

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

THAUANE MENDES MAIA

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE COMPÓSITOS DE  
HIDROXIAPATITA E GELATINA PARA POTENCIAL APLICAÇÃO COMO CIMENTO  
ÓSSEO

BELO HORIZONTE

2021

THAUANE MENDES MAIA

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE COMPÓSITOS DE  
HIDROXIAPATITA E GELATINA PARA POTENCIAL APLICAÇÃO COMO CIMENTO  
ÓSSEO

Trabalho de conclusão de curso apresentado no curso de Graduação em Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais – CEFET-MG, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Engenharia de Materiais.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Marra de Freitas Silva Azevedo

Belo Horizonte

2021

THAUANE MENDES MAIA

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE COMPÓSITOS DE  
HIDROXIAPATITA E GELATINA PARA POTENCIAL APLICAÇÃO COMO CIMENTO  
ÓSSEO

Trabalho de conclusão de curso apresentado no curso de Graduação de Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais – CEFET-MG, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Materiais.

Aprovado em 10/02/2022

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Danielle Marra de Freitas Silva Azevedo (Orientadora)  
Departamento de Ciências Biológicas do CEFET/MG

---

Profa. Dra. Mariana Martins Drumond  
Departamento de Ciências Biológicas do CEFET/MG

---

Prof. Dr. Sidney Nicodemos Da Silva  
Departamento de Física do CEFET/MG

## **AGRADECIMENTOS**

A minha mãe, que sempre lutou para que meu caminho nos estudos fosse garantido, incentivando e auxiliando, com muito carinho e amor, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu pai, que sempre me incentivou, fosse qual fosse o meu caminho escolhido, com muito suporte e amor.

Ao meu irmão, que com suas mensagens e assuntos aleatórios, me proporcionou bons momentos de descontração e reenergização.

A querida professora orientadora Danielle Marra de Freitas Silva Azevedo, por todo ensinamento antes e durante esta produção, com confiança e carinho, que foi essencial para a conclusão de mais essa etapa de minha vida.

Ao professor Sidney Nicodemos da Silva, por disponibilizar a hidroxiapatita necessária para realização deste trabalho.

Ao Jorge Wanderson por toda disponibilidade, cuidado e ajuda na análise das amostras.

A professora Aline Magalhães por todo apoio, carinho e orientação na disciplina, no meu aprendizado e produção deste material.

Ao CEFET-MG por disponibilizar parte dos materiais primas, além dos laboratórios e ensaios utilizados para o desenvolvimento do meu aprendizado e deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram e incentivaram nessa realização e que, mesmo não tendo seus nomes citados aqui, merecem meu mais profundo agradecimento.

A todos devo agradecer pelos bons momentos, pelos momentos difíceis que superamos juntos e por todo aprendizado que levarei comigo por toda a vida.

Muito obrigada!

## RESUMO

Existem vários tipos de traumas e doenças que podem levar a lesão ou perda de funções do tecido ósseo. A necessidade de busca por métodos de reparação e regeneração tem sido cada vez mais relevante e necessária. Neste trabalho foram produzidos e caracterizados compósitos formados por hidroxiapatita e gelatina, nas proporções de 2 e 5% m/m, para potencial aplicação como cimento ósseo. As matérias-primas hidroxiapatita e gelatina foram caracterizadas por meio das técnicas de Difração de Raios-X (DRX) e Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), respectivamente. Os compósitos foram produzidos pela técnica de mistura manual da fase líquida, formada pelo acelerante hidrogenofosfato dissódico e gelatina, e a fase sólida, formada pela hidroxiapatita. O tempo de pega (*setting time*) dos compósitos produzidos foi avaliado por meio de um aparato similar ao equipamento de Vicat. Os compósitos foram caracterizados pelas técnicas de DRX, Florescência de Raios-X por Energia Dispersiva (EDX) e Microdureza Vickers. O material contendo 5% de gelatina apresentou cura mais rápida, contudo, o tempo final e o tempo médio de pega de ambos os compósitos foi superior ao tempo dos cimentos ósseos comerciais. A adição de gelatina ocasionou diminuição na cristalinidade do material, sendo, a redução em relação à hidroxiapatita pura, de 5 e 12% para os compósitos contendo 2 e 5% de gelatina, respectivamente. O compósito contendo 5% de gelatina apresentou valor médio de resistência mecânica de  $19,35 \pm 3,42$  MPa, dentro da faixa de resistência a flexão para o osso esponjoso, o que sugere potencial aplicação desse material como cimento no reparo de lesões desse tecido.

Palavras-chave: compósito; hidroxiapatita; gelatina; cimento ósseo.

## ABSTRACT

There are several types of traumas and diseases that can lead to injury or loss of bone tissue function. The need to search for methods of repair and regeneration has been increasingly relevant and necessary. In this work, composites formed by hydroxyapatite and gelatin were produced and characterized, in proportions of 2 and 5% w/w, for potential application as bone cement. The hydroxyapatite and gelatine raw materials were characterized using X-Ray Diffraction (XRD) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), respectively. The composites were produced by the manual mixing technique of the liquid phase, formed by disodium hydrogen phosphate accelerant and gelatin, and the solid phase, formed by hydroxyapatite. The setting time of the composites produced was evaluated using an apparatus similar to the Vicat equipment. The composites were characterized by XRD, Energy Dispersive X-ray Fluorescence (EDX) and Vickers Microhardness. The material containing 5% gelatine presented faster cure, however, the final time and the average time of setting of both composites were superior to the time of commercial bone cements. The addition of gelatin caused a decrease in the crystallinity of the material, in comparison to pure hydroxyapatite, of 5 and 12% for composites containing 2 and 5% of gelatin, respectively. The composite containing 5% gelatin showed an average mechanical strength value of  $19.35 \pm 3.42$  MPa, within the range of flexural strength for cancellous bone, which suggests potential application of this material as a cement in the repair of injuries to this tissue.

Keywords: composite; hydroxyapatite; gelatin; bone cement.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organização estrutural dos ossos longos. ....	15
Figura 2- Esquema ilustrativo de um osso longo. ....	16
Figura 3 - Fases da reparação óssea.....	19
Figura 4 - Diagrama de isotermas de solubilidade para fosfatos de cálcio. ....	29
Figura 5 - Representação esquemática da estrutura cristalina da HA. ....	31
Figura 6 - Representação esquemática da estrutura do colágeno e da gelatina. ....	33
Figura 7 - Fluxograma de descrição do trabalho .....	36
Figura 8 - Molde utilizado para produção da amostra.....	41
Figura 9 - Amostras produzidas.....	42
Figura 10 – Montagem utilizada para análise do tempo de pega dos corpos de prova .....	42
Figura 11 - Superfície das amostras após terceira medida .....	43
Figura 12 - DRX da Hidroxiapatita .....	45
Figura 13 - FTIR da Gelatina .....	47
Figura 14 - DRX para Amostra de 2% de Gelatina.....	49
Figura 15 - DRX para Amostra de 5% de Gelatina.....	49
Figura 16 – Endentações realizadas no ensaio de Microdureza Vickers.....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferenças entre o tecido ósseo compacto e o esponjoso.....	17
Tabela 2 - Composição de alguns cimentos ósseos acrílicos disponíveis no mercado. ....	23
Tabela 3 - Fosfatos de cálcio presentes no organismo humano. ....	26
Tabela 4 - Métodos de síntese de diferentes composições de fosfatos de cálcio. ....	27
Tabela 5 - Classificação dos fosfatos de cálcio pela relação Ca/P. ....	28
Tabela 6 - Índice de bioatividade de diferentes materiais. ....	32
Tabela 7 - Dados da Hidroxiapatita.....	37
Tabela 8 - Especificação Química da Hidroxiapatita .....	38
Tabela 9 - Propriedades da Gelatina.....	39
Tabela 10 - Propriedades do Hidrogenofosfato dissódico.....	39
Tabela 11 - Teor de impurezas do Hidrogenofosfato dissódico.....	39
Tabela 12 - Picos característicos do DRX da Hidroxiapatita .....	46
Tabela 13 - Resultados obtidos para o Tempo de Pega do compósito produzido .....	48
Tabela 14 - Picos característicos do DRX da amostra de 2% .....	50
Tabela 15 - EDX da amostra de 2% de Gelatina.....	51
Tabela 16 - EDX da amostra de 5% de Gelatina.....	51
Tabela 17 - Microdureza e resistência mecânica dos materiais propostos .....	53

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E UNIDADES

ABC - Cimento ósseo acrílico  
ACP - Fosfato de cálcio amorfo  
ASTM - *merican Society for Test and Materials* (Órgão americano de normalização)  
BPO - Peróxido de benzoílo  
Ca/P - Relação proporcional entre Cálcio e Fosfato em uma composição  
CDHA - Hidroxiapatita deficiente em cálcio  
CMP - Metafosfato de cálcio  
CPC - Cimentos de fosfato de cálcio  
CPP - Pirofosfato de cálcio  
CPPD - Pirofosfato de cálcio dihidratado  
CSC - Cimento de sulfato de cálcio  
CSD - Sulfato de cálcio dihidratado  
CSH - Sulfato de cálcio hemihidratado  
DCP - Mono hidrogeno Fosfato de cálcio  
DCPD - Mono hidrogeno Fosfato de cálcio dihidratado  
DMT - N,N-dimetil-p-touluidina  
DRX - Difração de raios-x  
EDX - Florescência de Raios-X por Energia Dispersiva  
FC - Fosfato de cálcio  
FTIR - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier  
HA - Hidroxiapatita  
HCP - Fosfato Heptacálcico  
HV - Dureza Vickers  
ISO - *International Organization for Standarlization*  
Ib - Índice de bioatividade  
Ic - Índice de cristalinidade  
ICDD - *International Center of diffraction data*  
kV - Kilo Volt  
mA - Mili Ámpere  
MCPM - Fosfato monocálcio mono-hidratado  
MEV - Microscopia eletrônica de varredura  
MMA - Metilmetacrilato

mP - Mili Poise

OCP - Fosfato octacálcico

PCL - Policaprolactona

PGA - Ácido poliglicólico

PHB - Ácido polihidroxitirato

PLA - Ácido polilático

PMMA - Plimetilmetacrilato

TCP - Fosfato tricálcico

TDHP - Di-hidrogênio fosfato tetracálcico

TeCP - Fosfato tetracálcico

$\Theta$  - Theta

$\emptyset$  - Diâmetro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>13</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Tecido Ósseo.....</b>	<b>14</b>
3.1.1 Reparo de lesões do tecido ósseo .....	18
3.1.2 Biomateriais utilizados para reparo de fraturas ósseas .....	20
<b>3.2 Cimento ósseo.....</b>	<b>22</b>
3.2.1 Cimentos ósseos acrílicos .....	22
3.2.2 Cimentos ósseos de fosfato e sulfato de cálcio .....	24
3.2.3 Cimentos ósseos compósitos.....	25
<b>3.3 Fosfatos de Cálcio .....</b>	<b>26</b>
3.3.1 Hidroxiapatita.....	30
<b>3.5 Gelatina.....</b>	<b>32</b>
<b>3.6 Material Proposto .....</b>	<b>34</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1 Desenho Experimental.....</b>	<b>36</b>
<b>4.2 Materiais .....</b>	<b>37</b>
4.2.1 Hidroxiapatita.....	37
4.2.2 Gelatina .....	38
4.2.3 Hidrogenofosfato dissódico .....	38
<b>4.3 Métodos.....</b>	<b>40</b>
4.3.1 DRX da Hidroxiapatita .....	40
4.3.2 FTIR da Gelatina.....	40
4.3.3 Produção do compósito .....	41
4.3.4 Ensaio de Tempo de Pega ( <i>Setting time</i> ).....	42
4.3.5 Ensaio de Difração de Raios-X (DRX).....	43
4.3.6 Ensaio de Florescência de Raios-X por Energia Dispersiva (EDX).....	44
4.3.7 Ensaio de Microdureza Vickers .....	44
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>5.1 Matérias-primas.....</b>	<b>45</b>

5.1.1 DRX da hidroxiapatita .....	45
5.1.2 FTIR da Gelatina.....	47
<b>5.2 Ensaio de Tempo de Pega (<i>Setting time</i>) .....</b>	<b>48</b>
<b>5.3 Ensaio de Difração de Raios-X (DRX) .....</b>	<b>49</b>
<b>5.4 Ensaio de Florescência de Raios-X por Energia Dispersiva (EDX) .....</b>	<b>51</b>
<b>5.5 Ensaio de Microdureza Vickers.....</b>	<b>52</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>56</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Diante de doenças degenerativas e diversos tipos de lesões súbitas, com intercorrências fisiológicas aguda de graus diversificados, que podem ocasionar a lesão ou perda de funções de órgãos e/ou tecidos, a busca por métodos de reparação e regeneração baseada no desenvolvimento de biomateriais tem tido cada vez mais atenção na Medicina. Atualmente, diversos tipos de materiais se mostram aptos para serem implantáveis no organismo humano (SILVA, 2017).

No tecido ósseo, implantes e próteses ortopédicas como placas metálicas, parafusos e substitutos de articulações são os dispositivos mais utilizados para correção de defeitos e distorções da estrutura tecidual. Ainda assim, muitas são as pesquisas que podem ser realizadas, como por exemplo, o desenvolvimento de materiais bioativos, que permitem uma melhor interação entre os materiais e o tecido ósseo (SILVA, 2017).

Os cimentos ósseos são materiais que apresentam alta biocompatibilidade e características mecânicas adequadas para o reparo de tecido ósseo. A composição dos cimentos ósseos pode ser muito diversa, entretanto, a associação de um fosfato de cálcio com um polímero, apresenta-se como uma estratégia interessante, à medida que mimetiza a composição original do tecido ósseo (JARCHO, 1980). Devido a alta similaridade com a composição do tecido ósseo, a hidroxiapatita se tornou cada vez mais atraente para desenvolvimento de cimentos ósseos (GUSTALDI; APARECIDA, 2010).

Neste trabalho, a hidroxiapatita será reforçada com gelatina, um polímero natural com composição similar ao colágeno presente no organismo, com o objetivo de produzir um material com potencial aplicação como cimento ósseo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Produzir e caracterizar um material compósito formado por hidroxiapatita e gelatina PA para potencial aplicação como cimento ósseo.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar físico-quimicamente as matérias-primas hidroxiapatita e gelatina;
- Produzir o material compósito formado por hidroxiapatita e gelatina na proporção de 2% e 5% m/m;
- Avaliar o tempo de pega (*setting time*) das amostras por meio de um experimento similar ao Ensaio Vicat;
- Caracterizar físico-quimicamente os materiais produzidos por meio das técnicas de Difração de Raios-X (DRX), Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva (EDX) e Microdureza Vickers.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

#### 3.1 Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo, sendo o principal constituinte do esqueleto. As suas principais funções são: suporte para tecidos moles, proteção de órgãos vitais e realização de movimentos quando está associado a músculos. Ainda, é considerado um depósito importante de íons que são necessários para o funcionamento do organismo, como cálcio e fósforo, sendo capaz de armazená-los e liberá-los de forma controlada (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Este tecido conjuntivo é formado por células e material extracelular calcificado, chamado de matriz óssea. As células que formam este tecido são os osteócitos (presentes nas cavidades/lacunas no interior da matriz), os osteoblastos (sintetizam a parcela orgânica da matriz e estão presentes na periferia do tecido) e, por fim, os osteoclastos (responsáveis por reabsorverem o tecido ósseo, liberar os íons para o organismo e remodelar os ossos) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

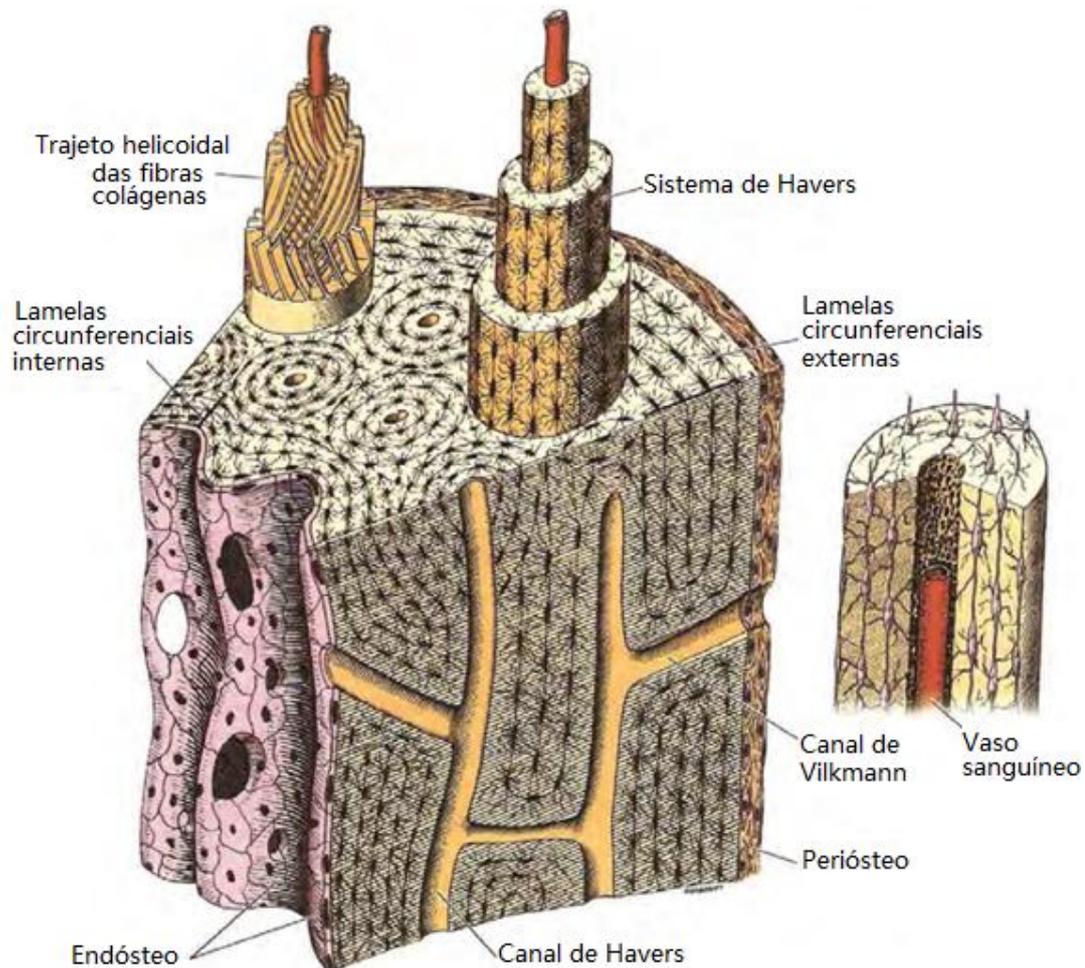
A parte inorgânica da matriz óssea constitui cerca de 50% do seu peso e os principais íons que a formam são o fosfato e o cálcio. Estes íons se associam formando um fosfato de cálcio denominado hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). Na superfície da hidroxiapatita estão os íons hidratados que constituem a capa de hidratação. Já a parte orgânica é formada por 95% de fibras colágenas do tipo I e 5% de proteoglicanos e glicoproteínas. A combinação das fibras colágenas com a hidroxiapatita é responsável pela dureza e resistência mecânica característica do tecido ósseo. Durante a descalcificação, o osso mantém sua forma intacta, mas torna-se muito flexível, em oposto, caso a parte orgânica fosse retirada, sua forma também seria intocada, mas ele se tornaria altamente quebradiço. Desta forma, a matriz extracelular do tecido ósseo é formada pela associação de polímeros (fibras colágenas, proteoglicanos e glicoproteínas) com material cerâmico (hidroxiapatita), formando, portanto, um material compósito. Interna e externamente a superfície do tecido ósseo é revestida por tecido conjuntivo osteogênico denominado endóstio e perióstio, respectivamente (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Na superfície do perióstio há principalmente fibras colágenas e fibroblastos. No seu interior existem mais células osteoprogenitoras, que depois de se diferenciarem em osteoblastos desempenham importante papel no crescimento e reparação de fraturas. O endóstio é formado principalmente por uma camada de células osteogênicas achatadas que revestem as cavidades

do osso esponjoso. As principais funções destas superfícies são a nutrição e o fornecimento de novos osteoblastos para crescimento do osso (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

O tecido ósseo se apresenta de duas formas, a primária/imatura ou secundária/madura/lamelar. O primeiro tecido a se formar é o primário, possuindo fibras colágenas desorganizadas e menor quantidade de minerais. A seguir, o tecido secundário começa a se formar e substitui gradativamente o primário. O secundário é formado por fibras colágenas organizadas em lamelas que podem ser paralelas ou concêntricas ao redor de canais com vasos, sendo estes canais chamados canais de Havers ou ósteons. Estes canais se comunicam entre si, com a cavidade medular e com a superfície externa do osso por meio de canais transversais ou oblíquos chamados de canais de Volkmann. Os arranjos das lamelas ósseas são organizados paralelamente e formam cilindros longos chamados de sistemas de Havers, como é possível observar na figura 1, juntamente com toda estrutura do tecido ósseo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

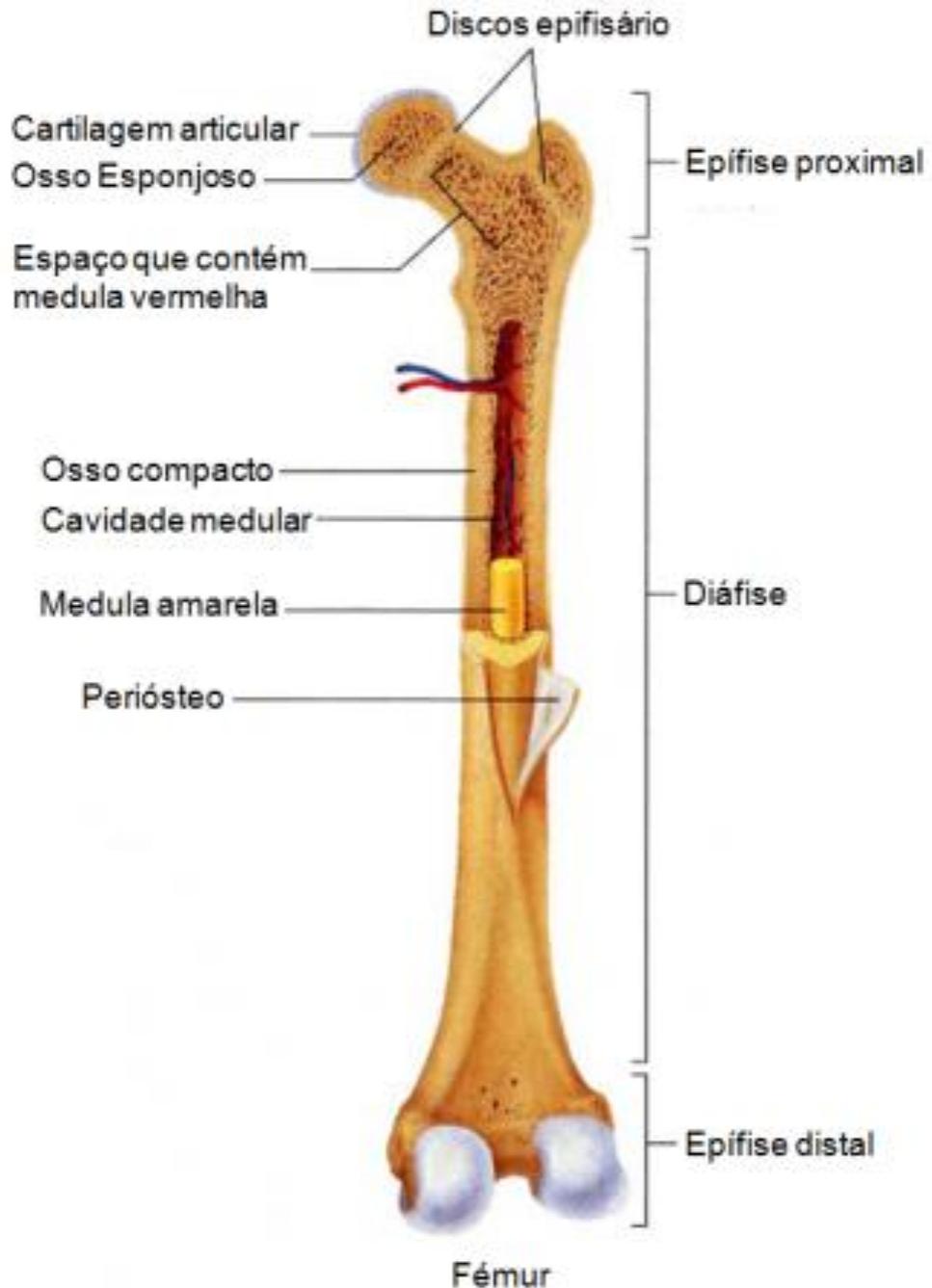
Figura 1 - Organização estrutural dos ossos longos.



Fonte: JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008 (Adaptado).

Ao se observar um corte feito em um osso é possível perceber partes sem cavidades e outras com muitas cavidades, sendo elas chamadas de osso compacto e osso esponjoso, respectivamente, como pode ser observados na figura 2.

Figura 2- Esquema ilustrativo de um osso longo.



Fonte: RAMALHO, 2010.

Apesar da observação macroscópica diferenciada, a estrutura histológica básica presente em ambos os tipos de osso é a mesma, pois são formados por tecido ósseo secundário, isto é,

as fibras colágenas encontram-se organizadas e orientadas na matriz óssea formando as lamelas. Devido ao diferente grau de compactação das lamelas, as propriedades mecânicas do tecido ósseo compacto e esponjoso são distintas, conforme pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1 - Diferenças entre o tecido ósseo compacto e o esponjoso.

Tecido ósseo /Características	Compacto	Esponjoso
Resistência a tração (MPa)	133	-
Resistência a compressão(MPa)	193	6
Modulo de Young (MPa)	17000	76
Porosidade	5 a 15%	40 a 95%
Onde é encontrado no osso	Diáfise do osso longo e camada fina em torno do osso esponjoso	Na metáfase e epífise do osso
Comportamento material	Anisotrópico	Anisotrópico
Viscoelasticidade	Moderada	Não linear

Fonte: BILEZIKIAN et al., 2002 (Adaptado).

O tecido ósseo esponjoso apresenta porosidade muito superior à do tecido ósseo compacto, o que induz menor resistência mecânica a compressão assim como pode ser observado na tabela, que é resultado da facilidade de nucleação e propagação de trincas na estrutura. No osso compacto o teste a tração indica alta capacidade de suportar esforços mecânicos, ao contrário do osso esponjoso que nem mesmo apresenta resistência a tração. Ainda, pelo valor do Modulo de Young, é possível saber que o tecido ósseo esponjoso tem maior capacidade de deformação do que o tecido ósseo compacto. A viscoelasticidade indica que o osso compacto é capaz de restaurar sua forma original a partir da aplicação de um certo nível de tensão, enquanto no esponjoso não é possível prever, já que a sua viscoelasticidade não se apresenta de modo linear (BILEZIKIAN et al., 2002).

Os tecidos ósseos podem se formar a partir de dois processos: ossificação intramembranosa e endocondral. A primeira acontece no interior da membrana conjuntiva, onde células mesenquimatosas se transformam em grupos de osteoblastos, que sintetizam a matriz não mineralizada que depois se mineraliza. A ossificação endocondral ocorre em um molde de cartilagem no formato do osso a ser formado, mas menor. Nesta ossificação, há hipertrofia de condrócitos, redução da matriz cartilaginosa, redução da mineralização e morte de condrócitos, seguida pela ocupação das cavidades por capilares sanguíneos e células osteogênicas vindas do

tecido conjuntivo adjacente. Estas células se diferenciam em osteoblastos que depositam matriz óssea no local (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

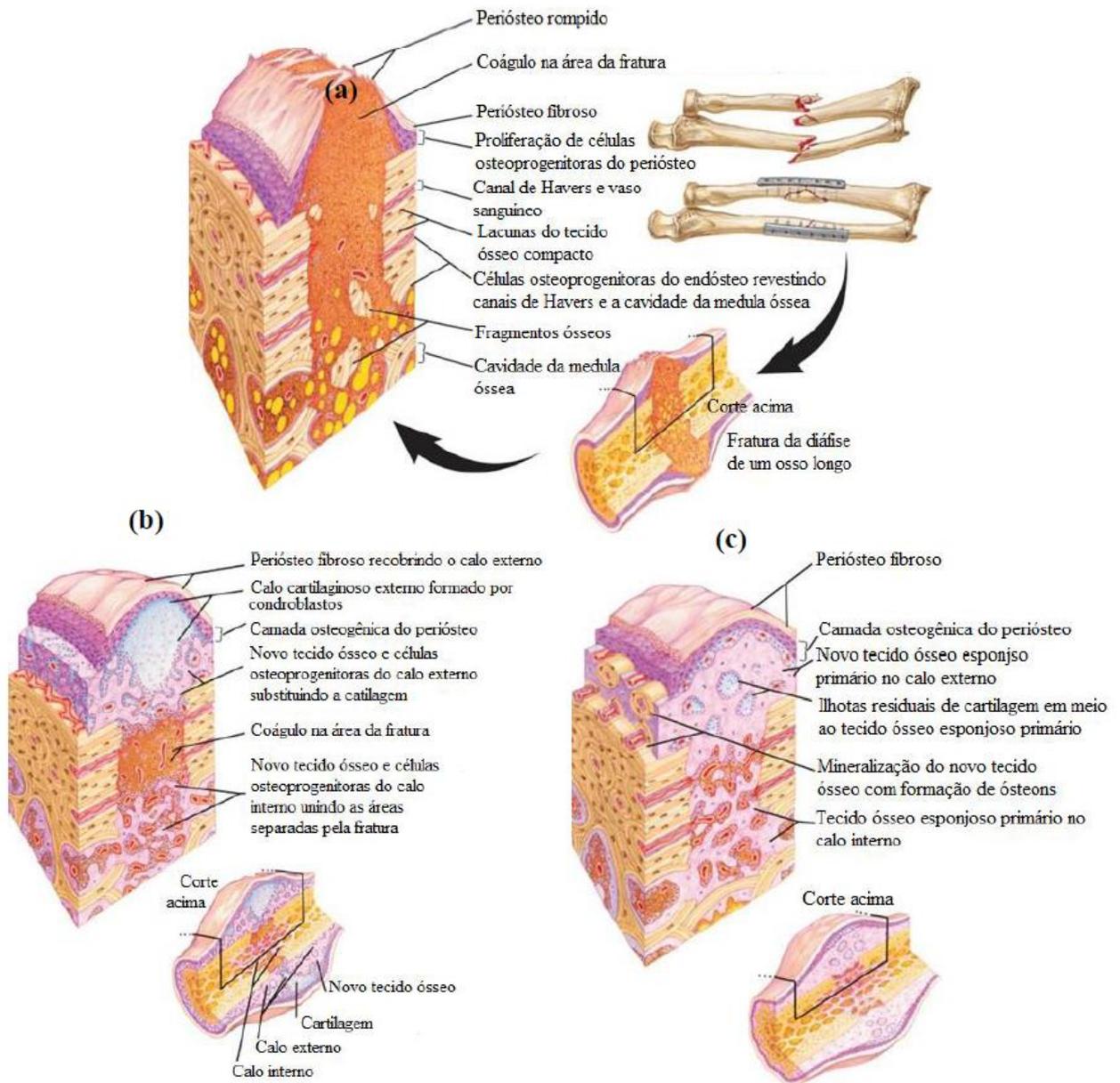
A formação de novo tecido ósseo (osteogênese) é um processo que ocorre ao longo de toda a vida do indivíduo, e culmina com a deposição de nutrientes na matriz óssea. Por outro lado, continuamente durante a reabsorção óssea, nutrientes são retirados da matriz e enviados ao sangue. Desta forma, o tecido ósseo é uma estrutura dinâmica e que apresenta taxas rigidamente controladas de osteogênese e reabsorção, garantindo a homeostase do organismo. Após a reabsorção óssea feita pelos osteoclastos, ocorre a deposição de novo tecido pelo processo de ossificação endocondral. Devido à capacidade de reabsorção e osteogênese, o tecido ósseo apresenta elevada plasticidade, sendo capaz de reparar lesões e recuperar funções, de forma parcial ou total, a depender da gravidade dessas lesões (OVALLE & NAHIRNEY, 2014).

### 3.1.1 Reparo de lesões do tecido ósseo

O tecido ósseo tem como característica alta resistência mecânica e dureza, propriedades que tornam o osso não muito flexível; por esse motivo fraturas e danos de diferentes dimensões podem ocorrer devido a acidentes, traumas e doenças. Devido à plasticidade óssea, lesões pequenas que causam, por exemplo, trincas nos ossos, mas que não afetam o perióstio, são naturalmente reparadas, sendo necessário apenas a imobilização de movimentos. Em fraturas onde o distanciamento entre os fragmentos de osso é maior que milímetros ou quando ocorre a movimentação do fragmento para fora da posição original e ocorre danificação do perióstio, além da imobilização torna-se necessário a fixação dos fragmentos. Essa fixação pode ser externa com um biomaterial que poderá ser posteriormente retirado, ou por enxerto de material biocompatível, unindo os fragmentos no local e posição corretos (OVALLE & NAHIRNEY, 2014).

Como é possível observar na figura 3, o reparo do tecido ósseo ocorre em etapas que podem ser denominadas de inicial, intermediária e tardia (OVALLE & NAHIRNEY, 2014).

Figura 3 - Fases da reparação óssea.



Fonte: OVALLE; NAHIRNEY, 2014 (Adaptado).

O reparo inicial, como visto na figura 3-a, ocorre em uma sequência de fases morfológicas. Assim como em todos os tecidos, as respostas imediatas do organismo a um ferimento é a inflamação. Os vasos sanguíneos próximos ao local ferido, e que foram atingidos, levam a um sangramento na cavidade medular no local. Após algum tempo, um coágulo se forma e a circulação dos canais de nutrição das células do tecido é interrompida. A falta de nutrição causa a morte dos osteócitos e o processo de necrose no fragmento de osso da fratura começa. Durante este processo fibroblastos se infiltram e novos capilares do periosteio se formam, levando a migração de leucócitos, monócitos e macrófagos que transformam o tecido

lesionado em novo tecido conjuntivo, parando o processo de necrose e começando o processo de regeneração celular. Células osteoprogenitoras migram para o local e começam a tornar o tecido mais fibroso, levando a progressão e desenvolvimento de tecido entorno da fratura, criando uma ponte entre os fragmentos de ossos, unindo-os (OVALLE & NAHIRNEY, 2014).

No meio do processo, na fase intermediária, figura 3-b, se forma o calo ósseo, que temporariamente une e estabiliza os fragmentos de osso da fratura. Uma vez que as células osteoprogenitoras no calo são pluripotentes, necessitam de vascularização e oxigênio para definirem no que se diferenciarão. Próximas a essas fontes de nutrientes, em locais como a cavidade medular e o periósteo, estas células se tornam osteoblastos. Em locais com pouco nutriente e oxigênio estas células se diferenciam em condroblastos, que posteriormente se tornam condrócitos (OVALLE & NAHIRNEY, 2014).

Aproximando-se do final, na fase tardia, figura 3-c, os condrócitos começam a formar a cartilagem na região da fratura, começando pelo exterior do calo. Mais tarde esta cartilagem é substituída pelo osso esponjoso por um processo similar à ossificação endocondral. O osso é considerado unido quando o osso esponjoso que se formou de todos os fragmentos da fratura se encontram e se tornam um mesmo tecido. A remodelação tardia do tecido primário para o secundário leva um pouco mais de tempo, uma vez que o primário deve ser absorvido para a formação do secundário. Quando todo o tecido for secundário a fratura é considerada completamente reparada (OVALLE & NAHIRNEY, 2014).

Todavia, em lesões ósseas mais extensas, pode ocorrer um agravamento do quadro clínico e a capacidade de regeneração óssea pode ser excedida. Nessas situações, a abordagem terapêutica mais utilizada é a inserção de diferentes tipos de biomateriais para auxiliar na fixação dos fragmentos e otimizar o processo de regeneração.

### 3.1.2 Biomateriais utilizados para reparo de fraturas ósseas

Materiais utilizados no reparo de tecido ósseo, além das características requeridas para um biomaterial, como por exemplo, biocompatibilidade, devem também apresentar características físico-químicas similares ao tecido alvo. Os materiais metálicos foram os primeiros a serem utilizados com sucesso no reparo ósseo. Aço inoxidável e ligas de cobalto-cromo já são implantados no organismo desde o século XX. As principais características dos materiais metálicos são: elevada resistência mecânica, alta resistência a fadiga, facilidade de conformação e de esterilização (MACHADO et al., 2010). Uma desvantagem importante nos implantes metálicos é a perda de estímulo mecânico no osso que o implante é posicionado,

devido à resistência mecânica do metal ser bem mais elevada do que a do tecido adjacente. Essa perda de estímulo pode ocasionar reabsorção óssea no local, podendo até levar à falha do implante (MACHADO et al., 2010). As aplicações mais comuns dos materiais metálicos no reparo do tecido ósseo são: fios, parafusos, placas de fixação de fraturas, implantes permanentes e próteses para substituição de articulações (SILVA, 2017). Como uma alternativa aos materiais metálicos em algumas aplicações, também existem os materiais poliméricos.

Podendo ser naturais ou sintéticos, os materiais poliméricos utilizados no reparo ósseo têm como principais características: biodegradabilidade, biocompatibilidade, fácil controle de produção e grande disponibilidade. Estes materiais tem apresentado atualmente grande interesse para aplicações na engenharia tecidual, no desenvolvimento de moldes tridimensionais que tornam possível a produção de cartilagens, ligamentos e discos vertebrais. Apesar disso, apresentam baixa resistência mecânica, o que reduz as opções em que podem ser aplicados e, ainda, podem gerar produtos tóxicos ao se degradarem no organismo, como íons que o organismo não utiliza em suas reações (MACHADO et al., 2010). Dentre as aplicações dos materiais poliméricos é interessante citar os sintéticos biodegradáveis que são utilizados como componentes de próteses permanentes (SILVA, 2012) e os cimentos ósseos poliméricos (RAMALHO, 2010). Alguns polímeros se destacam na aplicação de reparo no tecido ósseo, são eles: ácido poliglicólico (PGA) como suturas reabsorvíveis e ácido polilático (PLA), ácido polihidroxibutirato (PHB) e a policaprolactona (PCL) em produção de *scaffolds* para preenchimento de tecido e na composição de cimentos ósseos (ABUKAWA et al., 2006).

Além dos dois materiais descritos anteriormente, os materiais cerâmicos também podem ser utilizados e, assim como os polímeros, podem ser naturais ou sintéticos e apresentam muitas vantagens para utilização em reparo ósseo. Estes materiais apresentam, naturalmente, características estruturais semelhantes à porção inorgânica da matriz óssea, por esse motivo, são osteocondutivos, biocompatíveis e, por serem totalmente inorgânicos, não apresentam cadeias de proteínas que podem levar à rejeição do organismo. O tempo de degradação desses materiais costuma ser elevado, permitindo a remodelação de forma correta do tecido ósseo no implante, e ainda gera resíduos comuns ao organismo, não apresentando risco de toxicidade (MACHADO et al.; 2010). Apesar das diversas vantagens, os materiais cerâmicos apresentam como desvantagem baixa resistência mecânica e elevada porosidade, características que limitam seu uso para aplicações em que se requer esforços mecânicos elevados. Devido às suas desvantagens, suas aplicações ficam limitadas à fabricação de componentes de implantes e próteses ortopédicas para reparação e regeneração de tecido ósseo, preenchimento de defeitos ósseos e recobrimento de próteses metálicas (SILVA, 2012).

Ainda, a utilização de materiais compósitos é uma estratégia interessante para ser utilizada no reparo de tecido ósseo, uma vez que ao se combinar diferentes materiais é possível aprimorar a resistência mecânica e a taxa de absorção, desenvolvendo um material com características mais próximas ao tecido alvo. Além disso, a matriz extracelular do tecido ósseo é um compósito natural, tornando estes os materiais mais indicados para utilização nestes locais devido à proximidade de características (MACHADO et al.; 2010).

Dentre os compósitos utilizados no reparo de tecidos ósseos pode-se exemplificar as fibras de carbono reforçada com polietileno de alta densidade, fibra de carbono com termoplástico ou termofixo e fosfato de cálcio com termoplásticos (KAWACHI; BERTRAN; REAIS; ALVES, 2000). Um excelente exemplo de biomaterial compósito criado para obter as melhores características poliméricas e cerâmicas, são os cimentos ósseos que possuem resistência mecânica e composição similar à do osso e são capazes de serem moldados com facilidade e serem reabsorvidos pelo organismo (SILVA, 2017).

### **3.2 Cimento ósseo**

Os cimentos ósseos são materiais biocompatíveis compostos por duas fases diferentes: um componente em pó e outro líquido. Quando as duas fases são misturadas, formam uma pasta que é aplicada em fraturas e implantes ósseos e, depois de um curto período de tempo, se solidifica e promove a fixação do local. Em alguns casos, dependendo da composição do cimento utilizado, este pode ser absorvido pelo organismo e substituído por tecido ósseo, servindo como acelerador do processo de regeneração do tecido no local. Atualmente existem 4 classes principais de cimentos ósseos: acrílicos (ABCs), de fosfato de cálcio (CPCs), de sulfato de cálcio (CSCs) e os compósitos; sendo os principais materiais utilizados nestes cimentos os polímeros e os cerâmicos (RAMALHO, 2010).

#### **3.2.1 Cimentos ósseos acrílicos**

Os cimentos ósseos de acrílico se solidificam rapidamente depois que seus componentes são misturados. Nestes cimentos a fase em pó normalmente é composta pelo polímero metacrilato de metilo com peróxido de benzoílo (BPO - iniciador da reação) e a fase líquida por monômero de metilmetacrilato (MMA) aditivado com N,N-dimetil-p-touluidina (DMT). Estes materiais são muito utilizados devido à boa resistência mecânica e biocompatibilidade. No

entanto, os polímeros acrílicos possuem como desvantagens: possibilidade de necrose térmica durante a polimerização, ocasionada por reação exotérmica; necrose química devido aos monômeros que não reagiram durante a polimerização; contração volumétrica que leva à ineficácia do cimento e fragilização do tecido devido à diferença entre a resistência mecânica do cimento e do osso (RAMALHO, 2010). Alguns exemplos de cimentos dessa classe podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2 - Composição de alguns cimentos ósseos acrílicos disponíveis no mercado.

Cimento ósseo comercial	Composição do pó	Composição do monômero/líquido
Palacos®R	P(MMA/MA) (84,25% em peso) + ZrO <sub>2</sub> (15% em peso) + BPO (0,75 % em peso)	MMA + DMT (2,0% em peso)
Simplex®R	P(MMA/sty) (75% em peso) + PMMA (15% em peso) + BaSO <sub>4</sub> (10% em peso) + BPO (1,19% em peso)	MMA + DMT (2,6% em peso)
CMW® 1	PMMA (88,85% em peso) + BaSO <sub>4</sub> (9,10% em peso) + BPO (2,05% em peso)	MMA + DMT (0,816% em peso)
CMW® 3	PMMA (88% em peso) + BaSO <sub>4</sub> (10% em peso) + BPO (2,00% em peso)	MMA + DMT (2,487% em peso)
Zimmer Regular®	PMMA (89,25% em peso) + BaSO <sub>4</sub> (10% em peso) + BPO (10,75% em peso)	MMA + DMT (2,75% em peso)
Zimmer LVC®	PMMA (89,25% em peso) + BaSO <sub>4</sub> (10% em peso) + BPO (10,75% em peso)	MMA + DMT (2,73% em peso)
Endurance	PMMA (67,05% em peso) + P(MMA/sty) (21,10% em peso) + BaSO <sub>4</sub> (10% em peso) + BPO (1,85% em peso)	MMA + DMT (2,0% em peso)

Fonte: RAMALHO, 2010 (Adaptado).

Como é possível observar, as principais diferenças entre os cimentos de acrílico são o peso molecular utilizado nos polímeros e a quantidade de copolímero. Ainda, em alguns casos, pode haver a presença de aditivos para melhoria de alguma característica, como as cargas que atuam como reforços mecânicos. Estas mudanças propiciam a adequação de cimentos específicos para determinadas utilizações, melhorando assim sua eficiência (RAMALHO, 2010).

### 3.2.2 Cimentos ósseos de fosfato e sulfato de cálcio

Os cimentos de fosfato de cálcio (CPCs) e de sulfato de cálcio (CSCs) são cimentos cerâmicos amplamente utilizados para reparar e auxiliar a regeneração do osso, uma vez que possuem constituição semelhante à porção inorgânica do tecido ósseo (RAMALHO, 2010). CPCs são constituídos por uma parte líquida, água ou solução aquosa, e uma parte sólida, podendo conter um ou mais componentes de sais de cálcio e/ou fosfato de cálcio. As partes misturadas formam uma pasta que, com período de tempo restrito, endurece na temperatura ambiente ou corporal. No sólido formado ocorre a precipitação de pelo menos um composto de fosfato de cálcio. Os principais tipos de CPCs são os de Apatita e Brushita (RAMALHO, 2010).

Tipicamente, os cimentos de Apatita possuem presença inicial de carbonatos e precipitados mais cristalinos de hidroxiapatita (HA) e/ ou hidroxiapatita deficiente em cálcio (DCHA). Estes cimentos possuem tempo de endurecimento (*setting time*) intrínseco mais longo, o que torna necessário a utilização de menores teores de líquido para encurtar este tempo, tornando-os mais viscosos e difíceis de moldar. As propriedades mecânicas destes cimentos variam muito de acordo com sua composição, uma vez que a razão líquido-pó determina fortemente essas características. Normalmente, os cimentos de Apatita apresentam excelente biocompatibilidade, mas caso o cimento demore a endurecer, reações inflamatórias de maior grau podem ser desencadeadas. A biodegradabilidade deste cimento é superior se comparado à hidroxiapatita pura, mas ainda assim é considerada um pouco lenta (RAMALHO, 2010).

Os cimentos de Brushita tem como principal produto o fosfato de dicálcio dihidratado (DCPD-Brushita). Todos os cimentos de Brushita são obtidos por reação ácido-base, uma vez que DCPD só precipita em ambientes ácidos. O *setting time* deste cimento varia muito com a solubilidade da fase básica, já que se esta for maior, o tempo de endurecimento torna-se menor. A resistência à compressão destes cimentos é considerada baixa se comparada aos cimentos de Apatita. Estes materiais são muito biocompatíveis e bioabsorvíveis, apesar disso, estudos indicam a ocorrência de reações inflamatórias nas primeiras semanas após utilização de grande quantidade no organismo (RAMALHO, 2010).

CSCs apresentam longa história como cimentos ósseos na clínica. O sulfato de cálcio existe naturalmente na forma dihidratada (CSD). Sua desidratação acontece através do calor produzindo uma forma hemihidratada (CSH), que quando em contato com a água endurece. Este núcleo de CSH hidratado passa pelo processo de precipitação e crescimento de cristais, produzindo uma rede compacta de CSD, chama de cimento de sulfato de cálcio. Apesar deste endurecimento depender do tamanho das partículas sólidas, dos aditivos utilizados e da razão sólido-líquido, este cimento é fácil de misturar e origina uma pasta fácil de ser moldada. CSCs apresentam elevada biocompatibilidade, por outro lado, possuem baixa resistência mecânica e alta taxa de reabsorção, podendo prejudicar o processo de regeneração óssea (RAMALHO, 2010).

### 3.2.3 Cimentos ósseos compósitos

Os cimentos ósseos compósitos combinam as propriedades que melhor qualificam os cimentos apresentados anteriormente, uma vez que são a união de dois ou mais materiais. Os principais cimentos ósseos nesta categoria são os que combinam polímeros e cerâmicos, aliando a biocompatibilidade dos materiais cerâmicos e a resistência mecânica dos polímeros, tornando este novo material melhor qualificado para a aplicação (WANG et al.; 2017).

Dentre as vantagens destes cimentos ósseos pode-se destacar: melhorar propriedades mecânicas do material resultante, controlar a taxa de degradação, melhorar a biocompatibilidade e a bioatividade, além de possibilitar funções adicionais, como liberação de fármacos ou fatores de crescimento no local (PIRES et al., 2015). A fase de menor proporção pode ser aplicada em fase líquida proporcionando a liga do pó do material principal e sua solidificação. Ainda, podem ser adicionadas fibras na mistura para atuarem principalmente na melhoria das propriedades mecânicas do cimento resultante (CANAL et al., 2011). Devido as diversas formas de se aplicar a segunda fase, estes materiais podem apresentar algumas desvantagens, como apropriação de propriedades indesejáveis como toxicidade ou perda das funções esperadas, caso as características dos materiais constituintes, percentuais das fases utilizadas ou forma de distribuição e orientação das fibras/partículas não forem corretamente realizadas (PIRES et al., 2015).

Dentre os cimentos ósseos compósitos produzidos destacam-se: vidro bioativo com álcool polivinílico, fosfato de cálcio com Ácido Polilático (PLLA) e fosfato de cálcio com íons de prata (PIRES et al., 2015). Uma estratégia promissora nessa área é a combinação de materiais que mimetizem o tecido ósseo, isto é, um material cerâmico como os fosfatos de cálcio e um

material orgânico como as proteínas fibrosas, providenciando as características mecânicas adequadas e, ainda, ser possível a indução de produção de tecido no local (MARTÍNEZ-VÁZQUEZ et al., 2015).

### 3.3 Fosfatos de Cálcio

Ossos são compósitos naturais com uma fase orgânica, composta de colágeno ligado a fibras, e uma fase inorgânica. Jong, em 1926, observou que a fase inorgânica é composta de cristais de diferentes tipos de fosfatos de cálcio (GUSTALDI; APARECIDA, 2010), que podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3 - Fosfatos de cálcio presentes no organismo humano.

Fosfato de cálcio	Formula química	Razão Ca/P	Ocorrências
Apatita	$(Ca,Z)_{10}(PO_4Y)_6(OH,X)_2$ (Z = $Mg^{2+}$ , $Sr^{2+}$ , $Ba^{2+}$ ; Y = $HPO_4^{2-}$ , $CO_3^{2-}$ ; X = $Cl^-$ , $F^-$ )	Varia com Z e Y	Esmalte, dentina, osso, calculo dentário, pedras, cálculo urinário, calcificação de tecido mole
Fosfato octacálcico (OCP)	$Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$	1,33	Cálculo dentário e urinário
Monohidrogeno fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	1,0	Cálculo dentário, ossos decompostos
Fosfato tricálcico (TCP)	$Ca_3(PO_4)_2$	1,5	Cálculo dentário e urinário, pedras salivares, cáries dentárias, calcificação de tecido mole
Pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD)	$Ca_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$	1,0	Depósitos de pseudo-gotas em fluídos

Fonte: KAWACHI, 2000 (Adaptado).

A sintetização dos fosfatos de cálcio pode ser feita por precipitação a uma temperatura próxima a ambiente, a partir de soluções contendo ions  $Ca^{2+}$  e  $PO_4^{3-}$  em meio ácido, para

obtenção de fosfatos com grupos  $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ , ou meio alcalino, para obtenção de fosfatos com grupos  $\text{HPO}_4^{2-}$  ou  $\text{PO}_4^{2-}$  (GUSTALDI; APARECIDA, 2010). Ainda, é possível sintetizar os fosfatos de cálcio por reação térmica a altas temperaturas, onde o controle de tamanho e forma das partículas é possível de ser realizado (DALMÔNICO, 2011). Na tabela 4 é possível observar mais métodos utilizados na síntese das diferentes composições de fosfatos de cálcio.

Tabela 4 - Métodos de síntese de diferentes composições de fosfatos de cálcio.

Técnica utilizada	Materiais e Métodos
Via úmida	Via úmida ácido base Reação de $\text{H}_3\text{PO}_4$ e $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Secagem em estufa
	Síntese dos pós nanoestruturados de fosfato de cálcio, através da reação de dissolução-precipitação de $\text{CaO} + \text{H}_2\text{O} + \text{H}_3\text{PO}_4$
	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + (\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{H}_3\text{PO}_4$ $T > 100\text{ }^\circ\text{C}$
Hidrotérmica	Síntese hidrotérmica sob alta pressão. Soluções contendo cálcio e fosfatos
A partir de meio aquoso	Biomimético utilizando concentrações iônicas próximas às do plasma sanguíneo
A partir de meio aquoso	Reação por precipitação, utilizando $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
Titulação	Precipitação por titulação, utilizando $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e $\text{H}_3\text{PO}_4$
Reações em estado sólido	$\text{Ca}_3(\text{P}_4)_2 + \text{CaCO}_3 + \text{Ca}_3\text{P}_2\text{O}_7$ $T = 900 - 1500\text{ }^\circ\text{C}$ Usando vapor de água

Fonte: DALMÔNICO, 2011 (Adaptado).

A tabela 5 apresenta diferentes tipos de fosfatos de cálcio que podem ser produzidos, sua composição química e a relação Ca/P característica de cada um.

Tabela 5 - Classificação dos fosfatos de cálcio pela relação Ca/P.

Fosfato de cálcio	Fórmula química	Ca/P
Fosfato tetracálcio (TeCP)	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,0
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2.n\text{H}_2\text{O}$	1,5
Fosfato tricálcico ( $\alpha$ , $\alpha'$ , $\beta$ , $\gamma$ ) (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Fosfato octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6.5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4.2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio (DCP)	$\text{CaHPO}_4$	1,0
Pirosfosfato de cálcio (CPP)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,0
Pirofosfato de cálcio di-hidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7.2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Fosfato Heptacálcico (HCP)	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0,7
Di-hidrogênio fosfato tetracálcico (TDHP)	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0,67
Fosfato monocálcio mono-hidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2.\text{H}_2\text{O}$	0,5
Metafosfato de cálcio ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ ) (CMP)	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,5

Fonte: GUSTALDI; APARECIDA, 2010.

No organismo humano existem diferentes composições químicas de fosfatos de cálcio, apesar disso, a estrutura cristalina e a relação Ca/P entre estes fosfatos e a hidroxiapatita é semelhante, sendo que a composição química aproximada destes fosfatos pode ser determinada por: (GUSTALDI; APARECIDA, 2010).

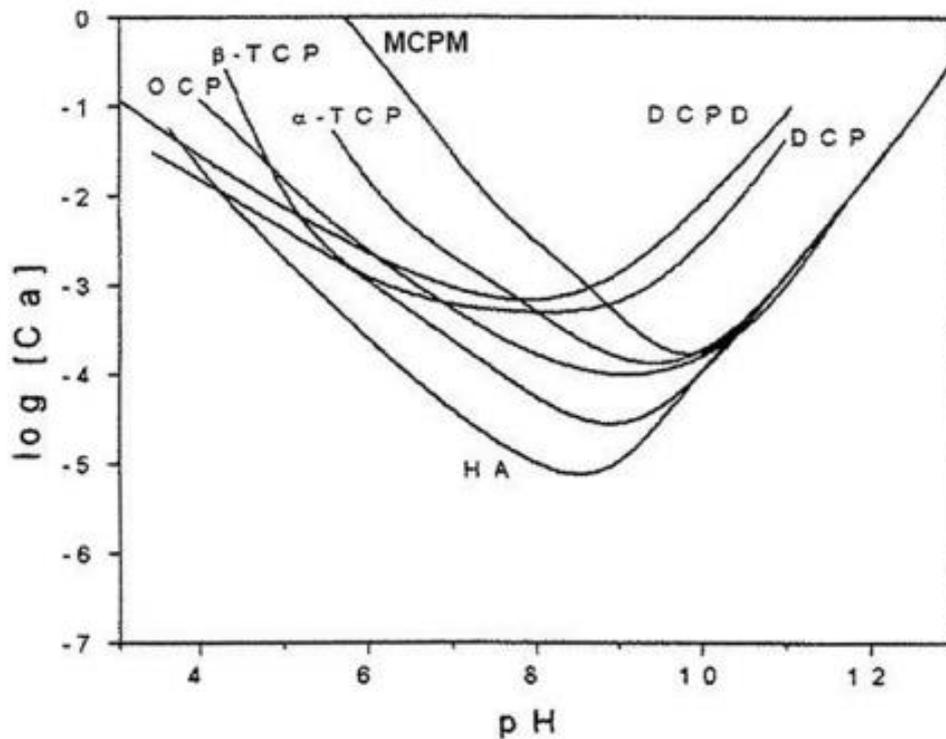


Onde X são cátions que podem variar na composição, a depender do fosfato de cálcio analisado no organismo.

As principais características que fazem com que os fosfatos de cálcio sejam amplamente utilizados como biomateriais para reparo de tecidos ósseos são: biocompatibilidade, bioatividade, baixa toxicidade, taxa de degradação variável e osteocondutividade. A biocompatibilidade deve-se principalmente à sua elevada semelhança química e estrutural com a fase mineral do tecido ósseo. A bioatividade é devido à capacidade do tecido ósseo de se formar sobre o material, absorve-lo e substituí-lo. A ausência de toxicidade deve-se ao fato de que a degradação destes materiais induz a formação de subprodutos já existentes no tecido ósseo, não causando danos ao organismo (GUSTALDI; APARECIDA, 2010). A velocidade de

reabsorção ou degradação destes materiais é uma característica importante, uma vez que o material deve apresentar uma taxa de degradação adequada a uma aplicação específica. Essa degradação ocorre pela dissolução do material no meio, que pode variar de acordo com a solubilidade do material no meio e do pH deste meio, tornando estas características também essenciais a serem avaliadas (KAWACHI et al., 2000). No diagrama presente na figura 4 podemos observar a isoterma de solubilidade de sete fosfatos de cálcio:

Figura 4 - Diagrama de isotermas de solubilidade para fosfatos de cálcio.



Fonte: GUSTALDI; APARECIDA, 2010.

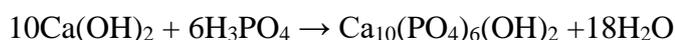
Como pode-se observar pelas isotermas, em pH básico a solubilidade cai enquanto em pH ácido a solubilidade aumenta. Para o pH do organismo humano, entre 7 e 8, podemos notar que a solubilidade está no pico destes compostos, sendo o que apresenta maior solubilidade é a hidroxiapatita (GUSTALDI; APARECIDA, 2010).

Apesar das vantagens apresentadas, os fosfatos de cálcio têm uma grande limitação relacionada às suas propriedades mecânicas. Estes materiais são muito frágeis, possuem baixa resistência ao impacto e baixa resistência à tensão, devido à sua porosidade e estrutura química que apresenta tendência de formar e propagar trincas (JARCHO, 1980).

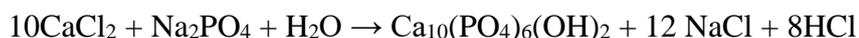
### 3.3.1 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HA) é o fosfato de cálcio mais abundante no organismo humano, representando 5 % do peso de um adulto. HA compõe 55 % dos ossos, 96 % do esmalte dentário e 70 % da dentina (GUSTALDI; APARECIDA, 2010). A hidroxiapatita pode ser sintetizada a partir de diversas técnicas como o sol-gel, hidrotermal, via seca e alta temperatura, mas a técnica mais utilizada é a de precipitação, onde é realizado a reação entre o cálcio e fósforo em via úmida com controle de temperatura e pH, para que a condição da solução seja adequada para o melhor resultado, uma vez que algumas condições levam a precipitação do fosfato de cálcio se tornar mais lenta ou rápida, sendo que a precipitação lenta melhora a homogeneidade química e a estequiometria do precipitado, e a rápida leva a falta de homogeneidade química no produto obtido. Para se obter a estrutura estequiométrica para a apatita, após a precipitação do pó, este é calcinado entre 400°C e 600°C (Costa et al., 2009). A seguir pode-se observar as reações que ocorrem na precipitação por via úmida:

a) Reação ácido base

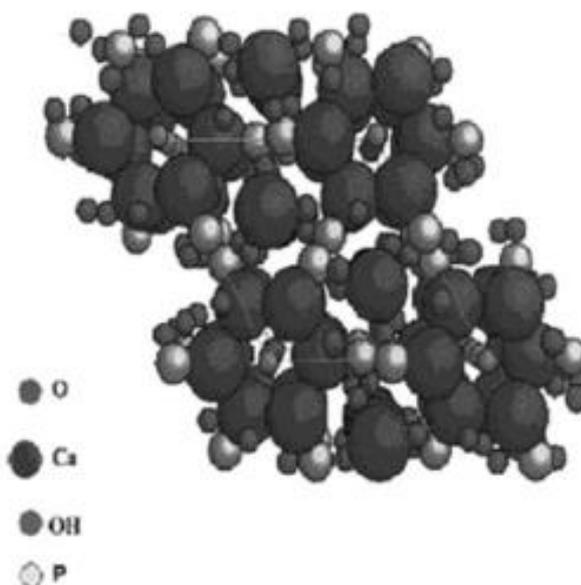


b) Reação entre sais de fosfato



A fórmula química da Hidroxiapatita é  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , apresenta sistema hexagonal primitivo quando cristalizada, tendo ainda maior cristalinidade do que os outros fosfatos de cálcio. Sua cristalinidade confere uma de suas propriedades mais importantes, que é a facilidade de substituição de cátions e ânions na estrutura. Essa substituição pode induzir alteração na cristalinidade, nos parâmetros de rede, na dimensão dos cristais, na textura superficial, na estabilidade e na solubilidade do material final. Estas alterações mudam a taxa de degradação e como este fosfato se comporta no organismo, tornando possível moldá-lo de acordo com a necessidade (GUSTALDI; APARECIDA, 2010). Na figura 5 é possível observar a estrutura cristalina da hidroxiapatita.

Figura 5 - Representação esquemática da estrutura cristalina da HA.



Fonte: GUSTALDI; APARECIDA, 2010.

Além disso, a facilidade das substituições dos cátions e dos ânions faz com que a hidroxiapatita atue como reserva de minerais, como cálcio e fósforo, regulando os diferentes íons no organismo, controlando a liberação e o armazenamento destes. Outra propriedade importante da hidroxiapatita é a capacidade de adsorver proteínas na superfície, que permite que este fosfato seja utilizado para separar proteínas de ácidos nucleicos na cromatografia líquida de alta performance. Este material apresenta elevada biocompatibilidade, osteocondutividade e bioatividade (GUSTALDI; APARECIDA, 2010).

A bioatividade é avaliada por um índice de bioatividade (Ib), definido como o tempo que é preciso para que 50% das ligações interfaciais ocorram entre o material e o tecido. A tabela 6 demonstra uma comparação entre a hidroxiapatita e outros biomateriais utilizados em reparos de tecido ósseo (GUSTALDI; APARECIDA, 2010).

Biomateriais para reparos em tecidos ósseos são classificados como da classe A ou B. Os que possuem Ib maior que 8 são da classe A e são definidos como osteoindutores, capazes de promover respostas intra e extracelulares e induzir colonização de células progenitoras na sua superfície. Os da classe B, com índice menor que 8, são classificados como apenas osteocondutores, como é o caso da hidroxiapatita, capazes apenas de promover deposição óssea (GUSTALDI; APARECIDA, 2010).

Tabela 6 - Índice de bioatividade de diferentes materiais.

Biomaterial	Ib	Classe de bioatividade	Ligação com osso	Ligação com tecido mole
Vidro Bioativo (4555)	12,5	A	Sim	Sim
Vidro Bioativo (5254)	10,5	A	Sim	Sim
Cerâmica Bioativa (AW)	6,0	B	Sim	Não
Hidroxiapatita (HÁ)	3,1	B	Sim	Não
Alumina	0	-	Não	Não

Fonte: GUSTALDI; APARECIDA, 2010 (Adaptado).

Apesar de todas estas vantagens, a hidroxiapatita apresenta limitação de aplicação clínica devido a sua baixa taxa de biodegradação e pequena resistência mecânica (GUSTALDI; APARECIDA, 2010). Ainda, já foi documentado descolamento da camada de hidroxiapatita do implante, que pode levar a formação de fibrose de tecido ao redor do implante e infecção no local (AMBARD; MUENINGHOFF, 2006). Diante destas limitações, a hidroxiapatita se tornou uma material de alto interesse para composição de materiais compósitos, de forma a se obter produtos com propriedades melhoradas, como é o caso do cimento ósseo, onde se utiliza a hidroxiapatita como base inorgânica e um polímero, por exemplo a gelatina, como base orgânica para o material final.

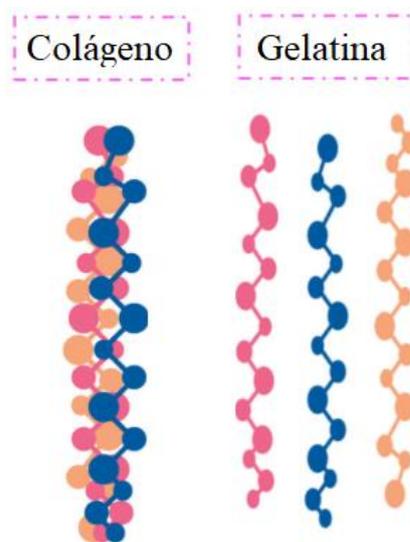
### 3.5 Gelatina

O colágeno retirado dos ossos é degradado termicamente para sintetizar a gelatina, polímero natural e que é biodegradável (MARTÍNEZ-VÁZQUEZ et al., 2015). O colágeno é produzido a partir de diversas fontes, mas, ao contrário disso, a gelatina só pode ser obtida de fontes ricas de colágeno do tipo I, devido a sua composição e as ligações químicas que são formadas em sua estrutura. As diversas fontes deste colágeno podem levar a ligeiras mudanças na composição de seus aminoácidos, possibilitando variações das propriedades da gelatina produzida (PARK; LAKES, 2017).

A produção da gelatina acontece a partir do colágeno do tipo I, originalmente insolúvel, que é primeiramente tratado por aquecimento em água à temperatura de 45 °C , convertendo-o para uma estrutura solúvel para possa ser extraído. Depois, um tratamento químico quebra as ligações não covalentes para desorganizar a cadeia proteica, produzir inchaço e acarretar em uma solubilização adequada. Por fim, outro tratamento térmico é realizado para retirar

hidrogênio e ligações covalentes, para então desestabilizar e reorganizar a cadeia polimérica, transformando-a na cadeia de gelatina. O grau de colágeno que é convertido em gelatina depende da severidade do primeiro tratamento térmico, do pH, da temperatura a que foi submetido e de quanto tempo levou-se para extrair o colágeno. O colágeno do tipo I possui estrutura em tripla-hélice, estes tratamentos sucessivos rompem as ligações entre as cadeias polipeptídicas, gerando uma cadeia polipeptídica única, parcialmente hidrolisada, chamada de gelatina (GÓMES-GUILLÉN et al., 2011). Na figura 6 é possível observar a representação esquemática da estrutura do colágeno e da gelatina.

Figura 6 - Representação esquemática da estrutura do colágeno e da gelatina.



Fonte: Próprio autor.

A gelatina obtida é normalmente caracterizada como do tipo A ou do tipo B, dependendo do primeiro tratamento térmico a que foi submetida. A gelatina do tipo A é obtida a partir de um banho em solução ácida, enquanto a do tipo B é obtida a partir de um banho em solução alcalina. Além das características físico-químicas, como composição, solubilidade, transparência e odor, propriedades como força do gel e estabilidade térmica, definem suas qualidades de mercado. Tanto a força do gel como a estabilidade térmica dependem das propriedades moleculares da gelatina, delimitando a fonte de extração a depender da aplicação a ser destinada esta composição. Normalmente, a qualidade da gelatina para cada tipo de aplicação depende de suas propriedades reológicas (GÓMES-GUILLÉN et al., 2011).

Além das propriedades básicas de hidratação da gelatina, como inchamento e solubilidade, as propriedades mais importantes deste composto podem ser separadas em dois grupos: as relacionadas ao comportamento como gel (formação do gel, textura, espessura e

capacidade de ligação com a água) e as relacionadas com o comportamento da superfície (formação de emulsão e espuma, estabilidade, adesão e coesão, função de proteção de coloide e capacidade de formar filme). Este composto apresenta atividade inibitória antioxidante, anti-hipertensiva e antimicrobiana; capacidade de ligação com composto mineral; atividade de modulação imunológica e efeitos benéficos para saúde da pele, ossos e cartilagens (GÓMES-GUILLÉN et al., 2011).

Apesar das propriedades vantajosas, a gelatina apresenta baixa resistência mecânica, o que causa grande limite na sua utilização como biomaterial. Para se obter as características mecânicas necessárias para sua utilização nos tecidos, é necessário realizar reticulação física (irradiação com ultravioleta, luz visível, feixe de elétrons ou raios  $\gamma$ ) ou química (solução com enzimas) deste material (LOTH et al., 2014). Os reticulados formados entre as cadeias químicas, além de aprimorar as características mecânicas, também são responsáveis por aprimorar as propriedades de estabilidade térmica. Os reticulados químicos trabalham na conexão de pontes covalentes entre eles e os grupos aminoácidos, enquanto os físicos ligam os hidrogênios dos polióis presentes na estrutura deste polímero natural (CORADIN et al., 2004).

### **3.6 Material Proposto**

A estratégia de combinar as propriedades da HA com gelatina foi realizada anteriormente por Chang e colaboradores (2003). Neste trabalho foi produzido e caracterizado um compósito de HA nanométrica de 4 a 70nm com gelatina de 50 a 90%. Os autores observaram que houve ligação química efetiva entre os cristais de hidroxiapatita e a gelatina, além de queda nos valores de cristalinidade da estrutura à medida que a concentração de gelatina na solução aumenta. Ainda, perceberam que houve orientação dos nanocristais em torno das fibras de gelatina sugerindo que ocorreu ligação química entre os compostos.

Dessi e colaboradores (2013) produziram um cimento ósseo injetável composto por hidroxiapatita deficiente em cálcio e espuma de gelatina (2 % p/p), para regiões que necessitam de reparo menos invasivo. Foram obtidos valores de viscosidade adequados para a injetabilidade, existência de poros homogeneamente distribuídos e interconectados, com morfologia de superfície similar à encontrada nos ossos. Os autores concluíram que como meio de regeneração do tecido ósseo temporário, as propriedades mecânicas deste cimento são adequadas e, posteriormente, em testes com células mesenquimais, estas foram capazes de migrar e proliferar nos poros do cimento, comprovando a sua capacidade de osteocondução.

Martínez-Várquez e colaboradores (2015) produziram *scaffolds 3D* porosos de hidroxiapatita combinada com silício de 1 a  $3\mu\text{m}$  e 10% de Gelatina do tipo A. Os autores observaram que a estrutura obtida é altamente homogênea e com presença de macro porosidades. As propriedades mecânicas do material foram similares aos valores encontrados no osso esponjoso, e observou-se comportamento de proliferação celular superior ao normalmente obtido para a hidroxiapatita pura.

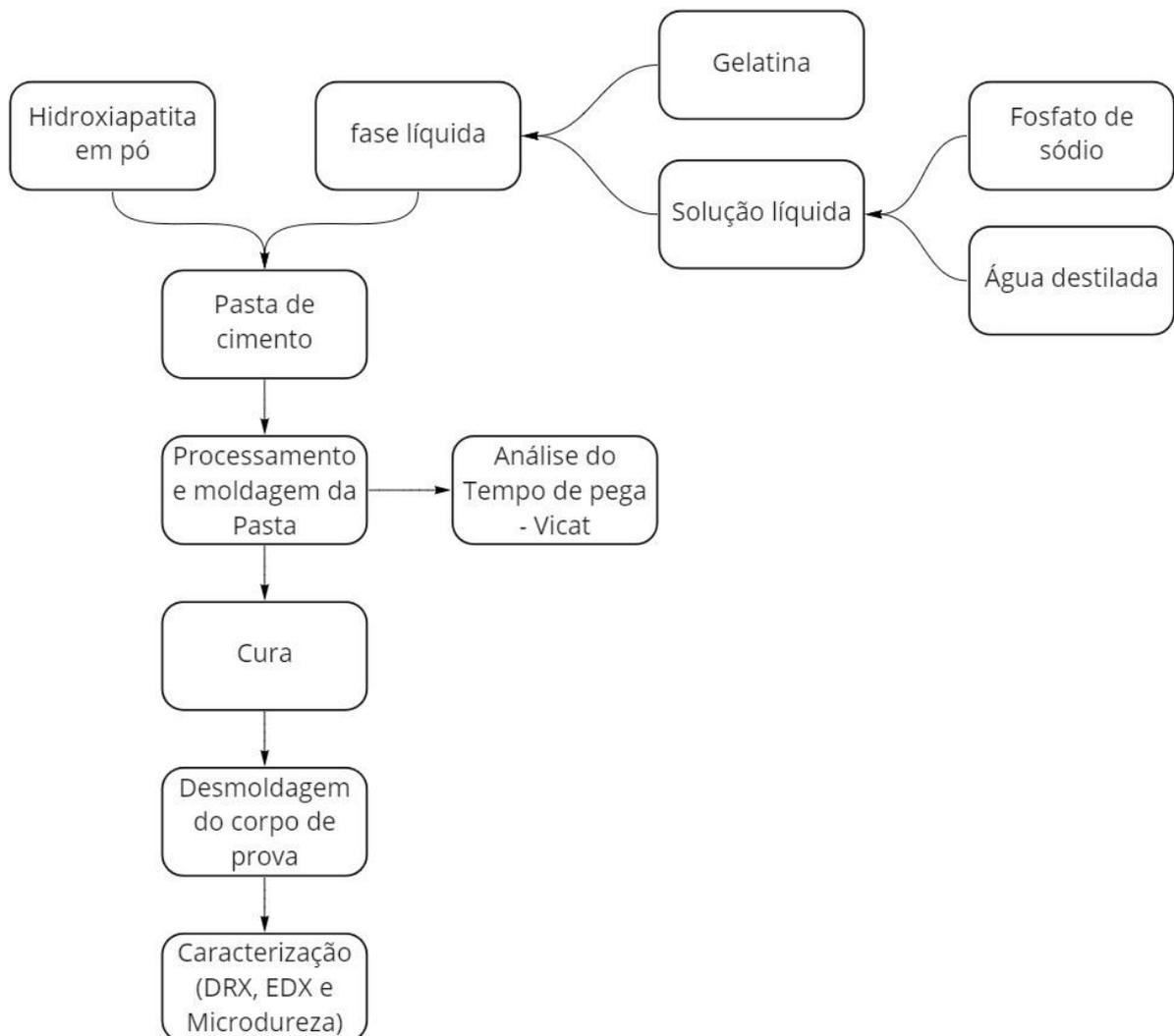
Com base nestes estudos, no presente trabalho será produzido um material compósito formado por hidroxiapatita e duas proporções de gelatina com possível aplicação como cimento ósseo. Os materiais e os métodos utilizados encontram-se descritos no próximo tópico.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Desenho Experimental

No presente trabalho foram produzidos e caracterizados 2 corpos de prova para cada proporção utilizada dos compósitos formados por hidroxiapatita e gelatina, para possível aplicação como cimento ósseo, conforme desenho experimental demonstrado na figura 7.

Figura 7 - Fluxograma de descrição do trabalho



Fonte: Próprio autor.

As matérias-primas hidroxiapatita e gelatina foram caracterizadas por meio das técnicas de Difração de Raios-X (DRX) e Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), respectivamente.

A produção do material foi feita a partir da mistura de hidroxiapatita e da solução de gelatina e fosfato de sódio, resultando na pasta de cimento que, então, foi processada e moldada. Em seguida, foi calculado o tempo de pega e foi realizada a caracterização das amostras por meio dos ensaios de DRX, Florescência de Raios-X por Energia Dispersiva (EDX) e Microdureza Vickers.

## 4.2 Materiais

### 4.2.1 Hidroxiapatita

A Hidroxiapatita, utilizada neste trabalho, foi produzida pela empresa Phoster Tecnologia de Aglomerações Ltda, com composição de duas fases, cristalina e amorfa, sendo que a hidroxiapatita corresponde a 69% e, o restante, é formado por fosfato de cálcio amorfo. O material é formado por cerca de 100% de nanopartículas com diâmetros abaixo de 0,25µm (250nm) e baixíssimos níveis contaminantes, conforme estabelece a norma ISO 13779-6: 2015. As características físico-químicas deste material podem ser observadas nas tabelas 7 e 8, a seguir.

Tabela 7 - Dados da Hidroxiapatita

CAS No.	1306-06-5 (HÁ) 7790-76-3 (ACP)
Nome químico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidroxiapatita (HA), Hidroxifosfato de cálcio, Fosfato de cálcio tribásico, HAp, Hidroxiapatita, Fosfato de cálcio tribásico, Hidroxiortofosfato Pentacálcio</li> <li>• Fosfato de cálcio amorfo (ACP), hidrogeno fosfato de cálcio</li> </ul>
Fórmula Molecular	HÁ – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e ACP – $(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O})$
Descrição	Pó branco fino

Fonte: Fabricante Phoster Tecnologia de aglomerações LTDA (Adaptado).

Tabela 8 - Especificação Química da Hidroxiapatita

Ca (%)	40,180
P (%)	19,12
Si (%)	<0,02
Outros: Fe, Al, Hg, Pb, Cd, Co, Cr, As, Ni, Cu, Zn, Mn, Al, Na, Mg (%)	0,222
Balanço de massa: O e H	40,46
Ca/P razão molar	1,62
Tamanho das partículas sub-micrométricas (cristalitos)	12nm
Perda de ignição (1000°C/1h) (%)	3,175
Tamanho Mediano de Partículas Cilas ( $\mu\text{m}$ )	8,800
Tamanho Mediano de Partículas Cilas, D10 ( $\mu\text{m}$ )	1,610
Tamanho Mediano de Partículas Cilas, D50 ( $\mu\text{m}$ )	5,450
Tamanho Mediano de Partículas Cilas, D90 ( $\mu\text{m}$ )	18,840
Tamanho Mediano de Partículas Cilas, D <sub>médio</sub> ( $\mu\text{m}$ )	8,010
Área de superfície – BET ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	60,520
pH	6,40

Fonte: Fabricante Phoster Tecnologia de aglomerações LTDA (Adaptado).

#### 4.2.2 Gelatina

A Gelatina utilizada neste trabalho foi a gelatina em pó de código 628 da fabricante Vetec Química fina, com as especificações da tabela 9.

#### 4.2.3 Hidrogenofosfato dissódico

O fosfato de sódio utilizado neste trabalho foi o hidrogenofosfato dissódico heptahidratado –  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – grau P.A., da fabricante CROMOLINE Química Fine, com as especificações descritas nas tabelas 10 e 11. Este composto foi utilizado na forma de solução aquosa aceleradora de cura do cimento de fosfato de cálcio.

Tabela 9 - Propriedades da Gelatina

Característica	Valor
pH (10 g/L)	5,0 – 6,0
Dióxido de Enxofre (SO <sub>2</sub> )	Máx. 40 ppm
Metais pesados (como Pb)	Máx. 20 ppm
Arsênio (As)	Máx. 1,0 ppm
Cromo (Cr)	Máx. 2 ppm
Peróxido (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Máx. 10 ppm
Cinzas (550 °C)	Máx. 2,0 %
Viscosidade (6,66 %)	26 – 27 mP.s
Umidade	8 – 13 %
Chumbo (Pb)	Máx. 1,5 ppm
Nitrogênio (N)	Máx. 15 %
Granulometria	30 mesh

Fonte: Fabricante Vetec Química fina (Adaptado).

Tabela 10 - Propriedades do Hidrogenofosfato dissódico

Característica	Valor
Teor mínimo	99%
pH (sol. 5% a 25 °C)	8,7 – 9,3

Fonte: Fabricante Cromoline Química Fine (Adaptado).

Tabela 11 - Teor de impurezas do Hidrogenofosfato dissódico

Impurezas	Limite máximo
Insolúveis em H <sub>2</sub> O	0,005%
Arsênio (As)	5 ppm
Ferro (Fe)	0,001%
Cloreto (Cl)	0,001%
Sulfato (SO <sub>4</sub> )	0,005%
Metais Pesados (como Pb)	0,001%
Compostas Nitrogenados	0,001%

Fonte: Fabricante Cromoline Química Fine (Adaptado).

### 4.3 Métodos

Com o intuito de verificar as informações a respeito das matérias-primas utilizadas, foi realizado a Difração de Raios-X (DRX) para avaliação de pureza e cristalinidade da Hidroxiapatita e o Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) para avaliação da Gelatina, descritas nos itens 4.3.1 e 4.3.2, respectivamente.

O método utilizado para o preparo das amostras, bem como o molde utilizado e a amostra finalizada podem ser observados no item 4.3.3.

Para a caracterização físico-química do compósito produzido foram realizados os ensaios de tempo de pega, Difração de Raios-X (DRX), Florescência de Raios-X por Energia Dispersiva (EDX) e Microcureza Vickers. As condições utilizadas nos ensaios encontram-se descritas a seguir.

#### 4.3.1 DRX da Hidroxiapatita

A matéria-prima Hidroxiapatita, em pó, utilizada neste trabalho foi submetida ao ensaio de DRX para avaliação da composição de fases e do grau de cristalinidade. O equipamento utilizado foi o difratômetro de raios-x Shimadzu, modelo XRD-7000, operado com radiação  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda=1,5418\text{\AA}$ ), tensão de 40 kV e corrente de 30 mA, pertencente ao Departamento de Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais. O ensaio foi realizado em temperatura ambiente, variando o ângulo de varredura entre 2 e 80° para 2 $\Theta$  (2Theta), no passo de 0,02° a cada 3 s.

O índice de cristalinidade (IC) das amostras foi calculado com o auxílio do programa OriginLab 2022 por meio do cálculo da área sob o gráfico de Intensidade x 2Theta obtido no ensaio de DRX e da fórmula:

$$Ic = (\text{área dos picos de cristalinidade}/\text{área de todo o gráfico}) \times 100$$

#### 4.3.2 FTIR da Gelatina

Para análise da composição química da Gelatina utilizada como matéria-prima, este material foi submetido ao ensaio de FTIR na faixa espectral de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  em atmosfera inerte e modo ATR. O equipamento utilizado foi o espectrômetro IR Prestige-21 da

SHIMADZU do Departamento de Química do Centro Federal de Educação tecnológica de Minas Gerais.

#### 4.3.3 Produção do compósito

A produção do compósito foi baseada nos trabalhos de Chang et al., (2003), Haroun & Migonney (2010), Raina et al., (2018) e Madureira et al., (2020). Preparou-se uma solução de fosfato de sódio 5 % m/v que foi homogeneizada com 2% ou 5% m/m de gelatina, obtendo-se a fase líquida. Em seguida, esta fase foi adicionada ao pó de hidroxiapatita com homogeneização manual e auxílio de uma espátula de metal, por 5 minutos em temperatura ambiente. Finalizado o preparo, a pasta cimentícia foi moldada no formato cilíndrico com 3,5 cm de diâmetro e 1,0 cm de altura, aproximadamente, como pode ser visto na figura 8.

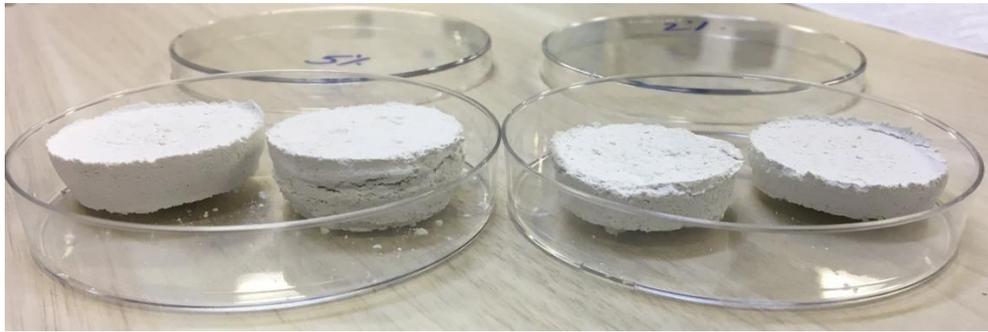
Figura 8 - Molde utilizado para produção da amostra



Fonte: Próprio autor.

As amostras foram levadas à estufa a 37 °C, por 24 horas. Durante os primeiros 25 minutos, de 5 minutos em 5 minutos, as amostras foram retiradas da estufa para que o ensaio Vicat fosse realizado. Na figura 9 é possível observar os corpos de prova finalizados, sendo os da direita os de 2% e os da esquerda de 5% de Gelatina.

Figura 9 - Amostras produzidas



Fonte: Próprio autor.

#### 4.3.4 Ensaio de Tempo de Pega (*Setting time*)

O ensaio para determinar o tempo de pega das amostras foi realizado tendo por base o trabalho de Madureira (2020) e a norma ABNT NBR 12128, utilizando-se uma montagem semelhante ao equipamento Vicat, como pode ser visto na figura 10.

Figura 10 – Montagem utilizada para análise do tempo de pega dos corpos de prova

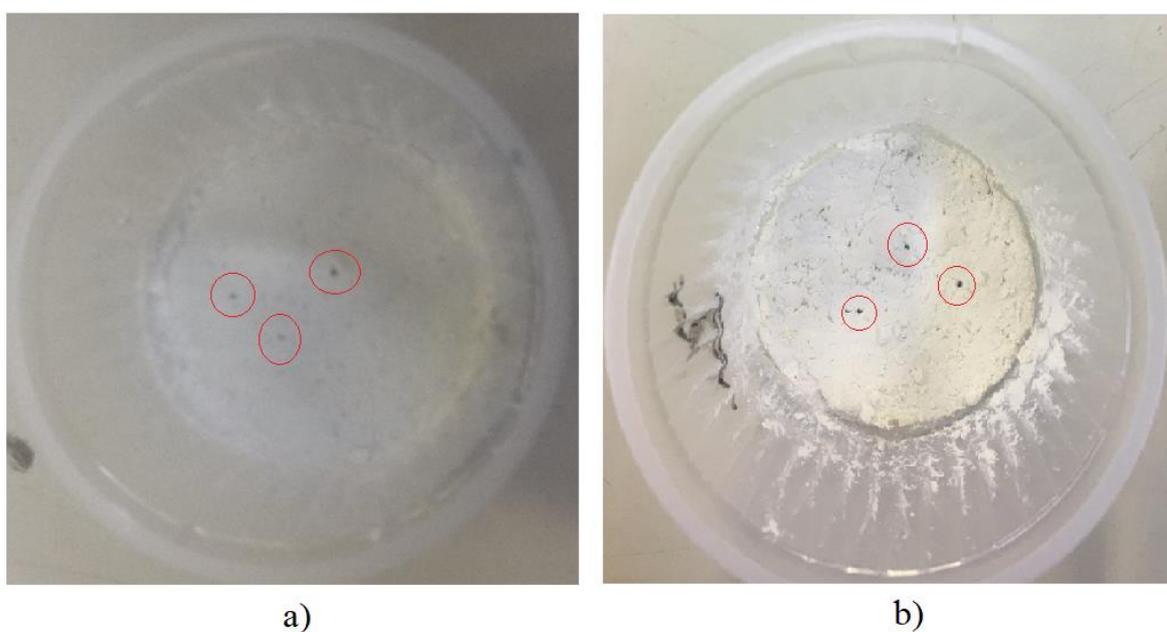


Fonte: Próprio autor.

Nesta montagem, o princípio utilizado para o ensaio foi o da aplicação da força peso pelo posicionamento de um objeto em cima da seringa, sem nenhum outro apoio, que irá então deslocar o corpo, causando a penetração da agulha no corpo de prova, até que a resistência seja equivalente a força aplicada pelo peso do corpo.

Para uso de uma força constante para perfuração da agulha do aparelho, foi utilizado um objeto de massa de 182,57 g e foi aferida a profundidade obtida pela agulha (Hipodermica, Referência 300339, Ø 0,70 mm x 30mm) por meio da graduação (em mm) existente no embolo utilizado. Durante os primeiros 25 minutos de secagem na estufa, a cada 5 minutos as amostras foram retiradas e submetidas ao ensaio. Para avaliação do tempo de pega, foi contabilizado o tempo decorrido entre a colocação da amostra na estufa (tempo inicial) e o tempo em que a agulha não penetrou mais no material, indicando sua resistência (tempo final). Na figura 11 é possível visualizar as três perfurações feitas após 15 minutos para as amostras contendo 2% (a) e 5% (b) de gelatina.

Figura 11 - Superfície das amostras após terceira medida



Fonte: Próprio autor.

#### 4.3.5 Ensaio de Difração de Raios-X (DRX)

As amostras produzidas foram submetidas ao ensaio de DRX para avaliação da composição das fases e do grau de cristalinidade. O equipamento utilizado e os parâmetros adotados foram os mesmos descritos para análise da matéria-prima hidroxiapatita, descritos no item 4.3.1.

#### 4.3.6 Ensaio de Florescência de Raios-X por Energia Dispersiva (EDX)

A técnica de Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva foi utilizada para analisar a química elementar das amostras produzidas. O equipamento utilizado foi SHIMADZU, modelo EDX – 720, operado a vácuo, pertencente ao Departamento de Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais.

#### 4.3.7 Ensaio de Microdureza Vickers

Para análise da resistência mecânica das amostras foi realizado o ensaio de Microdureza Vickers. De acordo com a norma ASTM E384 - 17. No presente trabalho o ensaio foi realizado com o equipamento da fabricante SHIMADZU, modelo HMV2T, pertencente ao Departamento de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, utilizando uma força de 980mN (100gf), sob o tempo de endentação de 30s e objetiva de 40x para visualizar a impressão. Para que as condições de paralelismo entre superfícies e acabamento superficial, necessárias para realização do ensaio fossem alcançadas, foi necessário embutir a amostra em molde polimérico e realizar polimento da superfície que não foi embutida.

De acordo com Callister (2002), é possível estimar os valores de resistência mecânica de um material através da medida de dureza Brinell (HB), uma vez que o limite de resistência mecânica a tração (LR) é 3,45 vezes maior do que a dureza HB dos materiais. E, segundo Souza (1982), as durezas Vickers e Brinell apresentam valores próximos para grande parte da faixa de dureza avaliada, de modo que podemos utilizar a dureza Vickers medida neste ensaio para estimar os valores de resistência mecânica do material, por meio da equação a seguir:

$$\text{Resistência mecânica} = 3,45 \times \text{HV}$$

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes da produção dos compósitos, as matérias-primas foram submetidas a ensaios para verificar a composição química e a presença de impurezas. Os resultados estão apresentados no item 5.1.

Para as análises físico-químicas do material produzido, foram realizados os ensaios de tempo de pega, DRX, EDX e Microdureza Vickers, que estão apresentados nos itens 5.2, 5.3, 5.4 e 5.5.

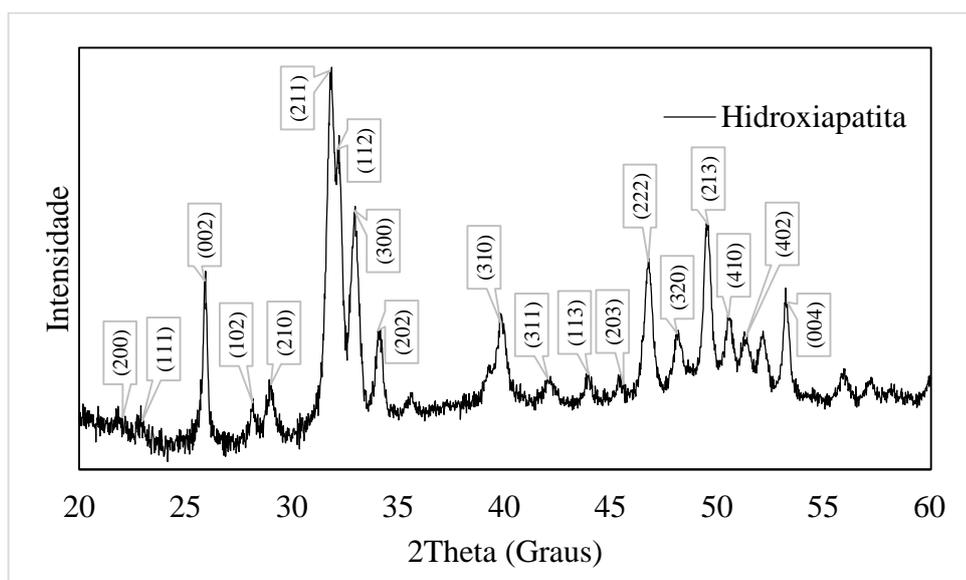
### 5.1 Matérias-primas

Os resultados do DRX da hidroxiapatita e do FTIR da gelatina encontram-se descritos nos itens 5.1.1 e 5.1.2, respectivamente.

#### 5.1.1 DRX da hidroxiapatita

A fim de se confirmar a composição química e o grau de cristalinidade da hidroxiapatita utilizada, uma amostra foi submetida ao ensaio de DRX. O resultado obtido pode ser visualizado na figura 12, a seguir.

Figura 12 - DRX da Hidroxiapatita



Fonte: Próprio autor.

O difratograma foi comparado com os resultados obtidos por Santos et al., (2005), Barandehfrad et al., (2016), Madureira et al., (2020) e a Ficha JCPDS-ICDD 09-0432 para a Hidroxiapatita, e apresentam os picos característicos do sistema hexagonal, nos ângulos e planos que podem ser vistos na tabela 12.

Tabela 12 - Picos característicos do DRX da Hidroxiapatita

Ângulo ( ° )	Plano Cristalográfico
22,1	(200)
22,8	(111)
25,9	(002)
28,2	(102)
28,9	(210)
31,8	(211)
32,2	(112)
32,9	(300)
34	(202)
39,8	(310)
42,3	(311)
44	(113)
45,5	(203)
46,8	(222)
48	(320)
49,6	(213)
50,5	(410)
51,4	(402)
53,3	(004)

Fonte: Próprio autor.

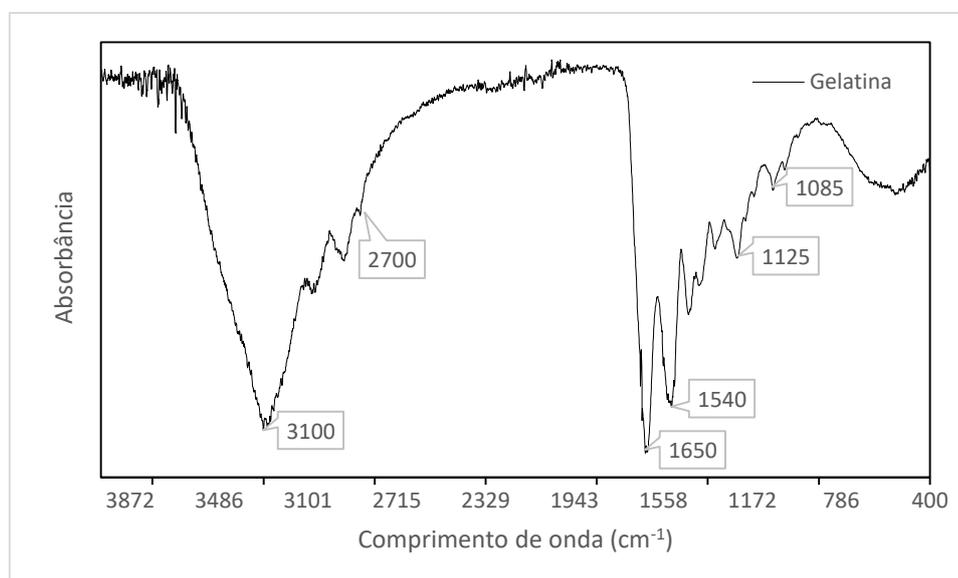
A presença dos picos bem definidos indica que não houve formação de outra fase de fosfato de cálcio durante o processamento do material, bem como é possível verificar que não existem impurezas em sua composição.

A partir do cálculo da área abaixo da curva completa e apenas dos picos, foi possível determinar que a cristalinidade desta hidroxiapatita é de aproximadamente 64%, o que confere com o valor informado pela fabricante, por uma pequena margem de erro.

### 5.1.2 FTIR da Gelatina

A amostra de Gelatina foi submetida ao ensaio de FTIR para avaliar a composição química e a presença de contaminantes. O resultado obtido pode ser observado na figura 13, a seguir.

Figura 13 - FTIR da Gelatina



Fonte: Próprio autor.

O espectro de Gelatina apresenta bandas típicas, quando comparado aos resultados obtidos por Mousia et al., (2011) e Zhang et al., (2013). Na figura 13 pode-se observar os picos próximos a  $1085 \text{ cm}^{-1}$ , e de menores comprimentos de onda, característicos da união de grupos COH e da relação entre os grupos  $\text{CH}_2$ . Os picos próximos a  $1125 \text{ cm}^{-1}$  são característicos do estiramento dos grupos CO e CC, podendo haver contribuições do grupo COH. As bandas de  $1300$  a  $800 \text{ cm}^{-1}$  podem ser observadas na presença de vibrações entre os grupo C-O e C-C, que são sensíveis ao estiramento conformacional e de cristalinidade. As bandas entre  $1540$  e  $1650 \text{ cm}^{-1}$  são típicas de ligações amidas, características das vibrações da ligação C=O, da ligação do grupo N-H e pelo estiramento da ligação C-N. Por fim, os picos  $2700$  e  $3100 \text{ cm}^{-1}$  pertencem a vibração de estiramento das ligações OH e CH. Além disso, na análise de FTIR não foi possível encontrar picos que indicassem a presença de contaminantes na matéria-prima.

## 5.2 Ensaio de Tempo de Pega (*Setting time*)

O resultado do ensaio de tempo de pega encontra-se sumarizado na tabela 13. O tempo inicial foi definido como a primeira medida realizada (após 5 minutos de secagem na estufa) e o tempo final, aquele quando a agulha não mais penetrou no material. O ensaio foi realizado em dois corpos de prova de cada proporção produzida.

Tabela 13 - Resultados obtidos para o Tempo de Pega do compósito produzido

Tempo dentro da estufa (min)	5	10	15	20	25
Profundidade Amostra com 2% de Gelatina (mm)	3,5	2,5	2,0	1,0	0
Profundidade Amostra com 5% de Gelatina (mm)	4,5	3,0	1,5	1,0	0

Fonte: Próprio autor.

De acordo com a análise estatística realizada, Teste T Student com distribuição unicaudal e variação igual para ambas amostras, obteve-se um valor de significância maior que 0,05; indicando que não há diferença estatística significativa entre os resultados obtidos.

Com base na comparação dos valores obtidos para ambas amostras é possível verificar que aquela com maior proporção de gelatina apresentou menor resistência à penetração nas primeiras medidas, mas, ainda assim, apresentou mesmo tempo de pega final, de 25 minutos, o que indica que sua cura foi mais rápida que a amostra com 2% de gelatina. A cura mais rápida pela presença de gelatina, assim como valores aproximados de tempo de pega, também foi observada por Bigi et al., (2004), Li et al., (2009) e Nezafati et al., (2019).

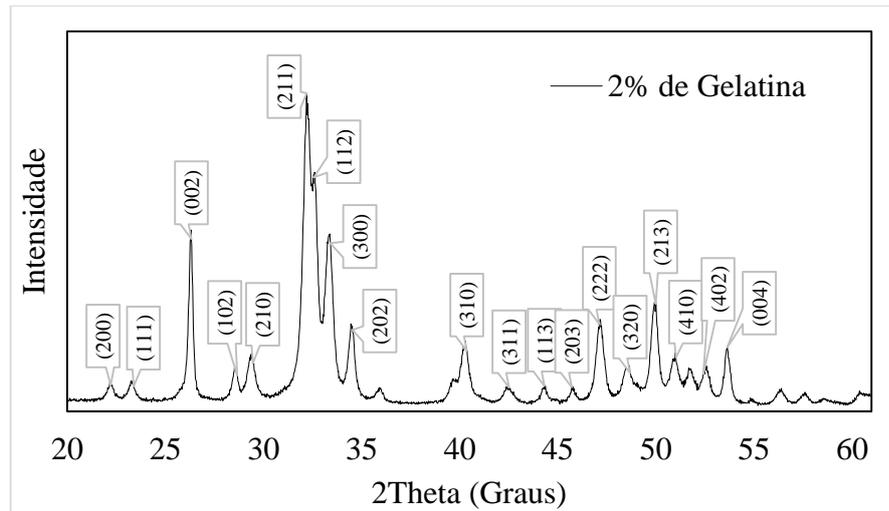
De acordo com Jansen et al., (2005) e Madureira et al., (2020), os valores comerciais encontrados para o tempo de pega de cimentos ósseos é em torno de 3 a 8 minutos para o tempo inicial, até 15 minutos para o tempo final e 7 minutos de tempo médio. Considerando tais valores podemos considerar que ambos os compósitos produzidos não se enquadram na faixa média e final estimada, uma vez que possuem tempo final de 25 minutos e tempo médio na faixa de 10 minutos, mas devemos salientar que, devido a utilização de uma montagem que é semelhante ao padrão mas não igual, estes valores podem ter sofrido alterações pelas modificações.

Apesar disso, pelos resultados obtidos, é possível sugerir que um aumento na proporção de gelatina do material, considerando a aceleração da cura por esta razão, poderia produzir um compósito com tempo de cura comercial, com as matérias-primas utilizadas no presente trabalho.

### 5.3 Ensaio de Difração de Raios-X (DRX)

O difratograma das amostras contendo 2% e 5% de gelatina pode ser observado nas figuras 14 e 15, respectivamente.

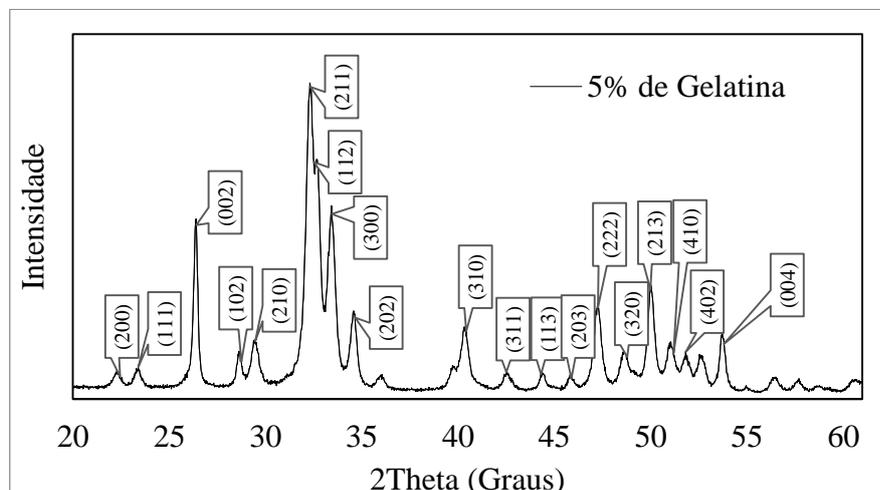
Figura 14 - DRX para Amostra de 2% de Gelatina



Fonte: Próprio autor.

Conforme esperado, os picos característicos de hidroxiapatita podem ser observados e estão listados na tabela 14. A presença de 2% de gelatina ocasionou uma ligeira redução na cristalinidade do material de 64% para 59%, o que condiz com os efeitos da adição de um material amorfo na produção do compósito.

Figura 15 - DRX para Amostra de 5% de Gelatina



Fonte: Próprio autor.

Tabela 14 - Picos característicos do DRX da amostra de 2%

Ângulo ( ° )	Plano Cristalográfico
22	(200)
22,9	(111)
26	(002)
28,1	(102)
29	(210)
31,8	(211)
32	(112)
32,9	(300)
34	(202)
40	(310)
42,3	(311)
44	(113)
45,5	(203)
46,8	(222)
48	(320)
49,6	(213)
50,5	(410)
51,4	(402)
53,3	(004)

Fonte: Próprio autor.

Assim como observado para o compósito contendo 2% de gelatina, o material produzido com 5% de gelatina continuou apresentando os picos característicos da hidroxiapatita, que podem ser observados na tabela 14. Contudo, a cristalinidade foi reduzida para 52%, confirmando o efeito da adição de uma fase amorfa na cristalinidade do compósito. Os resultados encontrados para ambas amostras produzidas no presente trabalho foram semelhantes aos descritos anteriormente por Bigi et al., (2004) e Li et al., (2009).

#### 5.4 Ensaio de Florescência de Raios-X por Energia Dispersiva (EDX)

Para confirmação da composição química e análise da presença de impurezas, foi realizado o ensaio de EDX para os compósitos produzidos. O resultado das análises pode ser visualizado nas tabelas 15 e 16 para a amostra contendo 2% e 5% de gelatina, respectivamente.

Tabela 15 - EDX da amostra de 2% de Gelatina

Elemento Químico	Concentração (%)
Ca	75,67
P	22,46
Si	1,37
Sr	0,41
Fe	0,06
Cu	0,02
Zr	0,01

Fonte: Próprio autor.

Tabela 16 - EDX da amostra de 5% de Gelatina

Elemento Químico	Concentração (%)
Ca	75,20
P	22,54
Si	1,67
Sr	0,41
S	0,11
Fe	0,07

Fonte: Próprio autor.

Uma vez que as amostras são formadas majoritariamente por hidroxiapatita é esperado que sua composição elementar seja em maior proporção formada por cálcio e fósforo, assim como foi observado nos resultados. Mas, se forem considerados os valores de referência fornecidos pela Fabricante Phoster Tecnologias de aglomerações LTDA, é esperado uma proporção em torno de 40% para o Cálcio e 20% para o fósforo. Tal discrepância pode ser explicada pelo fato da técnica EDX não ser capaz de identificar os elementos O e H,

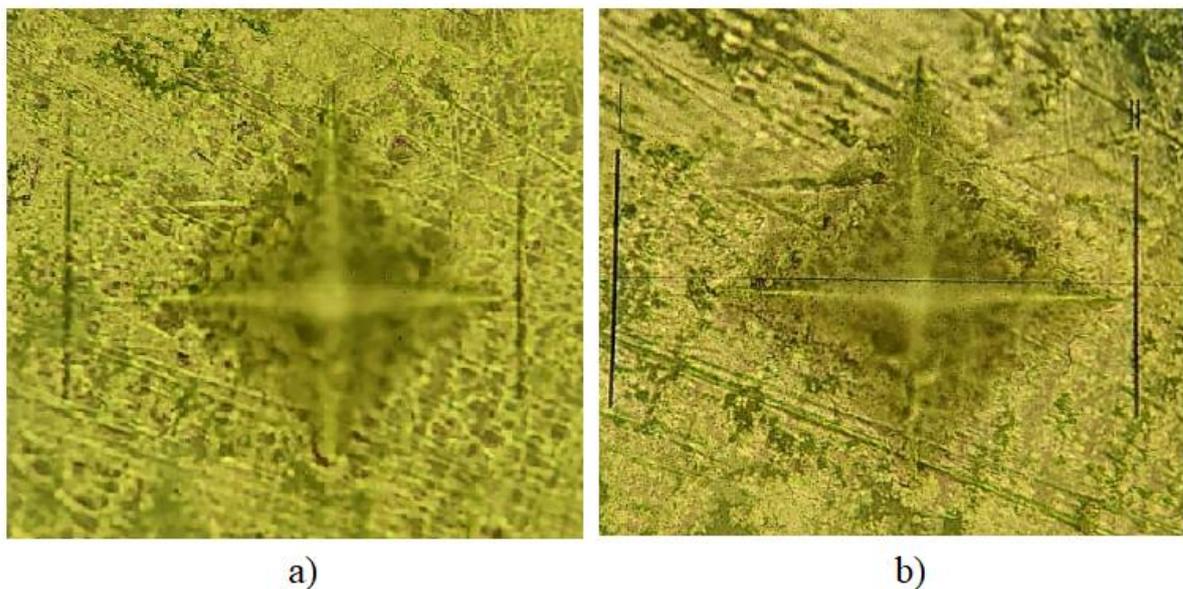
responsáveis pelos outros 40% da composição da Hidroxiapatita e muito presente na composição da gelatina.

Além destes elementos, também foi possível identificar a presença de Silício, Estrôncio, Ferro, Cobre, Zircônio e Enxofre. O Enxofre encontrado na amostra de 5% de Gelatina pode ser atribuído a própria Gelatina, que de acordo com o fabricante pode conter pequena proporção de Dióxido de Enxofre. Os outros elementos, por outro lado, tem sua presença atribuída ao porta amostra utilizado no ensaio.

### 5.5 Ensaio de Microdureza Vickers

No presente trabalho o ensaio de microdureza Vickers foi utilizado para avaliar o efeito do aumento da proporção de gelatina na resistência mecânica dos compósitos produzidos. Na figura 16 é possível visualizar uma das endentações realizadas, para os materiais contendo 2% (painel a) e 5% de gelatina (painel b).

Figura 16 – Endentações realizadas no ensaio de Microdureza Vickers



Fonte: Próprio autor.

Os resultados medidos de dureza e calculados de resistência mecânica para os compósitos produzidos encontram-se apresentados na tabela 17.

Os resultados do ensaio de microdureza demonstram que essa propriedade apresentou redução de seu valor com o aumento da proporção de gelatina no material, com o valor médio para a amostra de 2% de gelatina 7,78 HV e para a amostra de 5% de gelatina 5,61 HV.

Tabela 17 - Microdureza e resistência mecânica dos materiais propostos

Amostra	2% de Gelatina		5% de Gelatina	
	Dureza Vickers (HV)	Resistência mecânica (MPa)	Dureza Vickers (HV)	Resistência mecânica (MPa)
Medida 1	8,82	30,43	6,29	21,70
Medida 2	8,36	28,84	6,26	21,60
Medida 3	7,78	26,84	5,61	19,35
Medida 4	6,96	24,01	4,41	15,21
Medida 5	6,60	22,77	4,22	14,56
Média	7,78 ± 0,92 *	26,84 ± 3,21 #	5,61 ± 0,99 *	19,35 ± 3,42 #

Fonte: Próprio Autor.

\*  $p < 0,05$ , #  $p < 0,05$

De acordo com a análise estatística realizada, Teste T Student, com distribuição bicaudal e variação igual nas duas amostras, obteve-se uma significância inferior a 0,05; o que indica que existe diferença estatística significativa entre os resultados obtidos para a dureza Vickers e a resistência mecânica dos corpos de prova.

A partir do cálculo da resistência mecânica foi possível avaliar a potencial aplicação do material para uso biomédico. Os resultados apresentados demonstram que, para a proporção de 2% de gelatina foi obtido o maior valor de resistência mecânica, em média 26,84 MPa.

Segundo Oréfice (2012), a faixa de resistência a flexão para o osso esponjoso encontra-se entre 1,2 e 20 MPa, e para o osso cortical encontra-se entre 50 e 150 Mpa, o que nos permite sugerir que o compósito contendo de 5% de gelatina e com a resistência mecânica média de 19,35 MPa, possui potencial aplicação para reparo de tecido ósseo esponjoso. Contudo, é preciso deixar claro que para a aplicação desse composto como biomaterial, é necessário que sejam realizados um conjunto de ensaios biológicos *in vitro*, e posteriormente, *in vivo*.

## 6 CONCLUSÃO

No presente trabalho foram produzidos e caracterizados compósitos de hidroxiapatita contendo 2% e 5% de gelatina para potencial aplicação como cimento no reparo de tecido ósseo. O material contendo 5% de gelatina apresentou cura mais rápida, contudo, o tempo final e o tempo médio de pega de ambos os compósitos foi superior ao tempo dos cimentos ósseos comerciais.

Conforme esperado, a adição de gelatina ocasionou diminuição na cristalinidade do material, sendo, a redução em relação à hidroxiapatita pura, de 5 e 12% para os compósitos contendo 2 e 5% de gelatina, respectivamente.

O compósito contendo 5% de gelatina apresentou valor médio de resistência mecânica de  $19,35 \pm 3,42$  MPa, dentro da faixa de resistência a flexão para o osso esponjoso, o que sugere potencial aplicação desse material como cimento no reparo de lesões desse tecido.

## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como sugestões para continuidade da pesquisa em trabalhos futuros, podemos citar:

- Realizar ensaio para avaliar a molhabilidade dos compósitos;
- Analisar a superfície dos compósitos por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura;
- Realizar ensaio mecânico de compressão para avaliação do módulo elástico dos compósitos;
- Realizar ensaios para avaliar a porosidade dos compósitos;
- Realizar ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

ABUKAWA, H. et al. The Engineering of Craniofacial Tissues in the Laboratory: A Review of Biomaterials for Scaffolds and Implant Coatings. **Dent. Clin. N. Am.**, v.50, p.205-216, 2006.

AMBARD, A.J.; MUENINGHOFF, L. Calcium phosphate cement: Review of mechanical and biological properties. **Journal of Prosthodontics**. Vol. 15, n. 5, p. 321-328, Outubro, 2006.

**ASTM E384 - 17**: Standart test method for microindentation hardness of materials.

BARANDEHFARD, F; *et al.* The addition of synthesized hydroxyapatite and fluorapatite nanoparticles to a glass-ionomer cement for dental restoration and its effects on mechanical properties. **Ceramics International**, Elsevier, N. 42, p. 17866-17875, Agosto de 2016. DOI: 10.1016/j.ceramint.2016.08.122.

BARUD, H.G.O. **Biomateriais multifuncionais aplicados em reparo ósseo na odontologia**. (Tese) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Odontologia de Araraquara, Araraquara, 2017.

BAUDÍN, C.; BENET, T.; PENA, P. Effect of graphene on setting and mechanical behavior of tricalcium phosphate bioactive cements. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**. 2019.

BIGI, A.; *et al.* A biomimetic gelatin-calcium phosphate bone cement. **Biomaterials**, The international Journal of Artificial Organs, Vol. 27, nº 8, p. 664-673, 2004.

BILEZIKIAN, J.P.; RAISZ, L.G.; RODAN, G.A. Principles of Bone Biology. **Academic Press**. Volumes 1 e 2, 2ª edição, 2002.

BOEHM, A.V.; MEININGER, S.; TESCH, A.; GBURECK, U.; MULLER, F.A. The Mechanical Properties of Biocompatible Apatite Bone Cement Reinforced with Chemically Activated Carbon Fibers. **Materials (Basel)**. 2018.

CALLISTER JR, W.D.; RETHWISCH, D.G. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma introdução**. 5ª ed, Rio de Janeiro; LTC, 2002, 589p.

CANAL C, GINEBRA M P. **Fiber-reinforced calcium phosphate cements: A review**, **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**. p. 1658–1671, 2011.

CHANG, M.C.; KO, C.C.; DOUGLAS, W.H. Preparation of hydroxyapatite/gelatin nanocomposite. **Elsevier-Biomaterials**. n. 24, p. 28-53, 2003.

CORADIN, T.; BAH, S.; LIVAGE, J. Gelatine/silicate interactions: from nanoparticles to composite gels. **Elsevier - Colloids and surfaces**. Fevereiro, 2004.

COSTA, A.C.F.M.; LIMA, M.G.; LIMA, L.H.M.A.; CORDEIRO, V.V.; VIANA, K.M.S.; SOUZA, C.V.; LIRA, H.L. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. **Revista eletrônica de Materiais e Processos**. v. 4.3, p. 29-38, Novembro, 2009.

CURREY, J. The structure and mechanical properties of bone. **Bioceramics and Their Clinical Applications**, 2008, p. 3–27. DOI:10.1533/9781845694227.1.3.

DALMÔNICO, G.M.L. **Síntese e caracterização de fosfato de cálcio e Hidroxiapatita: Elaboração de composições Bifásicas HÁ/TCO-  $\beta$  para aplicações biomédicas**. (Tese) Universidade do Estado de Santa Catarina – Centro de Ciências Tecnológicas, Joinville, 2011.

DESSI, M.; ALVAREZ-PEREZ, M.A.; SANTIS, R.; GINEBRA, M.P.; PLANELL, J.A.; AMBROSIO, L. Bioactivation of calcium deficient hydroxyapatite with foamed gelatin gel. A new injectable self-setting bone analogue. **J Mater Sci: Mater Med**. 2013.

ELLIS III, E.; POTTER, J.K.; MALMQUIST, M. Biomaterials for reconstruction of the internal orbit. **Elsevier**. n.24. p. 609-627. 2012.

ESCOBAR, C.F.; FERNANDES, J.M.; SANTOS, L.A.; TRAJANO, W.T. Propriedades do cimento de fosfato de cálcio com adição de polímeros. **56º Congresso Brasileiro de Cerâmica- 1º Congresso Latino-Americano de Cerâmica**. Paraná. Junho, 2012.

FÉLIX, F.T. **Síntese e caracterização de compósitos de fosfato de cálcio e nanofibras de celulose para potencial aplicação do reparo de tecidos ósseos**. (Tese) Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais – CEFET-MG, Belo Horizonte, MG, 2016.

GALDINO, A.G.S.; ZAVAGLIA, C.A.C.; Caracterização físico-mecânica de compósitos porosos de hidroxiapatita-titânia confeccionados pelo método da esponja polimérica. **Cerâmica**, n. 58, p. 388-392, 2012.

GÓMES-GUILLÉN, M.C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; MONTERO, M.P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources. **Elsevier - Food Hydrocolloids**. Fevereiro, 2011.

GUASTALDI, Antonio Carlos; APARECIDA, Anahi Herrera. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**. Araraquara, v. 33, n. 6, p. 1352-1358. mai. 2010.

HAROUN, A.A.; MIGONNEY, V. Synthesis in vitro evaluation of gelatin/hydroxyapatite graft copolymers to form bionanocomposites. **Elsevier – International Journal of Biological Macromolecules**. n. 46, p. 310-316, 2010.

JANSEN, J.; OOMS, E.; VERDONSCHOT, N.; WOLKE, J. Injectable calcium phosphate cement for bone repair and implant fixation. **The Orthopedic Clinics of North America**, v. 36, issue 1, p. 89-95, Janeiro de 2005.

JARCHO, M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. **Clinical Orthopedica and Related Research**. 1980.

JIA, J.; ZHOU, H.; WEI, J.; JIANG, X.; HUA, H.; CHEN, F.; WEI, S.; SHIN, J.W.; LIU, C. Development of magnesium calcium phosphate biocement for bone regeneration. **J R Soc Interface**. 2010.

JUNQUEIRA, Luiz C.; CARNEIRO, José. Tecido Ósseo. In: JUNQUEIRA, Luiz C.; CARNEIRO, José. **Histologia Básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap. 8. p. 135-152, 2008

KAWACHI, E.Y.; BERTRAN, C.A.; REIS, R.R.; ALVES, O.L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**. N. 23, 2000.

LEE, J.; CHOI, B.B.R.; CHOI, J.; KIM, G.; HWANG, D.; CHANG, M.C.; BYUN, J.; KIM, U. Osteoblastic response to the Hydroxyapatite/Gelatin nanocomposite and bio-calcium phosphate cement. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. Vol. 10, n. 2, p. 47-52, 2013.

LEWIS, G. Injectable bone cements for use in Vertebroplasty and Kyphoplasty: State-of-the-art Review. **Wiley Interscience**. Memphis. Junho, 2015.

LI, M.; LIU, X.; LIU, X.; GE, B.; CHEN, K. Creation of microporous calcium phosphate cements as bone substitutes by using genipin-crosslinked gelatin microspheres. **J Mater Sci: Mater Med**, Vol. 20, p. 925-934, 2009.

LOTH, T.; HOTZEL, R.; KASCHOLKE, C.; ANDEREGG, U.; SCHULZ-SIEGMUND, M.; HACKER, M.C. Gelatin-Based biomaterial engineering with anhydride-containing oligomeric cross-linkers. **Biomacromolecules**. Maio, 2014.

LU J, YU H, CHEN C. Biological properties of calcium phosphate biomaterials for bone repair: a review. **RSC Advances**. 2018.

LUCAS-APARICIO, J.; MANCHÓN, A.; RUEDA, C.; PINTADO, C.; TORRES, J.; ALKHRAISAT, M.H.; LÓPEZ-CABARCOS, E. Silicon-calcium phosphate ceramics and silicon-calcium phosphate cements: Substrates to customize the release of antibiotics according to the idiosyncrasies of the patient. **Materials Science and Engineering**. 2020.

MACHADO, A.P.L.; OLIVEIRA, C.S.; OLIVEIRA, L.S.A.F.; ROSA, F.P. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de ciências médicas e biológicas**. n. 9, p. 37-44, Maio de 2010.

MADUREIRA, M.A.B.; FREITAS, K.M.; CRUZ, C.L.; *et al.* Análise das propriedades mecânicas e biológicas do cimento ósseo de fosfato de cálcio bifásico nanoestruturado de cura rápida. **Revista Matéria**, v. 25, n. 4, Abril, 2020. DOI: 10.1590/S1517-70762020004.1159.

MOUSIA, Z.; FARHAT, I. A.; PEARSON, M.; CHESTERS, M.A.; MITCHELL, J.R. FTIR Microspectroscopy study of Composition Fluctuations in Extruded Amylopectin-Gelatin Blends. **Biopolymers (Biospectroscopy)**, Vol. 62, p. 208-218, Fevereiro de 2001.

MARTÍNES-VÁZQUEZ, F.J., CABÑAS, M.V., PARIS, J.L., LOZANO, D., VALLET-REGÍ, M., Fabrication of novel Si-doped Hydroxyapatite/Gelatin scaffolds by rapid prototyping for drug delivery and bone regeneration. **Acta Biomaterialia**, 2015.

MORGAN, E.F.; UNNIKRISSAN, G.U.; HUSSEIN, A.I. Bone mechanical properties in healthy and diseased states. **Annu Rev Biomed Eng**. Junho de 2018.

NEZAFATI, N.; *et al.* *In vitro* bioactivity and cytocompatibility of an injectable calcium phosphate cement/silanated gelatin microsphere composite bone cement. **Composites Part B-Elsevier**, Vol. 175, p. 1359-8368, Julho de 2019.

ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M. de M.; MANSUR, H.S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. 1ª ed., 1ª reimpressão, Rio de Janeiro: Cultura médica: Guanabara Koogan, 2012, 538p.

OVALLE, William; NAHIRNEY, Patrick C. Tecido cartilaginoso e tecido ósseo. In: OVALLE, William; NAHIRNEY, Patrick C. Netter. **Bases da Histologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. cap. 6. p. 131-156.

PAKNAHAD, A.; PETRE, D.G.; LEEUWENBURGH, S.C.G.; SLUYSB, L.J. Interfacial characterization of poly (vinyl alcohol) fibers embedded in a calcium phosphate cement matrix: An experimental and numerical investigation. **Acta Biomaterialia**. 2019.

PARK, J.; LAKES, R.S. Biomaterials: an introduction. **Springer Science & Business Media**. Julho de 2017. Acesso em: 14 de Abril de 2019.

PIRES, A.L.R.; BIERHALZ, A.C.K.; MORAES, A.M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**. vol.38, n.27, p.957-971, Maio de 2015.

RAINHA, D.B.; LARSSON, D.; MRKONJIC, F.; ISAKSSON, H.; KUMAR, A.; LIDGREN, L.; TAGIL, M.; Gelatin- Hydroxyapatite- calcium sulphate based biomaterial for long term sustained delivery of bone morphogenic protein-2 and zoledronic acid for increased bone formation: In-vitro and in-vivo carrier properties. **Elsevier - Journal of controlled release**. P. 83-96, Janeiro, 2018. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.01.006.

RAMALHO, A.C.A. **Desenvolvimento e Caracterização de cimentos ósseos inovadores**. (Dissertação) Universidade da Beira Interior – Faculdade das ciências da saúde, Cascais, 2010.

SANTOS, M.L. *et al.* Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. **Eclética química**, Vol. 30, n. 3, p.29-35, 2005.

SILVA, Viviana V. Aplicação de biomateriais em ortopedia e engenharia de tecido ósseo. **Revista saúde e Meio Ambiente - Resma**. São Paulo, V.5, n.2, p. 14-27, agosto/ dezembro, 2017.

SIMAN, M.S. **Influência da adição do óxido de grafeno no tempo de pega e nas propriedades mecânicas de um cimento ósseo de fosfato de cálcio.** (Tese) Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais – CEFET-MG, Belo Horizonte, MG, 2018.

SOUZA, S.A. **Ensaaios mecânicos de materiais metálicos.** 5ª ed, São Paulo; Edgar Blucher, 1982, 286p.

USKOKOVIÉ, V.; GHOSH, S.; WU, V.M. Antimicrobial hydroxyapatite-gelatin-silica composite pastes with tunable setting properties. **Journal of Materials Chemistry.** 2017.

WANG, S.; ZHANG, S.; WANG, Y.; SUN, X.; SUNA, K. Reduced graphene oxide/carbon nanotubes reinforced calcium phosphate cement. **Ceramics International.** 2017.

ZHANG, N.; LIU, X.; YU, L.; SHANKS, R.; PETINAKS, E.; LIU, H. Phase composition and interface of starch-gelatine blends studied by synchrotron FTIR micro-spectroscopy. **Carbohydrate Polymers,** Elsevier, n. 95, p. 649-653, 2013. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.03.045