

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MINAS,
METALÚRGICA E DE MATERIAIS

JÚLIA BÜNECKER CASSEL

**OBTENÇÃO DE CIMENTO DE α -FOSFATO TRICÁLCICO INJETÁVEL REFORÇADO
COM FIBROÍNA DE SEDA: UM CIMENTO DE ALTA RESISTÊNCIA PARA
REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Dezembro de 2023

JÚLIA BÜNECKER CASSEL

OBTENÇÃO DE CIMENTO DE α -FOSFATO TRICÁLCICO INJETÁVEL REFORÇADO
COM FIBROÍNA DE SEDA: UM CIMENTO DE ALTA RESISTÊNCIA PARA
REGENERAÇÃO ÓSSEA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia dos Materiais

Orientador: Prof. Dr. Luís Alberto Loureiro dos Santos

Porto Alegre

2023

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, pelo ensino de excelência, por todas as oportunidades que me proporcionaram e por continuamente demonstrarem a importância da universidade pública em nosso país. Ao CNPq, pelo apoio financeiro durante minha caminhada pelo mestrado, permitindo que eu me dedicasse integralmente a este trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Alberto, por me receber em 2017 no início da minha graduação e por, desde então, me apresentar à maravilhosa área dos biomateriais e me guiar neste início da minha carreira acadêmica. Gostaria de agradecer imensamente sua orientação e apoio nos mais diversos momentos, além de demonstrar o carinho que tenho por todos os debates que tivemos sobre os mais diversos assuntos.

À Prof. Dr. Márcia Wink e à MSc. Thaís Casagrande, pesquisadoras do Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, pela parceria e apoio durante (e após) a realização das análises de cultura celular *in vitro*.

Aos meus colegas e ex-colegas do Labiomat, por todo o apoio e risadas em nosso convívio de quase 7 anos. Em especial, ao ex-colega e amigo, Matheus, por toda troca de conhecimento e parceria que tivemos desde 2017, pelas discussões que enriqueceram este trabalho e por ter compartilhado comigo grande parte das adversidades enfrentadas nesta jornada. À Alicia, Fernando e Wilbur, por todas as discussões, parecerias e momentos que tivemos juntos dentro e fora do laboratório.

Aos meus amigos, pelo apoio nos diversos desafios enfrentados durante à pós-graduação, pelas risadas e, principalmente, pela compreensão que tiveram pelas minhas ausências durante esta fase.

À minha família, que sempre me apoiou e incentivou a seguir meus objetivos e que apoiou minhas atividades na pesquisa, demonstrando a importância que esta tem, juntamente com a educação, na transformação da sociedade. Demonstro aqui minha gratidão por me proporcionarem a chance de aproveitar ao máximo este período.

A todos que, de alguma forma, contribuíram na minha formação e caminhada até aqui, meu mais sincero muito obrigada.

Nunca estou realmente satisfeita quanto a entender alguma coisa, porque até onde entendo, a minha compreensão só pode ser uma fração infinitesimal de tudo o que eu quero compreender.

Ada Lovelace

RESUMO

Cimentos de fosfato de cálcio (CPCs) injetáveis à base de fosfato de α -tricálcico (α -TCP) atraem considerável interesse devido ao seu potencial de aplicação em procedimentos minimamente invasivos para preenchimento e regeneração óssea. No entanto, as propriedades mecânicas destes materiais injetáveis são geralmente inadequadas para diversas aplicações ortopédicas, uma vez que é necessária uma maior incorporação de fase líquida para obter a injetabilidade das pastas cimentícias, o que reduz sua resistência mecânica. A resolução deste empecilho tem sido o foco de um número limitado de estudos, os quais dificilmente alcançam, com sucesso, propriedades mecânicas adequadas para aplicações clínicas. Este trabalho visa a formulação de um sistema de cimento α -TCP armazenável e injetável reforçado com diferentes concentrações de fibroína de seda (SF). Todas as pastas de cimento formuladas exibiram estabilidade de armazenamento por, pelo menos, 22 semanas e, após ativação, permitiram a formação de um material bifásico constituído por hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA) e hidroxiapatita substituída por cloro (HAp-Cl). As amostras reforçadas demonstraram um aumento de 335% na resistência à compressão em comparação com a amostra de controle, indicando uma interação favorável entre a SF e os fosfatos de cálcio presentes no material. Outrossim, a análise microestrutural das amostras revelou que todos os cimentos com incorporações de SF exibiram microestrutura mais análogas à do osso nativo, caracterizada por cristais nanométricos de formato agulhado. Além disso, a inclusão desta fase polimérica contribuiu para uma redução na dissolução do material durante a imersão em solução tampão de fosfato (PBS) e um aumento na deposição de apatita na superfície do CPC quando exposto à fluido corporal simulado (SBF). Ademais, a composição estabelecida não teve impacto adverso na viabilidade celular, mantendo a biocompatibilidade adequada. Assim, cimentos de fosfato de cálcio pré-misturados biomiméticos e biocompatíveis reforçados através da adição de SF foram obtidos com sucesso, apresentando potencial para ser avaliado mais profundamente como um material injetável para a regeneração óssea.

Palavras-chave: fosfato tricálcico; fibroína de seda; sistemas injetáveis; cimentos de fosfato de cálcio pré-misturados; biomateriais.

ABSTRACT

Injectable α -tricalcium phosphate (α -TCP)-based calcium phosphate cements (CPCs) draw considerable interest owing to their prospective application in minimally invasive procedures for bone filling and regeneration. Nevertheless, the mechanical properties of these injectable materials are often inadequate for numerous orthopaedic applications, as a higher incorporation of liquid is needed to obtain adequate injectability, reducing its mechanical strength. Addressing this substantial challenge in injectable systems has been the focus of only a limited number of studies, and an even smaller fraction has successfully achieved mechanical properties suitable for practical applications. Therefore, this investigation aims the formulation of a storable and injectable α -TCP cement system reinforced with varying concentrations of silk fibroin (SF). All formulated cement pastes exhibited storage stability for, at least, 22 weeks, and upon activation, allowed the formation of a biphasic calcium deficient hydroxyapatite and chloride-substituted hydroxyapatite material. The reinforced specimens demonstrated a 335% enhancement in compressive strength compared to the control sample, which indicates a favourable interaction between the SF and the present calcium phosphates. Moreover, microstructural analysis revealed that all SF-incorporated samples exhibited a microstructure more similar to the structure of native bone, characterized by nanosized needle-like crystals. Additionally, the inclusion of this polymeric phase contributed to a reduction in material dissolution during immersion in phosphate-buffered saline (PBS) solution and an increase in the deposition of bone-like apatite on the CPC's surface when exposed to simulated body fluid (SBF). Notably, the established composition did not adversely impact cell viability, maintaining suitable biocompatibility. In summary, injectable, biomimetic, and biocompatible premixed CPCs with mechanical reinforcement through silk fibroin addition were successfully developed, demonstrating potential for further evaluations as a promising material for bone regeneration.

Keywords: tricalcium phosphate; silk fibroin; injectable systems; premixed calcium phosphate cements; biomaterials.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Representação esquemática da estrutura óssea sob escala macro, micro, nano e sub-nanométrica. | 27 |
| Figura 2: Processo genérico de regeneração tecidual. | 29 |
| Figura 3: Exemplos de aplicações de biomateriais. | 33 |
| Figura 4: Estabilidade e bioatividade de biocerâmicas de fixação (a) morfológica (cerâmicas bioinertes), (b) biológica (cerâmicas bioinertes porosas), (c) bioativa e (d) de implantes bioabsorvíveis. | 34 |
| Figura 5: Aplicações clínicas de biocerâmicas. | 36 |
| Figura 6: Representação esquemática da estrutura do α -TCP. Projeção (a) de vista superior da célula unitária ao longo da direção [0 0 1] e (b) projeção fracional das células unitárias no plano bc, evidenciando a disposição dos átomos ao longo da direção [0 0 1]. Átomos Ca^{2+} estão representados em verde e P^{5+} em roxo. Íons O^{2-} não foram representados para uma melhor clareza da estrutura. | 38 |
| Figura 7: Mecanismos de (a) inibição da solubilização e hidratação do α -TCP através da adsorção de íons Mg^{2+} às partículas, (b) ativação da reação através da adição de íons Ca^{2+} e (c) solubilização do α -TCP e precipitação de CDHA. | 42 |
| Figura 8: Representação esquemática da estrutura da fibroína de seda. | 44 |
| Figura 9: Sequências (a) hexapeptídica Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser e dipeptídicas (b) Gly-Ala, (c) Gly-Ser e (d) Gly-Tyr presentes nas cadeias-H da fibroína de seda. | 45 |
| Figura 10: Possibilidades de interação entre a superfície do material e o sistema biológico. | 48 |
| Figura 11: Fluxograma das etapas de desenvolvimento do trabalho. | 49 |
| Figura 12: Representação esquemática da metodologia de mistura da pasta cimentícia pré-misturadas e a solução de ativação. | 57 |
| Figura 13: Representação esquemática do ensaio de injetabilidade das pastas cimentícias. | 58 |
| Figura 14: Geometria das amostras para os ensaios de resistência à compressão. | 61 |
| Figura 15: Difratoograma do precursor obtido por via úmida. | 67 |

| | |
|---|----|
| Figura 16. Curvas obtidas pela técnica STD, apresentando (a) fluxo de calor e (b) perda de massa com a temperatura. (c) Espectros de FTIR referentes às perdas de massa em 80°C, 267°C e 748°C. | 68 |
| Figura 17: Difratoograma do pó de α -TCP obtido. | 70 |
| Figura 18: Espectro de infravermelho do pó de α -TCP sintetizado..... | 72 |
| Figura 19: Distribuição de tamanho de partículas do pó de α -TCP obtido..... | 72 |
| Figura 20: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das fibras de seda (a) antes e (b) após o processo de degomagem, sob ampliação de 300x..... | 73 |
| Figura 21: Espectros de infravermelho de amostras de seda e fibroína de seda (SF). . | 74 |
| Figura 22: Curva de DSC do filme de fibroína de seda obtido após processamento..... | 76 |
| Figura 23: Curva de TGA da do filme de SF obtido após processamento..... | 77 |
| Figura 24: Teor de α -TCP definido por refinamento de Rietveld das pastas pré-misturadas armazenadas..... | 78 |
| Figura 25: Calor total liberado pela reação de pega dos cimentos ativados através da adição de soluções 4M CaCl_2 com diferentes concentrações de ácido cítrico..... | 80 |
| Figura 26: Injetabilidade das pastas cimentícias com diferentes concentrações de SF após armazenamento por 7d e ativação com solução de CaCl_2/CA . N.S.: $p > 0,05$ entre as variantes. | 82 |
| Figura 27: Teor de α -TCP determinado por Refinamento de Rietveld nos cimentos obtidos conforme aumento da permanência em câmara úmida..... | 83 |
| Figura 28: Teor de β -TCP determinado por Refinamento de Rietveld nos cimentos obtidos conforme aumento da permanência em câmara úmida..... | 84 |
| Figura 29: Teor de CDHA determinado por Refinamento de Rietveld nos cimentos obtidos conforme aumento da permanência em câmara úmida..... | 85 |
| Figura 30: Teor de HAp-Cl determinado por Refinamento de Rietveld nos cimentos obtidos conforme aumento da permanência em 100% de umidade relativa..... | 86 |
| Figura 31. Espectros de infravermelho por transformada de Fourier dos CPCs após 7d em câmara úmida. | 91 |
| Figura 32: Evolução da porosidade dos cimentos com diferentes concentrações de SF com o tempo de armazenamento em câmara úmida..... | 92 |

| | |
|---|-----|
| Figura 33: Porosidade dos cimentos obtidos com diferentes concentrações de SF após 7d de armazenamento em câmara úmida. N.S.: $p > 0,05$ entre as variantes. | 93 |
| Figura 34: Evolução da resistência à compressão dos cimentos com diferentes concentrações de SF com o tempo de armazenamento em 100% de umidade relativa. | 94 |
| Figura 35: (a) Resistência à compressão e (b) módulo de compressão dos cimentos obtidos com diferentes concentrações de SF após 7d de armazenamento em 100% de umidade. *: $p < 0,05$ entre as variantes; N.S.: $p > 0,05$ entre as variantes..... | 96 |
| Figura 36: Micrografias obtidas por MEV da superfície de fratura dos CPCs (a) S00M1, (b) S07M1, (c) S13M1, (d) S20M1, (e), S27M1, (f) S33M1, (g) S40M1, (h) S47M1 e (i) S53M1 sob magnificação de 10000x após pega sem permanência em 100% de umidade relativa (0d). A barra de escala representa um comprimento de 5 μ m..... | 99 |
| Figura 37: Micrografias obtidas por MEV da superfície de fratura dos CPCs (a) S00M1, (b) S07M1, (c) S13M1, (d) S20M1, (e), S27M1, (f) S33M1, (g) S40M1, (h) S47M1 e (i) S53M1 sob magnificação de 10000x após pega e permanência em 100% de umidade relativa por 1d. A barra de escala representa um comprimento de 5 μ m. | 100 |
| Figura 38: Micrografias obtidas por MEV da superfície de fratura dos CPCs (a) S00M1, (b) S07M1, (c) S13M1, (d) S20M1, (e), S27M1, (f) S33M1, (g) S40M1, (h) S47M1 e (i) S53M1 sob magnificação de 10000x após pega e permanência em 100% de umidade relativa por 3d. A barra de escala representa um comprimento de 5 μ m. | 101 |
| Figura 39: Micrografias obtidas por MEV da superfície de fratura dos CPCs (a) S00M1, (b) S07M1, (c) S13M1, (d) S20M1, (e), S27M1, (f) S33M1, (g) S40M1, (h) S47M1 e (i) S53M1 sob magnificação de 10000x após pega e permanência em 100% de umidade relativa por 7d. A barra de escala representa um comprimento de 5 μ m. | 102 |
| Figura 40: Calor total liberado pela reação de pega de cimentos S33M1 e S00M1. | 104 |
| Figura 41: Curva de liberação acumulada de Ca em PBS em função do tempo para os cimentos S00M1 e S33M1. As linhas pontilhadas indicam o ajuste exponencial para a curva de liberação..... | 105 |
| Figura 42: (a) Variação da massa relativa de amostras S00M1 e S33M1, e (b) variação do pH da solução de SBF adjacente em função do tempo de imersão das amostras. | 107 |

| | |
|---|-----|
| Figura 43: Micrografias da superfície de amostras S00M1 e S33M1 após 3, 7, 14 e 28d de imersão em SBF. As barras de escala nas imagens com magnificação de 500x indicam comprimentos de 100µm e nas imagens com magnificação de 10000x indicam comprimentos de 5µm..... | 108 |
| Figura 44: Pastas S00M1 e S33M1 após 0, 5, 10 e 20 min de sua injeção em SBF... | 110 |
| Figura 45: Pasta S33M1C após 0, 5, 10 e 20 min de sua injeção em SBF. | 110 |
| Figura 46: Injetabilidade, porosidade e resistência à compressão de amostras S33M1C em comparação a amostras S33M1. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as variantes..... | 111 |
| Figura 47: (a) Resistência à compressão e (b) porosidade total das amostras injetadas em SBF conforme a permanência nesta solução..... | 112 |
| Figura 48: Micrografias com magnificação de 10000x obtidas por MEV da superfície de fratura das amostras S33M1C após sua injeção e permanência em SBF..... | 112 |
| Figura 49: Viabilidade de células ADSC cultivadas por 24h em meios com concentrações de 1%, 10%, 50% e 100% de extratos de S00M1 e S33M1C. O controle foi realizado com células cultivadas em meio DMEM de baixa glicose. | 113 |
| Figura 50: Micrografias de fluorescência de células cultivadas por 24h em extratos puros de S00M1 e S33M1C. As micrografias mostram o citoesqueleto de F-actina (verde) e o núcleo (azul) das células ADSC. | 114 |
| Figura A1: Composição das amostras S00M0, S00M1, S07M1, S13M1, S20M1 e S27M1 conforme tempo de armazenamento. | 135 |
| Figura A2: Composição das amostras S33M1, S40MQ, S47M1 e S53M1 conforme tempo de armazenamento. | 136 |
| Figura B1: Difratoograma de raios-X das amostras de CPC obtidas após 0d em câmara úmida..... | 141 |
| Figura B2: Difratoograma de raios-X das amostras de CPC obtidas após 1d em câmara úmida..... | 142 |
| Figura B3: Difratoograma de raios-X das amostras de CPC obtidas após 3d em câmara úmida..... | 143 |
| Figura B4: Difratoograma de raios-X das amostras de CPC obtidas após 7d em câmara úmida..... | 144 |

| | |
|---|-----|
| Figura C1: Micrografias da superfície de fratura de amostras S00M1 sob magnificação de 10000x após permanência em 100% de umidade relativa por (a) 0d, (b) 1d, (c) 3d e (d) 7d. A barra de escala representa um comprimento de 5µm..... | 146 |
| Figura C2: Micrografias da superfície de fratura de amostras S07M1 sob magnificação de 10000x após permanência em 100% de umidade relativa por (a) 0d, (b) 1d, (c) 3d e (d) 7d. A barra de escala representa um comprimento de 5µm..... | 146 |
| Figura C3: Micrografias da superfície de fratura de amostras S13M1 sob magnificação de 10000x após permanência em 100% de umidade relativa por (a) 0d, (b) 1d, (c) 3d e (d) 7d. A barra de escala representa um comprimento de 5µm..... | 146 |
| Figura C4: Micrografias da superfície de fratura de amostras S20M1 sob magnificação de 10000x após permanência em 100% de umidade relativa por (a) 0d, (b) 1d, (c) 3d e (d) 7d. A barra de escala representa um comprimento de 5µm..... | 147 |
| Figura C5: Micrografias da superfície de fratura de amostras S27M1 sob magnificação de 10000x após permanência em 100% de umidade relativa por (a) 0d, (b) 1d, (c) 3d e (d) 7d. A barra de escala representa um comprimento de 5µm..... | 147 |
| Figura C6: Micrografias da superfície de fratura de amostras S33M1 sob magnificação de 10000x após permanência em 100% de umidade relativa por (a) 0d, (b) 1d, (c) 3d e (d) 7d. A barra de escala representa um comprimento de 5µm..... | 147 |
| Figura C7: Micrografias da superfície de fratura de amostras S40M1 sob magnificação de 10000x após permanência em 100% de umidade relativa por (a) 0d, (b) 1d, (c) 3d e (d) 7d. A barra de escala representa um comprimento de 5µm..... | 148 |
| Figura C8: Micrografias da superfície de fratura de amostras S47M1 sob magnificação de 10000x após permanência em 100% de umidade relativa por (a) 0d, (b) 1d, (c) 3d e (d) 7d. A barra de escala representa um comprimento de 5µm..... | 148 |
| Figura C9: Micrografias da superfície de fratura de amostras S53M1 sob magnificação de 10000x após permanência em 100% de umidade relativa por (a) 0d, (b) 1d, (c) 3d e (d) 7d. A barra de escala representa um comprimento de 5µm..... | 148 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1: Propriedades mecânicas de diferentes estruturas ósseas. | 28 |
| Tabela 2: Parâmetros de rede das estruturas polimórficas do Fosfato Tricálcico. | 38 |
| Tabela 3: Composição mássica dos principais aminoácidos presentes na fibroína e sericina de seda. | 44 |
| Tabela 4: Parâmetros de síntese utilizados na obtenção do α -TCP por via úmida. | 50 |
| Tabela 5: Nomenclatura e composição de cada formulação de teste estudada. A concentração de SF foi calculada considerando sua contribuição após a ativação do CPC com uma solução de 4M de CaCl_2 | 55 |
| Tabela 6: Composição do pó de α -TCP obtido determinada por refinamento de Rietveld. | 71 |
| Tabela 7: Distribuição de tamanho de partícula do pó de α -TCP. | 73 |
| Tabela 8: Tempo de pega inicial e final avaliados através do método de agulhas de Gillmore para cimentos S00M0 e cimentos S00M1 com diferentes concentrações de CA. Todas as amostras da triplicata de cada variante não demonstraram variação de tempo de pega. | 80 |
| Tabela 9: Tempo de pega inicial e tempo para ocorrência de 10, 50 e 90% da reação de pega de cimentos S00M0 e cimentos S00M1 com diferentes concentrações de CA. ... | 81 |
| Tabela 10: Composição dos CPCs desenvolvidos após 7d em câmara úmida de 100% de umidade relativa, conforme determinado por refinamento de Rietveld. | 86 |
| Tabela 11: Concentrações mássicas dos elementos Ca, P e Cl determinados por FRX. | 88 |
| Tabela 12: Concentração teórica e concentração experimental dos elementos Ca, P e O. Os valores experimentais apresentados foram determinados por FRX e corrigidos considerando as contribuições de O e H. | 88 |
| Tabela 13: Tempo de pega inicial e final avaliados através do método de agulhas de Gillmore para cimentos S00M1 e S33M1. | 103 |
| Tabela 14: Tempo de pega inicial e tempo para ocorrência de 10, 50 e 90% da reação de pega das pastas cimentícias S00M1 e S33M1 determinados através de calorimetria isotérmica a 37°C. | 104 |

| | |
|---|-----|
| Tabela A1: Composição das pastas pré-misturadas obtidas durante o teste de armazenamento até 3 semanas..... | 137 |
| Tabela A2: Composição das pastas pré-misturadas obtidas durante o teste de armazenamento entre 4 e 8 semanas..... | 138 |
| Tabela A3: Composição das pastas pré-misturadas obtidas durante o teste de armazenamento entre 9 e 16 semanas..... | 139 |
| Tabela A4: Composição das pastas pré-misturadas obtidas durante o teste de armazenamento entre 18 e 22 semanas..... | 140 |
| Tabela B1: Composição dos cimentos de fosfato de cálcio obtidos..... | 145 |

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

- ACP – fosfato tricálcico amorfo
- Ala – alanina
- Al_2O_3 – alumina (óxido de alumínio)
- ALP – fosfatase alcalina
- Am A – amida A
- Am B – amida B
- Am I – amida I
- Am II – amida II
- Am III – amida III
- Am IV – amida IV
- Am V – amida V
- ASTM – American Society for Testing and Materials
- BET – análise por adsorção de nitrogênio
- Bis-GMA – bisfenol-A glicidil metacrilato
- C – carbono
- Ca – elemento cálcio
- Ca^{2+} – íon cálcio
- CaCl_2 – cloreto de cálcio
- CaCO_3 – carbonato de cálcio
- Cadeia-H – cadeia hidrofóbica densa da fibroína de seda
- Cadeia-L – cadeia hidrofílica leve da fibroína de seda
- CaHPO_4 – hidrogenofosfato de cálcio
- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – nitrato de cálcio
- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ – hidróxido de cálcio
- Ca/P – razão molar entre átomos de cálcio e fósforo
- $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ – pirofosfato de cálcio
- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – fosfato tricálcico

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ - hidroxiapatita
CDHA – hidroxiapatita deficiente em cálcio
CF – fibra de carbono
Cl – elemento cloro
 Cl^- – íon cloro
ClAp - clorapatita
CMC - carboximetilcelulose
 CO_2 – gás carbônico
 CO_3^{2-} – íon carbonato
-C=O – grupo carbonila
Col-I – colágeno tipo I
-COOH – grupo carboxila
CaP/CaPs – fosfato/fosfatos de cálcio
CPC/CPCs – cimento/cimentos de fosfato de cálcio
DAPI – 4',6-diamidina-2-fenilindol
DCPA – fosfato dicálcico anidro
DMEM – meio Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO - dimetilsulfóxido
DRX – difração de raios-X
DSC – calorimetria exploratória diferencial
ECM – matriz extracelular
EDS – detector de energia dispersiva
EtOH – álcool etílico / etanol
 F^- – íon flúor
Fhx – fibrohexamerina
FRX – fluorescência de raios-X
FTIR – espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
GF – fibra de vidro

Gly – glicina

H – elemento hidrogênio

HAp – hidroxiapatita

HAp-Cl – hidroxiapatita com substituição de cloro

HDPE – polietileno de alta densidade

HIF-1 α – fator induzido por hipóxia 1 α

HNO₃ – ácido nítrico

H₂O – água

H₃PO₄ – ácido fosfórico

ICP-OES – espectrometria de emissão ótica por plasma indutivamente acoplado

ICSD – Inorganic Crystal Structure Database

KF – fibra de kenaf

K₃Na(SO₄)₂ – glaserita

LCP – polímero de cristal líquido

LOD – limite de detecção

L/P – razão líquido-pó

MEV – microscopia eletrônica de varredura

Mg²⁺ – íon magnésio

MgCl₂ – cloreto de magnésio

MgCO₃ – carbonato de magnésio

%(m/m) – concentração determinada pela razão massa/massa

MSCs – células-tronco mesenquimais

%(m/v) – concentração determinada pela razão massa/volume

Na₂CO₃ – carbonato de sódio

NH₃ – amônia

(NH₄)₂HPO₄ – hidrogenofosfato de amônio

NH₄H₂PO₄ – dihidrogenofosfato de amônio

NH₄OH – hidróxido de amônio

O – elemento oxigênio
O²⁻ – íon oxigênio
OH⁻ – íon hidroxila
-OH – grupo hidroxila
P – elemento fósforo
P⁵⁺ – íon fósforo
P25 – nomenclatura prévia à glicoproteína fibrohexamerina
PBS – solução tampão de fosfato
PC – policarbonato
PE – polietileno
PEEK – poli(éter-éter-cetona)
PEG – polietilenoglicol
PET – poli(tereftalato de etileno)
PGA – poli(ácido glicólico)
PHB – poli(hidroxibutirato)
PHEMA – poli(metacrilato de 2-hidroxietila)
PLA – poli(ácido láctico)
PLDLA – poli(D,L-ácido láctico)
PLLA – poli(L-ácido láctico)
PMMA – poli(metilmetacrilato)
PO₄³⁻ – íon fosfato
PP – polipropileno
PS – poliestireno
PTFE – politetrafluoroetileno
PU - poliuretano
SBF – fluido corpóreo simulado
SDT – análise térmica combinada (DSC/TGA)
Ser – serina

SF – fibroína de seda

SiC – carbeto de silício

Sr²⁺ – íon estrôncio

TCP – fosfato tricálcico

T_{fG} – tempo de pega final determinado pelo ensaio de agulhas de Gillmore

T_g – transição vítrea

TGA – análise termogravimétrica

T_{iG} – tempo de pega inicial determinado pelo ensaio de agulhas de Gillmore

TTCP – fosfato tetracálcico

Tyr – tirosina

UHMWPE – polietileno de ultra alto peso molecular

%(v/v) – concentração determinada pela razão volume/volume

Zn²⁺ – íon zinco

α-TCP – fase alfa do fosfato tricálcico

α'-TCP – fase alfa' do fosfato tricálcico

β-TCP – fase beta do fosfato tricálcico

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 22 |
| 2 | OBJETIVOS | 25 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL | 25 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 25 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 26 |
| 3.1 | TECIDO ÓSSEO..... | 26 |
| 3.1.1 | Regeneração Óssea..... | 28 |
| 3.2 | BIOMATERIAIS | 30 |
| 3.2.1 | Biomateriais cerâmicos | 33 |
| 3.2.1.1 | Cimentos de Fosfato de Cálcio | 36 |
| 3.2.1.2 | α -Fosfato Tricálcico | 37 |
| 3.2.1.3 | Cimentos de α -TCP pré-misturados..... | 41 |
| 3.2.2 | Biomateriais poliméricos..... | 42 |
| 3.2.2.1 | Fibroína de Seda..... | 43 |
| 3.3 | INTERAÇÃO DO BIOMATERIAL COM O CORPO | 47 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 49 |
| 4.1 | SÍNTESE DO α -FOSFATO TRICÁLCICO | 50 |
| 4.2 | CARACTERIZAÇÃO DA SÍNTESE DE α -TCP | 51 |
| 4.2.1 | Caracterização do precursor | 51 |
| 4.2.1.1 | Difração de Raios-X..... | 51 |
| 4.2.1.2 | Análises Térmicas | 51 |
| 4.2.2 | Caracterização do pó de α-TCP obtido..... | 52 |
| 4.2.2.1 | Difração de Raios-X..... | 52 |
| 4.2.2.2 | Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier | 52 |

| | | |
|---------|--|----|
| 4.2.2.3 | Tamanho e área superficial específica de partícula | 52 |
| 4.3 | OBTENÇÃO DA SOLUÇÃO DE FIBROÍNA DE SEDA | 53 |
| 4.3.1 | Degomagem da seda | 53 |
| 4.3.2 | Dissolução da fibroína de seda..... | 53 |
| 4.4 | CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSAMENTO DA FIBROÍNA DE SEDA | 54 |
| 4.4.1 | Microscopia Eletrônica de Varredura..... | 54 |
| 4.4.2 | Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier | 54 |
| 4.4.3 | Calorimetria Exploratória Diferencial..... | 54 |
| 4.4.4 | Análise Termogravimétrica..... | 55 |
| 4.5 | PREPARAÇÃO DA PASTA ARMAZENÁVEL DE α -TCP | 55 |
| 4.6 | TESTE DE ARMAZENAMENTO DAS PASTAS DE α -TCP PRÉ-MISTURADAS..... | 56 |
| 4.7 | ATIVAÇÃO DAS PASTAS | 56 |
| 4.7.1 | Estudo da reação de hidratação | 57 |
| 4.7.2 | Injetabilidade | 58 |
| 4.8 | CARACTERIZAÇÃO DOS CIMENTOS INJETÁVEIS OBTIDOS..... | 59 |
| 4.8.1 | Difração de Raios-X..... | 59 |
| 4.8.2 | Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier | 59 |
| 4.8.3 | Porosidade | 60 |
| 4.8.4 | Resistência à Compressão | 60 |
| 4.8.5 | Microscopia Eletrônica de Varredura..... | 61 |
| 4.9 | CARACTERIZAÇÕES ADICIONAIS DA MELHOR VARIANTE | 62 |
| 4.9.1 | Calorimetria Isotérmica..... | 62 |
| 4.9.2 | Comportamento <i>in vitro</i> | 62 |
| 4.9.2.1 | Liberação de íons de Ca^{2+} | 62 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 4.9.2.2 | Comportamento em SBF..... | 63 |
| 4.9.3 | Comportamento de injeção <i>in vitro</i>..... | 63 |
| 4.9.3.1 | Avaliação da coesão do cimento injetável | 63 |
| 4.9.3.2 | Resistência à compressão de amostras injetadas em SBF | 64 |
| 4.9.4 | Ensaio de Viabilidade Celular <i>in vitro</i>..... | 64 |
| 4.9.4.1 | Isolamento e caracterização de células-tronco derivadas de tecido adiposo.. | 64 |
| 4.9.4.2 | Avaliação de citotoxicidade <i>in vitro</i> indireta..... | 65 |
| 4.10 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 66 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 67 |
| 5.1 | CARACTERIZAÇÃO DA SÍNTESE DE α -TCP | 67 |
| 5.1.1 | Caracterização do precursor | 67 |
| 5.1.1.1 | Difração de Raios-X..... | 67 |
| 5.1.1.2 | Análise Térmica..... | 68 |
| 5.1.2 | Caracterização do pó de α-TCP obtido | 70 |
| 5.1.2.1 | Difração de Raios-X..... | 70 |
| 5.1.2.2 | Espectroscopia de Infravermelho por Transformação de Fourier..... | 71 |
| 5.1.2.3 | Tamanho e área superficial específica de partícula | 72 |
| 5.2 | CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSAMENTO DA FIBROÍNA DE SEDA | 73 |
| 5.2.1 | Microscopia Eletrônica de Varredura..... | 73 |
| 5.2.2 | Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier | 73 |
| 5.2.3 | Calorimetria Exploratória Diferencial..... | 76 |
| 5.2.4 | Análise Termogravimétrica..... | 77 |
| 5.3 | TESTE DE ARMAZENAMENTO DAS PASTAS DE α -TCP PRÉ-MISTURADAS..... | 78 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 5.4 | CARACTERIZAÇÃO DA ATIVAÇÃO E INJETABILIDADE DAS PASTAS | 79 |
| 5.4.1 | Estudo da reação de hidratação | 79 |
| 5.4.2 | Injetabilidade | 81 |
| 5.5 | CARACTERIZAÇÃO DOS CIMENTOS INJETÁVEIS OBTIDOS..... | 83 |
| 5.5.1 | Difração de Raios-X..... | 83 |
| 5.5.2 | Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier | 89 |
| 5.5.3 | Porosidade | 91 |
| 5.5.4 | Resistência à Compressão | 94 |
| 5.5.5 | Microscopia Eletrônica de Varredura..... | 98 |
| 5.5.6 | Calorimetria isotérmica..... | 103 |
| 5.5.7 | Comportamento <i>in vitro</i> | 105 |
| 5.5.7.1 | Liberação de íons de Ca ²⁺ | 105 |
| 5.5.7.2 | Comportamento em SBF | 106 |
| 5.5.8 | Comportamento de injeção <i>in vitro</i> | 109 |
| 5.5.8.1 | Avaliação da coesão do cimento injetável | 109 |
| 5.5.8.2 | Resistência à compressão de amostras injetadas em SBF | 111 |
| 5.5.9 | Ensaio de Viabilidade Celular | 113 |
| 6 | CONCLUSÕES | 115 |
| 7 | SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS | 117 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 118 |
| | APÊNDICE A – RESULTADOS COMPLETOS DO REFINAMENTO DE RIETVELD DO TESTE DE ARMAZENAMENTO..... | 135 |
| | APÊNDICE B – COMPOSIÇÃO COMPLETA E DIFRATOGRAMA DOS CIMENTOS DE FOSFATO DE CÁLCIO OBTIDOS..... | 141 |
| | APÊNDICE C – MICROGRAFIAS DOS CIMENTOS DE FOSFATO DE CÁLCIO OBTIDOS..... | 146 |

1 INTRODUÇÃO

Defeitos ósseos e fraturas originadas de traumas, envelhecimento e ressecções tumorais são casos comuns em tratamentos clínicos (Zhang et al., 2019; Mobika, Rajkumar, Nithya Priya, et al., 2020). O tecido ósseo possui a habilidade de se autorregenerar, entretanto, esta é limitada por diversos aspectos, como o tamanho do defeito ósseo. Conseqüentemente, intervenções clínicas são necessárias para que a regeneração óssea seja realizada adequadamente (Li et al., 2019). Porém, os tratamentos aplicados atualmente, como enxertos autógenos, alógenos, xenógenos e sintéticos, não são capazes de atender a demanda crescente por reparos ósseos biologicamente efetivos. Isso ocorre devido à falta de doadores e áreas doadoras para enxertos biológicos e a relação não ideal entre propriedades biológicas e mecânicas de enxertos sintéticos (Han et al., 2019).

Assim, cimentos de fosfato de cálcio (CPCs) atraem grande interesse como objeto de pesquisa para aplicações em regeneração óssea devido a sua capacidade de pega a baixas temperaturas, alta moldabilidade e similaridade composicional com o tecido ósseo, o que proporciona boa biocompatibilidade, osteocondutividade e bioatividade ao material (Shi et al., 2019). Adicionalmente, o desenvolvimento de CPCs injetáveis tem permitido o uso destes produtos em procedimentos minimamente invasivos para o preenchimento e substituição óssea (Niño e dos Santos, 2016; Vásquez, Domínguez e dos Santos, 2017). Um dos fosfatos de cálcio (CaPs) de maior interesse no desenvolvimento de CPCs é o fosfato tricálcico (TCP), devido a sua alta solubilidade em soluções aquosas, biocompatibilidade, bioatividade e bioabsortividade. O TCP apresenta três polimorfos: β -, α - e α' -TCP; entretanto, somente as fases β e α podem ser estabilizadas à temperatura ambiente (Carrodeguas e de Aza, 2011). A utilização destes materiais em cimentos ósseos hidráulicos é focada na fase α -TCP, devido à maior solubilidade desta em comparação com o β -TCP (Tronco, Cassel e dos Santos, 2022). Uma das maiores vantagens da utilização desta fase é a sua reação de hidratação, que permite a pega da pasta cimentícia através da transformação do TCP em hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA), a qual produz cristais aciculares entrelaçados e permite o aumento da resistência mecânica do produto (Sinusaite et al., 2021).

Apesar das propriedades de interesse dos CPCs baseados em α -TCP, a aplicação destes materiais apresenta diversos empecilhos. O manuseio dos CPCs requer que a mistura do pó e líquido seja realizada manualmente na sala cirúrgica, o que pode introduzir riscos de contaminação ao produto e riscos de partículas de pó entrarem em contato com locais indesejados do organismo do paciente. Além disso, a mistura manual dos componentes da pasta cimentícia (pó de CaP e líquido de pega) pode causar desvios estatísticos nas propriedades dos CPCs obtidos, prejudicando a performance do material (Weichhold et al., 2022). A elaboração de sistemas de CPCs pré-misturados elimina estes fatores através da preparação de componentes estocáveis que podem ser misturados por metodologias pré-definidas que garantem a mistura homogênea da pasta cimentícia. Diferentes sistemas têm sido desenvolvidos para inibir a reação de hidratação do α -TCP, desde a adição de soluções não-aquosas ao pó até a adição de íons de ação inibitória à pasta, prevenindo a reação de pega do cimento até o momento de aplicação do material (Heinemann et al., 2013; Bohner et al., 2015; Weichhold et al., 2022). Bohner et al. (2015) demonstrou os efeitos inibitórios do íon Mg^{2+} nas pastas de α -TCP através da adição de soluções aquosas de 0,1M do cloreto deste íon, permitindo a estocagem de pastas de α -TCP até 54 semanas.

Mesmo com a solução destas limitações, estes materiais não apresentam propriedades mecânicas adequadas para a maioria das aplicações ortopédicas, principalmente quando injetáveis, e têm sua aplicação limitada a locais de baixas solicitações mecânicas (Ginebra et al., 2007; Thürmer, Diehl e dos Santos, 2016). Sistemas cimentícios injetáveis são ainda mais afetados por este problema, já que exigem maiores incorporações de fase líquida para a obtenção de uma injetabilidade adequada (Tronco, Cassel e dos Santos, 2022). Diversos mecanismos têm sido estudados para o aumento das propriedades mecânicas de CPCs, incluindo o reforço através da adição de diferentes polímeros naturais, como proteínas e polissacarídeos. Estes polímeros são de grande interesse, pois apresentam boa versatilidade e funcionalização, biocompatibilidade, bioabsortividade e, quando implantados, induzem respostas inflamatórias mínimas (Farokhi et al., 2019).

Um dos polímeros mais promissores em pesquisas de biomateriais para regeneração óssea é a fibroína de seda (SF), devido a sua boa biocompatibilidade e possibilidade de controle de sua bioabsortividade e propriedades mecânicas, além de apresentar boa tenacidade (Zhengshi et al., 2018; Wang et al., 2021). O principal interesse do desenvolvimento de biomateriais com SF é sua capacidade de formar sítios de nucleação para a cristalização de hidroxiapatita (HAp) e outros fosfatos de cálcio e orientar o crescimento destes cristais ao longo do eixo *c* da estrutura cristalina, de forma análoga ao colágeno tipo I (Col-I) presente no tecido ósseo (Cao et al., 2014; Ming et al., 2015; Özcan e Çiftçioğlu, 2022). Desta forma, a adição desta fase polimérica ao cimento de α -TCP, além de permitir a melhoria das propriedades mecânicas, poderá resultar em uma microestrutura biomimética ao osso. A obtenção de estruturas biomiméticas é de grande importância na regeneração tecidual, pois promovem maior compatibilidade do material a nível molecular, estrutural e biológico com as células do tecido a ser regenerado (Fernandez-Yague et al., 2015).

Assim, este trabalho pretende desenvolver um sistema cimentício armazenável e injetável baseado em α -TCP e reforçado com diferentes concentrações de SF. A influência da adição desta fase polimérica na microestrutura, composição e nas propriedades mecânicas e biológicas do material foram estudadas, além do estudo da estabilidade de armazenamento da pasta de α -TCP e as propriedades relacionadas à injetabilidade da pasta cimentícia. Assim, o potencial de aplicação do cimento α -TCP/SF desenvolvido em aplicações de regeneração óssea foi avaliado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obtenção de cimento de fosfato de cálcio injetável e armazenável baseado em α -fosfato tricálcico e reforçado com fibroína de seda, de forma a se alcançar uma estrutura mais biomimética e com propriedades mecânicas adequadas a regeneração óssea.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (i) Verificar a possibilidade de obtenção de cimentos de fosfato de cálcio com fibroína de seda em solução aquosa de diferentes concentrações;
- (ii) Verificar a estabilidade das pastas de cimento de fosfato de cálcio com diferentes concentrações de fibroína de seda;
- (iii) Verificar a possibilidade de injeção das pastas obtidas com diferentes concentrações de fibroína de seda;
- (iv) Caracterizar o cimento obtido com técnicas físico-químicas;
- (v) Avaliar alterações microestruturais e propriedades mecânicas do cimento de fosfato de cálcio decorrentes da adição de diferentes concentrações de fibroína de seda;
- (vi) Avaliar alterações nas propriedades biológicas do cimento de fosfato de cálcio decorrentes da adição de diferentes concentrações de fibroína de seda;
- (vii) Comparar os resultados obtidos para o cimento de fosfato de cálcio com adição de fibroína de seda com os obtidos para o cimento puro.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é uma estrutura hierárquica única, que fornece suporte mecânico e proteção aos órgãos internos, enquanto produz células sanguíneas e regula o estoque de minerais e o pH sanguíneo (Farokhi et al., 2016). A estrutura óssea forma um material rígido, fornecendo pontos de adesão para músculos esqueléticos, e ao mesmo tempo tenaz, prevenindo fraturas da estrutura. Levando em consideração sua estrutura macroscópica, o osso pode ser classificado de acordo com sua densidade em duas formas: osso cortical e osso trabecular, que representam, respectivamente, a estrutura externa e interna do osso (Bilgiç et al., 2020). A estrutura óssea está representada na Figura 1.

O osso cortical é rígido e compacto, constituindo cerca de 80% do esqueleto ósseo e possuindo porosidade de 5-10%. Nesta estrutura, os vasos sanguíneos estão presentes em estruturas cilíndricas microscópicas denominadas canais de Harvers. Estes canais são conectados transversalmente por estruturas chamadas de canais de Volkmann (Suchanek e Yoshimura, 1998; Wu et al., 2014). Além disso, o osso cortical é organizado em uma estrutura de camadas regulares chamadas de lamelas, as quais são concêntricas aos canais de Harvers. Estas lamelas são formadas por ósteons, também denominados de sistemas de Harvers, em que estão presentes os osteócitos (Bilgiç et al., 2020).

O osso trabecular, no entanto, apresenta cerca de 50-95% de porosidade e possui vasos sanguíneos, medula óssea e gordura, sendo diretamente responsável pela produção de células sanguíneas (Fyhrie e Kimura, 1999; Hofmann et al., 2007). Sua estrutura consiste em cavidades que contêm medula óssea e filamentos de tecido ósseo cruzados através desta cavidade, denominados trabéculas. As trabéculas estão organizadas de maneira irregular e, apesar de parecer aleatória, a organização é extremamente precisa, promovendo máxima resistência à estrutura (Bilgiç et al., 2020).

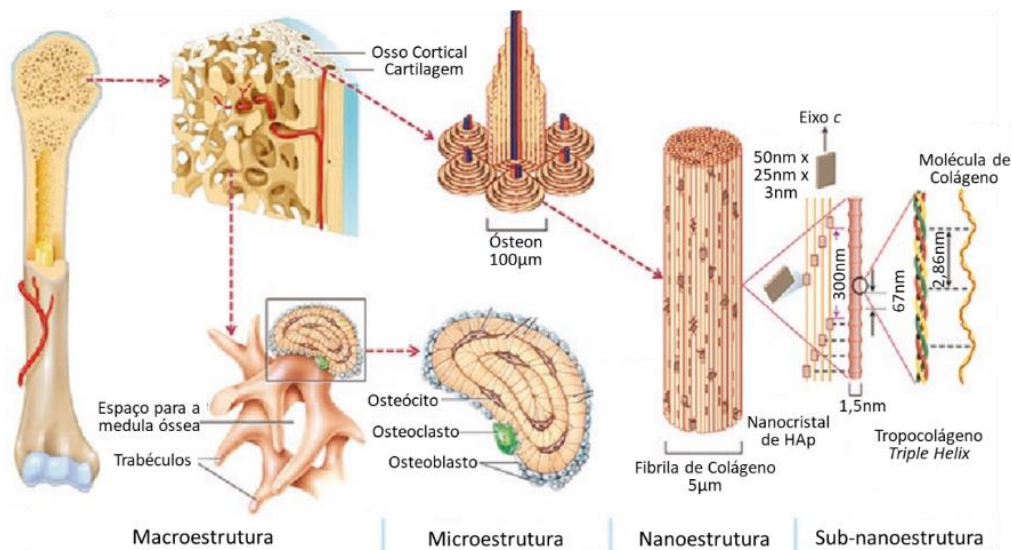


Figura 1: Representação esquemática da estrutura óssea sob escala macro, micro, nano e sub-nanométrica.

Fonte: Adaptado de Hasirci e Hasirci (2018)

Considerando a microestrutura do tecido ósseo, este apresenta uma matriz extracelular (ECM) com uma fase orgânica fibrosa e nanocristais inorgânicos, além de ser constituída de 10-20% de água. A fase orgânica apresenta 90-95% de colágeno tipo I (Col-I), juntamente com outras proteínas e proteoglicanos (Wu et al., 2014; Bilgiç et al., 2020). Esta fase orgânica fibrosa é altamente responsável pela resistência à tração e tenacidade do osso e serve como substrato para o crescimento dos nanocristais que constituem a fase inorgânica deste tecido (Jang, Castano e Kim, 2009). Já a fase inorgânica óssea é majoritariamente constituída por hidroxiapatita (HAp), que representa 70% em massa desta fase, além de apresentar menores quantidades de carbonatos, citratos e sais de magnésio, potássio e sódio (Bilgiç et al., 2020). A HAp presente no osso pode apresentar baixas quantidades de substituições iônicas, principalmente substituições do grupo hidroxila (OH^-) ou íon fosfato (PO_4^{3-}) por íons carbonato (CO_3^{2-}), flúor (F^-) e cloro (Cl^-) (Ratnayake, Mucalo e Dias, 2017). A HAp é formada através da desfosforilação de espécies bioquímicas promovida por enzimas fosfatase alcalina (ALP), processo que garante a resistência à compressão e a rigidez do osso, enquanto a incorporação de substituições iônicas à sua estrutura promove uma leve acidificação local

na superfície óssea que ativa osteoclastos no processo de reabsorção óssea (Swetha et al., 2010; Ratnayake, Mucalo e Dias, 2017; Bilgiç et al., 2020).

A partir deste entendimento, podemos considerar o tecido ósseo como um material compósito de origem natural. Os valores das propriedades mecânicas dos diferentes ossos e estruturas ósseas estão representados na Tabela 1.

Tabela 1: Propriedades mecânicas de diferentes estruturas ósseas.

| Osso humano | Resistência à Compressão (MPa) | Módulo de Elasticidade (GPa) | Tenacidade à Fratura, K_{IC} (MPa. m ^{1/2}) |
|-------------|--------------------------------|------------------------------|---|
| Trabecular | 2-12 | 0,05-0,5 | – |
| Cortical | 100-230 | 7-30 | 2-12 |
| Tíbia | 159 | 18,2 | – |
| Fêmur | 167 | 17,2 | – |
| Úmero | 132 | 17,2 | – |

Fonte: Kokubo, Kim e Kawashita (2003)

3.1.1 Regeneração Óssea

As estruturas ósseas apresentam uma capacidade de regeneração e remodelamento admirável, a qual é induzida por estímulos mecânicos ou danos ao tecido. Entretanto esta regeneração é limitada por diversos fatores, como suprimento inadequado de sangue, instabilidade mecânica e tamanho do defeito ósseo (Chen et al., 2020) e somente ocorre quando uma série de processos sequenciais é atendida (Al-Aql et al., 2008; Stace et al., 2016). De forma geral, podemos classificar os processos de regeneração óssea em dois mecanismos: ossificação endocondral e ossificação intramembranosa. O processo de regeneração, de forma generalizada, está resumido na Figura 2.

A ossificação endocondral é o mecanismo de regeneração óssea de maior ocorrência e apresenta extrema importância na formação de ossos longos, como o fêmur e o úmero, e de diversos ossos irregulares pequenos, como as costelas (Hu et al., 2005). Esta ossificação apresenta 4 etapas: a resposta inflamatória, formação cartilaginosa, substituição de cartilagem por osso primário e formação e remodelamento do osso

secundário (Phillips, 2005; Al-Aql et al., 2008). Primeiramente, as plaquetas interagem com as fibras de colágeno expostas no subendotélio dos vasos sanguíneos, formando um hematoma em poucas horas após a fratura. Após a formação do hematoma, células inflamatórias e células-tronco mesenquimais (MSCs) são atraídas ao local devido à secreção de citocinas (Lauzon et al., 2012). Devido aos baixos níveis de oxigênio no local da lesão, o fator induzido por hipoxia 1α (HIF- 1α) é expresso, aprimorando a regeneração óssea e a angiogênese (Wan et al., 2008). Os novos vasos sanguíneos formados pela influência do HIF- 1α são responsáveis pelo aumento do transporte de MSCs ao local da fratura, as quais irão diferenciar-se em condrócitos durante a fase inflamatória e irão formar uma nova estrutura cartilaginosa (Lauzon et al., 2012). O crescimento vascular é seguido da formação de uma nova matriz de colágeno, secreção osteoide e calcificação do tecido cartilaginoso. O remodelamento ósseo irá ocorrer por vários meses até a formação de um novo osso modelado à sua forma original.

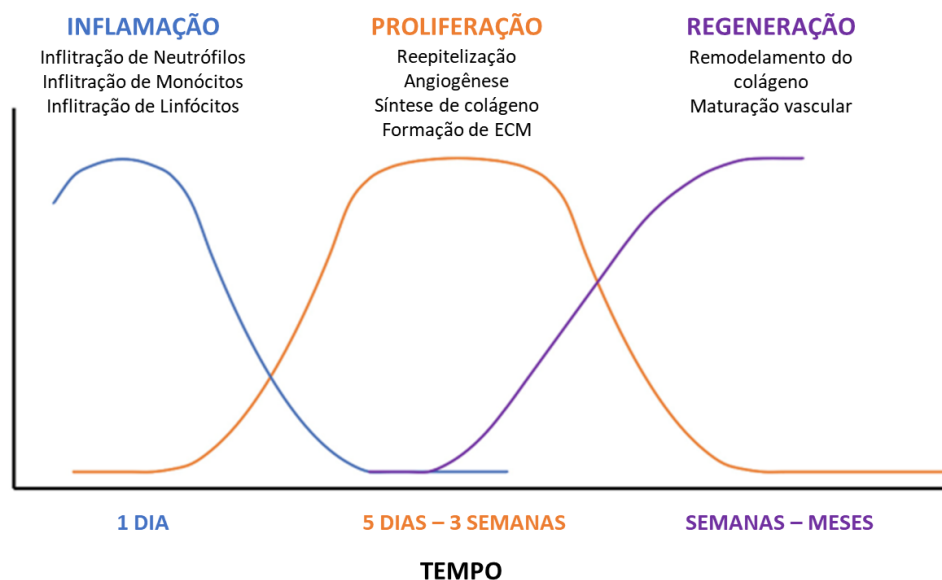


Figura 2: Processo genérico de regeneração tecidual.

Fonte: Adaptado de Hasirci e Hasirci (2018)

Já a ossificação intramembranosa ocorre principalmente durante o desenvolvimento inicial de ossos planos, além de auxiliar na regeneração de fraturas. Neste processo, MSCs irão se diferenciar tanto em vasos capilares quanto em osteoblastos. As MSCs diferenciadas em osteoblastos apresentam alta capacidade de produzir uma matriz de colágeno com sais de cálcio (Gilbert, 2000). Os osteoblastos

produzem, então, um colar ósseo ao redor da região hipertrófica e, finalmente, a ossificação primária se forma ao longo do osso através do crescimento de vasos sanguíneos (Olsen, 2006).

3.2 BIOMATERIAIS

A utilização de materiais em aplicações clínicas remonta há milhares de anos e teve enorme impacto no tratamento de traumas e doenças. Ao longo do desenvolvimento da humanidade, materiais naturais e alguns metais foram testados para tratar diversos traumatismos; entretanto, somente a partir da década de 1860, através da introdução de técnicas de assepsia cirúrgica pelo médico e cirurgião Joseph Lister, o desenvolvimento de biomateriais se tornou significativo. As expectativas com relação à interação entre o biomaterial e os tecidos biológicos têm evoluído com o aumento da nossa compreensão sobre as estruturas teciduais, doenças e biologia desenvolvimentista. Inicialmente, o desenvolvimento de materiais para aplicações clínicas era concentrado em se obter a maior inércia possível em sua interação com o tecido; atualmente, no entanto, grande parte dos estudos focam na obtenção de biomateriais com capacidade de provocar determinadas reações no organismo, como a estimulação da regeneração tecidual (Williams, 2009; Kuhn, 2011; Hudecki, Kiryczyński e Łos, 2018).

O termo “biomaterial” já foi utilizado para descrever diversas aplicações de materiais e, por isso, não há um consenso sobre uma definição única para este termo. Park e Lakes (2007) definem “biomaterial” como *qualquer material utilizado para elaborar dispositivos para substituir uma parte ou função do corpo de maneira segura, confiável, econômica e fisiologicamente aceitável*. No entanto, o desenvolvimento de novas tecnologias clínicas, como sistemas de liberação de fármacos e genes, engenharia de tecidos e terapia celular, têm expandido e inovado as aplicações de biomateriais, exigindo definições mais compatíveis com estas novas aplicações.

Williams (2009) propôs uma definição mais abrangente para o termo, de forma a considerar estes novos desenvolvimentos. Williams potencializa a ideia de que o termo biomaterial deve estar relacionado à área da saúde e que o material classificado sob este

termo deve apresentar interface com os tecidos ou com seus componentes. A proposta é de que “biomaterial” seja definido como

uma substância que foi projetada para assumir uma forma na qual, sozinha ou como parte de um sistema complexo, é usada para direcionar, pelo controle das interações com componentes de sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico, na medicina humana ou veterinária.

(Williams, 2009)

Apesar das diferenças entre as definições específicas adotadas por diferentes autores, todas exigem a biocompatibilidade como requisito básico de um biomaterial. Esta propriedade foi definida na I Conferência de Consenso da Sociedade Europeia para Biomateriais como a *habilidade de um material de atuar com uma resposta apropriada do hospedeiro em uma aplicação específica* (Williams, 1999; Anderson, 2019). A biocompatibilidade de um material é determinada por dois fatores: a resposta que o material estimula no organismo e a resposta induzida pela degradação do material provocada pela sua interação com o organismo (Hudecki, Kiryczyński e Łos, 2018).

Assim, os biomateriais podem ser classificados de acordo com a resposta fisiológica que provocam nos tecidos adjacentes. As classificações mais usuais dividem estes materiais em 5 categorias: tóxicos, biotoleráveis, bioinertes, bioativos e reabsorvíveis (Osborn, 1979; Hench e Wilson, 2013).

Tóxicos:

Materiais que causam a morte celular e necrose dos tecidos adjacentes ao implante ou liberam substâncias capazes de serem transportadas pelo organismo e causar danos sistêmicos ao hospedeiro. Este tipo de reação não é aceitável em um biomaterial considerado adequado à aplicação.

Biotoleráveis:

Materiais apenas tolerados pelo organismo. Estes materiais não causam reações tóxicas aos tecidos adjacentes, mas provocam a formação de uma camada envoltória de

tecido fibroso de forma a isolar o implante dos tecidos adjacentes. A espessura do tecido formado depende de fatores relacionados ao implante – como composição, morfologia e porosidade da superfície –, ao organismo – como circulação sanguínea no local, tipo, idade e estado de saúde do tecido em contato com o implante – e à movimentação da interface implante/tecido. Tipicamente, pode-se inferir que quanto mais reativo for o material do implante, maior será a camada de tecido fibroso formado. Esta categoria engloba a grande maioria dos metais e dos polímeros aplicados como biomateriais.

Bioinertes:

Materiais que provocam mínima ou nenhuma formação de camada de tecido fibroso no entorno do implante. O material libera alguns componentes em quantidades mínimas, apresentando resposta fagocitária baixa e passageira. Essa categoria engloba a alumina (Al_2O_3), a zircônia, o carbono e as ligas de titânio.

Bioativos:

Materiais que provocam a formação de ligações químicas com o entorno do implante e/ou a regeneração do tecido adjacente. Estas ligações imitam a interface formada durante a regeneração tecidual e garantem boa fixação do implante, prevenindo sua movimentação. A interface formada está em equilíbrio dinâmico com os tecidos e, dessa forma, se modifica com o tempo.

Bioabsorvíveis:

Materiais que são dissolvidos ou absorvidos pelo organismo e substituídos pelo tecido adjacente. Um biomaterial desta categoria não pode apresentar produtos de degradação que provoquem danos ao organismo e deve apresentar a possibilidade de ser degradado pelos fluidos corporais ou digerido por macrófagos. Além disso, este deve apresentar taxas de degradação compatíveis com a regeneração do tecido adjacente.

Além das considerações fisiológicas, é extremamente necessário considerar as solicitações mecânicas a que os biomateriais serão submetidos no local de implantação. Essas solicitações contribuem para a falha de próteses e deverão ser consideradas para cada aplicação, já que o material implantado deve apresentar propriedades mecânicas

compatíveis com os esforços locais e com o tecido adjacente, especialmente em casos de implantes de longa vida útil.

Alguns exemplos de biomateriais e suas respectivas aplicações no corpo humano estão representados na Figura 3.

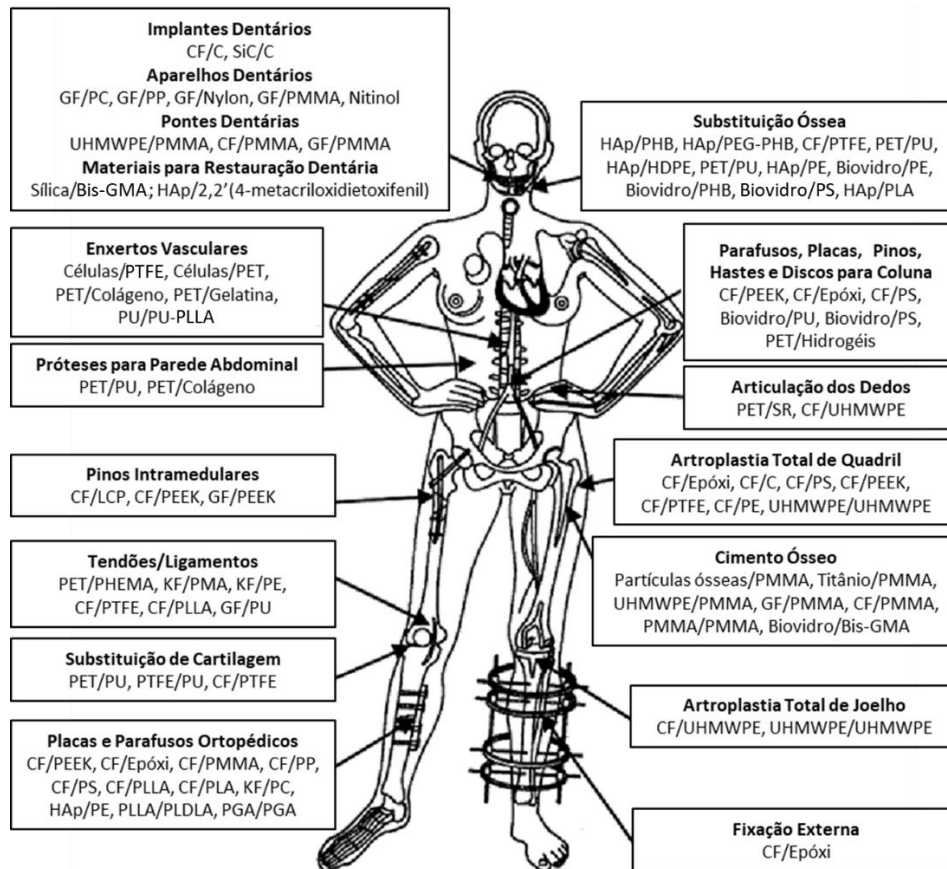


Figura 3: Exemplos de aplicações de biomateriais.

Fonte: Adaptado de Hasirci e Hasirci (2018)

3.2.1 Biomateriais cerâmicos

Devido à sua inércia química, materiais cerâmicos foram utilizados como biomateriais com o intuito de que, ao serem aplicados, estes provocassem mínima ou nenhuma reação do tecido adjacente. Entretanto, com o aumento do conhecimento na área, o desenvolvimento de biomateriais cerâmicos passou a ser dedicado a materiais com capacidade de provocar reações específicas no organismo, induzindo a regeneração

tecidual e a ligação interfacial entre o material e os tecidos adjacentes (dos Santos, 2002b).

Com relação a sua aplicação como biomateriais, as cerâmicas apresentam diversas vantagens, como sua biocompatibilidade e alta resistência ao desgaste e à compressão. As biocerâmicas podem ser aplicadas como monocristais, policristais, vidros, vitrocerâmicas ou compósitos e podem atuar na regeneração ou substituição do tecido ósseo, aplicações odontológicas ou como recobrimento de implantes (Kuhn, 2011; Hench e Wilson, 2013).

Em casos em que o material é utilizado como material de implante ou revestimento, a fixação deste ao tecido adjacente pode ocorrer de diferentes formas, sendo dividida nas seguintes classes: fixação morfológica, fixação biológica, fixação bioativa e fixação de implantes bioabsorvíveis (Hasirci e Hasirci, 2018). A estabilidade e bioatividade relativa das biocerâmicas de diferentes fixações estão representadas na Figura 4.

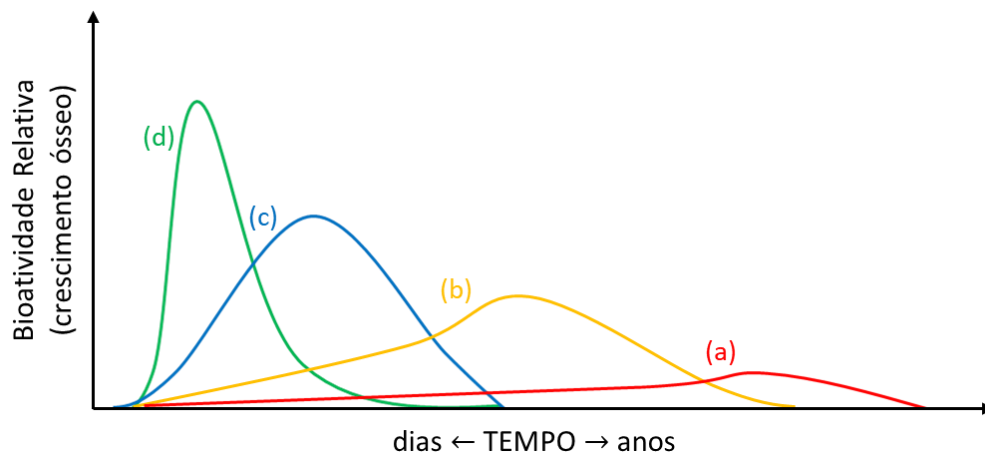


Figura 4: Estabilidade e bioatividade de biocerâmicas de fixação (a) morfológica (cerâmicas bioinertes), (b) biológica (cerâmicas bioinertes porosas), (c) bioativa e (d) de implantes bioabsorvíveis.

Fonte: Adaptado de Hasirci e Hasirci (2018)

Fixação morfológica:

Implantes nos quais a fixação ocorre através da adição de cimentos entre a peça e o tecido ou que são encaixados ao local de implantação por pressão, de forma a não permitir a existência de espaços para a movimentação da prótese. Próteses de alumina

(Al₂O₃) mono ou policristalina são exemplos de biocerâmicas comumente implantadas com este tipo de fixação.

Fixação biológica:

Implantes de cerâmicas porosas e inertes nos quais a fixação ocorre pelo crescimento do tecido dentro dos poros, impondo o travamento mecânico da prótese. Um exemplo deste mecanismo seria a aplicação de implantes de alumina policristalina.

Fixação bioativa:

Implantes de cerâmicas com superfície reativa que se fixam diretamente ao tecido através de ligações químicas com este. A aplicação de biovidros, vitrocerâmicas, cerâmicas funcionalizadas e hidroxiapatitas são exemplos comuns deste mecanismo de fixação.

Fixação de implantes bioabsorvíveis:

Implantes cerâmicos com fixação breve ao tecido, já que são projetados para apresentar uma absorção otimizada ao organismo, de forma a garantir sua substituição pelo tecido original em que está implantado. Esta classe de fixação engloba materiais de sulfato de cálcio e diversos fosfatos de cálcio.

Alguns exemplos de aplicações frequentes de biocerâmicas estão representados na Figura 5.

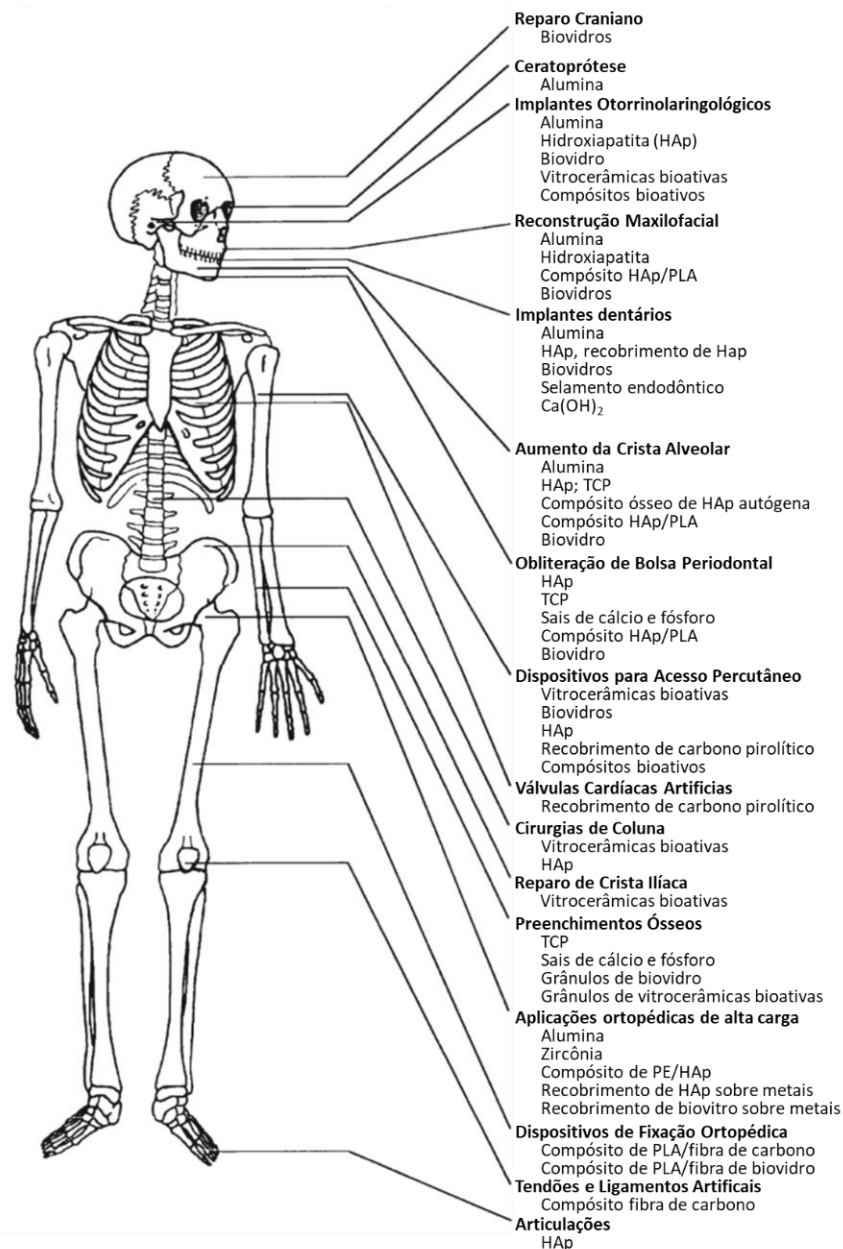


Figura 5: Aplicações clínicas de biocerâmicas.
Fonte: Adaptado de Hench e Wilson (2013)

3.2.1.1 Cimentos de Fosfato de Cálcio

Os CPCs foram inicialmente sugeridos como possíveis materiais para restaurações dentárias por LeGeros, Chohayeb e Schulman (1982) e desenvolvidos por Brown e Chow (1983). Estes materiais são, atualmente, um dos mais promissores em aplicações voltadas para a substituição e preenchimento ósseo (Zhang et al., 2014; Feng

et al., 2020). O crescente interesse se deve à excelente biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade exibida por estes materiais, além de possuírem fácil manuseio, moldabilidade e apresentarem produtos de seu processo de pega com composição similar à fase mineral óssea (Lodoso-Torrecilla, van den Beucken e Jansen, 2021).

De forma ampla, os CPCs podem ser descritos como cimentos hidráulicos, formados através da mistura de um ou mais ortofosfatos de cálcio com uma fase líquida. Esta mistura produz uma pasta moldável com capacidade de passar pelo processo de pega e endurecer após ser aplicada no organismo (Ginebra et al., 2010).

O endurecimento do material ocorre, principalmente, através da precipitação de cristais entrelaçados após a dissolução do fosfato de cálcio inicial. Estes cristais aumentam a resistência mecânica do CPC através do ancoramento mecânico e apresentam alta área superficial (Liu et al., 2013; O'Neill et al., 2017). Esta reação de pega não é altamente exotérmica, transferindo pouco calor, e não libera substâncias tóxicas ao organismo. Estas características representam grandes vantagens em comparação ao poli(metilmetacrilato) (PMMA), que é, atualmente, o cimento ósseo mais amplamente utilizado em cirurgias ortopédicas (He et al., 2015; Lodoso-Torrecilla, van den Beucken e Jansen, 2021). Entretanto, as propriedades mecânicas destes cimentos não são adequadas para aplicações em sistemas de alta sollicitação mecânica, somente sendo utilizados em aplicações bucomaxilofaciais (Canal e Ginebra, 2011; Cao et al., 2014).

3.2.1.2 α -Fosfato Tricálcico

O fosfato tricálcico apresenta 3 formas polimórficas: a fase de baixa temperatura (β -TCP) e as fases de alta temperatura (α - e α' -TCP). Entretanto, a fase α' -TCP somente existe a temperaturas superiores a 1430°C, se revertendo instantaneamente à fase α quando resfriada abaixo desta temperatura (Tronco, Cassel e dos Santos, 2022). Apesar de possuírem a mesma composição química, estas fases se diferenciam substancialmente em sua estrutura cristalina e, conseqüentemente, em sua densidade e solubilidade, fatores que determinam suas propriedades biológicas e aplicações clínicas. O α -TCP é consideravelmente mais solúvel do que sua fase β , o que permite tempos de

pega mais adequados a aplicações clínicas quando utilizado em CPCs (Carrodegus e de Aza, 2011).

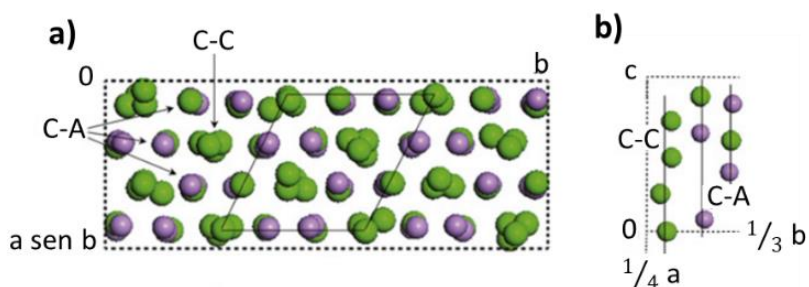


Figura 6: Representação esquemática da estrutura do α -TCP. Projeção (a) de vista superior da célula unitária ao longo da direção $[0\ 0\ 1]$ e (b) projeção fracional das células unitárias no plano bc, evidenciando a disposição dos átomos ao longo da direção $[0\ 0\ 1]$. Átomos Ca^{2+} estão representados em verde e P^{5+} em roxo. Íons O^{2-} não foram representados para uma melhor clareza da estrutura.

Fonte: Adaptado de Carrodegus e De Aza (2011)

A estrutura do α -TCP foi primeiramente descrita por Dickens e Brown (1972) como sendo similar à estrutura da glaserita $[\text{K}_3\text{Na}(\text{SO}_4)_2]$ e, posteriormente, foi mais detalhadamente estudada por Mathew et al. (1977) e Yashima e Sakai (2003). Esta estrutura está representada na Figura 6 e apresenta célula unitária monoclinica em que íons de Ca^{2+} e PO_4^{3-} são empacotados em colunas C-C e C-A ao longo da direção cristalográfica $[0\ 0\ 1]$. As colunas C-C apresentam somente cátions Ca^{2+} e são envoltas por 6 colunas C-A, que apresentam tanto cátions Ca^{2+} quanto ânions PO_4^{3-} . Os parâmetros de rede das estruturas polimórficas do TCP se encontram detalhados na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros de rede das estruturas polimórficas do Fosfato Tricálcico.

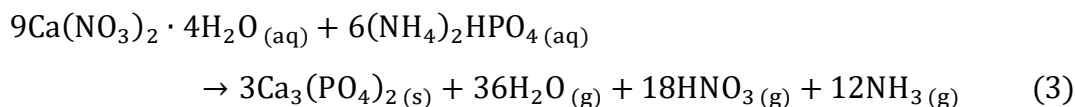
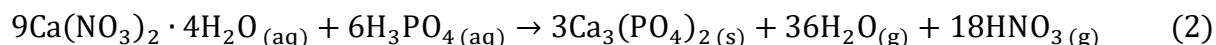
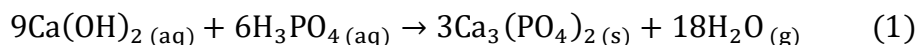
| Propriedade | Forma alotrópica de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | | |
|----------------|--|-----------------|--------------------------|
| | β -TCP | α -TCP | α' -TCP |
| Simetria | Romboédrica | Monoclínica | Hexagonal |
| Grupo espacial | R3C | $\text{P}2_1/a$ | $\text{P}6_3/\text{mmc}$ |
| a (nm) | 1,04352(2) | 1,2859(2) | 0,53507(8) |
| b (nm) | 1,04352(2) | 2,7354(2) | 0,53507(8) |
| c (nm) | 3,74029(5) | 1,5222(3) | 0,7684(1) |
| α (°) | 90 | 90 | 90 |
| β (°) | 90 | 126,35(1) | 90 |
| γ (°) | 120 | 90 | 120 |
| <i>D</i> | 3,066 | 2,866 | 2,702 |

Fonte: Adaptado de Carrodegus e De Aza (2011)

Como o α -TCP é metaestável à temperatura ambiente, não é possível realizar sua síntese direta através da precipitação em soluções aquosas e, para sua obtenção, é necessária a realização de reações em estado sólido sob altas temperaturas (Fathi et al., 2015). Assim, existem duas metodologias principais empregadas na síntese de α -TCP: a síntese por via úmida e a síntese por via seca.

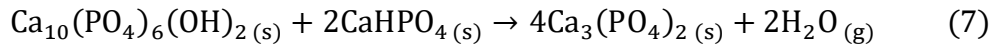
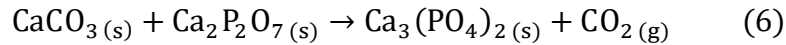
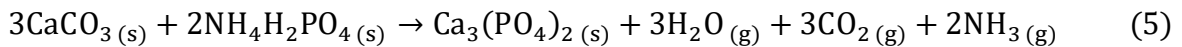
Via úmida

A síntese por via úmida consiste na precipitação em solução aquosa de hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA) de razão Ca/P de 1,5 ou de fosfato tricálcico amorfo (ACP), e sua posterior transformação térmica em α -TCP. Estes métodos permitem a obtenção da fase através de diferentes mecanismos, os quais dependem do precursor obtido durante a precipitação: o CDHA cristaliza primeiramente em β -TCP e, por isso, necessita de tratamentos de alta temperatura para a obtenção da fase α ; já o ACP cristaliza inicialmente e preferencialmente em α -TCP, necessitando de temperaturas próximas à 650°C para obtenção desta fase. As reações globais para a combinação de reagentes mais utilizadas estão descritas nas equações (1), (2) e (3) (Tronco, Cassel e dos Santos, 2022).



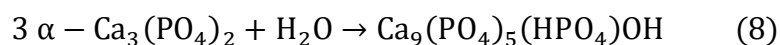
Via seca

A síntese por via seca consiste na reação entre reagentes sólidos precursores de α -TCP durante sua calcinação a altas temperaturas. Esta é a via de síntese mais reportada na literatura e as reações mais convencionais estão descritas nas equações (4), (5), (6) e (7) (Carrodegua e de Aza, 2011; Tronco, Cassel e dos Santos, 2022). Após a homogeneização dos precursores, estes são tratados termicamente acima da temperatura de transformação, geralmente entre 1250°C e 1500°C.



A obtenção de α -TCP puro é extremamente difícil, pois diversos parâmetros influenciam a temperatura de transformação de fase $\beta \rightarrow \alpha$. Um dos parâmetros de maior importância é a pureza dos reagentes (Duncan et al., 2014). Diversos íons metálicos como Sr^{2+} , Zn^{2+} , e Mg^{2+} substituem íons Ca^{2+} na estrutura do TCP e estabilizam a fase β (Frasnelli e Sglavo, 2016; Lode et al., 2018; Shi et al., 2018). Como o carbonato de magnésio (MgCO_3) é comumente associado ao CaCO_3 , íons Mg^{2+} são impurezas comuns nos precursores de cálcio da via seca e, por isso, sínteses por via úmida estão ganhando cada vez mais destaque em pesquisas envolvendo α -TCP (Tronco, Cassel e dos Santos, 2022).

Considerando sua aplicação como um CPC, a reação de pega do α -TCP é extremamente vantajosa. A hidratação deste material foi primeiramente descrita por Monma e Kanazawa (1976), entretanto a primeira formulação de um CPC contendo quantidade substancial de α -TCP com tempo de pega aceitável para aplicações clínicas foi descrita por Ginebra et al. (1994). Esta reação ocorre através da solubilização do α -TCP e reprecipitação do material como hidroxiapatita deficiente em cálcio [$\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_5(\text{HPO}_4)\text{OH}$, CDHA], conforme a equação (8). A CDHA apresenta grande similaridade química e cristalográfica com a fase mineral óssea, o que torna formulações de CPCs baseadas em α -TCP um grande interesse na área de regeneração e preenchimento ósseo. Além disso, CPCs baseados nesta fase, ao serem implantados *in vivo*, demonstraram boa osteointegração e osteocondução, formando uma interface com o tecido ósseo que permite a regeneração óssea e a absorção e substituição do material por osso nativo (Valle et al., 2007; Feng et al., 2020).



3.2.1.3 Cimentos de α -TCP pré-misturados

Conforme supracitado, CPCs convencionais consistem em misturas de pós de ortofosfatos de cálcio que serão misturados com um líquido de pega aquoso para a formação de uma pasta autocurável. Entretanto, algumas limitações surgem deste uso, como a necessidade de mistura imediatamente antes da implantação e o tempo limitado para a realização da implantação após a mistura dos materiais (Lode et al., 2018).

Takagi et al. (2003) desenvolveu o primeiro estudo a propor um cimento de fosfato de cálcio pré-misturado, ou seja, um CPC já misturado com sua fase líquida sem que a reação de pega ocorra. Takagi e colaboradores desenvolveram uma pasta de fosfato tetracálcico (TTCP) e fosfato dicálcico anidro (DCPA) com a adição de uma solução não-aquosa (glicerol), de forma que a pega do cimento somente ocorresse através do contato deste com o local do implante e, conseqüentemente, com a água presente nos tecidos adjacentes. Este estudo serviu como base para diversos sistemas similares baseados em α -TCP e com adição de fases líquidas não-aquosas, majoritariamente baseadas em óleos (Heinemann et al., 2013; Lode et al., 2018; Irbe e Loca, 2021).

Outra proposta para inibir a reação do α -TCP e permitir o armazenamento de pastas foi a adição de íons inibidores de reação. Bohner et al. (2015) desenvolveu um CPC baseado em α -TCP com adição de uma solução aquosa de $MgCl_2$. Nesta composição, os íons Mg^{2+} presentes na solução se aderem às partículas de α -TCP, impedindo sua dissolução e, conseqüentemente, a reação de pega da pasta. A ativação desta ocorre de forma controlada através da adição de uma solução aquosa de $CaCl_2$. Os íons Ca^{2+} deslocam os íons de Mg^{2+} da superfície das partículas e permitem o início da reação de hidratação do cimento, conforme a Figura 7. Uma proposta similar foi desenvolvida por Weichhold et al. (2022), mas através da adição de soluções aquosas com a presença de íons de pirofosfato. Estes íons agem de maneira análoga aos íons Mg^{2+} , inibindo a dissolução das partículas de α -TCP. Este mecanismo de inibição, também conhecido por *dual paste*, devido à adição de uma segunda “pasta” para a ativação da reação, permite a mistura destes materiais através de metodologias que

garantem boa homogeneidade à pasta, como a mistura por duas seringas (Weichhold et al., 2022).

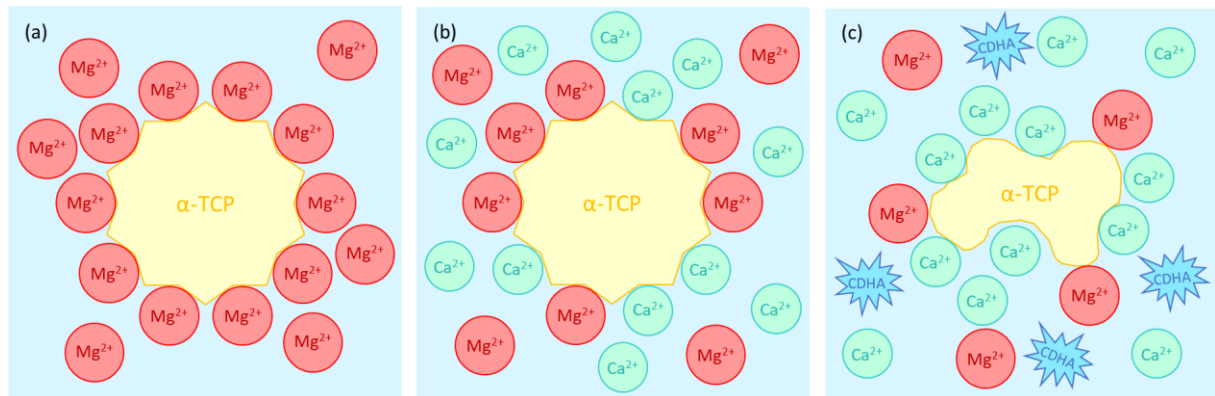


Figura 7: Mecanismos de (a) inibição da solubilização e hidratação do α -TCP através da adsorção de íons Mg^{2+} às partículas, (b) ativação da reação através da adição de íons Ca^{2+} e (c) solubilização do α -TCP e precipitação de CDHA.

Fonte: Adaptado de Bohner et al. (2015)

3.2.2 Biomateriais poliméricos

Biomateriais poliméricos são aplicados cada vez mais com o passar dos anos devido a sua diversidade de composições e grande variedade de propriedades, as quais podem ser modificadas para se adequarem à aplicação desejada. Além disso, estes podem ser obtidos em formas complexas através de diversos métodos de fabricação (Hasirci e Hasirci, 2018).

Polímeros sintéticos apresentam diversas vantagens sobre os naturais, como alta reprodutibilidade de suas propriedades e possibilidade de serem sintetizados em grande escala. Entretanto, a classe de maior interesse em aplicações biomédicas é, atualmente, a dos polímeros naturais, como proteínas e polissacarídeos (Loureiro dos Santos, 2017). Este interesse é relacionado à grande semelhança dos polímeros naturais com os tecidos de ocorrência natural no organismo, como a ECM, o que promove a ótima biocompatibilidade destes polímeros (Kuhn, 2011). Outrossim, polímeros naturais apresentam menor incidência de toxicidade e inflamação, quando comparados a materiais sintéticos, e apresentam custo relativamente baixo, o que é de grande interesse

para setores de alto valor, como o farmacêutico e biomédico (Smith, Moxon e Morris, 2016).

3.2.2.1 Fibroína de Seda

Há séculos, a seda tem sido utilizada como biomaterial polimérico para sutura e tratamento de ferimentos. Este material é um polímero natural produzido por diferentes insetos e aracnídeos, de forma a apresentar uma grande diversidade de propriedades e estruturas. A seda de maior interesse e caracterização na área de biomateriais é a produzida pelo bicho-da-seda *Bombyx-mori*, a qual apresenta maiores concentrações de aminoácidos básicos (arginina), ácidos (ácido aspártico) e polares (serina) em sua estrutura, o que, conseqüentemente, permite uma maior adesão celular (Malafaya, Silva e Reis, 2007; MacIntosh et al., 2008; Melke et al., 2016).

A seda é formada por duas proteínas principais: a sericina (proteína globular) e a fibroína (proteína fibrosa), as quais formam uma estrutura em que duas fibras de fibroína são envolvidas por uma camada de sericina, conforme a Figura 8. A sericina constitui cerca de 25 a 30% da massa da seda e é uma proteína hidrofílica, solúvel em água e de aspecto glutinoso (Melke et al., 2016; Bhattacharjee et al., 2017; Qi et al., 2017). A composição de aminoácidos da sericina e da fibroína estão descritas na Tabela 3. Entretanto, diversos estudos apontam que a sericina é responsável por diversas respostas imunogênicas após sua implantação e, por isso, é necessário que a seda passe por um processo físico-químico denominado degomagem para a remoção desta proteína (Kaplan et al., 1994; Li et al., 2014). Assim, as aplicações atuais da seda como biomaterial focam na utilização da fibroína de seda (SF).

A fibroína é um polímero semicristalino com estrutura que consiste em uma cadeia hidrofóbica densa (~390kDa, H) e uma cadeia hidrofílica leve (~26kDa, L) que são unidas através de uma ligação dissulfídica (através da presença de teores baixos de cisteína) ou através da glicoproteína fibrohexamerina (Fhx, previamente denominada P25), formando um complexo H-L. Esta glicoproteína, que apresenta ~25kDa, é ligada ao complexo H-L através de uma ligação não-covalente e está presente nestes complexos

em uma proporção 6:6:1 entre a cadeia-H, cadeia-L e a Fhx, respectivamente. A composição de aminoácidos presentes na fibroína consiste principalmente em glicina (43%, Gly), alanina (30%, Ala), serina (12%, Ser) e pequenas quantidades de tirosina (Tyr), os quais estão distribuídos nas cadeias H e L (Qi et al., 2017; Farokhi et al., 2018). As cadeias-H são formadas pela repetição de uma sequência hexapeptídica Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser e de uma sequência dipeptídica Gly-Ala/Ser/Tyr, conforme representado na Figura 9, formando estruturas β -sheet antiparalelas estáveis. Já as cadeias-L são não-repetitivas e, por isso, se tornam relativamente mais elásticas e hidrofílicas (Tanaka et al., 1999; Kundu et al., 2013; Qi et al., 2017; Farokhi et al., 2019).

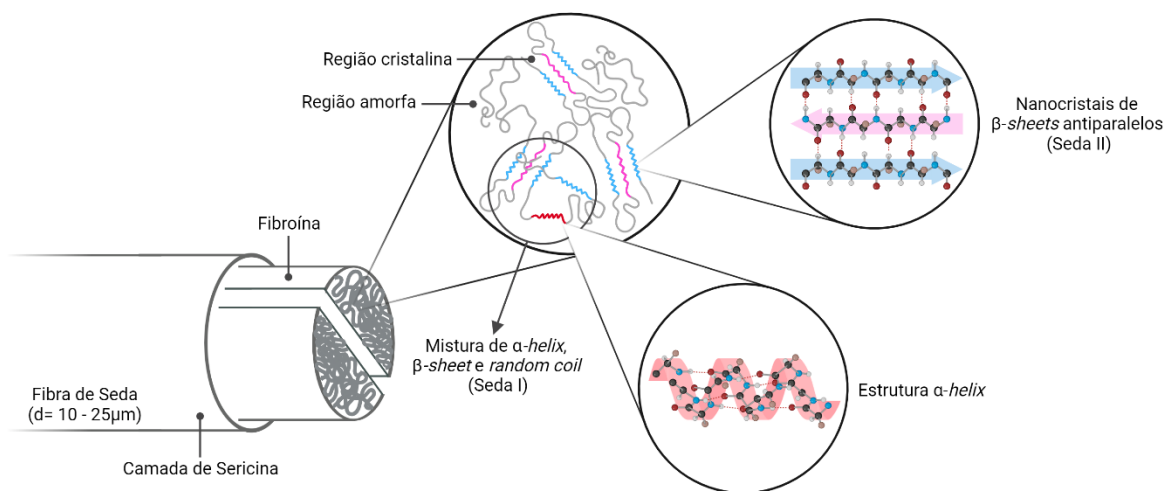


Figura 8: Representação esquemática da estrutura da fibroína de seda.

Fonte: Adaptado de Qi et al. (2017)

Tabela 3: Composição mássica dos principais aminoácidos presentes na fibroína e sericina de seda.

| | Fibroína | Sericina |
|-----|-----------------|-----------------|
| Gly | 42,8 | 8,8 |
| Ala | 32,4 | 4,0 |
| Ser | 14,7 | 30,1 |
| Tyr | 11,8 | 4,9 |
| Thr | 1,2 | 8,5 |
| Asp | 1,7 | 16,8 |
| Glu | 1,7 | 10,1 |
| Lys | 0,5 | 5,5 |

Fonte: Adaptado de Zhang e Wyeth (2010)

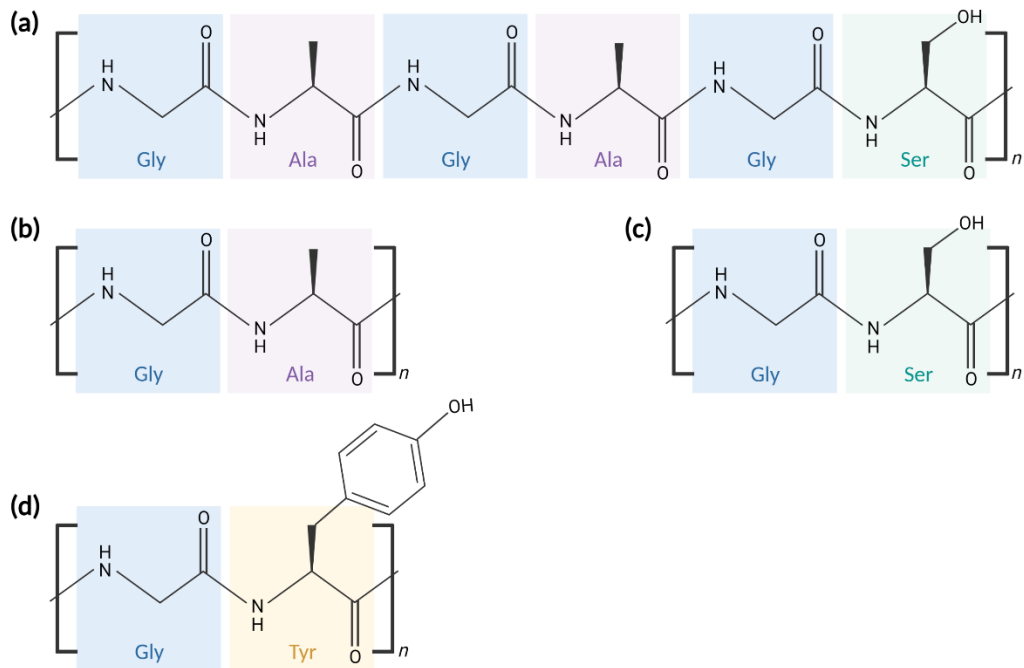


Figura 9: Sequências (a) hexapeptídica Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser e dipeptídicas (b) Gly-Ala, (c) Gly-Ser e (d) Gly-Tyr presentes nas cadeias-H da fibroína de seda.

Fonte: Adaptado de Cassel et al. (2023)

Estruturalmente, a SF apresenta domínios cristalinos e amorfos e é análoga ao colágeno tipo I (Col-I) presente no tecido ósseo (Farokhi et al., 2016; Coelho et al., 2020). Os domínios amorfos são formados, principalmente, por ácido aspártico. Já o domínio cristalino pode ser organizado em 3 estruturas principais: Seda I, Seda II e Seda III. A Seda I é uma estrutura solúvel em água e metaestável, formada por conformações *random coil* e α -*helix* e pertencendo ao sistema ortorrômbico. A Seda I pode ser transformada em Seda II através de tratamentos com metanol e fosfato de potássio (Volkov, Ferreira e Cavaco-Paulo, 2015; Melke et al., 2016). A Seda II é a conformação da fibroína em uma estrutura formada por β -*sheets* antiparalelas, a qual pertence ao sistema monoclinico, o que facilita o *crosslink* com proteínas através de ligações de hidrogênio e Van der Waals e contribui para a rigidez e resistência à tração da SF. Já a Seda III apresenta uma conformação helicoidal e se forma apenas em interfaces água/ar (Wang, Nemoto e Senna, 2004; Morgan et al., 2008; Wei et al., 2011; Farokhi et al., 2019). As estruturas Seda I e Seda II estão representadas na Figura 8.

As propriedades únicas da SF, como bioabsortividade, biocompatibilidade, baixa resposta imunogênica e comportamento mecânico robusto, fazem com que esta seja amplamente discutida e pesquisada com alto potencial em aplicações como biomaterial (Heimbach, Yu e Wei, 2020). Este material apresenta biocompatibilidade superior à de polímeros comumente aplicados na área médica, como o colágeno e o poli(L-ácido láctico) (PLLA) (Qi et al., 2017) e é adequado para uma grande variedade de aplicações, como a liberação controlada de drogas, regeneração de tecido vascular, tratamentos de feridas epiteliais e *scaffolds* para a engenharia de tecido ósseo (Kapoor e Kundu, 2016; Bhattacharjee et al., 2017). Além disso, a bioabsortividade desse material pode ser facilmente modificada através do controle da quantidade de β -*sheet* em sua estrutura secundária. Assim, materiais obtidos através do *solvent casting* de soluções de SF em meios orgânicos e materiais de SF tratados com metanol apresentam maior teor de β -*sheet* e podem levar um ano ou mais para serem completamente absorvidos *in vivo*, enquanto os obtidos através soluções de SF em meios aquosos são absorvidos em menos de 6 meses (Wang et al., 2008; Li et al., 2014).

Um grande interesse na área de regeneração óssea é a alta capacidade da fibroína de guiar o crescimento preferencial de cristais de fosfato de cálcio ao longo do eixo *c* da estrutura cristalina, de forma análoga ao Col-I (Mobika, Rajkumar, Nithya Priya, et al., 2020). Este crescimento é efetivamente controlado pelo posicionamento e densidade de resíduos de grupos aspartato, arginina e glutamato que estão arranjados em aglomerados polares nas estruturas β -*sheet*, os quais induzem uma distribuição de potencial na superfície do material devido à presença de grupos carboxila (-COOH), carbonila (-C=O) e hidroxila (-OH), e criam pontos de nucleação para fosfatos de cálcio (Özcan e Çiftçioğlu, 2022). Isso ocorre porque a exposição destes grupos aniônicos tende a concentrar íons de cálcio por atração eletrostática, resultando em uma supersaturação local e posterior nucleação de cristais. Desta forma, é possível mimetizar a biomineralização óssea, já que os fosfatos de cálcio crescem ao longo da direção preferencial instituída pela SF, resultando em cristais de tamanho reduzido e com formato de agulha, os quais se assemelham aos cristais presentes na fase mineral óssea (Huang et al., 2019; Zhang et al., 2020).

3.3 INTERAÇÃO DO BIOMATERIAL COM O CORPO

A partir da implantação de um material no organismo, uma série de reações no meio fisiológico e no sistema imunológico é desencadeada. A resposta biológica inicial é a formação, em um período de nanossegundos, de uma camada hidratada sobre a superfície do implante. Posteriormente, proteínas da matriz extracelular são adsorvidas na superfície do material implantado, formando uma camada proteica e, através desta, as células interagem com a superfície do implante (Roach et al., 2007). Esta adsorção superficial somente ocorre se a topografia e propriedades químicas e mecânicas do implante forem adequadas a ponto de permitir sua ocorrência (Hasirci e Hasirci, 2018).

Já a resposta inflamatória do sistema ocorre através do aumento da circulação sanguínea, aumento da atividade metabólica e acúmulo de fluido extracelular no local do dano tecidual. Quando este dano ocorre, seja causado pela lesão ou implantação, neutrófilos, células mononucleares e macrófagos são atraídos ao local, atacando e digerindo os microrganismos e detritos do tecido danificado. O estágio inicial da resposta inflamatória é completado entre 4 e 5 dias e, após, se iniciam os processos de migração, proliferação e remodelamento do tecido (Hasirci e Hasirci, 2018).

Como a interação do material com o corpo ocorre na interface implante-tecido, as propriedades superficiais do material determinam como irão ocorrer as interações entre o implante e o organismo. Esta interação causa efeitos no organismo e no biomaterial, que podem ser benéficos ou deletérios. Caso a interação célula-superfície seja deletéria, ocorrerá a apoptose celular, ou seja, a morte celular programada, a qual é de extrema importância para a eliminação de células supérfluas e defeituosas, mas provoca a necrose tecidual. Além disso, estas reações podem resultar na falha do implante, necessidade de demais procedimentos cirúrgicos e até o óbito do paciente (Ratner et al., 2004; Hasirci e Hasirci, 2018). As possibilidades de interação entre os tecidos e a superfície do biomaterial e a consequência destas estão representadas na Figura 10.

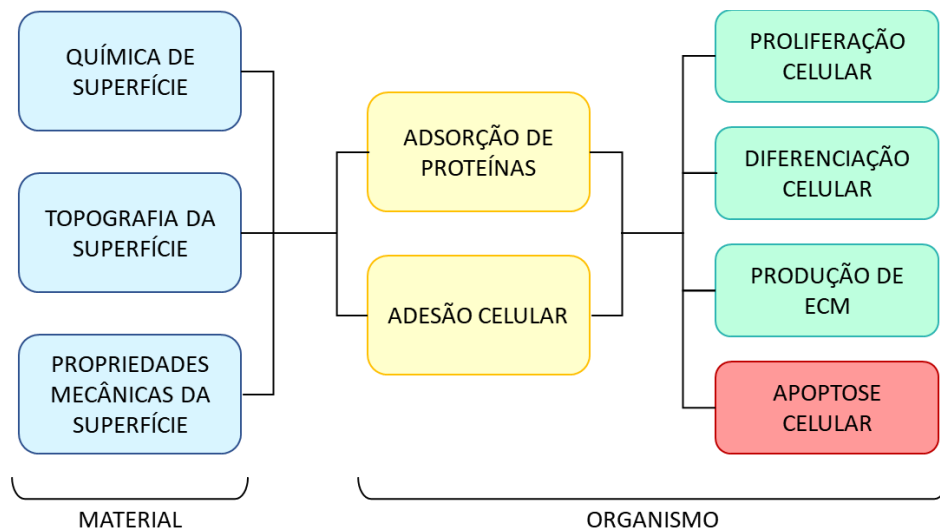


Figura 10: Possibilidades de interação entre a superfície do material e o sistema biológico.

Fonte: Adaptado de Hasirci e Hasirci (2018)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

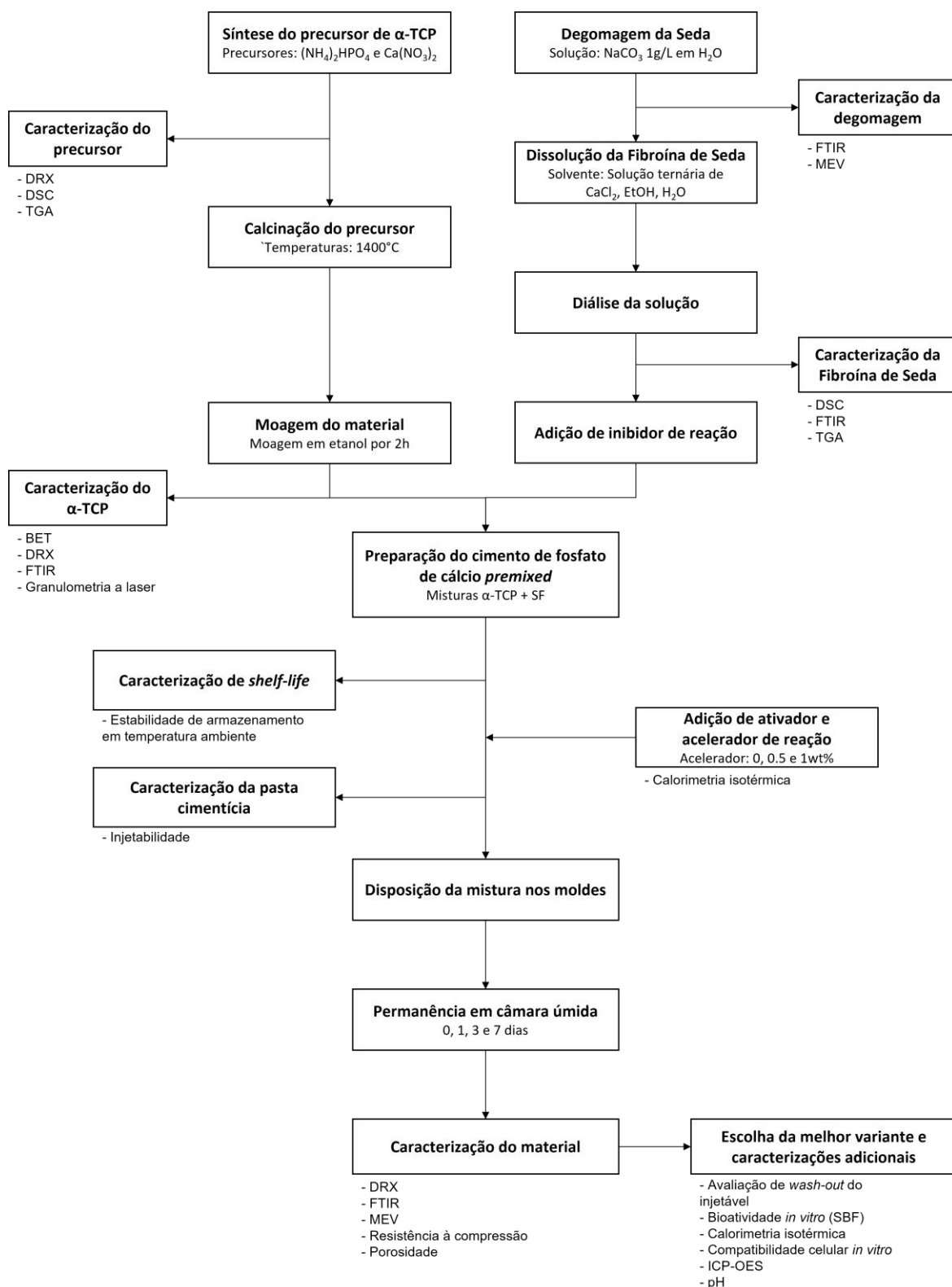


Figura 11: Fluxograma das etapas de desenvolvimento do trabalho.

Na Figura 11 é apresentado o fluxograma que ilustra as etapas da metodologia utilizada na elaboração deste projeto de pesquisa.

Este foi desenvolvido no Laboratório de Biomateriais e Cerâmicas Avançadas (Labiomat) do Departamento de Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), o qual está vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais (PPGE3M).

4.1 SÍNTESE DO α -FOSFATO TRICÁLCICO

A síntese de α -TCP foi realizada por via úmida, ou seja, através da calcinação de uma fase precursora obtida por precipitação em solução aquosa. Este precursor é obtido utilizando-se reagentes com a presença de Ca^{2+} e PO_4^{3-} em concentrações definidas, de forma a se manter a razão molar Ca/P em 1,5.

A síntese foi baseada no procedimento desenvolvido por Vásquez, Domínguez e Loureiro dos Santos (2017). Esta consiste em uma reação ácido-base, em que uma solução de 0,5M de hidrogenofosfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$, Dinâmica – P.A.] foi adicionada a uma solução de 0,5M de nitrato de cálcio $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2]$, Labsynth – P.A.] sob taxa de gotejamento de 20mL/min. A solução foi mantida à $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e sob agitação constante de 250rpm por 24h.

Para que a síntese resulte em um precursor com estequiometria correta para a obtenção do α -TCP após a calcinação, é necessário que o pH da suspensão se encontre dentro de uma faixa crítica. Assim, este foi mantido entre 8 e 9 através da adição de hidróxido de amônio $[\text{NH}_4\text{OH}]$, Dinâmica – P.A., a qual foi realizada em 3 etapas: (i) antes do início da reação, (ii) após a adição de 50% da solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e (iii) após a adição de toda a solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. As quantidades de solução e os parâmetros utilizados na síntese do precursor estão resumidos na Tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros de síntese utilizados na obtenção do α -TCP por via úmida.

| Concentração dos reagentes | Razão Ca/P dos reagentes | Volume de NH_4OH | pH da suspensão | Temperatura | Velocidade rotacional de agitação |
|----------------------------|--------------------------|----------------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|
| 0,5M | 1,5 | 80mL | 8 - 9 | $20 \pm 2^\circ\text{C}$ | 250 rpm |

A suspensão obtida foi filtrada a vácuo com um funil de Büchner e o pó resultante foi seco por 24h em estufa a 100°C. Posteriormente, o material foi moído manualmente com almofariz e pistilo de porcelana, peneirado em malha 60 mesh (abertura de 0,250mm) e calcinado a 1400°C em um forno elétrico CARBOLITE. Foram utilizadas duas rampas de aquecimento: (i) aquecimento da amostra até 1100°C sob taxa de aquecimento de 10°C/min e (ii) aquecimento até 1400°C sob taxa de aquecimento de 5°C/min. A amostra foi mantida a 1400°C por 2h e, após o patamar, o material foi resfriado até a temperatura ambiente no interior do forno. Finalmente, o produto foi moído a úmido em um moinho vibratório por 2h com esferas de alumina de 10,80mm de diâmetro. Cada grama de pó foi moído com 4 esferas de alumina e 2mL de etanol anidro [EtOH, Êxodo] e a suspensão obtida foi passada por peneira 325 mesh (abertura 0,040mm) e seca por 24h em uma estufa a 60°C. Tempos superiores de moagem não foram estudados devido à alta probabilidade de contaminação do material com polipropileno proveniente do frasco de moagem.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA SÍNTESE DE α -TCP

4.2.1 Caracterização do precursor

4.2.1.1 Difração de Raios-X

O precursor de α -TCP obtido por síntese de via úmida foi caracterizado de forma a se verificar qualitativamente as fases cristalinas presentes no pó obtido através da análise de difração de raios-X (DRX). A análise foi conduzida em um difratômetro Philips do modelo X'Pert MDP com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1,5418 \text{ \AA}$) e filtro de Ni ajustado a 40kV e 20mA. A varredura da amostra foi realizada com velocidade do goniômetro de 0,05°/s e no intervalo de $2\theta = 20^\circ$ a 50° .

4.2.1.2 Análises Térmicas

Para a avaliação das transformações que ocorrem no precursor obtido, foi realizada a análise térmica simultânea de análise termogravimétrica (TGA) com

calorimetria exploratória diferencial (DSC), denominada SDT. O equipamento SDT TA Instruments modelo Q600 foi acoplado a um espectrômetro Thermo Fischer Scientific do modelo Nicolet 6700 para análise de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) das substâncias eliminadas pelo material durante as perdas de massa apresentadas, de forma a se obter um maior entendimento dos mecanismos ocorridos nestas transformações. A análise foi realizada em atmosfera de nitrogênio (N₂) com vazão de 100mL/min e utilizando taxa de aquecimento de 20°C/min em um intervalo de 30°C a 1500°C.

4.2.2 Caracterização do pó de α -TCP obtido

4.2.2.1 Difração de Raios-X

As fases cristalinas presentes no pó obtido foram determinadas através da análise de difração de raios-X (DRX). Para a análise, foi utilizado um difratômetro Philips do modelo X'Pert MDP com radiação CuK α e filtro de Ni ajustado a 40kV e 20mA. A varredura da amostra foi realizada com velocidade do goniômetro de 0,015°/s e no intervalo de $2\theta=20^\circ$ a 50° . Para se obter a composição quantitativa das fases presentes no pó, o difratograma obtido foi avaliado através de refinamento de Rietveld com o *software* HighScore Plus versão 4.7 (PANalytical, Holanda). Para o refinamento, as estruturas ICSD 000923 (α -TCP, Mathew et al., 1977), ICSD 006191 (β -TCP, Dickens, Schroeder e Brown, 1974) e ICSD 026204 (HAp, Sudarsanan e Young, 1969) foram aplicadas.

4.2.2.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

Os grupamentos químicos do pó obtido foram analisados através de espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR). Para a análise, foi utilizado um espectrômetro Thermo Fischer Scientific do modelo Nicolet 6700 em modo de transmissão, com espectro na região de frequências entre 400 e 4000cm⁻¹.

4.2.2.3 Tamanho e área superficial específica de partícula

A distribuição de tamanhos de partícula foi avaliada através de granulometria a laser, a qual foi conduzida em um granulômetro Cilas modelo 1064, utilizando álcool isopropílico como líquido da suspensão. A área superficial específica das partículas foi avaliada através do método BET em um equipamento Quantachrome modelo Nova 1000e.

4.3 OBTENÇÃO DA SOLUÇÃO DE FIBROÍNA DE SEDA

4.3.1 Degomagem da seda

Para obtenção da fibroína de seda (SF), primeiramente, foi realizado o processo de degomagem de casulos de seda do inseto *Bombyx Mori*. Este processo é necessário para a remoção de impurezas e, principalmente, para a remoção da camada de sericina que envolve as fibras de fibroína. Neste trabalho, foi utilizado o processo descrito por Li et al. (2002). Os casulos foram imersos em uma solução de 1g/L de carbonato de sódio [Na_2CO_3 , Química Moderna – P.A.] a 85°C e mantidos sob agitação constante por 30min. Este processo foi realizado 3 vezes, trocando-se a solução entre as repetições. Posteriormente, as fibras foram enxaguadas e imersas em água destilada (H_2O) à temperatura ambiente e foram mantidas sob agitação por 30min. As fibras resultantes do processo foram secas em uma estufa a 37°C por 24h.

4.3.2 Dissolução da fibroína de seda

A dissolução das fibras de SF foi realizada em uma solução ternária de cloreto de cálcio [CaCl_2 , Dinâmica – P.A.], EtOH, e H_2O , com proporção molar de 1:2:8. As fibras foram adicionadas à solução em quantidades adequadas para a obtenção de uma solução de 12%(m/v) de SF e mantidas sob agitação por 4h à temperatura de 80°C.

A solução foi, então, dialisada por 48h contra água destilada e deionizada utilizando um tubo de diálise de celulose com corte de peso molecular de 3,5 kDa [3,5 MWCO SnakeSkin, ThermoFischer Scientific]. A água foi trocada após a primeira hora de diálise e, subsequentemente, a cada 12h. A concentração final da solução foi de 4%(m/v) de SF, a qual foi determinada através da massa do sólido resultante após a evaporação de 10mL de solução. A concentração da solução foi corrigida para 0,25; 0,50;

0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75 e 2,00%(m/v) através da dissolução da solução original com água.

Conforme demonstrado por Bohner et al. (2015), pastas de α -TCP armazenáveis foram obtidas através da mistura do pó com soluções aquosas de 0,1M de cloreto de magnésio ($MgCl_2$). Para a obtenção de uma solução SF/ $MgCl_2$ com capacidade de inibir a reação de hidratação do α -TCP, quantidades adequadas de $MgCl_2$ (NEON - P.A.) foram dissolvidas de forma a se obter concentrações de 0,1M deste cloreto nas soluções de SF.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSAMENTO DA FIBROÍNA DE SEDA

4.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para verificar a eficiência do processo de degomagem da seda, foi realizada a obtenção de imagens de MEV. A obtenção das imagens foi realizada em um microscópio eletrônico JEOL do modelo JSM 6060 com feixe de 15kV e sob ampliação de 300x. Previamente à análise, foi realizada metalização da superfície da amostra com uma fina camada de ouro, de forma a melhorar a condução da amostra.

4.4.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

A análise de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi aplicada de forma a se verificar os grupamentos químicos do polímero antes e após o processo de degomagem. A análise foi conduzida em um espectrômetro Thermo Fischer Scientific modelo Nicolet 6700 em modo ATR, com espectro na região de frequências entre 600 e 4000 cm^{-1} .

4.4.3 Calorimetria Exploratória Diferencial

Para a verificação da temperatura de transição vítrea e temperatura de degradação da SF, foi realizada a análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC). Esta análise foi conduzida em um calorímetro TA Instruments modelo Q2000 com aquecimento da amostra de 20°C a 350°C sob taxa de aquecimento de 10°C/min, atmosfera de N_2 e vazão de gás de purga de 50mL/min.

4.4.4 Análise Termogravimétrica

Para a verificação da estabilidade térmica e perda de massa da SF obtida, foi realizada a análise termogravimétrica (TGA). Esta análise foi conduzida em um equipamento Perkin Elmer modelo 4000, com aquecimento da amostra de 30°C a 350°C sob taxa de aquecimento de 10°C/min, atmosfera de N₂ e vazão de gás de purga de 20mL/min.

4.5 PREPARAÇÃO DA PASTA ARMAZENÁVEL DE α -TCP

As pastas de cimento de fosfato de cálcio pré-misturadas foram preparadas através da mistura do α -TCP sintetizado com a solução SF/MgCl₂ em quantidades adequadas para a obtenção de uma pasta com razão líquido/pó (L/P) de 0,4 mL/g. A mistura das duas fases foi realizada manualmente, utilizando-se uma espátula de aço inoxidável, até a obtenção de uma pasta homogênea. Este processo foi realizado para as soluções SF/MgCl₂ com diferentes concentrações de fibroína de seda. As concentrações mássicas de SF em cada variante de teste e suas respectivas nomenclaturas estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5: Nomenclatura e composição de cada formulação de teste estudada. A concentração de SF foi calculada considerando sua contribuição após a ativação do CPC com uma solução de 4M de CaCl₂.

| Variante | Concentração da solução de MgCl ₂ (M) | Concentração da solução de SF [% (m/v)] | Concentração de SF no cimento [% (m/m)] |
|----------|--|---|---|
| S00M0 | 0.0 | 0.00 | 0.00 |
| S00M1 | 0.1 | 0.00 | 0.00 |
| S07M1 | 0.1 | 0.25 | 0.07 |
| S13M1 | 0.1 | 0.50 | 0.13 |
| S20M1 | 0.1 | 0.75 | 0.20 |
| S27M1 | 0.1 | 1.00 | 0.27 |
| S33M1 | 0.1 | 1.25 | 0.33 |
| S40M1 | 0.1 | 1.50 | 0.40 |
| S47M1 | 0.1 | 1.75 | 0.47 |
| S53M1 | 0.1 | 2.00 | 0.53 |

As pastas preparadas foram transferidas para tubos Falcon ou seringas vedadas e armazenados a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ em ambiente climatizado por 7d antes de cada ensaio, com exceção do teste de armazenamento.

4.6 TESTE DE ARMAZENAMENTO DAS PASTAS DE α -TCP PRÉ-MISTURADAS

De forma a verificar a estabilidade das pastas de α -TCP/SF pré-misturadas desenvolvidas, amostras foram preparadas conforme descrito na Seção 4.5 ou através da mistura de α -TCP com água destilada e deionizada (S00M0). 2g de todas as pastas cimentícias foram transferidos para tubos Falcon de 5mL e armazenados a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ em ambiente climatizado por até 22 semanas.

Após o tempo de armazenamento determinado para cada grupo, as fases presentes em cada amostra foram analisadas através da análise de DRX e a composição quantitativa destas foi obtida por refinamento de Rietveld, conforme descrito na Seção 4.2.2.1. Além das estruturas previamente citadas nesta seção, a ficha cristalográfica ICSD 082293 (Jeanjean et al., 1996) foi utilizada para a quantificação de CDHA nas amostras.

4.7 ATIVAÇÃO DAS PASTAS

A ativação da reação de hidratação das pastas cimentícias foi realizada através da adição de uma solução aquosa de 4M de CaCl_2 (Química Moderna, Brasil) em uma proporção de 0,1mL/g de α -TCP. Também foram testadas a adição de 0,5 e 1,0%(m/v) de ácido cítrico (CA, Dinâmica, Brasil) à solução de ativação, de forma a acelerar a reação de pega do cimento.

A mistura foi realizada através da conexão de 2 seringas – uma contendo o cimento pré-misturado e outra contendo a solução de ativação – por um conector de seringas de PVC. A solução foi, então, deslocada para a seringa com a pasta cimentícia e esta foi deslocada continuamente de uma seringa para outra até que fossem finalizados 15 ciclos de deslocamento.

4.7.1 Estudo da reação de hidratação

Para avaliar a melhor composição com relação à pega do cimento de fosfato de cálcio, amostras S00M1 foram ativadas com soluções contendo 0; 0,5 e 1,0%(m/v) de CA. Estas tiveram sua reação de pega verificada através do ensaio de agulhas de Gillmore, seguindo a norma ASTM C266-21. A análise foi realizada em amostras de pastas cimentícias injetadas em moldes cilíndricos de silicone com dimensões de 12mm de diâmetro por 10mm de altura. O ensaio foi realizado a 37°C e os tempos de pega inicial e final (T_{iG} e T_{fG} , respectivamente) foram registrados quando a agulha não conseguiu criar uma indentação de 1mm de profundidade em 3 áreas distintas do cimento.

Além disso, a reação foi investigada mais profundamente através da análise de calorimetria isotérmica. Esta foi conduzida em um calorímetro NETZSCH modelo 404 F3 Pegasus. O equipamento foi pré-aquecido e programado a realizar uma curva isotérmica a 37°C por 24h. O tempo de preparação das amostras foi cronometrado e adicionado às curvas obtidas pela análise. A variante com reação de pega considerada mais adequada à aplicação foi selecionada e utilizada para a preparação das amostras dos demais testes.

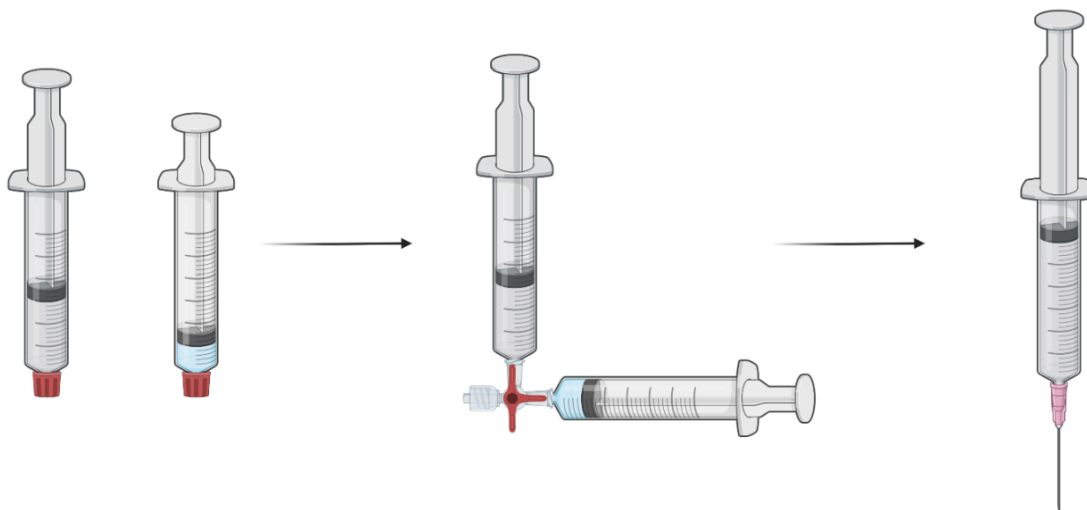


Figura 12: Representação esquemática da metodologia de mistura da pasta cimentícia pré-misturada e a solução de ativação.

4.7.2 Injetabilidade

As pastas cimentícias pré-misturadas foram armazenadas por 7d e, então, transferidas para uma seringa de 5mL. Posteriormente, foi adicionada a solução de ativação, conforme a metodologia previamente descrita, e foi acoplada uma agulha de 1,25mm à seringa. A realização do ensaio de injetabilidade seguiu a metodologia descrita por Weichhold et al. (2022). A seringa foi posicionada em uma máquina de ensaios universal INSTRON modelo 3369 em modo de compressão e com taxa de travessa de 30mm/min e célula de carga de 2kN. A máquina foi programada para ter o ensaio interrompido caso a força aplicada (F) atingisse 200N. A representação esquemática da realização do ensaio se encontra na Figura 13. A injetabilidade foi definida como a fração extrudada da pasta cimentícia e calculada conforme a equação (9), em que Inj é a injetabilidade da composição, $V_{i,p}$ é o volume inicial de pasta na seringa e $V_{f,p}$ é o volume de pasta na seringa após a interrupção do teste.

$$Inj = \frac{(V_{i,p} - V_{f,p})}{V_{i,p}} \times 100 \quad (9)$$

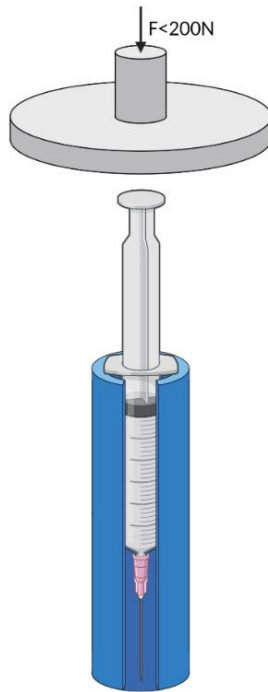


Figura 13: Representação esquemática do ensaio de injetabilidade das pastas cimentícias.

4.8 CARACTERIZAÇÃO DOS CIMENTOS INJETÁVEIS OBTIDOS

Amostras de todas as variantes de teste foram obtidas através da injeção dos cimentos em moldes cilíndricos de silicone com 8mm de diâmetro e 2,7mm de altura ou moldes cilíndricos de aço inoxidável com 6mm de diâmetro e 12mm de altura, a depender do ensaio a ser realizado. A injeção do cimento foi realizada em moldes pré-aquecidos a 37°C e estes foram mantidos em estufa 37°C até a completa pega do CPC. As amostras foram, então, retiradas dos moldes e posicionadas em uma câmara com 100% de umidade relativa a 37°C por 1, 3 e 7d. Também foram avaliadas amostras que não passaram por câmara úmida, sob nomenclatura de 0d.

4.8.1 Difração de Raios-X

As fases cristalinas presentes nas amostras mantidas a 0, 1, 3 e 7d em câmara úmida foram determinadas através da análise de difração de raios-X (DRX). A análise foi conduzida em um difratômetro Philips do modelo X'Pert MDP com radiação $\text{CuK}\alpha$ e filtro ajustado a 40kV e 20mA. A varredura das amostras foi realizada com velocidade do goniômetro de 0,015°/s e no intervalo de $2\theta = 20^\circ$ a 50° . Para a verificação da cinética da transformação de fase do α -TCP para CDHA nas variantes, se obteve a composição quantitativa das fases por refinamento de Rietveld com o *software* HighScore Plus versão 4.7. As estruturas ICSD 000923 (α -TCP), ICSD 006191 (β -TCP) e ICSD 082293 (CDHA), ICSD 001708 [hidroxiapatita com substituição de cloro, HAp-Cl, Sudarsanan e Young (1978)] e ICSD 024237 [clorapatita, ClAp, Hendricks, Jefferson e Mosley (1932)] foram aplicadas. A presença de HAp-Cl e ClAp também foi investigada já que a presença de íons cloro (Cl⁻) na fase líquida de CPCs baseados em α -TCP pode provocar a formação destas fases cristalinas, conforme demonstrado por Cassel et al. (2023).

4.8.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi aplicada de forma a verificar os grupamentos químicos dos cimentos de fosfato de cálcio obtidos após 7d em câmara úmida. A análise foi conduzida em um espectrômetro Thermo Fischer

Scientific do modelo Nicolet 6700 em modo de transmissão, com espectro na região entre 400 e 4000cm⁻¹.

4.8.3 Porosidade

A avaliação da porosidade dos CPCs obtidos é de extrema importância, pois esta influencia tanto nas propriedades mecânicas do material, como no comportamento do material após a implantação *in vivo*. A porosidade de amostras cilíndricas (8 x 2,7mm) foi obtida através da equação 10, onde ρ é a densidade medida experimentalmente e ρ_0 é a densidade teórica da amostra. Foram analisadas amostras mantidas em câmara úmida por 0, 1, 3 e 7d.

$$P = \left[1 - \left(\frac{\rho}{\rho_0} \right) \right] \times 100 \quad (10)$$

A densidade experimental foi calculada através do Princípio de Arquimedes, imergindo amostras em EtOH absoluto (Êxodo, Brasil) e seguindo a equação 11, onde m_s é a massa da amostra seca, m_u é a massa da amostra úmida e m_i é a massa da amostra imersa em EtOH ($\rho_{EtOH} = 0,79 \text{ g/cm}^3$).

$$\rho = \frac{m_s}{(m_u - m_i)} \times \rho_{EtOH} \quad (11)$$

Já a densidade teórica foi determinada pela contribuição volumétrica de cada fase identificada nas amostras, conforme a equação (12), onde ρ_i é a densidade teórica e V_i é a fração volumétrica de uma determinada fase i . As frações volumétricas foram calculadas baseadas nas frações mássicas obtidas por refinamento de Rietveld e as densidades consideradas para as fases α -TCP, β -TCP, CDHA e HAp-Cl foram de 2,86, 3,07, 3,01 e 3,11 g/cm³, respectivamente.

$$\rho_0 = \sum \rho_i \times V_i \quad (12)$$

4.8.4 Resistência à Compressão

Para a avaliação da resistência à compressão dos cimentos obtidos foi seguida a norma ASTM F451-29, a qual é utilizada para ensaios de compressão de cimentos

ósseos. Os cimentos foram conformados em moldes cilíndricos (6 x 12mm), conforme a Figura 14. Após o período de câmara úmida de cada grupo de teste (0, 1, 3 e 7d), as amostras foram submetidas à análise visual direta, com objetivo de verificar a integridade destas. As amostras com defeitos visíveis como fissuras e trincas foram descartadas.

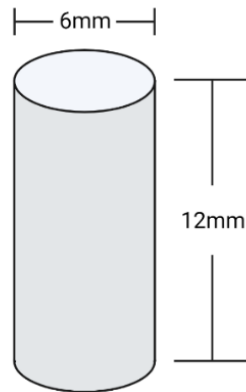


Figura 14: Geometria das amostras para os ensaios de resistência à compressão.

O teste de compressão foi realizado em um equipamento de ensaios universal INSTRON modelo 3369, com taxa de travessa de 1mm/min e célula de carga de 2kN. A resistência à compressão do material é definida pela tensão de ruptura do corpo de prova, a qual depende da força aplicada atuante na área transversal. Este valor é calculado conforme a equação (13), em que σ é a tensão de ruptura em MPa, F é a força aplicada no momento de fratura em N e A é a área transversal do corpo de prova em mm^2 .

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (13)$$

4.8.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para verificar as características microestruturais das amostras de CPC reforçados com SF, foi realizada a obtenção de imagens de MEV da superfície de fratura de amostras mantidas em câmara úmida por 0, 1, 3 e 7d. A obtenção foi realizada em um microscópio eletrônico de bancada ThermoFisher Scientific do modelo Phenom ProX, sob feixe de 10kV e ampliação de 10000x. Previamente à análise, foi realizada a metalização da superfície da amostra com fina camada de ouro para melhorar a condução da amostra.

4.9 CARACTERIZAÇÕES ADICIONAIS DA MELHOR VARIANTE

Através das caracterizações prévias, a melhor variante de teste foi escolhida para ser adicionalmente caracterizada. Devido às suas propriedades mecânicas e injetabilidade com potencial de aplicação, a variante S33M1 foi escolhida para ser complementarmente avaliada.

4.9.1 Calorimetria Isotérmica

Para verificação da reação de pega da melhor variante dos cimentos pré-misturados desenvolvidos, foi conduzida a análise de calorimetria isotérmica de amostras S33M1 em um calorímetro NETZSCH modelo 404 F3 Pegasus. O equipamento foi pré-aquecido e programado a realizar uma curva isotérmica a 37°C por 24h. O tempo de preparação da amostra foi cronometrado e adicionado à curva obtida pelo equipamento.

4.9.2 Comportamento *in vitro*

Amostras das variantes S00M1 e S33M1 foram obtidas através da injeção dos cimentos em moldes cilíndricos de silicone com 8mm de diâmetro e 2,7mm de altura ou com 15mm de diâmetro e 2,7mm de altura. A injeção do cimento foi realizada em moldes pré-aquecidos a 37°C e foram mantidos em estufa 37°C até a completa pega do CPC.

4.9.2.1 Liberação de íons de Ca²⁺

A liberação de íons Ca²⁺ em solução tampão de fosfato (PBS, pH 7,0) foi avaliada por espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES). Esta análise contribui para a avaliação da estabilidade física dos materiais obtidos, assim como apresenta um indicativo das propriedades osteointegrativas dos materiais, já que a liberação de íons de Ca²⁺ é de grande importância para a resposta celular do tecido ósseo. Assim, amostras cilíndricas (15 x 2,7mm) das variantes S00M1 e S33M1 foram posicionadas em uma placa de 12 poços preenchidos com 5mL de PBS e mantidas a 37°C. Foram coletados 1mL de solução nos intervalos de 0h (solução utilizada como branco, PBS puro), 2h, 24h, 72h, 168h, 336h, 504h e 672h. A análise foi conduzida em

um espectrômetro Agilent Technologies modelo 5110. A cada ponto de análise, foi realizada a troca da solução de PBS. Assim, a curva obtida é representada como a liberação absoluta, ou seja, a soma das liberações medidas até o ponto de análise.

4.9.2.2 Comportamento em SBF

Para a verificação do comportamento dos CPCs em solução fisiológica simulada (SBF), amostras cilíndricas (8 x 2,7mm) dos cimentos S00M1 e S33M1 foram colocadas em uma placa de 24 poços preenchidos com SBF e mantidas em estufa a 37°C até 28d. A cada 2d de análise, as amostras eram retiradas da solução e secas para a verificação da perda de massa do CPC e deposição de apatita sobre este. Neste mesmo ponto, as soluções que estavam em contato com as amostras tinham seu pH verificado e eram substituídas por uma nova solução de SBF.

Além disso, amostras de cada variante foram retiradas do ensaio após os períodos de 3, 7, 14 e 28d para a verificação da deposição de apatita sobre estas. As amostras retiradas da solução foram metalizadas com ouro e avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foi utilizado um microscópio eletrônico de bancada ThermoFischer Scientific do modelo Phenom ProX, sob tensão de 10kV e ampliação de 10000x.

4.9.3 Comportamento de injeção *in vitro*

4.9.3.1 Avaliação da coesão do cimento injetável

A coesão da pasta cimentícia obtida foi avaliada visualmente através da injeção direta desta em SBF utilizando uma seringa de 5mL acoplada a uma agulha de 1,25mm. Foram analisadas pastas S00M1 e S33M1. A avaliação foi realizada logo após a injeção do material em SBF (0min) e após 5, 10 e 20min desta.

Esta avaliação é importante para verificar se a pasta injetável é estável durante a injeção no local de implantação e se haverá ou não a ocorrência de *washout*. O *washout* é a desintegração da pasta durante a exposição inicial aos fluidos corpóreos, a qual afeta as propriedades mecânicas do material e pode causar reações inflamatórias severas (Wei et al., 2022).

4.9.3.2 Resistência à compressão de amostras injetadas em SBF

Para se verificar com maior representatividade prática a resistência à compressão do cimento injetável, pastas cimentícias foram injetadas em moldes cilíndricos de papel filtro (6mm x 12mm) completamente imersos em SBF. As amostras foram mantidas nos moldes até a pega do cimento e foram mantidas em SBF por 1, 3 e 7d.

O teste de compressão foi realizado seguindo a norma ASTM F451-29 em um equipamento de ensaios universal INSTRON modelo 3369, com taxa de travessa de 1mm/min e célula de carga de 2kN. Previamente ao ensaio, as amostras foram submetidas à análise visual e as que demonstraram defeitos visíveis foram descartadas.

Além disso, a superfície de fratura das amostras testadas após permanência de 1, 3 e 7d em SBF foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram metalizadas com ouro e analisadas através de um microscópio eletrônico de bancada ThermoFischer Scientific do modelo Phenom ProX, sob tensão de 10kV e ampliação de 10000x.

4.9.4 Ensaio de Viabilidade Celular *in vitro*

Devido à baixa coesão demonstrada por amostras S33M1 após sua injeção, 0,5%(m/m_{α-TCP}) de carboximetilcelulose (CMC) foi adicionado às pastas S33M1 pré-misturadas de forma a melhorar esta propriedade. Estas amostras foram denominadas S33M1C. Como esta variante se manteve estável após a injeção e não demonstrou diferenças estatisticamente significativas às propriedades previamente estudadas para as amostras S33M1, amostras S33M1C foram utilizadas para os testes subsequentes.

4.9.4.1 Isolamento e caracterização de células-tronco derivadas de tecido adiposo

Células-tronco derivadas de tecido adiposo (ADSCs) foram extraídas do tecido adiposo de doadores adultos saudáveis durante cirurgias de lipoaspiração. O estudo foi conduzido com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (REC-ISCOMPA 3029.141) e do Comitê de Ética em Pesquisa

da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (REC-UFCSPA 3.734.612). As células foram isoladas e caracterizadas de acordo com um protocolo padronizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

4.9.4.2 Avaliação de citotoxicidade *in vitro* indireta

O ensaio de viabilidade celular foi realizado através do método indireto. Para o experimento, extratos de amostras S00M1 e S33M1C foram preparados de acordo com as normas ISO 10993-5 e 10993-12. Resumidamente, amostras de cimento cilíndricas (12 x 1mm) foram autoclavadas e incubadas com meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) de baixa glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino por 72h em condições de cultura celular (atmosfera com 5%CO₂, 95% de umidade a 37°C) com uma razão de massa de amostra para volume de meio de 0,2g/mL. Os extratos foram então coletados sem nenhuma filtração para os testes de citotoxicidade.

ADSCs foram pré-cultivadas por 24h a 37°C em placas de 96 poços em uma razão de 3,0 X 10³ células por poço. Após, o meio foi removido e substituído por extratos de S00M1 ou S33M1 puros ou diluídos em concentrações de 1%, 10% e 50%. As células com os extratos foram, então, incubadas em condições de cultura celular por 24h. Como controle, ADSCs foram incubadas com meio padrão. Posteriormente, os extratos foram incubados com solução de 0,5mg/mL de 3-(4,5-dimetiltiozol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) em PBS por 4h e adicionou-se dimetilsulfóxido (DMSO) para a dissolução dos cristais de formazan formados pela interação do MTT com as células.

200µL da solução de cada poço foram transferidos para uma nova placa de 24 poços e a avaliação espectroscópica foi realizada em um leitor de microplacas SpectraMax M3. Foi analisada a absorbância das soluções no comprimento de onda de 570nm. Foram realizadas 4 séries de análise em pentaplicata.

Adicionalmente, células foram cultivadas em placa de 24 poços e tratadas com extratos puros de S00M1 e S33M1C, além de poços de controle tratados com meio DMEM de baixa glicose. Após 24h de cultura, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído, permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 e tingidas com DAPI

(4',6-diamidina-2-fenilindol) e faloidina (Alexa Fluor™ 488). Posteriormente, imagens das células foram adquiridas através de um microscópio de fluorescência Olympus IX51/Olympus U-RFL-T.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios de DRX quantitativo, agulhas de Gillmore, ICP-OES e comportamento em SBF foram realizados em triplicata. Os ensaios de injetabilidade e porosidade em pentaplicata, e os ensaios de compressão em decaplicata. Todos os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão.

Para a determinação da existência de diferenças estatísticas significativas foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida por teste *post-hoc* de múltiplas comparações de Tukey. As diferenças entre grupos de teste foram consideradas estatisticamente significativas se $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA SÍNTESE DE α -TCP

5.1.1 Caracterização do precursor

5.1.1.1 Difração de Raios-X

A Figura 15 apresenta o difratograma correspondente ao fosfato de cálcio precursor de α -TCP. Devido ao alto ruído do difratograma original, este foi tratado no *software* HighScore Plus através da função *smooth* polinomial quíntica e com faixa de convolução de 13 pontos, a qual foi utilizada para a identificação de fases. A fase presente no material foi identificada como CDHA através da ficha cristalográfica ICSD 026204. A presença de picos de baixa intensidade, sobreposição de picos e alto ruído no difratograma original (cinza), infere a baixa cristalinidade do precursor obtido.

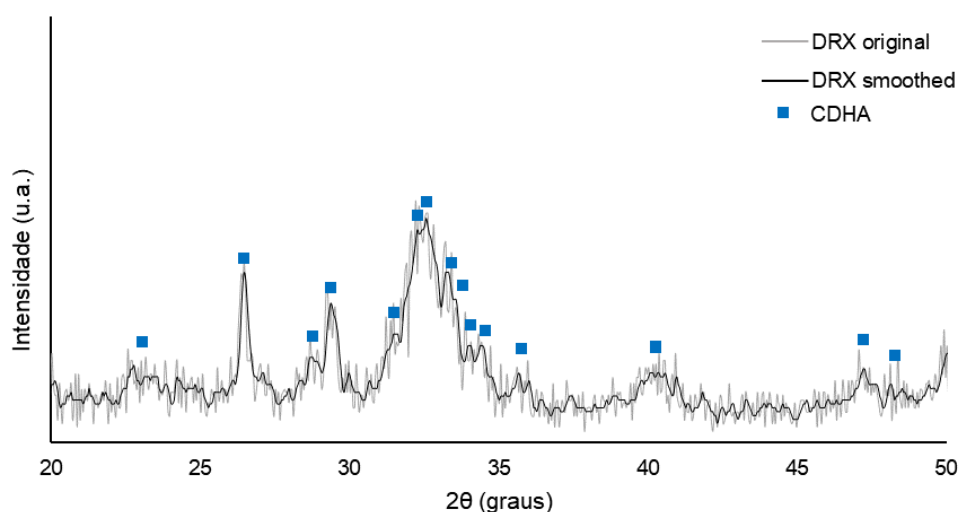


Figura 15: Difratograma do precursor obtido por via úmida.

A baixa cristalinidade verificada na CDHA obtida é característica de processos de precipitação em baixas temperaturas e pode indicar uma possível presença de pequenas concentrações de ACP (fosfato de cálcio amorfo) no precursor. O ACP é um precursor extremamente desejável, já que permite a obtenção de α -TCP em baixas temperaturas e auxilia a cinética da transformação $\beta \rightarrow \alpha$ (Tronco, Cassel e dos Santos, 2022).

5.1.1.2 Análise Térmica

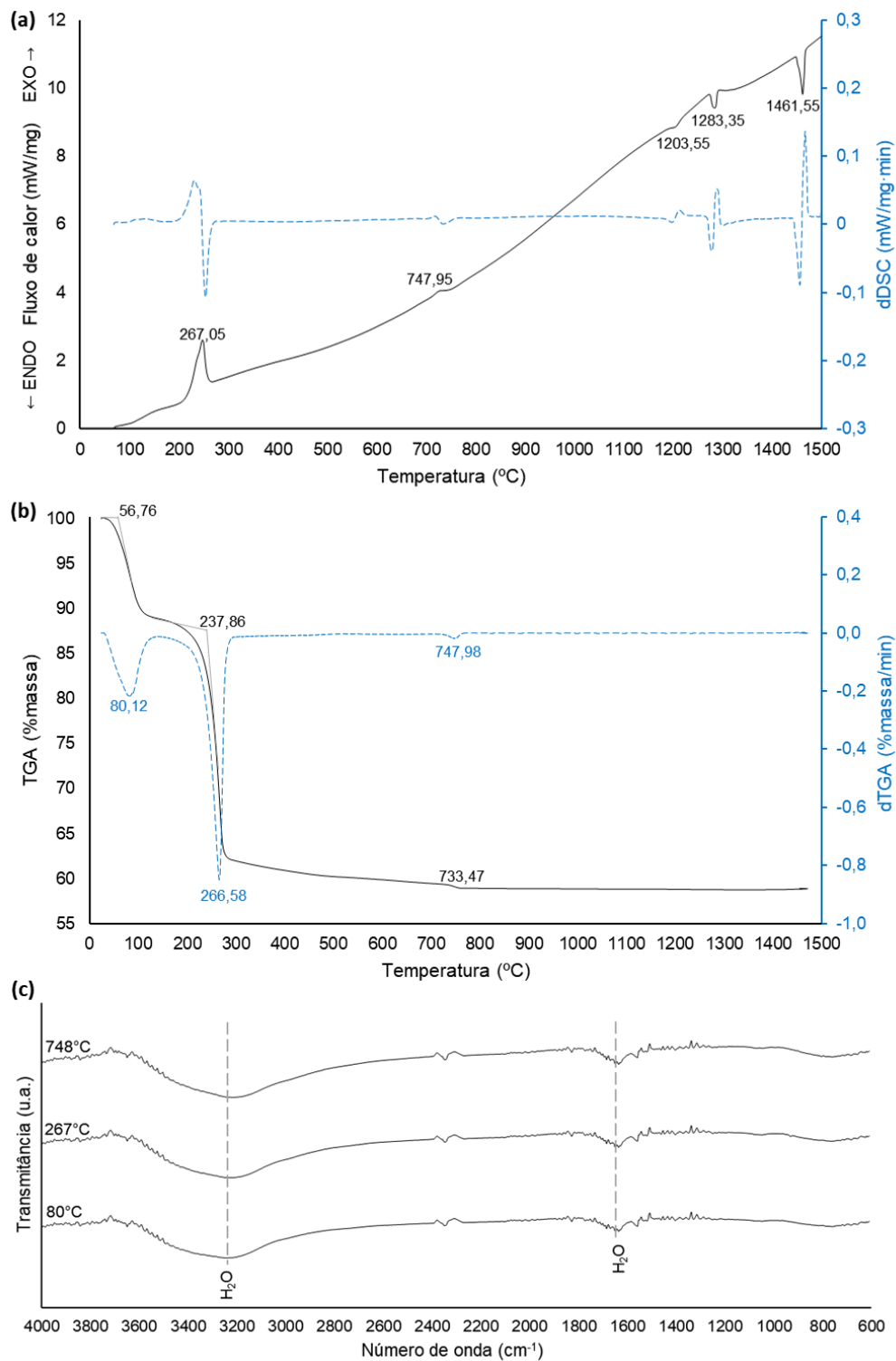


Figura 16. Curvas obtidas pela técnica STD, apresentando (a) fluxo de calor e (b) perda de massa com a temperatura. (c) Espectros de FTIR referentes às perdas de massa em 80°C, 267°C e 748°C.

É possível observar uma primeira perda de massa com *onset* em 56,76°C e pico de perda em 80,12°C, o qual é verificado pela derivada da curva de TGA. Esta primeira perda de massa está associada com um pequeno pico endotérmico na curva de fluxo de calor e resulta na liberação de grupos OH⁻ associados à água, conforme observado no espectro de FTIR. Esta liberação está provavelmente relacionada ao desprendimento e evaporação de moléculas de água adsorvidas na superfície do material devido à umidade e à característica hidrofílica do pó.

Uma segunda perda de massa pode ser verificada com *onset* em 237,86°C e máximo de perda em 266,58°C. Esta está diretamente relacionada ao pico exotérmico observado em 267,05°C da curva de fluxo de calor. Conforme Tronco, Cassel e dos Santos (2022), a evolução térmica dos precursores de α -TCP obtidos por via úmida conta com a desidratação de íons HPO₄²⁻ e formação de íons pirofosfato entre 20°C e 700°C. Este evento térmico pode ser atribuído ao pico exotérmico e perda de massa observados por volta de 267°C, o que é corroborado pela técnica de FTIR, a qual demonstra liberação de grupos hidroxila associados à H₂O nesta temperatura.

Uma última perda de massa pode ser observada com *onset* a 733,47°C e pico de perda em 747,98°C. Esta está relacionada ao pico exotérmico verificado a 747,95°C, o qual é, provavelmente, referente à reação entre os íons OH⁻ presentes na apatita precursora e os íons pirofosfato formados a 267°C. Esta reação, comumente observada entre 700°C e 800°C, resulta na formação de β -TCP e a eliminação completa dos grupos hidroxila do material (Tronco, Cassel e dos Santos, 2022) e é reforçada pela observação da liberação de grupos OH⁻ associados à H₂O no espectro de FTIR obtido.

Além destes eventos térmicos, é possível observar 3 eventos endotérmicos na curva de fluxo de calor que não estão associados a perdas de massa. O primeiro, a 1203,55°C, e o segundo, a 1283,35°C, estão associados à transformação do $\beta \rightarrow \alpha$ do TCP. A observação desta transformação em diferentes temperaturas pode ser resultado de uma transformação inicial para uma região bifásica β, α -TCP e, posteriormente, a transformação completa da fase β em α -TCP (Tronco, Cassel e dos Santos, 2022). Já o terceiro pico endotérmico, observado a 1461,55°C, está relacionado à transformação do α -TCP em α' -TCP (Carrodegua e De Aza, 2011; Tronco, Cassel e dos Santos, 2022).

5.1.2 Caracterização do pó de α -TCP obtido

5.1.2.1 Difração de Raios-X

O difratograma correspondente ao fosfato de cálcio obtido pela síntese por via úmida descrita na Seção 4.1 após calcinação a 1400°C está apresentado na Figura 17. Os picos observados evidenciam a predominância de α -TCP no material obtido, confirmando que a síntese realizada permitiu a obtenção do produto desejado. Entretanto, também foram observados picos de baixa intensidade relacionados à fase β -TCP, além do aumento da intensidade de picos cuja posição também corresponde à fase α , devido à sobreposição dos picos destas duas fases. O β -TCP é uma segunda fase comum em sínteses de α -TCP por ser a fase de baixas temperaturas do material. Além do β -TCP outra fase comum na síntese deste fosfato de cálcio é a HAp, a qual não apresentou picos no difratograma e teve sua ausência confirmada através de refinamento de Rietveld.

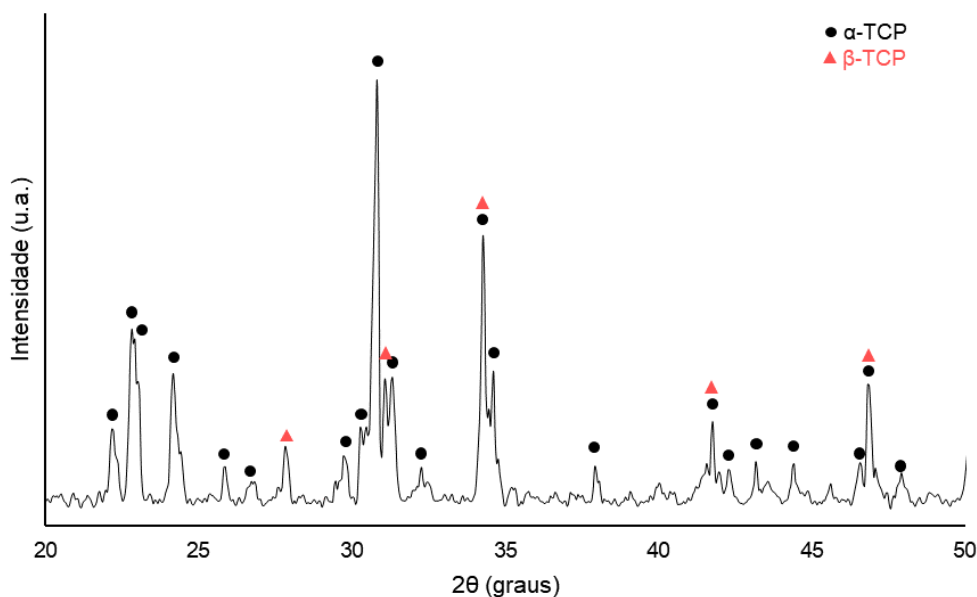


Figura 17: Difratograma do pó de α -TCP obtido.

Conforme apresentado na Tabela 6, os resultados de refinamento de Rietveld confirmam a obtenção de um pó de fosfato tricálcico bifásico, contendo $81,8 \pm 0,4\%$ de α -TCP e $18,2 \pm 0,4\%$ da fase β -TCP.

Tabela 6: Composição do pó de α -TCP obtido determinada por refinamento de Rietveld.

| Concentração mássica (%) | |
|--------------------------|----------------|
| α -TCP | 81,8 \pm 0,4 |
| β -TCP | 18,2 \pm 0,4 |
| HAp | <LOD |

5.1.2.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformação de Fourier

O espectro de infravermelho do pó baseado em α -TCP obtido está apresentado na Figura 18. É possível observar duas bandas de maior absorbância, que se encontram entre 548 e 604 cm^{-1} e 931–1200 cm^{-1} , e uma banda estreita a 454 cm^{-1} . A primeira está relacionada à sobreposição das bandas à 551, 563, 585, 597 e 613 cm^{-1} , referentes ao modo de vibração assimétrico de flexão da ligação P-O (ν_4) presente nos grupos PO_4^{3-} do α -TCP. Já a segunda, de maior largura, é constituída pela sobreposição das bandas referentes ao modo de vibração simétrico de deformação da ligação P-O (ν_1) e ao modo de vibração assimétrico de deformação (ν_3) da ligação P-O. Esta sobreposição ocorre entre a banda a 954 cm^{-1} , que é referente ao modo de vibração ν_1 , e as bandas a 984, 997, 1013, 1025, 1039 e 1055 cm^{-1} , as quais estão relacionadas ao modo de vibração ν_3 dos grupos PO_4^{3-} . A banda em 454 cm^{-1} está correlacionada ao modo de vibração simétrico de flexão (ν_2) da ligação P-O (Carrodeguas e De Aza, 2011). Além disso, as bandas em 1628 cm^{-1} e em 3442 cm^{-1} foram designadas à água adsorvida à superfície da amostra (Kesmez, 2020).

As fases β -TCP e α -TCP apresentam bandas de FTIR significativamente próximas (Carrodeguas e De Aza, 2011) e, devido à alta sobreposição das bandas observadas na análise, não é possível distinguir as influências de cada fase no espectro. Apesar disto, é possível afirmar que o pó é formado por fosfato tricálcico e, desta forma, a análise de FTIR corrobora os resultados apresentados pela análise de DRX.

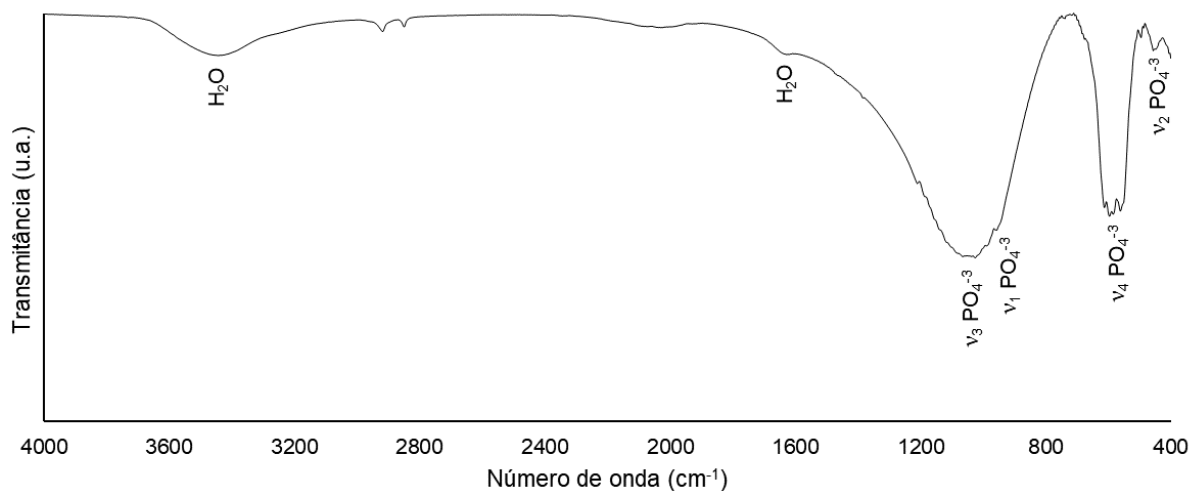


Figura 18: Espectro de infravermelho do pó de α -TCP sintetizado.

5.1.2.3 Tamanho e área superficial específica de partícula

As partículas de α -TCP obtidas após a moagem em moinho vibratório apresentam área superficial específica de $3,902\text{m}^2/\text{g}$. As partículas apresentam distribuição de tamanho bimodal e diâmetro médio de $13,44\mu\text{m}$, conforme apresentado na Tabela 7 e na Figura 19. A ocorrência da distribuição bimodal no pó obtido é provavelmente relacionada à presença de duas fases neste (α -TCP e β -TCP), as quais apresentam durezas distintas.

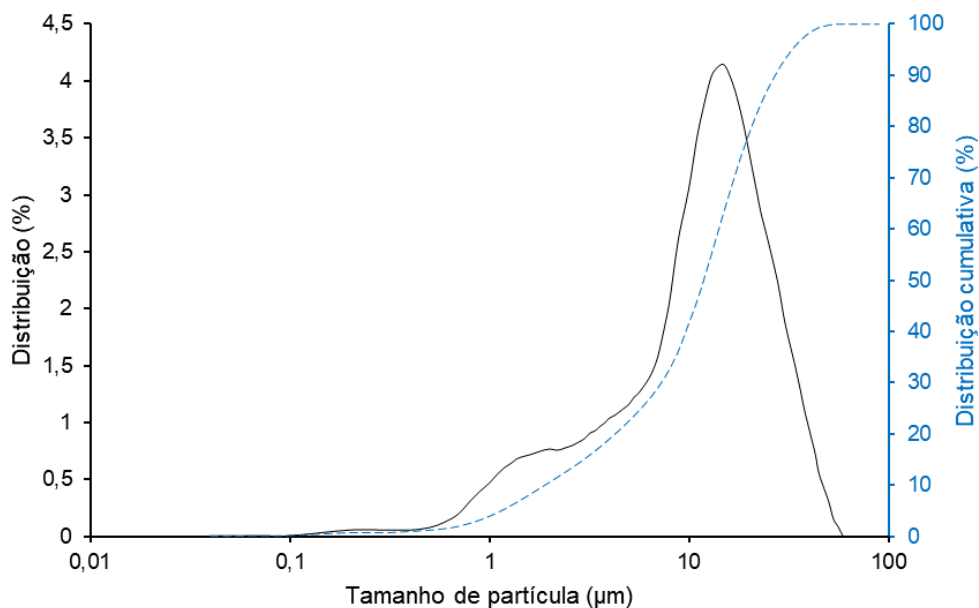


Figura 19: Distribuição de tamanho de partículas do pó de α -TCP obtido.

Tabela 7: Distribuição de tamanho de partícula do pó de α -TCP.

| d_{10} | d_{50} | d_{90} | $d_{\text{médio}}$ |
|----------|----------|----------|--------------------|
| 1,90 | 11,87 | 27,12 | 13,44 |

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSAMENTO DA FIBROÍNA DE SEDA

5.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

O processo de degomagem da seda é um processo termoquímico com o objetivo de remover a sericina e manter as fibras de fibroína estáveis. Para avaliar a efetividade deste processo, foram obtidas imagens de MEV das fibras antes e após a degomagem, as quais podem ser observadas na Figura 20. Através desta análise, é possível verificar uma alta efetividade do processo realizado, já que não é possível a observação da camada de sericina sobre as fibras obtidas e não se observam resíduos nestas na magnificação utilizada (Figura 20b).

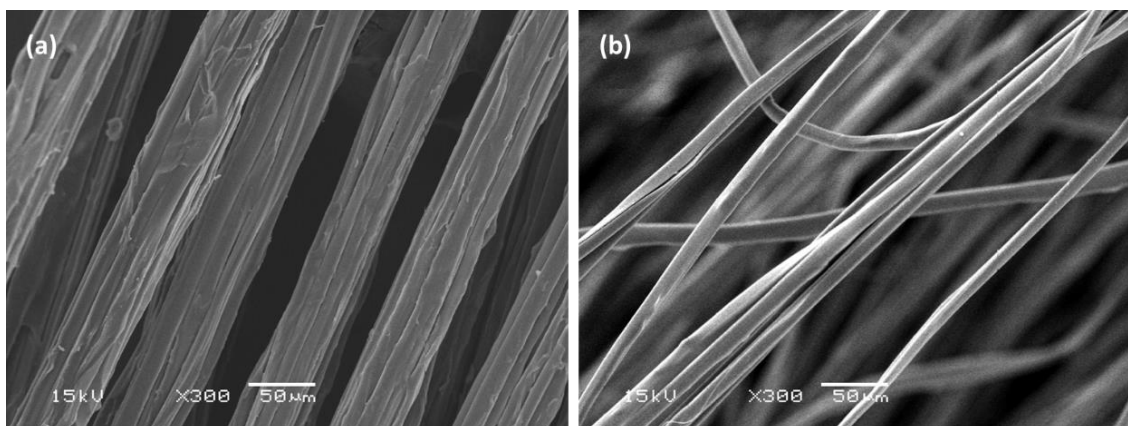


Figura 20: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das fibras de seda (a) antes e (b) após o processo de degomagem, sob ampliação de 300x.

5.2.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

Para a verificação dos grupos funcionais da SF obtida e a análise mais aprofundada da eficiência da degomagem dos casulos de seda, foi realizada a análise de FTIR em fibras de seda e de SF. Os espectros de infravermelho destes materiais se encontram na Figura 21.

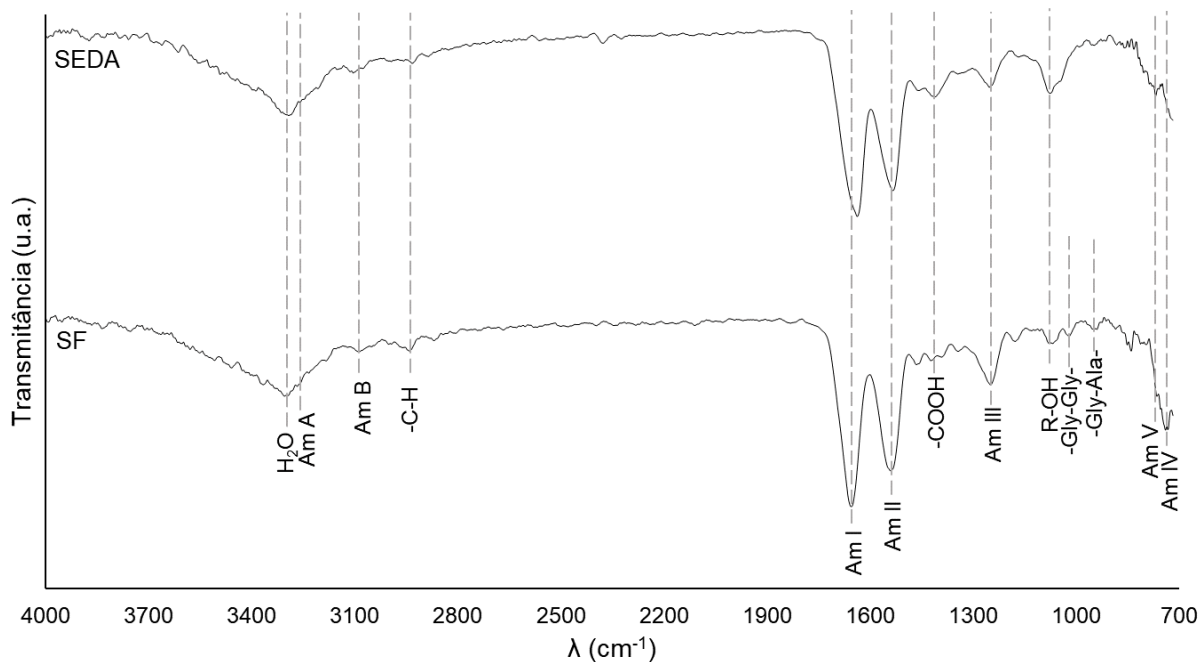


Figura 21: Espectros de infravermelho de amostras de seda e fibroína de seda (SF).

A sericina se mostra extremamente presente nas fibras de seda, devido à absorção significativa nas bandas presentes em 1402cm^{-1} e 1069cm^{-1} . A intensidade elevada destas bandas é um indicativo da presença desta proteína, pois a sericina apresenta teor de cadeias laterais de aminoácidos contendo grupos carboxila ($-\text{COOH}$) e grupos alquil-hidroxila (R-OH) significativamente superior à fibroína (Zhang e Wyeth, 2010; Saha et al., 2019). Esta relação pode ser observada através da composição das duas proteínas, previamente descrita na Tabela 3. Portanto, a ausência ou presença de baixos teores desta proteína na SF podem ser inferidas, já que a absorção destas bandas é substancialmente menor e possivelmente formada apenas pela contribuição dos grupos presentes em sua estrutura.

Com relação ao espectro da SF, é possível identificar diferentes conformações de cadeias peptídicas através das bandas de absorção associadas às amidas I (Am I), II (Am II) e III (Am III). A banda com absorção máxima em 1651cm^{-1} é referente à Am I e tem relação ao modo de vibração de deformação axial da ligação C=O . Esta amida está associada a duas bandas distintas, uma 1660cm^{-1} e outra em 1630cm^{-1} , as quais correspondem, respectivamente, à contribuição das conformações *random coil* e *β -sheet*. Em materiais de altos teores de *β -sheet*, este deslocamento ocorre devido ao maior

envolvimento das ligações C=O em ligações intermoleculares, o que desloca a banda da Am I para frequências inferiores (Rusa et al., 2005). A mesma relação pode ser observada na banda referente à Am II, correspondente ao modo de vibração de deformação angular da ligação N-H, a qual geralmente é identificada entre 1510 e 1545 cm^{-1} . Na amostra analisada, esta banda se encontra a 1535 cm^{-1} , o que demonstra maior influência da conformação *random coil* em relação à β -*sheet* na estrutura da SF obtida. Já a banda entre 1238 e 1265 cm^{-1} corresponde ao modo de vibração de flexão da ligação O-C-N da Am III e é formada pela sobreposição de dois picos, um a 1242 cm^{-1} e outro a 1263 cm^{-1} . Esta apresenta um máximo de absorção a 1242 cm^{-1} , frequência referente às regiões amorfas da SF, e um a 1263 cm^{-1} , que está relacionado à conformação β -*sheet*. A banda a 735 cm^{-1} é relacionada à vibração de flexão das ligações O-C-N da amida IV (Am IV) (Pham, Saelim e Tiyaboonchai, 2018) e o ombro em 768 cm^{-1} é relacionado à vibração de flexão fora do plano das ligações N-H da amida V (Am V), a qual é atribuída às conformações cristalinas da SF (Rusa et al., 2005).

Além destas bandas principais, é possível observar uma banda larga a 3303 cm^{-1} , a qual foi atribuída à água adsorvida na superfície do material. Esta banda apresenta um ombro em 3279 cm^{-1} referente à vibração de deformação axial das ligações N-H da amida A (Am A). Outrossim, bandas de baixas intensidades podem ser observadas a 3082 cm^{-1} e 2941 cm^{-1} , referentes à vibração de deformação da ligação N-H da amida B (Am B) e da vibração de deformação de ligações C-H, respectivamente (Pham, Saelim e Tiyaboonchai, 2018; Parushuram et al., 2020). Outras duas bandas de baixa intensidade se encontram a 970 cm^{-1} e 1009 cm^{-1} e estão caracteristicamente relacionadas ao modo de vibração de deformação de ligações C-C de cadeias peptídicas baseadas em sequências -Gly-Gly- e -Gly-Ala-, respectivamente. A observação destas bandas no espectro infere a ausência ou presença mínima de sericina na SF (Zhang e Wyeth, 2010; Pham, Saelim e Tiyaboonchai, 2018).

Ademais, Rusa et al. (2005) descreve que o grau de cristalinidade da fibroína de seda pode ser obtido através da razão entre as intensidades das bandas da Am III referentes às conformações β -*sheet* e *random coil*. Para a SF utilizada neste trabalho, o grau de cristalinidade foi calculado, então, através da razão entre as bandas observadas

a 1263cm^{-1} e 1242cm^{-1} e foi definido como 0,63. Podemos afirmar, logo, que a fibroína de seda obtida apresenta estrutura semicristalina com grau de cristalinidade de 0,63, rica em estrutura Seda I e com ausência ou baixos teores de sericina.

5.2.3 Calorimetria Exploratória Diferencial

A conformação estrutural da SF foi também verificada através da análise de DSC, apresentada na Figura 22. A curva de DSC obtida apresenta dois picos endotérmicos extensos. O primeiro, observado entre 30 e $120,04^\circ\text{C}$ e com pico em $55,84^\circ\text{C}$ referente à evaporação da água superficial e a água ligada à estrutura da fibroína (Motta, Fambri e Migliaresi, 2002; Pham, Saelim e Tiyaboonthai, 2018). Motta, Fambri e Migliaresi (2002) ressaltam que esta alta evaporação pode sugerir a ocorrência de um fenômeno mais complexo, provavelmente associado às mudanças conformacionais da fibroína. Já o segundo pico exotérmico a $311,29^\circ\text{C}$, que se apresenta entre $255,68$ e 350°C , é relacionado à quebra das cadeias laterais dos aminoácidos da SF e é considerado como indício da degradação térmica do material.

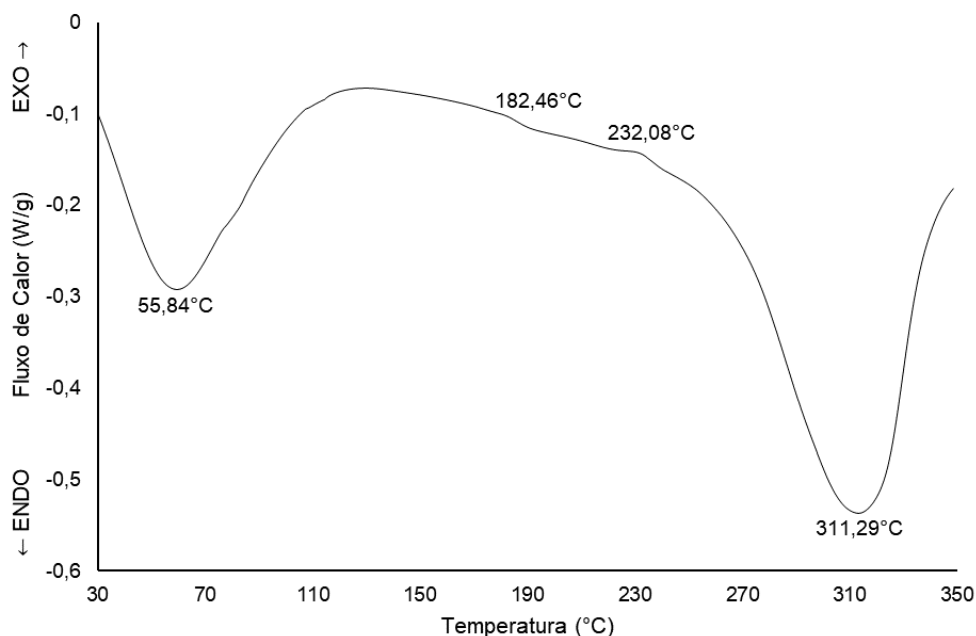


Figura 22: Curva de DSC do filme de fibroína de seda obtido após processamento.

A mudança de calor específico, verificada como uma mudança de inclinação na curva de DSC a $182,46^\circ\text{C}$, é referente à T_g do filme de fibroína obtida. Esta transição está

em uma temperatura considerada como a T_g de materiais de SF ricos na conformação Seda I (Pham, Saelim e Tiyaonchai, 2018). Por fim, o pico exotérmico em 232,08°C indica a transformação das conformações *random coil* – conformação amorfa e formadora da estrutura Seda I – para β -*sheet* – conformação mais cristalina e formadora da estrutura Seda II. Esta transformação é considerada por diversos autores, portanto, como a temperatura de cristalização da SF (Chlapanidas et al., 2011; Wang e Zhang, 2013). Assim, podemos afirmar que a análise de DSC corrobora as conclusões obtidas pela análise de FTIR da SF obtida e permite a observação da estabilidade térmica do polímero até temperaturas próximas a 250°C, o que permite técnicas de esterilização por aplicação de temperatura, como a autoclave.

5.2.4 Análise Termogravimétrica

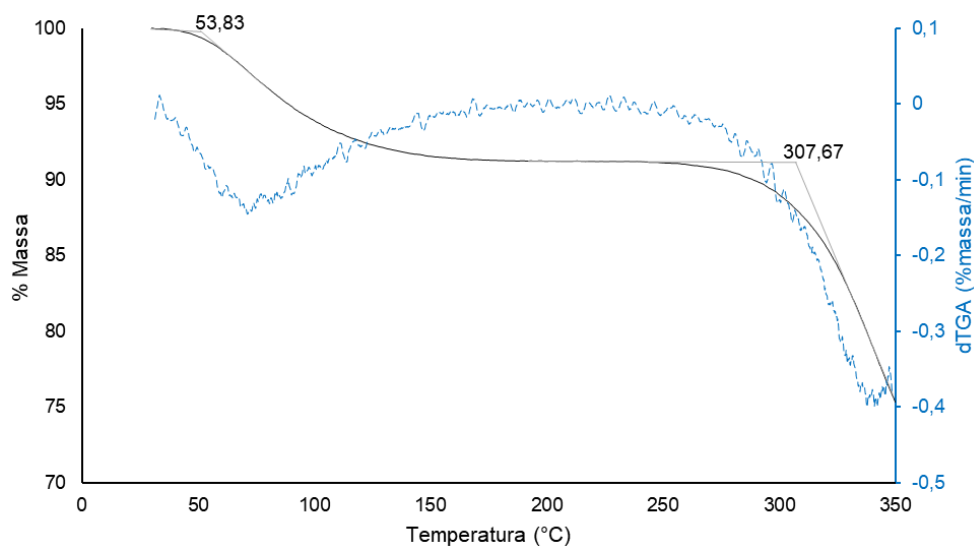


Figura 23: Curva de TGA da do filme de SF obtido após processamento.

A estabilidade térmica da SF foi verificada através de análise de TGA, representada na Figura 23. O primeiro decréscimo de massa, com *onset* a 53,83°C, está relacionado à perda de umidade e evaporação de água do filme de fibroína, a qual apresenta um pico endotérmico verificado na análise de DSC. Já a segunda perda de massa, com *onset* a 307,67°C, é referente à degradação dos filmes de fibroína de seda. Esta degradação inicial ocorre devido à quebra das cadeias laterais peptídicas da fibroína de seda e foi verificada também na análise de DSC (Motta, Fambri e Migliaresi, 2002; Parushuram et al., 2020). Assim, é possível afirmar que a curva de TGA condiz com a

análise de DSC, mantendo temperaturas similares para os eventos decorrentes da perda de massa do material e corrobora a estabilidade térmica da SF até temperaturas próximas a 250°C.

5.3 TESTE DE ARMAZENAMENTO DAS PASTAS DE α -TCP PRÉ-MISTURADAS

Os resultados resumidos do teste de armazenamento se encontram na Figura 24. Essa figura demonstra apenas os teores de α -TCP nas pastas armazenadas em função do tempo de armazenamento, os quais foram determinados por refinamento de Rietveld. Não foi possível verificar diferenças estatisticamente significativas entre as amostras com adição de $MgCl_2$ (SXXM1) e, por isso, uma curva padrão para estas amostras está representada na figura para um melhor entendimento. Os resultados completos, com a composição das amostras em todos os pontos de análise, se encontram no Apêndice A.

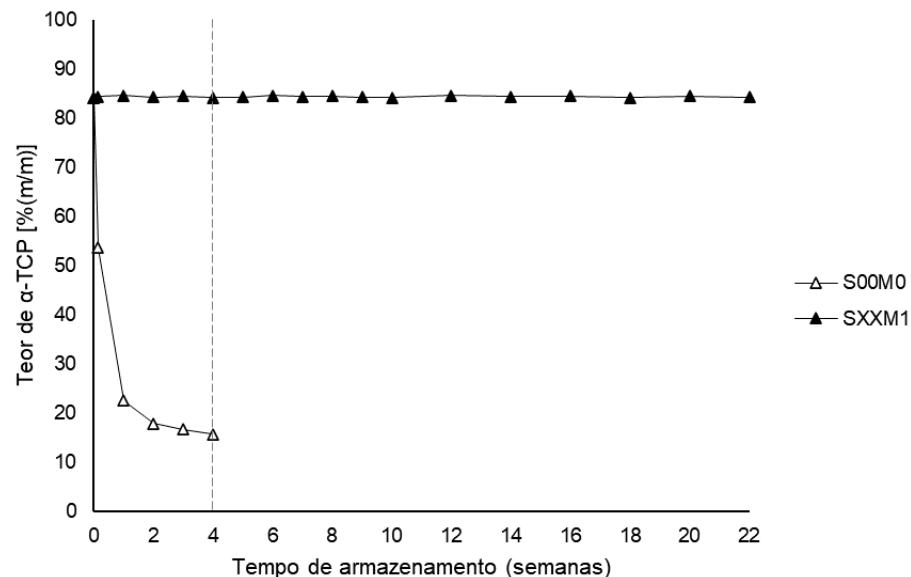


Figura 24: Teor de α -TCP definido por refinamento de Rietveld das pastas pré-misturadas armazenadas.

A estabilidade de armazenamento de um cimento pré-misturado representa a capacidade do sistema de inibir a hidratação do α -TCP e sua consequente transformação à CDHA e outras fases apatíticas. Se a reação de hidratação for alcançada antes da aplicação do CPC, o material irá endurecer e, portanto, não apresentará as propriedades de moldabilidade necessárias e nenhuma reação de pega ocorrerá após a aplicação do material.

É possível observar a reação de hidratação da pasta S00M0 já no primeiro dia de armazenamento. Este comportamento impediria a correta aplicação do material nas utilizações desejadas devido à pega do cimento, impedindo sua utilização após o armazenamento.

Todas as outras variantes de teste, no entanto, não apresentaram diminuições estatisticamente significativas no teor de α -TCP na pasta e, conforme apresentado no Apêndice A, não apresentaram formação de CDHA detectável pela técnica utilizada. Este comportamento demonstra a possibilidade de aplicação de todas as pastas desenvolvidas em sistemas pré-misturados, com possibilidade de armazenamento por até 22 semanas. Além disso, é possível afirmar que a adição de SF ao sistema não modificou o comportamento observado por Bohner et al. (2015), demonstrando boa estabilidade de armazenamento do material sob a presença de íons Mg^{2+} . Vale ressaltar que todas as amostras, com exceção da pasta S00M0, demonstraram boa moldabilidade durante todo o período de teste e que períodos superiores a 22 semanas de armazenamento devem ser estudados, de forma a verificar a estabilidade máxima das pastas desenvolvidas.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVAÇÃO E INJETABILIDADE DAS PASTAS

5.4.1 Estudo da reação de hidratação

Os tempos de pega obtidos através das agulhas de Gillmore dos cimentos S00M0 e S00M1 com diferentes concentrações de ácido cítrico estão descritos na Tabela 1, os quais representam o endurecimento dos cimentos desenvolvidos. Já os resultados obtidos por calorimetria isotérmica (curva de calor total liberado, tempo de início e tempo para ocorrência de 10, 50 e 90% da reação) estão representados na Figura 25 e Tabela 9. As agulhas de Gillmore demonstram o endurecimento do material, enquanto a calorimetria isotérmica demonstra um panorama geral da reação de hidratação do α -TCP.

É possível verificar que o início da reação (T_i) da variante S00M0, assim como o tempo de pega inicial de Gillmore (T_{iG}), são inferiores aos tempos apresentados por amostras contendo cloreto de magnésio (S00M1). Este aumento se deve à presença do

inibidor de reação nas pastas, o qual aumenta o tempo necessário para o início da pega do material, e demonstra o tempo de indução da reação após a adição das soluções de ativação às pastas pré-misturadas .

Tabela 8: Tempo de pega inicial e final avaliados através do método de agulhas de Gillmore para cimentos S00M0 e cimentos S00M1 com diferentes concentrações de CA. Todas as amostras da triplicata de cada variante não demonstraram variação de tempo de pega.

| | T_{iG} (min) | T_{fG} (min) |
|--------------|----------------|----------------|
| S00M0 | 25 | 60 |
| S00M1 | 35 | 80 |
| S00M1 0,5%CA | 35 | 65 |
| S00M1 1,0%CA | 35 | 65 |

O período até o T_i é considerado o tempo disponível para a aplicação ou injeção das pastas no local de implantação e é de extrema importância para a aplicação do material. O aumento observado pelas amostras S00M1 pode ser benéfico por disponibilizar maiores períodos para a aplicação do material e permitir maior controle e cautela do processo pelo cirurgião.

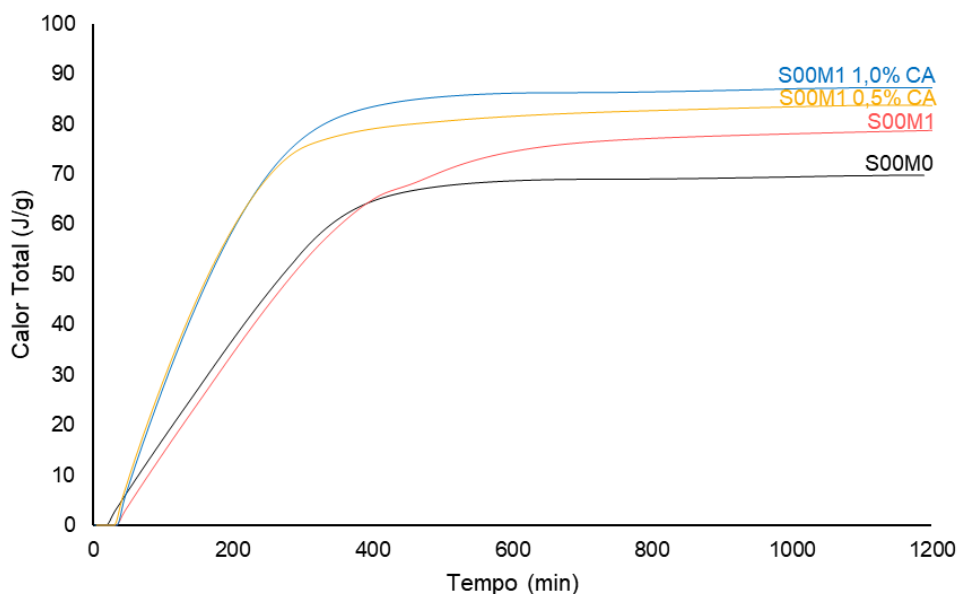


Figura 25: Calor total liberado pela reação de pega dos cimentos ativados através da adição de soluções 4M CaCl_2 com diferentes concentrações de ácido cítrico.

Entre as variantes S00M1 com diferentes concentrações de ácido cítrico não é possível verificar diferenças significativas do tempo de indução da reação de hidratação, demonstrando que o CA não apresenta influência na ativação da reação, que somente é dependente da adição de CaCl_2 . Entretanto, a adição de ácido cítrico diminui o tempo necessário para o endurecimento final (T_{FG}) de materiais S00M1 e acelera a cinética da reação de hidratação quando comparado à S00M0 e S00M1, conforme pode ser verificado através da comparação dos valores de T_{10} , T_{50} e T_{90} .

Tabela 9: Tempo de pega inicial e tempo para ocorrência de 10, 50 e 90% da reação de pega de cimentos S00M0 e cimentos S00M1 com diferentes concentrações de CA.

| | T_i (min) | T_{10} (min) | T_{50} (min) | T_{90} (min) |
|--------------|-------------|----------------|----------------|----------------|
| S00M0 | 19,2 | 45,2 | 188,6 | 370,9 |
| S00M1 | 31,7 | 68,6 | 224,8 | 505,4 |
| S00M1 0,5%CA | 30,6 | 49,3 | 137,6 | 293,3 |
| S00M1 1,0%CA | 31,2 | 50,4 | 140,1 | 302,6 |

As variantes contendo adição de ácido cítrico não apresentam diferenças substanciais em sua cinética de reação, apresentando T_{iG} , T_{FG} , T_{10} , T_{50} e T_{90} similares. Entretanto, a adição de 1,0% de CA demonstra uma liberação superior de calor quando comparada às outras variantes. A liberação de calor está diretamente relacionada à eficiência da reação de hidratação e, assim, podemos afirmar que a adição de ácido cítrico auxilia a transformação de α -TCP em CDHA e que a variante contendo 1,0% de CA apresenta maior eficiência da reação. Como não há mudanças significativas dos tempos de pega entre as variantes contendo ácido cítrico, a solução de ativação contendo 1,0%(m/v) de CA será utilizada em todos os ensaios subsequentes, de forma a aumentar a eficiência da reação.

5.4.2 Injetabilidade

A injetabilidade das pastas cimentícias desenvolvidas está representada na Figura 26. Não é possível observar mudanças significativas ($p < 0,05$) da injetabilidade entre a amostra S00M1 e amostras com adições de até 0,20% de SF. Entretanto, é possível observar uma tendência de decréscimo da injetabilidade com o aumento da concentração de SF nas amostras. Amostras com adições superiores a 0,33% de SF demonstram uma

diminuição significativa da injetabilidade das amostras, o que pode ser prejudicial para a homogeneidade e aplicabilidade do cimento final.

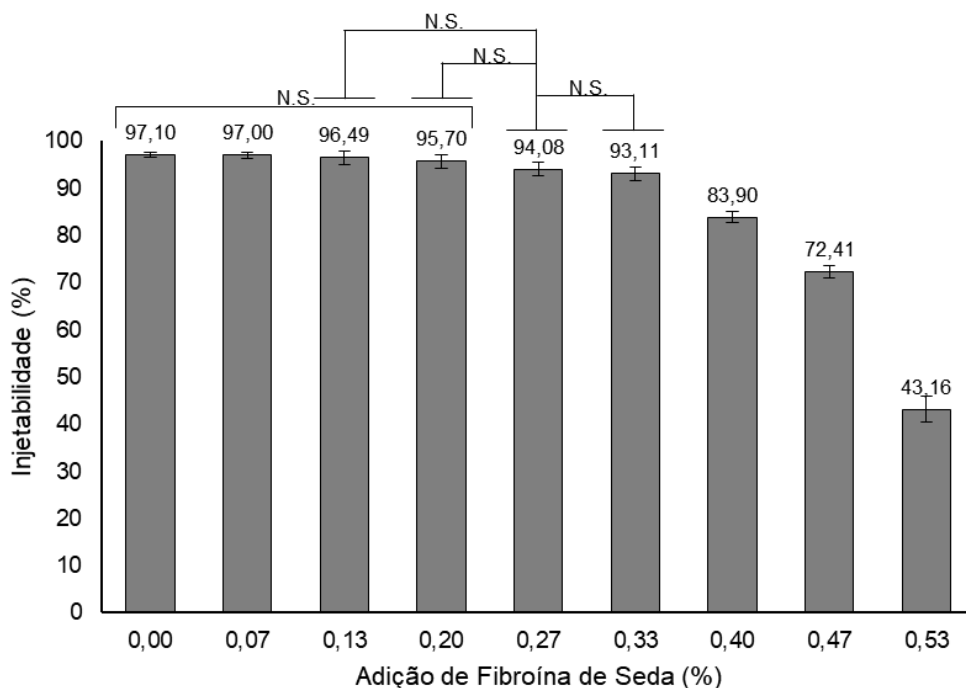


Figura 26: Injetabilidade das pastas cimentícias com diferentes concentrações de SF após armazenamento por 7d e ativação com solução de CaCl_2/CA . N.S.: $p > 0,05$ entre as variantes.

Esta diminuição está altamente relacionada à viscosidade da solução SF/MgCl₂ e sua disponibilidade de água. Uma maior viscosidade da solução, devido à presença de SF, poderia aumentar o atrito entre as partículas do pó, evitando o efeito *filter pressing* e melhorando a injetabilidade do material (Bohner e Baroud, 2005; Weichhold et al., 2022). Entretanto, a viscosidade da pasta também aumenta a tensão de cisalhamento do material com as paredes da seringa, o que reduz a influência do maior atrito entre partículas na prevenção do *filter pressing* e aumenta a força necessária para a injeção da pasta. Através da inspeção visual das seringas testadas, foi possível observar que as pastas residuais nas seringas formavam uma camada densa de partículas compactadas em todas as amostras, demonstrando que a SF não preveniu o efeito de *filter pressing* e que a tensão de cisalhamento da pasta com as paredes da seringa teve um efeito mais expressivo na injetabilidade dos materiais. Além disso, o aumento da viscosidade da solução SF/MgCl₂ é proporcional à concentração de fibroína de seda nas soluções, o que implica uma menor disponibilidade de água para a solubilização e hidratação do α -TCP

e uma menor razão L/P efetiva. Esta característica é deletéria à moldabilidade do cimento e diminui sua fluidez, dificultando sua passagem através da seringa e agulha em tensões menores, já que aumenta a força necessária para a passagem da pasta, conforme demonstrado por (Alves, dos Santos e Bergmann, 2008).

5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS CIMENTOS INJETÁVEIS OBTIDOS

5.5.1 Difração de Raios-X

Os difratogramas obtidos para as amostras mantidas por 0d, 1d, 3d e 7d em câmara úmida estão representados no Apêndice B. Foi possível observar que a presença dos íons Cl^- na fase líquida dos CPCs resultou em uma transformação parcial do α -TCP em HAp-Cl; entretanto, não foi possível observar a presença de ClAp e a ausência desta fase foi confirmada através de refinamento de Rietveld. As evoluções das concentrações de α -TCP, β -TCP, CDHA e HAp-Cl nas amostras de CPCs desenvolvidos conforme o período de armazenamento em câmara úmida estão representadas na Figura 27, Figura 28, Figura 29 e Figura 30, respectivamente. É importante ressaltar que o difratômetro utilizado apresenta limite de detecção de 1%(v/v).

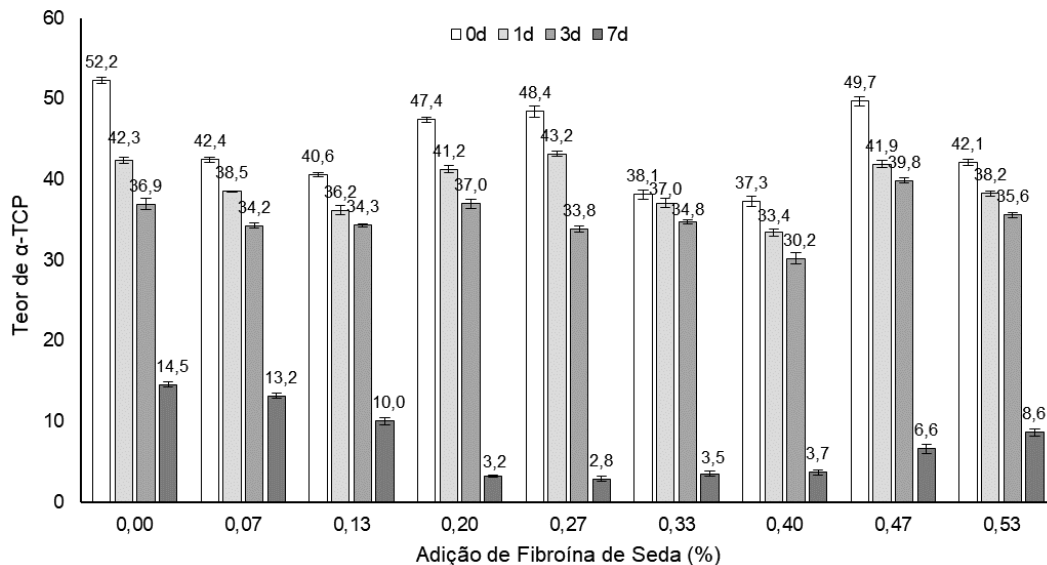


Figura 27: Teor de α -TCP determinado por Refinamento de Rietveld nos cimentos obtidos conforme aumento da permanência em câmara úmida.

É possível observar a transformação gradual do α -TCP nas fases de apatita (CDHA e HAp-Cl) e uma tendência maior de CPCs com incorporação de fibroína de seda de apresentar maior transformação inicial e final desta fase. Entretanto, foi possível notar uma tendência destas amostras de apresentar uma menor cinética de reação nos períodos iniciais em câmara úmida. Este comportamento pode ter sido causado devido a uma maior dificuldade das moléculas de água de difundirem pela fase polimérica, dificultando a continuação da reação de hidratação do material, conforme já demonstrado em outros sistemas CPC com adições de fases líquidas poliméricas (Tronco, Cassel e dos Santos, 2022). Além disso, uma pequena variação nos teores de β -TCP foi observada conforme a permanência em câmara úmida, demonstrando a baixa solubilidade do material.

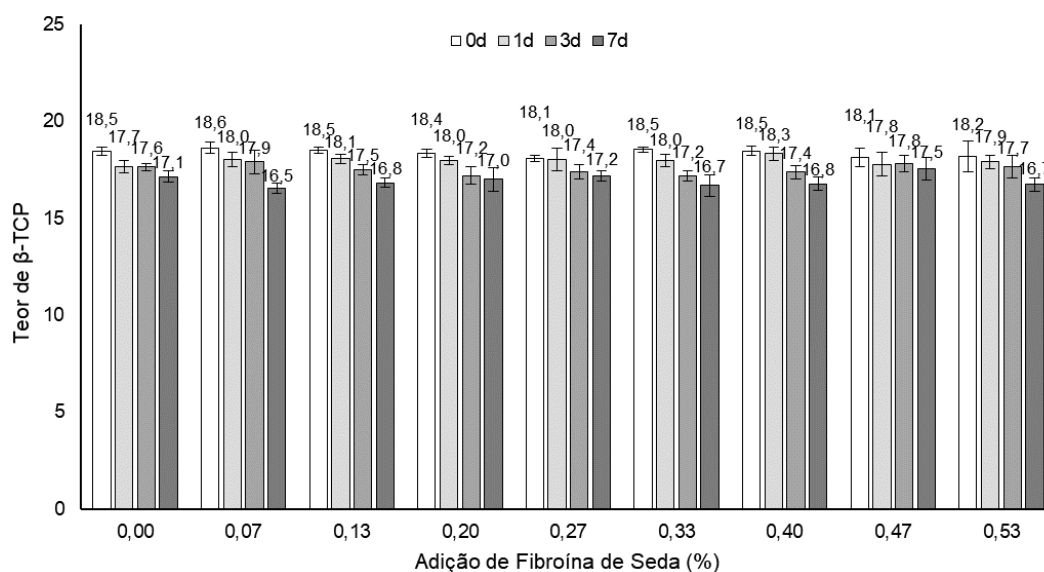


Figura 28: Teor de β -TCP determinado por Refinamento de Rietveld nos cimentos obtidos conforme aumento da permanência em câmara úmida.

A curva do teor de CDHA presente no material está diretamente relacionada à concentração de α -TCP. De forma análoga à curva do α -TCP, a formação de CDHA se torna mais significativa após 7d de permanência em câmara úmida e, durante os primeiros 3 dias, apresenta uma cinética mais baixa de transformação para amostras com adição de SF, o que é mais evidentemente observado nas amostras S33M1 e S40M1. Com relação ao HAp-Cl, este apresenta sua transformação total, majoritariamente, sem a necessidade de câmara úmida ou após um dia de permanência nesta. É possível inferir

que a interação com os íons cloro presentes no material causa a formação preferencial de HAp-Cl até o esgotamento destes íons nos CPCs. A pequena diminuição observada no teor de HAp-Cl no material com a permanência em câmara úmida é, possivelmente, decorrente da formação de CDHA nos materiais, a qual é uma fase mais densa e é formada através incorporação de íons OH^- à estrutura, o que provoca o ganho de massa do material e diminui a contribuição mássica da fase HAp-Cl.

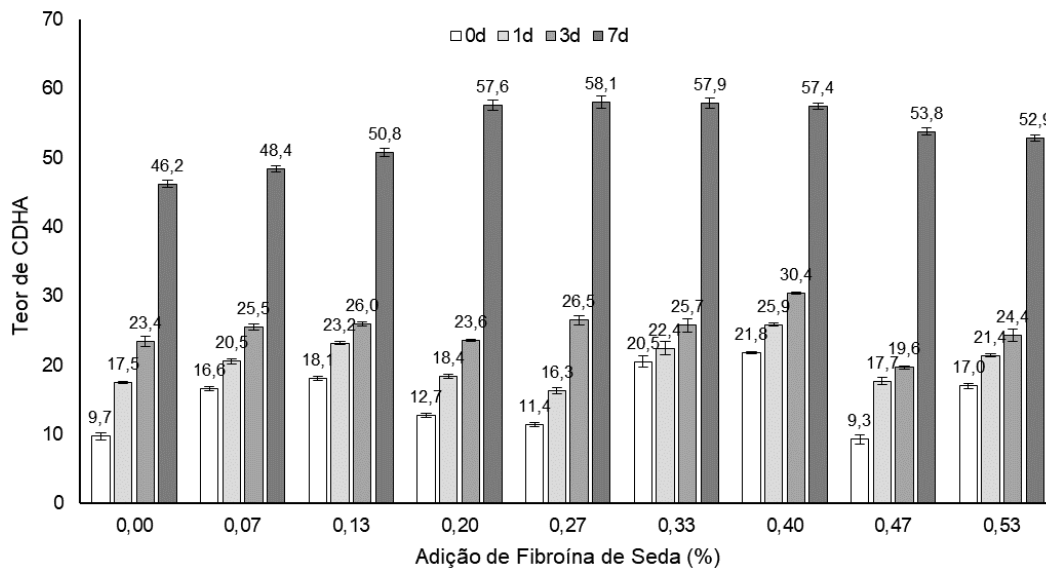


Figura 29: Teor de CDHA determinado por Refinamento de Rietveld nos cimentos obtidos conforme aumento da permanência em câmara úmida.

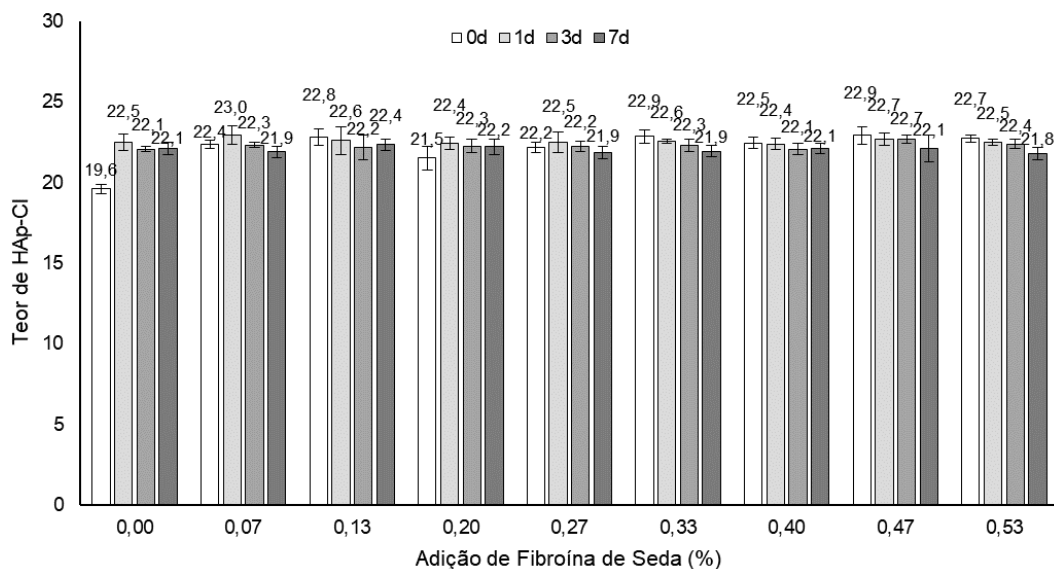


Figura 30: Teor de HAp-Cl determinado por Refinamento de Rietveld nos cimentos obtidos conforme aumento da permanência em 100% de umidade relativa.

Com relação às composições das amostras após 7d em câmara úmida, as quais estão detalhadamente descritas na Tabela 10, é possível observar a hidratação do α -TCP de forma evidente em todas as variantes de teste. Entretanto, amostras S00M1 e S07M1 ainda demonstraram quantidades significativas, acima de 10%, de α -TCP em sua composição, o que também pode ser observado na Figura B4 do Apêndice B, já que um pico significativo correspondente ao pico principal de α -TCP ($2\theta = 30.71^\circ$) ainda é identificável nos difratogramas destas amostras. Para quantidades superiores de incorporação de SF, a presença de α -TCP apresentou uma tendência de decréscimo conforme a adição deste polímero até amostras S27M1, mas ainda pôde ser identificada como resíduo da reação de hidratação. Estes resíduos são geralmente observados em cimentos de α -TCP, já que sua hidratação é comumente dificultada pela formação de cristais de Hadley – estruturas que consistem em uma camada envoltória de CDHA sobre partículas de α -TCP ainda não solubilizadas. A presença destas estruturas exige a difusão de moléculas de água através da casca apatítica para que a reação tenha continuidade e, assim, diminuem substancialmente a cinética da reação (Thürmer et al., 2012).

Tabela 10: Composição dos CPCs desenvolvidos após 7d em câmara úmida de 100% de umidade relativa, conforme determinado por refinamento de Rietveld.

| Variante | α -TCP [% (m/m)] | β -TCP [% (m/m)] | CDHA [% (m/m)] | HAp-Cl [% (m/m)] |
|----------|-------------------------|------------------------|----------------|------------------|
| S00M1 | 14.5 ± 0.3 | 17.1 ± 0.3 | 46.2 ± 0.2 | 22.1 ± 0.4 |
| S07M1 | 13.2 ± 0.4 | 16.5 ± 0.3 | 48.4 ± 0.4 | 21.9 ± 0.3 |
| S13M1 | 10.0 ± 0.4 | 16.8 ± 0.2 | 50.8 ± 0.6 | 22.4 ± 0.4 |
| S20M1 | 3.2 ± 0.1 | 17.0 ± 0.6 | 57.6 ± 0.8 | 22.2 ± 0.5 |
| S27M1 | 2.8 ± 0.3 | 17.2 ± 0.3 | 58.1 ± 0.9 | 21.9 ± 0.4 |
| S33M1 | 3.5 ± 0.3 | 16.7 ± 0.6 | 57.9 ± 0.7 | 21.9 ± 0.4 |
| S40M1 | 3.7 ± 0.3 | 16.8 ± 0.4 | 57.4 ± 0.5 | 22.1 ± 0.3 |
| S47M1 | 6.6 ± 0.6 | 17.5 ± 0.6 | 53.8 ± 0.5 | 22.1 ± 0.8 |
| S53M1 | 8.6 ± 0.4 | 16.7 ± 0.4 | 52.9 ± 0.5 | 21.8 ± 0.4 |

A maior eficiência da reação de hidratação em amostras com adição de SF pode ser explicada pela formação de pontos de nucleação de CaP na superfície desta proteína,

os quais são resultado da presença de grupos carboxila, carbonila e hidroxila na interface CaP/SF. Estes grupos formam sítios de supersaturação de Ca^{2+} devido à forte atração eletrostática desses íons pelos grupos aniônicos, o que causa a precipitação e nucleação de cristais de CaP na superfície da SF, e resulta em uma grande capacidade deste polímero de orientar e regular o crescimento destes cristais (Huang et al., 2019; Mobika et al., 2020; Özcan e Çiftçioğlu, 2022). Assim, podemos inferir que a capacidade da SF de nuclear e orientar os cristais de CaP dificulta a formação de cristais de Hadley, promovendo a maior eficiência observada na reação de hidratação do α -TCP. Como resíduos de α -TCP ainda são observáveis nos materiais, não podemos afirmar que há uma ausência completa destas estruturas no material, apenas a redução de sua ocorrência. Além disso, a capacidade de orientação dos cristais promovida pela SF pode contribuir na obtenção de fases de CDHA e HAp-Cl mais cristalinas do que comumente obtido em CPCs. Este efeito foi observado através da verificação do aumento da intensidade dos picos de Bragg em função da concentração de SF em difratogramas de amostras com composições de fases inorgânicas similares (S20M1, S27M1, S33M1 e S40M1).

As amostras S47M1 e S53M1 demonstraram, entretanto, resultados contrastantes com as tendências supracitadas, exibindo um aumento substancial no teor de α -TCP em comparação a amostras com concentrações inferiores de SF. Isto pode ser proveniente da baixa manuseabilidade e injetabilidade demonstradas por estas pastas, além do aumento da concentração de polímero na fase líquida, o que pode diminuir a solubilidade do α -TCP. Devido ao desempenho inferior destas propriedades, é possível que a homogeneidade da solução de ativação não tenha sido atingida adequadamente, o que pode ter causado também o decréscimo da efetividade da reação de pega.

Para avaliar de forma mais aprofundada a concentração de íons cloro no material, foi realizada a análise de fluorescência de raios-X (FRX) de uma amostra S33M1 em um equipamento Thermo Fischer Scientific modelo Niton™ XL3t. As porcentagens mássicas dos elementos cálcio, fósforo e cloro estão descritas na Tabela 11. É importante ressaltar que o equipamento em que a análise foi conduzida não detecta elementos de massas

atômicas menores que a do magnésio (Mg). Assim, as contribuições mássicas de oxigênio (O) e hidrogênio (H) não foram contabilizadas pelo equipamento.

As porcentagens mássicas foram corrigidas considerando as contribuições de massa dos elementos O e H, que foram calculadas considerando as frações mássicas de cada fase ($\%m_i$) determinadas por refinamento de Rietveld. As porcentagens corrigidas estão descritas na Tabela 12, e foram calculadas seguindo as equações (14), (15) e (16), onde n é a quantidade do elemento em 1 mol de fase i , M é a massa molar do elemento e/ou fase, e X é o elemento que terá sua fração mássica corrigida (Ca, P ou Cl).

$$(\%Ca, P, Cl)_i = \frac{(n_{Ca_i} \times M_{Ca} + n_{P_i} \times M_P + n_{Cl_i} \times M_{Cl})}{M_i} \quad (14)$$

$$\%Ca, P, Cl = \sum \%m_i \times (\%Ca, P, Cl)_i \quad (15)$$

$$\%X_{corr} = \%X_{XRF} \times \%Ca, P, Cl / 100 \quad (16)$$

Nesta tabela também estão representadas as concentrações teóricas de Ca, P e Cl no material, as quais foram calculadas conforme os teores das fases observadas, seguindo as equações (17) e (18). Todos as quantidades de elementos em 1 mol de material foram retiradas das fichas cristalográficas utilizadas durante o refinamento de Rietveld.

$$\%X_i = \frac{(n_{X_i} \times M_X)}{M_i} \quad (17)$$

$$\%X = \sum \%m_i \times \%X_i \quad (18)$$

Tabela 11: Concentrações mássicas dos elementos Ca, P e Cl determinados por FRX.

| Elemento | Concentração [% (m/m)] |
|----------|------------------------|
| Ca | 65,51 ± 0,53 |
| P | 32,96 ± 0,30 |
| Cl | 0,89 ± 0,03 |

Tabela 12: Concentração teórica e concentração experimental dos elementos Ca, P e O. Os valores

experimentais apresentados foram determinados por FRX e corrigidos considerando as contribuições de O e H.

| Elemento | Concentração Experimental Corrigida [% (m/m)] | Concentração Teórica [% (m/m)] |
|----------|---|--------------------------------|
| Ca | 37,95 | 38,04 |
| P | 19,09 | 19,28 |
| Cl | 0,52 | 0,62 |

É importante ressaltar que íons cloro são substituições iônicas comuns em hidroxiapatitas biológicas, representando entre 0,13% (Ratnayake, Mucalo e Dias, 2017) e 1,3% (Galia et al., 2009) em massa da fase mineral óssea. Sua significância surge de sua capacidade de induzir meios levemente ácidos na superfície óssea, estimulando a atividade de osteoclastos no processo de reabsorção óssea. Biomateriais baseados em HAp-Cl demonstraram maior proliferação celular e osteocondutividade *in vitro* e *in vivo* quando comparadas à HAp estequiométrica; entretanto, concentrações altas de substituição de cloro em apatitas, como o caso da ClAp – em que todos os grupos OH⁻ são substituídos por Cl⁻, podem causar reações indesejadas devido à intensificação da acidez local (Kannan et al., 2007; García-Tuñón et al., 2012; Ratnayake, Mucalo e Dias, 2017). Como os materiais desenvolvidos demonstram a ausência de ClAp e concentrações relativamente baixas de Cl⁻, constituindo aproximadamente 0,52% em massa do material final, pode-se inferir que a presença de HAp-Cl pode aumentar a osteocondutividade dos CPCs e prover uma composição mais biomimética sem a ocorrência de efeitos adversos causados por altas concentrações de Cl⁻.

5.5.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

Os espectros de FTIR das variantes de teste estão representados na Figura 31. Todos os CPCs obtidos demonstram bandas referentes a grupos PO₄³⁻; entretanto, amostras S00M1 demonstraram morfologias de banda mais próximas das apresentadas por espectros de α -TCP, inferindo maiores teores desta fase do que nas outras variantes (Carrodeguas e De Aza, 2011). As bandas observadas entre 560cm⁻¹ e 605cm⁻¹ são correspondentes ao modo de vibração assimétrico de flexão ν_4 de ligações P-O. As bandas relacionadas ao modo de vibração assimétrico de deformação ν_3 estão

sobrepostas formando a banda extensa em 1028cm^{-1} , a qual apresenta um ombro em 945cm^{-1} correspondente à banda do modo de vibração simétrico de deformação ν_1 da ligação P-O. Além disso, é possível observar uma banda em 876cm^{-1} referente a grupos HPO_4^{2-} inerentes da estrutura da CDHA. Outra característica comum entre as amostras é a banda em 660cm^{-1} atribuída aos grupos OH^- , a qual apresenta deslocamentos parciais para 720cm^{-1} e 729cm^{-1} (Berzina-Cimdina e Borodajenko, 2012; El Rhilassi et al., 2016; Kesmez, 2020). Estes deslocamentos foram primeiramente reportados por Freund e Knobel (1977) em hidroxiapatitas com substituição de flúor e eram puramente dependentes da concentração de substituição dos grupos hidroxila por íons flúor. Este comportamento também foi observado em materiais com a presença de HAp-Cl por Cassel et al. (2023) e é, então, um indicativo da presença de substituição de OH^- por íons Cl^- nos materiais obtidos. As bandas em 1640cm^{-1} e 3438cm^{-1} foram atribuídas a água adsorvida na superfície das amostras. Outrossim, a presença de íons Cl^- é reforçada por diferenças morfológicas na banda em 3438cm^{-1} , as quais podem ser atribuídas à interação entre íons Cl^- e OH^- presentes nos CPCs, conforme detalhado por Maiti e Freund (1981) e de Almeida Cavalcante et al. (2020).

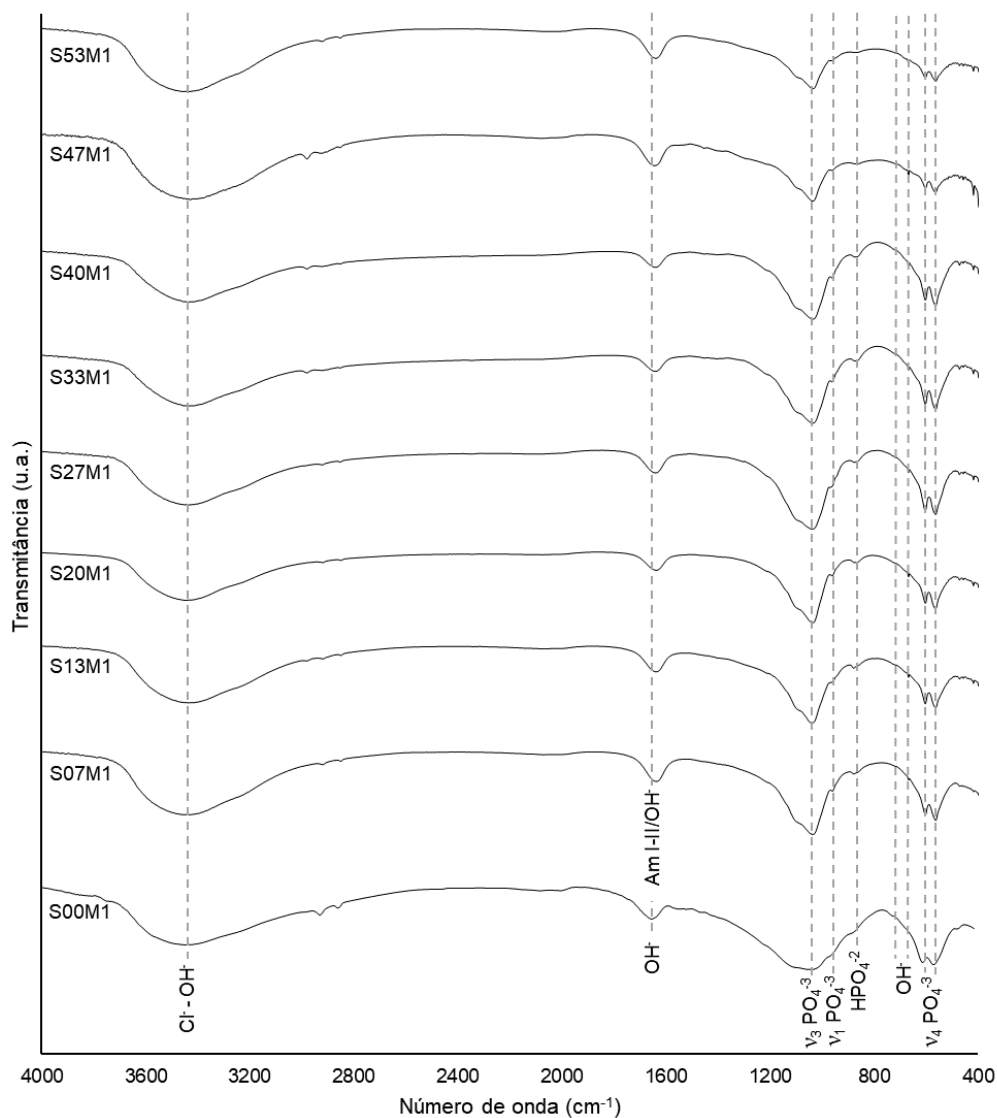


Figura 31. Espectros de infravermelho por transformada de Fourier dos CPCs após 7d em câmara úmida.

As amostras com adição de SF em sua composição apresentam espectros de FTIR quase idênticos à amostra S00M1, com diferenças de morfologia relacionadas aos teores de α -TCP e pequenas diferenças na banda a 1639cm^{-1} . Esta última ocorre devido à sobreposição das bandas relacionadas às vibrações da AmI e AmII observadas no espectro da SF com a banda relacionada à água adsorvida, contribuindo para uma absorção maior da onda incidente e um leve deslocamento do ponto de mínima transmitância para números de onda inferiores.

5.5.3 Porosidade

A evolução da porosidade nos CPC obtidos se encontra na Figura 32, enquanto as porosidades finais, após 7d de armazenamento, estão representadas na Figura 33.

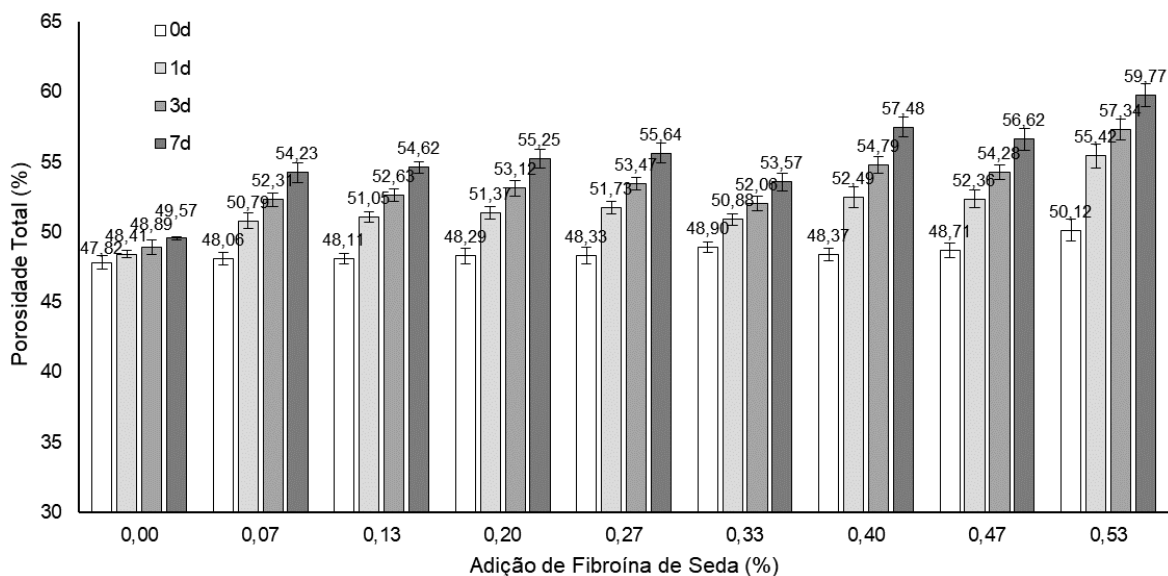


Figura 32: Evolução da porosidade dos cimentos com diferentes concentrações de SF com o tempo de armazenamento em câmara úmida.

É possível verificar o aumento da porosidade das amostras conforme sua permanência em câmara com 100% de umidade relativa. Para amostras S00M1, este aumento condiz com a transformação do α -TCP para as apatitas observadas nos difratogramas, CDHA e HAp-Cl. Isto se deve à maior densidade destas fases, o que diminui o volume real ocupado pelo material em seu interior e, assim, aumenta sua porosidade.

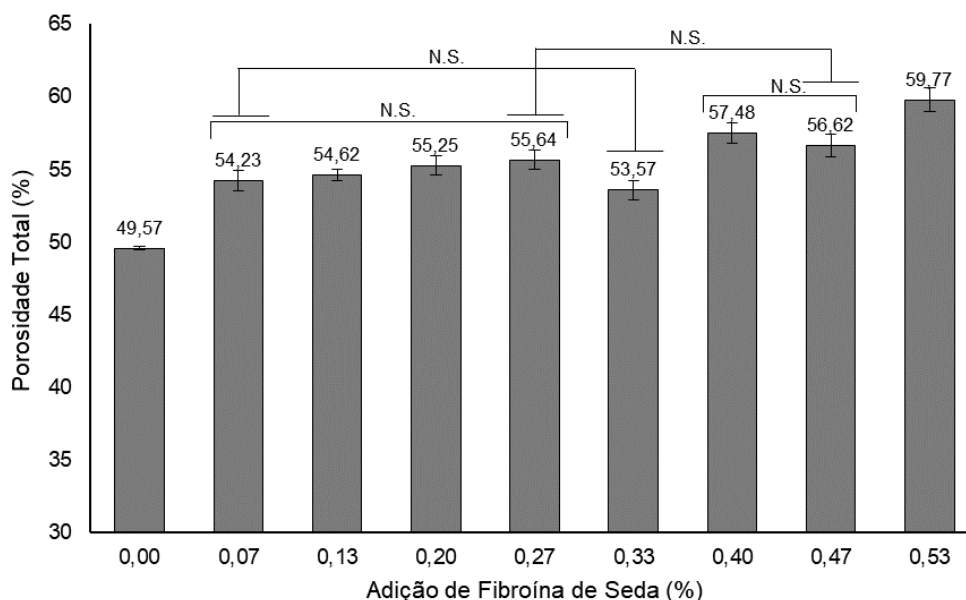


Figura 33: Porosidade dos cimentos obtidos com diferentes concentrações de SF após 7d de armazenamento em câmara úmida. N.S.: $p > 0,05$ entre as variantes.

Já amostras com adição de fibroína de seda, demonstraram aumento da porosidade tanto em função da permanência em câmara úmida, quanto em função da concentração da fase polimérica. No ponto 0d, é possível observar uma tendência de aumento da porosidade com a adição de SF. Esta pode estar relacionada à maior eficiência da transformação de α -TCP nas fases apatíticas finais, a qual, como já supracitado, aumenta a porosidade do material devido à promoção da maior densidade deste. Entretanto, este efeito não é suficiente para descrever o aumento substancial da porosidade conforme a permanência dos CPCs em câmara úmida, já que os aumentos são superiores aos teoricamente esperados apenas pelo aumento da densidade real dos CPCs. Este aumento adicional pode ser resultado do inchamento da SF na presença de umidade, conforme descrito por Kawahara, Furukawa e Yamamoto (2006). Este comportamento é comum em materiais baseados neste polímero, já que moléculas de água são capazes de difundir na SF sob umidade, o que, em temperaturas inferiores a 50°C, permite a transformação de estruturas Seda II em Seda I e causa, conseqüentemente, a expansão do material. Assim, a expansão da SF incorporada durante a manutenção dos CPCs em umidade permite a criação de vazios no material após sua secagem. É importante ressaltar que, apesar de haver uma tendência de aumento da porosidade média com o aumento da concentração de SF, a maioria das

amostras não apresenta diferenças estatisticamente significativas entre si. Ademais, a porosidade expressiva apresentada por amostras S53M1, podem ser decorrentes da presença de defeitos estruturais provenientes da baixa injetabilidade das pastas cimentícias.

5.5.4 Resistência à Compressão

A evolução da resistência à compressão dos CPCs desenvolvidos está representada na Figura 34. Já as resistências e módulos de compressão após 7d em câmara com 100% de umidade relativa se encontram na Figura 35.

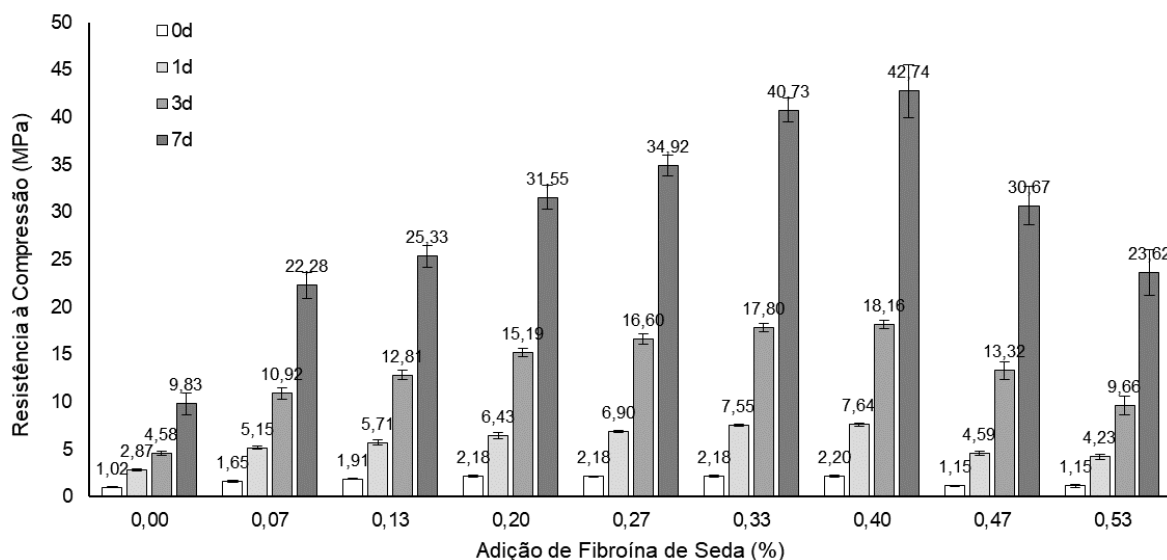


Figura 34: Evolução da resistência à compressão dos cimentos com diferentes concentrações de SF com o tempo de armazenamento em 100% de umidade relativa.

É possível observar o aumento da resistência mecânica de todas as amostras à medida que permanecem em câmara úmida, o que está diretamente relacionado à evolução da hidratação do α -TCP. Isso ocorre devido à precipitação de cristais de CDHA e HAp-CI entrelaçados, o que contribui para o aumento da resistência mecânica do CPC por meio do ancoramento mecânico. Similarmente à composição de fases, não são identificadas diferenças substanciais entre as amostras nos primeiros dias na câmara úmida, embora as amostras com incorporações de SF já apresentem resistências significativas após 3 dias de exposição à umidade. Portanto, uma vez que os aumentos na resistência mecânica desses materiais não são diretamente proporcionais às

transformações de fase observadas, pode-se inferir que, inicialmente, essas transformações não exercem grande influência na resistência mecânica, já que provavelmente consistem na nucleação de cristais que não atingem tamanho suficiente para aumentar substancialmente as propriedades mecânicas. No entanto, em um segundo estágio, as transformações contínuas permitem o crescimento dos cristais, possibilitando um entrelaçamento mais expressivo e causando um aumento exponencial da resistência mecânica até atingir um limite em que a resistência não varia significativamente, o qual é reportado por diversos estudos como sendo atingido após 7d de armazenamento em umidade (Weichhold et al., 2019; Rau et al., 2022).

Além disso, é possível verificar o aumento significativo da resistência após 7d em câmara úmida em função da adição de SF aos CPCs pré-misturados, atingindo um máximo de 42,74MPa para as amostras S40M1, o que é equivalente a 434,8% da resistência à compressão atingida pela amostra de controle (S00M1). Com relação ao módulo de compressão, uma evolução do valor médio desta propriedade foi observada conforme a adição de SF ao CPC, a qual está alinhada ao aumento da resistência à compressão. No entanto, a maioria das variantes não demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre seus módulos de compressão, as quais somente foram observadas entre amostras S33M1 e S00M1, S07M1 e S13M1, e entre amostras S40M1 e S00M1, S07M1, S13M1 e S53M1. Estas duas amostras (S33M1 e S40M1) atingiram os dois maiores módulos de compressão com $2,19 \pm 0,23$ GPa e $2,34 \pm 0,32$ GPa, respectivamente. Ao se realizar a avaliação de ambas as propriedades, não foi possível verificar diferenças estatisticamente significativas entre as amostras S33M1 e S40M1. Assim, a variante S33M1 foi considerada a composição mais adequada para as análises subsequentes devido à sua injetabilidade superior.

O aumento das propriedades mecânicas dos CPCs pode ser parcialmente relacionado à maior eficiência da hidratação do α -TCP, conforme supracitado. Entretanto, como amostras com composições inorgânicas similares demonstraram resistências à compressão significativamente diferentes, pode-se inferir que a adição da fase polimérica contribui para o aumento da resistência mecânica do material de forma independente ao maior teor de fases hidratadas. Ademais, a inclusão de SF às composições provoca a

nucleação localizada dos fosfatos de cálcio e uma maior orientação dos cristais, o que melhora o ancoramento mecânico destes em comparação aos cristais tipicamente lamelares e petaloides de CPCs baseados em α -TCP.

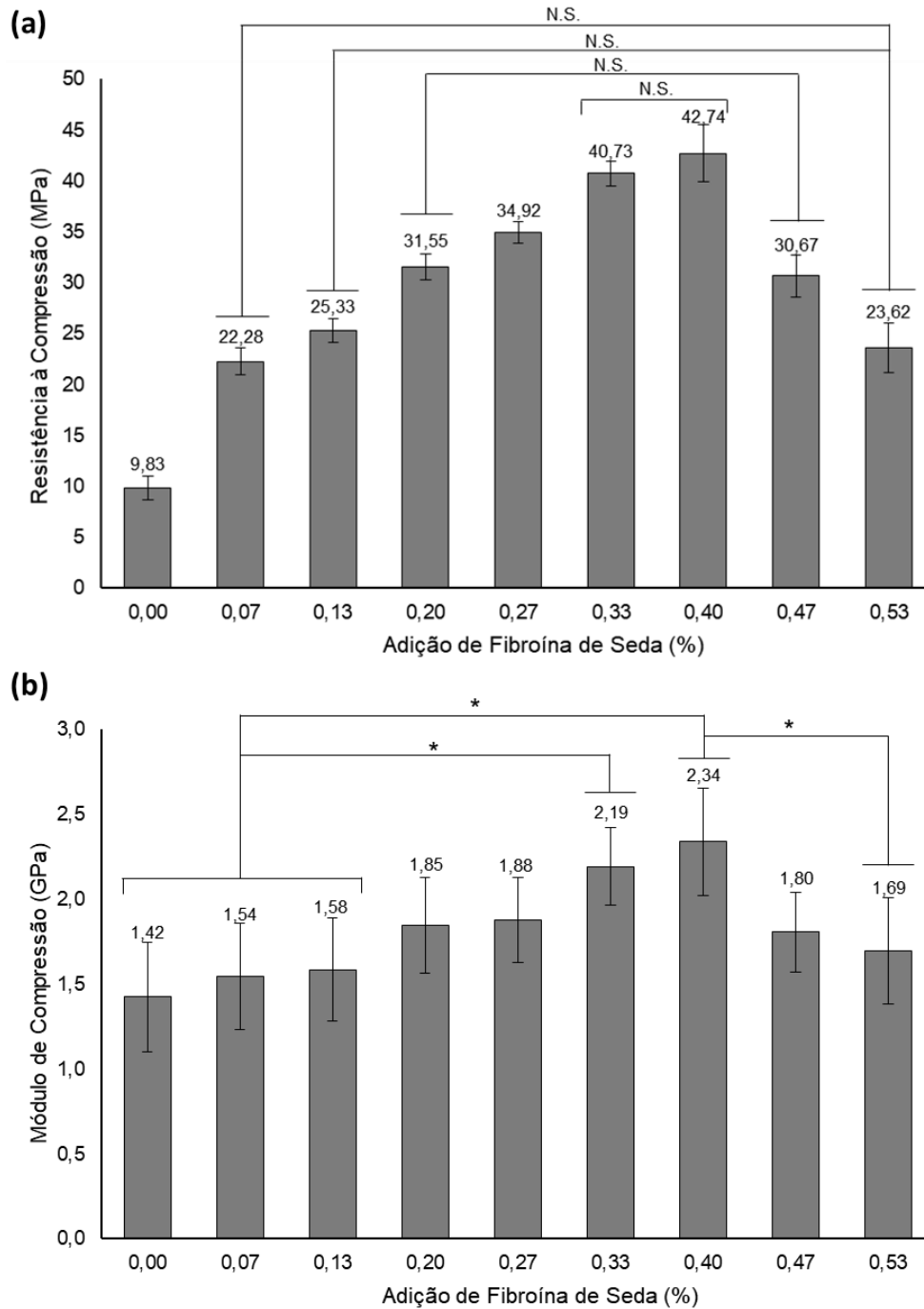


Figura 35: (a) Resistência à compressão e (b) módulo de compressão dos cimentos obtidos com diferentes concentrações de SF após 7d de armazenamento em 100% de umidade. *: $p < 0,05$ entre as variantes; N.S.: $p > 0,05$ entre as variantes.

Não obstante, amostras com adições superiores a 0,40%SF demonstraram um decréscimo nas propriedades à compressão quando comparadas a outras amostras reforçadas. Este decréscimo pode estar relacionado à menor eficiência da hidratação do α -TCP, a qual diminuiria o ancoramento mecânico dos cristais e, conseqüentemente sua resistência e módulo à compressão. Esta diminuição pode também ser causada por dificuldades de manuseio causadas pela baixa injetabilidade destas variantes, as quais criariam defeitos e porosidade adicional à estrutura dos materiais. Ainda assim, todas as amostras reforçadas exibiram resistência à compressão significativamente superior à amostra de controle ($p < 0,05$), demonstrando uma boa interação entre as fases orgânicas e inorgânicas dos materiais.

Valores inferiores de resistência à compressão já foram reportados na literatura para CPCs convencionais baseados em α -TCP reforçados apenas com SF, os quais atingiram valores de aproximadamente 32MPa (Cao et al., 2014; Hu et al., 2018). Além das resistências mecânicas inferiores e da não-armazenabilidade destes, estes materiais foram preparados utilizando razões L/P menores do que as deste trabalho, inferindo menores porosidades e, assim, menor contribuição desta propriedade nas resistências mecânicas dos cimentos. Desta forma, os CPCs desenvolvidos neste trabalho demonstraram capacidades superiores de reforço mecânico através da incorporação de baixas concentrações de SF.

Outrossim, a compatibilidade mecânica dos CPCs com o tecido ósseo é de extrema importância quando se estuda o potencial de aplicação destes na regeneração óssea. Esta importância se torna ainda maior quando se avalia o módulo de compressão; caso o material demonstre um módulo superior ao do osso nativo, este pode induzir efeitos de blindagem de tensões e conseqüentemente provocar a perda de densidade óssea do tecido adjacente (Raffa et al., 2021). Os módulos de compressão observados são comparáveis aos de ossos caninos úmidos, que apresentam módulos na magnitude de 1GPa (Kucko et al., 2019) e notavelmente menores do que os apresentados por ossos corticais humanos, que variam entre 17,9 e 18,2GPa (Morgan, Unnikrisnan e Hussein, 2018). Além disso, os CPCs desenvolvidos atingiram resistências à compressão que estão dentro da faixa observada em ossos trabeculares, os quais variam de 1,5 a 45MPa

(Ginebra, 2009). Entretanto, apesar dos aumentos significativos de resistência à compressão observados pelos materiais, os valores ainda não são compatíveis com os apresentados por ossos corticais humanos (Ginebra, 2009). Assim, estes materiais poderiam ser aplicados em regiões e ossos predominantemente trabeculares, ampliando a aplicação atual de cimentos de fosfato de cálcio baseados em α -TCP, mas ainda apresenta pequenas limitações em sua aplicação como um material para regeneração óssea.

5.5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

As micrografias da superfície de fratura de amostras de CPC após permanência em câmara úmida por 0d, 1d, 3d e 7d estão representadas, respectivamente, na Figura 36, Figura 37, Figura 38 e Figura 39. A evolução de cada amostra pode ser verificada no Apêndice C.

Nas amostras de 0 e 1d, é possível observar a presença de partículas não reagidas e pequenos pontos de nucleação de apatitas. Devido à uniformidade das arestas da maioria das partículas de maior tamanho, podemos inferir que estas são majoritariamente constituídas de β -TCP, uma vez que essa fase apresenta menor solubilidade e não reagiria extensivamente com a fase aquosa. Além disso, não foram identificadas diferenças substanciais nas microestruturas entre estes dois pontos de análise, embora seja possível observar um leve aumento na deposição de cristais. No entanto, uma magnificação superior seria necessária para detectar diferenças mais acentuadas relacionadas à hidratação do α -TCP e verificar o aumento real da deposição de apatita. Ademais, nestes períodos ainda não se observam cristais com crescimento substancial e, assim, se infere o favorecimento energético da nucleação destes. Já a partir do terceiro dia, tornam-se visíveis deposições mais significativas, principalmente nas amostras reforçadas com SF, o que é explicitamente evidente na amostra S33M1 (Figura 38f). Nesse período, as amostras apresentam cristais agulhados de comprimento adequado para um ancoramento mecânico mais eficaz, o que contribui para o aumento significativo da resistência à compressão em comparação com os valores anteriores.

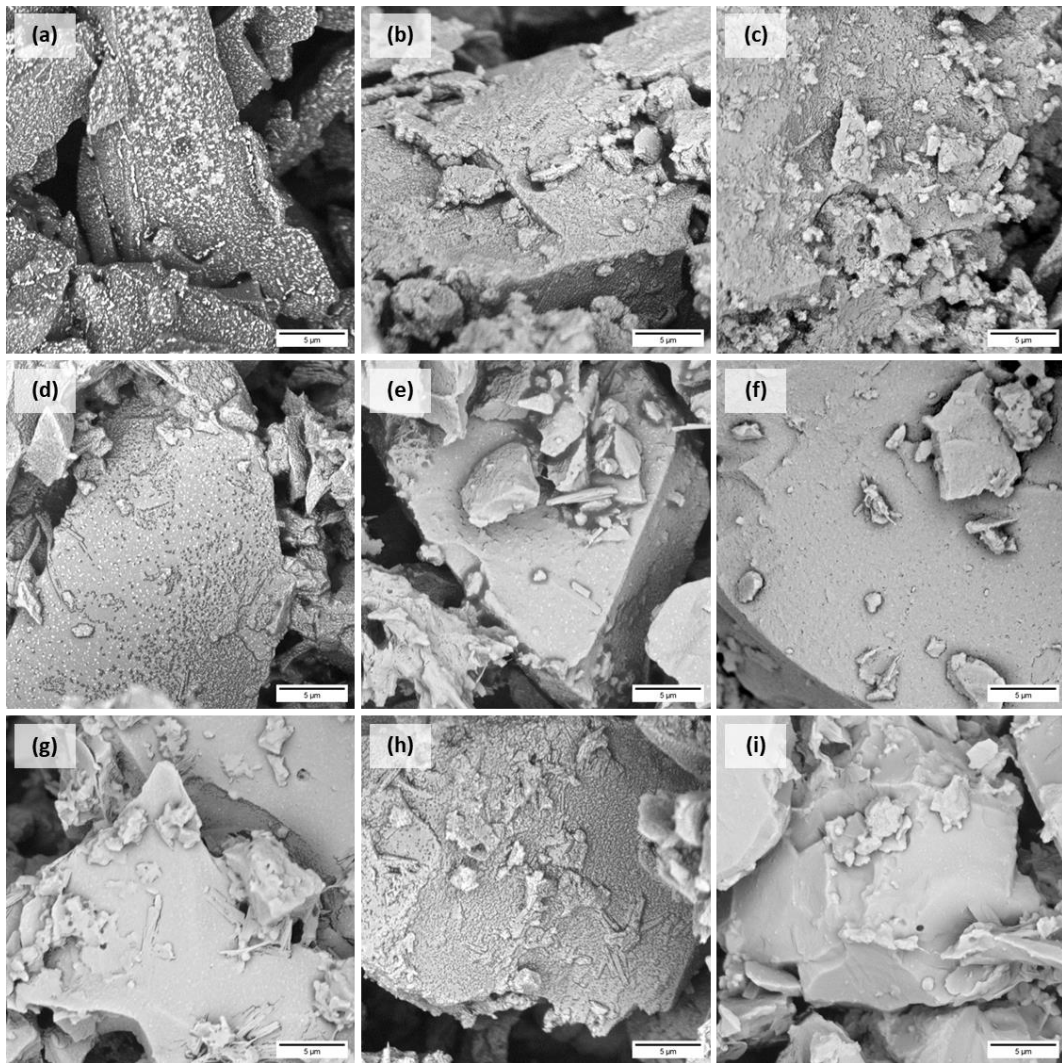


Figura 36: Micrografias obtidas por MEV da superfície de fratura dos CPCs (a) S00M1, (b) S07M1, (c) S13M1, (d) S20M1, (e), S27M1, (f) S33M1, (g) S40M1, (h) S47M1 e (i) S53M1 sob magnificação de 10000x após pega sem permanência em 100% de umidade relativa (0d). A barra de escala representa um comprimento de 5µm.

Estas observações sustentam, portanto, a hipótese apresentada na Seção 5.5.4, demonstrando que, durante a permanência entre 0 e 1d em câmara úmida, a transformação α -TCP \rightarrow CDHA/HAp-Cl consiste principalmente na nucleação dos cristais apatíticos, e, desta forma, não exerce influência substancial na resistência mecânica. No entanto, entre 3 e 7d de permanência em câmara úmida, essa transformação envolve preferencialmente o crescimento destes cristais, o que contribui para o ancoramento mecânico e o aumento na resistência à compressão dos CPCs.

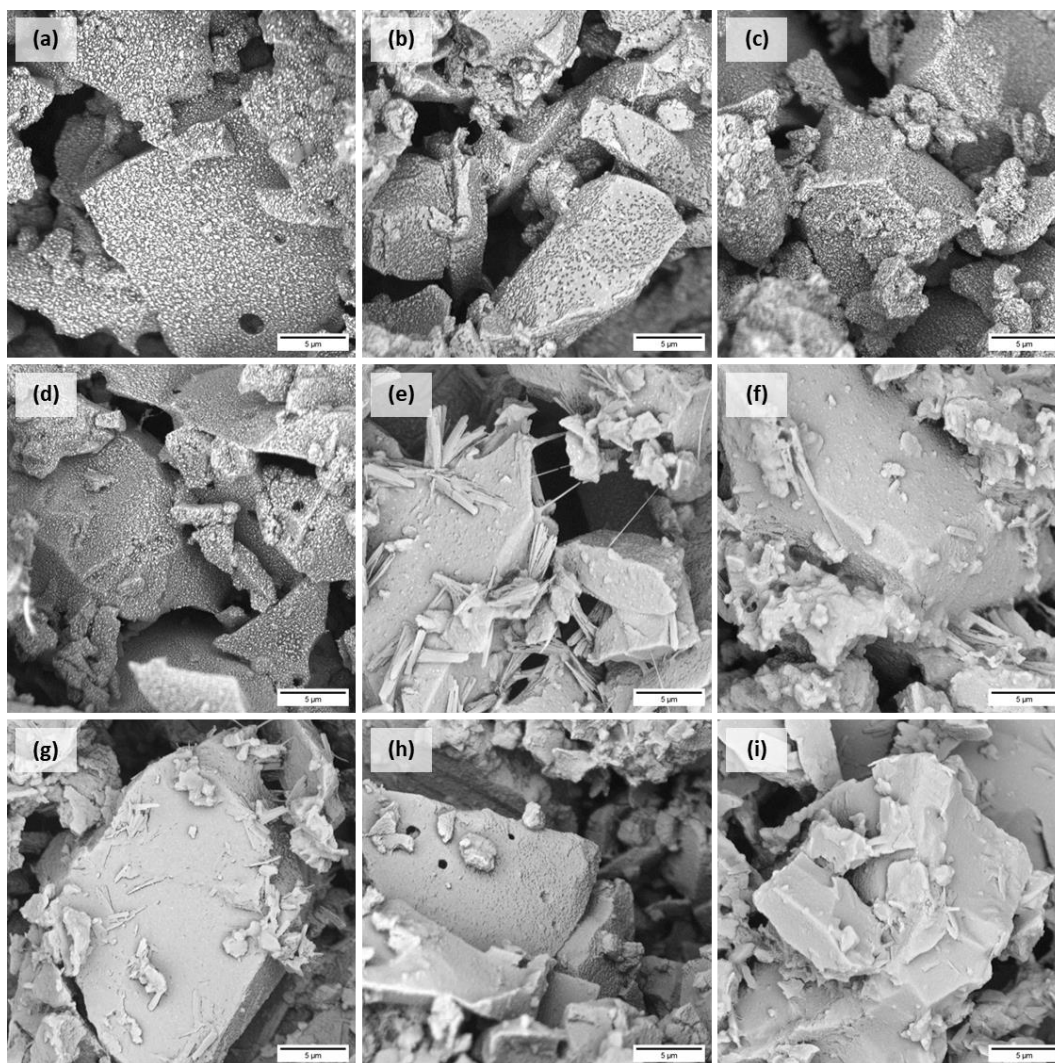


Figura 37: Micrografias obtidas por MEV da superfície de fratura dos CPCs (a) S00M1, (b) S07M1, (c) S13M1, (d) S20M1, (e) S27M1, (f) S33M1, (g) S40M1, (h) S47M1 e (i) S53M1 sob magnificação de 10000x após pega e permanência em 100% de umidade relativa por 1d. A barra de escala representa um comprimento de 5 μ m.

As imagens obtidas após a permanência dos materiais por 7d em 100% de umidade relativa (Figura 39) apresentam cristais nanoestruturados em formas lamelares e agulhadas. Amostras S00M1 demonstram microestrutura composta, principalmente, por cristais lamelares e petaloides, os quais são indicativos da formação de cristais de Hadley. A presença destas estruturas, assim como a menor concentração de cristais na superfície de fratura deste CPC, corrobora a hipótese levantada na Seção 5.5.1 sobre a hidratação facilitada do material inicial através da adição de SF.

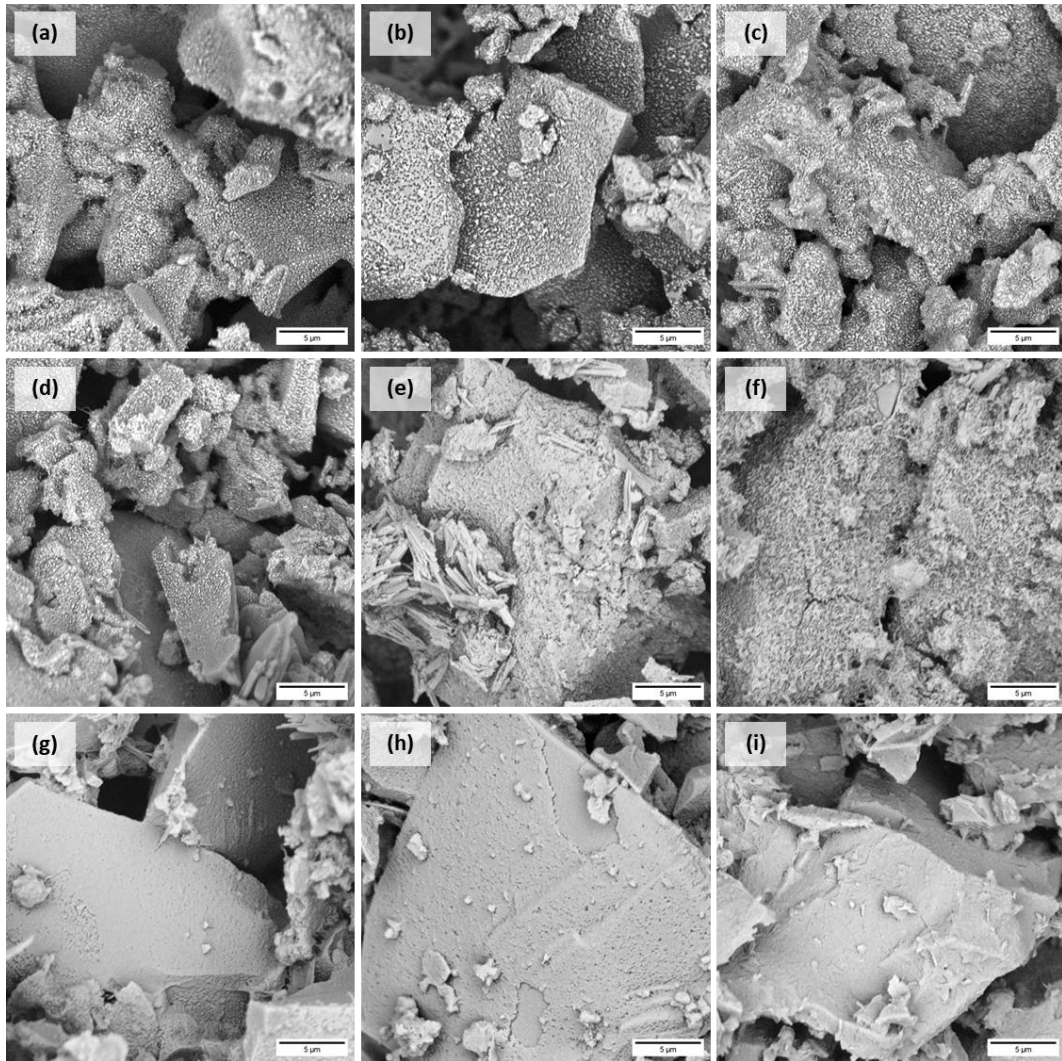


Figura 38: Micrografias obtidas por MEV da superfície de fratura dos CPCs (a) S00M1, (b) S07M1, (c) S13M1, (d) S20M1, (e) S27M1, (f) S33M1, (g) S40M1, (h) S47M1 e (i) S53M1 sob magnificação de 10000x após pega e permanência em 100% de umidade relativa por 3d. A barra de escala representa um comprimento de 5µm.

Além disso, amostras reforçadas com SF demonstram maior cobertura da superfície de fratura com cristais apatíticos e, com exceção das amostras S47M1 e S53M1, uma tendência de aumento da razão entre cristais agulhados e lamelares de forma proporcional ao aumento da concentração deste polímero. Apesar da predominância de cristais agulhados na morfologia destes materiais, ainda é possível observar cristais lamelares, de forma a demonstrar uma baixa concentração de cristais de Hadley e, conseqüentemente, de α -TCP residual nos CPCs. Esta microestrutura demonstra a alta capacidade da SF de regular o crescimento e orientação de cristais de

CaPs precipitados, conforme supracitado. A presença desta estrutura corrobora também a possibilidade do aumento da resistência mecânica em 7d através do incremento da eficiência do ancoramento mecânico proporcionado pelos cristais agulhados.

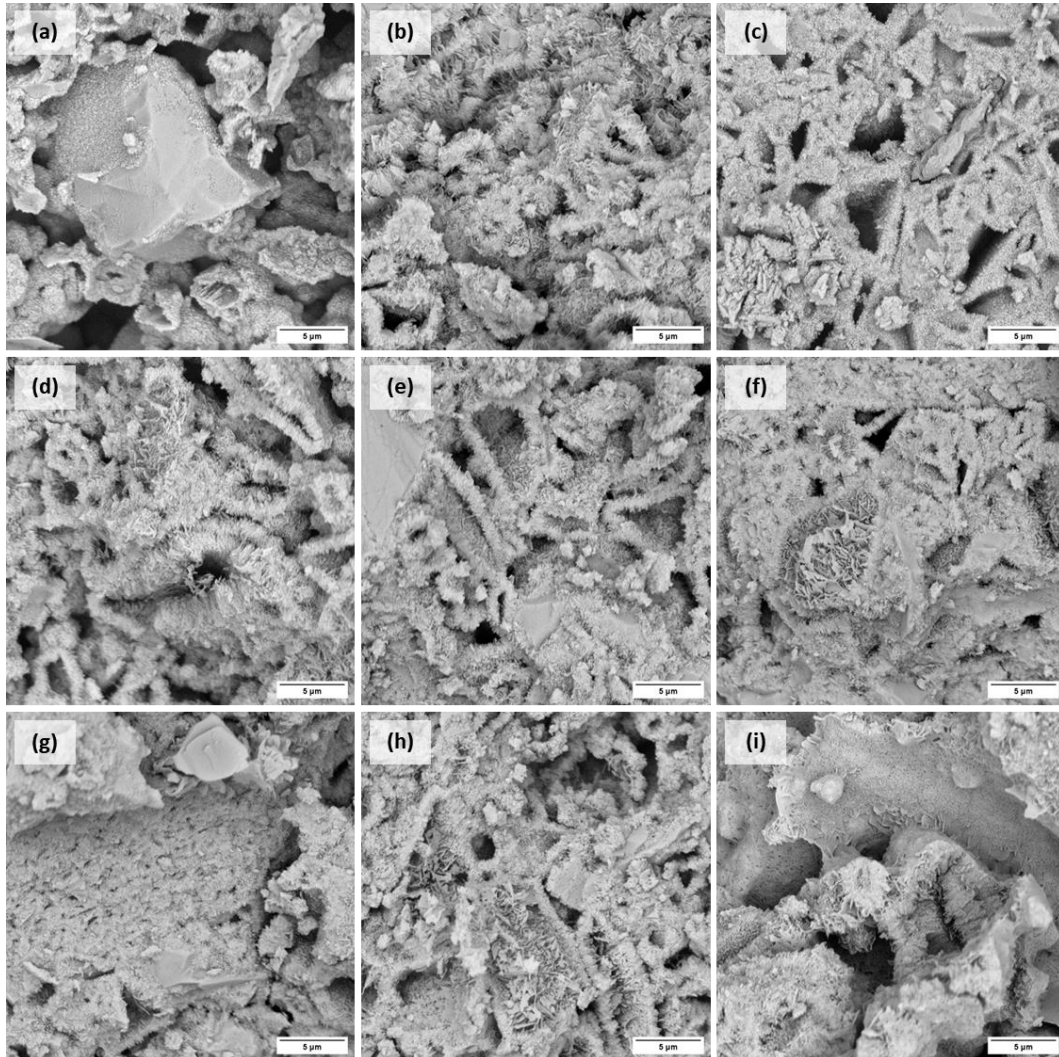


Figura 39: Micrografias obtidas por MEV da superfície de fratura dos CPCs (a) S00M1, (b) S07M1, (c) S13M1, (d) S20M1, (e) S27M1, (f) S33M1, (g) S40M1, (h) S47M1 e (i) S53M1 sob magnificação de 10000x após pega e permanência em 100% de umidade relativa por 7d. A barra de escala representa um comprimento de 5µm.

Outrossim, a microestrutura final demonstra similaridades significativas entre os mecanismos de nucleação de CaP da SF e Col-I; já que, no tecido ósseo, fibras de Col-I biológicas nucleiam cristais nanoestruturados de HAp com orientação preferencial (Wang e Yeung, 2017; Bilgiç et al., 2020). Logo, as dimensões nanométricas e maior orientação

dos cristais de CDHA e HAp-Cl nas amostras reforçadas com SF formam uma estrutura análoga à fase mineral óssea, o que pode melhorar a afinidade celular do material durante processos de regeneração óssea (Cao et al., 2014; Bigi e Boanini, 2017).

Cassel et al. (2023) demonstraram uma tendência de redução dos tamanhos dos cristais com a adição de SF, o que pode ter afetado as resistências mecânicas de amostras com maiores teores do polímero. Esta é uma hipótese a ser estudada nas composições desenvolvidas; entretanto, para a verificação adequada dos tamanhos dos cristais apatíticos nos CPCs e a influência da SF na variação destas dimensões, é necessária a avaliação em um microscópio eletrônico de varredura que permita a obtenção de imagens sob maiores magnificações.

5.5.6 Calorimetria isotérmica

Os tempos de pega dos cimentos S00M1 e S33M1 obtidos utilizando agulhas de Gillmore estão descritos na Tabela 13. Já a curva de calor total liberado obtida por calorimetria isotérmica está representada na Figura 40 e os tempos relevantes de avaliação da reação de hidratação estão descritos na Tabela 14.

Tabela 13: Tempo de pega inicial e final avaliados através do método de agulhas de Gillmore para cimentos S00M1 e S33M1.

| | T_{IG} (min) | T_{FG} (min) |
|-------|-----------------------------|-----------------------------|
| S00M1 | 35 | 65 |
| S33M1 | 35 | 65 |

É possível verificar que o início da reação (T_i) da variante S33M1 é inferior ao apresentado pela amostra S00M1, entretanto os tempos de pega de Gillmore não apresentam diferenças significativas e os tempos T_{50} e T_{90} desta amostra são superiores aos demonstrados pela amostra de controle. Este efeito pode estar relacionado, inicialmente, à nucleação facilitada de cristais de CDHA e HAp-Cl proporcionada pela presença de SF de forma a iniciar a reação de pega mais rapidamente. Já a diminuição da cinética de reação pode estar relacionada à menor difusividade dos íons na solução polimérica, diminuindo a velocidade da continuidade da reação de pega e aumentando o tempo necessário para a reação máxima do material a 37°C sem a presença de umidade.

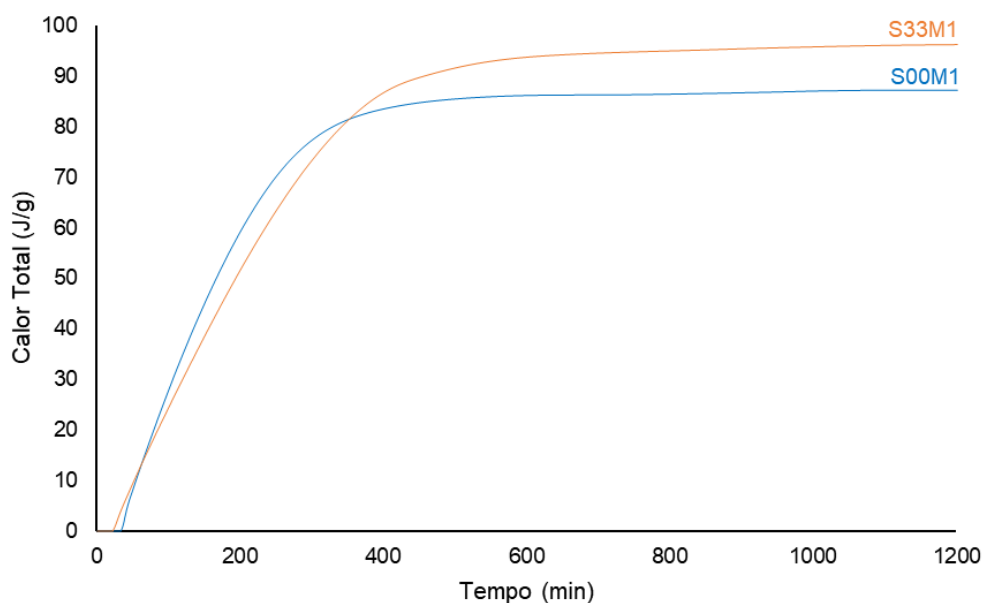


Figura 40: Calor total liberado pela reação de pega de cimentos S33M1 e S00M1.

Tabela 14: Tempo de pega inicial e tempo para ocorrência de 10, 50 e 90% da reação de pega das pastas cimentícias S00M1 e S33M1 determinados através de calorimetria isotérmica a 37°C.

| | T_i (min) | T₁₀ (min) | T₅₀ (min) | T₉₀ (min) |
|-------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| S00M1 | 34,2 | 52,4 | 140,1 | 302,6 |
| S33M1 | 23,2 | 51,6 | 187,2 | 399,5 |

Conforme supracitado, o aumento do tempo de indução demonstrado pelo material pode permitir maiores períodos para o início da aplicação do material e maior controle e cautela do processo pelo cirurgião. Porém, os altos períodos para o endurecimento efetivo do material, representado pelo tempo T_{fG} , pode ser prejudicial à sua aplicação. Isto se deve à necessidade de manutenção do paciente no ambiente estéril e sob anestesia, de forma que este permaneça imóvel para impedir a formação de defeitos e heterogeneidades no material aplicado.

É importante ressaltar que a variante S33M1 demonstrou liberação de calor superior à variante S00M1, corroborando os resultados observados por DRX de que a adição de SF ao cimento resulta em uma maior eficiência da reação de hidratação do α -TCP.

5.5.7 Comportamento *in vitro*

5.5.7.1 Liberação de íons de Ca^{2+}

A liberação de íons em solução é uma maneira de avaliar a eficiência da reação de hidratação do α -TCP e a estabilidade do cimento obtido. Na Figura 41 estão representados os resultados do ensaio de liberação de íons Ca^{2+} em PBS dos CPCs S00M1 e S33M1. Foi possível traçar uma curva de ajuste exponencial assintótica para as duas amostras, o que é um comportamento comum para ensaios de liberação de íons.

Verifica-se um aumento rápido da concentração de Ca^{2+} nas primeiras 2h de ensaio, atingindo valores de $4,93 \pm 0,03\text{mM}$ e $3,96 \pm 0,01\text{mM}$ para amostras S00M1 e S33M1, respectivamente. Ambas as amostras apresentam uma estabilização da liberação de íons a partir de 3d de imersão, liberando concentrações menores que $0,01\text{mM}$ de Ca^{2+} entre os pontos de análise. Após 28d de imersão em PBS, as amostras S00M1 e S33M1 liberaram, respectivamente, um total de $6,31 \pm 0,03\text{mM}$ e $5,44 \pm 0,01\text{mM}$.

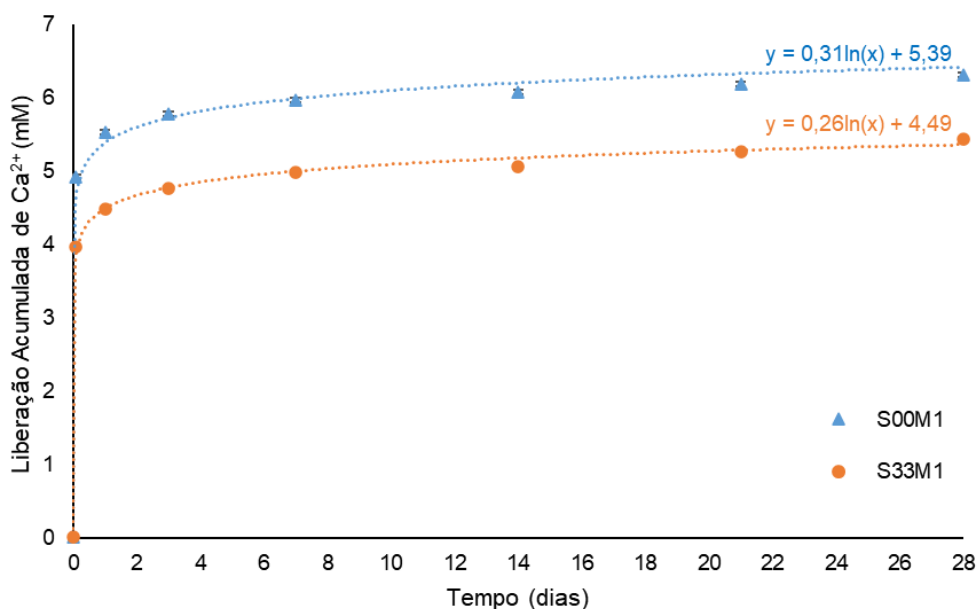


Figura 41: Curva de liberação acumulada de Ca em PBS em função do tempo para os cimentos S00M1 e S33M1. As linhas pontilhadas indicam o ajuste exponencial para a curva de liberação.

A incorporação de SF ao CPC diminuiu a liberação de Ca^{2+} quando as amostras foram imergidas em PBS. Como o α -TCP é uma fase solúvel, que irá hidrolisar e liberar íons Ca^{2+} no meio aquoso adjacente, é possível inferir que a liberação inferior demonstrada por esta amostra se deve, principalmente, ao maior teor de fases hidratadas no cimento quando comparada a amostras S00M1. Além disso, ambos os materiais continuam a liberar íons em tempos de imersão superiores devido à continuidade da solubilidade do material; entretanto, a taxa de liberação diminuiu substancialmente com o tempo, demonstrando a boa estabilidade do CPC obtido.

A liberação de íons Ca^{2+} decorrente da dissolução parcial de CPCs é benéfica à osteointegração dos materiais, pois estimula a formação de tecido ósseo. Porém, uma taxa de dissolução alta poderia prejudicar a integridade e desempenho do material antes da regeneração óssea adequada. Lode et al. (2018) observaram liberações menores de íons Ca^{2+} nas primeiras 24h de imersão de outros sistemas de CPC baseados em α -TCP, demonstrando uma liberação de aproximadamente 1,5mM. Entretanto, estes sistemas mantiveram uma liberação quase constante durante todo o período de estudo, atingindo liberações totais superiores às observadas neste trabalho.

5.5.7.2 Comportamento em SBF

O comportamento *in vitro* em SBF dos materiais determina sua estabilidade e resistência no início de sua aplicação e pode indicar sua bioatividade. O comportamento das amostras S00M1 e S33M1 em SBF está representado nos gráficos de variação da massa relativa e variação do pH da solução adjacente, os quais são apresentados na Figura 42.

Após 2d em SBF, amostras S00M1 e S33M1 exibiram um decréscimo de suas massas relativas, atingindo, respectivamente, $94,41 \pm 0,07\%$ e $95,62 \pm 0,06\%$. Este corresponde à liberação de Ca^{2+} inicial observada na análise ICP-OES (Figura 41) e está diretamente relacionado à solubilidade do α -TCP presente no material. Além disso, esta perda de massa impacta diretamente a solução de SBF adjacente, já que a dissolução do material, além de liberar íons Ca^{2+} , libera íons PO_4^{3-} , os quais reagem com o meio aquoso formando H_3PO_4 e, assim, diminuem o pH da solução (Dos Santos et al., 2002).

No quarto dia de imersão, o pH atinge um mínimo de $6,72 \pm 0,03$ para amostras S00M1 e $6,78 \pm 0,04$ para amostras S33M1. Durante o resto do período de análise, é possível observar uma estabilização do pH e da perda de massa.

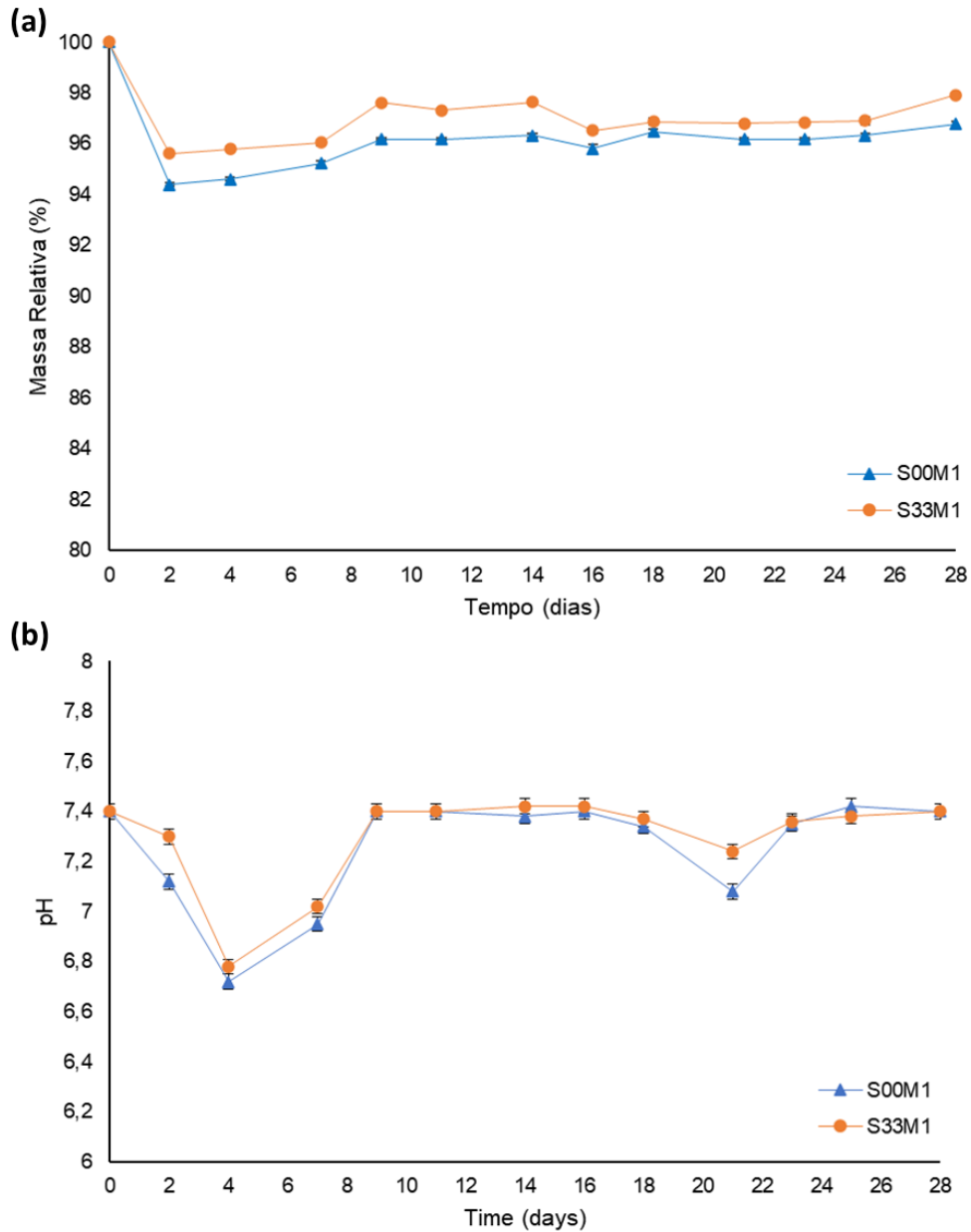


Figura 42: (a) Variação da massa relativa de amostras S00M1 e S33M1, e (b) variação do pH da solução de SBF adjacente em função do tempo de imersão das amostras.

A perda de massa exibida pela amostra S33M1 em 16d é provavelmente relacionada à degradação e solubilização da SF; entretanto, se esperaria perdas mais significativas relacionadas a este evento, devido à solubilização indireta dos CaPs

através da degradação da SF. Materiais compostos por SF são conhecidos por sua bioabsortividade quando expostos a determinadas enzimas, porém, a degradabilidade destes é dificilmente observada em SBF (Huang et al., 2019). Assim, é esperado que as amostras S33M1 demonstrem maior absorvidade e perdas de massa mais perceptíveis ao serem aplicadas em sistemas biológicos.

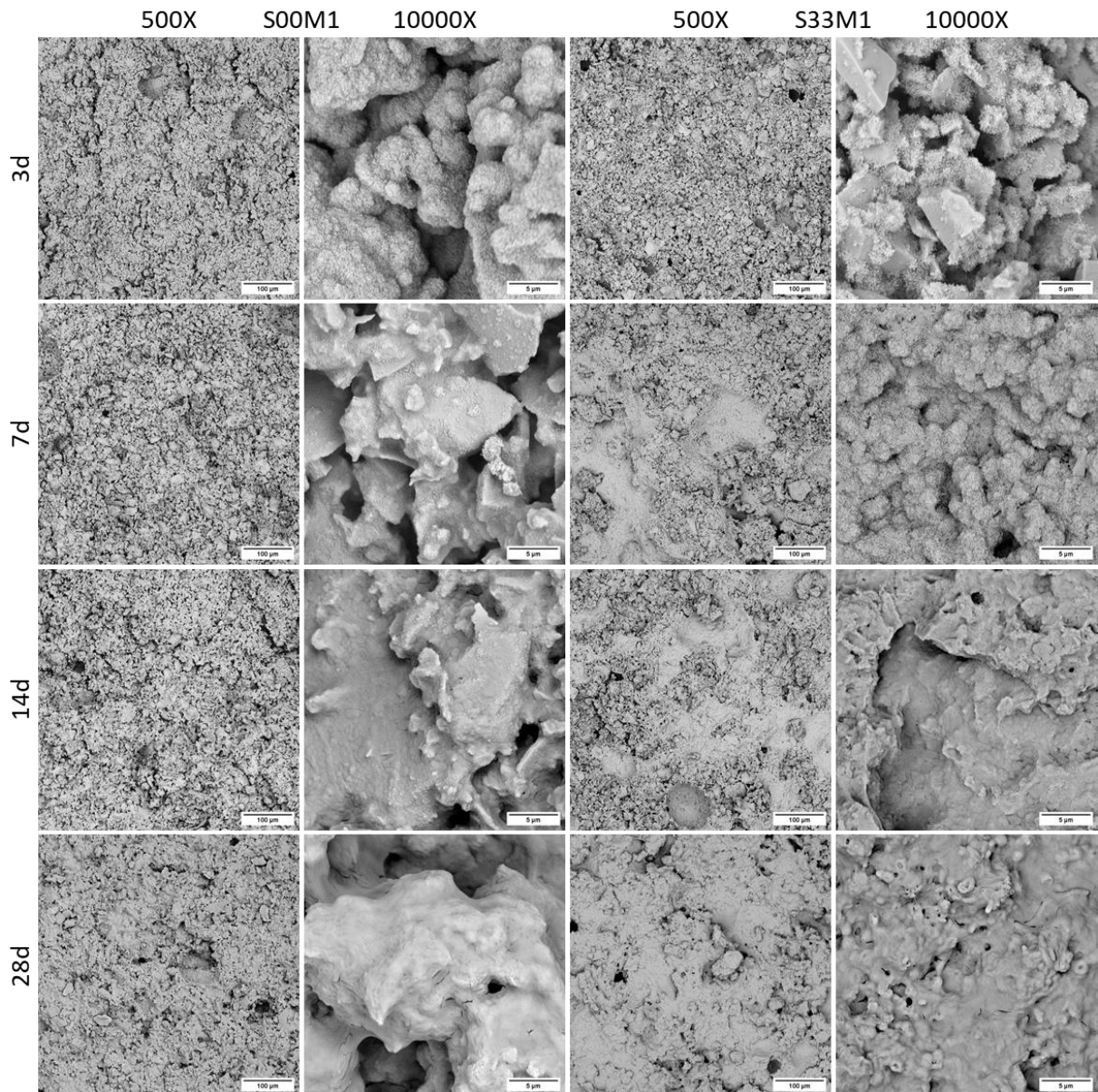


Figura 43: Micrografias da superfície de amostras S00M1 e S33M1 após 3, 7, 14 e 28d de imersão em SBF. As barras de escala nas imagens com magnificação de 500x indicam comprimentos de 100μm e nas imagens com magnificação de 10000x indicam comprimentos de 5μm.

Além disso, é possível observar em todas as amostras pequenos aumentos de massa relativa após a solubilização inicial. Este comportamento é resultado da deposição de apatitas sobre a superfície dos CPCs provenientes da interação dos materiais com os íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} da solução de SBF, como pode-se observar nas micrografias apresentadas na Figura 43. Ambas as variantes demonstraram deposições em suas superfícies, as quais são mais evidentes a partir do sétimo dia de imersão. A composição S33M1 demonstrou um aumento significativo na deposição de apatita quando comparada com a amostras S00M1, o que pode ser observado pela deposição inicial de cristais agulhados e posterior diminuição da rugosidade aparente das amostras. Este efeito pode ser resultado da nucleação e deposição facilitada de CaPs na superfície de materiais com incorporação de SF, conforme previamente demonstrado. A deposição de apatitas na superfície de CPCs desempenha funções importantes na manutenção de interfaces bioativas entre o material e o tecido ósseo adjacente, implicando em reações positivas do organismo após a implantação (Huang et al., 2019).

5.5.8 Comportamento de injeção *in vitro*

5.5.8.1 Avaliação da coesão do cimento injetável

De forma a possibilitar a aplicação dos CPCs desenvolvidos em sistemas injetáveis, estes devem manter sua coesão após a injeção da pasta. A Figura 44 demonstra o comportamento das pastas S00M1 e S33M1 após sua injeção em SBF.

Imediatamente após a injeção, amostras S00M1 e S33M1 demonstraram leves indícios de comportamento de *washout* e inchamento das pastas, demonstrando, assim, sinais de decoesão. Além disso, ao final do teste, ambas as amostras demonstraram comportamento de desintegração, impedindo seu uso de forma adequada em sistemas injetáveis.

Desta forma, para melhorar a coesão das pastas após injeção, 0,5%(m/m $_{\alpha}$ -TCP) de carboximetilcelulose (CMC) foi adicionado às pastas S33M1 pré-misturadas, as quais serão referenciadas como S33M1C. Este polímero é amplamente aplicado para a melhoria das propriedades de coesão de CPCs, já que promove mudanças eletrostáticas

nas pastas através da introdução de cadeias poliméricas laterais à superfície das partículas de CaP (Alves, dos Santos e Bergmann, 2008; An et al., 2016).

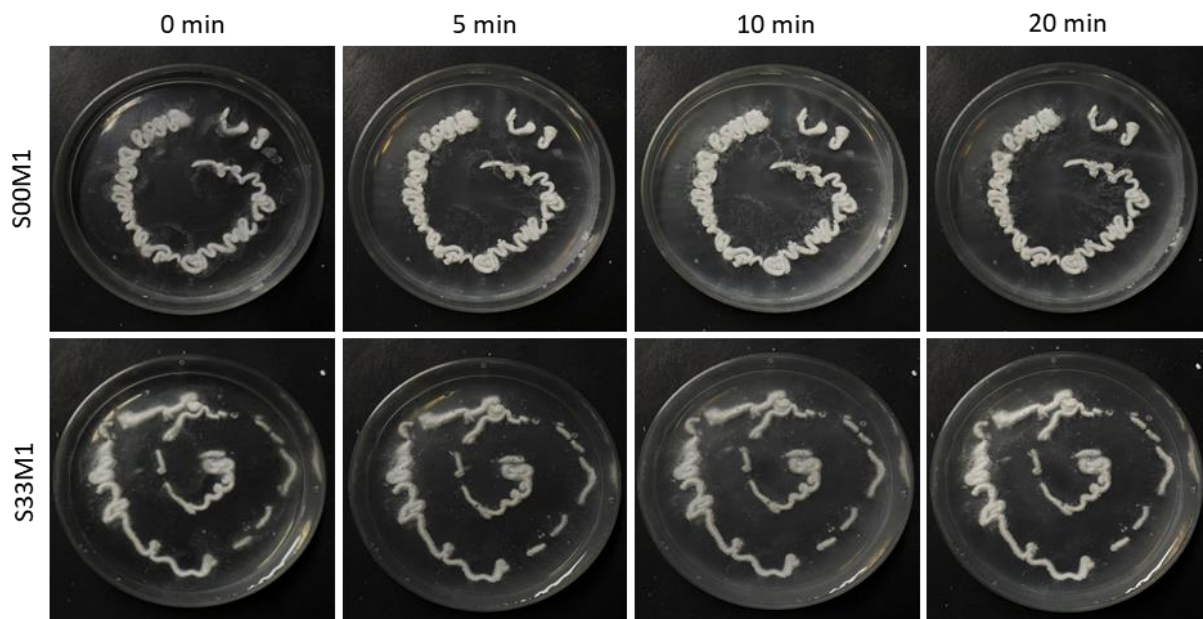


Figura 44: Pastas S00M1 e S33M1 após 0, 5, 10 e 20 min de sua injeção em SBF.

O comportamento de injeção em SBF da pasta S33M1C está representado na Figura 45. Esta variante manteve sua estrutura e formato após a injeção, demonstrando boa coesão da pasta no meio líquido. Mesmo após 20min da injeção, a pasta S33M1C manteve boa coesão com *washout* negligenciável. Esta resposta indica interações energéticas favoráveis entre as partículas do CPC promovidas pela incorporação de CMC, e garante coesão adequada para a utilização desta variante em sistemas injetáveis.

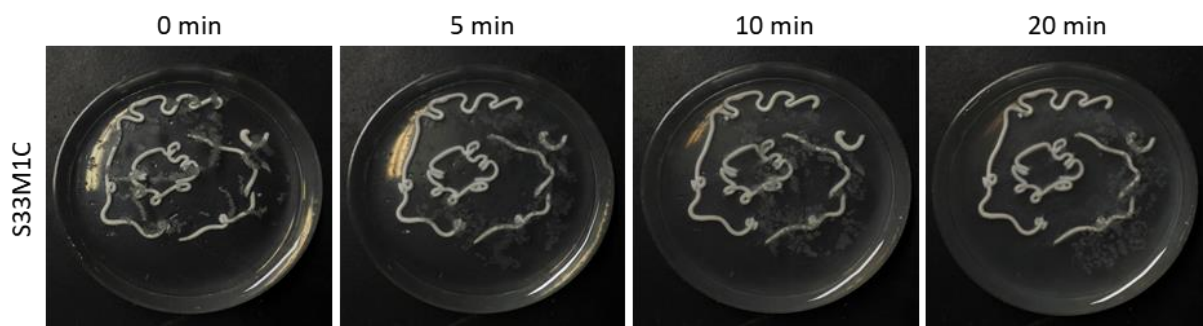


Figura 45: Pasta S33M1C após 0, 5, 10 e 20 min de sua injeção em SBF.

A adição de CMC ao material não influenciou significativamente as propriedades previamente estudadas do CPC em comparação a amostras S33M1. A variante S33M1C demonstrou, conforme representado na Figura 46, porosidade de $53,85 \pm 0,74\%$, resistência à compressão de $40,15 \pm 0,99\text{MPa}$ e injetabilidade de $94,21 \pm 1,17\%$. Como não foi possível observar diferenças significativas entre as variantes S33M1C e S33M1, os testes subsequentes foram realizados com amostras com incorporação de CMC, já que estas demonstram coesão adequada à aplicação.

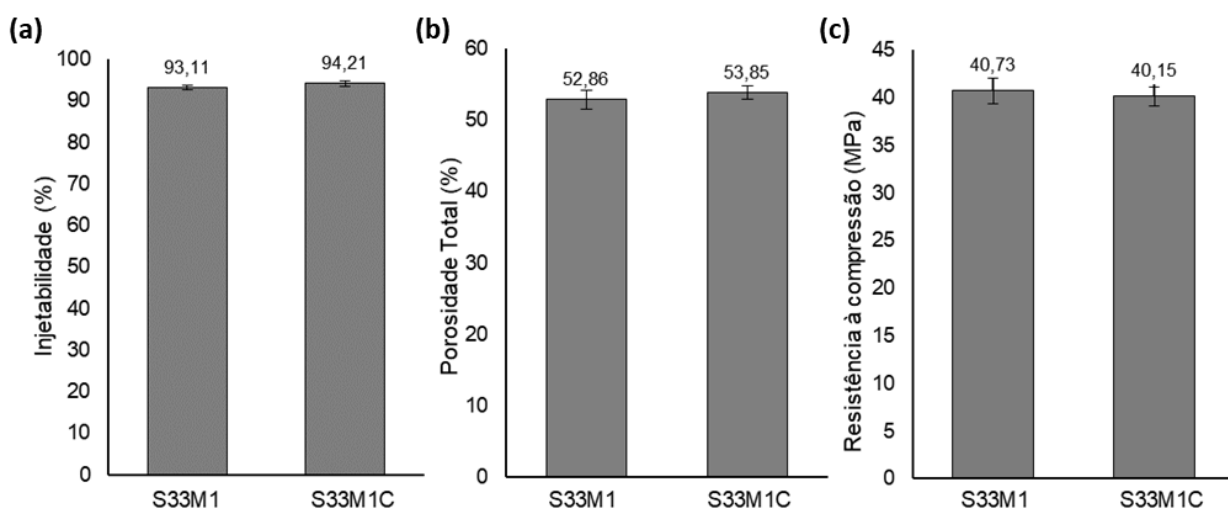


Figura 46: Injetabilidade, porosidade e resistência à compressão de amostras S33M1C em comparação a amostras S33M1. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as variantes.

5.5.8.2 Resistência à compressão de amostras injetadas em SBF

Para avaliar a resistência à compressão com maior representatividade prática de um sistema injetável de aplicação em sistemas biológicos, pastas S33M1C foram injetadas diretamente em moldes de papel imersos em SBF. Os resultados obtidos de resistência à compressão e porosidade total das amostras conforme a permanência em SBF estão representados na Figura 47 e as micrografias das superfícies de fratura se encontram na Figura 48.

Foi possível observar a obtenção de resistência à compressão máxima em 7d de imersão das pastas, as quais resistiram $36,96 \pm 0,75\text{MPa}$, mesmo apresentando porosidade de $59,45 \pm 0,46\%$. Novamente, pode-se observar o aumento da resistência na medida em que o material permanece imerso em SBF, demonstrando a correlação

deste com a hidratação do α -TCP. A partir da injeção e manutenção das amostras em SBF, foi possível obter resistências próximas do seu limite máximo já em 3 dias de permanência na solução. Isso se deve ao constante contato das amostras com o meio aquoso, permitindo a reação das fases iniciais com a água mais rapidamente. Este efeito é corroborado pelas micrografias obtidas, as quais demonstram a formação substancial de cristais agulhados e lamelares já em 3 dias de imersão das amostras em SBF, os quais auxiliam o ancoramento mecânico e o aumento da resistência mecânica do material.

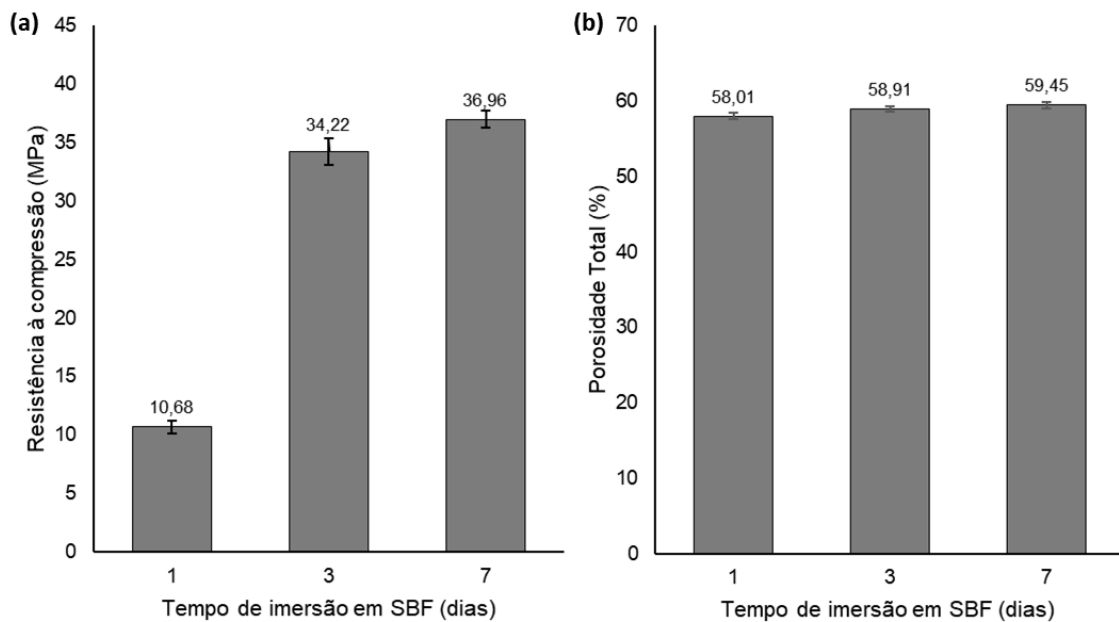


Figura 47: (a) Resistência à compressão e (b) porosidade total das amostras injetadas em SBF conforme a permanência nesta solução.

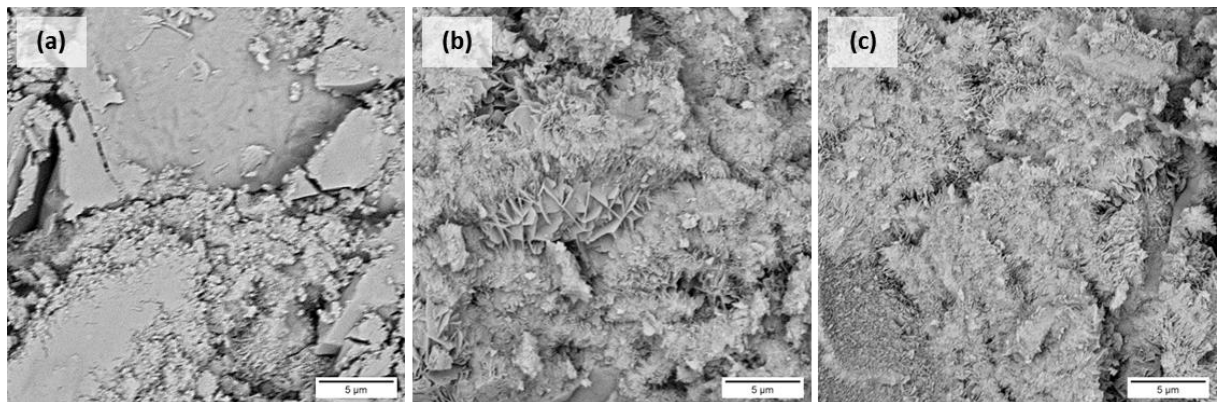


Figura 48: Micrografias com magnificação de 10000x obtidas por MEV da superfície de fratura das amostras S33M1C após sua injeção e permanência em SBF.

Apesar da leve diminuição observada na resistência à compressão das amostras quando comparada à obtida pelo método de avaliação convencional, os valores ainda se demonstram compatíveis com a de ossos trabeculares humanos, demonstrando o potencial de aplicação deste CPC em sistemas injetáveis.

5.5.9 Ensaio de Viabilidade Celular

Na Figura 49, estão representadas as viabilidades celulares relativas de células ADSC em extratos de amostras S00M1 e S33M1C em relação ao controle negativo (DMEM de baixa glicose).

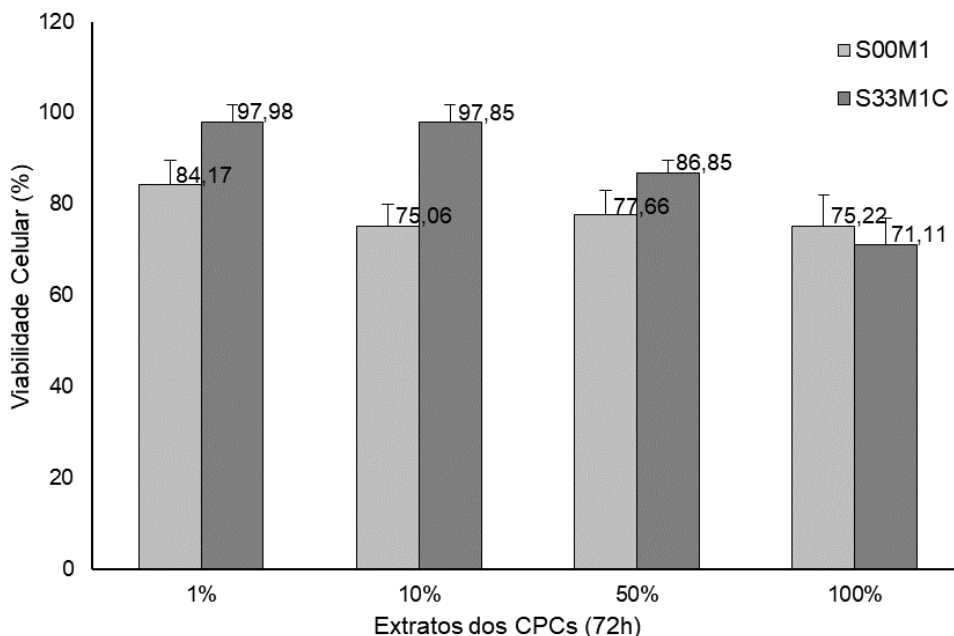


Figura 49: Viabilidade de células ADSC cultivadas por 24h em meios com concentrações de 1%, 10%, 50% e 100% de extratos de S00M1 e S33M1C. O controle foi realizado com células cultivadas em meio DMEM de baixa glicose.

Células tratadas com meios de concentrações de 1%, 10% e 50% de extratos de amostras S33M1C demonstraram maior viabilidade do que as tratadas em meios com extratos de amostras S00M1. No entanto, não foi possível observar diferenças significativas na viabilidade celular entre as variantes quando as amostras foram expostas a extratos puros. Nesta avaliação, amostras S33M1C obtiveram 71,11% de viabilidade celular, enquanto amostras S00M1 obtiveram viabilidade de 75,22%. A única diferença estatisticamente significativa entre as amostras, conforme avaliado por ANOVA

seguida por um teste de Tukey, foi observada em meios com extratos de 10%. Neste grupo de análise, foram obtidas viabilidades de 97,85% e 75,06% para as variantes S33M1C e S00M1, respectivamente.

As micrografias de fluorescência, as quais estão representadas na Figura 50, demonstram boa morfologia e aderência ao plástico das células ADSC tratadas. Estas não apresentam alterações nestas propriedades e mantiveram a integridade do núcleo e do citoesqueleto de actina, indicando que permanecem viáveis após o tempo de cultura.

Como o alvo aceito pela ISO 10993-5 e 10993-12 para que um material seja considerado biocompatível é de 70%, e não houve mudanças morfológicas nas células avaliadas, podemos afirmar que os CPCs S00M1 e S33M1C demonstram biocompatibilidade adequada para aplicação em sistemas biológicos.

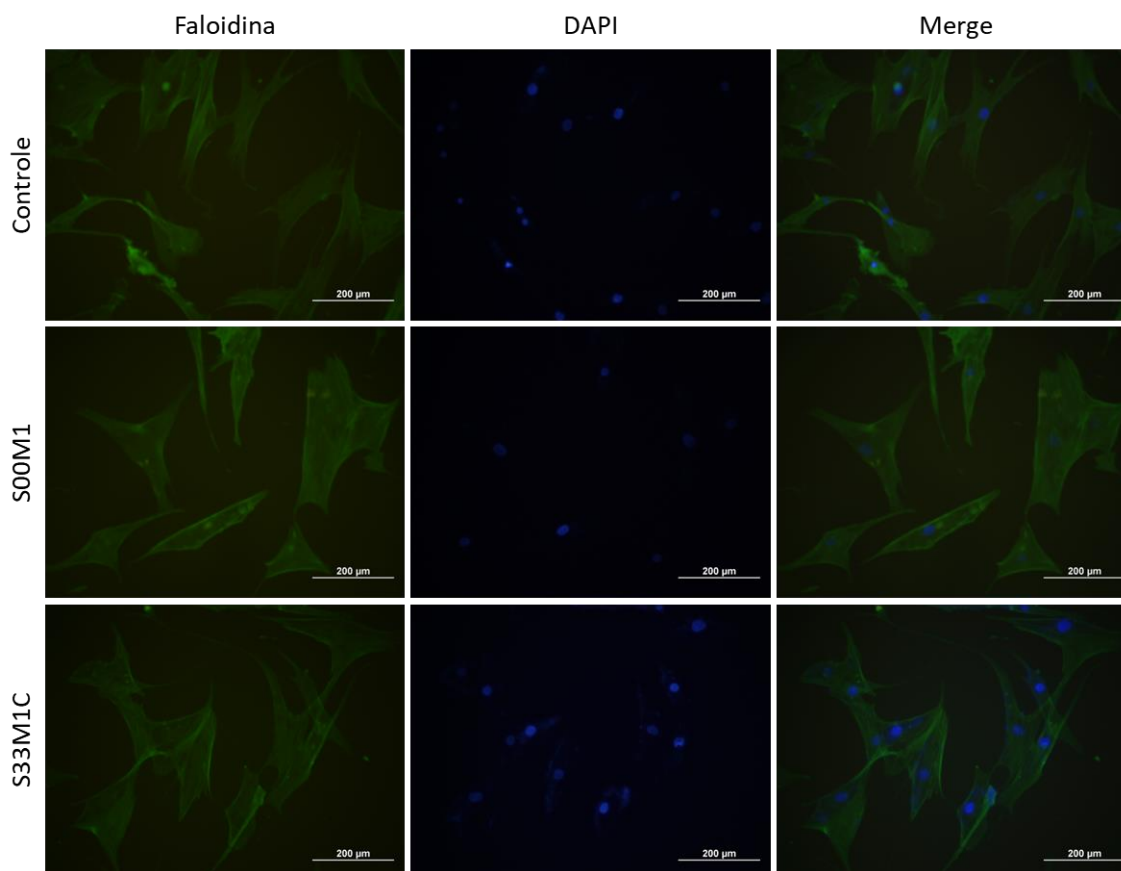


Figura 50: Micrografias de fluorescência de células cultivadas por 24h em extratos puros de S00M1 e S33M1C. As micrografias mostram o citoesqueleto de F-actina (verde) e o núcleo (azul) das células ADSC.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, verificou-se que a metodologia desenvolvida para a obtenção de cimentos de fosfato de cálcio pré-misturados permitiu a obtenção de materiais injetáveis biomiméticos de alta resistência com potencial de aplicação na regeneração óssea.

As análises utilizadas permitiram verificar que a metodologia de síntese e processamento dos materiais precursores foi eficaz na obtenção de materiais de alta pureza para a elaboração do cimento de fosfato de cálcio pré-misturados baseado em α -TCP. Além disso, as composições desenvolvidas permitiram a estabilidade das pastas por, pelo menos, 22 semanas e uma boa injetabilidade do material, mesmo com a incorporação de fibroína de seda.

As avaliações químicas permitiram a verificação simplificada da cinética de hidratação do α -TCP e demonstraram que, após 7 dias em câmara úmida, foi possível a obtenção de materiais com teores mínimos de α -TCP residual através da adição de fibroína de seda à composição. Além disso, a presença de íons Cl^- nas soluções de inibição e ativação da reação de pega provocou a obtenção de um material final composto por CDHA e HAp-Cl, garantindo maior similaridade química e cristalográfica do cimento com a fase mineral óssea e criando a possibilidade de um aumento da osteocondutividade do material, a qual deve ser posteriormente verificada.

A incorporação de 0,33% de fibroína de seda permitiu a obtenção de um aumento de 314% da resistência à compressão dos cimentos de fosfato de cálcio em relação às amostras de controle. Estes valores garantem maior estabilidade estrutural do material sob as solicitações mecânicas inerentes à implantação. Esta adição também promoveu a formação de uma microestrutura mais análoga à fase mineral óssea, já que permitiu uma maior nucleação e orientação de nanocristais apatíticos. Outrossim, a adição desta fase polimérica contribuiu para reduzir a dissolução inicial do material após imersão em PBS e para aumentar a deposição de apatita óssea na superfície do cimento obtido. Estas duas características demonstram a maior estabilidade e bioatividade *in vitro* do material desenvolvido neste trabalho, os quais podem contribuir no desempenho biológico do

material após a implantação. A incorporação adicional de CMC garantiu a boa coesão da pasta desenvolvida após a injeção em SBF, o que permite a utilização desta pasta cimentícia em sistemas injetáveis. Além disso, esta, ao ser injetada diretamente em SBF produziu um material com capacidade de resistir a 36,96 MPa enquanto apresenta porosidade de 59,45% e, assim, demonstrou resistência à compressão compatível com as de ossos trabeculares humanos. Finalmente, a composição desenvolvida não afetou a viabilidade celular, mantendo biocompatibilidade adequada e não afetando as estruturas celulares vitais.

Desta forma, o conjunto de resultados obtidos mostra que a metodologia de obtenção de cimentos de fosfato de cálcio pré-misturados reforçados com fibroína de seda foi eficaz na obtenção de estruturas biomiméticas com propriedades mecânicas superiores às apresentadas pelo cimento de fosfato de cálcio puro e, portanto, apresenta potencial para ser avaliado mais profundamente como um material injetável para a regeneração óssea.

7 SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS

Este trabalho pode ser complementado e aprofundado a partir das seguintes sugestões de trabalhos futuros:

- Utilizar análises complementares, como a microtomografia, para investigar a interconectividade dos poros do material obtido, a interação dos cristais de CaP com a SF e a formação de grãos de Hadley nas variantes de cimento de fosfato de cálcio com adição de fibroína de seda;
- Avaliar a viabilidade biológica destes cimentos através de ensaios de comportamento *in vivo*;
- Avaliar alterações de funcionalidade celular causadas pelos cimentos desenvolvidos, como a produção de isoenzimas de ALP;
- Realizar testes de viabilidade celular dos cimentos desenvolvidos com culturas de osteoblastos;
- Realizar modificações e substituições iônicas no α -TCP e adicioná-lo ao sistema cimentício desenvolvido, de forma a provocar reações específicas após a implantação do material (maior bioatividade, promoção de propriedades antimicrobianas etc.).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM F451-21-15: Standard Specification for Acrylic Bone Cement. Pennsylvania, United States, 2021.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM C266-21: Standard Test Method for Time of Setting of Hydraulic-Cement Paste by Gillmore Needles. Pennsylvania, United States, 2021.

Al-Aql, Z.S. et al. (2008) 'Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis', *Journal of Dental Research*, 87(2), pp. 107–118. Available at: <https://doi.org/10.1177/154405910808700215>.

de Almeida Cavalcante, L. et al. (2020) 'Chlorapatite derived from fish scales', *Materials*, 13(5). Available at: <https://doi.org/10.3390/ma13051129>.

Alves, H.L.R., dos Santos, L.A. e Bergmann, C.P. (2008) 'Injectability evaluation of tricalcium phosphate bone cement', *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(5), pp. 2241–2246. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3329-6>.

An, J. et al. (2016) 'Influence of polymeric additives on the cohesion and mechanical properties of calcium phosphate cements', *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 27(3), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10856-016-5665-x>.

Anderson, J. (2019) Biocompatibility and immune responses to biomaterials, *Definitions of Biomaterials for the Twenty-First Century*. Available at: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818291-8.00004-3>.

Berzina-Cimdina, L. e Borodajenko, N. (2012) 'Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy', in *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology*. Available at: <https://doi.org/10.5772/36942>.

Bhattacharjee, P. et al. (2017) 'Silk scaffolds in bone tissue engineering: An overview', *Acta Biomaterialia*, 63, pp. 1–17. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.09.027>.

Bigi, A. e Boanini, E. (2017) 'Functionalized Biomimetic Calcium Phosphates for Bone Tissue Repair', *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, 15(4), pp. e313–e325. Available at: <https://doi.org/10.5301/jabfm.5000367>.

Bilgiç, E. et al. (2020) 'Architecture of bone tissue and its adaptation to pathological conditions', in *Comparative Kinesiology of the Human Body*. Elsevier, pp. 71–90. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812162-7.00006-0>.

Bohner, M. et al. (2015) 'Design of an inorganic dual-paste apatite cement using cation exchange', *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26(2), p. 63. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10856-015-5400-z>.

Bohner, M. e Baroud, G. (2005) 'Injectability of calcium phosphate pastes', *Biomaterials*, 26(13), pp. 1553–1563. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.05.010>.

Brown, W.E. e Chow, L.C. (1983) 'A new calcium phosphate setting cement', *Journal of Dental Research*, 62(special issue), p. 672.

Canal, C. e Ginebra, M.P. (2011) 'Fibre-reinforced calcium phosphate cements: A review', *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4(8), pp. 1658–1671. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.06.023>.

Cao, C. et al. (2014) 'Mechanical reinforcement of injectable calcium phosphate cement/silk fibroin (SF) composite by mineralized SF', *Ceramics International*, 40(9 PART A), pp. 13987–13993. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.05.123>.

Carrodeguas, R.G. e De Aza, S. (2011) 'α-Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications', *Acta Biomaterialia*, 7(10), pp. 3536–3546. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.06.019>.

Cassel, J.B. et al. (2023) 'α-Tricalcium phosphate cement reinforced with silk fibroin: A high strength biomimetic bone cement with chloride-substituted hydroxyapatite', *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 143. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2023.105936>.

Chen, Y. et al. (2020) 'Role of mesenchymal stem cells in bone fracture repair and regeneration', in *Mesenchymal Stem Cells in Human Health and Diseases*. Elsevier, pp. 127–143. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819713-4.00007-4>.

Chlapanidas, T. et al. (2011) 'Regenerated Silk Fibroin Scaffold and Infrapatellar Adipose Stromal Vascular Fraction as Feeder-Layer: A New Product for Cartilage Advanced Therapy', *Tissue Engineering Part A*, 17(13–14), pp. 1725–1733. Available at: <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0636>.

Coelho, F. et al. (2020) 'Silk fibroin/hydroxyapatite composite membranes: Production, characterization and toxicity evaluation', *Toxicology in Vitro*, 62(April 2019). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104670>.

Dickens, B. e Brown, W.E. (1972) 'The crystal structure of $\text{CaKAsO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ', *Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry*, 28(10), pp. 3056–3065. Available at: <https://doi.org/10.1107/s0567740872007411>.

Dickens, B., Schroeder, L.W. e Brown, W.E. (1974) 'Crystallographic studies of the role of Mg as a stabilizing impurity in $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. The crystal structure of pure $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ', *Journal of Solid State Chemistry*, 10(3), pp. 232–248. Available at: [https://doi.org/10.1016/0022-4596\(74\)90030-9](https://doi.org/10.1016/0022-4596(74)90030-9).

Dos Santos, L.A. et al. (2002) ' α -Tricalcium phosphate cement: "In vitro" cytotoxicity', *Biomaterials*, 23(9), pp. 2035–2042. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00333-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00333-7).

Dos Santos, L.A.L. (2002b) 'Desenvolvimento de Cimento de Fosfato de Cálcio Reforçado por Fibras para Uso na Área Médico-Odontológica. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, Campinas.

Duncan, J. et al. (2014) 'The role of the chemical composition of monetite on the synthesis and properties of α -tricalcium phosphate', *Materials Science and Engineering C*, 34(1), pp. 123–129. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.08.038>.

Fan, C. et al. (2010) 'Facile fabrication of nano-hydroxyapatite/silk fibroin composite via a simplified coprecipitation route', *Journal of Materials Science*, 45(21), pp. 5814–5819. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10853-010-4656-4>.

Farokhi, M. et al. (2016) 'Importance of dual delivery systems for bone tissue engineering', *Journal of Controlled Release*, 225, pp. 152–169. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.033>.

Farokhi, M. et al. (2018) 'Silk fibroin/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering', *Biotechnology Advances* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.10.001>.

Farokhi, M. et al. (2019) 'Silk fibroin scaffolds for common cartilage injuries: Possibilities for future clinical applications', *European Polymer Journal* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.03.035>.

Fathi, M. et al. (2015) 'Wet chemical method for preparing high purity β and α -tricalcium phosphate crystalline powders', *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 6(6), pp. 139–143.

Feng, T. et al. (2020) 'Osteogenesis enhancement of silk fibroin/ α -TCP cement by N-acetyl cysteine through Wnt/ β -catenin signaling pathway in vivo and vitro', *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 101(September 2018), p. 103451. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.103451>.

Fernandez-Yague, M.A. et al. (2015) 'Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicochemical strategies', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 84, pp. 1–29. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.09.005>.

Frasnelli, M. e Sglavo, V.M. (2016) 'Effect of Mg²⁺ doping on beta-alpha phase transition in tricalcium phosphate (TCP) bioceramics', *Acta Biomaterialia*, 33, pp. 283–289. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.01.015>.

Freund, F. e Knobel, R.M. (1977) 'Distribution of Fluorine in Hydroxyapatite studied by Infrared Spectroscopy', *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, pp. 1136–1140.

Fyhrie, D.P. e Kimura, J.H. (1999) 'Cancellous bone biomechanics', *Journal of Biomechanics*, 32(11), pp. 1139–1148. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(99\)00114-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(99)00114-1).

Galia, C.R. et al. (2009) 'Physicochemical characterization of bovine and human freeze-dried bones', *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões (Journal of the Brazilian College of Surgeons)*, 36(2), pp. 157–160. Available at: <https://doi.org/10.1590/S0100-69912009000200013>.

García-Tuñón, E. et al. (2012) 'Synthesis and characterisation of large chlorapatite single-crystals with controlled morphology and surface roughness', in *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, pp. 2471–2482. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4717-0>.

Gilbert, S.F. (2000) 'Osteogenesis: The Development of Bones'. In: 'Developmental Biology'. 6th ed. Sunderland: Sinauer Associates.

Ginebra, M.P. et al. (1994) Compliance of an Apatitic Calcium Phosphate Cement with the Short-term Clinical Requirements in Bone Surgery, *Orthopaedics and Dentistry*.

Ginebra, M.-P. et al. (2007) 'Factors affecting the structure and properties of an injectable self-setting calcium phosphate foam', *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 80(A), pp. 351–361. Available at: <https://doi.org/10.1002/jbm.a>.

Ginebra, M.P. (2009) 'Cements as bone repair materials', in *Bone Repair Biomaterials*. Elsevier, pp. 271–308. Available at: <https://doi.org/10.1533/9781845696610.2.271>.

Ginebra, M.P. et al. (2010) 'New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine', *Acta Biomaterialia*, 6(8), pp. 2863–2873. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.01.036>.

Han, F. et al. (2019) 'In situ silk fibroin-mediated crystal formation of octacalcium phosphate and its application in bone repair', *Materials Science and Engineering C*, 95(October 2018), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.041>.

Hasirci, V. e Hasirci, N. (2018) 'Fundamentals of Biomaterials' 1st ed. New York: Springer. ISBN: 978-1-4939-8854-9.

He, Z. et al. (2015) 'Bone cements for percutaneous vertebroplasty and balloon kyphoplasty: Current status and future developments', *Journal of Orthopaedic Translation*, 3(1), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jot.2014.11.002>.

Heimbach, B., Yu, L. e Wei, M. (2020) 'In vitro behavior of silk fibroin-based composite resorbable bone fixation devices', *Materialia*, 9(January). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mtla.2020.100587>.

Heinemann, S. et al. (2013) 'Properties of injectable ready-to-use calcium phosphate cement based on water-immiscible liquid', *Acta Biomaterialia*, 9(4), pp. 6199–6207. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.12.017>.

Hench, L.L.; Wilson, J. (2013) 'Introduction'. In: Henck, L.L. 'An Introduction to Bioceramics'. 2nd ed. London: Imperial College Press.

Hendricks, S.B., Jefferson, M.E. e Mosley, V.M. (1932) 'The Crystal Structures of some Natural and Synthetic Apatite-Like Substances', *Zeitschrift für Kristallographie - Crystalline Materials*, 81(1–6), pp. 352–369. Available at: <https://doi.org/10.1524/zkri.1932.81.1.352>.

Hofmann, S. et al. (2007) 'Control of in vitro tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds', *Biomaterials*, 28(6), pp. 1152–1162. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.10.019>.

Hu, H. et al. (2005) 'Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development', *Development*, 132(1), pp. 49–60. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.01564>.

Hu, M. et al. (2018) 'Reinforcement of calcium phosphate cement using alkaline-treated silk fibroin', *International Journal of Nanomedicine* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.2147/IJN.S172881>.

Huang, T. et al. (2019) '3D-printed scaffolds of biomineralized hydroxyapatite nanocomposite on silk fibroin for improving bone regeneration', *Applied Surface Science*, 467–468(March 2018), pp. 345–353. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.10.166>.

Hudecki, A., Kiryczyński, G. e Łos, M.J. (2018) 'Biomaterials, definition, overview', *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine*, (ii), pp. 85–98. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812258-7.00007-1>.

Irbe, Z. e Loca, D. (2021) 'Soluble phosphate salts as setting aids for premixed calcium phosphate bone cement pastes', *Ceramics International*, 47(17), pp. 24012–24019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.05.110>.

Jang, J.H., Castano, O. e Kim, H.W. (2009) 'Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(12), pp. 1065–1083. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.008>.

Jeanjean, J. et al. (1996) A Crystallographic Study of the Sorption of Cadmium on Calcium Hydroxyapatites: Incidence of Cationic Vacancies, *JOURNAL OF SOLID STATE CHEMISTRY*.

Kannan, S. et al. (2007) 'Synthesis and mechanical behaviour of chlorapatite and chlorapatite/ β -TCP composites', *Journal of the European Ceramic Society*, 27(5), pp. 2287–2294. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2006.07.004>.

Kaplan, D. et al. (1994) 'Silk: Biology, Structure, Properties and Genetics', pp. 2–16.

Kapoor, S. e Kundu, S.C. (2016) 'Silk protein-based hydrogels: Promising advanced materials for biomedical applications', *Acta Biomaterialia* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.11.034>.

Kawahara, Y., Furukawa, K. e Yamamoto, T. (2006) 'Self-expansion behavior of silk fibroin film', *Macromolecular Materials and Engineering*, 291, pp. 458–462. Available at: <https://doi.org/10.1002/mame.200500350>.

Kesmez, Ö. (2020) 'Preparation of anti-bacterial biocomposite nanofibers fabricated by electrospinning method', *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry*, 7(1), pp. 125–142. Available at: <https://doi.org/10.18596/jotcsa.590621>.

Kokubo, T., Kim, H.M. e Kawashita, M. (2003) 'Novel bioactive materials with different mechanical properties', *Biomaterials*, 24(13), pp. 2161–2175. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00044-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00044-9).

Kucko, N.W. et al. (2019) 'Tough and Osteocompatible Calcium Phosphate Cements Reinforced with Poly(vinyl alcohol) Fibers', *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5(5), pp. 2491–2505. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00226>.

Kuhn, L.T. (2011) 'Biomaterials', *Introduction to Biomedical Engineering*, pp. 219–271. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374979-6.00005-8>.

Kundu, B. et al. (2013) 'Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations', *Advanced Drug Delivery Reviews* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.043>.

Lauzon, M.A. et al. (2012) 'Bone repair: New developments in growth factor delivery systems and their mathematical modeling', *Journal of Controlled Release*, 162(3), pp. 502–520. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.07.041>.

LeGeros, R.Z., Chohayeb, A. e Schulman, A. (1982) 'Apatitic Calcium Phosphates: Possible Dental Restorative Materials', *Journal of Dental Research*, 61(special issue), p. 343.

Li, J. et al. (2014) 'Biopolymer/calcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering', *Advanced Healthcare Materials*, 3(4), pp. 469–484. Available at: <https://doi.org/10.1002/adhm.201300562>.

Li, M. et al. (2002) 'Structure and properties of silk fibroin-poly(vinyl alcohol) gel', *International Journal of Biological Macromolecules*, 30(2), pp. 89–94. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(02\)00007-7](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(02)00007-7).

Li, Z. et al. (2019) 'Biomimicry, biomineralization, and bioregeneration of bone using advanced three-dimensional fibrous hydroxyapatite scaffold', *Materials Today Advances*, 3. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2019.100014>.

Liu, W. et al. (2013) 'The influence of different cellulose ethers on both the handling and mechanical properties of calcium phosphate cements for bone substitution', *Acta Biomaterialia*, 9(3), pp. 5740–5750. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.11.020>.

Lode, A. et al. (2018) 'Strontium-modified premixed calcium phosphate cements for the therapy of osteoporotic bone defects', *Acta Biomaterialia*, 65, pp. 475–485. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.10.036>.

Lodoso-Torrecilla, I., van den Beucken, J.J.J.P. and Jansen, J.A. (2021) 'Calcium phosphate cements: Optimization toward biodegradability', *Acta Biomaterialia*, 119, pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.10.013>.

Loureiro dos Santos, L.A. (2017) 'Natural Polymeric Biomaterials: Processing and Properties ☆', in *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*. Elsevier, pp. 1–6. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.02253-0>.

MacIntosh, A.C. et al. (2008) 'Skeletal tissue engineering using silk biomaterials', *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2(2–3), pp. 71–80. Available at: <https://doi.org/10.1002/term.68>.

Maiti, G.C. e Freund, F. (1981) 'Incorporation of chlorine into hydroxy-apatite', *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, 43(11), pp. 2633–2637. Available at: [https://doi.org/10.1016/0022-1902\(81\)80589-1](https://doi.org/10.1016/0022-1902(81)80589-1).

Malafaya, P.B., Silva, G.A. e Reis, R.L. (2007) 'Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(4–5), pp. 207–233. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.03.012>.

Mathew, M. et al. (1977) 'The crystal structure of α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ', *Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry*, 33(5), pp. 1325–1333. Available at: <https://doi.org/10.1107/s0567740877006037>.

Melke, J. et al. (2016) 'Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering', *Acta Biomaterialia*, 31, pp. 1–16. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.09.005>.

Ming, J. et al. (2015) 'Silk fibroin/sodium alginate fibrous hydrogels regulated hydroxyapatite crystal growth', *Materials Science and Engineering C*, 51, pp. 287–293. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.014>.

Mobika, J., Rajkumar, M., Linto Sibi, S.P., et al. (2020) 'Fabrication of bioactive hydroxyapatite/silk fibroin/gelatin cross-linked nanocomposite for biomedical application', *Materials Chemistry and Physics*, 250, p. 123187. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2020.123187>.

Mobika, J., Rajkumar, M., Nithya Priya, V., et al. (2020) 'Substantial effect of silk fibroin reinforcement on properties of hydroxyapatite/silk fibroin nanocomposite for bone tissue engineering application', *Journal of Molecular Structure*, 1206, p. 127739. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.127739>.

Monma, H. e Kanazawa, T. (1976) 'The Hydration of -Tricalcium Phosphate', *Yogyo-Kyokai-Shi*, 84(4), pp. 209–213.

Morgan, A.W. et al. (2008) 'Characterization and optimization of RGD-containing silk blends to support osteoblastic differentiation', *Biomaterials*, 29(16), pp. 2556–2563. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.02.007>.

Morgan, E.F., Unnikrisnan, G.U. e Hussein, A.I. (2018) 'Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States', *Annual Review of Biomedical Engineering*, 20(1), pp. 119–143. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-062117-121139>.

Motta, A., Fambri, L. e Migliaresi, C. (2002) 'Regenerated silk fibroin films: Thermal and dynamic mechanical analysis', *Macromolecular Chemistry and Physics*, 203(10–11), pp. 1658–1665. Available at: [https://doi.org/10.1002/1521-3935\(200207\)203:10/11<1658::AID-MACP1658>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1521-3935(200207)203:10/11<1658::AID-MACP1658>3.0.CO;2-3).

Niño, A.F.V. e Dos Santos, L.A.L. (2016) 'Preparation of an injectable macroporous α -TCP cement', *Materials Research*, 19(4), pp. 908–913. Available at: <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2016-0229>.

Olsen, B.R. (2006) 'Bone Embryology' In: 'Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism'. Washington D.C.: American Society for Bone and Mineral Research.

O'Neill, R. et al. (2017) 'Critical review: Injectability of calcium phosphate pastes and cements', *Acta Biomaterialia*, 50, pp. 1–19. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.019>.

Osborn, J.F. (1979). *Biomaterials and their application to implantation*. SSO Schweizerische Monatschrift für Zahnheilkunde Vol.89, No.11, pp. 1138-1139, ISSN 0036-7702

Özcan, S. e Çiftçioğlu, M. (2022) 'Enhanced model protein adsorption of nanoparticulate hydroxyapatite thin films on silk sericin and fibroin surfaces', *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 33(1). Available at: <https://doi.org/10.1007/s10856-021-06632-5>.

Park, J.; Lakes, R.S. (2007) 'Biomaterials'. 3rd ed. New York: Springer, 2007.

Parushuram, N. et al. (2020) 'Facile fabrication of silk fibroin microparticles: their characterization and potential adsorption study', *Journal of Dispersion Science and Technology*, 42(10), pp. 1–19. Available at: <https://doi.org/10.1080/01932691.2020.1774383>.

Pham, D.T., Saelim, N. e Tiyaboonchai, W. (2018) 'Crosslinked fibroin nanoparticles using EDC or PEI for drug delivery: physicochemical properties, crystallinity and structure', *Journal of Materials Science*, 53(20), pp. 14087–14103. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10853-018-2635-3>.

Phillips, A.M. (2005) 'Overview of the fracture healing cascade.', *Injury*, 36 Suppl 3, pp. 5–7. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.injury.2005.07.027>.

Qi, Y. et al. (2017) 'A review of structure construction of silk fibroin biomaterials from single structures to multi-level structures', *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms18030237>.

Raffa, M.L. et al. (2021) 'Stress shielding at the bone-implant interface: Influence of surface roughness and of the bone-implant contact ratio', *Journal of Orthopaedic Research*, 39(6), pp. 1174–1183. Available at: <https://doi.org/10.1002/jor.24840>.

Ratnayake, J.T.B., Mucalo, M. e Dias, G.J. (2017) 'Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: A review of current trends', *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 105(5), pp. 1285–1299. Available at: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33651>.

Rau, J. V. et al. (2022) 'Strontium Substituted Tricalcium Phosphate Bone Cement: Short and Long-Term Time-Resolved Studies and In Vitro Properties', *Advanced Materials Interfaces*, 9(21), p. 2200803. Available at: <https://doi.org/10.1002/admi.202200803>.

El Rhilassi, A. et al. (2016) 'Interaction of some essential amino acids with synthesized poorly crystalline hydroxyapatite', *Journal of Saudi Chemical Society*, 20, pp. S632–S640. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2013.05.003>.

Roach, P. et al. (2007) 'Modern biomaterials: A review - Bulk properties and implications of surface modifications', *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18(7), pp. 1263–1277. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0064-3>.

Rusa, C.C. et al. (2005) 'Conformational changes induced in Bombyx mori silk fibroin by cyclodextrin inclusion complexation', *Macromolecules*, 38(13), pp. 5640–5646. Available at: <https://doi.org/10.1021/ma050340a>.

Saha, J. et al. (2019) 'Extraction, Structural and Functional Properties of Silk Sericin Biopolymer from Bombyx mori Silk Cocoon Waste', *Journal of Textile Science & Engineering*, 09(01). Available at: <https://doi.org/10.4172/2165-8064.1000390>.

Shi, H. et al. (2018) 'Effects of Strontium doping on the degradation and Sr ion release behaviors of α -tricalcium phosphate bone cement', *Journal of the American Ceramic Society [Preprint]*. Available at: <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>.

Shi, H. et al. (2019) 'Synergistic effects of citric acid - sodium alginate on physicochemical properties of α -tricalcium phosphate bone cement', *Ceramics International*, 45(2), pp. 2146–2152. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.10.124>.

Sinusaite, L. et al. (2021) 'Effect of Mn doping on hydrolysis of low-temperature synthesized metastable alpha-tricalcium phosphate', *Ceramics International*, (January), pp. 1–6. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.01.052>.

Smith, A.M., Moxon, S. e Morris, G.A. (2016) 'Biopolymers as wound healing materials', in *Wound Healing Biomaterials*. Elsevier Inc., pp. 261–287. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-456-7.00013-1>.

Stace, E.T. et al. (2016) 'Translating Regenerative Biomaterials Into Clinical Practice', *Journal of Cellular Physiology*, 231(1), pp. 36–49. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcp.25071>.

Suchanek, W. e Yoshimura, M. (1998) 'Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants', *Journal of Materials Research*, 13(1), pp. 94–117. Available at: <https://doi.org/10.1557/JMR.1998.0015>.

Sudarsanan, K. e Young, R.A. (1969) 'Significant precision in crystal structural details. Holly Springs hydroxyapatite', *Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry*, 25(8), pp. 1534–1543. Available at: <https://doi.org/10.1107/S0567740869004298>.

Sudarsanan, K. e Young, R.A. (1978) 'Structural interactions of F, Cl and OH in apatites', *Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry*, 34(5), pp. 1401–1407. Available at: <https://doi.org/10.1107/S0567740878005798>.

Swetha, M. et al. (2010) 'Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering', *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(1), pp. 1–4. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.03.015>.

Takagi, S. et al. (2003) 'Premixed calcium-phosphate cement pastes', *Journal of Biomedical Materials Research*, 67B(2), pp. 689–696. Available at: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.10065>.

Tanaka, K. et al. (1999) 'Determination of the site of disulfide linkage between heavy and light chains of silk fibroin produced by *Bombyx mori*', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1432(1), pp. 92–103. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00088-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00088-6).

Thürmer, M.B. et al. (2012) 'Synthesis of alpha-tricalcium phosphate by wet reaction and evaluation of mechanical properties', *Materials Science Forum*, 727–728, pp. 1164–1169. Available at: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.727-728.1164>.

Thürmer, M.B., Diehl, C.E. e dos Santos, L.A.L. (2016) 'Calcium phosphate cements based on alpha-tricalcium phosphate obtained by wet method: Synthesis and milling effects', *Ceramics International*, 42(16), pp. 18094–18099. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.08.115>.

Tronco, M.C., Cassel, J.B. e dos Santos, L.A. (2022) 'α-TCP-based calcium phosphate cements: A critical review', *Acta Biomaterialia* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.08.040>.

Valle, S. Del et al. (2007) 'In vivo evaluation of an injectable Macroporous Calcium Phosphate Cement', *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18(2), pp. 353–361. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0700-y>.

Vásquez, A.F., Domínguez, S. e Loureiro dos Santos, L.A. (2017) 'α-TCP cements prepared by syringe-foaming: Influence of Na₂HPO₄ and surfactant concentration', *Materials Science and Engineering C*, 81(August), pp. 148–155. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.07.056>.

Volkov, V., Ferreira, A. v. e Cavaco-Paulo, A. (2015) 'On the Routines of Wild-Type Silk Fibroin Processing Toward Silk-Inspired Materials: A Review', *Macromolecular Materials and Engineering*, 300(12), pp. 1199–1216. Available at: <https://doi.org/10.1002/mame.201500179>.

Wan, C. et al. (2008) 'Role of hypoxia inducible factor-1α pathway in bone regeneration', *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions*, 8(4), pp. 323–324.

Wang, H.-Y. e Zhang, Y.-Q. (2013) 'Effect of regeneration of liquid silk fibroin on its structure and characterization', *Soft Matter*, 9(1), pp. 138–145. Available at: <https://doi.org/10.1039/C2SM26945G>.

Wang, K. et al. (2021) 'Injectable silk/hydroxyapatite nanocomposite hydrogels with vascularization capacity for bone regeneration', *Journal of Materials Science and Technology*, 63, pp. 172–181. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2020.02.030>.

Wang, L. e Li, C. (2007) 'Preparation and physicochemical properties of a novel hydroxyapatite/chitosan-silk fibroin composite', *Carbohydrate Polymers*, 68(4), pp. 740–745. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.08.010>.

Wang, L., Nemoto, R. e Senna, M. (2004) 'Changes in microstructure and physicochemical properties of hydroxyapatite-silk fibroin nanocomposite with varying silk fibroin content', *Journal of the European Ceramic Society*, 24(9), pp. 2707–2715. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2003.09.006>.

Wang, W. e Yeung, K.W.K. (2017) 'Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review', *Bioactive Materials*, 2(4), pp. 224–247. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007>.

Wang, Y. et al. (2008) 'In vivo degradation of 3D Silk Fibroin Scaffolds', *Biomaterials*, 29(24–25), pp. 3415–3428. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.05.002>.In.

Wei, K. et al. (2011) 'Fabrication of nano-hydroxyapatite on electrospun silk fibroin nanofiber and their effects in osteoblastic behavior', *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 97 A(3), pp. 272–280. Available at: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33054>.

Wei, M. et al. (2022) 'Enhanced mechanical properties and anti-washout of calcium phosphate cement/montmorillonite composite bone-cement for bone-repair applications', *Ceramics International*, 48(23), pp. 35185–35197. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.08.117>.

Weichhold, J. et al. (2019) 'Setting Mechanism of a CDHA Forming α -TCP Cement Modified with Sodium Phytate for Improved Injectability', *Materials*, 12(13), p. 2098. Available at: <https://doi.org/10.3390/ma12132098>.

Weichhold, J. et al. (2022) 'Pyrophosphate ions inhibit calcium phosphate cement reaction and enable storage of premixed pastes with a controlled activation by orthophosphate addition', *Ceramics International*, 48(11), pp. 15390–15404. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.02.073>.

Williams, D.F. (1999) 'The Williams Dictionary of Biomaterials', *The Williams Dictionary of Biomaterials*, pp. 33–54. Available at: <https://doi.org/10.5949/upo9781846314438>.

Williams, D.F. (2009) 'On the nature of biomaterials', *Biomaterials*, 30(30), pp. 5897–5909. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.027>.

Wu, S. et al. (2014) 'Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering', *Materials Science and Engineering R: Reports*, 80(1), pp. 1–36. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mser.2014.04.001>.

Yashima, M. e Sakai, A. (2003) 'High-temperature neutron powder diffraction study of the structural phase transition between α and α' phases in tricalcium phosphate $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ', *Chemical Physics Letters*, 372(5–6), pp. 779–783. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(03\)00505-0](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(03)00505-0).

Zhang, H. et al. (2020) 'Silk as templates for hydroxyapatite biomineralization: A comparative study of *Bombyx mori* and *Antheraea pernyi* silkworm silks', *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, pp. 2842–2850. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.142>.

Zhang, J. et al. (2014) 'Calcium phosphate cements for bone substitution: Chemistry, handling and mechanical properties', *Acta Biomaterialia*, 10(3), pp. 1035–1049. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.11.001>.

Zhang, X. yun et al. (2019) 'Biocompatible silk fibroin/carboxymethyl chitosan/strontium substituted hydroxyapatite/cellulose nanocrystal composite scaffolds for bone tissue engineering', *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, pp. 1247–1257. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.172>.

Zhang, X.M. e Wyeth, P. (2010) 'Using FTIR spectroscopy to detect sericin on historic silk', *Science China Chemistry*, 53(3), pp. 626–631. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11426-010-0050-y>.

Zhengshi, Z. et al. (2018) 'Green process to prepare water-insoluble silk scaffolds with silk I structure', *International Journal of Biological Macromolecules* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.175>.

APÊNDICE A – RESULTADOS COMPLETOS DO REFINAMENTO DE RIETVELD DO TESTE DE ARMAZENAMENTO

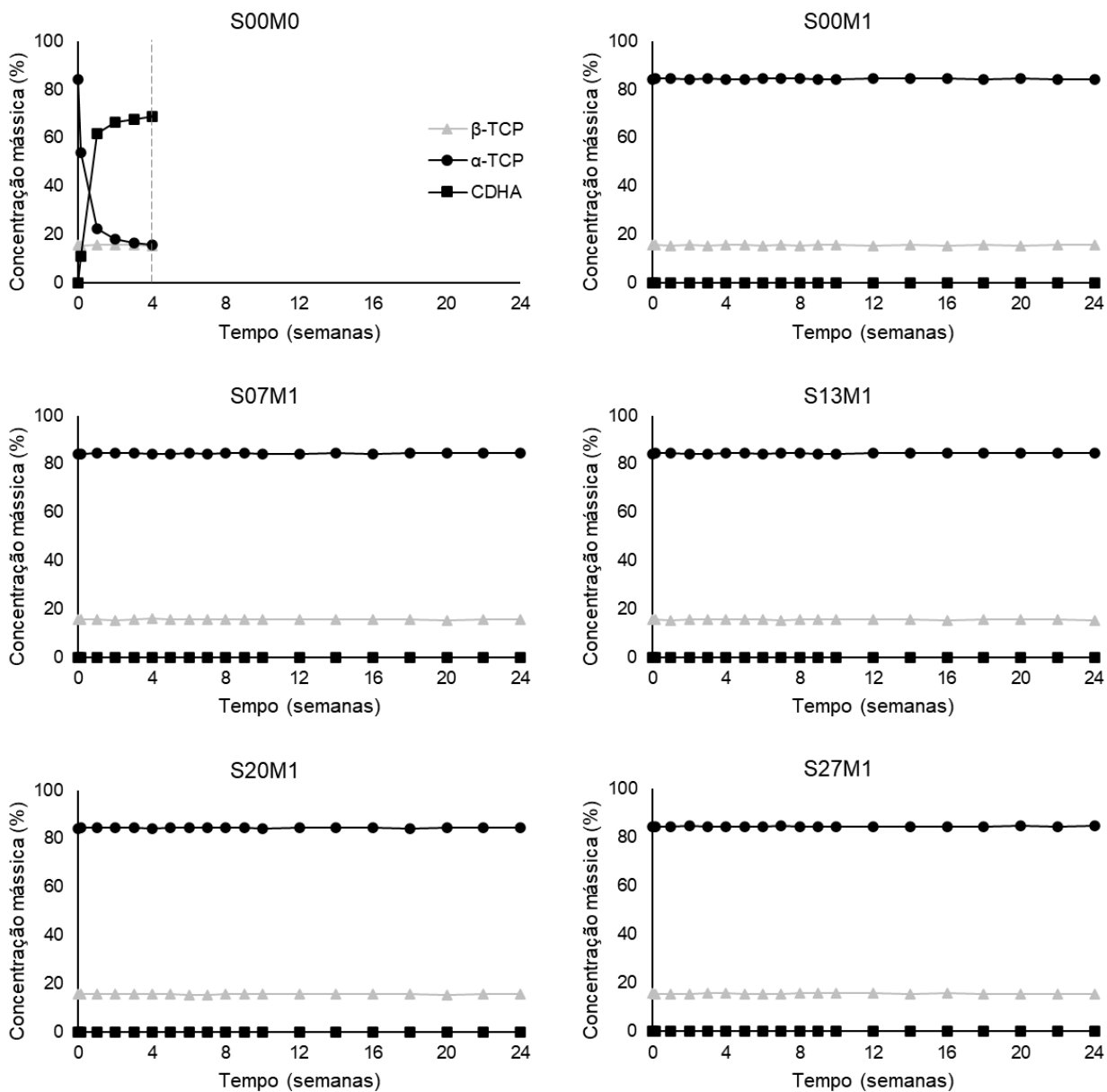


Figura A1: Composição das amostras S00M0, S00M1, S07M1, S13M1, S20M1 e S27M1 conforme tempo de armazenamento.

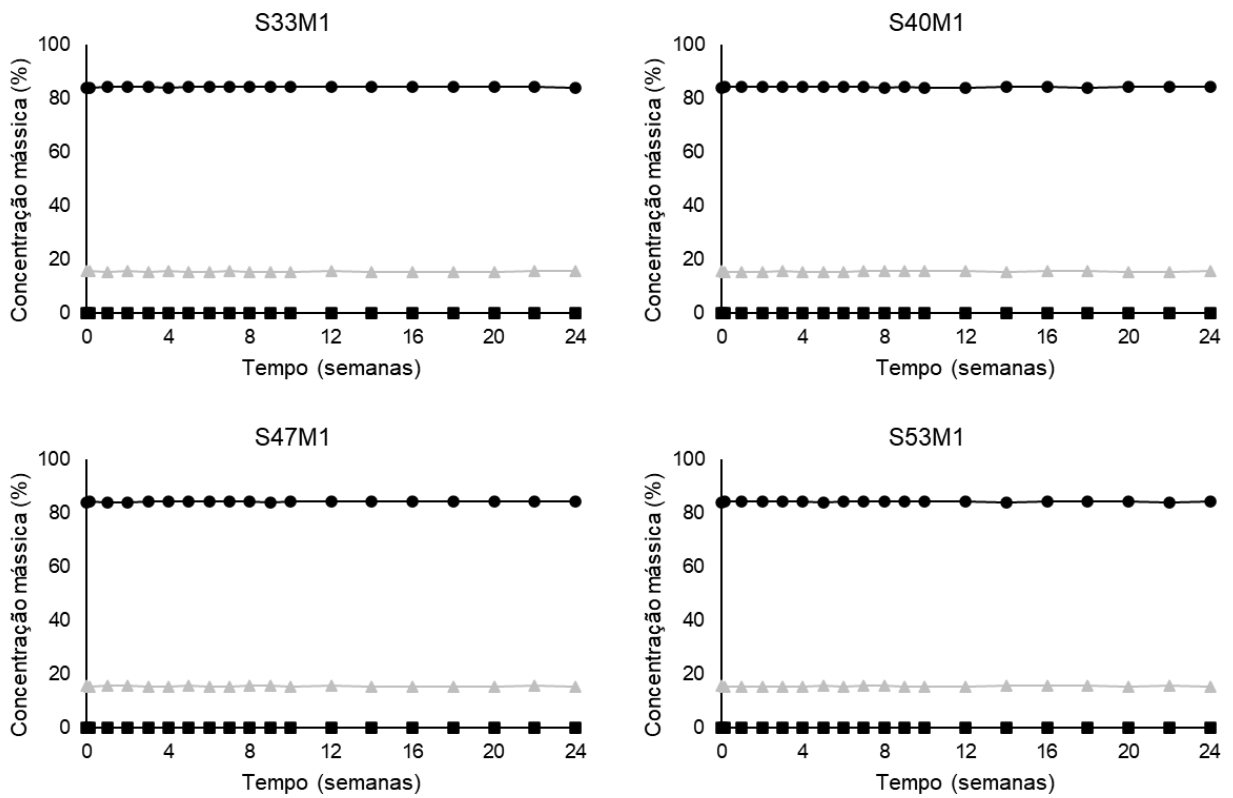


Figura A2: Composição das amostras S33M1, S40MQ, S47M1 e S53M1 conforme tempo de armazenamento.

Tabela A1: Composição das pastas pré-misturadas obtidas durante o teste de armazenamento até 3 semanas.

| Variante | 0d | | | 3d | | | 1 semana (w) | | | 2w | | | 3w | | |
|----------|---------------|--------------|-------|---------------|--------------|------------|---------------|--------------|------------|---------------|--------------|------------|---------------|--------------|------------|
| | α -TCP | β -TCP | CDHA | α -TCP | β -TCP | CDHA | α -TCP | β -TCP | CDHA | α -TCP | β -TCP | CDHA | α -TCP | β -TCP | CDHA |
| S00M0 | 81,8 ± 0,4 | 18,2 ± 0,4 | < LOD | 53,7 ± 0,5 | 15,4 ± 0,4 | 10,9 ± 0,4 | 22,6 ± 0,3 | 15,6 ± 0,4 | 61,8 ± 0,2 | 17,9 ± 0,2 | 15,6 ± 0,4 | 66,5 ± 0,2 | 16,7 ± 0,3 | 15,7 ± 0,5 | 67,6 ± 0,4 |
| S00M1 | 81,8 ± 0,4 | 18,2 ± 0,4 | < LOD | 81,4 ± 0,5 | 18,6 ± 0,5 | < LOD | 81,6 ± 0,3 | 18,4 ± 0,3 | < LOD | 81,9 ± 0,4 | 18,1 ± 0,4 | < LOD | 81,5 ± 0,3 | 18,5 ± 0,3 | < LOD |
| S07M1 | 81,8 ± 0,4 | 18,2 ± 0,4 | < LOD | 81,9 ± 0,6 | 18,1 ± 0,6 | < LOD | 81,4 ± 0,6 | 18,6 ± 0,6 | < LOD | 81,6 ± 0,2 | 18,4 ± 0,2 | < LOD | 81,5 ± 0,5 | 18,5 ± 0,5 | < LOD |
| S13M1 | 81,8 ± 0,4 | 18,2 ± 0,4 | < LOD | 81,4 ± 0,5 | 18,6 ± 0,5 | < LOD | 81,8 ± 0,2 | 18,2 ± 0,2 | < LOD | 81,6 ± 0,1 | 18,4 ± 0,1 | < LOD | 81,2 ± 0,6 | 18,8 ± 0,6 | < LOD |
| S20M1 | 81,8 ± 0,4 | 18,2 ± 0,4 | < LOD | 81,7 ± 0,2 | 18,3 ± 0,2 | < LOD | 81,4 ± 0,3 | 18,6 ± 0,3 | < LOD | 81,7 ± 0,3 | 18,3 ± 0,3 | < LOD | 81,5 ± 0,5 | 18,5 ± 0,5 | < LOD |
| S27M1 | 81,8 ± 0,4 | 18,2 ± 0,4 | < LOD | 81,8 ± 0,2 | 18,2 ± 0,2 | < LOD | 81,7 ± 0,3 | 18,3 ± 0,3 | < LOD | 81,4 ± 0,5 | 18,6 ± 0,3 | < LOD | 81,3 ± 0,5 | 18,7 ± 0,5 | < LOD |
| S33M1 | 81,8 ± 0,4 | 18,2 ± 0,4 | < LOD | 81,3 ± 0,5 | 18,7 ± 0,5 | < LOD | 81,6 ± 0,4 | 18,4 ± 0,4 | < LOD | 81,7 ± 0,6 | 18,3 ± 0,4 | < LOD | 81,4 ± 0,3 | 18,6 ± 0,3 | < LOD |
| S40M1 | 81,8 ± 0,4 | 18,2 ± 0,4 | < LOD | 81,6 ± 0,3 | 18,4 ± 0,3 | < LOD | 81,9 ± 0,5 | 18,1 ± 0,5 | < LOD | 81,7 ± 0,5 | 18,3 ± 0,5 | < LOD | 81,6 ± 0,2 | 18,4 ± 0,2 | < LOD |
| S47M1 | 81,8 ± 0,4 | 18,2 ± 0,4 | < LOD | 81,9 ± 0,3 | 18,1 ± 0,3 | < LOD | 81,4 ± 0,5 | 18,6 ± 0,5 | < LOD | 81,7 ± 0,4 | 18,3 ± 0,4 | < LOD | 81,4 ± 0,6 | 18,6 ± 0,6 | < LOD |
| S53M1 | 81,8 ± 0,4 | 18,2 ± 0,4 | < LOD | 81,5 ± 0,6 | 18,5 ± 0,6 | < LOD | 81,4 ± 0,3 | 18,6 ± 0,3 | < LOD | 81,9 ± 0,3 | 18,1 ± 0,3 | < LOD | 81,5 ± 0,5 | 18,5 ± 0,6 | < LOD |

Tabela A2: Composição das pastas pré-misturadas obtidas durante o teste de armazenamento entre 4 e 8 semanas.

| Variante | 4w | | | 5w | | | 6w | | | 7w | | | 8w | | |
|----------|---------------|--------------|------------|---------------|--------------|-------|---------------|--------------|-------|---------------|--------------|-------|---------------|--------------|-------|
| | α -TCP | β -TCP | CDHA | α -TCP | β -TCP | CDHA | α -TCP | β -TCP | CDHA | α -TCP | β -TCP | CDHA | α -TCP | β -TCP | CDHA |
| S00M0 | 15,8 ± 0,6 | 15,4 ± 0,3 | 68,8 ± 0,5 | | | | | | | | | | | | |
| S00M1 | 81,7 ± 0,5 | 18,3 ± 0,5 | < LOD | 81,3 ± 0,3 | 18,7 ± 0,3 | < LOD | 81,6 ± 0,2 | 18,4 ± 0,2 | < LOD | 81,4 ± 0,7 | 18,6 ± 0,7 | < LOD | 81,5 ± 0,5 | 18,5 ± 0,5 | < LOD |
| S07M1 | 82,0 ± 0,1 | 18,0 ± 0,1 | < LOD | 81,3 ± 0,5 | 18,7 ± 0,5 | < LOD | 81,5 ± 0,4 | 18,5 ± 0,4 | < LOD | 81,3 ± 0,7 | 18,7 ± 0,7 | < LOD | 81,4 ± 0,5 | 18,6 ± 0,5 | < LOD |
| S13M1 | 81,4 ± 0,5 | 18,6 ± 0,5 | < LOD | 81,5 ± 0,3 | 18,5 ± 0,3 | < LOD | 81,3 ± 0,6 | 18,7 ± 0,6 | < LOD | 81,6 ± 0,5 | 18,4 ± 0,5 | < LOD | 81,4 ± 0,3 | 18,6 ± 0,3 | < LOD |
| S20M1 | 81,9 ± 0,3 | 18,1 ± 0,3 | < LOD | 81,5 ± 0,6 | 18,5 ± 0,6 | < LOD | 81,6 ± 0,3 | 18,4 ± 0,3 | < LOD | 81,6 ± 0,5 | 18,4 ± 0,5 | < LOD | 81,4 ± 0,2 | 18,6 ± 0,2 | < LOD |
| S27M1 | 81,9 ± 0,5 | 18,1 ± 0,5 | < LOD | 81,4 ± 0,4 | 18,6 ± 0,4 | < LOD | 81,5 ± 0,6 | 18,5 ± 0,6 | < LOD | 81,6 ± 0,3 | 18,4 ± 0,3 | < LOD | 81,3 ± 0,5 | 18,7 ± 0,5 | < LOD |
| S33M1 | 81,8 ± 0,3 | 18,2 ± 0,3 | < LOD | 81,5 ± 0,5 | 18,5 ± 0,5 | < LOD | 81,6 ± 0,2 | 18,4 ± 0,2 | < LOD | 81,9 ± 0,5 | 18,1 ± 0,5 | < LOD | 81,4 ± 0,6 | 18,6 ± 0,6 | < LOD |
| S40M1 | 81,5 ± 0,4 | 18,5 ± 0,4 | < LOD | 81,4 ± 0,5 | 18,6 ± 0,5 | < LOD | 81,6 ± 0,6 | 18,4 ± 0,6 | < LOD | 81,9 ± 0,3 | 18,1 ± 0,3 | < LOD | 81,8 ± 0,5 | 18,2 ± 0,5 | < LOD |
| S47M1 | 81,5 ± 0,3 | 18,5 ± 0,3 | < LOD | 81,3 ± 0,7 | 18,7 ± 0,7 | < LOD | 81,6 ± 0,5 | 18,4 ± 0,5 | < LOD | 81,6 ± 0,2 | 18,4 ± 0,2 | < LOD | 81,3 ± 0,7 | 18,7 ± 0,7 | < LOD |
| S53M1 | 81,5 ± 0,5 | 18,5 ± 0,5 | < LOD | 81,9 ± 0,3 | 18,1 ± 0,3 | < LOD | 81,4 ± 0,4 | 18,6 ± 0,4 | < LOD | 81,3 ± 0,6 | 18,7 ± 0,6 | < LOD | 81,3 ± 0,5 | 18,7 ± 0,5 | < LOD |

Tabela A3: Composição das pastas pré-misturadas obtidas durante o teste de armazenamento entre 9 e 16 semanas.

| Variante | 9w | | | 10w | | | 12w | | | 14w | | | 16w | | |
|----------|---------------|--------------|-------|---------------|--------------|-------|---------------|--------------|-------|---------------|--------------|-------|---------------|--------------|-------|
| | α -TCP | β -TCP | CDHA | α -TCP | β -TCP | CDHA | α -TCP | β -TCP | CDHA | α -TCP | β -TCP | CDHA | α -TCP | β -TCP | CDHA |
| S00M0 | | | | | | | | | | | | | | | |
| S00M1 | 81,3 ± 0,5 | 18,7 ± 0,5 | < LOD | 81,9 ± 0,3 | 18,1 ± 0,3 | < LOD | 81,6 ± 0,3 | 18,4 ± 0,3 | < LOD | 81,4 ± 0,6 | 18,6 ± 0,6 | < LOD | 81,5 ± 0,2 | 18,5 ± 0,2 | < LOD |
| S07M1 | 81,5 ± 0,4 | 18,5 ± 0,4 | < LOD | 81,9 ± 0,2 | 18,1 ± 0,2 | < LOD | 81,3 ± 0,5 | 18,7 ± 0,5 | < LOD | 81,5 ± 0,3 | 18,5 ± 0,3 | < LOD | 81,3 ± 0,7 | 18,7 ± 0,7 | < LOD |
| S13M1 | 81,9 ± 0,1 | 18,1 ± 0,1 | < LOD | 81,4 ± 0,5 | 18,6 ± 0,5 | < LOD | 81,5 ± 0,5 | 18,5 ± 0,5 | < LOD | 81,4 ± 0,6 | 18,6 ± 0,6 | < LOD | 81,6 ± 0,2 | 18,4 ± 0,2 | < LOD |
| S20M1 | 81,3 ± 0,6 | 18,7 ± 0,6 | < LOD | 81,9 ± 0,3 | 18,1 ± 0,3 | < LOD | 81,3 ± 0,5 | 18,7 ± 0,5 | < LOD | 81,5 ± 0,4 | 18,5 ± 0,4 | < LOD | 81,3 ± 0,3 | 18,7 ± 0,3 | < LOD |
| S27M1 | 81,9 ± 0,5 | 18,1 ± 0,5 | < LOD | 81,3 ± 0,6 | 18,3 ± 0,6 | < LOD | 81,3 ± 0,4 | 18,7 ± 0,4 | < LOD | 81,4 ± 0,5 | 18,6 ± 0,5 | < LOD | 81,9 ± 0,2 | 18,1 ± 0,2 | < LOD |
| S33M1 | 81,4 ± 0,2 | 18,6 ± 0,2 | < LOD | 81,5 ± 0,3 | 18,5 ± 0,3 | < LOD | 81,8 ± 0,5 | 18,2 ± 0,5 | < LOD | 81,5 ± 0,2 | 18,5 ± 0,2 | < LOD | 81,3 ± 0,5 | 18,7 ± 0,2 | < LOD |
| S40M1 | 81,3 ± 0,6 | 18,7 ± 0,6 | < LOD | 81,9 ± 0,2 | 18,1 ± 0,2 | < LOD | 81,9 ± 0,3 | 18,1 ± 0,3 | < LOD | 81,5 ± 0,4 | 18,5 ± 0,4 | < LOD | 81,3 ± 0,5 | 18,7 ± 0,5 | < LOD |
| S47M1 | 81,9 ± 0,3 | 18,1 ± 0,3 | < LOD | 81,4 ± 0,5 | 18,6 ± 0,5 | < LOD | 81,3 ± 0,4 | 18,7 ± 0,4 | < LOD | 81,5 ± 0,2 | 18,5 ± 0,2 | < LOD | 81,4 ± 0,3 | 18,6 ± 0,3 | < LOD |
| S53M1 | 81,5 ± 0,5 | 18,5 ± 0,5 | < LOD | 81,6 ± 0,3 | 18,4 ± 0,3 | < LOD | 81,4 ± 0,6 | 18,6 ± 0,6 | < LOD | 81,9 ± 0,2 | 18,1 ± 0,2 | < LOD | 81,3 ± 0,6 | 18,7 ± 0,6 | < LOD |

Tabela A4: Composição das pastas pré-misturadas obtidas durante o teste de armazenamento entre 18 e 22 semanas.

| Variante | 18w | | | 20w | | | 22w | | |
|----------|---------------|---------------|-------|---------------|---------------|-------|---------------|---------------|-------|
| | α -TCP | β -TCP | CDHA | α -TCP | β -TCP | CDHA | α -TCP | β -TCP | CDHA |
| S00M0 | | | | | | | | | |
| S00M1 | 81,9 ± 0,3 | 18,1 ± 0,3 | < LOD | 81,5 ± 0,5 | 18,5 ± 0,5 | < LOD | 81,3 ± 0,6 | 18,7 ± 0,6 | < LOD |
| S07M1 | 81,5 ± 0,4 | 18,5 ± 0,4 | < LOD | 81,6 ± 0,4 | 18,4 ± 0,4 | < LOD | 81,5 ± 0,3 | 18,5 ± 0,3 | < LOD |
| S13M1 | 81,5 ± 0,3 | 18,5 ± 0,3 | < LOD | 81,4 ± 0,5 | 18,6 ± 0,5 | < LOD | 81,4 ± 0,3 | 18,6 ± 0,3 | < LOD |
| S20M1 | 81,9 ± 0,2 | 18,1 ± 0,2 | < LOD | 81,6 ± 0,5 | 18,4 ± 0,5 | < LOD | 81,3 ± 0,4 | 18,7 ± 0,4 | < LOD |
| S27M1 | 81,5 ± 0,5 | 18,5 ± 0,5 | < LOD | 81,6 ± 0,3 | 18,4 ± 0,3 | < LOD | 81,4 ± 0,5 | 18,6 ± 0,5 | < LOD |
| S33M1 | 81,6 ± 0,2 | 18,4 ± 0,2 | < LOD | 81,6 ± 0,3 | 18,4 ± 0,3 | < LOD | 81,9 ± 0,1 | 18,1 ± 0,1 | < LOD |
| S40M1 | 81,2 ± 0,8 | 18,8 ± 0,8 | < LOD | 81,4 ± 0,5 | 18,6 ± 0,5 | < LOD | 81,5 ± 0,6 | 18,5 ± 0,6 | < LOD |
| S47M1 | 81,6 ± 0,4 | 18,4 ± 0,4 | < LOD | 81,6 ± 0,5 | 18,4 ± 0,5 | < LOD | 81,3 ± 0,7 | 18,7 ± 0,7 | < LOD |
| S53M1 | 81,3 ± 0,5 | 18,7 ± 0,5 | < LOD | 81,5 ± 0,4 | 18,5 ± 0,4 | < LOD | 81,9 ± 0,2 | 18,1 ± 0,2 | < LOD |

APÊNDICE B – COMPOSIÇÃO COMPLETA E DIFRATOGRAMA DOS CIMENTOS DE FOSFATO DE CÁLCIO OBTIDOS

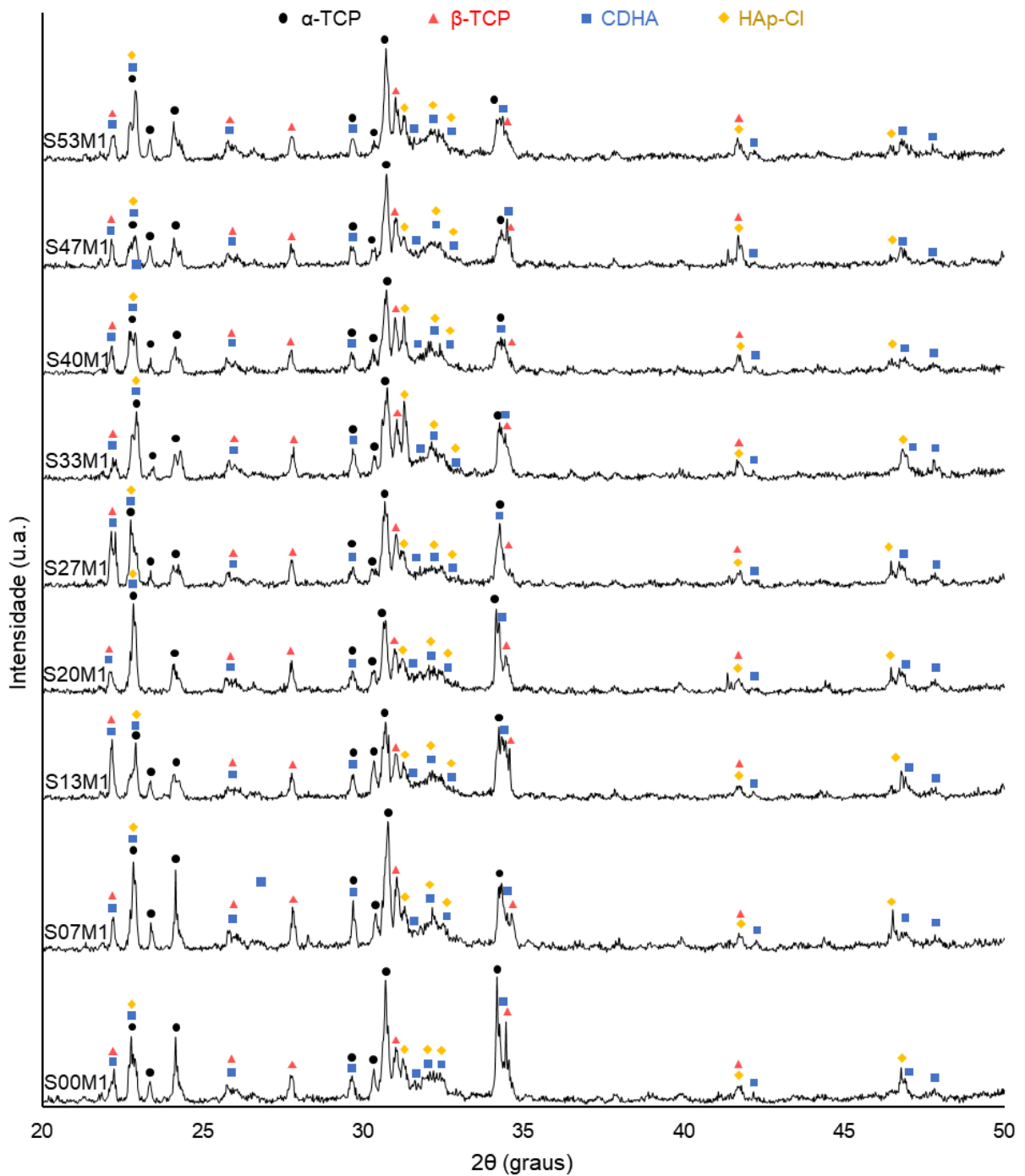


Figura B1: Difratoograma de raios-X das amostras de CPC obtidas após 0d em câmara úmida.

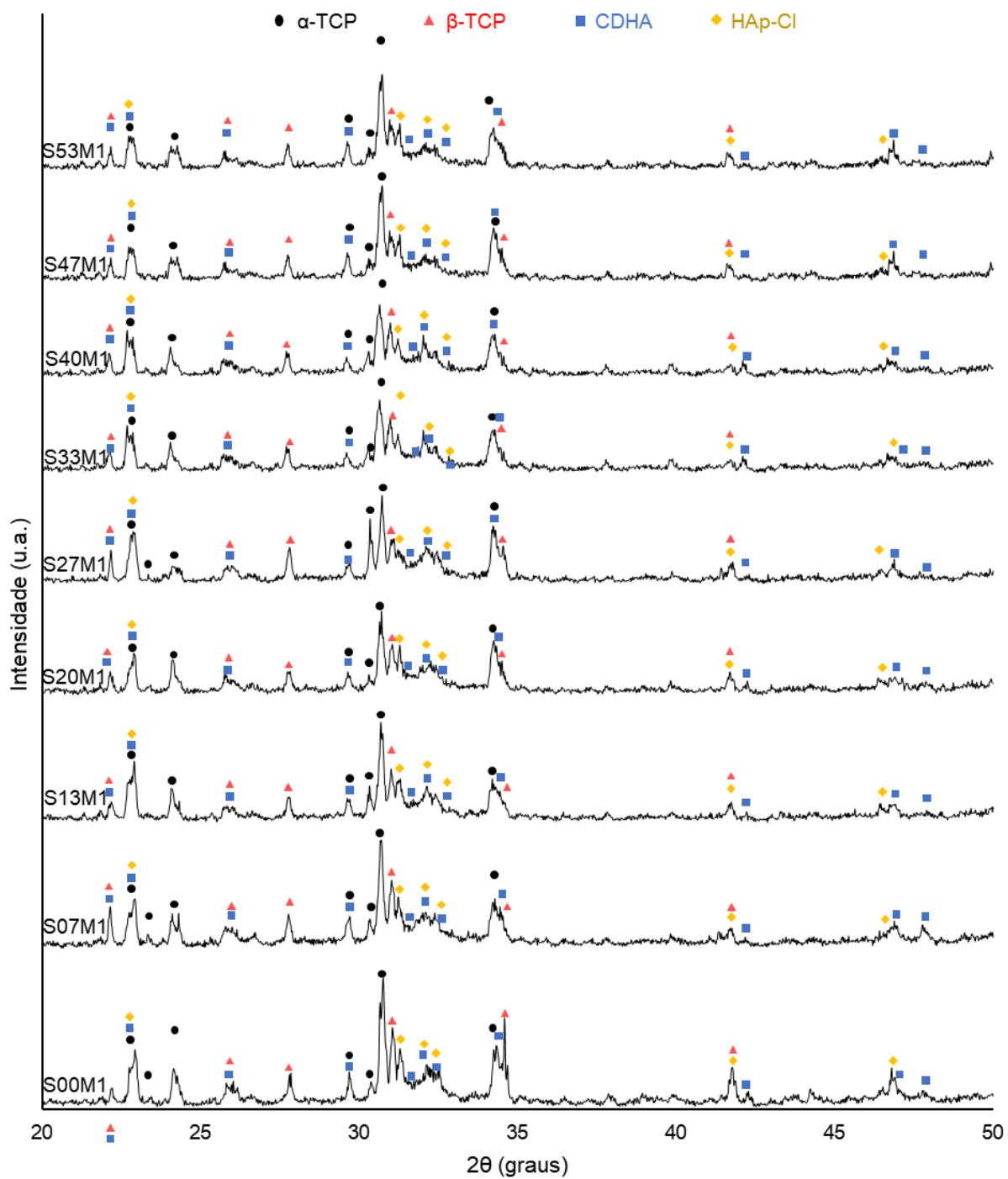


Figura B2: Difratoograma de raios-X das amostras de CPC obtidas após 1d em câmara úmida.

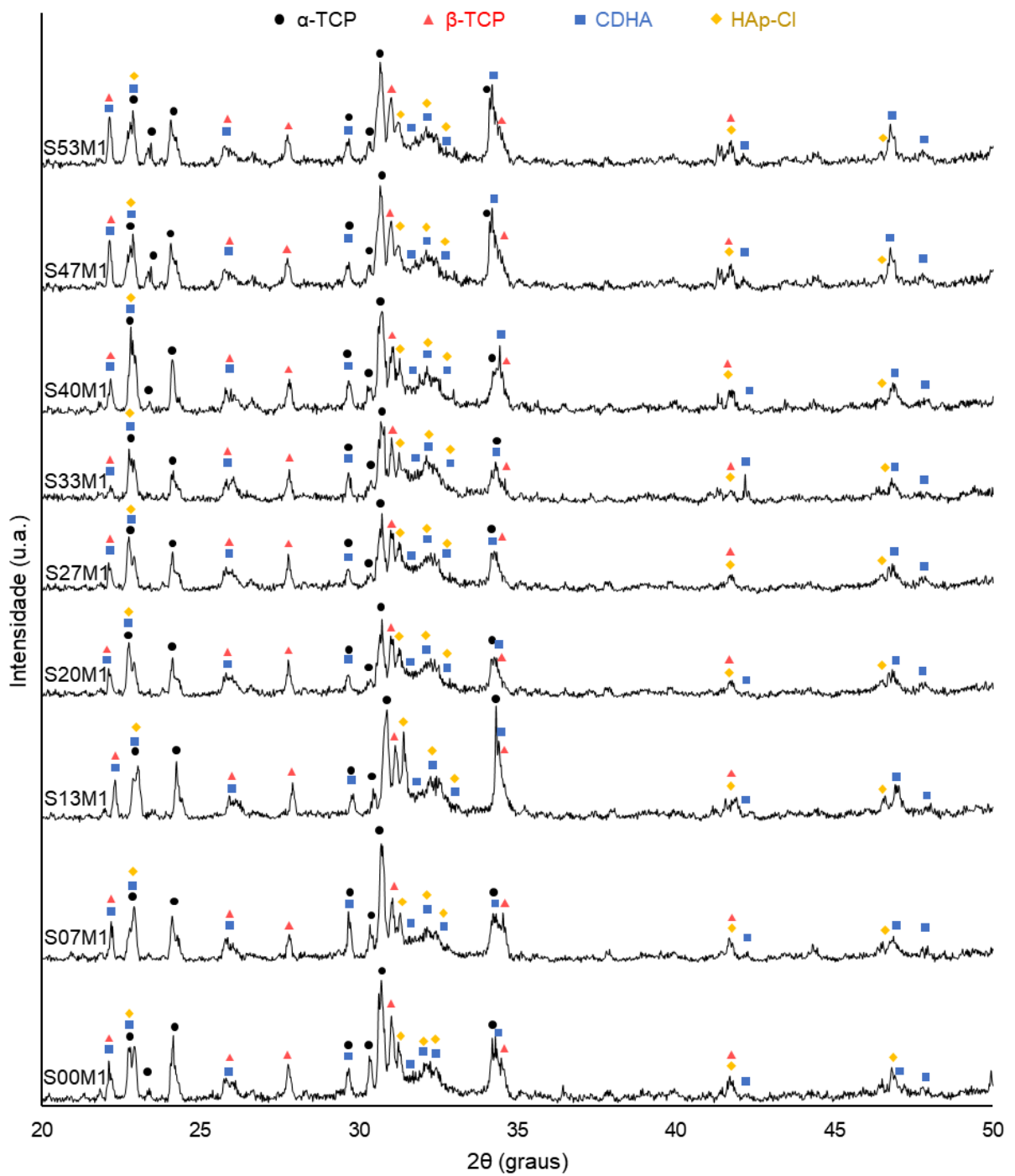


Figura B3: Difratoograma de raios-X das amostras de CPC obtidas após 3d em câmara úmida.

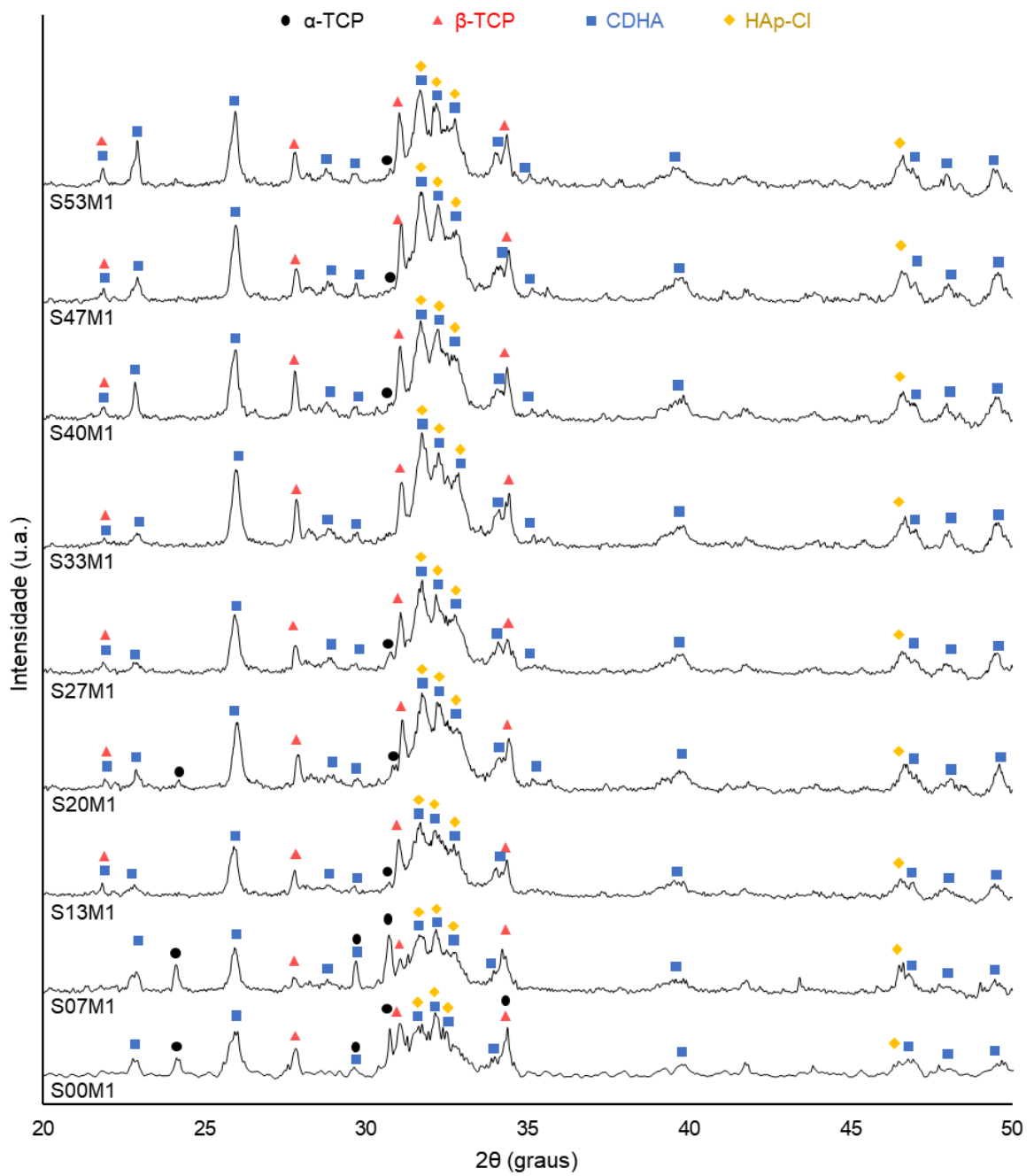


Figura B4: Difratoograma de raios-X das amostras de CPC obtidas após 7d em câmara úmida.

Tabela B1: Composição dos cimentos de fosfato de cálcio obtidos.

| Variante | 0d | | | | 1d | | | | 3d | | | | 7d | | | |
|----------|---------------|--------------|------------|------------|---------------|--------------|------------|------------|---------------|--------------|------------|------------|---------------|--------------|------------|------------|
| | α -TCP | β -TCP | CDHA | HAp-Cl | α -TCP | β -TCP | CDHA | HAp-Cl | α -TCP | β -TCP | CDHA | HAp-Cl | α -TCP | β -TCP | CDHA | HAp-Cl |
| S00M1 | 52,2 ± 0,4 | 18,5 ± 0,2 | 9,7 ± 0,6 | 19,6 ± 0,3 | 42,3 ± 0,4 | 17,7 ± 0,3 | 17,5 ± 0,2 | 22,5 ± 0,5 | 36,9 ± 0,7 | 17,6 ± 0,2 | 23,4 ± 0,8 | 22,1 ± 0,2 | 14,5 ± 0,3 | 17,1 ± 0,3 | 46,2 ± 0,2 | 22,1 ± 0,4 |
| S07M1 | 42,4 ± 0,4 | 18,6 ± 0,3 | 16,6 ± 0,3 | 22,4 ± 0,3 | 38,5 ± 0,1 | 18 ± 0,4 | 20,5 ± 0,3 | 23,0 ± 0,6 | 34,2 ± 0,3 | 17,9 ± 0,6 | 25,5 ± 0,4 | 22,3 ± 0,2 | 13,2 ± 0,4 | 16,5 ± 0,3 | 48,4 ± 0,4 | 21,9 ± 0,3 |
| S13M1 | 40,6 ± 0,3 | 18,5 ± 0,5 | 18,1 ± 0,3 | 22,8 ± 0,5 | 36,2 ± 0,6 | 18,1 ± 0,3 | 23,2 ± 0,3 | 22,6 ± 0,9 | 34,3 ± 0,2 | 17,5 ± 0,3 | 26,0 ± 0,3 | 22,2 ± 0,7 | 10,0 ± 0,4 | 16,8 ± 0,2 | 50,8 ± 0,6 | 22,4 ± 0,4 |
| S20M1 | 47,4 ± 0,3 | 18,4 ± 0,2 | 12,7 ± 0,3 | 21,5 ± 0,7 | 41,2 ± 0,4 | 18,0 ± 0,2 | 18,4 ± 0,3 | 22,4 ± 0,4 | 37,0 ± 0,6 | 17,2 ± 0,5 | 23,6 ± 0,2 | 22,3 ± 0,4 | 3,2 ± 0,1 | 17,0 ± 0,6 | 57,6 ± 0,8 | 22,2 ± 0,5 |
| S27M1 | 48,4 ± 0,7 | 18,1 ± 0,2 | 11,4 ± 0,3 | 22,2 ± 0,3 | 43,2 ± 0,4 | 18,0 ± 0,6 | 16,3 ± 0,4 | 22,5 ± 0,7 | 33,8 ± 0,4 | 17,4 ± 0,4 | 26,5 ± 0,7 | 22,2 ± 0,3 | 2,8 ± 0,3 | 17,2 ± 0,3 | 58,1 ± 0,9 | 21,9 ± 0,4 |
| S33M1 | 38,1 ± 0,6 | 18,5 ± 0,2 | 20,5 ± 0,8 | 22,9 ± 0,4 | 37,0 ± 0,6 | 18,0 ± 0,3 | 22,4 ± 0,9 | 22,6 ± 0,2 | 34,8 ± 0,3 | 17,2 ± 0,3 | 25,7 ± 0,9 | 22,3 ± 0,4 | 3,5 ± 0,3 | 16,7 ± 0,6 | 57,9 ± 0,7 | 21,9 ± 0,4 |
| S40M1 | 37,3 ± 0,6 | 18,5 ± 0,3 | 21,8 ± 0,2 | 22,5 ± 0,4 | 33,4 ± 0,5 | 18,3 ± 0,4 | 25,9 ± 0,2 | 22,4 ± 0,4 | 30,2 ± 0,7 | 17,4 ± 0,3 | 30,4 ± 0,1 | 22,1 ± 0,4 | 3,7 ± 0,3 | 16,8 ± 0,4 | 57,4 ± 0,5 | 22,1 ± 0,3 |
| S47M1 | 49,7 ± 0,6 | 18,1 ± 0,5 | 9,3 ± 0,7 | 22,9 ± 0,6 | 41,9 ± 0,5 | 17,8 ± 0,6 | 17,7 ± 0,5 | 22,7 ± 0,4 | 39,8 ± 0,3 | 17,8 ± 0,4 | 19,6 ± 0,2 | 22,7 ± 0,3 | 6,6 ± 0,6 | 17,5 ± 0,6 | 53,8 ± 0,5 | 22,1 ± 0,8 |
| S53M1 | 42,1 ± 0,4 | 18,2 ± 0,8 | 17,0 ± 0,4 | 22,7 ± 0,2 | 38,2 ± 0,4 | 17,9 ± 0,4 | 21,4 ± 0,2 | 22,5 ± 0,2 | 35,6 ± 0,4 | 17,7 ± 0,6 | 24,4 ± 0,9 | 22,4 ± 0,3 | 8,6 ± 0,4 | 16,7 ± 0,4 | 52,9 ± 0,5 | 21,8 ± 0,4 |

APÊNDICE C – MICROGRAFIAS DOS CIMENTOS DE FOSFATO DE CÁLCIO OBTIDOS

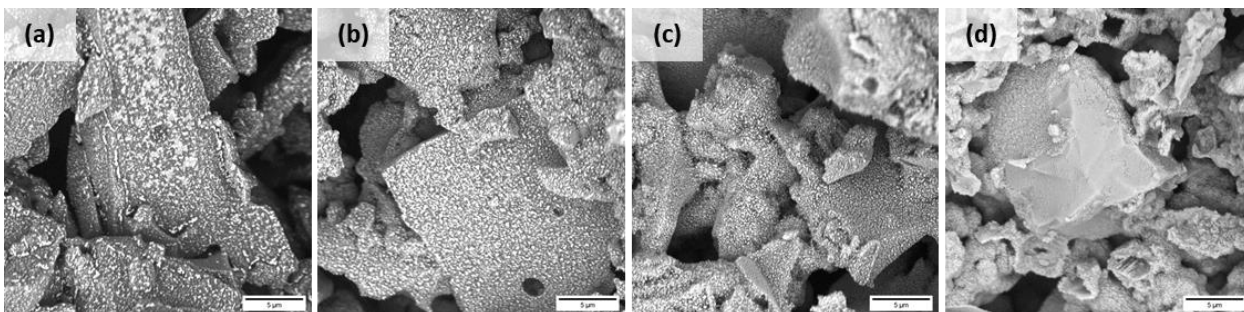


Figura C1: Micrografias da superfície de fratura de amostras S00M1 sob magnificação de 10000x após permanência em 100% de umidade relativa por (a) 0d, (b) 1d, (c) 3d e (d) 7d. A barra de escala representa um comprimento de 5 μ m.

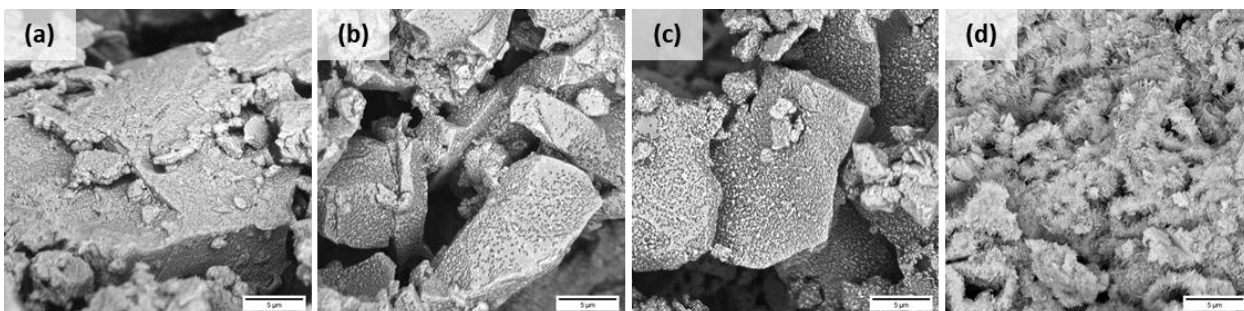


Figura C2: Micrografias da superfície de fratura de amostras S07M1 sob magnificação de 10000x após permanência em 100% de umidade relativa por (a) 0d, (b) 1d, (c) 3d e (d) 7d. A barra de escala representa um comprimento de 5 μ m.

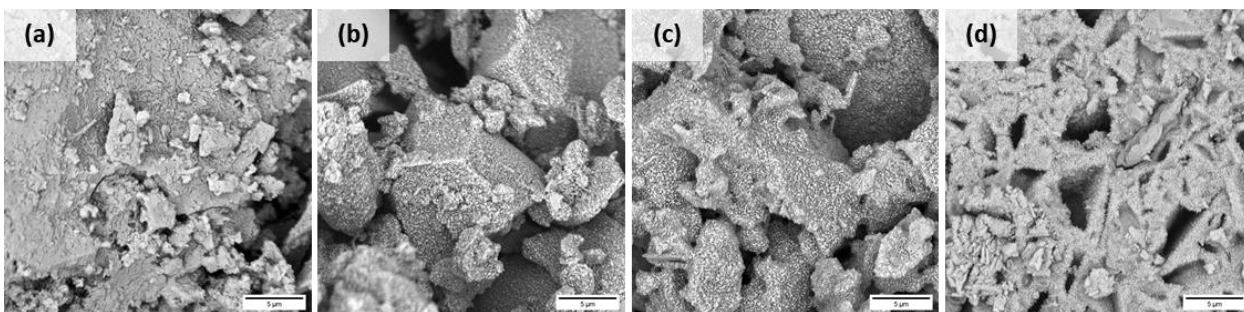


Figura C3: Micrografias da superfície de fratura de amostras S13M1 sob magnificação de 10000x após permanência em 100% de umidade relativa por (a) 0d, (b) 1d, (c) 3d e (d) 7d. A barra de escala representa um comprimento de 5 μ m.

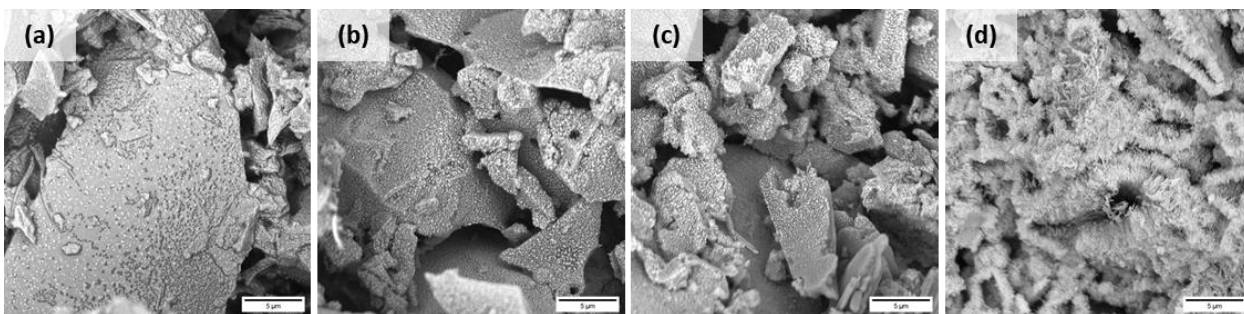


Figura C4: Micrografias da superfície de fratura de amostras S20M1 sob magnificação de 10000x após permanência em 100% de umidade relativa por (a) 0d, (b) 1d, (c) 3d e (d) 7d. A barra de escala representa um comprimento de 5 μ m.

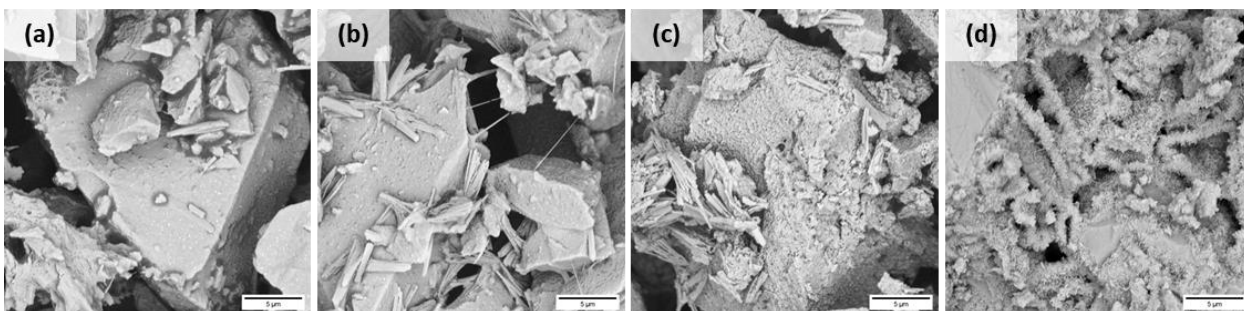


Figura C5: Micrografias da superfície de fratura de amostras S27M1 sob magnificação de 10000x após permanência em 100% de umidade relativa por (a) 0d, (b) 1d, (c) 3d e (d) 7d. A barra de escala representa um comprimento de 5 μ m.

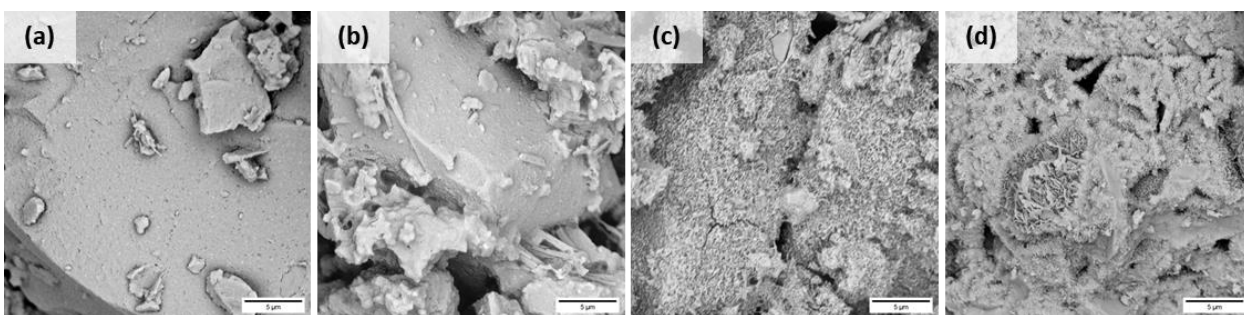


Figura C6: Micrografias da superfície de fratura de amostras S33M1 sob magnificação de 10000x após permanência em 100% de umidade relativa por (a) 0d, (b) 1d, (c) 3d e (d) 7d. A barra de escala representa um comprimento de 5 μ m.

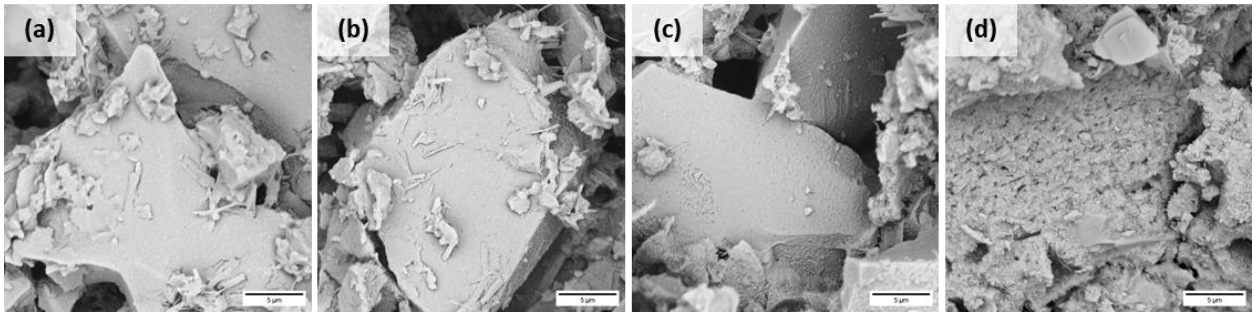


Figura C7: Micrografias da superfície de fratura de amostras S40M1 sob magnificação de 10000x após permanência em 100% de umidade relativa por (a) 0d, (b) 1d, (c) 3d e (d) 7d. A barra de escala representa um comprimento de 5 μ m.

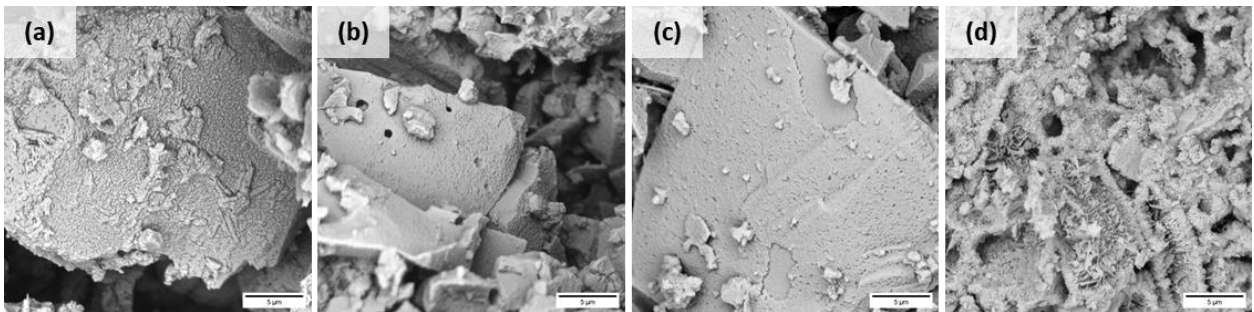


Figura C8: Micrografias da superfície de fratura de amostras S47M1 sob magnificação de 10000x após permanência em 100% de umidade relativa por (a) 0d, (b) 1d, (c) 3d e (d) 7d. A barra de escala representa um comprimento de 5 μ m.

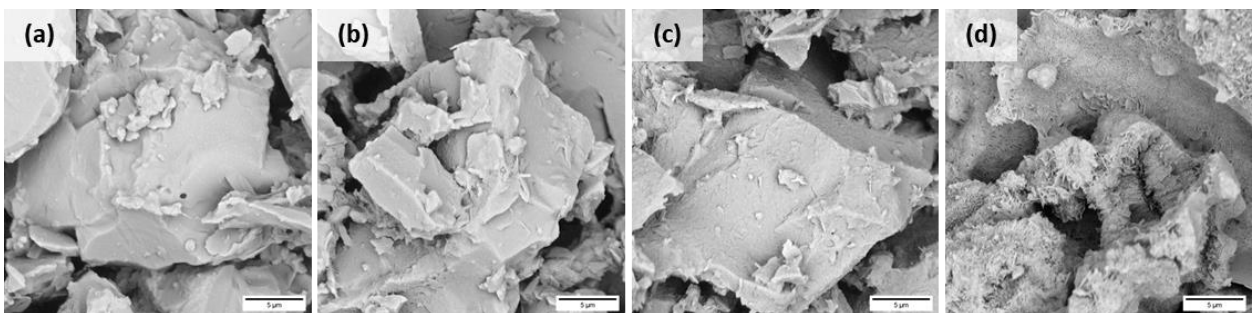


Figura C9: Micrografias da superfície de fratura de amostras S53M1 sob magnificação de 10000x após permanência em 100% de umidade relativa por (a) 0d, (b) 1d, (c) 3d e (d) 7d. A barra de escala representa um comprimento de 5 μ m.