



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
ENGENHARIA DE MATERIAIS

---



## TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO

### **OBTENÇÃO DE CIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO BIOMIMÉTICO COM ADIÇÃO DE FIBROÍNA DE SEDA PARA APLICAÇÕES ORTOPÉDICAS**

Júlia Bünecker Cassel  
Matrícula: 00223846

Orientador: Prof. Dr. Luis Alberto Loureiro dos Santos

Outubro de 2021

## **AGRADECIMENTOS**

Diversas pessoas contribuíram para a construção da minha caminhada até este momento. Primeiramente, gostaria de agradecer à minha família, que sempre me apoiou e incentivou a seguir meus objetivos e que sempre levou o estudo e a pesquisa com a importância que estes merecem e como um meio único de transformação.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo ensino de excelência e por todas as oportunidades que me proporcionaste; aos meus professores, especialmente os do curso de Engenharia de Materiais, por terem proporcionado diversos aprendizados ao longo da minha formação como engenheira.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Alberto, por me receber como aluna de iniciação científica no início da graduação e por, desde então, me apresentar à maravilhosa área dos biomateriais e prestar orientação e apoio, nos mais diversos momentos, além das diversas discussões construtivas que tivemos.

Aos meus colegas do Labiomat, por todo o apoio e parceria em nosso convívio de mais de quatro anos, muito obrigada pela troca de ideias, pelo incentivo e por todas as contribuições que tiveram para esta pesquisa e para a minha formação.

Aos meus amigos, pelo apoio incondicional nos diversos desafios enfrentados durante à graduação, pelas risadas e por todo o incentivo na minha busca de projetos pessoais e profissionais.

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

A ciência é competitiva, agressiva e exigente. Mas também é imaginativa, inspiradora e edificante.

Vera Rubin

## RESUMO

Nas últimas décadas, defeitos ósseos se tornaram cada vez mais comuns, afetando grande parte da população mundial. Atualmente, os principais tratamentos para a regeneração deste tecido são ineficazes no suprimento da demanda crescente de tratamentos mais eficientes. Assim, o desenvolvimento de cimentos de fosfato de cálcio é de grande interesse, devido a sua similaridade química com a fase inorgânica óssea, o que garante ótimas propriedades biológicas a estes materiais. Cimentos baseados em  $\alpha$ -TCP são amplamente pesquisados, pois estes reagem com o líquido de cura formando CDHA, que apresenta maior similaridade química e cristalográfica com a fase inorgânica óssea. Contudo, estes materiais não apresentam propriedades mecânicas adequadas a aplicações ortopédicas, sendo limitados à utilização na reconstrução de defeitos bucomaxilofaciais. Desta forma, este trabalho pretende desenvolver um cimento de fosfato de cálcio biomimético baseado em  $\alpha$ -TCP e reforçado com SF, de forma a se obter um material com propriedades mecânicas adequadas a estas aplicações. O  $\alpha$ -TCP utilizado na elaboração do cimento de fosfato de cálcio foi sintetizado pelo método de precipitação por via úmida e caracterizado por técnicas de difração de raios-X e espectroscopia de infravermelho, as quais demonstraram a obtenção do material em alta pureza. Os cimentos de fosfato de cálcio foram preparados através da adição, ao  $\alpha$ -TCP, de soluções aquosas de SF. Os materiais obtidos foram caracterizados por difração de raios-X, espectroscopia de infravermelho e caracterizados quanto à sua resistência à compressão, tenacidade à fratura e microestrutura. As análises demonstraram que a adição de SF induziu a transformação total do  $\alpha$ -TCP em CDHA, além do aumento substancial das propriedades mecânicas. Além disso, a microestrutura obtida passou de uma estrutura de cristais lamelares para uma estrutura de cristais aciculares com maior similaridade ao tecido ósseo. A metodologia de obtenção de cimento de fosfato de cálcio reforçado com SF se mostrou eficaz na obtenção de estruturas biomiméticas com propriedades mecânicas superiores e com alta aplicabilidade na regeneração do tecido ósseo. Entretanto, as propriedades mecânicas apresentadas ainda não são suficientes para aplicações ortopédicas em locais de alta sollicitação compressiva.

Palavras-chave: biomateriais; cimento de fosfato de cálcio; alfa-TCP; fibroína de seda.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da estrutura óssea sob escala macro, micro, nano e sub-nanométrica.....	5
Figura 2: Exemplos de aplicações de biomateriais. ....	10
Figura 3: Aplicações clínicas de biocerâmicas. ....	12
Figura 4: Representação esquemática da estrutura do $\alpha$ -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]. .....	15
Figura 5: Representação esquemática da estrutura da fibroína de seda. ....	20
Figura 6: Esquema das possibilidades de interação entre organismo e implante. ....	22
Figura 7: Fluxograma das etapas de desenvolvimento do trabalho. ....	23
Figura 8: Geometria das amostras para os ensaios de resistência à compressão. ....	29
Figura 9: Geometria das amostras para os ensaios de tenacidade à fratura. ....	30
Figura 10: Configuração do modo de flexão 4 pontos utilizado no ensaio de tenacidade à fratura. ....	30
Figura 11: Difratoograma de raios-X do $\alpha$ -TCP após calcinação à 1350°C .....	32
Figura 12: Espectro de FTIR do $\alpha$ -TCP sintetizado.....	33
Figura 13: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das fibras de seda (a) antes e (b) após o processo de degomagem.....	34
Figura 14: Espectro de FTIR da fibroína de seda após o processo de degomagem.....	35
Figura 15: Difratoograma de raios-X das amostras de cimento de fosfato de cálcio (a) puro, com adição de (b) 0,250%, (c) 0,375%, (d) 0,500%, (e) 0,625%, (f) 0,750%, (g) 0,875% e (h) 1,000% de fibroína de seda após 5 dias em câmara úmida. ....	36
Figura 16: Espectros de FTIR das amostras de cimento de fosfato de cálcio (a) puro, com adição de (b) 0,250%, (c) 0,375%, (d) 0,500%, (e) 0,625%, (f) 0,750%, (g) 0,875% e (h) 1,000% de fibroína de seda após 5 dias em câmara úmida.....	38
Figura 17: Resistência à compressão das amostras de cimento de fosfato de cálcio com diferentes concentrações de fibroína de seda.....	39
Figura 18: Tenacidade à fratura das amostras de cimento de fosfato de cálcio com diferentes concentrações de fibroína de seda.....	41

Figura 19: Imagens de microscopia eletrônica de varredura com magnificação de 5000x para as variantes de teste de (a) cimento de fosfato de cálcio puro, com adição de (b) 0,250%, (c) 0,375%, (d) 0,500%, (e) 0,655%, (f) 0,750%, (g) 0,875% e (h) 1,000% de fibroína de seda.....42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades mecânicas de diferentes ossos e estruturas ósseas. ....	5
Tabela 2: Parâmetros de rede das estruturas polimórficas do Fosfato Tricálcico. ....	16
Tabela 3: Parâmetros utilizados na síntese de $\alpha$ -TCP por via úmida. ....	24
Tabela 4: Nomenclatura e porcentagens mássicas de fibroína de seda em cada variante de teste. ....	26

## LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

$a$  – comprimento do entalhe no corpo de prova de tenacidade à fratura

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

Ala – alanina

ASTM – American Society for Testing and Materials

B – espessura do corpo de prova de tenacidade à fratura

Bis-GMA – bisfenol-A glicidil metacrilato

C - carbono

$\text{Ca}^{2+}$  - íon cálcio

$\text{CaCl}_2$  – cloreto de cálcio

$\text{CaCO}_3$  – carbonato de cálcio

$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – fosfato de cálcio dibásico

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  – nitrato de cálcio

CaP – fosfato de cálcio

Ca/P – razão molar entre átomos de cálcio e fósforo

CDHA – hidroxiapatita deficiente em cálcio

CF – fibra de carbono

CPC – cimento de fosfato de cálcio

Col-I – colágeno tipo I

$\text{CO}_3^{2-}$  - íon carbonato

C=O – ligação dupla entre carbono e oxigênio

-COOH – grupo funcional carboxila

DCPD – fosfato de cálcio dihidratado

DRX – difração de raios-X

DSC – calorimetria exploratória diferencial

EtOH – álcool etílico / etanol

F – força aplicada

FTIR – espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

GF – fibra de vidro  
Gly – glicina  
HAp – hidroxiapatita  
HDPE – polietileno de alta densidade  
HIF-1 $\alpha$  – fator induzido por hipóxia 1 $\alpha$   
H<sub>2</sub>O – água  
ICSD – Inorganic Crystal Structure Database  
JCPDS – Joint Committee on Powder Diffraction Standards  
KF – fibra de kenaf  
K<sub>IC</sub> – tenacidade à fratura  
LCP – polímero de cristal líquido  
L/P – razão líquido-pó  
MEV – microscopia eletrônica de varredura  
Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – carbonato de sódio  
N-H – ligação entre nitrogênio e hidrogênio  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – hidrogenofosfato de amônio  
NH<sub>4</sub>OH – hidróxido de amônio  
O-C-N – ligação entre oxigênio, carbono e nitrogênio  
-OH – grupo funcional hidroxila  
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)

PMA – poli(metilacrilato)

PMMA – poli(metilmetacrilato)

PP - polipropileno

OS - poliestireno

PTFE - politetrafluoroetileno

$\text{PO}_4^{3-}$  - íon fosfato

PU - poliuretano

S – distância entre os apoios do ensaio de tenacidade à fratura

Ser – serina

SiC – carbeto de silício

SF – fibroína de seda

Tyr – tirosina

TTCP – fosfato de cálcio tetracálcico

UHMWPE – polietileno de ultra alto peso molecular

W – altura do corpo de prova de tenacidade à fratura

$\alpha$ -TCP – fase alfa do fosfato tricálcico

$\alpha'$ -TCP – fase alfa' do fosfato tricálcico

$\beta$ -TCO – fase beta do fosfato tricálcico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	3
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
3.1	TECIDO ÓSSEO .....	4
3.1.1	<b>Regeneração Óssea</b> .....	<b>6</b>
3.2	BIOMATERIAIS.....	7
3.2.1	<b>Biomateriais cerâmicos</b> .....	<b>11</b>
3.2.1.1	Cimentos de Fosfato de Cálcio .....	13
3.2.1.2	$\alpha$ -Fosfato Tricálcico.....	14
3.2.2	<b>Biomateriais poliméricos</b> .....	<b>17</b>
3.2.2.1	Fibroína de Seda.....	18
3.2	INTERAÇÃO DO BIOMATERIAL COM O CORPO .....	21
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
4.1	SÍNTESE DO $\alpha$ -FOSFATO TRICÁLCICO.....	24
4.2	OBTENÇÃO DA SOLUÇÃO DE FIBROÍNA DE SEDA .....	25
4.2.1	<b>Degomagem da seda</b> .....	<b>25</b>
4.2.2	<b>Dissolução da fibroína de seda</b> .....	<b>25</b>
4.3	PREPARAÇÃO DO CIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO.....	26
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS .....	27
4.4.1	<b>Caracterização do <math>\alpha</math>-TCP</b> .....	<b>27</b>
4.4.1.1	Difração de Raios-X .....	27
4.4.2	<b>Caracterização da Fibroína de Seda</b> .....	<b>27</b>

4.4.2.1	Microscopia Eletrônica de Varredura .....	27
4.4.2.2	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier .....	27
<b>4.4.3</b>	<b>Caracterização das amostras de cimento de fosfato de cálcio.....</b>	<b>28</b>
4.4.3.1	Difração de Raios-X.....	28
4.4.3.2	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier .....	28
4.4.3.3	Resistência à Compressão .....	28
4.4.3.4	Tenacidade à Fratura.....	29
4.4.3.5	Microscopia Eletrônica de Varredura .....	31
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>32</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO $\alpha$ -TCP.....	32
5.1.1	Difração de Raios-X.....	32
5.1.2	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier .....	33
5.2	CARACTERIZAÇÃO DA FIBROÍNA DE SEDA.....	34
5.2.1	Caracterização da degomagem da seda .....	34
5.2.2	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier .....	34
5.3	CARACTERIZAÇÃO DO CIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO .....	36
5.3.1	Difração de Raios-X.....	36
5.3.2	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier .....	37
5.3.3	Resistência à Compressão.....	39
5.3.4	Tenacidade à Fratura .....	40
5.3.5	Microscopia Eletrônica de Varredura .....	41
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>46</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>47</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, defeitos ósseos se tornaram cada vez mais comuns, afetando grande parte da população mundial. Estes abrangem problemas oriundos de tumores, traumas, malformação congênita e, inclusive, do envelhecimento da população, e impactam substancialmente a qualidade de vida dos afetados (Mobika *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Atualmente, o principal tratamento para a regeneração ou substituição deste tecido consiste, principalmente, em enxertos ósseos naturais ou sintéticos. Entretanto, os procedimentos atuais são ineficazes no suprimento da demanda crescente de tratamentos mais eficientes, devido à baixa funcionalidade biológica de enxertos sintéticos e a fonte limitada e alta incidência de rejeição de enxertos naturais (Han *et al.*, 2019). Desta forma, a demanda pelo desenvolvimento de tecnologias biologicamente funcionais, que consigam suprir a necessidade de implantes e que sejam de fácil aplicação para o tratamento de defeitos ósseos se torna cada vez mais evidente.

De forma a evitar estas adversidades, o desenvolvimento de cimentos de fosfato de cálcio (CPC) aumentou significativamente. Isso se deve, principalmente, à similaridade química com a fase inorgânica óssea, garantindo a esses materiais ótimas propriedades biológicas, como bioabsortividade, bioatividade e biocompatibilidade, além de permitir a formação de uma pasta maleável que pode ser utilizada em procedimentos minimamente invasivos (Valle *et al.*, 2007).

Cimentos baseados na fase  $\alpha$  do fosfato tricálcico ( $\alpha$ -TCP) são rigorosamente pesquisados, pois, além de possuir as propriedades gerais dos CPCs, este material, ao ser hidratado, reage formando hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA), que provém o material com osteocondutividade e forma uma rede de cristais aciculares entrelaçados, que aumentam a resistência do cimento (Vásquez *et al.*, 2017). Contudo, os cimentos baseados em  $\alpha$ -TCP não apresentam propriedades mecânicas apropriadas para a maioria das aplicações ortopédicas, obtendo, no melhor dos casos, valores de resistência similares aos do osso trabecular, o que permite sua utilização somente em aplicações de baixas solicitações, como a regeneração de defeitos bucomaxilofaciais (Liu *et al.*, 2013).

Diversas tentativas de aumento das propriedades do cimento de fosfato de cálcio foram realizadas, incluindo a adição de diversos polímeros sintéticos e naturais. Entretanto, a utilização de polímeros sintéticos bioabsorvíveis está comumente associada a reações inflamatórias devido à acidez dos produtos da absorção destes materiais (Cao *et al.*, 2014). Os estudos têm focado, então, na utilização de polímeros naturais, incluindo proteínas e polissacarídeos, já que estes induzem mínima reação inflamatória de corpo estranho e apresentam propriedades úteis com relação à versatilidade, biocompatibilidade, funcionalização e bioabsorção (Farokhi *et al.*, 2019).

Um dos polímeros naturais mais promissores em aplicações de regeneração do tecido ósseo é a fibroína de seda (SF), que apresenta ótimas propriedades mecânicas, ótima biocompatibilidade, bioabsortividade controlada e possibilidade de obtenção nos mais variados formatos, como filmes, fibras e hidrogéis (Zhengshi *et al.*, 2018). Além disso, diversos estudos demonstraram que os grupos funcionais -COOH e -OH presentes na estrutura da SF podem reagir com os íons  $\text{Ca}^{2+}$  dos fosfatos de cálcio, formando locais de nucleação para o crescimento de hidroxiapatita (HAp) e regulando seu crescimento no eixo *c* da estrutura cristalina, de forma análoga ao colágeno tipo I presente no tecido ósseo (Hu *et al.*, 2018). Desta forma, a adição desta fase polimérica ao cimento de fosfato de cálcio poderá resultar em uma estrutura biomimética, com microestrutura similar à apresentada pelo osso. A obtenção de uma estrutura biomimética é de extrema importância na regeneração tecidual, pois estas estruturas a compatibilidade molecular, estrutural e biológica com as células do tecido a ser regenerado, facilitando este processo (Fernandez-Yague *et al.*, 2015).

Assim, este trabalho pretende desenvolver um cimento de fosfato de cálcio biomimético baseado em  $\alpha$ -TCP e reforçado com fibroína de seda, de forma a se obter um material biomimético com propriedades mecânicas mais adequadas a aplicações ortopédicas e de morfologia e composição similar à do tecido ósseo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Obtenção de cimento de fosfato de cálcio baseado em  $\alpha$ -fosfato tricálcico reforçado com fibroína de seda, de forma a se alcançar uma estrutura biomimética com propriedades mecânicas adequadas a aplicações ortopédicas.

### 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) Caracterizar o cimento obtido com técnicas físico-químicas;
- (iii) Avaliar alterações microestruturais e propriedades mecânicas do cimento de fosfato de cálcio decorrentes da adição de diferentes concentrações de fibroína de seda;
- (iv) 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 osso é uma estrutura hierárquica única, que garante suporte ao corpo e proteção aos órgãos internos, enquanto regula o estoque de minerais e o pH sanguíneo, participando ativamente na geração de células sanguíneas e na manutenção da homeostase (Farokhi *et al.*, 2016). De forma geral, os ossos podem ser classificados em duas classes de acordo com sua estrutura: osso cortical e osso trabecular, que representam, respectivamente, a estrutura externa e interna do osso.

O osso cortical constitui cerca de 80% do esqueleto ósseo. Este é rígido e compacto, apresentando porosidade de 5-10%, e possui em sua estrutura vasos sanguíneos e osteócitos (MacIntosh *et al.*, 2008; Fernandez-Yague *et al.*, 2015). Nesta estrutura, os vasos sanguíneos se encontram em estruturas cilíndricas microscópicas denominadas canais de Harvers, as quais são conectadas transversalmente por canais de Volkmann (Suchanek e Yoshimura, 1998; Wu *et al.*, 2014). Já os osteócitos se encontram em estruturas compactas denominadas de sistemas de Harvers ou ósteons, os quais formam lamelas ósseas concêntricas a um canal de Harvers.

O osso trabecular, entretanto, apresenta porosidade de cerca de 50-95% e possui em sua estrutura 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 contendo medula óssea e trabéculas, filamentos de tecido ósseo cruzados através da cavidade. A organização dos trabéculas pode parecer aleatória, porém esta é extremamente precisa, promovendo máxima resistência a esta estrutura.

O tecido ósseo possui em sua composição uma fase orgânica fibrosa e nanocristais inorgânicos, além de ser constituído de 10-20% de água. O colágeno tipo I (Col-I) representa 90-95% da fase orgânica óssea, juntamente com osteocalcina, osteonectina, osteopontina, e outras proteínas e proteoglicanos (Roach, 1994; Holzwarth e Ma, 2011; Wang *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2014). Estas fibras de colágeno são

responsáveis pela resistência à tração e tenacidade à fratura do osso, e servem como substrato para o crescimento de nanocristais que constituem a fase inorgânica óssea. (Shi, Kirk e Kahn, 1996; Jang, Castano e Kim, 2009). Já a fase inorgânica do osso possui aproximadamente 70% de sua massa formada por hidroxiapatita (HAp), também sendo constituída por carbonatos e sais de magnésio e sódio. A HAp é responsável pela promoção da fosfatase alcalina óssea, processo que garante a resistência à compressão e a rigidez única do osso (Swetha *et al.*, 2010). A partir do entendimento desta estrutura, podemos tratar osso como um compósito de ocorrência biológica.

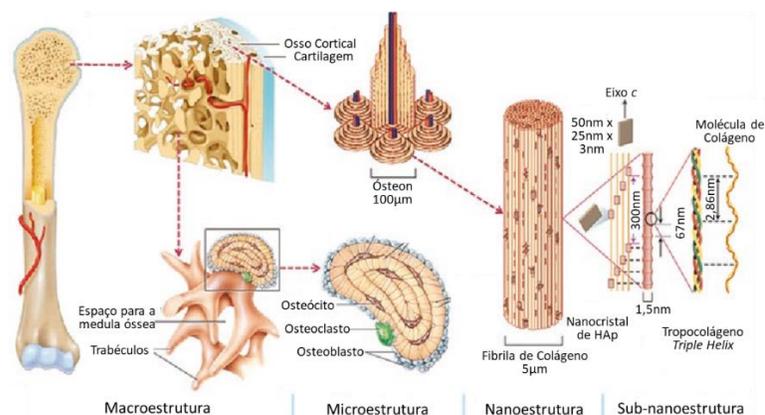


Figura 1: Representação esquemática da estrutura óssea sob escala macro, micro, nano e sub-nanométrica.

Fonte: Adaptado de (Hasirci e Hasirci, 2018)

Os valores das propriedades mecânicas dos diferentes ossos e estruturas ósseas estão representados na Tabela 1.

Tabela 1: Propriedades mecânicas de diferentes ossos e estruturas ósseas.

Osso humano	Resistência à Compressão (MPa)	Módulo de Elasticidade (GPa)	Tenacidade à Fratura, $K_{Ic}$ (MPa. m <sup>1/2</sup> )
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, Hasirci e Hasirci, 2018)

### 3.1.1 Regeneração Óssea

A capacidade de regeneração e remodelamento apresentada pelas estruturas ósseas pós-natais é admirável e esta é induzida por estímulos mecânicos ou danos ao tecido, somente ocorrendo quando uma série de processos sequenciais é atendida (Al-Aql *et al.*, 2008; Stace *et al.*, 2016). A maior consequência de traumas ósseos se deve ao rompimento de vasos sanguíneos, o que causa uma diminuição do suprimento de oxigênio, necrose aguda e hipóxia na região adjacente à lesão (Hankenson *et al.*, 2011). De forma geral, podemos dividir os processos de regeneração óssea em dois mecanismos principais: ossificação endocondral e ossificação intramembranosa.

A ossificação endocondral é o mecanismo de ocorrência mais comum e é de extrema importância para a formação de ossos longos, como o fêmur e o úmero, e de diversos ossos irregulares pequenos, como as costelas (Gilbert, 2000; Hu *et al.*, 2005). Esta ossificação é induzida pela ação dos condrócitos, os quais se diferenciam em osteoblastos e formam uma região hipertrófica durante o desenvolvimento de ossos endocondrais. A ossificação endocondral apresenta 4 etapas: a resposta inflamatória, formação cartilaginosa, substituição do osso primário por cartilagem e formação e remodelamento do osso secundário (Phillips, 2005; Al-Aql *et al.*, 2008). Primeiramente, a interação entre plaquetas e as fibras de colágeno expostas no subendotélio dos vasos sanguíneos gera um hematoma em poucas horas após a fratura. Após esta formação, a secreção de certas citocinas atrai células inflamatórias e células-tronco mesenquimais (MSCs) (Lauzon *et al.*, 2012), e, então, o fator induzido por hipóxia  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ) é expresso devido aos baixos níveis de oxigênio e este aprimora a regeneração óssea e a angiogênese (Wan *et al.*, 2008). Os novos vasos sanguíneos são responsáveis pelo transporte de MSCs ao local da lesão, as quais irão se diferenciar em condrócitos durante a fase inflamatória. Estes irão, então, se proliferar e formar uma nova estrutura cartilaginosa (Lauzon *et al.*, 2012). O crescimento vascular é seguido da formação da matriz de colágeno, secreção osteoide e calcificação do tecido cartilaginoso. Finalmente, o remodelamento ósseo irá ocorrer por vários meses, no qual o novo osso será modelado para sua forma original.

Já a ossificação intramembranosa ocorre principalmente durante o desenvolvimento inicial de ossos planos, como os ossos do crânio, mandíbula e clavículas, além de auxiliar na regeneração de fraturas. Neste processo, algumas MSCs se diferenciam em vasos capilares, enquanto outras se diferenciam em osteoblastos com a 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 médicas remonta há milhares de anos e teve enorme impacto no tratamento de lesões e doenças. Ao longo da história, materiais naturais, como madeira e ossos, e alguns metais foram testados para tratar diversos traumatismos; entretanto, somente após a introdução das técnicas de assepsia cirúrgica pelo médico e cirurgião Joseph Lister na década de 1860, o desenvolvimento de biomateriais se tornou expressivamente significativo. Através do aumento da nossa compreensão sobre as estruturas teciduais, doenças e biologia desenvolvimentista, as expectativas com relação à interação do biomaterial com o organismo têm evoluído. Inicialmente, o desenvolvimento destes materiais era concentrado em se obter a maior inércia possível em sua interação com o tecido; hodiernamente, no entanto, grande parte dos estudos focam na obtenção de biomateriais capazes de provocar determinadas reações no organismo, como a estimulação da regeneração tecidual (Williams, 2009; Kuhn, 2011; Hudecki *et al.*, 2018).

O termo “biomaterial” já foi utilizado para descrever diversos materiais com relação a suas aplicações e, por isso, não se há um consenso sobre uma definição única para essa palavra, possuindo tanto definições amplas quanto definições mais restritas. Park e Lakes (2007) definem o termo “biomaterial” como *qualquer material utilizado para elaborar dispositivos para substituir uma parte ou função do corpo de maneira segura, confiável, econômica e fisiologicamente aceitável* (Park e Lakes, 2007). No entanto, o

desenvolvimento de novas tecnologias na área da saúde, como os sistemas de liberação de fármacos e genes, a engenharia de tecidos e a terapia celular, têm expandido e inovado as aplicações dos biomateriais, exigindo definições mais coerentes a estas novas aplicações.

Em 2009, Williams propôs uma definição mais abrangente para o termo, de forma a considerar estas novas tecnologias e desenvolvimentos, incluindo materiais e substâncias projetadas para exercer funções no cuidado da saúde e de desempenho controlado por sua interação com o organismo. Williams potencializa a ideia de que o termo biomaterial deve estar relacionado à área da saúde e que o material classificado com 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 inúmeras diferenças entre as definições específicas adotadas por diferentes autores, todas assumem como requisito básico de um biomaterial a biocompatibilidade. 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, *et al.*, 2018).

Os biomateriais podem ser classificados de acordo com a resposta fisiológica que provocam nos tecidos adjacentes aos implantes. Hench e Wilson (2013) propõe esta classificação em 4 categorias: tóxicos, quase inertes, bioativos e reabsorvíveis (Elshahawy, 2011).

### Tóxicos:

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

### Biotoleráveis:

Materiais apenas tolerados pelo organismo, sem causar reações tóxicas a este, mas provocando 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 utilizados como biomaterial.

### Bioinertes:

Materiais que provocam a formação de mínima camada de tecido fibroso no entorno do implante, sendo uma camada praticamente inexistente. O material libera alguns tipos de componentes em quantidades mínimas, apresentando baixa e passageira resposta fagocítica. Essa categoria engloba a alumina, a zircônia, o carbono e as ligas de titânio.

### Bioativos:

Materiais que provocam a formação de ligações químicas com o tecido adjacente ao implante e/ou a regeneração deste tecido. Esta ligação imita a interface formada durante a regeneração tecidual e garante uma boa fixação do implante, prevenindo a 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 reabsorvidos pelo organismo e são substituídos pelo tecido adjacente. Um biomaterial desta categoria não pode apresentar produtos de degradação que provoquem danos ao organismo e devem apresentar a possibilidade de serem degradados pelos fluidos corporais ou ser digerido por macrófagos.

Além das considerações fisiológicas, é de extrema importância considerar as solicitações mecânicas que serão aplicadas aos biomateriais implantados. Essas solicitações contribuem para a falha de implantes e deverão ser consideradas para cada aplicação, já que o material implantado deve apresentar propriedades mecânicas compatíveis com os esforços aplicados no local de implantação, especialmente em casos de implantes de longa vida útil.

Alguns exemplos de biomateriais e suas respectivas aplicações no corpo humano estão representados na Figura 2.

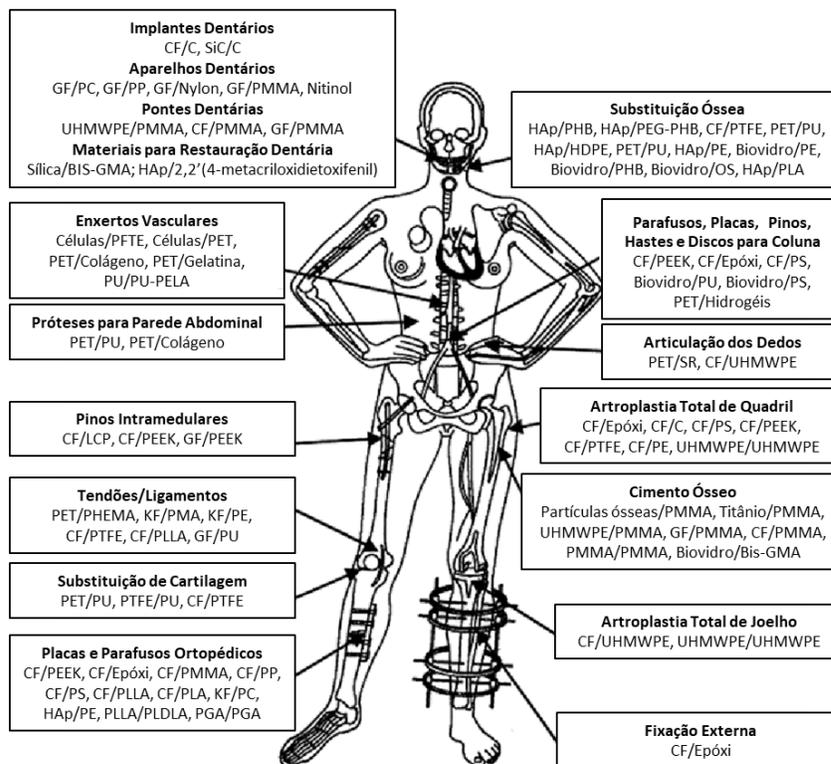


Figura 2: Exemplos de aplicações de biomateriais.

Fonte: Adaptado de (Hasirci e Hasirci., 2018)

### 3.2.1 Biomateriais cerâmicos

Os materiais cerâmicos foram utilizados como biomateriais, inicialmente, devido à sua inércia, de forma que, ao serem aplicados, estes materiais provocassem mínima ou nenhuma reação do tecido. Entretanto, com o aumento do conhecimento na área, o desenvolvimento de biomateriais cerâmicos passou a focar em materiais capazes de provocar reações específicas no organismo, induzindo a regeneração tecidual e a ligação interfacial entre o material e os tecidos adjacentes. Assim, as cerâmicas bioativas passaram a ganhar mais espaço nesta área (Loureiro dos Santos, 2002).

As cerâmicas apresentam diversas vantagens para aplicação como biomateriais, como sua biocompatibilidade e alta resistência ao desgaste e à compressão, e podem ser utilizados em diversas fases, dependendo da aplicação desejada. As biocerâmicas podem ser aplicadas como monocristais, policristais, vidros, vitrocerâmicas ou compósitos e podem atuar com a função de substituição ou regeneração de tecido ósseo, preenchimento de cavidades, aplicações odontológicas ou como recobrimento de implantes, de forma a promover a ligação interfacial entre tecido e implante (Kuhn, 2011; Hench e Wilson, 2013).

Em casos em que o material cerâmico é utilizado como material de implante, a fixação destes ao tecido adjacente pode ocorrer de diferentes formas. A classificação desta pode ser resumida nas seguintes classes: fixação morfológica, fixação biológica, fixação bioativa e fixação de implantes bioabsorvíveis (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, não permitindo a existência de espaços para a movimentação da prótese. Próteses de  $Al_2O_3$  mono ou policristalina são exemplos de biocerâmicas 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 um travamento mecânico da prótese.

Alguns exemplos desta fixação seriam as aplicações de implantes de alumina policristalina ou de implantes metálicos com recobrimento de hidroxiapatita.

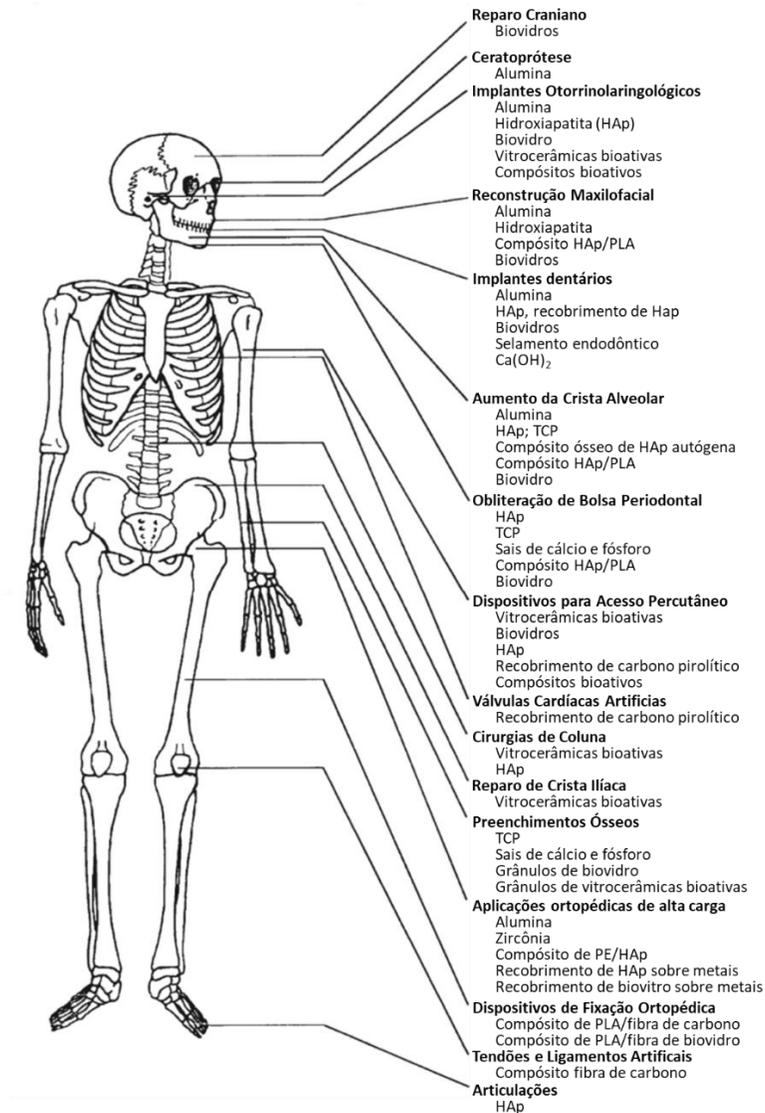


Figura 3: Aplicações clínicas de biocerâmicas.

Fonte: Adaptado de (Hench e Wilson, 2013).

### Fixação bioativa

Implantes de cerâmicas com superfície reativa que se fixam diretamente ao tecido ósseo através da formação de ligação química com o tecido. Esta fixação ocorre na aplicação de biovidros, vidrocerâmicas, cerâmicas funcionalizadas e hidroxiapatitas.

### Fixação de implantes bioabsorvíveis

Implantes são fixados brevemente ao tecido, já que estes são projetados a apresentar lenta absorção ao organismo, sendo substituídos pelo tecido original em que está implantado. Sulfato de cálcio e diversos fosfatos de cálcio estão presentes nesta classe de fixação.

Alguns exemplos de aplicações clínicas frequentes de materiais cerâmicos estão representados na Figura 3.

#### 3.2.1.1 Cimentos de Fosfato de Cálcio

Inicialmente sugeridos como possíveis materiais para a restauração dentária por LeGeros (LeGeros, Chohayeb e Schulman, 1982) e primeiramente desenvolvidos com sucesso por Brown e Chow (Brown e Chow, 1983), os Cimentos de Fosfato de Cálcio são, atualmente, um dos mais promissores materiais para substituição e preenchimento ósseo (Zhang *et al.*, 2014; Feng *et al.*, 2020). Estes materiais atraem crescente interesse devido à sua excelente biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade, além de possuírem fácil manuseio, alta moldabilidade e apresentarem produtos de composição similar à matriz mineral óssea ao passarem por seu processo de cura (Liu *et al.*, 2013).

De forma ampla, os Cimentos de Fosfato de Cálcio, podem ser descritos como cimentos hidráulicos, que são formados através da mistura de um ou mais ortofosfatos de cálcio com uma fase líquida, de forma a se obter uma pasta com a habilidade de passar pelo processo de cura e endurecer após ser aplicada no organismo (Ginebra *et al.*, 2010).

O cimento desenvolvido por Brown e Chow (1983), consistia de uma mistura entre fosfato tetracálcico (TTCP) e fosfato de cálcio dihidratado (DCPD), entretanto, diversos outros sistemas foram desenvolvidos desde então, e pode-se realizar a classificação destes nas seguintes categorias (Jansen *et al.*, 2005):

1. Cimentos obtidos de um ou mais compostos de fosfato de cálcio (CaP) sob mistura com água ou com uma solução contendo cálcio ou fósforo. O endurecimento é obtido através da formação de um ou mais fosfatos de cálcio no cimento.

2. Cimentos obtidos através da mistura de CaP's com fase líquida de algum ácido orgânico. O endurecimento ocorre através da formação de complexos entre o cálcio e o ácido orgânico.
3. Cimentos similares aos descritos no item 2, entretanto a fase líquida utilizada consiste na utilização de uma solução polimérica e o endurecimento ocorre através da formação de HAp ou de complexos de cálcio e polímero.
4. Cimentos que são compósitos entre CaP e polímeros. Neste caso, o fosfato de cálcio atua como o reforço do compósito e não apresenta papel significativo no endurecimento do cimento.

O endurecimento do material ocorre, principalmente, através da dissolução do CaP utilizado e da posterior precipitação de cristais entrelaçados, os quais atuam aumentando a resistência mecânica do CPC e apresentam alta área superficial e microestrutura particular (Liu *et al.*, 2013; O'Neill *et al.*, 2017). Esta reação de cura não é exotérmica e não libera substâncias tóxicas ao organismo, o que representa vantagens sobre a utilização de poli(metilmetacrilato) (PMMA), atualmente muito utilizado como cimento ósseo em cirurgias ortopédicas (He *et al.*, 2015; Lodoso-Torrecilla *et al.*, 2021).

A similaridade química desses materiais provém justamente deste processo de cura. Tanto a formação óssea, quanto o endurecimento dos CPC's ocorrem através da precipitação de CaP em soluções aquosas e sob temperatura fisiológica, desta forma, a composição química e a microestrutura obtidas podem ser trabalhadas para apresentar semelhança íntima com a hidroxiapatita biológica.

Entretanto, as propriedades mecânicas destes cimentos não são adequadas para a aplicação ortopédica em sistemas de alta sollicitação, somente sendo utilizado em aplicações bucomaxilofaciais (Canal e Ginebra, 2011; Cao *et al.*, 2014).

#### 3.2.1.2 $\alpha$ -Fosfato Tricálcico

O Fosfato Tricálcico apresenta 3 formas alotrópicas: a fase de baixa temperatura,  $\beta$ -TCP, e as fases de alta temperatura  $\alpha$ - e  $\alpha'$ -TCP, entretanto, a fase  $\alpha'$  somente existe a temperaturas superiores à 1430°C e, abaixo desta, se reverte quase instantaneamente

a sua fase  $\alpha$  (Carrodegua e De Aza, 2011). Desta forma, as fases significativas em aplicações de baixa temperatura são as fases  $\alpha$ -TCP e  $\beta$ -TCP. Apesar de terem a mesma composição química, estas fases se diferenciam significativamente em sua estrutura cristalina, densidade e solubilidade, fatores que determinam suas propriedades biológicas e aplicações clínicas. O  $\alpha$ -TCP é consideravelmente mais solúvel que sua fase  $\beta$ , por exemplo, o que permite que este apresente tempos de cura mais apropriados para aplicações clínicas (Gbureck *et al.*, 2005).

A estrutura do  $\alpha$ -TCP foi primeiramente descrita por Dickens e Brown em 1972 como sendo similar à estrutura da glaserita [ $K_3Na(SO_4)_2$ ] (Dickens and Brown, 1972) e, posteriormente, esta foi mais detalhadamente estudada por Mathew (Mathew *et al.*, 1977) e por Yashima e Sakai (Yashima e Sakai, 2003). Esta fase apresenta uma estrutura monoclinica em que íons de  $Ca^{2+}$  e  $PO_4^{3-}$  são empacotados em colunas ao longo da direção  $[0\ 0\ 1]$  da estrutura cristalina em colunas denominadas de C-C e C-A. As colunas C-C apresentam somente cátions de  $Ca^{2+}$  e são envoltas por 6 colunas C-A, as quais apresentam tanto cátions de  $Ca^{2+}$  quanto ânions  $PO_4^{3-}$ , conforme pode-se observar na Figura 4. Os parâmetros da rede cristalina do  $\alpha$ -TCP, assim como do  $\beta$ - e  $\alpha'$ -TCP, se encontram na Tabela 2.

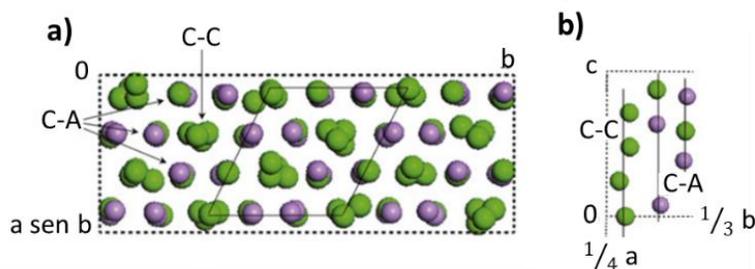


Figura 4: Representação esquemática da estrutura do  $\alpha$ -TCP. Projeção (a) de vista superior da célula unitária ao longo da direção  $[0\ 0\ 1]$  e (b) projeção fracional das células unitárias no plano bc, evidenciando a disposição dos átomos ao longo da direção  $[0\ 0\ 1]$ . Átomos  $Ca^{2+}$  em verde e  $P^{5+}$  em roxo. Íons  $O^{2-}$  não foram representados para uma melhor clareza da estrutura.

Fonte: Adaptado de (Carrodegua e De Aza, 2011)

A utilização deste material como cimentos de fosfato de cálcio foi impulsionada pela ótima reação de endurecimento que o  $\alpha$ -TCP apresenta. Esta foi primeiramente

descrita por Monma e Kanazawa em 1976 (Monma e Kanazawa, 1976), entretanto a primeira formulação contendo quantidade substancial de  $\alpha$ -TCP com tempo de cura aceitável para aplicação clínica foi descrita por Ginebra e colaboradores em 1994 (Ginebra *et al.*, 1994). A reação de endurecimento do  $\alpha$ -TCP ocorre através de sua solubilização e reprecipitação como hidroxiapatita deficiente em cálcio [ $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_5(\text{HPO}_4)\text{OH}$ , CDHA], conforme a reação na equação (1).



Os cimentos de fosfato de cálcio baseados em  $\alpha$ -TCP apresentam ótima biocompatibilidade, bioatividade, bioabsortividade e osteocondução, ou seja, além de ser compatível com o organismo, este material forma ligação química com o tecido ósseo e estimula o crescimento e diferenciação de células ósseas.

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

Propriedade	Forma alotrópica de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$		
	$\beta$ -TCP	$\alpha$ -TCP	$\alpha'$ -TCP
Simetria	Romboédrica	Monoclínica	Hexagonal
Grupo espacial	R3C	$P2_1/a$	$P6_3/mmc$
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)
$\alpha$ (°)	90	90	90
$\beta$ (°)	90	126,35(1)	90
$\gamma$ (°)	120	90	120
D	3,066	2,866	2,702

Fonte: Adaptado de (Carrodegas e De Aza, 2011).

Como o  $\alpha$ -TCP é metaestável à temperatura ambiente, somente sendo estável entre 1115 e 1465°C (Carrodegas *et al.*, 2008), não é possível realizar sua síntese por precipitação de soluções aquosas e, para sua obtenção, é necessária a realização de reações em estado sólido sob altas temperaturas à partir de precursores de cálcio e fósforo em relação Ca/P de aproximadamente 1,5 (Fathi *et al.*, 2015). Assim, existem duas metodologias principais empregadas na síntese de  $\alpha$ -TCP: síntese por via úmida e síntese de por via seca.

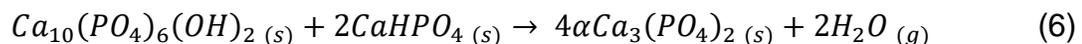
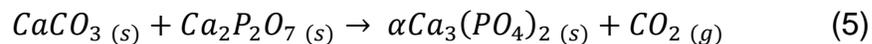
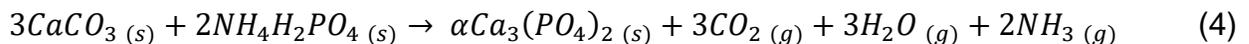
### Via úmida:

A síntese por via úmida consiste na precipitação em solução aquosa de hidroxiapatita deficiente de cálcio (CDHA, Ca/P=1,5) e sua posterior transformação térmica em  $\alpha$ -TCP. Esta segue o a reação apresentada na equação (2).



### Via seca:

A síntese por via seca consiste na reação de estado sólido entre os precursores de  $\alpha$ -TCP. Esta é a síntese mais reportada na literatura e as reações mais empregadas estão descritas nas equações (3), (4), (5) e (6) (Carrodegua e De Aza, 2011). Após a homogeneização dos precursores, estes são tratados termicamente acima da temperatura de transformação, geralmente entre 1250 e 1500°C.



## **3.2.2 Biomateriais poliméricos**

A utilização de biomateriais poliméricos tem sido impulsionada cada vez mais com o passar dos anos, pois estes apresentam diversidade de composições, grande diversidade de materiais e grande variedade de propriedades, as quais podem ser adequadas à aplicação desejada. Além disso, estes se assemelham aos materiais de ocorrência natural no organismo, como as matrizes extracelulares, e podem ser obtidos em formas complexas através de diversos métodos de fabricação.

Polímeros sintéticos apresentam diversas vantagens sobre os naturais, como a reprodutibilidade das suas propriedades e a possibilidade de serem sintetizados em grande escala (Loureiro dos Santos, 2017). Entretanto, a variedade de maior interesse

dos pesquisadores para aplicação biomédica é, atualmente, a dos polímeros naturais, como proteínas e polissacarídeos. Este interesse é promovido, principalmente, pela grande semelhança dos polímeros naturais com os tecidos presentes no organismo, o que promove ótima biocompatibilidade nestes materiais. (Kuhn, 2011). Além disso, polímeros naturais apresentam menor incidência de toxicidade e inflamação quando comparados a materiais sintéticos e apresentam custo relativamente baixo, o que faz com que estes sejam de grande interesse em setores de alto valor, como o setor farmacêutico e biomédico. (Smith, Moxon e Morris, 2016).

### 3.2.2.1 Fibroína de Seda

A seda tem sido utilizada como biomaterial para o tratamento de ferimentos há séculos e 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 *Bombix-mori*, a qual apresenta maiores concentrações de aminoácidos básicos (arginina), ácidos (ácido aspártico) e polares (serina) em sua estrutura e permitem uma maior adesão celular (Malafaya, Silva e Reis, 2007; MacIntosh *et al.*, 2008; Melke *et al.*, 2016). Esta é formada, principalmente, por duas proteínas: a sericina (proteína globular) e a fibroína (proteína fibrosa), com estrutura em que 2 fibras de fibroína são envolvidas por uma camada de sericina, conforme a Figura 5. A sericina é uma proteína hidrofílica, solúvel em água e de aspecto glutinoso que constitui 25-30% da massa da seda (Melke *et al.*, 2016a; Bhattacharjee *et al.*, 2017; Qi *et al.*, 2017). Entretanto, diversos estudos apontam que esta é responsável por diversas respostas imunogênicas após sua implantação e, por isso, é necessário que a seda passe por um processo físico-químico denominado de degomagem para a retirada desta proteína (Kaplan *et al.*, 1994, McGrath e Kaplan, 1997, Li *et al.*, 2014). Assim, as aplicações atuais da seda como biomaterial têm como foco a utilização da fibroína de seda.

A fibroína é um polímero semicristalino com estrutura que consiste em uma cadeia hidrofóbica densa (~390 kDa, H) e uma cadeia hidrofílica leve (~26kDa, L), as quais são unidas através de uma ligação dissulfídica, formando um complexo H-L. Uma

glicoproteína P25 (~25kDa) também é ligada ao complexo H-L através de uma ligação não-covalente, de forma a se ter uma proporção 6:6:1 entre a cadeia-H, a cadeia-L e P25. A composição de aminoácidos presentes na fibroína consiste principalmente em Glicina (Gly, 43%), Alanina (Ala, 30%), Serina (Ser, 12%) 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, formando estruturas  $\beta$ -sheet antiparalelas estáveis. Já as cadeias-L são não-repetitivas e, por isso, se tornam relativamente mais elásticas e hidrofílicas (Kundu *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2017; Farokhi *et al.*, 2019).

Estruturalmente, a fibroína 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 a estrutura cristalina pode ser de 3 conformações 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  $\alpha$ -*helix*, pertencendo ao sistema ortorrômbico e podendo ser transformada em Seda II através de tratamentos com metanol e fosfato de potássio. A Seda II é a conformação da fibroína em uma estrutura de  $\beta$ -*sheets* antiparalelas, a qual pertence ao sistema monoclinico, facilita o *crosslink* com proteínas através de ligações de hidrogênio e Van der Waals e contribui para a rigidez e resistência à tração da fibroína. Já a estrutura Seda III, apresenta uma estrutura helicoidal e se forma somente em interfaces água/ar (Wang, Nemoto e Senna, 2004; Vepari e Kaplan, 2007; Morgan *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014; Mottaghitlab *et al.*, 2015; Volkov, Ferreira e Cavaco-Paulo, 2015; Melke *et al.*, 2016; Farokhi *et al.*, 2019). As estruturas Seda I e Seda II estão representadas na Figura 5.

As propriedades únicas da SF, como bioabsortividade, biocompatibilidade, performance mecânica robusta e baixa resposta imunogênica, fazem com que este polímero seja amplamente discutido e pesquisado como um biomaterial de grande potencial (Farokhi *et al.*, 2018). Este material apresenta biocompatibilidade superior a de polímeros comumente usados em aplicações médicas, como o colágeno e o poli(L-ácido

lático) (PLLA) (Qi *et al.*, 2017) e é adequado para uma grande diversidade de aplicações, como liberação controlada de drogas, regeneração de tecido vascular, tratamentos de feridas epiteliais e *scaffolds* para engenharia de tecido ósseo. Isto se deve à alta facilidade de se obter diferentes nano, micro e macroestruturas de SF através de diferentes tratamentos e processos (Kundu *et al.*, 2013). Além disso, a bioabsortividade desse material pode ser facilmente regulada através da quantidade de  $\beta$ -sheet na estrutura secundária. Desta forma, materiais obtidos através da solubilização da SF em meios orgânicos, os quais apresentam maior teor de  $\beta$ -sheet podem levar um ano ou mais para serem completamente absorvidos *in vivo*, enquanto os obtidos por solubilização em meios aquosos são completamente absorvidos em menos de 6 meses (Kong *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008, 2010; Li *et al.*, 2014).

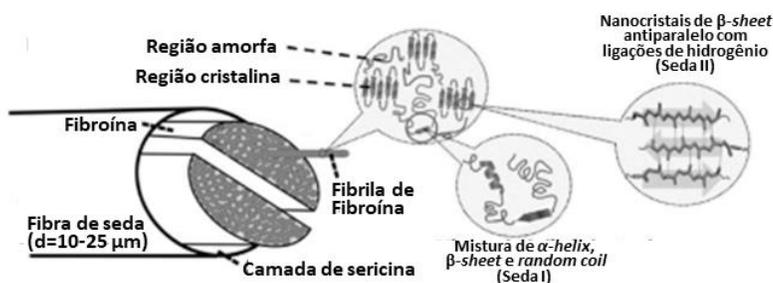


Figura 5: Representação esquemática da estrutura da fibroína de seda.

Fonte: Adaptado de (Qi *et al.*, 2017).

Um grande interesse na área da Regeneração Tecidual Óssea é a alta capacidade da fibroína de guiar o crescimento preferencial de cristais de fosfatos de cálcio ao longo do eixo c da estrutura cristalina destes (Marelli *et al.*, 2012; Bhattacharjee *et al.*, 2017; Mobika *et al.*, 2020). Este crescimento é efetivamente controlado pelo posicionamento e densidade de grupos carboxila e aminoácidos na superfície da fibroína, já que os locais em que estes estão expostos servem como pontos de nucleação para fosfatos de cálcio (Kong *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2014). Isso ocorre, pois a exposição destes grupos aniônicos tende a concentrar íons de cálcio, resultando na supersaturação local e posterior nucleação de cristais. Desta forma, é possível mimetizar a biomineralização óssea, já que fosfatos de cálcio crescem ao longo da direção preferencial instituída pela SF, resultando

em cristais com formato de agulha, os quais se assemelham aos presentes na fase mineral óssea (Li *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2019).

### 3.2 INTERAÇÃO DO BIOMATERIAL COM O CORPO

A partir da implantação de um material no organismo, uma série de reações é desencadeada no organismo, tanto no meio fisiológico quanto no sistema imunológico. A resposta 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, então, as células entram em contato com a superfície do implante, interagindo com este através das proteínas adsorvidas (Roach *et al.*, 2007). Esta adsorção superficial de células e proteínas ocorre somente se a topografia e propriedades químicas e mecânicas do implante sejam adequadas para que esta ocorra.

Já a resposta inflamatória do sistema ocorre através do aumento da circulação sanguínea, aumento da atividade metabólica e acúmulo de fluido extracelular no local de dano tecidual. Quando este dano ocorre, seja devido à lesão ou à implantação, neutrófilos são atraídos ao local, assim como células mononucleares e macrófagos. Estas células atacam e digerem os microrganismos e detritos do tecido danificado. O estágio inicial da resposta inflamatória é completado em 4-5 dias, no qual ocorre a revascularização da área e a reconstrução do tecido danificado (Hasirci e Hasirci, 2018).

Como a interação do material com o corpo ocorre na interface implante-tecido, as propriedades superficiais do material determinam como se darão as interações entre o implante e o organismo. Esta interação causa efeitos no organismo e no biomaterial, os quais podem ser benéficos ou deletérios, podendo resultar a 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 o biomaterial está representado na Figura 6.

## INTERAÇÕES BIOMATERIAIS-TECIDOS

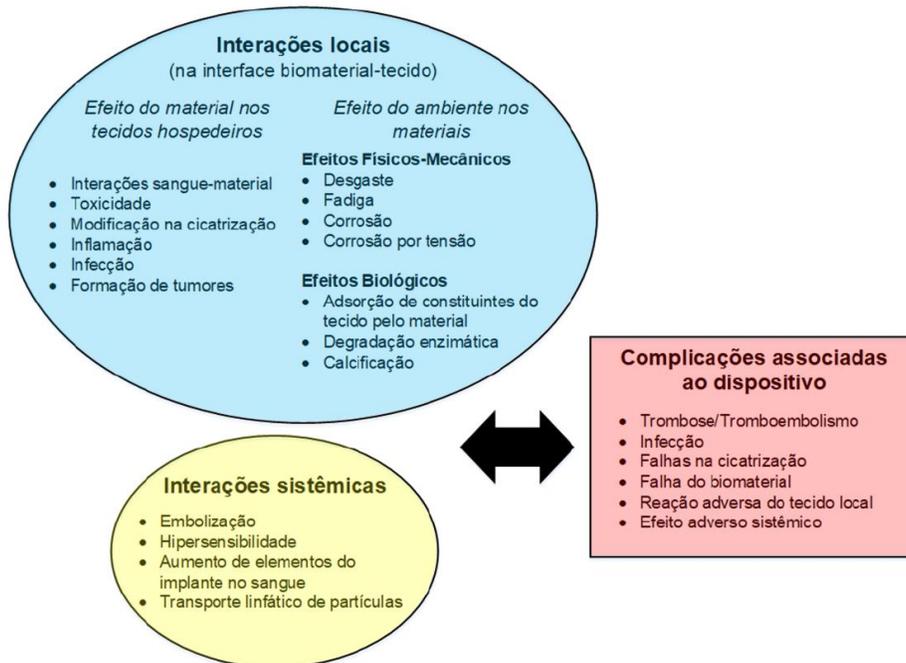


Figura 6: Esquema das possibilidades de interação entre organismo e implante.

Fonte: Adaptado de (Ratner *et al.*, 2004).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biomateriais e Cerâmicas Avançadas (Labiomat) do Departamento de Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Na Figura 7 é apresentado o fluxograma com a descrição da metodologia utilizada na elaboração deste trabalho.

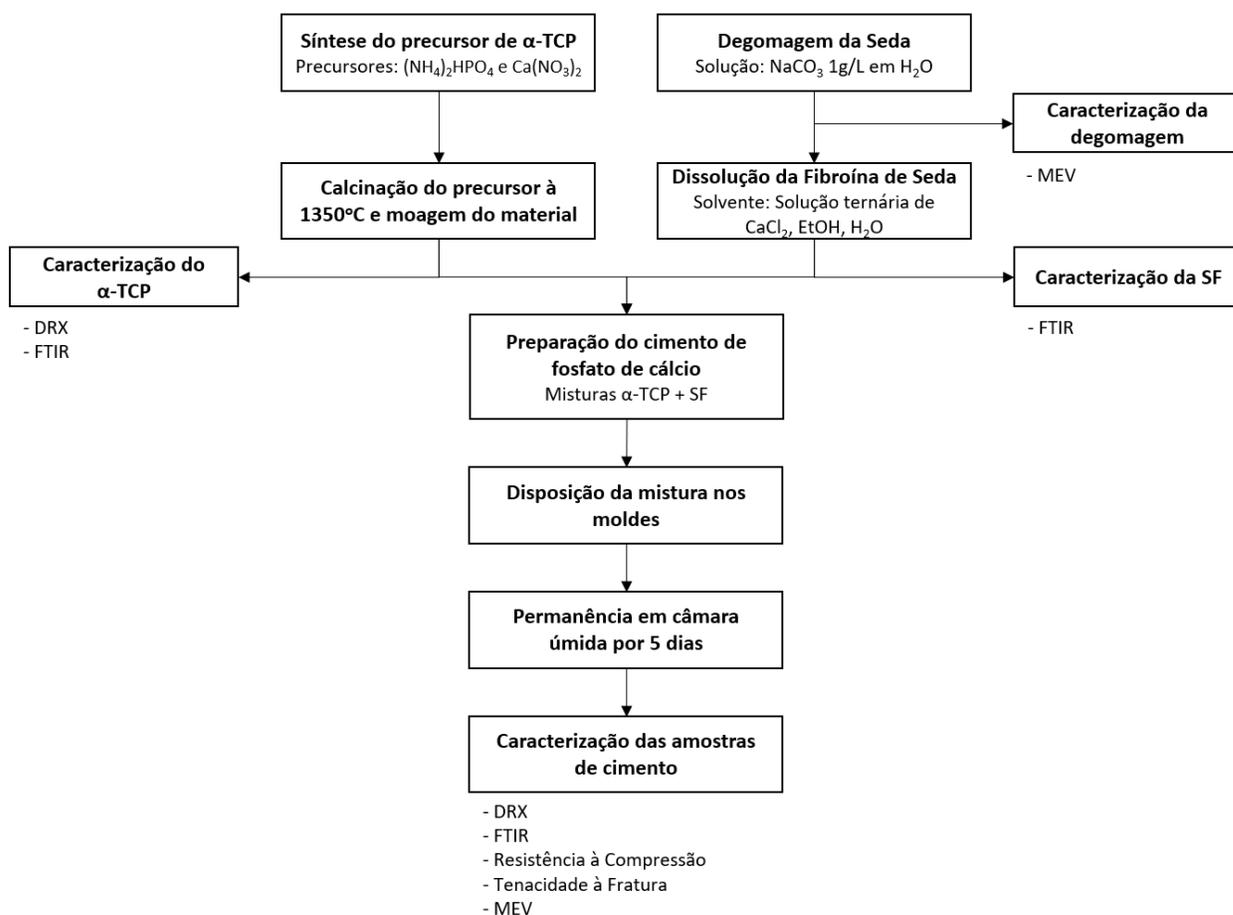


Figura 7: Fluxograma das etapas de desenvolvimento do trabalho.

Para o desenvolvimento do trabalho, foram utilizadas fibras seda de 20/22 denier fornecidas gentilmente pela empresa Bratac.

#### 4.1 SÍNTESE DO $\alpha$ -FOSFATO TRICÁLCICO

O  $\alpha$ -TCP foi sintetizado por via úmida, ou seja, através da calcinação de uma fase precursora obtida por precipitação em solução aquosa, utilizando-se precursores com concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  definidas e mantendo-se a relação molar de Ca/P em 1,5. Esta síntese foi selecionada, devido à dificuldade de obtenção de  $\alpha$ -TCP em fase pura através do método de via seca, já que os precursores utilizados nesta via de síntese apresentam teores consideráveis de magnésio (Mg), o qual desloca o equilíbrio da reação de transformação  $\beta \leftrightarrow \alpha$  para a formação de  $\beta$  (Enderle *et al.*, 2005; Carrodegua *et al.*, 2008; Frasnelli e Sglavo, 2016).

O procedimento 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 com uma taxa de gotejamento de 14mL/min a uma solução 0,5M de nitrato de cálcio  $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2]$ , Labsynth – P.A.] em balão de fundo redondo de três bocas sob temperatura de 60°C. A solução final foi mantida nesta temperatura sob agitação constante de 250 rpm por 24h.

Tanto o pH quanto a temperatura são parâmetros críticos na síntese do precursor com a estequiometria correta para a obtenção do  $\alpha$ -TCP após a calcinação. Desta forma, se adicionou de hidróxido de amônio  $[\text{NH}_4\text{OH}]$ , Dinâmica-P.A.] ao balão em 3 etapas: (i) após 1min de reação, (ii) após a adição de 50% da solução de hidrogeno fosfato de amônio e (iii) após a adição de toda a solução de hidrogenofosfato de amônio. As quantidades de solução e os parâmetros utilizados na síntese do material estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros utilizados na síntese de  $\alpha$ -TCP por via úmida.

Concentração dos reagentes	Razão Ca/P dos reagentes	Volume de $\text{NH}_4\text{OH}$	pH da mistura	Temperatura	Velocidade rotacional de agitação
0,5 M	1,5	85 mL	7 - 8	60°C	250 rpm

A solução foi filtrada à vácuo com um funil de Büchner e a secagem do pó resultante foi realizada em estufa à 100°C por 24h. Posteriormente, o material obtido foi moído manualmente com almofariz e pistilo de porcelana e peneirado em peneira de

malha 60 mesh (abertura de 0,250 mm) e calcinado a 1350°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 1350°C sob taxa de aquecimento de 5°C/min. A amostra foi mantida a 1350°C por 1 hora e, após o patamar, o material permaneceu dentro do forno até atingir a temperatura ambiente. Finalmente, o produto foi moído com almofariz e pistilo de porcelana e peneirado em peneira com malha 200 mesh (abertura de 0,074 mm).

## 4.2 OBTENÇÃO DA SOLUÇÃO DE FIBROÍNA DE SEDA

### 4.2.1 Degomagem da seda

Para a obtenção da fibroína de seda, foi realizado, primeiramente, o processo de degomagem das fibras de seda, processo necessário para a remoção da camada de sericina. Foi utilizado o processo descrito por Li *et al.* em 2002 (Li *et al.*, 2002). Para isso, fibras de seda foram imersas em uma solução 1g/L de carbonato de sódio [Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Dinâmica – P.A.] a 85°C e mantidas sob agitação constante por 30min. Este procedimento foi repetido 3 vezes, realizando-se a troca da solução entre as repetições. Após, as fibras foram enxaguadas e imersas em água destilada (H<sub>2</sub>O) à temperatura ambiente por 30min sob agitação. As fibras resultantes do processo foram secas em uma estufa a 40°C por 24h.

### 4.2.2 Dissolução da fibroína de seda

Para a dissolução das fibras de SF, foi preparada uma solução ternária de cloreto de cálcio [CaCl<sub>2</sub>, Dinâmica, P.A.], etanol [EtOH, Dinâmica, P.A.] e água, com proporção molar de 1:2:8. As fibras foram adicionadas à solução em quantidades adequadas para a obtenção de soluções com 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 e 4% em massa de SF e mantidas sob agitação por 4h à temperatura de 80°C. As soluções foram armazenadas em um refrigerador para a evitar a diminuição da massa molar das cadeias poliméricas.

### 4.3 PREPARAÇÃO DO CIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO

O cimento de fosfato de cálcio foi obtido através da mistura de do  $\alpha$ -TCP sintetizado com a solução de fibroína de seda em quantidades adequadas para a obtenção de uma pasta com 25% em massa de solução de SF, ou seja, uma razão líquido-pó(L/P) de 0,33 mL/g. A mistura foi realizada manualmente, utilizando-se uma espátula de aço inoxidável, até a obtenção de uma pasta homogênea. Este processo foi realizado para as diferentes soluções de fibroína de seda. A pasta obtida foi transferida manualmente aos moldes específicos de cada ensaio a ser realizado e foi mantida nestes por 15min. Posteriormente, as amostras foram retiradas dos moldes e colocadas em uma câmara úmida a 60°C por 5 dias.

As concentrações mássicas de SF em cada variante de teste e suas respectivas nomenclaturas se encontram na Tabela 4.

Tabela 4: Nomenclatura e porcentagens mássicas de fibroína de seda em cada variante de teste.

Variante	Concentração de SF em solução (%)	Concentração mássica de solução na pasta de cimento (%)	Concentração mássica de SF no cimento (%)
SF0	0,0	25	0,000
SF250	1,0	25	0,250
SF375	1,5	25	0,375
SF500	2,0	25	0,500
SF625	2,5	25	0,625
SF750	3,0	25	0,750
SF875	3,5	25	0,875
SF1000	4,0	25	1,000

## 4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

### 4.4.1 Caracterização do $\alpha$ -TCP

#### 4.4.1.1 Difração de Raios-X

As fases cristalinas presentes no pó obtido foram determinadas qualitativamente através da análise de difração de raios-x (DRX). Para a análise, foi utilizado 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  $0,05^\circ/\text{s}$  e no intervalo de  $2\theta = 20^\circ$  a  $50^\circ$ .

#### 4.4.1.2 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 pó obtido. Para a análise, foi utilizado um espectrômetro Perkin Elmer do modelo Spectrum 1000 em modo de transmissão, com espectro na região de frequências entre  $400$  e  $4000\text{cm}^{-1}$ .

### 4.4.2 Caracterização da Fibroína de Seda

#### 4.4.2.1 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 JEOL modelo JSM 6060 com feixe de 15kV e sob ampliação de 300x. Previamente à análise, foi realizada a metalização da superfície da amostra com fina camada de ouro de forma a se melhorar a condução da amostra.

#### 4.4.2.2 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 após o processo de degomagem. Para a análise, foi utilizado um espectrômetro Perkin Elmer do modelo

Spectrum 1000 em modo ATR, com espectro na região de frequências entre 600 e 4000cm<sup>-1</sup>.

### **4.4.3 Caracterização das amostras de cimento de fosfato de cálcio**

#### **4.4.3.1 Difração de Raios-X**

As fases cristalinas presentes nos CPCs obtidos após armazenamento em câmara úmida foram determinadas qualitativamente 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 $\alpha$  ( $\lambda=1,5418 \text{ \AA}$ ) 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  $2\theta = 20^\circ$  à  $50^\circ$ . Esta análise foi realizada em todas as variantes de CPC obtidas neste trabalho.

#### **4.4.3.2 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 cimento de fosfato de cálcio obtido. Para a análise, foi utilizado um espectrômetro Perkin Elmer do modelo Spectrum 1000 em modo de transmissão, com espectro na região de frequências entre 400 e 4000cm<sup>-1</sup>.

#### **4.4.3.3 Resistência à Compressão**

Para a avaliação da resistência à compressão dos cimentos obtidos, foi seguida a norma ASTM F451-20, a qual é utilizada para ensaios de compressão de cimentos ósseos.

Os cimentos foram conformados em moldes cilíndricos de diâmetro de 6mm e altura de 12mm, conforme a Figura 8, e mantidos no molde por 15min. Posteriormente, as amostras foram retiradas dos moldes e mantidas em uma câmara com umidade relativa de 100% por 5 dias a temperatura de 60°C. Após o período em câmara úmida, 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.

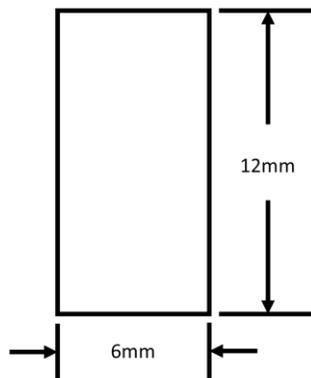


Figura 8: Geometria das amostras para os ensaios de resistência à compressão.

O teste de compressão foi realizado em um equipamento de ensaio mecânico 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 (7), em que  $\sigma$  é a tensão de ruptura em MPa,  $F$  é a força aplicada no momento de ruptura em N e  $A$  é a área transversal do corpo de prova em  $\text{mm}^2$ . Foram ensaiadas 5 amostras de cada uma das variantes de concentração de fibroína de seda.

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (7)$$

#### 4.4.3.4 Tenacidade à Fratura

Para a avaliação da tenacidade à fratura ( $K_{IC}$ ) dos cimentos obtidos, foi seguida a norma ASTM E399-20a, norma utilizada para a definição da tenacidade à fratura de cimentos ósseos (Guandalini, Baleani e Viceconti, 2004).

Os cimentos foram conformados em moldes retangulares de 5,5mm de espessura, 11mm de altura e 50mm de comprimento, conforme a Figura 9, e mantidos no molde por 15min. Posteriormente, as amostras foram retiradas dos moldes e mantidas em uma câmara com umidade relativa de 100% por 5 dias a temperatura de 60°C. Após o período em câmara úmida, foi induzida um entalhe de 5mm no meio do comprimento da amostra, conforme a Figura 9, e as amostras foram submetidas à análise visual direta, com objetivo

de verificar a integridade destas. As amostras com defeitos visíveis como fissuras e trincas indesejadas foram descartadas.

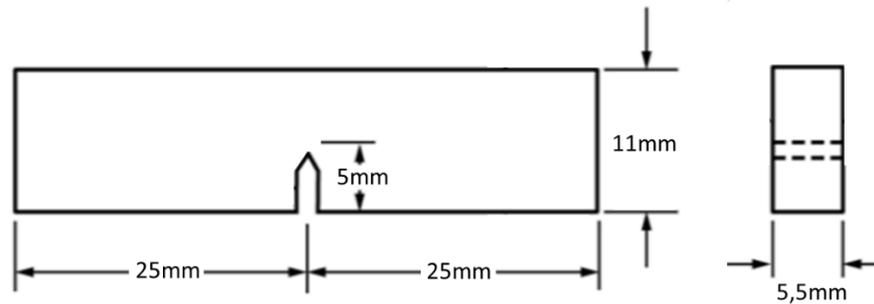


Figura 9: Geometria das amostras para os ensaios de tenacidade à fratura.

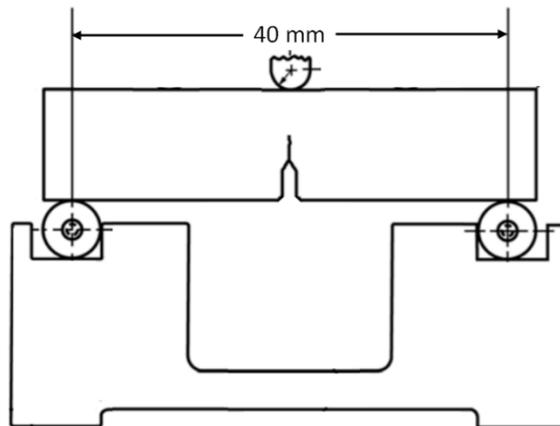


Figura 10: Configuração do modo de flexão 4 pontos utilizado no ensaio de tenacidade à fratura.

O teste de tenacidade à fratura foi realizado em um equipamento de ensaio mecânico universal INSTRON modelo 3369 em modo de flexão 3, pontos com montagem conforme o esquema representado na Figura 10. Foi utilizado taxa de travessa de 1mm/min e célula de carga de 2kN. A tenacidade à fratura do material é definida pela equação (8) e depende da força aplicada sob o corpo de prova ( $F$ ), da distância entre os apoios do ensaio ( $S$ ), da espessura ( $B$ ) e altura da amostra ( $W$ ) e de uma função dependente a razão entre o comprimento do entalhe ( $a$ ) e  $W$ . Esta função é definida na equação (9).

$$K_{IC} = \frac{F \cdot S}{(B \cdot W^{3/2})} \cdot f\left(\frac{a}{W}\right) \quad (8)$$

$$f\left(\frac{a}{W}\right) = 3 \sqrt{\frac{a}{W}} \cdot \frac{1,99 - \left(\frac{a}{W}\right)\left(1 - \frac{a}{W}\right)\left[2,15 - 3,93\frac{a}{W} + 2,7\left(\frac{a}{W}\right)^2\right]}{2\left(1 + 2\frac{a}{W}\right)\left(1 - \frac{a}{W}\right)^{3/2}} \quad (9)$$

Foram ensaiadas 5 amostras de cada variante de concentração de fibroína de seda.

#### 4.4.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para verificar as características microestruturais das amostras de cimento de fosfato de cálcio reforçado com fibroína de seda, foi realizada a obtenção de imagens de MEV. A obtenção das imagens foi realizada em um microscópio ZEISS modelo EVO MA15 com feixe de 15kV e sob ampliação de 5000x. Previamente à análise, foi realizada a metalização da superfície da amostra com fina camada de ouro de forma a se melhorar a condução da amostra.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO $\alpha$ -TCP

#### 5.1.1 Difração de Raios-X

A Figura 11 apresenta o difratograma correspondente ao fosfato de cálcio obtido pela síntese por via úmida de  $\alpha$ -TCP descrita na Seção 4.1 após a calcinação à 1350°C. Os picos observados evidenciam a predominância de  $\alpha$ -TCP no material obtido, confirmando que a síntese realizada permitiu a obtenção do produto desejado. Como referência foi utilizada a ficha cristalográfica ICSD 000923.

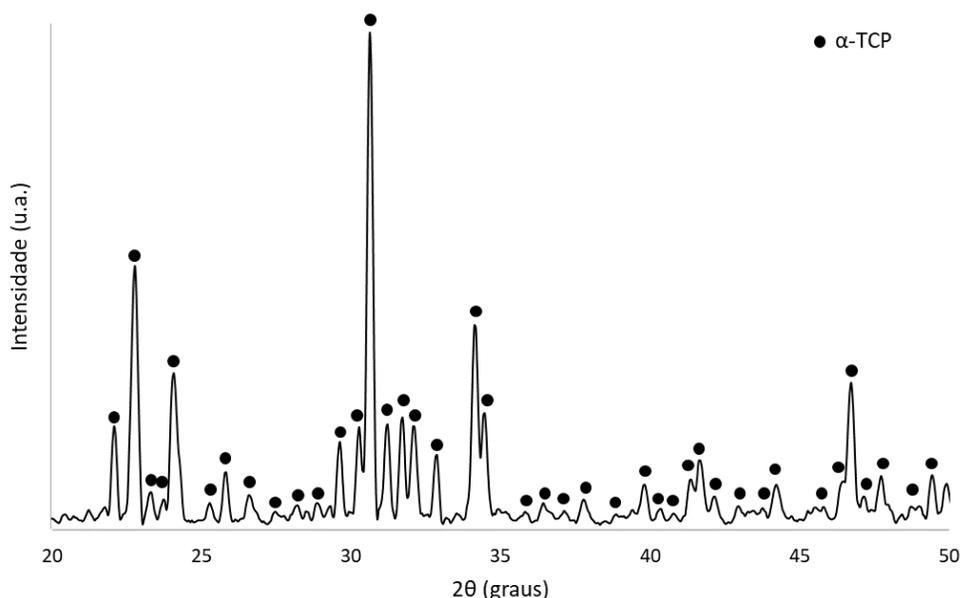


Figura 11: Difratograma de raios-X do  $\alpha$ -TCP após calcinação à 1350°C

Não foi possível a identificação de picos atribuídos à presença de fases indesejáveis como  $\beta$ -TCP e HAp, contaminações comuns na sintetização de  $\alpha$ -TCP. No entanto, o limite de detecção de fases no difratômetro utilizado é de 4% e, por este motivo, não é possível afirmar que se obteve um material composto de  $\alpha$ -TCP puro. Desta forma, podemos afirmar que o  $\alpha$ -TCP é a fase predominante obtida através da metodologia de síntese utilizada.

### 5.1.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

O espectro de infravermelho para o  $\alpha$ -TCP obtido se encontra na Figura 12. É possível observar 2 bandas largas, as quais se encontram nos comprimentos de onda  $536-604\text{ cm}^{-1}$  e  $941-1124\text{ cm}^{-1}$ . A primeira banda se refere a sobreposição das bandas em  $551, 563, 585, 597$  e  $613\text{ cm}^{-1}$ , as quais são referentes ao modo de vibração assimétrico de flexão da ligação P-O ( $\nu_4$ ), correspondente aos grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  do  $\alpha$ -TCP. Já a segunda banda, a qual apresenta maior largura, corresponde ao modo de vibração assimétrico de deformação da ligação P-O ( $\nu_3$ ), também referente aos grupos  $\text{PO}_4^{3-}$ . Esta banda é constituída pela sobreposição das bandas contidas em  $984, 997, 1013, 1025, 1039$  e  $1055\text{ cm}^{-1}$ . Todos os valores de frequência das bandas vibracionais identificadas correspondem às bandas da fase  $\alpha$  do fosfato tricálcico (Carrodegas e De Aza, 2011).

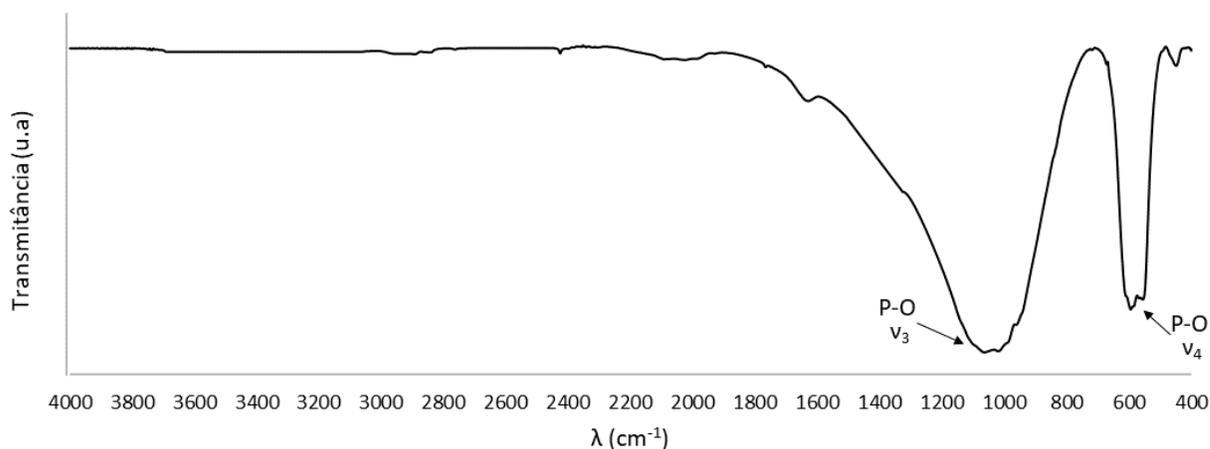


Figura 12: Espectro de FTIR do  $\alpha$ -TCP sintetizado.

Desta forma, podemos afirmar que o método de síntese utilizado é adequado, já que a análise de FTIR, assim como a análise de DRX, revelou que, dentro dos limites de detecção, o  $\alpha$ -TCP é a única fase presente no fosfato de cálcio obtido.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DA FIBROÍNA DE SEDA

### 5.2.1 Caracterização da degomagem da seda

O processo de degomagem da seda é um processo termoquímico com 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 depois deste processo, as quais podem ser observadas na Figura 13.

Pode-se verificar, na escala de observação, que o processo realizado foi possivelmente efetivo, já que não é possível a observação de resíduos de sericina, proteína glutinosa que envolve os filamentos de fibroína, nas fibras obtidas (Figura 13b).

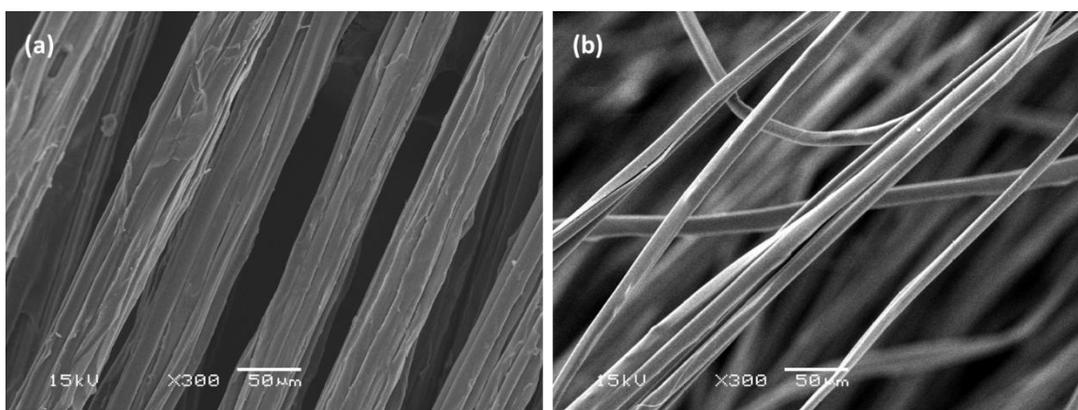


Figura 13: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das fibras de seda (a) antes e (b) após o processo de degomagem.

### 5.2.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

O espectro de infravermelho da fibroína de seda, após a degomagem, se encontra na Figura 14. É possível identificar as diferentes conformações das cadeias peptídicas da SF através das bandas de absorção associadas às amidas I, II e III. A banda com absorção máxima em  $1624\text{ cm}^{-1}$  é referente à amida I e tem relação ao modo de vibração de deformação axial da ligação C=O. Esta amida está associada à duas bandas distintas, uma a  $1660\text{ cm}^{-1}$  e outra à  $1630\text{ cm}^{-1}$ , correspondentes à contribuição da conformação *random coil* e  $\beta$ -*sheet*, respectivamente. Devido à frequência de detecção desta banda,

podemos concluir que há uma grande concentração de  $\beta$ -sheet, já que as ligações C=O nesta conformação estão mais envolvidas em ligações intermoleculares de hidrogênio, deslocando a banda de FTIR da amida I para frequências inferiores (Rusa *et al.*, 2005). O mesmo ocorre com a banda de amida II, correspondente ao modo de vibração de deformação angular da ligação N-H, a qual geralmente se encontra entre 1510 e 1545  $\text{cm}^{-1}$ . Na amostra analisada, esta banda se encontra em 1511  $\text{cm}^{-1}$  devido ao deslocamento da banda para frequências mais baixas devido à presença majoritária de  $\beta$ -sheet com relação à estrutura *random coil*. Já a banda entre 1225 e 1260  $\text{cm}^{-1}$  é correspondente ao modo de vibração de flexão da ligação O-C-N referente à amida III e é formada pela sobreposição de dois picos, um em 1229  $\text{cm}^{-1}$  e outro a 1255  $\text{cm}^{-1}$ . Esta apresenta seu máximo de absorção em 1229  $\text{cm}^{-1}$ , frequência referente às regiões amorfas da SF, e um ombro em 1255  $\text{cm}^{-1}$ , que está relacionado à conformação  $\beta$ -sheet. A banda em 692  $\text{cm}^{-1}$  é relacionada à amida V, a qual é atribuída às conformações cristalinas da SF (Rusa *et al.*, 2005).

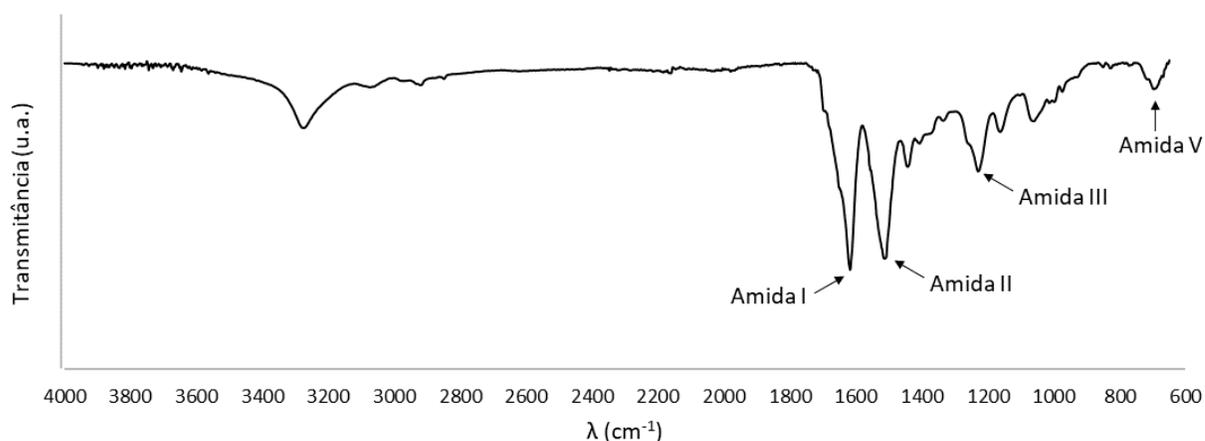


Figura 14: Espectro de FTIR da fibroína de seda após o processo de degomagem.

Podemos afirmar, logo, que a fibroína de seda utilizada neste trabalho apresenta estrutura rica na conformação Seda II, a qual é responsável pela grande contribuição da estrutura  $\beta$ -sheet no espectro obtido.

## 5.3 CARACTERIZAÇÃO DO CIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO

### 5.3.1 Difração de Raios-X

Os difratogramas correspondentes às amostras de cimento de fosfato de cálcio obtidas são apresentados na Figura 15. Para a análise da presença da fase CDHA foi utilizada a ficha cristalográfica JCPDS 9-432.

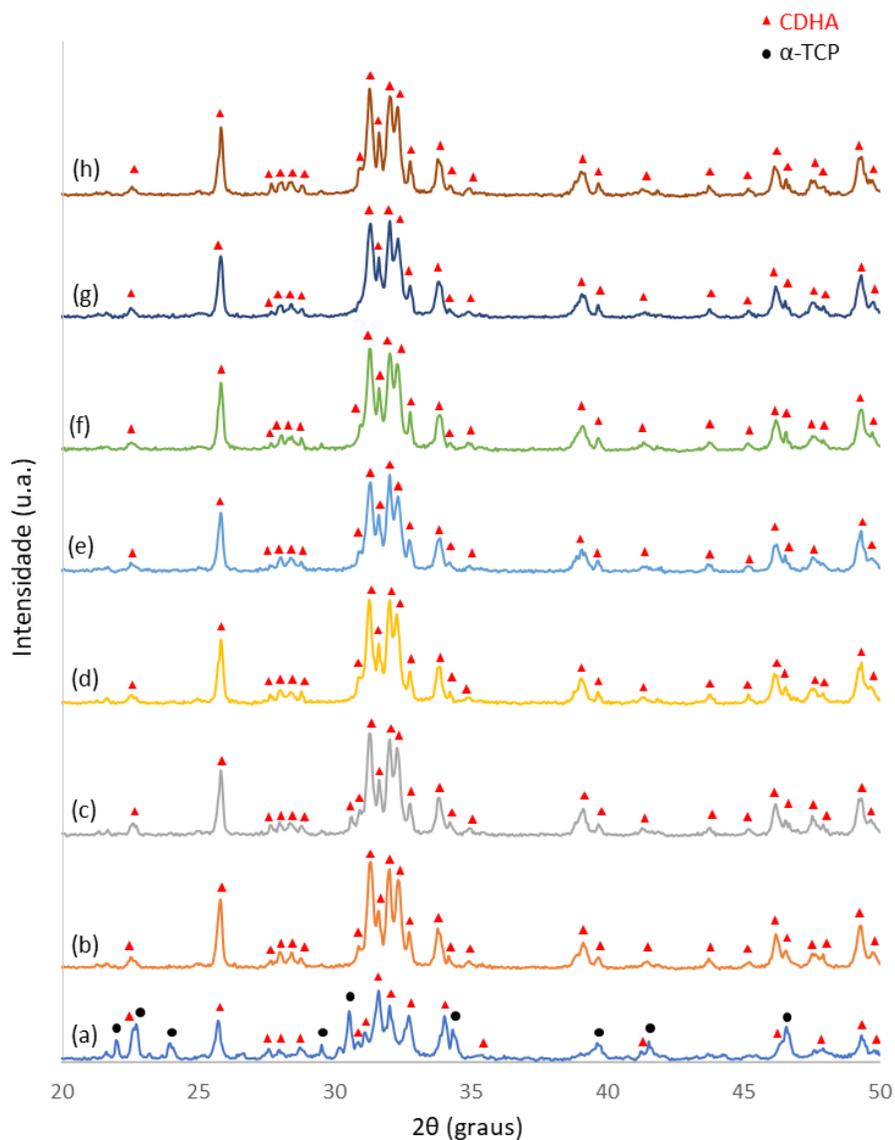


Figura 15: Difratograma de raios-X das amostras de cimento de fosfato de cálcio (a) puro, com adição de (b) 0,250%, (c) 0,375%, (d) 0,500%, (e) 0,625%, (f) 0,750%, (g) 0,875% e (h) 1,000% de fibroína de seda após 5 dias em câmara úmida.

A transformação do  $\alpha$ -TCP em CDHA após a permanência em câmara úmida por 5 dias é evidente. Entretanto, é possível observar picos de baixa intensidade pertencentes à fase  $\alpha$  na amostra sem adição de fibroína de seda (SF0), indicando que a transformação nesta variante foi incompleta. Por outro lado, todas as amostras de cimento modificado apresentaram transformação completa do  $\alpha$ -TCP em CDHA, dentro dos limites de detecção do equipamento.

A transformação deste, sob concentrações tão pequenas quanto 0,250% em massa da proteína, pode ser explicada pelo posicionamento dos grupos carboxila e de aminoácidos na superfície da fibroína, os quais servem como pontos de nucleação para fosfatos de cálcio. Isto ocorre devido à forte atração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  por estes grupos aniônicos, que causa supersaturação local e a posterior nucleação de cristais e resulta na capacidade da fibroína de guiar o crescimento de cristais de fosfatos de cálcio ao longo do eixo *c* da estrutura cristalina destes (Li *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2019; Mobika *et al.*, 2020). Como esta transformação é dificultada pela formação de grãos de Hadley – estruturas em que se forma uma casca de CDHA ao redor de grãos de  $\alpha$ -TCP ainda não solubilizados – (Thürmer *et al.*, 2012), podemos inferir que a propriedade da SF de orientar o crescimento de grãos de CDHA pode estar prevenindo a formação destes grãos através da precipitação preferencial de CDHA na superfície da fibroína, e, assim, impedindo a formação de grãos de Hadley e permitindo a transformação completa do  $\alpha$ -TCP.

A obtenção de CDHA é desejável em cimentos de fosfato de cálcio baseados em  $\alpha$ -TCP, pois este apresenta maior semelhança química e cristalográfica à fase mineral óssea, facilitando a remodelação e regeneração do tecido ósseo (Cao *et al.*, 2014).

### **5.3.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier**

Os espectros correspondentes às variantes de cimento de fosfato de cálcio após 5 dias em câmara úmida estão representados na Figura 16. É possível observar em todas as amostras a presença das bandas relacionadas ao modo de vibração assimétrica de deformação da ligação P-O ( $\nu_3$ ) referentes aos íons  $\text{PO}_4^{3-}$  dos fosfatos de cálcio, uma

banda de máximo de absorção à  $1035\text{ cm}^{-1}$  e um ombro à  $1092\text{ cm}^{-1}$ , e bandas relacionadas aos modos de vibração assimétrica de flexão da ligação P-O ( $\nu_4$ ) e de vibração simétrica de deformação da ligação P-O ( $\nu_1$ ) em frequências de  $663$  e  $958\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.

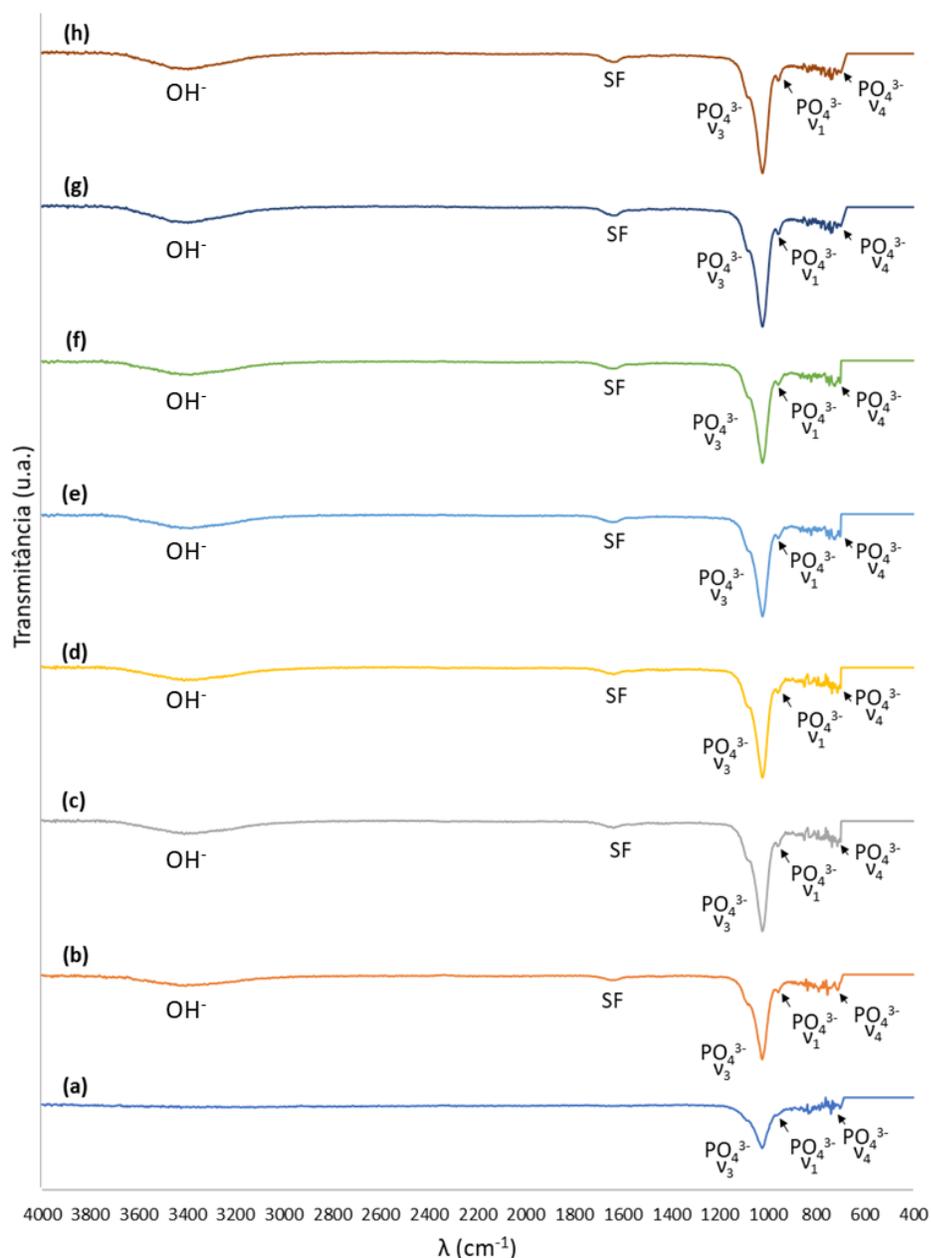


Figura 16: Espectros de FTIR das amostras de cimento de fosfato de cálcio (a) puro, com adição de (b) 0,250%, (c) 0,375%, (d) 0,500%, (e) 0,625%, (f) 0,750%, (g) 0,875% e (h) 1,000% de fibroína de seda após 5 dias em câmara úmida.

Diferentemente da amostra de cimento de fosfato de cálcio puro, todas as variantes de cimento com adição de SF apresentaram picos característicos da CDHA com intensidade identificável, corroborando os resultados da análise de DRX. A larga banda de absorção entre 3100 e 3600  $\text{cm}^{-1}$  é formada pela sobreposição de bandas em 3180 e 3466  $\text{cm}^{-1}$ , as quais são referentes à vibração de deformação da ligação O-H, íon presente na estrutura da CDHA (Mobika *et al.*, 2020). Já o ruído presente por volta de 800 e 900  $\text{cm}^{-1}$  pode ser uma indicação da substituição do íon  $\text{PO}_4^{3-}$  por  $\text{CO}_3^{2-}$  na estrutura da CDHA. Além disso, a banda com máximo de absorção em 1628  $\text{cm}^{-1}$  é referente à sobreposição das bandas de amida I e amida II da fibroína de seda (Cao *et al.*, 2014; Manoj *et al.*, 2015; Mujahid, Sarfraz e Amin, 2015).

### 5.3.3 Resistência à Compressão

Os valores de resistência à compressão para as variantes de teste de cimento de fosfato de cálcio se encontram no gráfico representado na Figura 17.

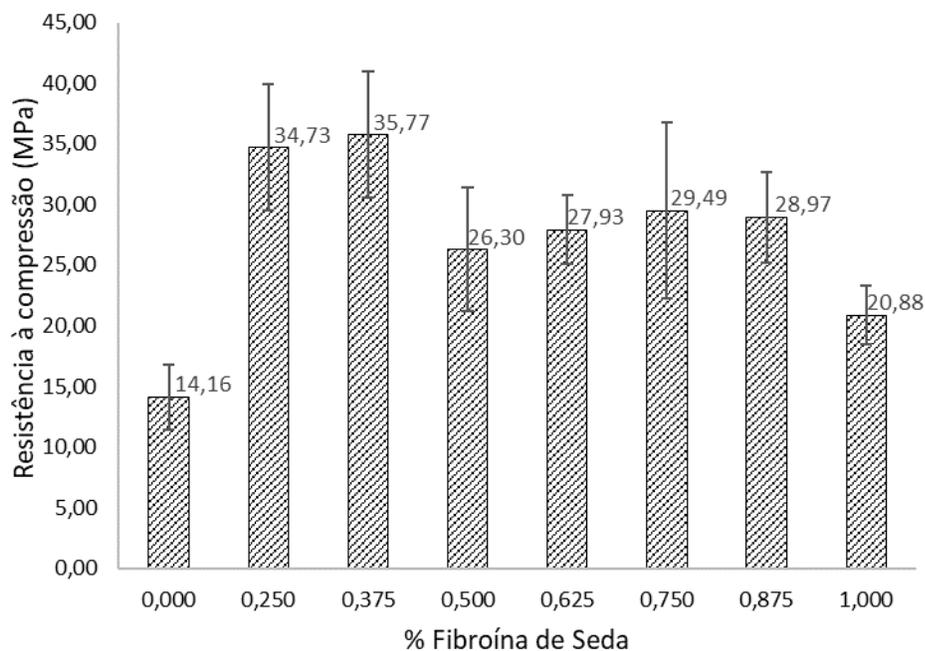


Figura 17: Resistência à compressão das amostras de cimento de fosfato de cálcio com diferentes concentrações de fibroína de seda.

Para a composição isenta de fibroína de seda e armazenada em câmara úmida por 5 dias, os valores de resistência à compressão é similar aos obtidos em literatura ( $15,6 \pm 3,3$  MPa) para sistemas de  $\alpha$ -TCP com a utilização de mesma razão L/P (Oh *et al.*, 2010).

Observa-se que a adição de fibroína de seda ao cimento baseado em  $\alpha$ -TCP, avaliando somente os valores médios, provocou um aumento considerável da resistência à compressão das amostras, obtendo-se um máximo (35,77 MPa) para a amostra com adição de 0,375% de fibroína de seda, equivalente à 252,6% da resistência referente à amostra isenta de fibroína de seda. Para adições superiores a 0,375%, obtivemos uma redução da resistência; porém, todas as tensões obtidas foram superiores à da amostra original. Este comportamento demonstra uma boa interação entre os fosfatos de cálcio ( $\alpha$ -TCP e CDHA) com a SF, apresentando bom acoplamento entre estas fases.

Entretanto, os valores obtidos ainda não são compatíveis com aplicações ortopédicas em ossos de estrutura predominantemente cortical e de altas solicitações compressivas, como o caso do fêmur, tíbia e úmero. Apesar disso, as resistências das variantes com adição de fibroína de seda são compatíveis com as apresentadas pela estrutura trabecular.

#### **5.3.4 Tenacidade à Fratura**

Os valores obtidos de tenacidade à fratura para as variantes de cimento de fosfato de cálcio se encontram na Figura 18.

Pode-se observar que a adição de fibroína de seda ao cimento de fosfato de cálcio provocou um aumento substancial da tenacidade à fratura do material, com máximo ( $1,43$  MPa.m<sup>1/2</sup>) para a amostra com adição de 0,500% de SF, equivalente à 550,0% da tenacidade apresentada pela variante isenta de polímero. Para adições superiores à 0,500%, obtivemos uma diminuição do valor de tenacidade; entretanto, todas as variantes apresentaram tenacidade superior à variante de cimento puro e a variante com menor tenacidade à fratura (com adição de 0,875% de SF e tenacidade de  $0,76$  MPa.m<sup>1/2</sup>) apresentou o equivalente à 292,3% da tenacidade da amostra original. Este

comportamento é provavelmente causado pela existência da fase polimérica no cimento, a qual permite o reforço das microtrincas e, conseqüentemente, a tenacificação da matriz.

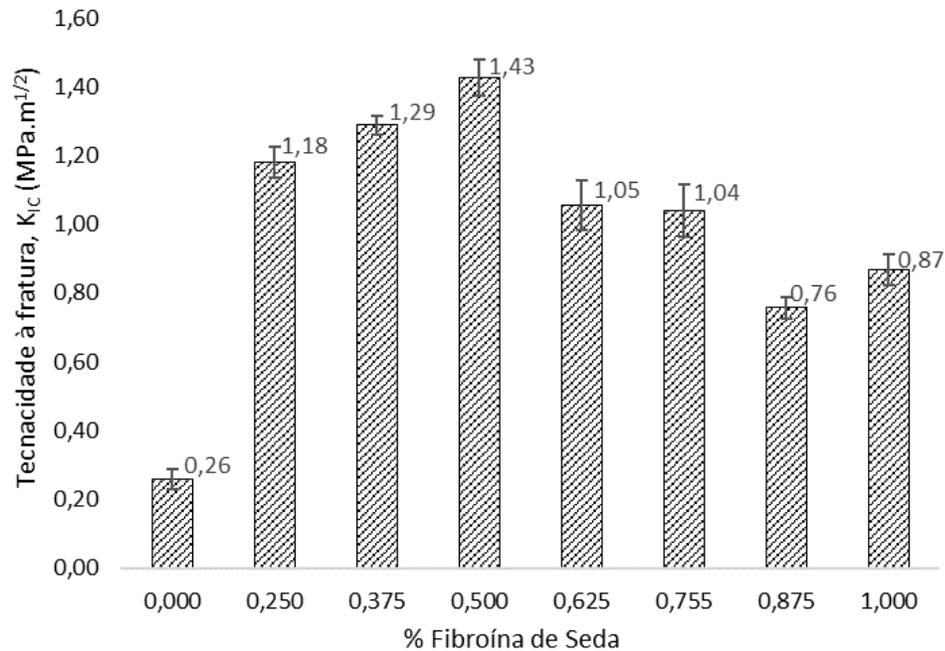


Figura 18: Tenacidade à fratura das amostras de cimento de fosfato de cálcio com diferentes concentrações de fibroína de seda.

Apesar dos aumentos da  $K_{IC}$  obtidos pelas variantes com adição polimérica, estes ainda são inferiores aos do osso cortical humano, que se encontram na faixa de 2 a 12 MPa.m<sup>1/2</sup> (Kokubo, Kim e Kawashita, 2003).

### 5.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microestrutura da seção transversal dos cimentos de fosfato de cálcio com diferentes adições de SF se encontram na Figura 19. As amostras de cimento de fosfato de cálcio isento de SF (Figura 13a) apresentam uma estrutura de cristais de CDHA lamelares, estruturas que podem indicar a formação de grãos de Hadley e que são características dos CPCs baseados em  $\alpha$ -TCP (Thürmer *et al.*, 2012; Hurle *et al.*, 2016).

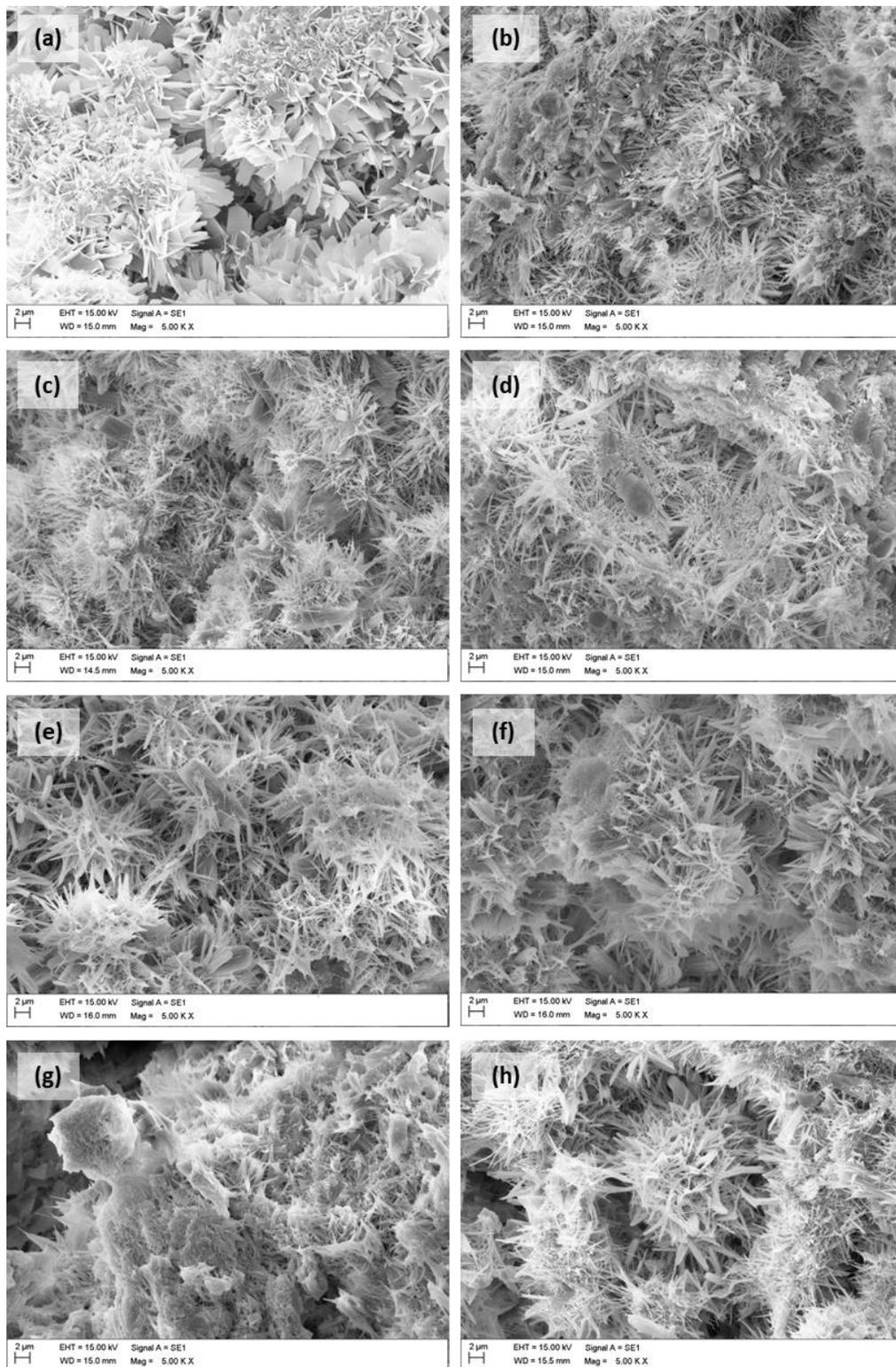


Figura 19: Imagens de microscopia eletrônica de varredura com magnificação de 5000x para as variantes de teste de (a) cimento de fosfato de cálcio puro, com adição de (b) 0,250%, (c) 0,375%, (d) 0,500%, (e) 0,655%, (f) 0,750%, (g) 0,875% e (h) 1,000% de fibroína de seda.

Diversos estudos apontaram a capacidade da fibroína de seda de estimular a nucleação dos cristais de HAp e a orientação destes ao longo do eixo *c*, devido à formação de supersaturação de íons nos locais de exposição dos grupos funcionais presentes na SF (Wang e Li, 2007; Fan *et al.*, 2010). A partir da adição de SF à composição desenvolvida neste trabalho (Figura 19a-h), é possível verificar formação de cristais agulhados e de menor tamanho de grão, o que demonstra a alta capacidade da SF na regulação do crescimento dos cristais de CDHA, orientando o crescimento dos cristais ao longo do eixo *c*.

Esta morfologia é, possivelmente, uma das causas do aumento das propriedades mecânicas dos materiais desenvolvidos devido ao maior travamento mecânico desenvolvido pelos cristais agulhados. Além disso, a microestrutura desenvolvida demonstra grande similaridade à microestrutura às fases minerais do osso humano, sendo uma estrutura biomimética, a qual permite uma maior afinidade celular durante o processo de regeneração óssea (Cao *et al.*, 2014).

## 6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que a metodologia desenvolvida para a obtenção de cimentos de fosfato de cálcio permitiu a obtenção de materiais biomiméticos com aplicabilidade na área ortopédica.

As análises desenvolvidas permitiram a verificação de 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 baseado em  $\alpha$ -TCP. Além disso, a mistura desenvolvida permitiu a obtenção de uma pasta moldável para a obtenção das amostras de teste.

As avaliações químicas utilizadas na caracterização final das variantes de teste demonstraram que, após 5 dias em câmara úmida, foi possível a obtenção de transformação total do  $\alpha$ -TCP em CDHA em todas as variantes com adição de SF, o que garante uma maior similaridade química e cristalográfica do material obtido com a fase mineral óssea. Além disso, foi possível a obtenção de aumento da resistência à compressão para todas as variantes reforçadas, obtendo-se um aumento máximo de 152,6%. Com relação aos ensaios de tenacidade à fratura, se obteve, novamente, um aumento da propriedade em todas as variantes modificadas, com aumento máximo de 450,0% desta propriedade. Estes valores garantem uma maior estabilidade estrutural do material sob as solicitações mecânicas inerentes à implantação quando comparado ao cimento de fosfato de cálcio puro.

Outrossim, a análise microestrutural das variantes demonstra uma alta capacidade da fase orgânica na regulação do crescimento dos cristais de CHDA. Com o aumento da concentração de fibroína de seda no material, nota-se a formação de cristais menores e de maior orientação ao longo do eixo *c*, de forma a se obter cristais agulhados, diferentemente dos cristais lamelares apresentados pelo cimento de fosfato de cálcio isento de SF. Esta adição permitiu, pois, a formação de uma microestrutura de maior similaridade a apresentada pela fase mineral óssea.

Desta forma, o conjunto de resultados obtidos mostra que a metodologia de obtenção de cimento de fosfato de cálcio reforçado com fibroína de seda foi eficaz na

obtenção de estruturas biomiméticas com propriedades mecânicas superiores à do cimento de fosfato de cálcio puro e, com relação às análises no escopo deste trabalho, com alta aplicabilidade na regeneração do tecido ósseo.

## 7 SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS

Este trabalho pode ser aprofundado e complementado através das seguintes sugestões para trabalhos futuros:

- Realizar o estudo e verificação dos possíveis mecanismos apresentados pela fibroína de seda que permitem a transformação de  $\alpha$ -TCP em CDHA;
- Utilizar técnicas de análise complementares, como mapeamento de raios-X por EDS e microtomografia para investigar a formação ou não de grãos de Hadley nas variantes de cimento de fosfato de cálcio com adição de fibroína de seda;
- Avaliar a viabilidade biológica das variantes de cimento de fosfato de cálcio através de ensaios de bioatividade e de cultura celular *in vitro*;
- Realizar a verificação da injetabilidade dos cimentos de fosfato de cálcio para a verificação da sua viabilidade em procedimentos minimamente invasivos, como o caso da vertebroplastia;
- Realizar ensaios com cimentos de fosfato de cálcio com adição de soluções de fibroína de seda dialisadas, de forma a se comparar as propriedades obtidas com as amostras sem diálise e verificar uma possível influência deste processo sobre estas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM E399-20a**: Standard Test Methods for Linear-Elastic Plane-Strain Fracture Toughness of Metallic Materials. Pennsylvania, 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. doi: 10.1177/154405910808700215.

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

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

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

Canal, C. and Ginebra, M. P. (2011) 'Fibre-reinforced calcium phosphate cements: A review', *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. Elsevier Ltd, 4(8), pp. 1658–1671. doi: 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*. Elsevier, 40(9 PART A), pp. 13987–13993. doi: 10.1016/j.ceramint.2014.05.123.

Carrodeguas, R. G. *et al.* (2008) 'New approach to the  $\beta \rightarrow \alpha$  polymorphic transformation in magnesium-substituted tricalcium phosphate and its practical implications', *Journal of the American Ceramic Society*, 91(4), pp. 1281–1286. doi: 10.1111/j.1551-2916.2008.02294.x.

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

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

Dickens, B. and Brown, W. E. (1972) 'The crystal structure of CaKAsO<sub>4</sub>·8H<sub>2</sub>O', *Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry*. International Union of Crystallography, 28(10), pp. 3056–3065. doi: 10.1107/s0567740872007411.

Elshahawy, W. (2011) 'Biocompatibility', in Sikalidis, C. (ed.) *Advances in Ceramics - Electric and Magnetic Ceramics, Bioceramics, Ceramics and Environment*. InTech, pp. 359–378. doi: 10.5772/18475.

Enderle, R. *et al.* (2005) 'Influence of magnesium doping on the phase transformation temperature of β-TCP ceramics examined by Rietveld refinement', *Biomaterials*, 26(17), pp. 3379–3384. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.09.017.

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. doi: 10.1007/s10853-010-4656-4.

Farokhi, M. *et al.* (2016) 'Importance of dual delivery systems for bone tissue engineering', *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V., 225, pp. 152–169. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.01.033.

Farokhi, M. *et al.* (2018) 'Silk fibroin/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering', *Biotechnology Advances*. doi: 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*. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2019.03.035.

Fathi, M. *et al.* (2015) 'Wet chemical method for preparing high purity  $\beta$  and  $\alpha$ -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/  $\alpha$ -TCP cement by N-acetyl cysteine through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in vivo and vitro', *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. Elsevier Ltd, 101(September 2018), p. 103451. doi: 10.1016/j.jmbbm.2019.103451.

Fernandez-Yague, M. A. *et al.* (2015) 'Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicommechanical strategies', *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., 84, pp. 1–29. doi: 10.1016/j.addr.2014.09.005.

Frasnelli, M. e Sglavo, V. M. (2016) 'Effect of Mg<sup>2+</sup> doping on beta-alpha phase transition in tricalcium phosphate (TCP) bioceramics', *Acta Biomaterialia*. Acta Materialia Inc., 33, pp. 283–289. doi: 10.1016/j.actbio.2016.01.015.

Fyhrie, D. P. and Kimura, J. H. (1999) 'Cancellous bone biomechanics', *Journal of Biomechanics*, 32(11), pp. 1139–1148. doi: 10.1016/S0021-9290(99)00114-1.

Gbureck, U. *et al.* (2005) 'Rheological enhancement of mechanically activated  $\alpha$ -tricalcium phosphate cements', *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 73(1), pp. 1–6. doi: 10.1002/jbm.b.30148.

Gilbert, S.F. (2000) 'Osteogenesis: The Development of Bones'. *In: ' Developmental Biology'*. 6<sup>th</sup> 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', *Clinical Materials*, 17(2), pp. 99–104. doi: 10.1016/0267-6605(94)90018-3.

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. doi: 10.1016/j.actbio.2010.01.036.

Guandalini, L., Baleani, M. and Viceconti, M. (2004) 'A procedure and criterion for bone cement fracture toughness tests', *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers*,

*Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 218(6), pp. 445–450. doi: 10.1243/0954411042632144.

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*. Elsevier, 95(October 2018), pp. 1–10. doi: 10.1016/j.msec.2018.10.041.

Hankenson, K. D. *et al.* (2011) 'Angiogenesis in bone regeneration', *Injury*. Elsevier Ltd, 42(6), pp. 556–561. doi: 10.1016/j.injury.2011.03.035.

Hasirci, V.; Hasirci N. (2018) 'Fundamentals of Biomaterials' 1<sup>st</sup> 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*. Elsevier Ltd, 3(1), pp. 1–11. doi: 10.1016/j.jot.2014.11.002.

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

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. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.10.019.

Holzwarth, J. M. and Ma, P. X. (2011) 'Biomimetic Nanofibrous Scaffolds for Bone Tissue Engineering', *Biomaterials*, 32(36), pp. 9622–9629. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.009.Biomimetic.

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

Hu, M. *et al.* (2018) 'Reinforcement of calcium phosphate cement using alkaline-treated silk fibroin', *International Journal of Nanomedicine*. doi: 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*. doi: 10.1016/j.apsusc.2018.10.166.

- Hudecki, A., Kiryczyński, G. and Łos, M. J. (2018) 'Biomaterials, definition, overview', *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine*, (ii), pp. 85–98. doi: 10.1016/B978-0-12-812258-7.00007-1.
- Hurle, K. *et al.* (2016) 'Reaction kinetics of dual setting  $\alpha$ -tricalcium phosphate cements', *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. Springer US, 27(1), pp. 1–13. doi: 10.1007/s10856-015-5616-y.
- Jang, J. H., Castano, O. and Kim, H. W. (2009) 'Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering', *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., 61(12), pp. 1065–1083. doi: 10.1016/j.addr.2009.07.008.
- Jansen, J. *et al.* (2005) 'Injectable calcium phosphate cement for bone repair and implant fixation', *Orthopedic Clinics of North America*, 36(1), pp. 89–95. doi: 10.1016/j.ocl.2004.06.014.
- Kaplan, D. *et al.* (1994). 'Silk: Biology, Structure, Properties and Genetics,' *in: 'Silk Polymers.'* American Chemical Society. ISBN: 9780841227439.
- Kokubo, T., Kim, H. M. and Kawashita, M. (2003) 'Novel bioactive materials with different mechanical properties', *Biomaterials*, 24(13), pp. 2161–2175. doi: 10.1016/S0142-9612(03)00044-9.
- Kong, X. D. *et al.* (2004) 'Silk fibroin regulated mineralization of hydroxyapatite nanocrystals', *Journal of Crystal Growth*, 270(1–2), pp. 197–202. doi: 10.1016/j.jcrysgr.2004.06.007.
- Kuhn, L. T. (2011) 'Biomaterials', *Introduction to Biomedical Engineering*, pp. 219–271. doi: 10.1016/B978-0-12-374979-6.00005-8.
- Kundu, B. *et al.* (2013) 'Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations', *Advanced Drug Delivery Reviews*. doi: 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*. Elsevier B.V., 162(3), pp. 502–520. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.07.041.

- LeGeros, R. Z., Chohayeb, A. and 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. doi: 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. doi: 10.1016/S0141-8130(02)00007-7.
- Li, Y. *et al.* (2008) 'Anisotropic growth of hydroxyapatite on the silk fibroin films', *Applied Surface Science*, 255(5 PART 1), pp. 1681–1685. doi: 10.1016/j.apsusc.2008.06.009.
- 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. doi: 10.1016/j.actbio.2012.11.020.
- Lodoso-Torrecilla, I., van den Beucken, J. J. J. P. and Jansen, J. A. (2021) 'Calcium phosphate cements: Optimization toward biodegradability', *Acta Biomaterialia*. Elsevier Ltd, 119, pp. 1–12. doi: 10.1016/j.actbio.2020.10.013.
- Loureiro dos Santos, L.A. (2002) '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.
- Loureiro dos Santos, L. A. (2017) 'Natural Polymeric Biomaterials: Processing and Properties ☆', *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, (September 2016), pp. 1–6. doi: 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. doi: 10.1002/term.68.

- Malafaya, P. B., Silva, G. A. and 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. doi: 10.1016/j.addr.2007.03.012.
- Manoj, M. *et al.* (2015) 'Core-shell hydroxyapatite/Mg nanostructures: Surfactant free facile synthesis, characterization and their in vitro cell viability studies against leukaemia cancer cells (K562)', *RSC Advances*. Royal Society of Chemistry, 5(60), pp. 48705–48711. doi: 10.1039/c5ra04663g.
- Marelli, B. *et al.* (2012) 'Silk fibroin derived polypeptide-induced biomineralization of collagen', *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 33(1), pp. 102–108. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.039.
- Mathew, M. *et al.* (1977) 'The crystal structure of  $\alpha$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>', *Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry*, 33(5), pp. 1325–1333. doi: 10.1107/s0567740877006037.
- McGrath, K. and Kaplan, D. (1997). 'Protein-based materials. Boston: Birkhäuser. ISBN: 9781461286493.
- Melke, J. *et al.* (2016) 'Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering', *Acta Biomaterialia*. Acta Materialia Inc., 31, pp. 1–16. doi: 10.1016/j.actbio.2015.09.005.
- Mobika, J. *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*. Elsevier B.V, 1206, p. 127739. doi: 10.1016/j.molstruc.2020.127739.
- Monma, H. and 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. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.02.007.

Mottaghitlab, F. *et al.* (2015) 'Silk as a potential candidate for bone tissue engineering', *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V., 215, pp. 112–128. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.07.031.

Mujahid, M., Sarfraz, S. and Amin, S. (2015) 'On the formation of hydroxyapatite nano crystals prepared using cationic surfactant', *Materials Research*, 18(3), pp. 468–472. doi: 10.1590/1516-1439.298014.

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

Oh, S. A. *et al.* (2010) 'Osteoclastic cell behaviors affected by the  $\alpha$ -tricalcium phosphate based bone cements', *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(11), pp. 3019–3027. doi: 10.1007/s10856-010-4152-z.

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.

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

Phillips, A. M. (2005) 'Overview of the fracture healing cascade.', *Injury*, 36 Suppl 3, pp. 5–7. doi: 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). doi: 10.3390/ijms18030237.

Ratner, *et al.* (2013) 'Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine'. 3<sup>rd</sup> ed. Elsevier. ISBN: 978-0-12-374626-9.

Roach, H. I. (1994) 'Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption.', *Cell Biology International*, pp. 617–628. doi: 10.1006/cbir.1994.1088.

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. doi: 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. doi: 10.1021/ma050340a.

Shi, S., Kirk, M. and Kahn, A. J. (1996) 'The role of type I collagen in the regulation of the osteoblast phenotype', *Journal of Bone and Mineral Research*, 11(8), pp. 1139–1145. doi: 10.1002/jbmr.5650110813.

Smith, A. M., Moxon, S. and Morris, G. A. (2016) 'Biopolymers as wound healing materials', in *Wound Healing Biomaterials*. Elsevier Inc., pp. 261–287. doi: 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. doi: 10.1002/jcp.25071.

Suchanek, W. and 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. doi: 10.1557/JMR.1998.0015.

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

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. doi: 10.4028/www.scientific.net/MSF.727-728.1164.

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. doi: 10.1007/s10856-006-0700-y.

Vásquez, A. F., Domínguez, S. and Loureiro dos Santos, L. A. (2017) 'α-TCP cements prepared by syringe-foaming: Influence of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and surfactant concentration',

- Materials Science and Engineering C*. Elsevier Ltd, 81(August), pp. 148–155. doi: 10.1016/j.msec.2017.07.056.
- Vepari, C. and Kaplan, D. L. (2007) 'Silk as a biomaterial', *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 32(8–9), pp. 991–1007. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013.
- Volkov, V., Ferreira, A. V. and 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. doi: 10.1002/mame.201500179.
- Wan, C. *et al.* (2008) 'Role of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  pathway in bone regeneration', *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions*, 8(4), pp. 323–324.
- Wang, J. *et al.* (2010) 'Study of synthesis of nano-hydroxyapatite using a silk fibroin template', *Biomedical Materials*, 5(4). doi: 10.1088/1748-6041/5/4/041002.
- Wang, J. *et al.* (2011) 'Collagen/silk fibroin bi-template induced biomimetic bone-like substitutes', *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 99 A(3), pp. 327–334. doi: 10.1002/jbm.a.32602.
- Wang, L. *et al.* (2020) 'Fabrication and characterization of strontium-hydroxyapatite/silk fibroin biocomposite nanospheres for bone-tissue engineering applications', *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., 142, pp. 366–375. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.107.
- Wang, L. and Li, C. (2007) 'Preparation and physicochemical properties of a novel hydroxyapatite/chitosan-silk fibroin composite', *Carbohydrate Polymers*, 68(4), pp. 740–745. doi: 10.1016/j.carbpol.2006.08.010.
- Wang, L., Nemoto, R. and 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. doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2003.09.006.
- Wang, Y. *et al.* (2008) 'In vivo degradation of 3D Silk Fibroin Scaffolds', *Biomaterials*, 29(24–25), pp. 3415–3428. doi: 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. doi: 10.1002/jbm.a.33054.

Williams, D. F. (1999) 'The Williams Dictionary of Biomaterials', *The Williams Dictionary of Biomaterials*, pp. 33–54. doi: 10.5949/upo9781846314438.

Williams, D. F. (2009) 'On the nature of biomaterials', *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 30(30), pp. 5897–5909. doi: 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*. Elsevier B.V., 80(1), pp. 1–36. doi: 10.1016/j.mser.2014.04.001.

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

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

Zhengshi, Z. *et al.* (2018) 'Green process to prepare water-insoluble silk scaffolds with silk I structure', *International Journal of Biological Macromolecules*. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.175.