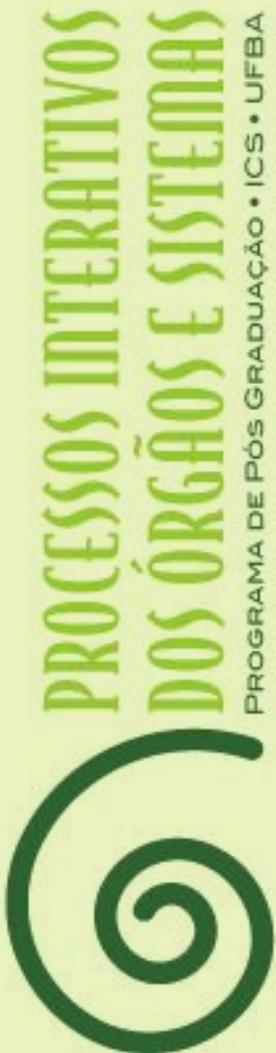


LUIZA QUEIROZ VASCONCELOS



**COMPOSTO DE WOLLASTONITA/ β -TCP
COMO ARCABOUÇO PARA
REGENERAÇÃO ÓSSEA: UMA
AVALIAÇÃO HISTOMORFOLÓGICA**

Salvador
2015

LUIZA QUEIROZ VASCONCELOS

**COMPOSTO DE WOLLASTONITA/ β FOSFATO
TRICÁLCICO COMO ARCABOUÇO PARA
REGENERAÇÃO ÓSSEA: UMA AVALIAÇÃO
HISTOMORFOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Fabiana Paim Rosa

Salvador

2015

Vasconcelos, Luisa Queiroz.

Composto de wollastonita/ β fosfato tricálcico como arcabouço para regeneração óssea: uma avaliação histomorfológica. / Luisa Queiroz Vasconcelos. - 2015.

74 f. : il.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Paim Rosa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciência da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Salvador, 2015.

1. Regeneração Óssea. 2. Biomateriais. 3. Cerâmica. I. Rosa, Fabiana Paim. II. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciência da Saúde. Programa de Pós- Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas. III. Título.

CDD 612.753

LUISA QUEIROZ VASCONCELOS

**COMPOSTO DE WOLLASTONITA/ β FOSFATO TRICÁLCICO COMO
ARCABOUÇO PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA: UMA AVALIAÇÃO
HISTOMORFOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 15 de dezembro de 2015.

Banca Examinadora

Fabiana Paim Rosa – Orientadora _____

Doutora em Odontologia, pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Universidade Federal da Bahia.

Raúl García Carrodegua _____

Doutor em Ciências Químicas, pela Universidade da Havana
Pesquisador Visitante no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais, da
Universidade Federal de Campina Grande

Elisângela de Jesus Campos _____

Doutora em Medicina e Saúde, pela Universidade Federal da Bahia
Universidade Federal da Bahia

Ao meu filho, Mateus, e à minha família, por mais esta conquista.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar o meu caminho e me ajudar a seguir em frente e superar os obstáculos surgidos ao longo desta trajetória.

Ao meu filho, Mateus, por entender as minhas ausências, mesmo sendo ainda tão pequeno.

Aos meus pais, Faustino e Hildélia, que tanto amo e que são meu exemplo de força, coragem e luta. Em especial, à minha mãe pela força e ajuda nos cuidados de Mateus. Sem a sua ajuda certamente esta caminhada seria bem difícil.

Aos meus irmãos, que sempre estão do meu lado, me apoiando e me incentivando. Em especial, Marcia pela atenção e ajuda com Mateus.

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

À Profa. Dra. Fabiana Paim, pela orientação ao longo deste ano e pela compreensão nos momentos de crescimento no universo dos biomateriais.

A George (Geo) e Suelen (Su), por injetarem alegria e carinho nesta caminhada. Chego feliz ao final deste ciclo por conquistar a amizade de duas pessoas que só me dão carinho. Obrigada por toda ajuda.

Aos colegas do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais (LBTB), em especial Iorrana e Anderson, por estarem sempre dispostos a ajudar e a direcionar o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada!

Ao Prof. Roberto Paulo de Araújo, coordenador do programa de Pós-graduação, pela dedicação ao Programa de Pós-graduação dos Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

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

A Azurebio, por disponibilizar o biomaterial.

A Suzette, pela gentileza ao responder minhas dúvidas.

Às técnicas de laboratório Cristina e Elisângela, pela dedicação no processamento dos espécimes.

Ao Junior, por cuidar com respeito e responsabilidade todos os animais deste experimento.

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

Aos colegas de turma do PIOS.

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

À FAPESB, pelo apoio financeiro.

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

Olho nenhum viu, ouvido nenhum ouviu, mente nenhuma imaginou o que Deus preparou para aqueles que o amam.

(1 Coríntios 2:9)

VASCONCELOS, Luisa Queiroz. **Composto de wollastonita/ β fosfato tricálcico como arcabouço para regeneração óssea: uma avaliação histomorfológica.** 2015. 74 f. il. Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) –Universidade Federal da Bahia, Salvador.

RESUMO

Introdução: A área da bioengenharia tecidual tem o desafio de desenvolver materiais que possam criar e aperfeiçoar enxertos aloplásticos ou técnicas regenerativas que melhorem e restaurem a função tecidual. Associar diferentes materiais pode contribuir para a elaboração de um biomaterial com tal característica. Diante disso, as biocerâmicas wollastonita e fosfato tricálcico vêm sendo estudadas com o objetivo de se desenvolver um composto com biodegradação e osteogênese similar ao processo reparador do tecido ósseo. A wollastonita é um silicato de cálcio que apresenta o silício em sua constituição. O silício participa ativamente do processo de osteogênese, fator que explica a bioatividade da wollastonita. O fosfato tricálcico apresenta rápida degradação quando exposto aos fluídos corpóreos. A associação dessas biocerâmicas tem grande interesse para a bioengenharia tecidual, já que esse composto é bioativo e biorreabsorvido. **Objetivo:** Avaliar, após implantação *in vivo*, o comportamento osteogênico de um novo compósito formado por pseudowollastonita e fosfato tricálcico no reparo ósseo. **Materiais e métodos:** Foram utilizados 20 ratos distribuídos, randomicamente, em 4 grupos experimentais avaliados aos 15 dias e 45 dias de pós-operatório: grupo wollastonita de cálcio - defeito ósseo preenchido com wollastonita/TCP; grupo sem biomaterial - defeito ósseo sem implantação de biomaterial, preenchido com coágulo. Os espécimes foram avaliados por histomorfologia, através da microscopia de luz comum. **Resultados:** Observou-se, aos 15 dias, no grupo wollastonita de cálcio a formação de matriz osteoide reacional restrita às bordas, porém, direcionada ao centro do defeito ósseo. Aos 45 dias, observou-se matriz osteoide depositada ao longo de todo o defeito ósseo. Em ambos os pontos biológicos, a matriz neoformada permeou os grânulos do biomaterial e eles se apresentaram com aspecto basifílico. Estes se apresentaram em tamanhos diferentes, preenchendo todo o defeito em mono ou em duplas camadas e em processo de biodegradação. Notou-se um discreto processo inflamatório mononuclear, com proliferação de capilares e reação granulomatosa ao redor da superfície do biomaterial. No grupo controle, aos 15 e 45 dias, ocorreu neoformação óssea reacional restrita às bordas do defeito com preenchimento do defeito por delgado tecido conjuntivo fibroso. **Conclusão:** O compósito p-W/ β TCP apresentou capacidade osteocondutora, bioativa e biodegradável.

Palavras-chave: Regeneração óssea. Wollastonita. Cerâmica.

VASCONCELOS, Luisa Queiroz. **Compound of wollastonite/ β tricalcium phosphate as a scaffold to bone regeneration: a histomorphological evaluation.** 2015. 74 s. ill. Theses (Master's degree in Interactive processes of systems and organs) – Federal University of Bahia, Salvador.

ABSTRACT

Introduction: The field of tissue bioengineering has the challenge of developing materials that can create and perfect alloplastic grafts or regenerative techniques that improve and restore tissue function. Associating different materials can contribute to the elaboration of a biomaterial with such characteristic. In face of this, the wollastonite bioceramics and tricalcium phosphate have been studied with the aim of developing a compound with biodegradation and osteogenesis similar to the repair process of bone tissue. Wollastonite is a calcium silicate which presents silicon in its constitution. Silicon participates actively in the process of osteogenesis, the factor which justify the bioactivity of wollastonite. Tricalcium phosphate presents rapid degradation when it is exposed to body fluids. The association of these bioceramics has great interest for tissue bioengineering, since this compound is bioactive and bioreabsorbed. **Objective:** To evaluate, after implantation *in vivo*, the osteogenic behavior of a new composite formed by pseudowollastonite and tricalcium phosphate in bone repair. **Materials and methods:** Twenty rats were used and randomly assigned in 4 experimental groups evaluated at 15 days and 45 postoperative days: group wollastonite of calcium - bone defect filled with wollastonite / TCP; group without biomaterial - bone defect without implantation of biomaterial, filled with clot. The specimens were evaluated by histomorphology using ordinary light microscopy. **Results:** It was observed at 15 days, in the group wollastonite of calcium, the formation of a osteoid matrix reactional restricted to the borders, but directed to the center of the bone defect. At 45 days, it was observed the osteoid matrix deposited throughout the entire bone defect. In both biological points, the neoformed matrix permeated the granules of the biomaterial and they presented themselves with basophilic aspect. These presented themselves in different sizes, filling the whole defect in mono or in double layers and in the biodegradation process. It was noticed a unobtrusive mononuclear inflammatory process, with proliferation of capillaries and granulomatous reaction around the surface of the biomaterial. In the control group, at 15 and 45 days, respectively, occurred a reactional bone neoformation restricted to the borders of the defect, with filling the defect by fibrous slender connective tissue. **Conclusion:** The composite p-W/ β TCP presented osteoconductive, bioactive and biodegradable capacity.

Keywords: Bone regeneration. Wollastonite. Ceramics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Estrutura cristalina da wollastonita.
- Figura 2** Representação esquemática do processo de dissolução dos fosfatos de cálcio, após implantação. (1 e 2). Início e continuação do processo de reabsorção. (3) Equilíbrio iônico entre implante-tecido. (4) Adsorção de proteínas. (5 e 6) Adesão e proliferação celular. (7) Deposição de HAP. (8) Osso neoformado.
- Figura 3** Representação das etapas de deposição de HAP dos biovidros em fluido biológico.
- Figura 4** Ilustração da ligação por coalescências entre as superfícies dos materiais formada no processo de sinterização.
- Figura 5** Armazenamento e aspecto macroscópico dos grânulos.
- Figura 6** Sequência de fotos tirada em microscópio eletrônico de varredura (MEV) mostrando o formato e a textura superficial em diferentes tamanhos.
- Figura 7** Etapas que envolvem a síntese do compósito W-TCP.
- Figura 9** Principais etapas cirúrgicas: (1) Incisão do tecido. (2) Confecção do defeito ósseo com fresa trefina. (3) Demarcação do defeito ósseo. (4) Remoção da tampa óssea. (5) Implantação do biomaterial.
- Figura 10** Esquema da região anatômica onde o defeito ósseo crítico é realizado.
- Figura 11** Ilustração da calvária com o defeito ósseo (1), divididas nas porções posterior (PP) e porção anterior (PA). Corte transversal da porção posterior do defeito ósseo utilizada na análise histológica (2).
- Figura 12** GW: Matriz osteoide restrita às bordas do defeito ósseo aos 15 dias.

- Figura 13** GCV: Matriz osteoide restrita as bordas do defeito ósseo aos 15 dias.
- Figura 14** GW: Matriz osteoide depositada ao redor do grânulo aos 15 dias.
- Figura 15** GW: Matriz osteoide no centro do defeito ósseo e de permeio aos grânulos aos 45 dias.
- Figura 16** GW: Matriz osteoide em diferente grau de maturação aos 45 dias.
- Figura 17** GCV: Preenchimento do defeito ósseo por tecido conjuntivo fibroso aos 15 dias.
- Figura 19** GCV: Preenchimento do defeito ósseo por tecido conjuntivo fibroso aos 45 dias.
- Figura 19** GW: Distribuição dos grânulos ao longo do defeito aos 15 dias.
- Figura 20** GW: Distribuição dos grânulos ao longo do defeito aos 45 dias.
- Figura 21** GW: Aspecto dos grânulos no centro do defeito aos 15 dias.
- Figura 22** GW: Aspecto dos grânulos centro do defeito e inflamação crônica aos 45 dias.
- Figura 23** GW: Grânulo no centro do defeito ósseo circundado por osteoblastos aos 45 dias.
- Figura 24** GW: Presença de vasos sanguíneos aos 45 dias.
- Figura 25** GW: Grânulos no centro do defeito ósseo circundados por tecido conjuntivo frouxo aos 45 dias.
- Figura 26** GW: Grânulos no centro do defeito ósseo circundados por inflamação granulomatosa aos 45 dias.

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** Composição química típica da wollastonita.
- Quadro 2** Número de animais de acordo com o grupo e ponto biológico.

LISTA DE GRÁFICOS

- | | | |
|----------------|----------|--|
| Gráfico | 1 | Gráfico do tempo e temperaturas envolvendo a síntese do composto WTCP. |
| Gráfico | 2 | Representação gráfica da porosidade intra e intergrânulos da W-TCP. |

LISTA DE TABELA

Tabela **1** Exemplos de vias mais utilizadas para a síntese de TCP

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A_2O_3	Alumina
Al	Alumínio
Al_2O_3	Óxido de alumínio
BO	Borda óssea
$Ca_3(PO_4)_2$	Estrutura molecular fosfato tricálcico
CaP	Fosfatos de cálcio
$CaSiO_3$	Metassilicato de cálcio
DM	Dura-máter
FC	Fluído corpóreo
Fe	Ferro
Fe_2O_3	Óxido de ferro
GOLDNER	Tricrômico de Masson-Goldner
Gr	Grânulos
HAP	Hidroxiapatita
K	Potássio
K_2O	Óxido de potássio
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Mg	Magnésio
MgO	Óxido de magnésio
Mn	Manganês
MnO	Óxido de manganês
MO	Matriz steoide
Na	Sódio
pH	Potencial de hidrogênio
PIFG	Picrossirius-Red
p-W	Pseudowollastonita
SiO_2	Dióxido de silício
TC	Tecido conjuntivo

TCF	Tecido conjuntivo fibroso
TCP	Fosfato tricálcico
TiO ₂	Óxido de titânio
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
UFBA	Universidade Federal da Bahia
VC	Veia central
W	Wollastonita
ZrO ₂	Zircônia

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta
α	Alfa
s	Segundos
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
mm	Milímetros
mL	Mililitros
min	Minutos
M	Molar
g	Gramas
cm	Centímetros
μm	Micrômetros
®	Registrado
%	Por cento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1 BIOMATERIAIS	24
2.1.1 Wollastonita (W).....	25
2.1.2 Fosfato Tricálcico (TCP)	29
2.1.3 Vitrocerâmicas	31
2.2 W-TCP.....	32
2.3 TECIDO ÓSSEO	35
3 OBJETIVO.....	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO W-TCP	41
4.2 CÁLCULO AMOSTRAL	44
4.3 AMOSTRA.....	45
4.4. ASPECTOS ÉTICOS.....	46
4.5. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	46
4.6. ETAPA LABORATORIAL	48
4.6.1 Processamento histológico	48
4.6.2 Análise histomorfológica	49
5 RESULTADOS	51
6 DISCUSSÃO.....	62
7 CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS	68
ANEXO	72

1 INTRODUÇÃO

Lesões ósseas de dimensões críticas são caracterizadas por comprometimento da irrigação sanguínea e de células, em decorrência da ausência de uma estrutura que auxilie na sua reparação. Nessa condição, o reparo se dá por deposição de tecido conjuntivo fibroso, o que não fornece organização estrutural ao tecido. Faz-se necessária, então, a implantação de um suporte que oriente a migração de células e de fatores osteogênicos para que ocorra a deposição de novo tecido ósseo.

Diante desse desafio, a bioengenharia tecidual utiliza conhecimentos das Ciências Biológicas e das Engenharias para desenvolver novas tecnologias, tratamentos e substitutos teciduais, com características que mimetizem respostas biológicas similares às fisiológicas. Esses substitutos, definidos como biomateriais, de origem natural ou sintética, são destinados a interagir com sistemas biológicos, de forma transitória ou permanente, com o objetivo de ativar, aumentar ou substituir tecidos biológicos e/ou órgãos.

Diante dessa necessidade, os biomateriais podem ser uma opção terapêutica, uma vez que podem ser produzidos com composição e arquitetura similar ao tecido ósseo. Além disso, eles têm boa disponibilidade, fácil esterilização e menor chance de causar morbidades. Para que seja viável a utilização desses materiais como substitutos ósseos, é necessário haver biocompatibilidade, osteocondução e biodegradação. Tais respostas dependem do conhecimento de parâmetros, como características físico-químicas, formato, reatividade superficial e arcabouços que permitam a migração e adesão celular.

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

O silício presente na W está relacionado com uma maior osteogênese e maior reforço às forças de tração. Estudos científicos associam um melhor desempenho biológico da W devido à participação do silício em processos fisiológicos

importantes, já que o silício é o terceiro elemento traço mais abundante no corpo humano, encontrando-se presente na zona ativa de crescimento ósseo e está relacionado com o ciclo celular dos osteoblastos.

A W e TCP, como biomateriais, são biologicamente compatíveis, termodinamicamente estáveis ao pH fisiológico e permitem substituições em sua estrutura química, o que resulta em diferentes respostas clínicas e formas de apresentação.

A estratégia de associar a W com o TCP permite desenvolver um substituto ósseo com biodegradabilidade e osteogênese similar ao processo fisiológico de reparação óssea. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar, após implantação *in vivo*, o comportamento osteogênico de um novo composto constituído de p-wollastonita e β -fosfato tricálcico para aplicação na terapia tecidual óssea.

Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BIOMATERIAIS

Biomateriais a base de fosfato e cálcio são estudados e descritos como opção de enxerto para tecido ósseo desde 1894, quando Dreesman relatou o uso de gesso como possível substituto ósseo. Na década de 1960, muitos dos comportamentos biológicos dos biomateriais foram elucidados pelos trabalhos desenvolvidos por Hench. Isto porque os achados constataram que a fase mineral de alguns biomateriais era similar aos dos dentes e ossos humanos. Esta semelhança é explicada pela natureza química desses materiais que, por serem formados basicamente por íons cálcio e fosfato, participam ativamente do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e os fosfatos de cálcio (TEIXEIRA, 2009).

Biomaterial pode ser definido como aquele projetado para direcionar, por meio da interação com componentes biológicos, a resposta de qualquer tratamento ou diagnóstico, na medicina humana ou veterinária, de maneira independente ou como parte de um sistema complexo quando em contato com um sistema vivo (WILLIAM, 2009). Os biomateriais podem ser classificados como metal, cerâmica e polímero, a depender de sua origem (GONÇALVES et al., 2013).

As cerâmicas são definidas como moléculas inorgânicas, não metálicas, de composição altamente variada. Os principais representantes para aplicações biomédicas são a alumina (Al_2O_3), a zircônia (ZrO_2), os fosfatos de cálcio bioativos (fosfato beta tricálcico [B-TCP], hidroxiapatita de cálcio [HAP]), os vidros bioativos (Bioglass 45S5) (COSTA, 2014). Existe um subgrupo dentro das cerâmicas, chamado de cerâmicas quimicamente ligadas, onde as ligações formadas são do tipo covalente, iônica e força de van der Waals. Fazem parte deste subgrupo os sistemas silicato de cálcio (wollastonita), fosfatos de cálcio, carbonatos de cálcio, aluminatos de cálcio e os sulfatos de cálcio (ALONSO, 2011).

As cerâmicas, quando em contato com tecidos vivos, são divididas em três classes: bioinertes, biativas ou de superfície ativa e as biodegradáveis ou reabsorvíveis.

- **Bioinertes:** pertencem a este grupo os materiais que mantêm as propriedades físicas e químicas, sem troca iônica, quando expostas ao meio fisiológico. Sua fixação produz íntimo contato entre o enxerto e o osso, a partir de

uma forte ligação física criada nessa interface. São bem tolerados pelo organismo e não provocam respostas ao tecido. Porém, há uma pequena formação de camada fibrosa entre o biomaterial e o meio intersticial. Compõem este grupo a zircônia e a alumina (GARZÓN, 2012).

- **Bioativos:** neste grupo os materiais realizam ligações de origem química com o tecido adjacente, sem formar tecido conjuntivo, o que promove fixação estável entre eles. São representados pelos fosfatos de cálcio e compostos de fosfato de cálcio (GARZÓN, 2012).

- **Biodegradáveis:** compostos por biomateriais que, ao entrarem em contato com os tecidos são degradados, são solubilizados ou fagocitados pelo organismo de forma gradual. Não há formação de tecido conjuntivo entre o implante e o osso. O TCP e W fazem parte desta classe (GARZÓN, 2012).

As biocerâmicas, nos últimos anos, se destacam dentre os biomateriais pelo desempenho biológico ao serem implantados. Quando em contato com o meio biológico, elas têm a capacidade de formar camada de hidroxiapatita, o que promove adesão mecânica e química entre o tecido e o enxerto (COSTA, 2014). Dentro desse grupo, dois compostos se destacam: o fosfato tricálcio (TCP) e a wollastonita (W) (CARRODEGUAS et al., 2008; DE AZA et al., 2014).

2.1.1 Wollastonita (W)

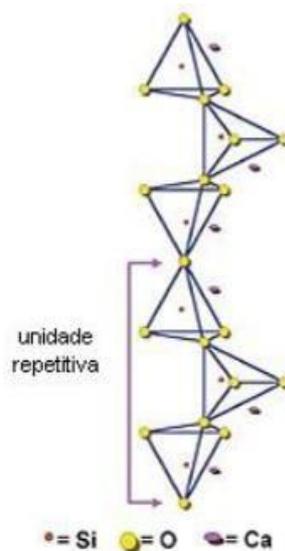
A W é um metassilicato de cálcio, do tipo piroxênio (estrutura de cadeia simples), constituída por três tetraedros comumente repetitiva e com fórmula química CaSiO_3 (Figura 1). Sua origem pode ser natural ou sintética, sendo que a sintética apresenta pureza química e estrutura mais cristalina. Esses aspectos são a principal diferença entre as duas origens (FACTORI, 2009; ANJANEYULU; SASIKUMAR, 2014). O seu principal uso nas últimas décadas tem sido na indústria de cerâmica doméstica, na área tecnológica e industrial devido a sua inércia, estabilidade térmica, baixa expansão e baixa condutividade térmica (AZAROV, 1995).

Na natureza, encontra-se com composição teórica de 48,28% CaO (óxido de cálcio) e 51,72% SiO_2 (dióxido de silício), podendo estar associado a outros minerais, como o alumínio (Al), ferro (Fe), magnésio (Mg), titânio (Ti), manganês

(Mn), potássio (K) (Quadro 1). É o único mineral natural com a capacidade de se organizar em forma acicular, forma de agulha. No entanto, na forma sintética não apresenta essa conformação (FACTORI, 2009; ANJANEYULU; SASIKUMAR, 2014).

A W apresenta boa resistência mecânica e térmica e a sua utilização em compósitos cerâmicos propicia melhorias nas propriedades biomecânicas deles. Baixa contração e ponto de fusão, alcalinidade e atoxicidade são características também importantes da W, quando utilizada como opção para enxerto ósseo (AZAROV, 1995).

Figura 1 - Estrutura cristalina da wollastonita.



Fonte: Adaptado de Fernandes (2006).

Quadro 1 - Composição química típica da wollastonita

Componentes	Valor típico (%)
CaO	46,15
SiO₂	51,60
Fe₂ O₃	0,77
Al₂O₃	0,34
MnO	0,16
MgO	0,38
TiO₂	0,05
K₂ O	0,05

Fonte: Adaptado de Fernandes, 2006.

A W de origem natural é formada pelo processo chamado de metamorfismo, resultante da variação de calor e pressão do calcário e sílica. É normalmente encontrada na coloração branca, mas pode ser cinza, marrom ou vermelha, dependendo da quantidade de impurezas presentes em sua estrutura química, ou seja, da quantidade de ligações com outros minerais (FACTORI, 2009).

A W sintética possui características físico-químicas constantes, o que lhe permite produzir os três tipos presentes na natureza. A W triclinica é a forma mais comum e predominante; já as formas parawollastonita monoclinica e a pseudowollastonita triclinica (p-W) são as mais raras de serem encontradas naturalmente. A p-W é a única das W que se forma em altas temperaturas: acima de 1200°C (FACTORI, 2009; ANJANEYULU; SASIKUMAR, 2014).

A p-W é uma sílica estável a temperaturas acima de 1030°C, polimórfica e possui estrutura cristalina capaz de realizar ligação direta como osso (CARRODEGUAS et al., 2008; DE AZA; GUITIA; DE AZA, 1994). Esta ligação ocorre, pois se trata de um silicato com comportamento bioativo que permite a formação de uma camada de hidroxiapatita (HAP), a partir da dissolução dos seus cristais. Essa camada de HAP conduz a migração dos osteoblastos para a superfície do implante e coloniza a sua superfície. (AL NOAMAN et al., 2013)

A W e a p-W, quando em contato com os fluídos corpóreos (FC), formam uma camada de apatita por meio da troca iônica entre H_3O^+ do FC com íons de cálcio da p-W. Como resultado, ocorre formação de uma camada de hidrogel de sílica amorfo e aumento do pH de 9,0 para 10,5 na interface W/FC (DE AZA; GUITIA; DE AZA, 1994). A alcalinização do meio e a formação da camada de hidrogel de sílica explicam a sua superior bioatividade, quando comparada a outros biomateriais (DE AZA; DE AZA, 1994; MOTISUKE; BERTRAN, 2012; AL NOAMAN et al., 2013).

O tempo de ligação ao osso ocorre mais rápido devido a sua maior reatividade superficial, propriedade essa que está relacionada com as características superficiais do biomaterial. A área superficial do biomaterial é onde ocorre o primeiro contato com o meio onde foi implantado. Ela influencia na adsorção das proteínas, no grau de contato dos fluídos fisiológicos sobre o biomaterial e na adesão celular. A morfologia superficial do material tem papel importante na interação tecido/biomaterial, pois ela participa da modulação da atividade celular circunjacente com a superfície do implante (ALONSO, 2011).

A biodegradabilidade e bioatividade encontradas na p-W resultam, então, da ligação física e química à estrutura óssea. De Aza e colaboradores (2000) demonstraram que a p-W, quando implantada em tíbias de rato, ligava-se ao osso mediada por proteína e pelo mecanismo que eles definiram como dissolução-precipitação-transformação. A dissolução-precipitação é o processo responsável pela formação da camada de HAP, por meio da dissolução parcial da sílica amorfa e logo após a precipitação de HAP na superfície do biomaterial, até que não haja mais trocas iônicas. O processo de transformação seria a fase de remodelação óssea (Figura 2) (DE AZA et al., 1994).

A presença do silício na composição da W traz aspectos biológicos importantes, já que ele desempenha papel primário na formação da matriz óssea com ligações entre o colágeno e os proteoglicanos (AL NOAMAN et al., 2013). Além disso, estudos têm sugerido que as adições de silício em biomateriais influenciam no metabolismo celular, já que esse íon participa do processo de mineralização, promove a expressão de genes relacionados com a atividade óssea, estimula a proliferação celular dos osteoblastos e promove a neoformação óssea (DE AZA et al., 2000; MOTISUKE; BERTRAN, 2012; DE AZA et al., 2014).

2.1.2 Fosfato Tricálcico (TCP)

O TCP apresenta propriedades importantes para a elaboração de substitutos teciduais ósseos, pois é quimicamente estável, possui capacidade de permitir substituições iônicas sem promover alterações significativas em seu arranjo espacial na forma alotrópica β -TCP, além de ser bioativo, osteocondutor e biodegradável. Atualmente, é utilizado em reservatórios de liberação lenta de fármaco e preenchimento de pequenos defeitos ósseos (GUASTALDI; APARECIDA, 2010; GOMES, 2012; PIRES et al., 2015).

Presente em diversos processos patológicos, o TCP ocorre no cálculo dentário, salivar e urinário, em lesões cariosas e calcificações em tecido mole. Apresenta fórmula química de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e pode ser sintetizado, a partir do fosfato de cálcio amorfo ou hidroxiapatita deficiente de cálcio, em quatro formas cristalinas, a depender da temperatura de transição. Entre 1120-1180°C há conversão de β -TCP para α -TCP. O β -TCP permite a substituição do íon cálcio por íon magnésio em sua estrutura, o que promove o aumento da temperatura de transição da fase β para a fase α , tornando-o mais estável a temperaturas acima de 1400°C (ALONSO, 2011), enquanto que em sua composição sem substituições iônicas há transição da fase α -TCP para α' -TCP. O aparecimento da fase γ -TCP só é possível sob condições de elevada pressão e a fase α' -TCP não é conhecida devido à dificuldade de preparação (GUASTALDI; APARECIDA, 2010; GOMES, 2012; PIRES et al., 2015).

As fases α e β são quimicamente idênticas, no entanto, em meio biológico, comportam-se de forma diferente. A fase β é mais usada em compostos monofásicos ou bifásicos, pois possui um maior índice de solubilidade do que a fase α e por possuir maior energia específica superficial. Os TCP podem ser obtidos por diferentes vias de síntese, o que possibilita a aquisição de TCP, com características particulares e respostas biológicas diferentes. As vias mais utilizadas para sua síntese são a via úmida e a reação de estado sólido (Tabela 1) (ALONSO, 2011). Na reação de estado sólido, o material é aquecido em temperatura superior a 1000°C. Esse aquecimento provoca um aumento no tamanho médio das partículas, o que permite a remoção de impurezas durante a síntese. (KAI, 2012)

Tabela 1 - Exemplos de vias mais utilizadas para a síntese de TCP

Métodos de obtenção do fosfato tricálcico	
	$3\text{Ca}(\text{OH})_2 + 2\text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + 6\text{H}_2\text{O}$ (Rathje, 1939) Partículas pequenas (< 1µm), cristalinidade similar aos tecidos naturais (baixa cristalinidade)
Métodos por via úmida	$3\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + 2(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 + 2\text{NH}_4(\text{OH}) \rightarrow \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + 6\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{H}_2\text{O}$ (Hayek & Newesely, 1963)
	$3\text{CaCl}_2 + 2(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 = \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + 6\text{NH}_4\text{Cl} + 2\text{H}_2\text{O}$ $3\text{CaCl}_2 + 2\text{Na}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + 6\text{NaCl}$ (Nancollas & Mohan, 1970)
	Partículas pequenas (< 10µm), cristalinidade similar aos tecidos naturais (baixa cristalinidade)
	Método idêntico à via úmida sob pressão e temperatura. Produto conformado, pó nanométrico ou milimétrico possível a obtenção de materiais com porosidade (hidroxiapatita de coral).
Reações de estado sólido	$2\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{CaCO}_3 \rightarrow \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{CO}_2 + 5\text{H}_2\text{O}$ (Monma, 1976)
	$1000^\circ\text{C} < T < 1300^\circ\text{C}$ Alta cristalinidade, controle da estequiometria, grandes quantidades, método fácil

Fonte: Alonso (2011).

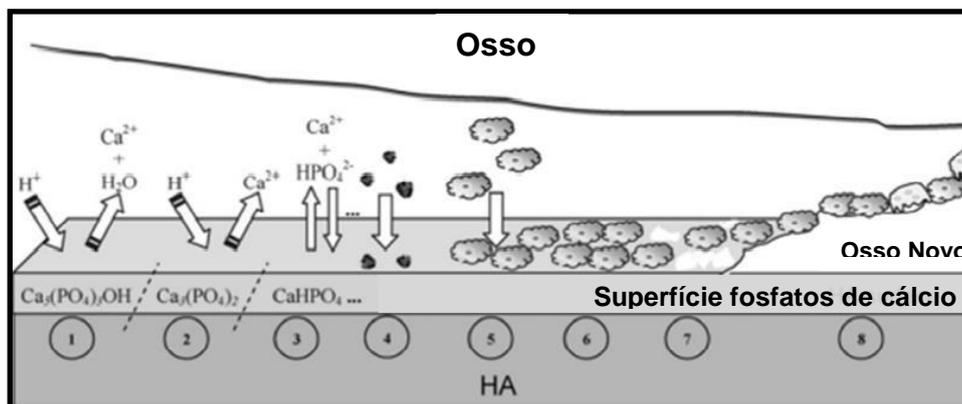
As cerâmicas TCP não são estáveis em soluções aquosas e em presença de umidade; são reabsorvidas entre 6 e 15 semanas após o implante. Isto se dá por possuírem uma maior taxa de degradação quando comparadas com a HAP. Por conta dessa característica, vem sendo associada a outras cerâmicas, como alternativa para acelerar a reabsorção destas. A sua similaridade com a porção inorgânica do osso proporciona uma tenacidade com valores próximos ao do osso cortical humano. Contudo, trata-se de um material com baixa resistência à tração e baixa propriedade mecânica, o que reduz a sua indicação para áreas de pequenos defeitos ósseos. (GUASTALDI; APARECIDA, 2010; GOMES, 2012; MOTA, 2014).

Domingues (2003) utilizou cultivo celular para verificar a toxicidade da α TCP e da β -TCP. O autor concluiu que a fase α -TCP é mais citotóxica do que a fase β -TCP. Ele atribuiu essa toxicidade ao fato do α -TCP ser mais solúvel e hidrolisar mais rapidamente em uma hidroxiapatita deficiente em cálcio, quando comparado aos outros fosfatos de cálcio. A citotoxicidade é associada à hidrólise desse material que liberaria ácido fosfórico para o meio de cultura, causando a sua acidificação, o que teria promovido a morte das células.

A solubilidade dos fosfatos de cálcio em água é uma das principais vantagens quando utilizados *in vivo*. De forma geral, a dissolução está relacionada com a razão molar Ca/P (ALONSO, 2011). Quanto maior concentração molar de cálcio, menos solúvel serão os fosfatos de cálcio. O pH é outro fator que influencia na degradação da cerâmica *in vivo*: conforme o pH diminui, mais solúvel se torna o fosfato de cálcio, pela troca iônica com o meio fisiológico (GUSTALDI; APARECIDA, 2010).

A biodegradabilidade dos fosfatos de cálcio pode ser explicada pelas propriedades físico-químicas do material, tais como, grau de solubilidade do material em diferentes pH e dos fatores biológicos, como exemplo a fagocitose. A solubilização dos cristais de fosfato de cálcio promove troca iônica com o meio intersticial, o que estimula a migração celular, adsorção de proteínas e deposição de cálcio e fósforo na forma de HAP (Figura 2) (BERTAZZO, 2007; DE AZA et al., 2014).

Figura 2 - Representação esquemática do processo de dissolução dos fosfatos de cálcio após implantação. (1 e 2) Início e continuação do processo de reabsorção. (3) Equilíbrio iônico entre implante-tecido. (4) Adsorção de proteínas. (5 e 6) Adesão e proliferação celular. (7) Deposição de HAP. (8) Osso neoformado.



Fonte: Adaptado Bertazzo (2007).

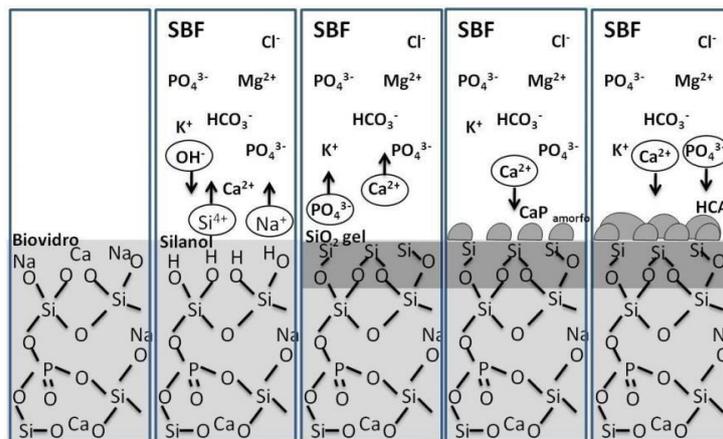
2.1.3 Vitrocerâmicas

Os vidros não apresentam ordenação atômica, portanto, são amorfos (Figura 3). Esse estado se dá pela termodinamicamente metaestável do material. A unidade

básica de um vidro de silicato é o grupo $(\text{SiO}_4)^{-4}$ e suas redes são formadas a partir da ligação desses grupos (DAGUNO, 2011).

As vitrocerâmicas são materiais inorgânicos policristalinos, contendo fase vítrea que é produzida a partir de duas fases. A primeira envolve a fusão dos átomos do material e a segunda, da cristalização do material através da nucleação e do crescimento do cristal. A natureza do cristal, desenvolvida na síntese, terá influência sobre a capacidade de reabsorção do biomaterial. O processo de biorreabsorção ocorre quando a vitrocerâmica é introduzida em fluido biológico e a superfície do biovidro sofre dissolução parcial de cálcio e fósforo e deposição de apatita em sua superfície do implante, o que promove a ligação química com o tecido ósseo (Figura 3) (DAGUNO, 2011).

Figura 3 – Representação das etapas de deposição de HAP dos biovidros em fluido biológico



Fonte: Daguno (2011)

2.2 W-TCP

O grande número de artigos relacionados com as rotas de síntese dos biomateriais tem mostrado uma profunda influência dos métodos de preparação sobre as propriedades das biocerâmicas. Entre as variáveis determinantes dessas propriedades, a estequiometria, a estrutura cristalina e a porosidade são determinantes para o comportamento biológico de tais materiais. Genericamente, o preparo de uma cerâmica sinterizada e, portanto, de uma biocerâmica, envolve 3

etapas fundamentais: (i) preparo do pó; (ii) secagem parcial do bloco conformado; e (iii) aquecimento a altas temperaturas para obtenção do bloco sinterizado (ALMEIDA, 2013).

A síntese do composto W-TCP pode ocorrer através de altas temperaturas. Uma delas ocorre quando é ele levado a altas temperaturas eutéticas; nesse processo ocorre a fusão dos componentes e produção de um sistema eutético de W-TCP. Esse sistema, então, será constituído de átomos que estão distribuídos de maneira desordenada, formando uma estrutura amorfa (DE AZA et al., 1997, 2014). Contudo, esse processo resulta na formação de espaços intrapartículas diminutos, menores do que $100\mu\text{m}$, resultando em uma matriz cuja porosidade não contribui para a migração celular e osteogênese no interior do arcabouço tridimensional (AL SALMAN, et al., 2015). Outra desvantagem dessa via de síntese é que ela necessita de várias etapas e altas temperaturas por um longo tempo (PODPORSKA et al., 2008; AL SALMAN et al., 2015).

De Aza e colaboradores (1997) desenvolveram uma cerâmica bioativa, formada por W e TCP, denominada de Bioeutectic®. Este compósito é sintetizado através de uma lenta solidificação, a uma temperatura eutética de 1500°C , por um período de quatro horas. Quando esse sistema está por volta de 1205°C , há transição de uma fase cristalina para uma fase amorfa. Ao final desse processo, obtém-se um composto binário com 60% p-W e 40% αTCP . Por elevar a wollastonita a temperaturas bem elevadas, a p-W torna-se um biovidro e se funde a $\alpha\text{-TCP}$. Sua estrutura é densa e organiza-se em colônias quase esféricas, com tamanho médio de $20\pm 5\mu\text{m}$ e diâmetro de $10\text{-}0,9\mu\text{m}$ (DE AZA et al., 2008).

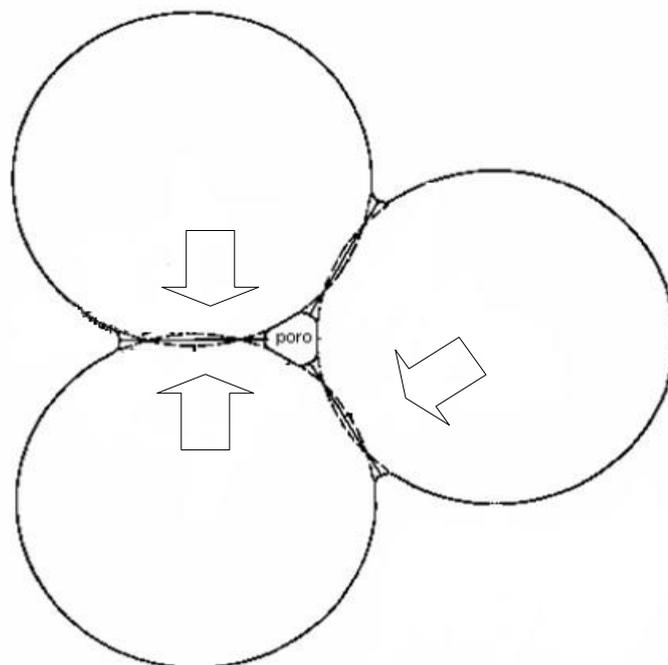
O potencial osteocondutor e a bioatividade do Bioeutectic® vêm sendo testados em diversos modelos experimentais. Foram realizados experimentos *in vitro* com cultura de osteoblastos em fluido corpóreo simulado (FCS) e saliva da glândula parótida. Esses trabalhos avaliaram as propriedades físico-químicas, bem como o potencial osteocondutor desse composto. Nos testes *in vivo*, o Bioeutectic® foi implantado em tíbia de coelhos adultos e fêmur de rato e em ambos os modelos os resultados mostraram uma rápida dissolução do αTCP em pseudoapatitas e adesão de células osteoblásticas, mediada por proteínas (DE AZA et al., 2000,2013). A principal desvantagem das TCP está relacionada à sua resistência mecânica, que é igual ou menor do que a porção esponjosa do osso, e à rápida

degradabilidade. A p-W funcionou como reforço mecânico para a α -TCP e proporcionou bioatividade ao composto, com a liberação do Si, Ca e P para o meio fisiológico (ALONSO, 2011; DE AZA et al., 2000, 2013).

Outra via de aquisição do compósito W-TCP é a sinterização, um processo de aquecimento abaixo do ponto de fusão, em condições controladas, para produzir estruturas metálicas, cerâmicas e compósitos metais-cerâmicos. Esse aquecimento, chamado de sinterização, promove a união por coalescência entre as partículas, isto é, fusão das superfícies adjacentes, estruturas cristalinas e peça sólida coerente (Figura 4) (BRITO; MEDEIROS; LOURENÇO, 2007).

A sinterização permite determinar o estado de agregação das partículas, o que possibilita a elaboração de matrizes tridimensionais, com conexões intra e interpartículas que favoreçam a osteogênese. A porosidade de um material utilizado como suporte e matriz para migração e ancoragem celular deve simular o sistema de comunicação vascular ósseo de modo que os poros cheguem na ordem do diâmetro harvesiano (50 a 250 μ m) (OLIVEIRA et al., 2007; DA SILVA et al., 2008; DE AZA et al., 2014).

Figura 4 - Ilustração da ligação por coalescências entre as superfícies dos materiais formada no processo de sinterização



Fonte: Lengler (2006)

2.3 TECIDO ÓSSEO

O osso é um tecido conjuntivo especializado, formado por matriz extracelular impregnada de cálcio e fosfato (matriz óssea) e células que produzem e regulam seu desenvolvimento. A matriz óssea atua como reservatório de cálcio e fosfato (MOREIRA, 2012).

Macroscopicamente, o osso maduro é dividido em compacto ou denso e osso esponjoso ou trabecular, característica comum a todos os tipos de ossos (GUASTALDI; APARECIDA, 2010). Microscopicamente, o osso maduro organiza-se em osso lamelar e osso não lamelar (imaturo). As lamelas são formadas lentamente com fibras colágenas, alinhadas regularmente e associadas a cristais de HAP, o que confere dureza e resistência ao osso maduro. No osso imaturo, as fibras de colágeno são dispostas de forma irregular, deixando-o mecanicamente frágil (SALGADO, 2002).

As superfícies ósseas são revestidas por membranas conjuntivas, denominadas de periósteo e endósteo, que funcionam como barreiras mantenedoras do osso. O periósteo participa da nutrição, fornece novos osteoblastos e reveste externamente o osso. Ele é constituído por fibroblastos, fibras colágenas e elásticas e células osteogênicas (SALGADO, 2002; MOREIRA, 2013). O endósteo reveste as paredes das cavidades na porção esponjosas do osso.

Quando o osso sofre alguma lesão ou fratura, o periósteo responde com intensa proliferação de seus fibroblastos e células osteogênicas. Algumas células se diferenciam em macrófagos e fagocitam restos de tecido e coágulo em regiões onde terá neoformação óssea, sendo fundamental para o processo de reparação óssea (CUNHA, 2007).

O osso é uma estrutura dinâmica e com notável capacidade regenerativa. Na fase inicial de reparação a matriz osteoide possui pequena quantidade de material inorgânico, sendo uma fase marcada pela deposição desorganizada das fibras colágenas. À medida que o processo de reparação avança, essa matriz torna-se mais mineralizada e há uma organização das fibras colágenas de uma forma seriada única, espiralada concêntrica, formando as lamelas (GUIMARÃES, 2011).

Aos 15 dias de reparação óssea, é possível observar duas fases. Na fase 1, a lesão promove alteração do metabolismo local e liberação de mediadores químicos devido à redução de irrigação sanguínea e morte celular, o que promove o desenvolvimento de um processo inflamatório de caráter agudo. Posteriormente, ocorre uma subfase celular, com aumento da permeabilidade vascular e com aumento da atividade dos fibroblastos. Nesta fase, a inflamação é caracterizada pela tentativa de remoção dos corpos estranhos e do tecido necrosado. Essa resposta é denominada de inflamação granulomatosa e é marcada pela mitose celular, com migração e ativação dos fibroblastos (BALBINO, 2013). Na fase 2, a reparação ocorre por um pico de produção das fibras colágenas pelos fibroblastos de uma forma desorganizada; essa fase pode durar de 3 a 6 semanas (BALBINO, 2013; MOREIRA, 2013).

O processo de reparação é regido por um exército celular e de fatores como: células mesenquimais, fibroblastos, fibronectinas, integrinas, fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina, osteopontina, fatores de crescimento de endotélio, fatores de crescimento derivados de plaquetas, proteínas ósseas morfogenéticas (BMP), dentre outros fatores homeostáticos (CARVALHO, 2010; ROLIM, 2010).

Quando esse equilíbrio é afetado, seja por uma lesão extensa, doença metabólica ou uma má formação congênita, esse processo de reparação óssea dá lugar um tecido conjuntivo fibroso cicatricial. A osteogênese está relacionada com o crescimento vascular, já que as paredes dos vasos e artérias são constituídas de células multipotentes que podem se diferenciar em condrócitos e osteoblastos (MONTEIRO et al., 2009).

O biomaterial deve proporcionar a construção de um arcabouço com conexões internas que promovam um meio favorável para o fluxo de células e nutrientes, assim como adesão e proliferação de células. A porosidade, assim como o tamanho de partícula, portanto, irão afetar a taxa de degradação do composto e as propriedades biomecânicas do implante (GRIFFON, 2002). Testes *in vivo* possibilitam avaliar o comportamento dos biomateriais, quando implantados no tecido, através de respostas biológicas, que são complexas por serem mediadas por resposta inflamatória e angiogênese (MONTEIRO et al., 2009).

Um modelo experimental bastante difundido e usado para avaliação da regeneração óssea é a confecção de defeito em calvária de rato. Esse sítio é

utilizado, pois tem baixa vascularização e pequena densidade de osso esponjoso; além disso, permite confeccionar defeitos ósseos de tamanhos diferentes, que podem simular defeitos extensos ou até críticos (MIGUEL, 2006; BARRETO, 2011). Ao confeccionar o defeito ósseo crítico em calvária de rato, as corticais externa e interna do osso parietal são envolvidas, o que permite um único sentido para a osteogênese, saindo das bordas do defeito ósseo até o seu centro. Por isto, a anatomia e a função da região lesada necessitam de uma estrutura que oriente a migração celular e favoreça a adesão celular. Portanto, defeitos ósseos críticos permitem avaliar as propriedades osteocondutoras e osteoindutoras de um biomaterial (ROLIM, 2010; GUIMARAES, 2011; BARRETO, 2011).

Outro fator que ganha destaque nas discussões relacionadas aos substitutos ósseos está relacionado ao tamanho e à conformação do biomaterial. Qual o melhor tamanho e formato que o material deve apresentar para que funcione como matriz apropriada para osteoconduzir a neoformação óssea? Constitui-se, portanto, em um dos grandes desafios da bioengenharia tecidual óssea desenvolver um arcabouço tridimensional (3D) que simule as condições fisiológicas para que ocorra adesão, proliferação e diferenciação celular (PODPOSKA et al., 2008).

Dentro desse contexto, os biomateriais a base de fosfato de cálcio permitem ser produzidos em diversas formas e formatos. Podem se apresentar em forma de blocos, discos, grânulos, esferas, microesferas, tubos, lâminas ou até em uma combinação deles ou ainda podem estar impregnados por células, medicamentos ou proteínas. O formato em bloco devolve altura e volume ósseo. Os grânulos apresentam tamanhos e formas diferentes, o que permite a construção de um arcabouço com espaços internos bem heterogêneos, ideais para regiões que necessitem de reconstrução óssea com paredes irregulares (BARRETO, 2011).

Associar materiais com características diferentes possibilita a construção de um arcabouço com propriedades refinadas, já que são utilizados os aspectos favoráveis individuais de cada composto para tal construção. Este arcabouço deve criar sítios que contribuam para migração, implantação, proliferação e diferenciação celular, fundamentais para a regeneração tecidual (MIGUEL, 2008).

Objetivo

3 OBJETIVO

Avaliar, após implantação *in vivo* em defeito ósseo crítico em calvária de rato, o comportamento osteogênico de um novo composto constituído de α -wollastonita e β -fosfato tricálcico para aplicação na terapia tecidual óssea.

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O compósito W-TCP foi desenvolvido e fabricado pelo Azurebio S.L. (Madrid-Espanha), por força do convênio firmado entre o Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Instituto de Cerámica y Vidrio, Madrid-Espanha, e a Universidade Federal da Bahia (UFBA).

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO W-TCP

Trata-se de um material bifásico cristalino, composto por 40% de pseudowolastonita e 60% de β - fosfato tricálcico (Figuras 5 e 6). O material foi obtido em condições de não equilíbrio, produzidas por sinterização (Figuras 6 e 7, Gráfico 1), originando fases amorfas de natureza vítrea. Esse material tem uma área superficial específica de $0,36 \pm 0,02 \text{ m}^2/\text{g}$ por grânulos, com tamanho que varia de 0,4-0,6 mm. Os grânulos foram acondicionados em tubos de vidro e encaminhados à esterilização por calor úmido (autoclave).

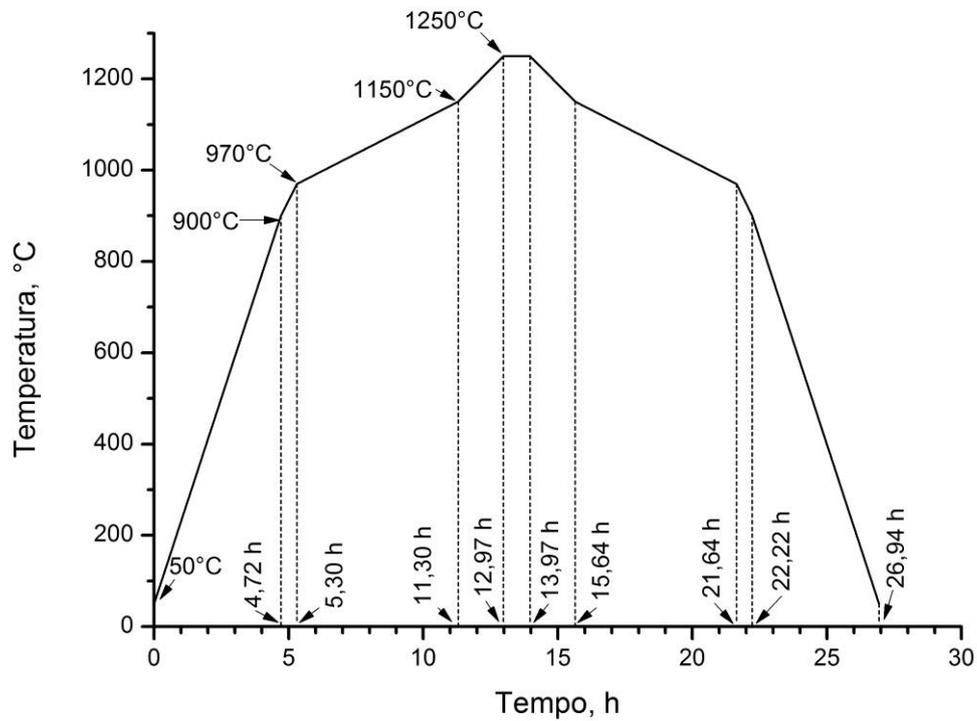
Apresenta porosidade total de 62%, porosidade intragranular de 42% e intergranular de 19%. (Gráfico 2)

Figura 5 – Armazenamento e aspecto macroscópico dos grânulos.



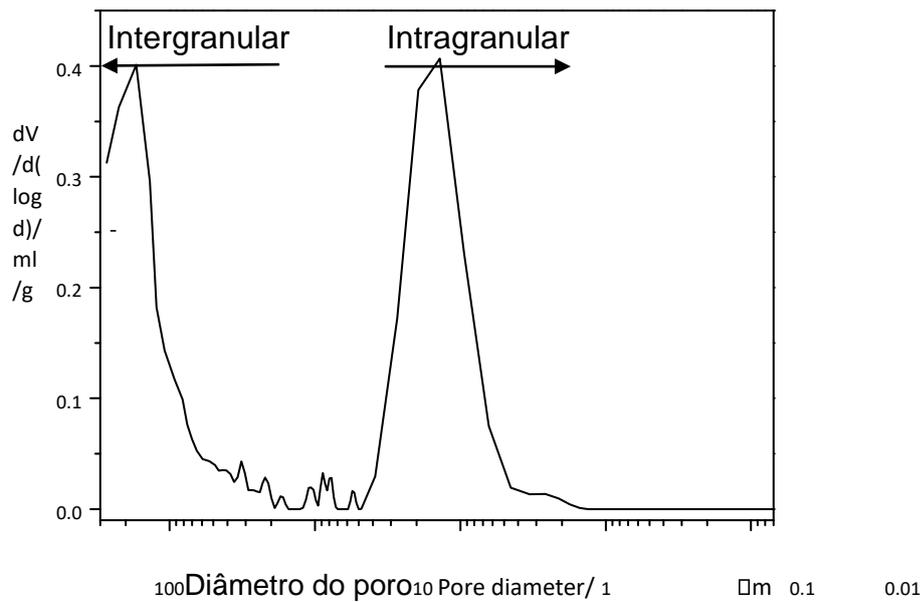
Fonte: Elaboração da autora.

1 - Gráfico de tempo e temperaturas, envolvendo a síntese do composto W-TCP.



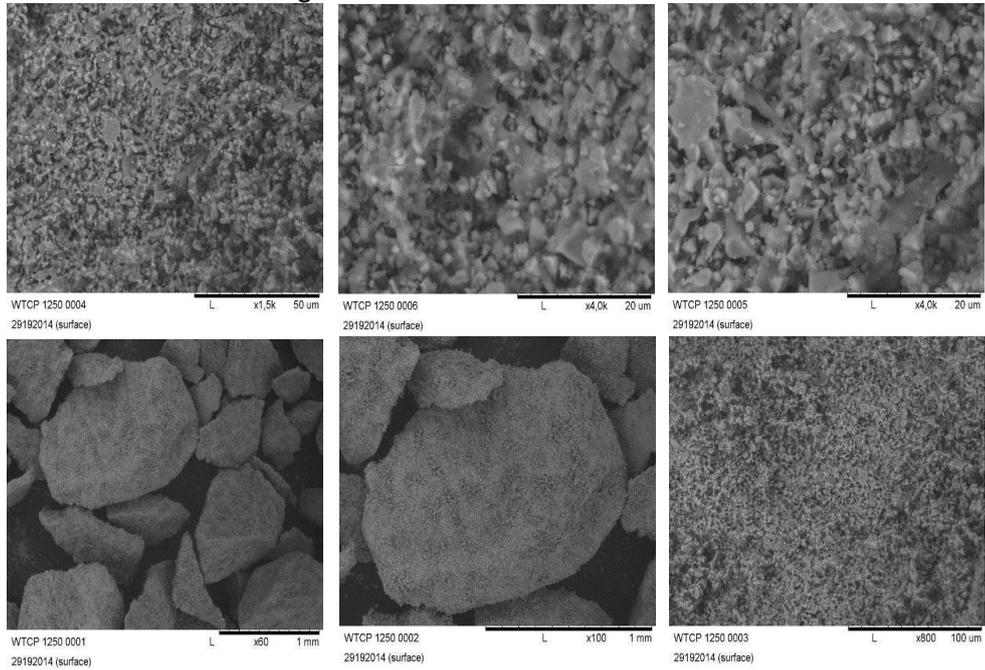
Fonte: Azurebio (2014)

Gráfico 2- Gráfico da porosidade da W-TCP

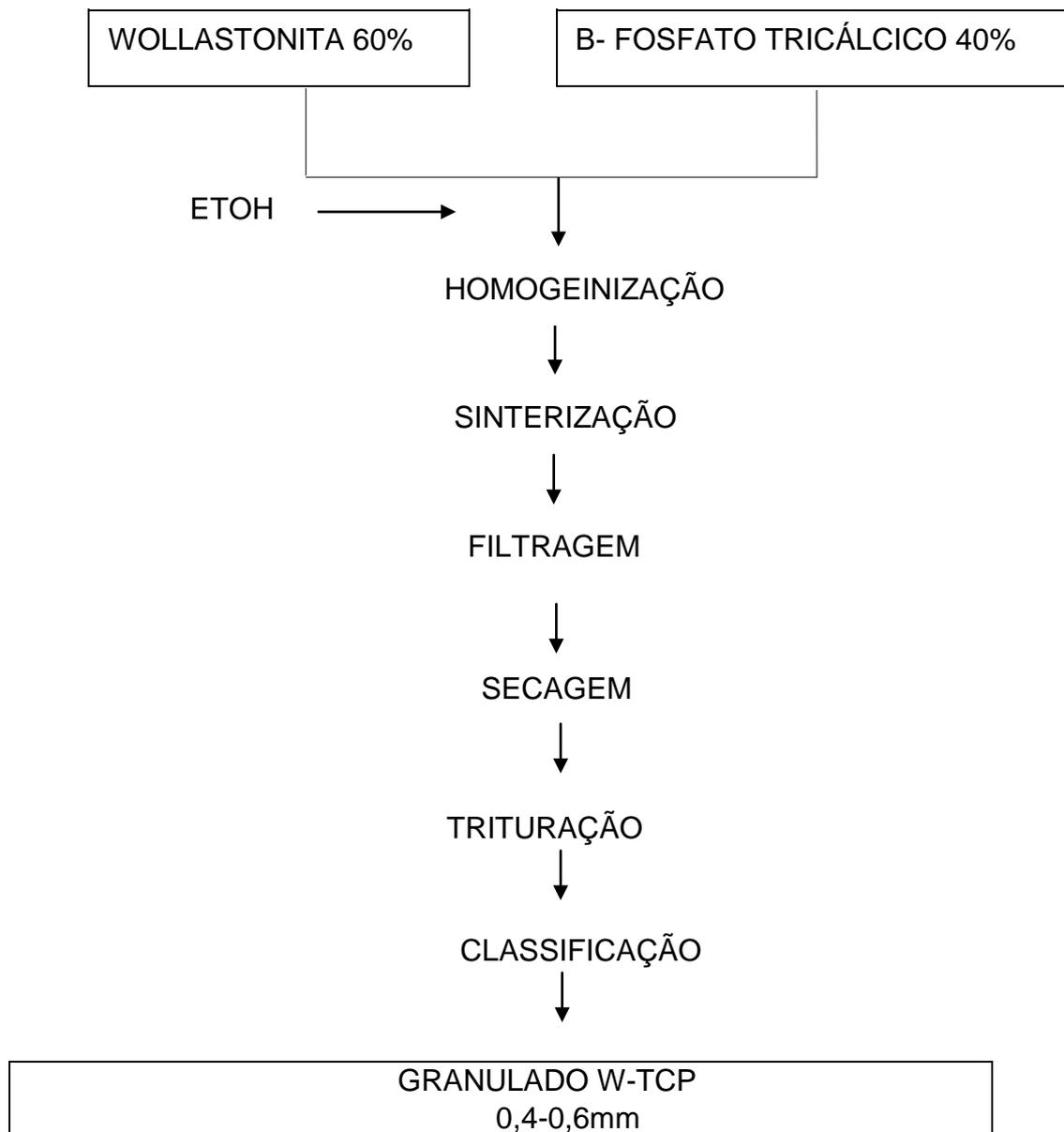


Fonte: Azurebio (2014)

Figura 6 - Sequência de fotos tirada em microscópio eletrônico de varredura (MEV) mostrando o formato e a textura superficial em diferentes tamanhos dos grânulos de W-TCP.



Fonte: Azurebio (2014)

Figura 7 - Etapas que envolvem a síntese do composto W-TCP

Fonte: Azurebio (2014)

4.2 CÁLCULO AMOSTRAL

Para o cálculo da amostra, não foram utilizados valores referências, pois se trata de um novo biomaterial não descrito na literatura, portanto, assumiu-se uma magnitude de efeito esperado (*COHEN'd*) de 1 (um) para comparação de dois (2) grupos, nível de significância de 5% e poder de 80%. Realizou-se análise de

variância de um fator para amostras independentes. Foram necessários cinco (5) animais por grupo, totalizando um número final de dez animais.

O cálculo amostral foi realizado utilizando o *pacote pwr: Basic function for power analysis* (versão 1.11, de Stephane Champely, 2012), do programa *R: a language and environment for statistical computing and graphics* (versão 3.0.2, 25/09/2013, Vienna, Austria, da R Core Team).

4.3 AMOSTRA

Para realização deste projeto, foram utilizados 20 ratos da linhagem *Wistar*, machos adultos, com massa corpórea entre 350 e 400g e idade aproximada de 4 a 5 meses, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em caixas plásticas autoclavadas, forradas com maravalha; alimentados com ração Nuvital[®] (CR-1) e água *ad libitum*. As caixas plásticas foram identificadas conforme o grupo experimental e ponto biológico. Na ficha de identificação, constavam massa corporal do animal, data da cirurgia e do sacrifício e nome do pesquisador responsável.

Os animais foram distribuídos, randomicamente, em dois grupos experimentais, avaliados aos 15 e 45 dias de pós-operatório:

GW – Defeito ósseo preenchido com W- TCP;

GCV (grupo sem biomaterial) – Defeito ósseo sem implantação dos biomateriais, com defeito ósseo preenchido com coágulo.

Quadro 2 – Número de animais de acordo com o grupo e ponto biológico.

Grupos	Ponto Biológico	15 dias	45 dias	TOTAL
Grupo W- TCP (GW)		5	5	10
Grupo Controle (GCV)		5	5	10
TOTAL		10	10	20

Fonte: Elaborado pela autora.

4.4. ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal da Bahia (UFBA), com número de protocolo 078-2015 e aprovação seguindo as Normas Éticas de Pesquisas em Animais (Lei nº. 11.794 de 2008), bem como foram observadas as Normas Nacionais de Biossegurança e as diretrizes do Instituto Nacional de Saúde para o cuidado e uso de animais de laboratório (NIH Publicação n° 85-23, Rev. 1985).

4.5. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Biotério da UEFS, sob a supervisão dos professores Fabiana Paim e Fúlvio Miguel, do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais (LBTB), e do médico veterinário Orestes Paixão.

Inicialmente, os animais foram submetidos à sedação e anestesia geral por injeção intramuscular de cloridrato de xilazina¹ (0,04mL/100g de peso corporal) e cloridrato de quetamina² (0,1mL/100g de peso corporal), respectivamente. Por conseguinte, foram posicionados em decúbito ventral, tricotomizados na região da calvária e submetidos à antissepsia do campo operatório, com álcool iodado.

A técnica cirúrgica empregada na confecção do defeito foi a mesma descrita por Barreto (2011) e Miguel e colaboradores (2006, 2013). Nessa técnica, o acesso cirúrgico foi obtido na porção mediana da calvária, com uma incisão cutânea semilunar, medindo aproximadamente 3 cm de extensão, com utilização de lâmina de bisturi nº 15; seguida da exposição do periósteo e sua remoção para exposição do tecido ósseo (Figura 9).

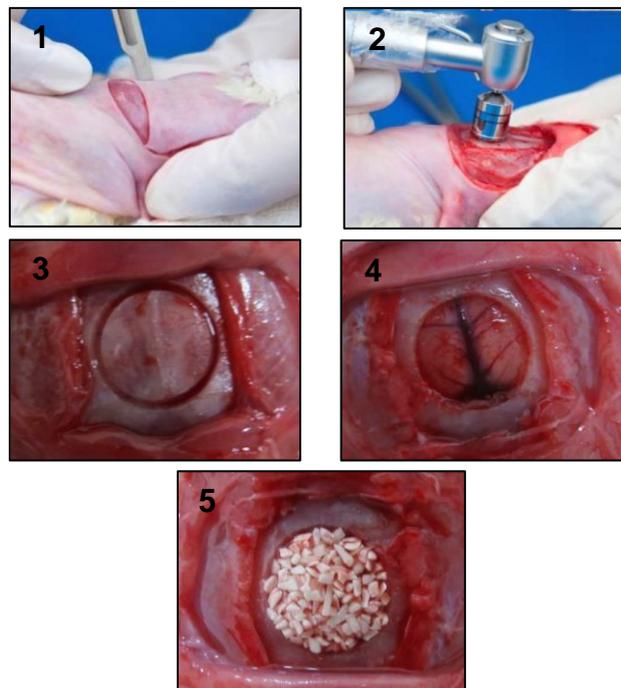
Posteriormente, o defeito ósseo circular crítico transfixado, com aproximadamente 8,5 mm de diâmetro, foi confeccionado na porção mediana da calvária, a partir do vértice da sutura craniana posterior (Figura 10). Para tanto, foi utilizada uma fresa trefina (Dentoflex[®]) com 8,0 mm de diâmetro, montada em contra-ângulo (Driller[®]) com redução de 16:1, acoplada em motor para implante (Driller[®]), a 1500 rpm, sob irrigação constante com solução fisiológica. O defeito

¹ Anasedan®, AGRIBRADS BRASIL Ltda- http://www.vetbrands.com.br/bulas/Bula_Anasedan.pdf

² Dopalen®, AGRIBRADS BRASIL Ltda- http://www.vetbrands.com.br/bulas/Bula_Dopalen

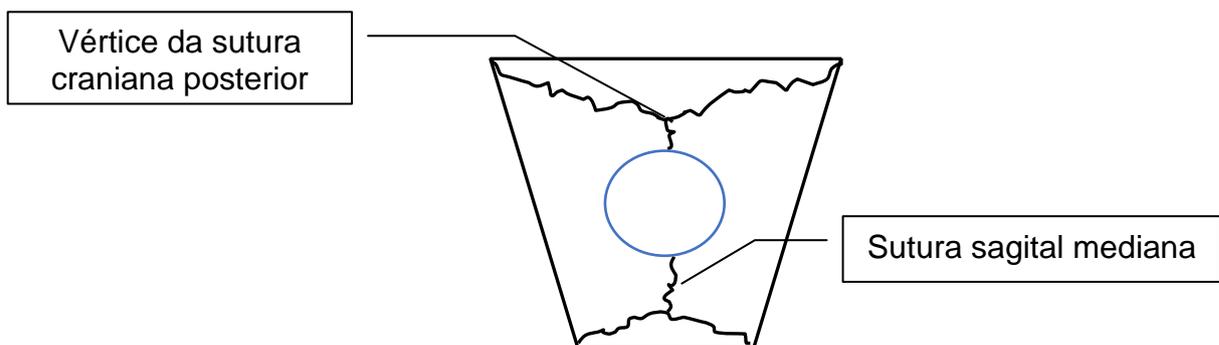
alcançou aproximadamente 8,5mm de diâmetro, pois as paredes da broca trefina têm 0,25mm de espessura em cada lado, totalizando 0,5mm. Após confecção do defeito ósseo, o biomaterial foi implantado na região, seguido de reposicionamento do retalho e sutura com pontos interrompidos do tecido mole (Figura 9).

Figura 8 - Principais etapas cirúrgicas: (1) Incisão do tecido. (2) Confecção do defeito ósseo com fresa trefina. (3) Demarcação do defeito ósseo. (4) Remoção da tampa óssea. (5) Implantação do biomaterial.



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 9 - Esquema da região anatômica onde o defeito ósseo crítico é realizado.



Fonte: Elaborado pela autora

4.6. ETAPA LABORATORIAL

4.6.1 Processamento histológico

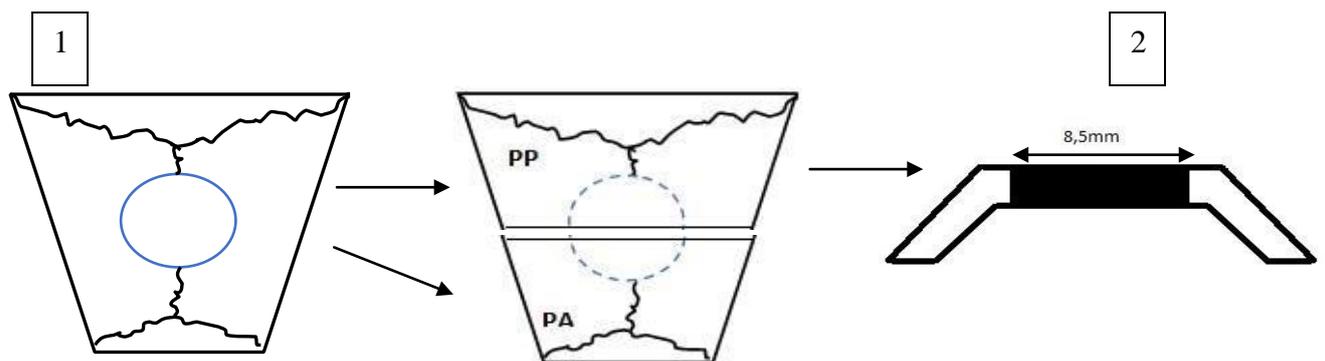
Completados os 15 dias de pós-operatório, os animais foram sacrificados, com dose letal de anestésico injetável, e a calvária foi removida. Os espécimes foram fixados em formaldeído tamponado a 4%³, por 72 horas, seccionados ao meio, obtendo a porção anterior e a posterior (Figura 11). A porção posterior foi descalcificada com EDTA a 5%⁴, por 7 dias, e depois foi incluída em parafina.

A porção anterior permanece em formol para ser emblocada em resina.

Cada espécime foi, então, cortado em 5µm de espessura e corado com Hematoxilina-Eosina (HE), Picrossírius-Red (PIFG) e Tricrômico de MassonGoldner (Goldner), para a análise histológica por microscopia de luz comum.

Esta etapa foi realizada no Instituto de Patologia Geral e Cutânea (IPAC) S/C 54 LTDA.

Figura 10 – Ilustração da calvária com o defeito ósseo (1), divididas nas porções posterior (PP) e porção anterior (PA). Corte transversal da porção posterior do defeito ósseo utilizada na análise histológica (2).



Fonte: Elaborado pela autora

³ Composição do formol 4%: 4g de fosfato monofásico, 6,5 de fosfato de sódio bifásico e 100ml de água destilada.

⁴ Composição de EDTA 5% para um 1 litro: 50g EDTA, 8,5g cloreto de sódio e 100ml de água destilada

4.6.2 Análise histomorfológica

Os cortes foram analisados por microscopia de luz comum, a partir dos seguintes parâmetros: (1) matriz neomineralizada em relação à área seccional total do defeito; e (2) constituintes celulares da matriz óssea neoformada mineralizada. Para isto, foi utilizado microscópio de luz comum (DM1000, Leica®, Wetzlar, Germany), com câmera digital DFC 310 FX (Leica®, Wetzlar, Germany), utilizando-se o Sistema de Análise de Processamento de Imagens QWin 3.1 (Leica®, Wetzlar, Germany). A análise morfológica foi realizada com auxílio do patologista Dr. Aryon de Almeida Barbosa Júnior

Resultados

5 RESULTADOS

Observou-se, nos pontos biológicos de 15 dias de pós-operatório, em ambos os grupos, neoformação de matriz osteoide reacional, a partir das bordas do defeito ósseo e em direção centrípeta (Figuras 12 e 13). No GW, aos 45 dias, a deposição osteoide estendeu-se além das bordas ósseas, em direção ao centro, associada e em torno das partículas do biomaterial (Figura 14) e com deposição osteoide visível no centro do defeito ósseo (Figura 15). Na coloração PIFG, aos 45 dias no GW, é possível distinguir matriz osteoide madura e densa da matriz neoformada e imatura (Figura 16).

No GCV, aos 15 e 45 dias, o defeito foi todo preenchido por tecido conjuntivo fibroso, com espessura inferior ao osso remanescente (Figuras 17 e 18)

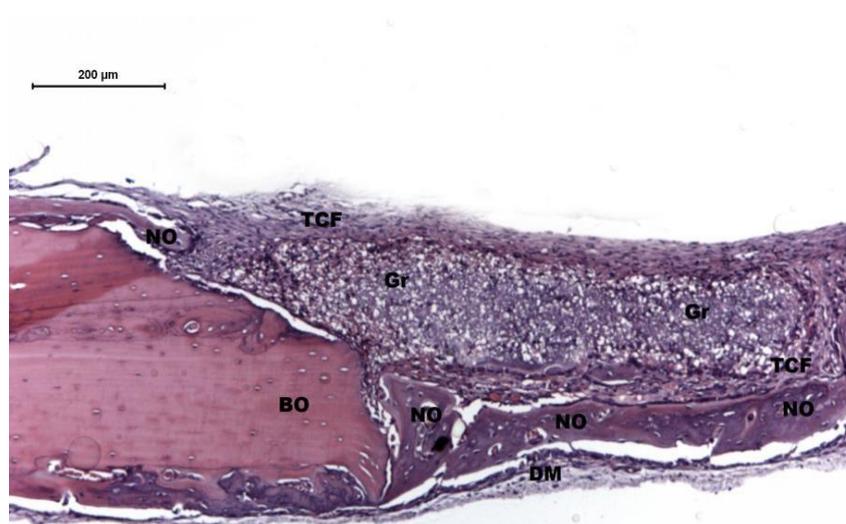
Em ambos os grupos, aos 15 dias, houve discreto infiltrado inflamatório mononuclear, distribuído ao longo do reparo.

Tanto aos 15 quanto aos 45 dias, os grânulos do biomaterial ocuparam toda a extensão do defeito, dispostos em mono, dupla ou tripla camada (Figuras 19 e 20). Em ambos os pontos biológicos, os grânulos foram vistos em diferentes tamanhos, com aspecto discretamente basofílico (Figuras 21 e 22), reticulado, no centro e, por vezes, circundados por osteoblastos (Figura 23). Contudo, aos 45 dias, notou-se que os grânulos apresentaram menor diâmetro e foram substituídos ora por tecido conjuntivo, ora por matriz osteoide (Figura 22).

Observou-se aos 15 dias, no GW, que ao redor das partículas do biomaterial e nas regiões do defeito voltadas para a dura-máter e para o retalho formou-se tecido conjuntivo frouxo, discretamente edemaciado, com brando infiltrado inflamatório mononuclear e proliferação de capilares sanguíneos (Figura 24).

Aos 15 dias, no GW, observaram-se partículas do biomaterial, associadas e circundadas por discreta reação inflamatória granulomatosa (Figura 25). Aos 45 dias, notou-se inflamação granulomatosa acentuada, com predomínio de células gigantes multinucleadas e macrófagos ao redor dos grânulos, e em menor quantidade linfócitos de permeio ao biomaterial (Figura 26).

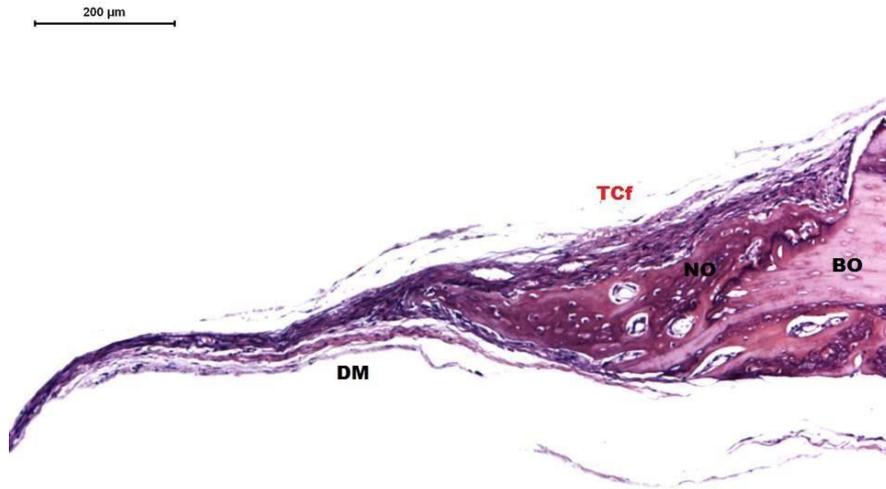
Figura 11 - GW: Matriz osteoide restrita as bordas do defeito ósseo aos 15 dias.



Fonte: Elaboração da autora (2015).

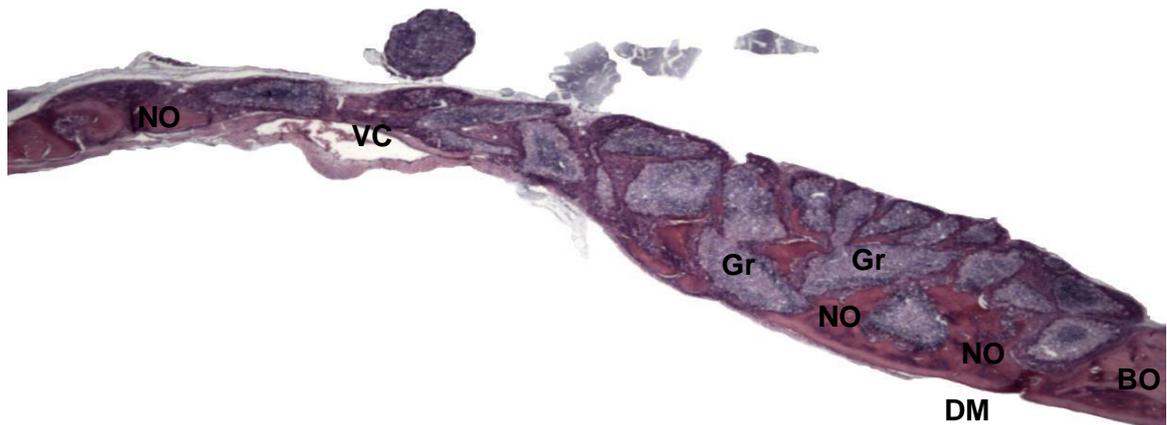
Legenda: Matriz osteoide reacional (NO). Borda óssea (BO). Grânulos (Gr). Tecido conjuntivo frouxo (TCf). Dura-máter (DM). 10X. (coloração HE)

Figura 12 - GCV: Matriz osteoide restrita às bordas do defeito ósseo aos 15 dias



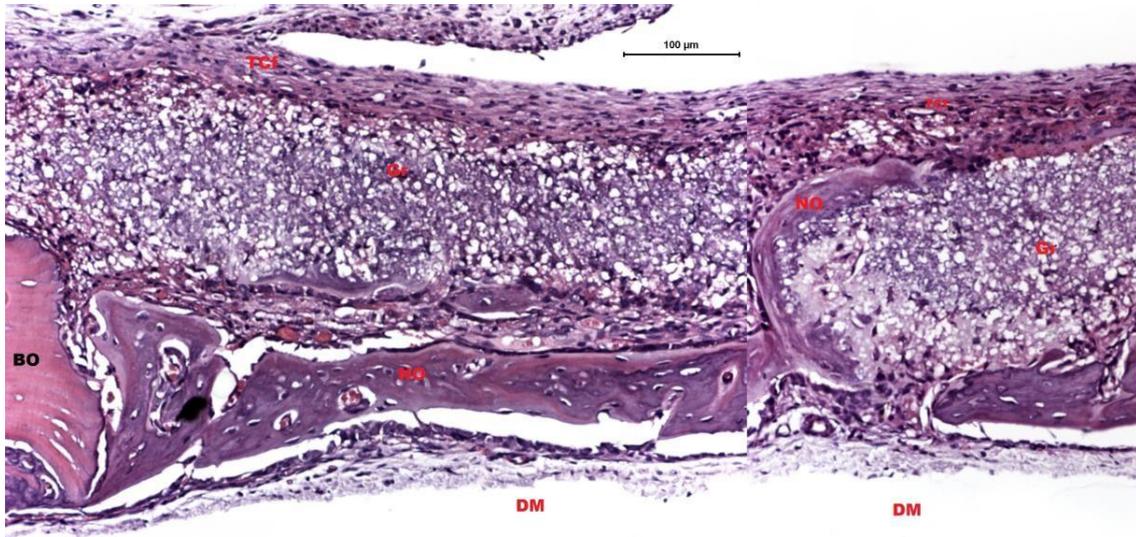
Fonte: Elaboração da autora (2015).

Figura 13 - GW: Matriz osteoide depositada ao redor do grânulo aos 15 dias.



Fonte: Elaboração da autora (2015).

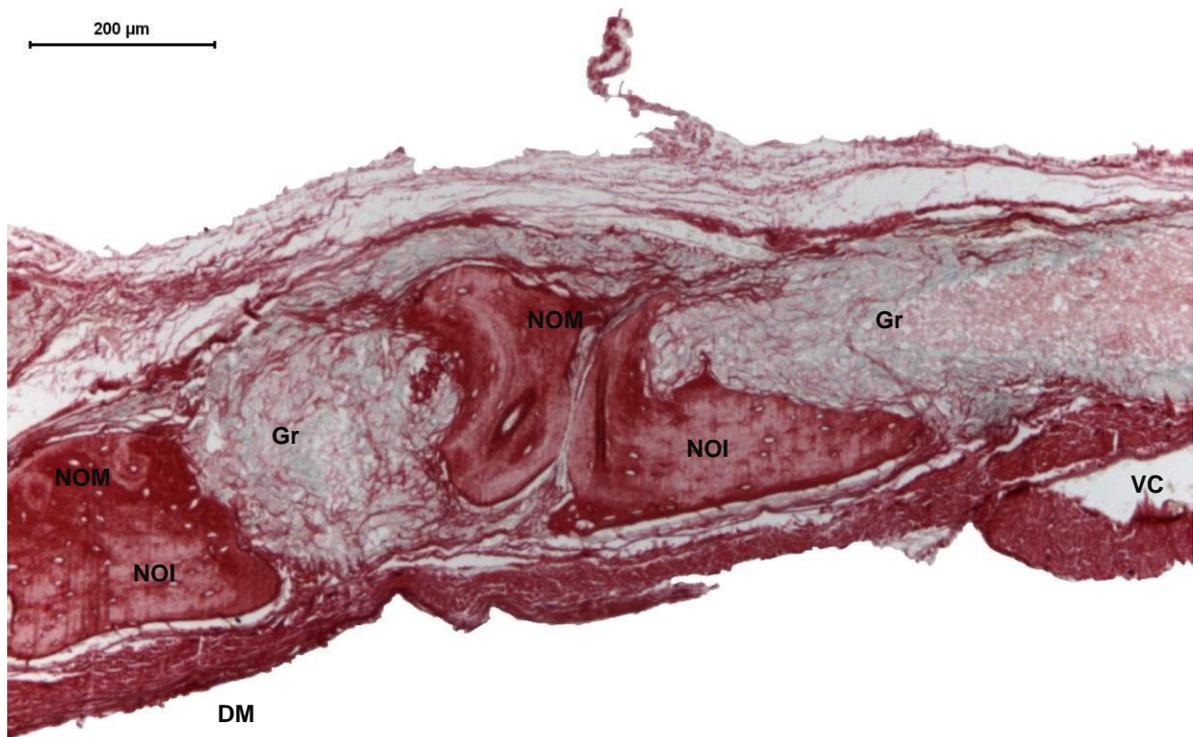
Figura 14 - GW: Matriz osteoide no centro do defeito ósseo e de permeio aos grânulos aos 45 dias.



Fonte: Elaboração da autora (2015).

Legenda: Matriz osteoide reacional (NO). Borda óssea (BO). Grânulos (Gr). Tecido conjuntivo frouxo (TCf). Dura-máter (DM). 10X. (coloração HE)

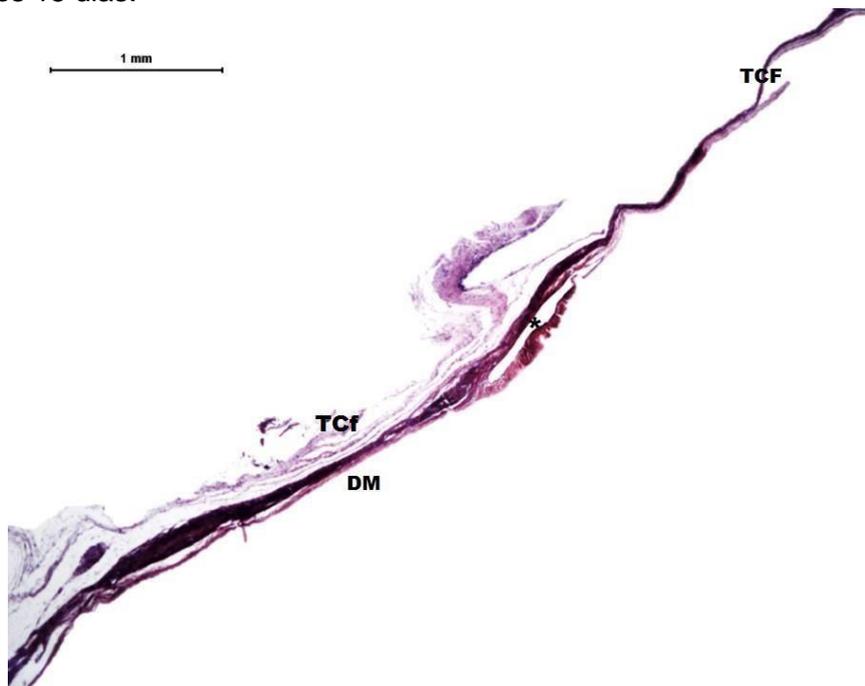
Figura 15 - GW: Matriz osteoide em diferente grau de maturação aos 45 dias.



Fonte: Elaboração da autora (2015).

Legenda: Matriz osteoide madura (NOM). Matriz osteoide imatura (NOI). Grânulos (Gr). Veia central (VC). Dura-máter (DM), 10X. (coloração PIFG)

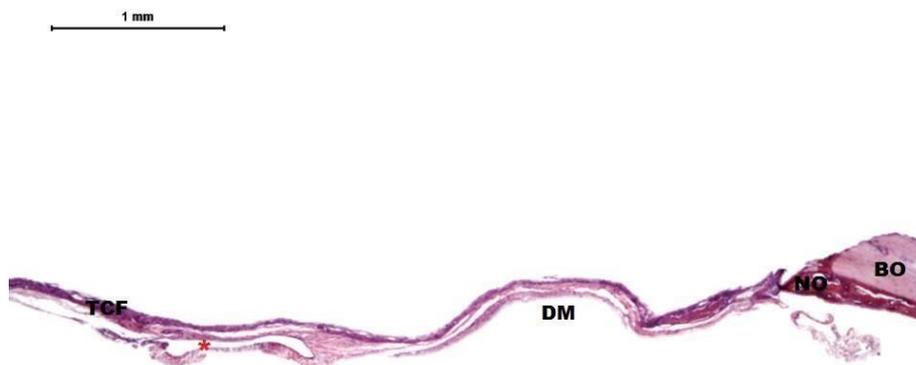
Figura 16- GCV: Preenchimento do defeito ósseo por tecido conjuntivo fibroso aos 15 dias.



Fonte: Elaboração da autora (2015).

Legenda: Borda óssea (BO). Tecido conjuntivo fibroso (TCF). Veia central (*). Dura-máter (DM). 2,5X. (coloração HE)

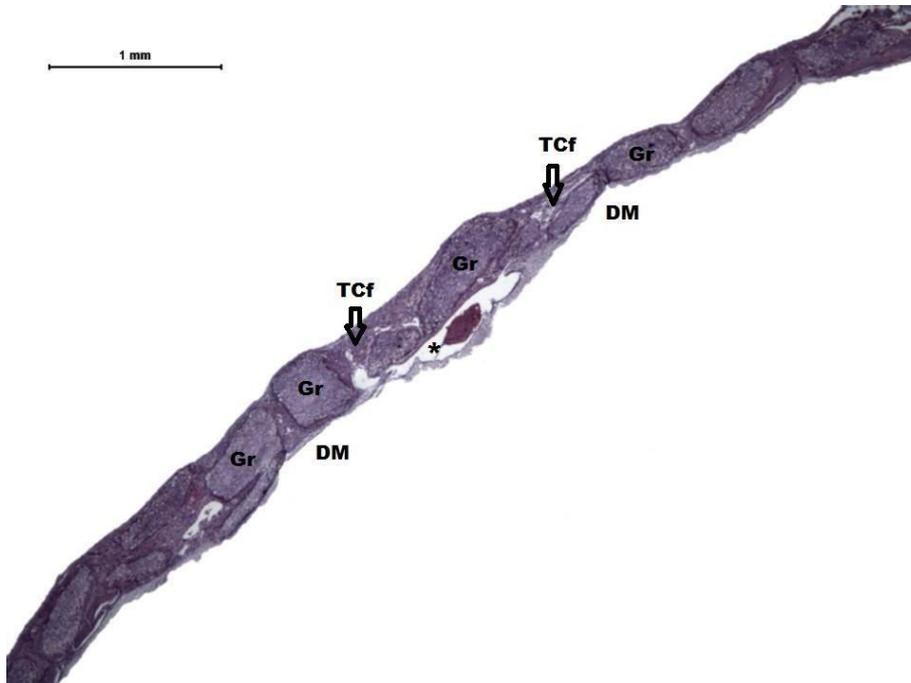
Figura 17 - GCV: Preenchimento do defeito ósseo por tecido conjuntivo fibroso aos 45 dias.



Fonte: Elaboração da autora (2015).

Legenda: Borda óssea (BO). Tecido conjuntivo fibroso (TCF). Veia central (*). Dura-máter (DM). 2,5X. (coloração HE)

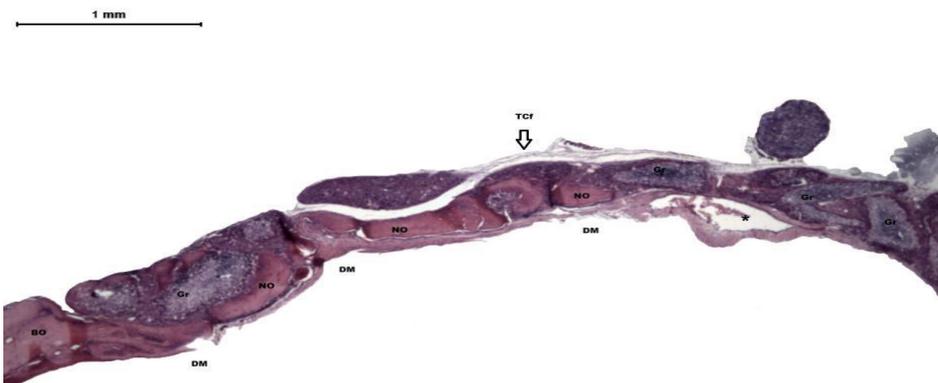
Figura 18 - GW: Distribuição dos grânulos ao longo do defeito aos 15 dias.



Fonte: Elaboração da autora (2015).

Grânulos (Gr). Tecido conjuntivo frouxo (↓). Dura-máter (DM). Veia central (*). 2,5X. (coloração HE)

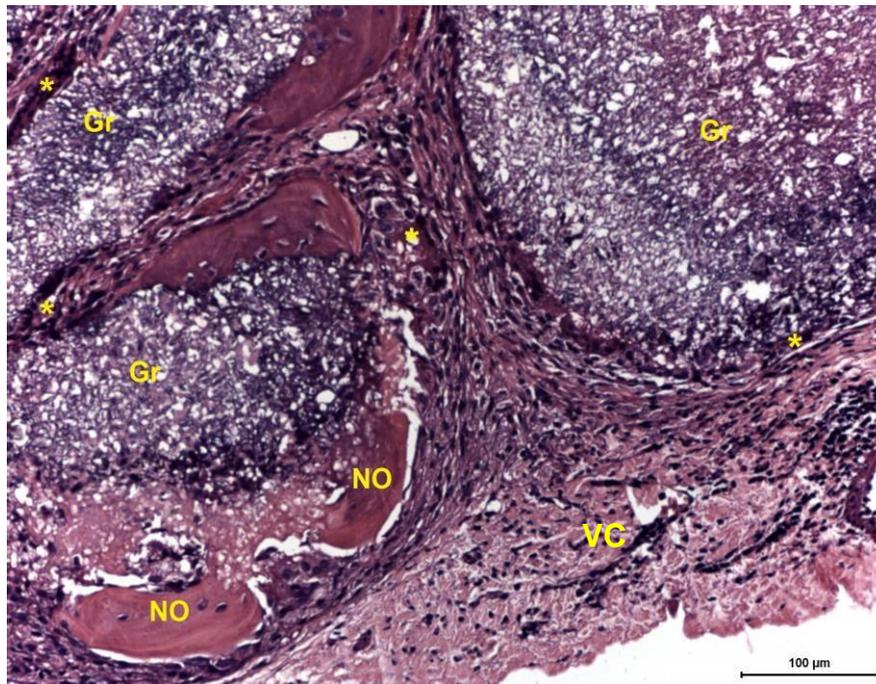
Figura 19 - GW: Distribuição dos grânulos ao longo do defeito aos 45 dias.



Fonte: Elaboração da autora (2015).

Legenda: Grânulos (Gr). Tecido conjuntivo frouxo (↓). Dura-máter (DM). Veia central (*). 2,5X. (coloração HE)

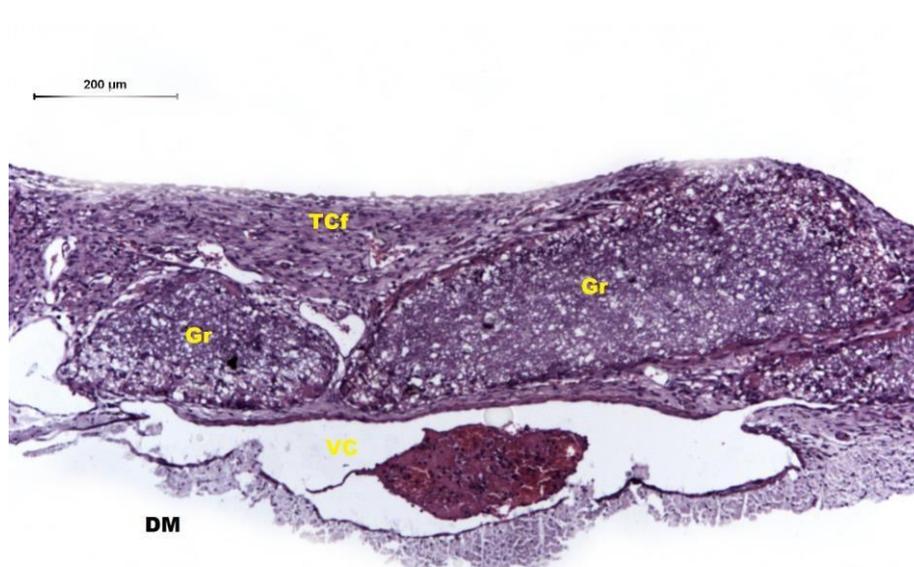
Figura 20- GW: Aspecto dos grânulos no centro do defeito aos 15 dias



Fonte: Elaboração da autora (2015).

Legenda: Grânulos (Gr). Tecido conjuntivo frouxo (TCff). Dura-máter (DM). Veia central (VC). 10X. (coloração HE)

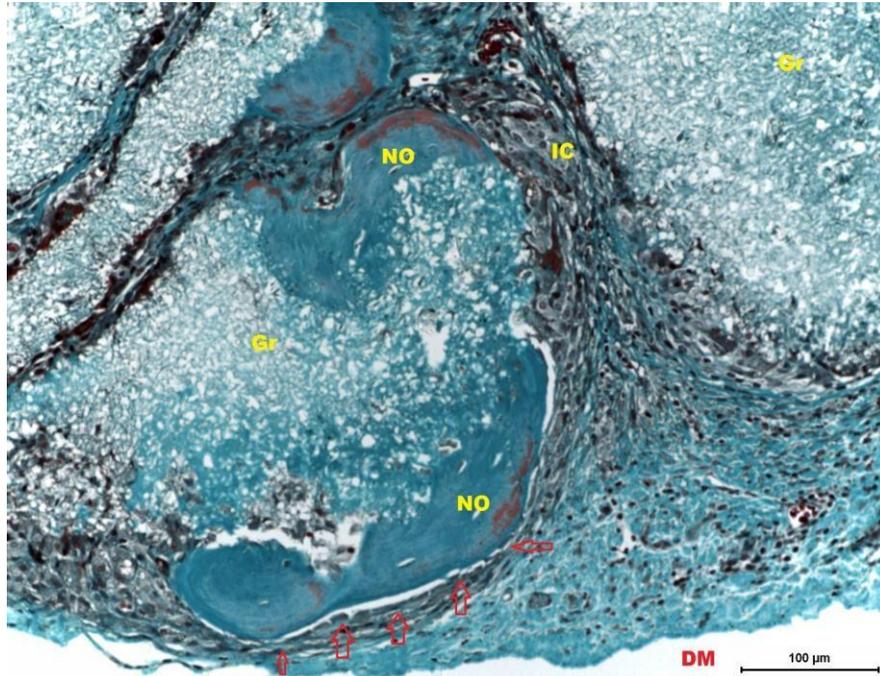
Figura 21- GW: Aspecto dos grânulos centro do defeito e inflamação crônica aos 45 dias.



Fonte: Elaboração da autora (2015).

Legenda: Grânulos (Gr). Matriz osteoide (NO). Tecido conjuntivo frouxo (TCf). Célula gigante multinucleada (*). Dura-máter (DM). Veia central (VC). 10X. (coloração HE)

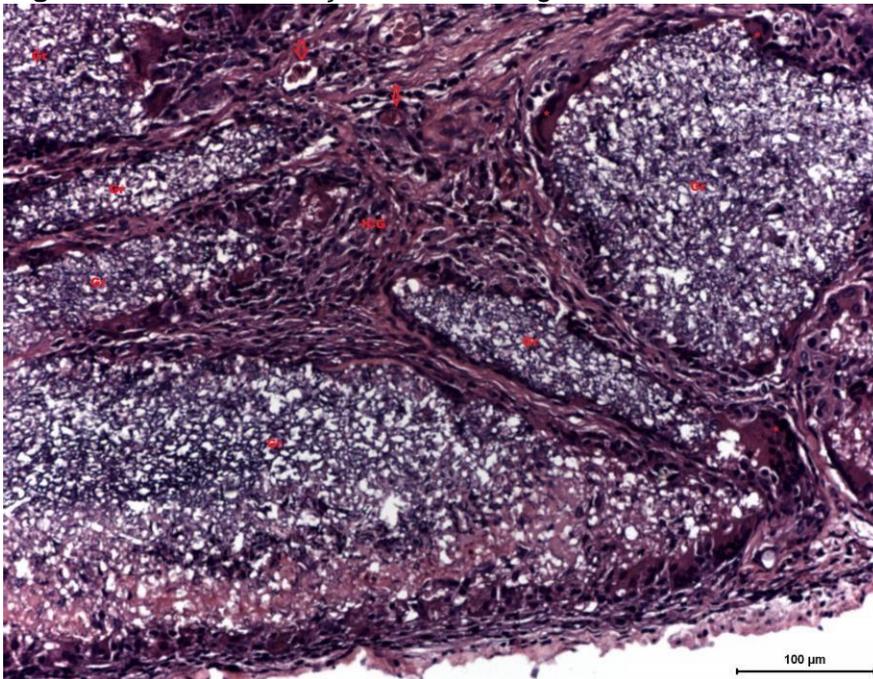
Figura 22- GW: Grânulo no centro do defeito ósseo circundado por osteoblastos aos 45 dias.



Fonte: Elaboração da autora (2015).

Legenda: Grânulos (Gr). Inflamação crônica (IC). Matriz osteoide (NO). Dura-máter (DM). Osteoblastos (□). 20X. (coloração Goldner)

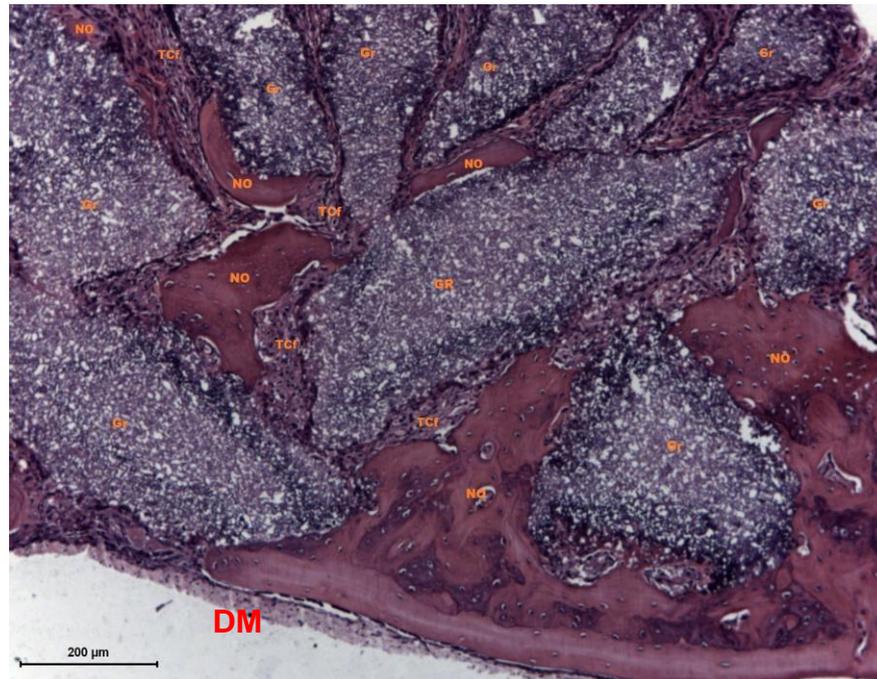
Figura 23 - GW: Presença de vasos sanguíneos aos 45 dias.



Fonte: Elaboração da autora (2015).

Grânulos (Gr). Vasos sanguíneos (V). Inflamação crônica granulomatosa (ICG). 20X. (coloração HE)

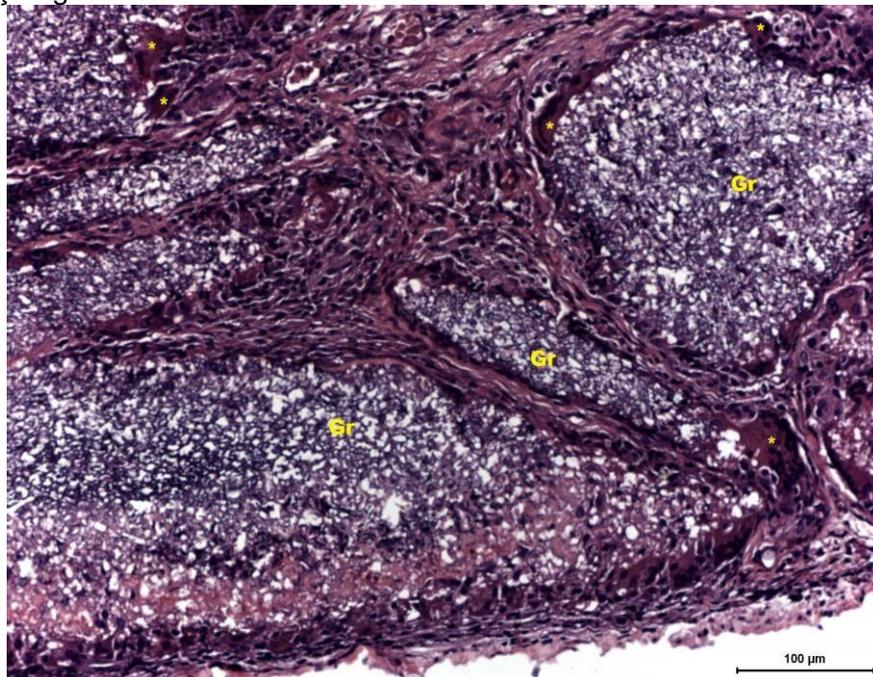
Figura 24 - GW: Grânulos no centro do defeito ósseo circundados por tecido conjuntivo frouxo aos 45 dias.



Fonte: Elaboração da autora (2015).

Legenda: Grânulos (Gr). Matriz osteoide (NO). Tecido conjuntivo frouxo (TCf). Dura-máter (DM). 10X. (coloração HE)

Figura 25- GW: Grânulos no centro do defeito ósseo circundados por inflamação granulomatosa aos 45 dias.



Fonte: Elaboração da autora (2015).

Legenda: Grânulos (Gr). Célula gigante multinucleada (*). 20X. (coloração HE)

Discussão

6 DISCUSSÃO

Na área da bioengenharia tecidual, os pesquisadores têm tentado desenvolver biomateriais que atuem como arcabouço para regeneração óssea, com o objetivo de torná-los alternativas efetivas para o tratamento de tecidos e/ou órgãos que necessitam de reestabelecimento funcional e/ou estético (TEDEJA, 2004). Dentre os diferentes materiais utilizados nas últimas décadas, a associação da p- W com o β -TCP, utilizada neste estudo, vem sendo uma das estratégias desenvolvidas para formar compostos com biocondutibilidade e biodegradabilidade aprimoradas, propriedades promissoras para a regeneração óssea.

Com relação à inflamação crônica do tipo granulomatosa presente no GW, aos 15 e 45 dias, pode-se dizer que este composto foi biocompatível, uma vez que a resposta inflamatória desenvolvida no período foi de baixa intensidade e sem produção de exsudato purulento, sem aumento de volume exacerbado e sem proliferação de neutrófilos. Durante esse período, as células gigantes multinucleadas foram predominantes no meio intersticial circunjacente aos grânulos do arcabouço, o que sugere intensa atividade celular. Ao implantar um biomaterial, espera-se uma resposta inflamatória local, devido ao rompimento de vasos sanguíneos em decorrência da lesão tecidual. Desta forma, a biocompatibilidade do biomaterial influencia na intensidade e no tipo de resposta inflamatória. Em um estudo realizado por Gaspar e colaboradores (2009), foi possível observar ausência de qualquer tipo de resposta inflamatória após ser implantado um composto formado por TCP e β W, em diferentes concentrações (5 e 15%), em tibia de rato aos 7, 30 e 120 dias.

A organização, o tamanho e o formato dos grânulos, no defeito ósseo, permitiram a disposição das partículas, em sua maioria, em mono ou dupla camada, com formação de interconexões e porosidade que contribuíram para a osteogênese e para a neoangiogênese em uma fase inicial da reparação, ao visualizar deposição de matriz osteoide nas bordas do defeito, aos 15 dias, e em uma fase mais tardia, aos 45 dias, formação de matriz osteoide, ao longo de todo o defeito.

Resultados similares foram encontrados no estudo realizado por Gaspar e colaboradores (2009), quando implantaram um composto formado por TCP/ β -W. Após 7 dias de implantação, as duas formulações obtiveram intensa angiogênese e atividade osteoblástica. Teremoto e colaboradores (2005) avaliaram a porosidade das matrizes formadas por composto, conteúdo W e TCP, e concluíram que o

arcabouço formado por W e TCP formou poros que favoreceram a osteocondução e angiogênese. Sendo assim, a porosidade formada no arcabouço pela distância entre as superfícies do biomaterial é um fator que influencia na migração celular para o interior da matriz. Contudo, os estudos são bem divergentes em relação ao tamanho que esses poros devem apresentar. Por outro lado, são unânimes em relatar que essa distância deve pelo menos simular a porção cortical do osso (OLIVEIRA et al., 2007; DA SILVA et al., 2008).

A discreta produção de tecido conjuntivo frouxo, apresentada em ambos os pontos biológicos, 15 e 45 dias, no GW, está também relacionada com as características e a distribuição dos grânulos no defeito ósseo, uma vez que os formatos entre os grânulos não são homogêneos e os espaços formados entre eles são diferentes, o que influencia na quantidade de vasos e de células no interstício. Resultados similares foram observados em estudo desenvolvido por De Aza e colaboradores (2014), com implantação de grânulos de W/ α -TCP (Bioeutectic®) em tibia de coelho. Após 4 semanas, eles observaram a formação de uma camada de matriz osteoide, com discreta formação de tecido conjuntivo frouxo.

O fato de os grânulos preencherem todo o defeito ósseo, no GW, com aparência reticular, sugestiva de processo de degradação, aos 15 e 45 dias, está relacionado com a alta solubilidade da W e da β -TCP. Alguns grânulos apresentaram, em seu interior, septos fibrosos em meio ao processo de degradação. Isso pode ter ocorrido pelo fato de a superfície desse composto apresentar alta porosidade que aumenta a reatividade superficial do biomaterial no interstício. Alguns trabalhos avaliaram o tempo da biodegradabilidade do TCP associado, ou não, com a W. Kawachi (2000) relatou, em seus resultados, que o TCP pode ser parcialmente reabsorvido em um período de 6 a 15 semanas, enquanto Egli e colaboradores (1988) mostraram que essa degradação ocorre entre de 3 a 6 semanas. Teramoto e colaboradores (2005) avaliaram um composto, contendo W-TCP e β -TCP implantados em tibia de coelho, e os resultados apresentaram rápida degradação dos grânulos de β -TCP, o que não favoreceu a formação de nova matriz óssea. Já W-TCP apresentava taxa de reabsorção mais gradual do que β -TCP e houve uma densa formação de matriz osteoide. No referido estudo, concluiu-se que a associação da W com TCP resultou em uma cerâmica bioativa com melhor biodegradabilidade do que quando implantada isoladamente.

A formação de matriz osteoide esteve presente em ambos os pontos biológicos deste estudo, mas aos 45 dias observou-se densa deposição osteoide, inclusive na região central do defeito. Alguns trabalhos desenvolvidos por De Aza e colaboradores (2014) inseriram p-W/ α -TCP (Bioeutectic®) em defeito crítico em tíbias de coelho, durante 15 meses. Esses autores constataram que os osteoblastos migraram para a interface e colonizaram a superfície do biomaterial, com deposição de camada de hidroxiapatita sobre as superfícies. Em outro estudo, De Aza, Guitian e De Aza (1997) avaliaram o potencial osteocondutor da Bioeutectic® em fluido biológico simulado (FBS). Nesse estudo, eles relatam que os espaços deixados pela liberação da sílica foram preenchidos pelo FBS, o que resultou na precipitação e nucleação de HAP, na superfície do implante.

A pequena produção de matriz osteoide restrita às bordas do defeito e a reparação total do defeito, por um delgado tecido conjuntivo fibroso, observada no GCV, aos 15 e 45 dias, estão relacionadas à falta de uma estrutura que possibilite a migração de células e que funcione com meio de suporte para as células e difusão de nutrientes, resultante de um defeito com grande perda de estrutura óssea. A matriz osteoide restrita às bordas é decorrente da vascularização da dura-máter próxima das bordas do defeito ósseo e dos fatores de crescimento liberados na região, após as lesões vascular e tecidual e pela dura-máter. Esses achados são compatíveis com o trabalho desenvolvido por Almeida (2013) durante a avaliação da biocompatibilidade e biofuncionalidade de grânulos de 2 -TCP e 2 -TCP/biovidro. Nesse experimento, foi utilizado, para efeito comparativo, um grupo onde o defeito ósseo crítico foi preenchido somente por coágulo. Notaram que os defeitos ósseos críticos em calvária de rato, aos 15 dias, tiveram o preenchimento total do defeito por tecido conjuntivo fibroso. Além desse trabalho, os estudos realizados por Miguel (2008), Miguel e colaboradores (2006 e 2013) e Campos e Rosa (2012) também obtiveram resultados similares, aos 15 e 45 dias.

Os resultados obtidos no presente estudo, quando comparado com trabalhos que utilizam o modelo experimental de defeito ósseo crítico em calvária de rato, mostraram que a implantação de grânulos contendo 40% de wollastonita, associada a 60% de TCP, foi de um biomaterial com expressiva capacidade osteocondutora, uma vez que o biomaterial preencheu o defeito ósseo, formando uma matriz tridimensional que propiciou a migração e fixação celular ao redor dos grânulos.

Além disso, favoreceu a deposição de osso aos 15 e 45 dias ao longo de todo o defeito ósseo. Portanto, os grânulos de W-TCP permitiram a reparação óssea, com o restabelecimento anatômico e funcional do tecido perdido.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

O compósito p-W/ β -TCP é biocompatível, osteocondutor e biodegradável. Seus grânulos formaram um arcabouço que devolveu altura e preencheu todo o defeito, além de ter promovido a migração e adesão celular ao seu redor.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R.S. **Avaliação da implantação de grânulos de 2 -TCP associado ou não à biovidro fosfatado para regeneração de defeito ósseo.** 2013. Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) - Instituto de Ciências da Saúde Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- AL-NOAMAN, A., SIMON, C.F.R., HILL, R.G. Bioactive glass-stoichiometric wollastonite glass alloys to reduce TEC of bioactive glass coatings for dental implants. **Materials Letters**, n. 94, p.69–71, 2013.
- ALONSO, L.M. **Avaliação de cimentos ósseos de fosfatos de cálcio com adições de aluminato e silicato de cálcio.** 2011. Tese (Doutorado em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais) - Universidade Federal da Bahia, Escola de Engenharia, Porto Alegre.
- ANJANEYULU, U.; SASIKUMAR, S. Bioactive nanocrystalline wollastonite synthesized by sol–gel combustion method by using eggshell waste as calcium source. **Bull. Mater. Sci.**, Indian Academy of Sciences v. 37, n. 2, p. 207-212, Apr. 2014.
- AZA, A.H . et al. In situ bone-like apatite formation from a bioeutectic ceramic in SBF Dynamic Flow. **J. Am. Ceram. Soc.**, v. 90, n. 4, p. 1200–1207, 2007.
- BALBINO, C.A., PEREIRA, L.M, CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, jan./mar., 2005.
- BARRETO, I. C. **Utilização de ranelato de estrôncio associado a biometrias para regeneração óssea.** 2011. 176f. Tese (Doutorado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- BRITO, I.G.F., MEDEIROS, K.F.M., LOURENÇO, J.M. Um estudo teórico sobre a sinterização na metalurgia do pó. **Holos**, v. 3, n. 23, 2007.
- CAMPOS, L.S.; ROSA, F. P. Avaliação da hidroxiapatita no reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas.** Salvador, v. 11, n. 2, p.177-183, jan/maio 2012.
- CARRODEGUAS, R. G.; DE AZA, P. N.; DE AZA. Main contributions to bioceramics. **Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio.** v. 50, n. 6, p. 301-309, Nov.-Dic. 2011
- CARRODEGUAS, R.G. et al. Preparation and in vitro characterization of wollastonite doped tricalcium phosphate bioceramics. **Key Engineering Materials.** n. 361-363, p.237-240, 2008.
- CARVALHO, A.C.A. **Reparo ósseo de defeito crítico em calvária de rato com microesferas de hidroxiapatita e selante de fibrina.** 2010. Dissertação (Mestrado

em Processos interativos dos Órgãos e Sistemas) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

COSTA, C. de M. **Efeito da adição de alumina nas propriedades químicas e mecânicas de biocerâmicas de apatitas nanométricas sintetizadas via solgel.** 2014. 80 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais) – Centro de Tecnologia-Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

CUNHA, L.R.; BALDUCCI-ROSLINDO, E.; MINARELLI-GASPAR, A.M. Efeito do fosfato tricálcio na reparação de defeito ósseo em tíbias de ratos. **Revista de Odontologia da UNESP.** v.36, n. 4, p. 293-298, 2007.

DE AZA, P. N., LUKLINSKA, Z. B., MARTINEZ, A., ANSEAU, M. R., GUITIAN, F., DE AZA, S. **Morphological and structural study of pseudowollastonite implants in bone.** Journal of Microscopy, 197(1): 60–67, January, 2000.

DE AZA, P. et al. Bioeutectic® ceramics for biomedical application obtained by laser floating zone method. In vivo evaluation. **Materials.** (7)2395-2410, 2014.

DE AZA, P.N., GUITIAN, F., DE AZA, S. Bioactivity of wollastonite ceramics: in vitro evaluation. **Scripta Metallurgica et Materialia.** v.31, n.8, p.1001-1005, 1994.

DOMINGUES, J.A. **Influência dos “whiskerts’ de wollastonita em cimento de fosfato de cálcio no comportamento de células osteoblásticas.** 2013. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biologia Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FACTORI, I.M. **Processamento e propriedade de compósito de poliamida 6.6 reforçada com partículas de vidro reciclado.** 2009. 66 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) -Universidade de São Paulo, São Paulo.

FERNADES, A. de A. **Síntese de zeólitas e wollastonita à partir da cinza da casca de arroz.** 2006. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais) - Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares-, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GARZÓN, L.B. **Estudio histológico de las reacciones biológicas del tejido óseo frente a biomateriales basados en monetita.** 2012. Tesis doctoral - Departamento de Anatomía e Histología Humanas, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca.

GASPAR, A. M. M. et al. Biological response to wollastonite doped α -tricalcium phosphate implants in hard and soft tissues in rats. **Key Engineering Materials,** n. 396/398, p.7-10, 2009.

GOMES, L. C. et al . Síntese e caracterização de fosfatos de cálcio a partir da casca de ovo de galinha. **Cerâmica,** São Paulo, v. 58, n. 348, p. 448-452, Dez. 2012 . Acesso em: 18 out. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/S0366-69132012000400005>.)

GONÇALVES, G dos SANTOS; MARINHO, S.M.O.C.; MIGUEL, F.B. Polímeros como biomateriais para o tecido cartilaginoso. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, Salvador, v. 12, n. 3, p. 367-373, set./dez. 2013.

GRIFFON, D. J. **Evaluation of osteopductive biomaterials: allograft, bone inducing agent, bioactive glass, and ceramics.** 2002. Academic Dissertation (Department of Clinical Veterinary Sciences, Division of Surgery Faculty of Veterinary Medicine) - University of Helsinki.

GUASTALDI, A.C.; APARECIDA, A. H. Fosfato de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimento. **Quim. Nova**, v. 33, n. 6, p. 1352-1358, 2010.

LENGLER, H.C. de M. **Controle de porosidade em fase vítrea formada pela ação de fundentes em cerâmica gresificadas.** 2006. Tese (Doutorado - Programa de pós-graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais) - Escola de Engenharia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MAGALLANES- PERDORO, M. et al. **Estudios “in vitro” de biomateriales de composición eutéctica en el sistema fosfato tricálcico- wollastonita.** Madrid: Instituto de Cerámica y Vidrio, 2010.

MIGUEL, F. B. **Avaliação do potencial osteogênico de matrizes tridimensionais colagênicas aniônicas, reticuladas ou não em glutaraldeído, na regeneração de defeitos críticos, em calvária de rato.** 2008. 158 f. Tese (Doutorado em Patologia Humana) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador

MIGUEL, F.B. et al. Regeneration of critical bone defects with anionic collagen matrix as scaffolds. **J Mater Sci: Mater Med**, v. 24, p. 2567–2575, 2013.

MIGUEL, F.B. et al. Morphological assessment of the behavior of threedimensional anionic collagen matrices in bone regeneration in rats. **J Biomed Mater Res**, [Hoboken], v. 78s, n. 2, p. 334-339, Aug. 2006.

MOREIRA, B. da S. A biomecânica da fratura e o processo de cicatrização. **Cadernos Unisuam**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 1, p. 101-117, 2013.

PIRES, A.K., BIERHALZ, A.C.K., MORAES, A.M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Quim. Nova**, v. 38, n. 7, p.957-971, 2015.

PODPORSKA, J. et al. A novel ceramic with medical application. **Processing and Application of Ceramics**, v. 2, n. 1, p. 19-22, 2008.

ROLIM, Ana Emília Holanda. **Avaliação de microesferas, dopadas ou não com estrôncio no reparo de defeito ósseo crítico, em calvária de rato.** 2010. (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) - Universidade Federal da Bahia, Salvador.

SALMAN, S.M., SALAMA, S.N., ABO-MASOLLAM, H.A. The crystallization behaviour and bioactivity of wollastonite glass-ceramic based on Na₂O–K₂O– CaO–SiO₂–F glass system. **Journal of Asian Ceramic Societies**, v. 3, p. 255– 261, 2015.

SILVA, S.N.; PEREIRA, M.M. Comparação in vitro da reatividade de diferentes biocerâmicas na forma de pós e grânulos. **COALAOB**, ago. 2012.

TEDEJA, A, et al. Cerâmicas bioeutecticas W-TCP. **Revista Mexicana de Física**, v. 50, n. 2, p.187–192, abr. 2004

TEIXEIRA, Leonardo Jorge Carvalho. **Potencial osteoindutor de grânulos de hidroxiapatita em defeitos críticos na calvária de ratos**. 2009. (Mestrado em Odontologia) - Universidade Grande Rio Prof. José de Souza Herdy, Duque de Caxias, RJ.

TERAMOTO, H. et al. Resorption of Apatite-wollastonite Containing Glass-ceramic and β tricalcium Phosphate *in vivo*. **Acta Med. Okayama**, v. 59, n. 5, p. 201-207, 2005.

ANEXO

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



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

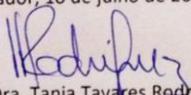


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "ANÁLISE DO POTENCIAL OSTEOGÊNICO DE BIOMATERIAIS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA", protocolo nº 078 /2015, sob a responsabilidade da Professora Dra. Fabiana Paim Rosa - que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11. 794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências da saúde (CEUA-ICS), em reunião de 10/07/2015.

Vigência do Projeto	01/06/2014 a 01/05/2016
Espécie/linhagem	<i>Rattus norvegicus</i> , Wistar (Ratos)
Número de animais	60
Peso/Idade	3 - 4 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

Salvador, 10 de julho de 2015


 Profa. Dra. Tania Tavares Rodriguez
 Coordenadora da CEUA-ICS



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

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