna a cadeia mais estável que a reticulação feita através da interação da superfície do BCP com as hidroxilas da cadeia do PVA (NIE et al., 2012).

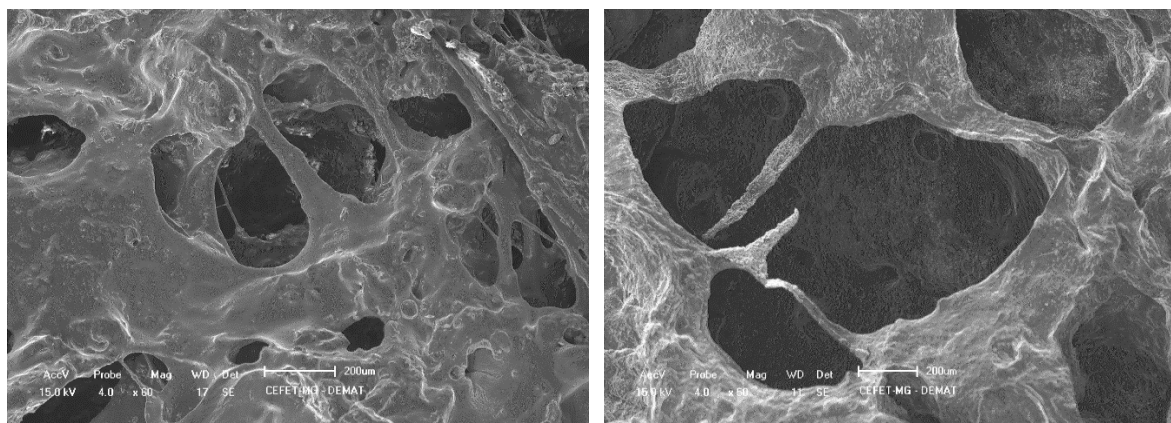
### 5.3 Caracterização Morfológica

#### 5.3.1 Microscopia Eletrônica de varredura (MEV)

Sabe-se que os scaffolds porosos interligados desempenham um papel crítico na engenharia de tecido ósseo. Eles proporcionam um modelo para a fixação de células e formação de matriz extracelular óssea e o suporte estrutural para o tecido recém-formado. (NIE et al., 2012).

As imagens da Figura 15 mostram a morfologia da rede macroporosa para a espuma RL.

**Figura 15- Imagens de MEV da espuma RL**



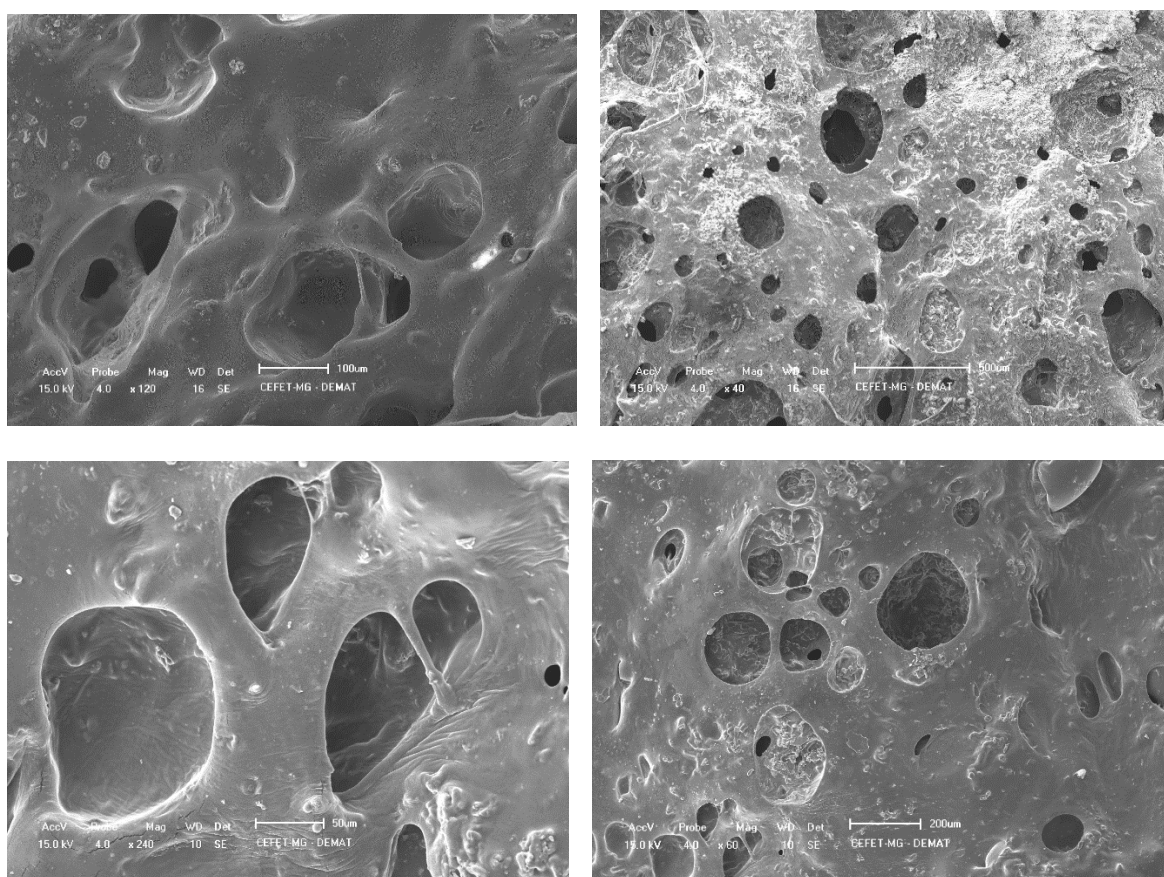
Fonte: Próprio autor.



A análise de imagem da espuma RL (Figura 15) indica a presença de uma estrutura macroporosa com tamanho de poros variando entre 100 a 800  $\mu\text{m}$ . A presença desses macroporos é de suma importância em scaffolds para tecido ósseo, visto que os osteoblastos migram, aderem e proliferam mais facilmente em poros com tamanhos entre 200 a 400  $\mu\text{m}$  de diâmetro (KIM, KNOWLES e KIM, 2004). É possível observar também que a amostra apresenta poros interconectados.

As espumas que não foram reticuladas com glutaraldeído apresentaram morfologia semelhante à das espumas reticuladas como pode ser observado nas imagens da Figura 16.

**Figura 16-- Imagens de MEV espuma NRL**

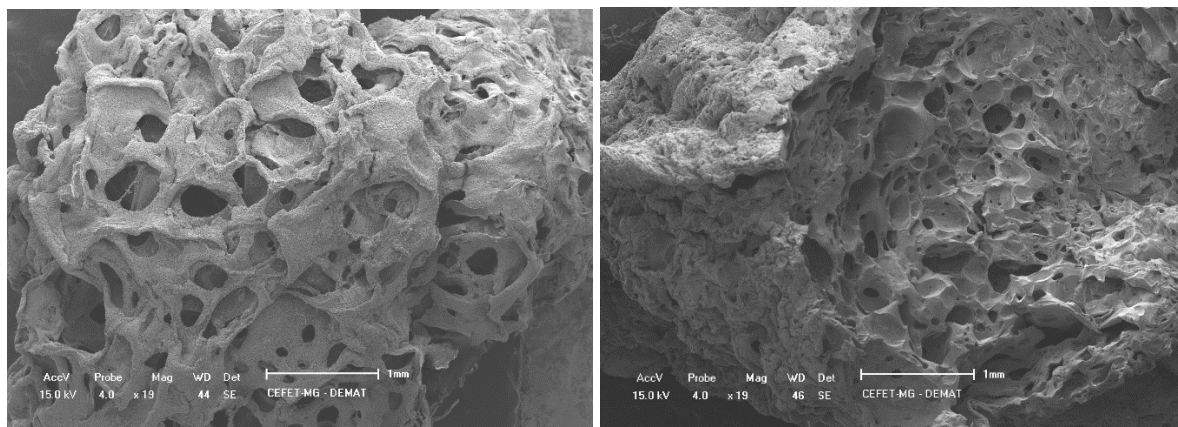


Fonte: Próprio autor.

As espumas de biocompósito PVA/BCP reticulada ou não, mostraram estrutura altamente porosa com canais de poros e estruturas interconectadas, com a fase orgânico-inorgânica sendo distinguível. Essa distinção entre as fases pode ser explicada pela menor interação entre as fases, uma vez que as partículas de BCP apresentam tamanhos entre 53 e 38 $\mu\text{m}$  e as utilizadas em Nie et al (2012) foram nanopartículas.

As imagens da Figura 17 apresentam a superfície e o interior da espuma.

**Figura 17- Imagens do MEV da espuma RL na (a) superfície e na (b) fratura**



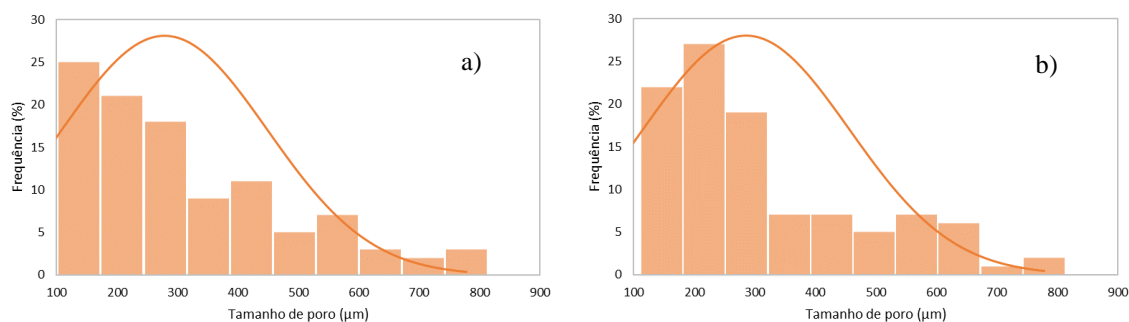
Fonte: Próprio autor.

A imagem da Figura 17 (a) confirma a formação de uma superfície contendo poros que se conectam com o interior do material. Scaffolds com superfície porosa e com poros interconectados facilita a a difusão de nutrientes, oxigênio e remoção de resíduos. Além disso, uma estrutura com rede de poros auxilia na orientação e formação do novo tecido (LOH; CHOONG, 2013).

A imagem da fratura do material também exibe diversos poros interconectados com tamanhos variados, indicando a heterogeneidade da população de poros interconectados que favorecem o crescimento e desenvolvimento de tecidos.

Utilizando o software ImageJ foi possível medir os tamanhos dos poros e foram plotados os histogramas para se avaliar os efeitos da reticulação, na dispersão da população de poros presentes na estrutura. A Figura 18 apresenta o histograma para a espumas (a) não reticulada e (b) reticulada

**Figura 18 – Histogramas da dispersão do tamanho de poro**



Fonte: Próprio autor

Pela curva de distribuição normal do tamanho de poros obtidos da espuma não reticulada, nota-se uma predominância de poros com tamanhos até 300  $\mu\text{m}$ . A curva de distribuição normal para estas amostras é larga indicando que há uma variedade na população dos poros.

Já para as amostras que passaram pelo processo de reticulação, observa-se um tamanho médio de poro maior, e um aumento na frequência de poros com tamanhos entre 200 a 300  $\mu\text{m}$ . A curva de distribuição normal para estas amostras é semelhante à das espumas não reticuladas indicando que a reticulação não alterou a variedade na população dos poros.

## 6 CONCLUSÕES

As matérias primas utilizadas para a produção das espumas estavam de acordo com as composições químicas requeridas, os ensaios de caracterização confirmaram isso. Quanto as espumas produzidas, nas análises de FTIR ambas apresentaram bandas características do PVA e do BCP e bandas que podem indicar a interação entre os grupos funcionais da macromolécula com os íons Ca via interação eletrostática. Para as espumas reticuladas foi observado um pico mais alargado que sugere a presença de glutaraldeído não reagido.

As análises térmicas indicam uma menor hidrofobicidade das espumas RL, o que está associado a presença do agente reticulante. As curvas de DSC, para a espuma NRL, sugerem que a inserção da fase inorgânica reduziu a perfeição da estrutura de cristal o que acarretou a diminuição da temperatura de fusão. Já para as espumas RL a presença do glutaraldeído deixou o compósito mais estável aumentando a sua temperatura de fusão, no entanto como já observado no FTIR uma parte do material não foi reticulado.

Por fim, as espumas obtidas foram caracterizadas morfológicamente, sendo que os resultados confirmam a formação de poros de tamanhos variados proporcionados pela reação do agente de expansão  $\text{CaCO}_3$  com HCl e pela liofilização, para ambas as espumas. A população de poros variou de 100  $\mu\text{m}$  a 800  $\mu\text{m}$ , com a presença de poros de até 800  $\mu\text{m}$ . Essa heterogeneidade no tamanho dos poros facilita a migração, adesão e proliferação dos osteoblastos. O que indica que as espumas produzidas possuem potencial para uso como scaffold em tecido ósseo.

## **7 TRABALHOS FUTUROS**

Para atividades futuras para a continuidade do presente trabalho, sugere-se os estudos abaixo relacionados:

- Análise das propriedades mecânicas das espumas;
- Ensaio de degradação das espumas produzidas em SBF;
- Estudos cinéticos de reticulação do PVA;
- Evolução da técnica para o aumento da interconectividade entre poros;
- Ensaio *in vitro* para avaliação da adesão celular.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANHA, I, B. Chemical modification of poly(vinyl alcohol): evaluation of hydrophilic/lipophilic balance. **Polímeros**, vol.11, n<sup>o</sup>4, p.174-181, 2001.

ATHANASIOU, K.A.; ZHU, P.E.; LANCOT, D.R.; AGRAWAL, C.M.; WANG, X.: **Fundamentals of biomaterials in tissue engineering of bone**. Tissue Engineering, vol.6, n<sup>o</sup>4, 2000.

BAI, Xue et al. Preparation of crosslinked macroporous PVA foam carrier for immobilization of microorganisms. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 45, n. 1, p.60-66, jan. 2010.

BALBUENA, O, B, F. Síntese de fosfato de cálcio bifásico via sol-gel e processamento de amostras para aplicação em bioengenharia. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, 2015.

BANKS, W. J. Tecidos de sustentação-osso. In: **Histologia aplicada**. 2.ed. São Paulo: Ed. Manole, 1992. p.137-166.

BATISTA, T.S. Desenvolvimento de nanomateriais absorvedores no ultravioleta para aplicação em filtros solares, **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão,2010.

BHAT, N. V et al. **Effect of g-radiation on the structure and morphology of polyvinyl alcohol films**. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B. v.237, p.585–92, 2005.

BERTHIAUME, F.; MAGUIRE, T. YARMUSH. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. **Annual Reviews of Chemical and Biomolecular Engineering**, 2, pp. 403-430, 2011.

BOCCACCINI, A. Bioresorbable and bioactive polymer/Bioglass® composites with tailored pore structure for tissue engineering applications. **Composites Science And Technology**, [s.l.], v. 63, n. 16, p.2417-2429, dez. 2003.

BUCKLEY, C.T. **Topics in Bio-Mechanical Engineering**. Trinity Centre for Bioengineering & National Centre for Biomedical Engineering Science, Dublin ,Ireland, Compos Sci Technol, pp. 2417-2429,2003.

CHIELLINI, Emo et al. Biodegradation of poly (vinyl alcohol) based materials. **Progress In Polymer Science**, [s.l.], v. 28, n. 6, p.963-1014, jun. 2003.

DASSIOS, Konstantinos G.. Poly(Vinyl Alcohol)-Infiltrated Carbon Nanotube Carpets. **Materials Sciences And Applications**, [s.l.], v. 03, n. 09, p.658-663, 2012.

DEMPSTER D. W. New concepts in bone remodeling. In: SEIBEL, M. J.; ROBINS, S. P.; BILEZIKIAN, J. P. **Dynamics of bone and cartilage metabolism**. San Diego: Academic Press, 1999. cap.18, p.261-273.

ELLIOT, J. C. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Amsterdam: Elsevier, 1994, 389p.

FIGUEIREDO, K. C. S.; ALVES, T. L. M.; BORGES, C. P. Poly(vinyl alcohol) films crosslinked by glutaraldehyde under mild conditions. **Journal of applied polymer science**, v. 111, p. 3074–3080, 2009.

FONTES, R. A. M. **Fabrico e caracterização de scaffolds à base de fosfatos de cálcio**. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, p. 98. 2010.

GARTNER, Leslie P; HIATT, James L. **Tratado de histologia**. 3 ed. Trad. Thaís Porto Amadeu. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

GERHARDT, Lutz-christian; BOCCACCINI, Aldo R.. Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Materials**, [s.l.], v. 3, n. 7, p.3867-3910, 6 jul. 2010.

HASSAN, C. M.; PEPPAS, N. A. Structure and applications of polyvinyl alcohol hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods. **Advances in Polymer Science**, v. 153, p. 37-65, 2000.

JUDAS, F. et al. **Estrutura dinâmica do tecido ósseo**. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, 2012.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.136-148.

KAPLAN, F. S. Form and function of bone. In: SIMON, S.R. Orthopaedic basic science. Chicago: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1994.

KASTEN P., BEYEN I., NIEMEYER P., LUGINBÜHL R., BOHNER M., RICHTER W. Porosity and pore size of beta-tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: an in vitro and in vivo study. **Acta Biomater.**, v.4, n.6, p.1904-15, 2008.

KIM, Hae-won; KNOWLES, Jonathan C.; KIM, Hyoun-ee. Hydroxyapatite/poly( $\epsilon$ -caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. **Biomaterials**, [s.l.], v. 25, n. 7-8, p.1279-1287, 2004.

KOHN, J. New approaches to biomaterials design. **Nature Materials**, v. 3, n. 11, p. 745-747, 2004.

KUMAR, Anuj et al. Microstructural and mechanical properties of porous biocomposite scaffolds based on polyvinyl alcohol, nano-hydroxyapatite and cellulose nanocrystals. **Cellulose**, [s.l.], v. 21, n. 5, p.3409-3426, 18 jul. 2014.

LANAO, P. et al. Physicochemical Properties and Applications of Poly(lactic-co-glycolic acid) for Use in Bone Regeneration. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.380-390, ago. 2013.

LANGER, R.; Tirrell, D. A.: **Designing materials for biology and medicine**. Nature, vol.248, 2004.

LANGER, R.; VACANTI, J. Advances in tissue engineering. **Journal of pediatric surgery**, 2015.

LENZA, R. F. S.; JONES, J. R.; VASCONCELOS, W. L.; HENCH, L. L.: Surface-modified 3d scaffolds for tissue engineering. **Journal Mat. S-M. M**, vol.13, p.837-842, 2002.

LEOR, J. COHEN, S. Myocardial tissue engineering: creating a muscle patch for a wounded heart. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1015, p. 312-319, 2004.

LIMA, I. R. Efeito do zinco na biocompatibilidade in vitro e in vivo de grânulos de zincoapatita 5% em comparação com a hidroxiapatita. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, 2006.

LIRANI, A. P. R. Estudo comparativo dos efeitos do ultra-som e do laser de baixa intensidade no reparo ósseo de tibia de rato. **Dissertação de Mestrado**. Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

LOH, Q. L; CHOONG, C. Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, [s.l.], v. 19, n. 6, p.485-502, dez. 2013.

MAHESHWARI, S.U; SAMUEL, V. K; NAGIAH, N. Fabrication and evaluation of (PVA/HAp/PCL) bilayer composites as potential scaffolds for bone tissue regeneration application. **Ceramics International**, [s.l.], v. 40, n. 6, p.8469-8477, jul. 2014.

MANSUR, H. S. et al. FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. **Materials science and engineering c**. Belo Horizonte, n. 28, p. 539–548, 2008.

MIRSALEHI Seyed Ali, SATTARI, Mohammadali; KHAVANDI, Alireza; MIRDAMADI, Shamsodin; JAMAL, M. Reza Naimi. Tensile and biocompatibility properties of synthesized nano-hydroxyapatite reinforced ultrahigh molecular weight polyethylene nanocomposite. **Journal of Composite Materials**. v. 50. 2016.

NIE, Lei et al. Physicochemical characterization and biocompatibility in vitro of biphasic calcium phosphate/polyvinyl alcohol scaffolds prepared by freeze-drying method for bone tissue engineering applications. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 100, p.169-176, dez. 2012.

NUTTELMANA, C. R.; HENRYA, S. M.; ANSETH, K. S. Synthesis and characterization of photocrosslinkable, degradable poly(vinyl alcohol)-based tissue engineering scaffolds. **Biomaterials**, v. 23, p. 3617–3626, 2002.

OLIVEIRA, A.A.R, et al. Avaliação das propriedades mecânicas de espumas híbridas de vidro bioativo/álcool polivinílico para aplicação em engenharia de tecidos. **Revista Matéria**, v. 12, n. 1, pp. 140 – 149, 2007.

PATEL, A. R.; VAVIA, P. R. Evaluation of synthesized cross linked polyvinyl alcohol as potential disintegrant. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, n. 13, p. 114 - 127, 2010.

PATEL, H.; BONDE, M.; SRINIVASAN, G. Biodegradable polymer scaffold for tissue engineering. **Trends Biomaterial Artificial Organs**, v. 25, n. 1, p. 20-29, 2011.



PRAKASAM, Mythili; LOCS, Janis; ANCANE, Kristine Salma; LOCA, Dagnija; LARGETEAU, Alain; CIMDINA, Liga Berzina. Fabrication, Properties and Applications of Dense Hydroxyapatite: A review. *Journal of Functional Biomaterials*. 2015.

RAMAKRISHNA, S; MAYER, J.; WINTERMANTEL, E.; LEONG, Kam W. Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. **Composites Science and Technology**. v. 61. 2001.

RATNER, Buddy D; HOFFMAN, Alan s.; SCHOEN, Frederick J.; LEMONS, Jack E. **Biomaterials Science: An introduction to Materials in Medicine**. 2. ed. Califórnia: Elsevier, 2004.

REICHERT, Johannes C. et al. Ovine bone- and marrow-derived progenitor cells and their potential for scaffold-based bone tissue engineering applications in vitro and in vivo. **Journal Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine**, [s.l.], v. 4, n. 7, p.565-576, 21 jun. 2010.

RIGO, E.C.S.; HABITZREUTER, F.. Avaliação das características físico-químicas e citotóxicas de membranas gelatina/quitosana com hidroxiapatita obtidas por precipitação in situ. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CERÂMICA, 60., **Anais...** São Paulo, 2016.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Patologia bases patológicas das doenças**; 7 Edição, Elsevier Editora Ltda, Rio de Janeiro, pp 91-124, 2005.

SABIR, Muhammad Iqbal; XU, Xiaoxue; LI, Li. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. **Journal Of Materials Science**, [s.l.], v. 44, n. 21, p.5713-5724, 12 ago. 2009.

SALGADO, Antônio J.; COUTINHO, Olga P.; REIS, Rui L. Bone-tissue engineering: state of the art and future trends. **Macromolecular Bioscience**, v.4, p.743-765, 2004.

SENGERS, B.G., et al., Computational modelling of cell spreading and tissue regeneration in porous scaffolds, **Biomaterials**, v. 28, pp. 1926-1940, 2007.

SCHMIDLIN, P. R. et al. Evaluation of moldable, in situ hardening calcium phosphate bone graft substitutes. **Clinical Oral Implants Research**, [s.l.], v. 24, n. 2, p.149-157, 1 nov. 2011.

SONG, Yue et al. Nano-biphasic calcium phosphate/polyvinyl alcohol composites with enhanced bioactivity for bone repair via low-temperature three-dimensional printing and loading with platelet-rich fibrin. **International Journal Of Nanomedicine**, [s.l.], v. 13, p.505-523, jan. 2018.

STIPNIECE, Liga et al. Development of functionalized hydroxyapatite/poly(vinyl alcohol) composites. **Journal Of Crystal Growth**, [s.l.], v. 444, p.14-20, jun. 2016.

VACANTI, J. P.; VACANTI, C. V. The history and scope of tissue engineering. In: LANGER, R.; LANZA, R. P.; VACANTI, J. P. **Principles of tissue engineering**. 3. ed. [S.l.]: Elsevier, 2007. p. 3-6.

WANG, Xuanhui et al. Tissue engineering of biphasic cartilage constructs using various biodegradable scaffolds: an in vitro study. **Biomaterials**, [s.l.], v. 25, n. 17, p.3681-3688, ago. 2004.

YE, M.; MOHANTY, P.; GHOSH, G. Morphology and properties of poly vinyl alcohol (PVA) scaffolds: impact of process variables. **Materials science and engineering**, v. 42, p. 289-294, 2014.

ZHAO, J., et al., A study on improving mechanical properties of porous HA tissue engineering scaffolds by hot isostatic pressing. **Biomedical Materials**, v. 1, pp. 188-192, 2006.