



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E**  
**ENGENHARIA DOS MATERIAIS**

**DESENVOLVIMENTO DE SCAFFOLDS A BASE DE HIDROXIAPATITA E**  
**GOMAS NATURAIS**

**Marcus Vinicius Beserra dos Santos**  
**Edson Cavalcanti da Silva Filho (Orientador)**  
**Ana Leite Oliveira (Coorientadora)**

**Teresina - Piauí**  
**2019**

**MARCUS VINICIUS BESERRA DOS SANTOS**

**DESENVOLVIMENTO DE SCAFFOLDS A BASE DE HIDROXIAPATITA E  
GOMAS NATURAIS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia dos Materiais da Universidade Federal do Piauí – UFPI, como requisito obrigatório à obtenção do título de Doutor em Ciência e Engenharia dos Materiais.

**EDSON CAVALVANTI DA SILVA FILHO (ORIENTADOR)**

**ANA LEITE OLIVEIRA (COORIENTADORA)**

**Teresina-Piauí**

**2019**

S237d Santos, Marcus Vinicius Beserra dos.  
Desenvolvimento de Scaffolds a base de hidroxiapatita e Gomas Naturais. / Marcus Vinicius Beserra dos Santos. – 2019.  
98 f.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portella, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia dos Materiais, Teresina-PI, 2019.  
Orientação: Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho.

1. Hidroxiapatita. 2. Scaffolds. 3. Biocompósito. I. Título.

CDD 620



Programa de Pós-Graduação em  
**CIÊNCIA E ENGENHARIA DOS MATERIAIS**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DOS MATERIAIS – PPGCM

**FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE**

**DISCENTE: MARCUS VINICIUS BESERRA DOS SANTOS**

**TÍTULO DO PROJETO: “DESENVOLVIMENTO DE SCAFFOLDS A BASE DE HIDROXIAPATITA E GOMAS NATURAIS”.**

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho

**BANCA EXAMINADORA:**

**ASSINATURA**

Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho – UFPI  
(Presidente)

Profª. Dra. Ana Leite Oliveira – UNIPORTO  
(Coorientadora)

Profª. Dra. Aluska do Nascimento Simões Braga –  
UFPI (Examinadora Interna)

Profª. Dra. Ana Cristina Vasconcelos Fialho – UESPI  
(Examinadora Externa ao Programa)

Profª. Dra. Cassilda Maria dos Santos Cunha Reis –  
UNIPORTO (Examinadora Externa à Instituição)

Prof. Dr. Antonio Luiz Martins Maia Filho – UESPI  
(Examinador Externo à Instituição)

**DATA DA AVALIAÇÃO:** 30 de Agosto de 2019.

**HORÁRIO:** 09:00h

**LOCAL:** Auditório do PPG em Ciência e Engenharia dos Materiais/UFPI

## DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais *Manoel* e *Francisca*, às minhas irmãs, *Ananda Rosa* e *Clara Fernanda*, à minha querida esposa *Martha Barbosa* e ao meu filho *Miguel Arcanjo*, que sempre me incentivaram, foram refúgio e porto seguro, sem vocês eu não conseguiria.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, Jesus Cristo, o Espírito Santo, a Virgem Maria e a Santa Terezinha do Menino Jesus, pelo dom da vida e pela sabedoria na condução desta realização profissional, pois sempre diante das dificuldades e desafios, me foram mostradas soluções e saídas desconhecidas aos olhos dos homens.

Agradeço a minha família, meus amados pais, Manoel e Francisca, incentivadores e batalhadores para eu estudar. Às minhas queridíssimas irmãs, Ananda Rosa e Clara Fernanda, a minha diletíssima esposa Martha Barbosa e ao meu querido Miguel Arcanjo, todos fieis companheiros e incentivadores nessa jornada. Também agradeço a todos meus familiares, avós, tios, primos, padrinhos e madrinhas que comigo estiveram nessa caminhada.

Agradeço a Universidade Federal do Piauí através de todo corpo docente do programa de pós-graduação em Ciências e Engenharia de Materiais, que com esforço e dedicação sempre passaram o máximo possível de conhecimentos, sempre agregando valores educacionais, profissionais e pessoais, onde cresci como pessoa e profissional. Estendo os agradecimentos ao Centro de Biotecnologia e Química Fina na Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa, onde pude consolidar conhecimentos, executar parte dos experimentos e crescer em conhecimento e sabedoria.

Agradeço ao prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho, orientador, mestre, companheiro, amigo e fonte de inspiração ao que busco como profissional, sempre sabendo dosar incentivos, elogios e puxões de orelha, mas nunca me deixando desanimar perante os desafios impostos pela pesquisa. À prof. Dr<sup>a</sup>. Josy Osajima todo meu agradecimento pelas orientações, conversas, apoio, palavras de incentivo e companhia nessa caminhada. Agradeço à prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Leite Oliveira pelos cuidados, atenção,

acolhida, ensinamentos científicos e pessoais que me foram passados enquanto estive na cidade do Porto.

Aos amigos de graduação que continuaram a caminhar juntos na pós-graduação. Ao grupo de oração Arcanjos do Senhor, fonte de inspiração para oração, que sempre traz calma, sabedoria e revigora a vontade de não desistir perante as dificuldades. Agradeço ao Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados\_LIMAV - UFPI, que foi essencial para o desenvolvimento de todo o trabalho. Aos anjos do LIMAV, no qual represento todos em nome de Kelson Silva, sempre solícito, disposto e ajudando a vencer as dificuldades que a pesquisa possui, o qual levo como meu grande amigo. A todo o grupo de pesquisa, que sempre me ajudaram com as trocas de conhecimentos passados nas reuniões de grupo, companheiros com quem dividi laboratórios, ansiedade, angústias e alegrias. Aqui agradeço de forma especial ao ABBA TEAM, em nome da Dr<sup>a</sup> Cassilda Maria dos Santos Cunha Reis, time formado por pesquisadores comprometidos e acolhedores. Agradeço aos técnicos dos laboratórios, Edgar, Elton e Luciano, companheiros de discussões e sugestões. A todos que participaram, diretamente ou indiretamente, grato eu sou. Aqui fica o meu muito obrigado.

*“Porque, quando me sinto fraco, então é que sou forte”*

*2 Cor 12, 10.*



## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	12
REFERÊNCIAS .....	14
CAPÍTULO 1: A HIDROXIAPATITA NO DESENVOLVIMENTO DE SCAFFOLDS PARA APLICAÇÃO NA REGENERAÇÃO ÓSSEA – MÉTODOS DE OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÕES E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS .....	16
1.0 Introdução.....	18
2.0 Desenvolvimento de scaffolds de Hidroxiapatita.....	21
2.1 Secagem a vácuo (Liofilização) .....	21
2.2 Lixiviação (Solvent casting).....	21
2.3 Robocasting .....	22
2.4 Eletrofiação (Electrospinning).....	22
3.0 Caracterizações físico-químicas, mecânica e biológicas aplicadas aos scaffolds ....	23
3.1 Difractometria de raios X (DRX).....	23
3.2 Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	24
3.3 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV).....	24
3.4 Teste mecânico de compressão .....	25
3.5 Teste de viabilidade celular .....	25
3.6 Teste de atividade hemolítica .....	26
4.0 Considerações Finais .....	27
5.0 Agradecimentos .....	27
6.0 Referências .....	27
CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO DE SCAFFOLDS COMPOSTOS POR HIDROXIAPATITA E GOMA GELANA – SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO .....	32

1.0 Introdução.....	34
2.0 Materiais E Método .....	36
2.1 Materiais .....	36
2.2 Síntese de HAp e Ce-HAp.....	36
2.3 Preparo dos Scaffolds .....	36
2.4 Caracterizações físico-químicas .....	37
2.4.1 Difração de Raios-X (DRX).....	37
2.4.2 Espectrofotometria de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	37
2.4.3 Análise termogravimétrica (TG) .....	37
2.5 Morfologia.....	38
2.6 Testes de compressão .....	38
3.0 Resultados E Discussão.....	38
3.1 DRX.....	38
3.2 FTIR .....	41
3.3 TG/DTG .....	43
3.4 MEV .....	45
3.5 Teste Mecânico.....	49
4.0 Considerações Finais .....	50
5.0 Agradecimentos .....	50
6.0 Referências .....	50
<b>CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO DE SCAFFOLD COMPOSTO POR HIDROXIAPATITA DOPADA COM CÉRIO E GOMAS NATURAIS: PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E MECÂNICAS .....</b>	<b>63</b>

1.0 Introdução.....	65
2.0 Parte Experimental .....	67
2.1 materiais e reagentes.....	67
2.2 Isolamento da goma do cajueiro.....	68
2.3 Síntese do compósito de hidroxiapatita dopada com Cério e GC .....	68
2.4 Síntese Dos Scaffolds .....	69
2.5 Caracterização Físico-Química Dos Materiais .....	69
2.6 Testes de caracterização In Vitro.....	70
2.6.1 Teste de degradação.....	70
2.6.2 Ensaio de MTT e Hemólise .....	70
2.6.2.1 Ensaio MTT.....	70
2.6.2.2 Hemólise (Ensaio de atividade hemolítica).....	71
3.0 Resultados e Discussão.....	72
3.1 Caracterização dos Compósitos.....	72
3.2 Caracterização In Vitro.....	84
3.3 Teste Mecânico.....	87
4.0 Considerações Finais .....	87
5.0 Agradecimentos .....	88
6.0 Referências .....	88
<i>Considerações Finais</i> .....	98

## ***APRESENTAÇÃO***

Avanços tecnológicos têm dado à população mundial maior expectativa e qualidade de vida. A área multidisciplinar chamada de engenharia de tecidos têm combinado conhecimentos da área médica com engenharia de materiais e tem ofertado à população novas estratégias para cuidados relacionados ao tecido ósseo, com procedimentos de implantes e próteses, tratando patologias inerentes a população com idade avançada[1].

Neste cenário, os biomateriais se destacam como material apropriado para utilização na engenharia de tecidos, pois conseguem reunir em si características como excelentes propriedades mecânicas, biocompatibilidade, além de apresentar similaridade química com o organismo humano[2].

A hidroxiapatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , HAp, está entre os principais biomateriais utilizados na engenharia de tecido, devido ao fato de ser componente inorgânico tanto do tecido ósseo como do tecido dentário. Atualmente, os fatores motivadores nesse biomaterial está no fato de serem osteoindutores, osteogênicos e não tóxicos [3]. Entretanto, a HAp pode apresentar baixa reabsorção do organismo como também baixa tenacidade quando submetida a esforços mecânicos[4].

Apesar de todos os pontos positivos citados, substituições iônicas se mostram como alternativa no objetivo de aprimorar as propriedades mecânicas e biológicas da hidroxiapatita, já que íons de  $\text{Ca}^{2+}$  podem ser substituído por vários íons divalentes e trivalentes, como o  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ce}^{3+}$ ,  $\text{La}^{3+}$ , oportunizando uma variação nas características da HAp[5].

O desenvolvimento de novos materiais utilizados na engenharia de tecido tem passado pela utilização de diversos biopolímeros, que devido a sua origem natural, são

abundantes na natureza, não tóxicos, e acrescentam características como biodegradabilidade, biocompatibilidade e possibilidade de modelação aos novos materiais, como exemplo, a utilização de polissacarídeos, onde pode-se citar a goma do cajueiro e a goma gelana. [6,7].

Dado o exposto, o referente estudo desenvolvido no doutorado buscou o desenvolvimento de materiais voltado para aplicação na engenharia de tecidos óssea, conhecido como *scaffolds*. O estudo se iniciou com pesquisa bibliográfica acerca da hidroxiapatita, das rotas de sínteses dos *scaffolds* com a HAp e das caracterizações e teste utilizados, norteando a pesquisa executada no laboratório.

Experimentalmente, o estudo iniciou com a síntese da hidroxiapatita, seguindo para o desenvolvimento de diferentes *scaffolds*, com as especificidades de cada *scaffold* sendo por conta da variação da composição de cada *scaffolds*. As variações das composições estão na substituição de  $\text{Ca}^{2+}$  da HAp por íons de cério e presença/ausência do biopolímero da goma do cajueiro, já que a goma gelana sempre esteve presente nas composições.

No estudo, foram desenvolvidos três *scaffolds* diferentes. O primeiro *scaffold*, o  $S_H$ , tem sua composição determinada pela hidroxiapatita e a goma gelana. O *scaffold*  $S_{CH}$ , tem sua composição dada por hidroxiapatita dopada com cério – CeHAp – e goma gelana. O terceiro *scaffolds* desenvolvido,  $S_{HG}$ , traz em sua composição a presença de dois biopolímeros, a goma do cajueiro e a goma gelana, além da presença da substituição de íons de cálcio por íons de cério. A presença da goma do cajueiro está atrelada por ser atóxica, biodegradável, ser de baixo custo e ter propriedade anti-inflamatória, cicatrizante, agente antimicrobiano[8–10], além de agir como agente adesivo, características enriquecedoras ao *scaffold*  $S_{HG}$ .

Os artigos que seguem revelam as propriedades e características dos *scaffolds*, mostrando caminhos utilizados para sucesso das sínteses. Se faz necessário dizer que ainda há desafios que deverão ser vencidos, para que em um futuro não muito distante, a tecnologia aqui desenvolvida contribua eficazmente para a melhora da expectativa e qualidade de vida de todos nós.

## REFERÊNCIAS

- [1] E.H. Fragal, T.S.P. Cellet, V.H. Fragal, M.V.P. Companhoni, T. Ueda-Nakamura, E.C. Muniz, R. Silva, A.F. Rubira, Hybrid materials for bone tissue engineering from biomimetic growth of hydroxiapatite on cellulose nanowhiskers, *Carbohydr. Polym.* 152 (2016) 734–746. doi:10.1016/j.carbpol.2016.07.063.
- [2] W.S.W. Harun, R.I.M. Asri, J. Alias, F.H. Zulkifli, K. Kadirgama, S.A.C. Ghani, J.H.M. Shariffuddin, A comprehensive review of hydroxyapatite-based coatings adhesion on metallic biomaterials, *Ceram. Int.* 44 (2018) 1250–1268. doi:10.1016/j.ceramint.2017.10.162.
- [3] B. Yilmaz, A.Z. Alshemary, Z. Evis, Co-doped hydroxyapatites as potential materials for biomedical applications, *Microchem. J.* 144 (2019) 443–453. doi:10.1016/j.microc.2018.10.007.
- [4] A. Sygnatowicz, M.; Keyshar, K.; Tiwari, Antimicrobial Properties of Silver-doped Hydroxyapatite Nano-powders and Thin Films, *Biol. Biomed. Mater.* 62 (2010) 65–70.
- [5] R. V. Suganthi, K. Elayaraja, M.I.A. Joshy, V.S. Chandra, E.K. Girija, S.N. Kalkura, Fibrous growth of strontium substituted hydroxyapatite and its drug release, *Mater. Sci. Eng. C.* 31 (2011) 593–599. doi:10.1016/j.msec.2010.11.025.
- [6] A.E. Aguiar, M. de O. Silva, A.C.D. Rodas, C.A. Bertran, Mineralized layered films of xanthan and chitosan stabilized by polysaccharide interactions: A promising material for bone tissue repair, *Carbohydr. Polym.* 207 (2019) 480–491. doi:10.1016/j.carbpol.2018.12.006.
- [7] J. Liu, S. Willför, C. Xu, A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications, *Bioact. Carbohydrates Diet. Fibre.* 5 (2015) 31–61. doi:10.1016/j.bcdf.2014.12.001.
- [8] L.T. dos R. Corrêa, A.G.S. de Laia, H. de S. Costa, Processamento e caracterização de hidrogéis a base de alginato e goma gelana visando aplicações em articulações, 14º Congr. Da Soc. Lat. Am. Biomateriais, Órgãos Artif. e Eng. Tecidos - SLABO. (2017) 427–436.

- [9] A.C. Ribeiro, P. Eaton, D.A. Campos, C. Eiras, M. Manuela Pintado, J.R.S.A. Leite, E.M. Costa, F.B. Araruna, F.K. Tavoria, J.C. Fernandes, Study of antimicrobial activity and atomic force microscopy imaging of the action mechanism of cashew tree gum, *Carbohydr. Polym.* 90 (2012) 270–274. doi:10.1016/j.carbpol.2012.05.034.
- [10] V.K. Shingala, A.K. Singh, S.K. Yadav, T. Sivakumar, Design and characterization of diclofenac sodium tablets containing *Mangifera indica* resin as release retardant, *Int. J. PharmTech Res.* 2 (2010) 2107–2111.

**CAPÍTULO 1: A HIDROXIAPATITA NO DESENVOLVIMENTO DE  
SCAFFOLDS PARA APLICAÇÃO NA REGENERAÇÃO ÓSSEA –  
MÉTODOS DE OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÕES E  
PROPRIEDADES BIOLÓGICAS**



# **A HIDROXIAPATITA NO DESENVOLVIMENTO DE SCAFFOLDS PARA APLICAÇÃO NA REGENERAÇÃO ÓSSEA – MÉTODOS DE OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÕES E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS**

<sup>1</sup> Universidade Federal do Piauí ; [mvbeserradossantos@gmail.com](mailto:mvbeserradossantos@gmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal do Piauí; [edsonfilho@ufpi.edu.br](mailto:edsonfilho@ufpi.edu.br)

## **Resumo**

O desenvolvimento de novas tecnologias vem contribuindo para o aumento da expectativa e qualidade de vida da sociedade. Dentre as diversas áreas em que ocorreram avanços, um ramo área médica e da ciência dos materiais tem buscado desenvolver materiais que auxiliem no tratamento das doenças relacionadas ao tecido ósseo. Assim sendo, materiais cerâmicos como os fosfatos de cálcio, com evidência para a hidroxiapatita, ganharam ênfase na área da ortopedia com sua utilização como biomateriais em próteses, por apresentarem características como biocompatibilidade, osteointegração e osteoindução. Deste modo, este trabalho traz uma revisão sobre a utilização da hidroxiapatita aplicado à engenharia de tecidos através do desenvolvimento de scaffolds, observando as diversas metodologias de síntese, as técnicas de caracterizações utilizadas e estudos de toxicidade que podem ser aplicados aos scaffolds.

Palavras-chave: Hidroxiapatita, Scaffolds, Revisão.

## **Abstract**

The development of new technologies has contributed to increasing the expectation and quality of life of society. Among the several areas in which advances have taken place, a medical and materials science branch has sought to develop materials that assist in the treatment of bone tissue diseases. Thus, ceramic materials such as calcium phosphates, with evidence for hydroxyapatite, have gained emphasis in the area of orthopedics with their use as prosthetic biomaterials, as they have characteristics such as biocompatibility, osteointegration and osteoinduction. So, this paper reviews the use of hydroxyapatite applied to tissue engineering through the development of scaffolds, observing the various

synthesis methodologies, characterization techniques used and toxicity studies that can be applied to scaffolds.

Keywords: Hydroxyapatite, Scaffolds, Review.

## **1.0 Introdução**

O estado saudável do organismo humano no decorrer da vida depende, entre outras habilidades, da capacidade de autorregenerar-se das diversas lesões sofridas nas mais diferentes partes do corpo no decorrer da vida [1,2]. Aliado a esta realidade, o desenvolvimento de novas tecnologias tem proporcionado um maior tempo de vida, conseqüentemente, maior tem sido a ocorrência de traumas, lesões e infecções que a sociedade tem experimentado [3].

Entre as diversas soluções buscadas para se vencer os obstáculos inerentes à qualidade de vida citados acima, há uma área da ciência multidisciplinar que utiliza os princípios da ciência da vida e de engenharia no desenvolvimento de materiais biológicos para auxiliar a restaurar, regenerar ou até mesmo substituir órgãos inteiros do organismo. Esta área é chamada de engenharia de tecidos [4,5].

A ideia de engenharia de tecidos surgiu por volta do ano de 1990 quando o doutor Joseph Vacanti em parceria com o doutor Robert Langer do Massachusetts Institute of Technology, MIT, propuseram desenvolver um sistema de entrega de células saudáveis a um local lesionado, diferindo de uma técnica existente e bastante aplicada na época, que é a semeadura de células saudáveis sobre o tecido lesionado, visto que as condições de crescimento celular no local da lesão são adversas devido às propriedades físico-químicas do ambiente serem difíceis de se controlar [4].

Para Langer (1993) a ideia principal da engenharia de tecidos é conseguir transportar material biológico, como exemplos, moléculas, proteínas, células que auxiliem na regeneração dentro de um material degradável e poroso. A porosidade é característica intrínseca e de suma importância, pois os poros levam as células que atuarão na regeneração do tecido lesionado [6].

O entendimento sobre a engenharia de tecidos se dá inicialmente com a compreensão dos biomateriais. Segundo Kim (2014) os biomateriais são materiais que têm apresentado grande destaque devido a possibilidade da interação deste com os seres vivos [7]. Os biomateriais podem ser definidos como um material ou combinação de materiais de origem natural ou sintética que pode ser usado como parte ou o todo de um sistema em que esteja sendo tratado ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo [7,8].

A definição dos biomateriais nos leva a compreender o motivo deles serem constantemente utilizados nas mais diversas áreas da medicina cirúrgica, tais como urologia, ginecologia, ortopedia, odontologia, cardiologia entre outras [8]. A interação do corpo com o material implantado é crucial para o sucesso da intervenção, visto que imediatamente após a implantação de qualquer material externo ao organismo, é iniciado imediatamente uma reação do organismo contra o corpo estranho [9].

A tentativa de combate contra a rejeição do organismo ao corpo estranho se deu inicialmente pela utilização de material do próprio organismo do paciente, processo conhecido como autoenxerto. Porém a desvantagem desse procedimento esbarrava na pequena quantidade de material disponível para utilização [10]. Os aloenxertos e os xenoenxertos apareceram como solução para o problema da pequena quantidade de material do autoenxerto, porém esbarraram em limitações como risco de rejeição ou de inoperância após o implante [11,12].

Frente às dificuldades citadas acima, alguns biomateriais sintéticos têm se mostrado como excelente estratégia para se vencer a limitação de disponibilidade de materiais que serão utilizados como enxerto. Entre os diversos biomateriais sintéticos, a hidroxiapatita (HAp) tem ganho destaque devido as propriedades químicas e físicas que a tornam semelhante à hidroxiapatita encontrada no tecido ósseo e dentário [13]. As características que possibilitam a utilização da hidroxiapatita como enxerto se deve às propriedades de biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade que esta apatita pode apresentar [14,15].

A HAp é uma das formas mais comuns dos fosfatos de cálcio, e que tem fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . A HAp é um composto isomórfico, que se cristaliza

em um sistema hexagonal P63/m, com os parâmetros cristalográficos  $a = b = 9,418 \text{ \AA}$ ,  $c = 6,881 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = 90^\circ$  e  $\gamma = 120^\circ$  (JCPDS N° 9 – 432)[16,17]. A estrutura que a rede cristalina da HAp estequiométrica pode ser descrita como um compacto irregular de grupos  $\text{PO}_4$  tetraédricos, um conjunto de poliedros  $\text{Ca}_1\text{O}_9$  e grupos pentagonais bipiramidais  $\text{Ca}_2\text{O}_6\text{OH}$  unidos por grupos de tetraedros regulares de  $\text{PO}_4$ , como mostrado na figura 1.

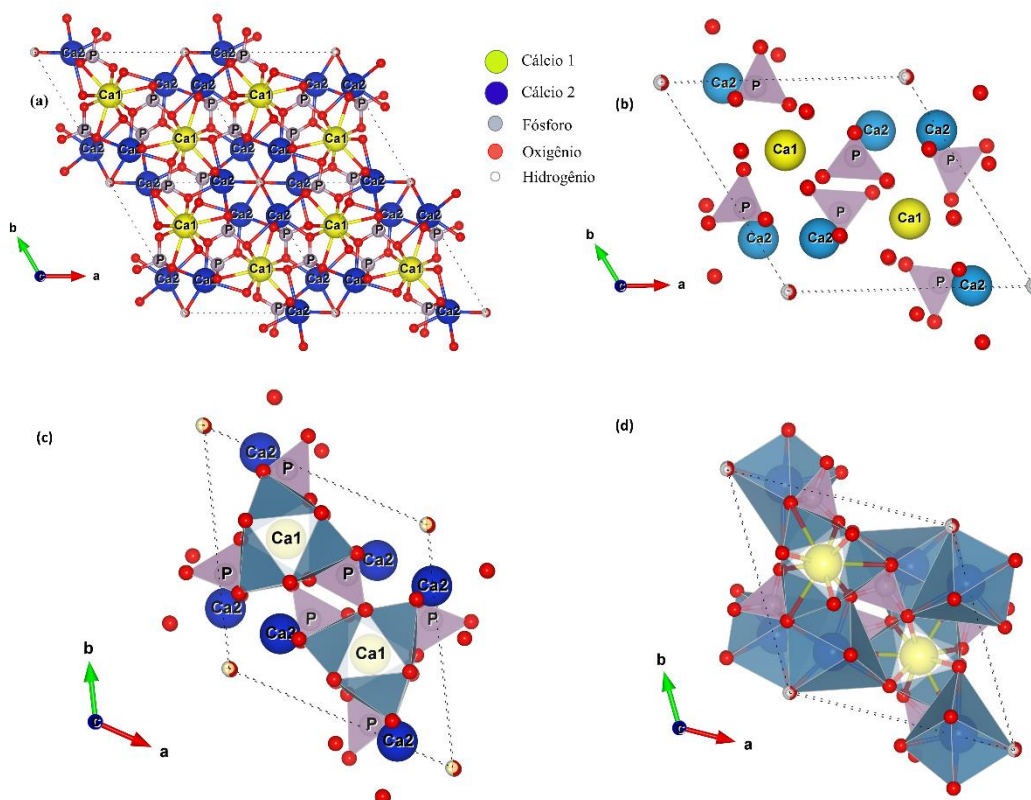


Figura 1: (a) Representação da célula unitária da hidroxiapatita, (b) representação da célula unitária da hidroxiapatita com destaque para os grupos  $\text{PO}_4$  tetraédricos. (c) representação da célula unitária da HAp com destaque para os poliedros  $\text{Ca}_1\text{O}_9$  e grupos pentagonais bipiramidais. (d) representação da HAp em forma poliedral. Fonte: Autoria própria com auxílio do software VESTA.

Dessa forma, esta revisão tem como objetivo oferecer informações sobre os processos de sínteses para o desenvolvimento de scaffolds a base de hidroxiapatita, trazendo informações das principais técnicas de caracterizações utilizadas para descrever

os scaffolds, como também de expor alguns testes de biocompatibilidade empregados na aplicação no desenvolvimento de scaffolds na engenharia óssea.

## **2.0 Desenvolvimento de scaffolds de Hidroxiapatita**

O desenvolvimento de *scaffolds* de hidroxiapatita para aplicação na engenharia de tecido ósseo passa por diferentes técnicas de sínteses. Os diferentes métodos de síntese de *scaffolds* ocorrem para poder variar a morfologia que cada *scaffolds* apresentará, como exemplos os grãos nanométricos, as estruturas em 3D, os pós, os fios ou ainda em diversos formatos, buscando se obter um *scaffold* que seja poroso, osteocondutor, osteogênico, atóxico e biodegradável. A seguir será mostrado diferentes rotas de síntese de *scaffolds*.

### **2.1 Secagem a vácuo (Liofilização)**

O processo de liofilização é uma técnica de secagem amplamente utilizada para desidratar alimentos, mas que também pode ser usada para secagem de materiais. O processo é utilizado para remover a água através da sublimação de cristais de gelo, e para isso, a amostra deve estar a uma temperatura menor que 0 °C [18]. A liofilização é um processo baseado em duas etapas, onde a primeira etapa refere-se ao congelamento dos materiais e a segunda etapa se refere ao processo de sublimação dos cristais de água presente no material [19].

O processo de liofilização também pode influenciar nas propriedades finais dos materiais sintetizados. Piazza et al. e colaboradores [19] mostraram que a utilização da liofilização como técnica de secagem proporcionou a obtenção de nanocristalitos de fosfatos de cálcio para aplicação em regeneração óssea, pois, diferentemente de outras técnicas que utilizam a precipitação, a liofilização resultou em partículas menores devido a interrupção da maturação dos cristais na etapa do congelamento [19]. Outra propriedade que também pode ser alterada com a utilização da liofilização é a porosidade. Santos et al e colaboradores utilizaram a liofilização para confeccionar scaffold poroso de hidroxiapatita e gomas naturais [20].

### **2.2 Lixiviação (Solvent casting)**

A técnica de *solvent casting* é largamente utilizada na síntese de scaffolds por obter materiais com elevada porosidade [21]. Utilizada no desenvolvimento de scaffolds

poliméricos, a técnica apresenta um princípio muito simples, onde o polímero é dissolvido em solvente apropriado, seguido da adição de um sal insolúvel à solução polimérica. Posteriormente ocorre a evaporação do solvente, onde o scaffold é lavado para se retirar as partículas de sal insolúveis presente na estrutura do scaffold[22].

É um procedimento simples, que não necessita de equipamentos sofisticados, e que permite controlar fatores como a porosidade, tamanho dos poros e interconectividade[22]. Entretanto, algumas desvantagens podem ser citadas, como propriedades mecânicas limitadas e resquícios de solvente nos scaffolds[21]. Rangunathan et al. e colaboradores utilizaram a técnica de lixiviação para obter scaffolds de hidroxiapatita com amido polimérico natural na proporção de 1:1. Os scaffolds sintetizados foram eficazes a resistências mecânica, apresentando poros com variação de 14 a 17  $\mu\text{m}$ , reforçando que os tamanhos dos poros estão relacionados ao sal utilizado no processo de lixiviação[23].

### **2.3 Robocasting**

O *robocasting* é uma técnica de produção de scaffolds através da combinação de energia sequencial automatizada subsidiada por softwares computacionais, permitindo assim o desenvolvimento de scaffolds com tamanhos dos poros ajustáveis, proporcionando a confecção de poros interconectados, oportunizando o crescimento celular, além de permitir uma excelente resposta frente às propriedades mecânicas. Assim o *robocasting* é uma técnica que permite adaptar projetos de acordo com a necessidade dos tamanhos dos poros e das propriedades mecânicas [24].

Como mencionado acima, o *robocasting* oferece o controle sobre a forma e tamanho, o que permite o desenvolvimento de scaffolds sob medidas para cada paciente, ou seja, um scaffold personalizável e com as características singulares de cada indivíduo [25]. Vale ressaltar que a utilização de um sistema controlado por software permite um controle específico da estrutura dos scaffolds, lhe conferindo um alto grau de homogeneidade e reprodutibilidade [24].

### **2.4 Eletrofiação (Electrospinning)**

A eletrofiação é uma técnica de desenvolvimento de scaffolds utilizada para a confecção de scaffolds composto de fibras ultrafinas de polímeros biodegradáveis. Em

linhas gerais, a eletrofição é um processo de impressão baseado em bicos onde polímeros que apresentam alta viscosidade e baixa condutividade são guiados através de força eletrostática devido à alta tensão aplicada entre a fieira e o coletor, fazendo com que essas fibras tenham morfologia muito mais fina em comparação às fibras obtidas por outras técnicas [26].

Entre as vantagens da utilização da eletrofição está a elevada área superficial obtida, somada às boas propriedades biomecânicas. Entretanto, algumas desvantagens podem ser atreladas a eletrofição, sendo a semeadura celular, além da relação inversa que existe devido a espessura da fibra e o tamanho dos poros, lembrando que as espessuras das fibras afetam diretamente o as propriedades mecânicas que os scaffolds apresentaram[21].

### **3.0 Caracterizações físico-químicas, mecânica e biológicas aplicadas aos scaffolds**

Entender a composição e a morfologia dos scaffolds, somado ao comportamento que eles terão quando estiverem sendo aplicados para o fim que se destinam é de extrema importância para sua avaliação e validação. Dessa forma, algumas análises físico-químicas, análises biológicas e de propriedades mecânicas se fazem necessárias para compreender as respostas que os scaffolds terão no organismo. Dessa forma esta seção tratará algumas das análises às quais os scaffolds podem ser caracterizados.

#### **3.1 Difractometria de raios X (DRX)**

A difratometria de raios X, DRX, é uma técnica utilizada para se conhecer o arranjo dos átomos no interior de um sólido. O princípio da técnica se baseia na emissão de raios X de frequência única, monocromática, sobre a amostra pulverizada que será analisada, com o sinal da intensidade da difração sendo medida através do movimento do detector em diferentes comprimentos de onda em diferentes ângulos. Cada padrão obtido é característico de cada amostra e pode ser utilizado para identificação de cada material por meio da comparação com um banco de dados [27].

O bando de dados que é utilizado para comparação com os dados experimentais obtidos é o banco do Centro internacional para Dados de Difração, o ICDD. O ICDD é um centro que trabalha com a coleta, edição, publicação e distribuição de dados

da difração de pó para auxiliar na identificação de materiais. Os dados são fornecidos com base no espaçamento do ângulo de difração e na intensidade da radiação difratada[28].

No desenvolvimento de scaffolds para aplicação no tecido ósseo, o DRX atua identificando a fase do material cristalino, apresentando os planos cristalinos que o material possui. Santos *et al* 2019, utilizou a difratometria de raios X para identificação da fase de hidroxiapatita no scaffold composto por hidroxiapatita e goma de cajueiro, podendo assim comprovar a presença da fase desejada do material cerâmico no scaffolds desenvolvido[29].

### ***3.2 Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)***

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica que se fundamenta nas deformações, vibrações, sofridas pelas ligações dos átomos por meio da absorção de radiação de infravermelho, radiações que tem comprimento de onda típico de aproximadamente 1000 nm. As moléculas que têm em sua composição átomos leves e ligações fortes apresentam frequência vibracional maior em comparação as moléculas que tem átomos pesados e ligações fracas [27].

A utilização da espectroscopia no infravermelho tem contribuído para identificar grupamentos iônicos e moleculares presentes na composição dos scaffolds. Dessa forma, o espectro obtido contribui para revelar os constituintes dos scaffolds. Em trabalhos recentes que desenvolveram scaffolds a base de hidroxiapatita, os espectros de infravermelho revelaram a presença de grupos fosfatos, constituinte da estrutura da hidroxiapatita. Os espectros também revelaram a presenças do grupamento hidroxila [20,29–31].

### ***3.3 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)***

A microscopia eletrônica de varredura tem se tornada uma técnica bastante requisitada por pesquisadores devido aos excelentes resultados alcançados através da detecção das lentes, pois tem permitido se alcançar imagens com elevado poder de resolução para diferentes classes de materiais. A técnica é baseada na desmagnetização de um feixe de elétrons que varre a superfície da amostra. A interação entre a amostra e os elétrons produz diferentes tipos de emissões, sendo emissões de elétrons secundários



(SEs) que contribuem para a obtenção das informações morfológicas e emissões de elétrons retroespalhados (BSEs), que fornecem informações sobre o contraste topológico [32].

No desenvolvimento dos scaffolds, além de revelar a morfologia do material sintetizado, o MEV tem sido uma ferramenta poderosa para se comprovar mais duas propriedades inerentes a função que será desenvolvida pelos scaffolds, sendo uma a presença de poros na estrutura do scaffold e a capacidade de interação do scaffold no processo de mineralização e desmineralização [20,33].

A microscopia também tem sido ferramenta poderosa no estudo de scaffold pelo método de síntese de *electrospinning*, pois as imagens de MEV têm revelado o desenvolvimento de materiais com poros ordenados, além de mostrar que as fibras possuem características bem definidas [26,34].

### **3.4 Teste mecânico de compressão**

Entender a resposta dos scaffolds à compressão mecânica é fundamental para se prosseguir com a sua aplicação. Os scaffolds que serão utilizados na substituição óssea devem corresponder com a resistência à compressão mínima necessária da mesma forma que o osso, para assim, serem aplicados como enxerto. É válido frisar que ossos de diferentes partes do corpo possuem diferentes valores de resistência à compressão [35].

Partindo da referência de que a resistência mecânica encontrada no osso cortical e osso esponjoso são diferentes e que elas variam entre os valores de 130-180 MPa e 4-12 MPa, respectivamente, para cada tipo de tecido, tornando possível direcionar a qual parte do corpo poderá receber o scaffold [36]. É válido ressaltar que o osso esponjoso é utilizado como a melhor opção em cirurgias de substituição ósseas, pois apresenta porosidade, além de conduzir a osteogênese. Por essas propriedades, o osso esponjoso é conhecido como padrão ouro por especialistas na área da ortopedia[37].

### **3.5 Teste de viabilidade celular**

O teste de viabilidade celular é um teste *in vitro* que permite verificar a toxicidade dos materiais em relação às células através da viabilidade celular em termos da capacidade das células metabolicamente ativas [38]. O teste ocorre com a utilização

do reagente brometo de 3-[4,5dimetiltiazol-zil]-2,5-difeniltetrazolio, conhecido também como MTT. O MTT é um método colorimétrico que se baseia no metabolismo da enzima mitocondrial succinato desidrogenase, que converte o sal amarelo do MTT em um cristalino roxo de formazan que é solúvel em água. O resultado do teste se dá através da medida de comprimento de onda específico em 550 nm [39].

Sob condições adequadas, os resultados obtidos são diretamente proporcionais ao valor do número de células vivas. É válido destacar que o MTT é uma técnica amplamente difundida e aplicada às células de mamíferos, bactérias e fungos. Entretanto é válido destacar que alguns resultados podem divergir, o que pode gerar até incoerência. As divergências ocorridas se devem às novas adaptações experimentais que o método tem passado por meio da sua aplicação em novas metodologias sem que tenha ocorrido uma otimização dos protocolos de MTT [40].

### **3.6 Teste de atividade hemolítica**

O teste de atividade hemolítica tem sido utilizado para quantificar a lise dos glóbulos vermelhos por meio de diluições seriadas [41]. Esse teste é aplicado buscando-se entender a interação dos materiais implantados, neste caso, a interação dos scaffolds em relação aos fluidos corporais, especificamente o sangue. O teste de atividade hemolítica determina a extensão da hemólise provocada pelos materiais [42].

O cálculo para se determinar a porcentagem de hemólise é dado pela equação 1.

$$\text{Hemolise (\%)} = \frac{DO_{(teste)} - DO_{(negativa)}}{DO_{(positiva)} - DO_{(negativa)}} \cdot 100 \quad (\text{eq. 1})$$

sendo que, DO é a densidade optica da absorção da luz em um espectrômetro de UV-Vis no comprimento de onda de 545 nm. A solução utilizada para provocar a ruptura em larga escala das hemácias é o controle positivo ( $DO_{(positivo)}$ ). O controle negativo ( $DO_{(negativo)}$ ) é obtido através da solução de 0,2 mL de sangue diluído em 10 mL de solução salina. Tanto o ( $DO_{(positivo)}$ ) como o ( $DO_{(negativo)}$ ) e o valor da hemólise são encontrados em espectrômetro de UV-Vis no comprimento de onda de 545 nm como citado anteriormente[42].

A classificação da atividade hemolítica é dada através da comparação do valor da hemólise provocada pelo material estudado por meio da porcentagem, onde, materiais que apresentem hemólise menor que 5% são considerados materiais altamente hemocompatíveis, ao tempo que materiais com hemocompatibilidade acima de 20% não são considerados hemocompatíveis [20,42].

#### **4.0 Considerações Finais**

O estudo vem mostrar a diversidade nas rotas de síntese dos scaffolds a base de hidroxiapatita, e que, dependendo do objetivo e da aplicação de cada scaffold sintetizado, poderá existir uma ou mais rotas de sínteses mais indicadas, o que permitirá variação do tamanho de poros e controle da arquitetura do scaffold, como no caso da síntese por robocasting. Sobre as caracterizações aplicadas aos scaffolds, nota-se que suas utilizações passam por comprovar, a nível molecular, a similaridade e a composição química com o lugar que será aplicado, como também a sua organização estrutural, citando a utilização do DRX e do FTIR. A microscopia se apresenta como técnica que revelará a morfologia do scaffold, ao tempo em que também revelará a presença dos poros na estrutura. Os testes de citotoxicidade, MTT e hemólise, vem simular como será a interação do material com o organismo humano, pois o comportamento das hemácias e das células revelarão a presença ou ausência de toxicidade do material. Em se tratando de um candidato a substituinte ósseo, o teste mecânico vem averiguar a resistência mecânica, para garantir que o scaffolds desenvolvido resistirá à compressão no momento do esforço físico.

#### **5.0 Agradecimentos**

CAPES, CNPq, FAPEPI e UFPI pelo financiamento e suporte.

#### **6.0 Referências**

- [1] M. Ishii, J. Kikuta, Y. Shimazu, M. Meier-Schellersheim, R.N. Germain, Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling in vivo, *J. Exp. Med.* 207 (2010) 2793–2798. doi:10.1084/jem.20101474.
- [2] N.A. Sims, T.J. Martin, Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit, *Bonekey Rep.* 3 (2014)

- 1–10. doi:10.1038/bonekey.2013.215.
- [3] S. Saber-Samandari, S. Saber-Samandari, F. Ghonjizade-Samani, J. Aghazadeh, A. Sadeghi, Bioactivity evaluation of novel nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering: The impact of hydroxyapatite, *Ceram. Int.* 42 (2016) 11055–11062. doi:10.1016/j.ceramint.2016.04.002.
- [4] J.P. Langer, Robert. Vacanti, *Tissue Engineering, Science* (80-. ). 260 (1993) 920–926.
- [5] W. Liu, D. Wang, J. Huang, Y. Wei, J. Xiong, W. Zhu, L. Duan, J. Chen, R. Sun, D. Wang, Low-temperature deposition manufacturing: A novel and promising rapid prototyping technology for the fabrication of tissue-engineered scaffold, *Mater. Sci. Eng. C* 70 (2017) 976–982. doi:10.1016/j.msec.2016.04.014.
- [6] M. Fröhlich, W.L. Grayson, L.Q. Wan, D. Marolt, M. Drobic, G. Vunjak-, *Tissue Engineered Bone Grafts : Biological Requirements , Tissue Culture and Clinical Relevance*, (2008) 254–264.
- [7] T. Il Kim, A tribute to Dr. Per-Ingvar Brånemark, *J. Periodontal Implant Sci.* 44 (2014) 265. doi:10.5051/jpis.2014.44.6.265.
- [8] G. Binyamin, B.M. Shafi, C.M. Mery, *Biomaterials: A primer for surgeons*, *Semin. Pediatr. Surg.* 15 (2006) 276–283. doi:10.1053/j.sempedsurg.2006.07.007.
- [9] J.M. Anderson, A. Rodriguez, D.T. Chang, Foreign body reaction to biomaterials, *Semin. Immunol.* 20 (2008) 86–100. doi:10.1016/j.smim.2007.11.004.
- [10] D. Mata, F.J. Oliveira, M.A. Neto, M. Belmonte, A.C. Bastos, M.A. Lopes, P.S. Gomes, M.H. Fernandes, R.F. Silva, Smart electroconductive bioactive ceramics to promote in situ electrostimulation of bone, *J. Mater. Chem. B* 3 (2015) 1831–1845. doi:10.1039/C4TB01628A.
- [11] B. Arabkhani, J.A. Bekkers, E.R. Andrinopoulou, J.W. Roos-Hesselink, J.J.M. Takkenberg, A.J.J.C. Bogers, Allografts in aortic position: Insights from a 27-year, single-center prospective study, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 152 (2016) 1572–1579.e3. doi:10.1016/j.jtcvs.2016.08.013.
- [12] A.H. Aparecida, M. Vinícius, L. Fook, M. Luis, C. Guastaldi, D. De Físico-química, I. De Química, U.E. Paulista, R.F. Degni, Estudo da influência dos íons  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $SO_4^{2-}$  e  $CO_3^{2-}$  na cristalização biomimética de fosfato de cálcio amorfo (ACP) e conversão a fosfato octacálcico (OCP), 30 (2007) 892–896.
- [13] U. Erdem, M. Dogan, A.U. Metin, S. Baglar, M.B. Turkoz, M. Turk, S. Nezir, Hydroxyapatite-based nanoparticles as a coating material for the dentine surface: An antibacterial and toxicological effect, *Ceram. Int.* 46 (2019) 270–280. doi:10.1016/j.ceramint.2019.08.260.

- [14] A. Labanni, Zulhadjri, D. Handayani, Y. Ohya, S. Arief, Size controlled synthesis of well-distributed nano-silver on hydroxyapatite using alkanolamine compounds, *Ceram. Int.* (2019). doi:10.1016/j.ceramint.2019.11.035.
- [15] A. Szcześ, L. Hołysz, E. Chibowski, Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications, *Adv. Colloid Interface Sci.* 249 (2017) 321–330. doi:10.1016/j.cis.2017.04.007.
- [16] M.I. KAY, R.A. YOUNG, A.S. POSNER, Crystal Structure of Hydroxyapatite, *Nature*. 204 (1964) 1050–1052. doi:10.1038/2041050a0.
- [17] A. El Khouri, A. Zegzouti, M. Elaatmani, F. Capitelli, Bismuth-substituted hydroxyapatite ceramics synthesis: Morphological, structural, vibrational and dielectric properties, *Inorg. Chem. Commun.* (2019) 107568. doi:10.1016/j.inoche.2019.107568.
- [18] C. Chi, X. Li, Y. Zhang, S. Miao, L. Chen, L. Li, Y. Liang, Understanding the effect of freeze-drying on microstructures of starch hydrogels, *Food Hydrocoll.* (2019) 105509. doi:10.1016/j.foodhyd.2019.105509.
- [19] R.D. Piazza, T.A.G. Pelizaro, J.E. Rodriguez-Chanfrou, A.A. La Serna, Y. Veranes-Pantoja, A.C. Guastaldi, Calcium phosphates nanoparticles: The effect of freeze-drying on particle size reduction, *Mater. Chem. Phys.* 239 (2020). doi:10.1016/j.matchemphys.2019.122004.
- [20] M. Vinicius Beserra dos Santos, L. Bastos Nogueira Rocha, E. Gomes Vieira, A. Leite Oliveira, A. Oliveira Lobo, M.A.M. de Carvalho, J. Antevelli Osajima, E. Cavalcanti Silva-Filho, Development of Composite Scaffolds Based on Cerium Doped-Hydroxyapatite and Natural Gums—Biological and Mechanical Properties, *Materials (Basel)*. 12 (2019) 2389. doi:10.3390/ma12152389.
- [21] A. Prasad, M.R. Sankar, V. Katiyar, State of Art on Solvent Casting Particulate Leaching Method for Orthopedic Scaffolds Fabrication, *Mater. Today Proc.* 4 (2017) 898–907. doi:10.1016/j.matpr.2017.01.101.
- [22] A. Sola, J. Bertacchini, D. D'Avella, L. Anselmi, T. Maraldi, S. Marmioli, M. Messori, Development of solvent-casting particulate leaching (SCPL) polymer scaffolds as improved three-dimensional supports to mimic the bone marrow niche, *Mater. Sci. Eng. C*. 96 (2019) 153–165. doi:10.1016/j.msec.2018.10.086.
- [23] S. Ragunathan, G. Govindasamy, D.R. Raghul, M. Karuppaswamy, R.K. VijayachandraTogo, Hydroxyapatite reinforced natural polymer scaffold for bone tissue regeneration, *Mater. Today Proc.* (2019). doi:10.1016/j.matpr.2019.07.712.
- [24] J. Roleček, L. Pejchalová, F.J. Martínez-Vázquez, P. Miranda González, D. Salamon, Bioceramic scaffolds fabrication: Indirect 3D printing combined with ice-templating vs. robocasting, *J. Eur. Ceram. Soc.* 39 (2019) 1595–1602. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2018.12.006.

- [25] B.A.E. Ben-arfa, A.S. Neto, I.E. Palam, I.M.M. Salvado, R.C. Pullar, J.M.F. Ferreira, *Journal of the European Ceramic Society* Robocasting of ceramic glass scaffolds : Sol – gel glass , new horizons, *J. Eur. Ceram. Soc.* 39 (2019) 1625–1634. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2018.11.019.
- [26] Y. Jin, Q. Gao, C. Xie, G. Li, J. Du, J. Fu, Y. He, Fabrication of heterogeneous scaffolds using melt electrospinning writing: Design and optimization, *Mater. Des.* 185 (2020) 108274. doi:10.1016/j.matdes.2019.108274.
- [27] B.J.R. Brown, Theodore L., Lemay Eugene H., Bursten Bruce E., *Qumica: A Cincia Central*, 13th ed., Pearson Universidades, So Paulo, 2016.
- [28] S. Thakral, M.W. Terban, N.K. Thakral, R. Suryanarayanan, Recent advances in the characterization of amorphous pharmaceuticals by X-ray diffractometry, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 100 (2016) 183–193. doi:10.1016/j.addr.2015.12.013.
- [29] M.V.B. Santos, A.L. Oliveira, J.A. Osajima, E.C. Silva-Filho, Development of composites scaffolds with calcium and cerium-hydroxyapatite and gellan gum, *Ceram. Int.* (2019) 0–1. doi:10.1016/j.ceramint.2019.10.104.
- [30] G.T. Feitosa, M.V.B. Santos, H.M. Barreto, L.C.C. Nunes, J.A. Osajima, E.C. Silva Filho, Hydroxyapatites Obtained from Different Routes and their Antimicrobial Properties, *Mater. Sci. Forum.* 869 (2016) 890–895. doi:10.4028/www.scientific.net/MSF.869.890.
- [31] M.V.B. dos Santos, G.T. Feitosa, J.A. Osajima, R.L.P. Santos, E.C. da Silva Filho, Desenvolvimento de biomaterial composto por hidroxiapatita e clorexidina para aplicao na cavidade oral, *Cermica.* 65 (2019) 130–138. doi:10.1590/0366-69132019653732441.
- [32] M. Suga, S. Asahina, Y. Sakuda, H. Kazumori, H. Nishiyama, T. Nokuo, V. Alfredsson, T. Kjellman, S.M. Stevens, H.S. Cho, M. Cho, L. Han, S. Che, M.W. Anderson, F. Schuth, H. Deng, O.M. Yaghi, Z. Liu, H.Y. Jeong, A. Stein, K. Sakamoto, R. Ryoo, O. Terasaki, Recent progress in scanning electron microscopy for the characterization of fine structural details of nano materials, *Prog. Solid State Chem.* 42 (2014) 1–21. doi:10.1016/j.progsolidstchem.2014.02.001.
- [33] P. Deb, E. Barua, A.B. Deoghare, S. Das Lala, Development of bone scaffold using *Puntius conchonus* fish scale derived hydroxyapatite: Physico-mechanical and bioactivity evaluations, *Ceram. Int.* (2019). doi:10.1016/j.ceramint.2019.02.044.
- [34] M. Afzali, A. Mostafavi, T. Shamspur, Electrospun composite nanofibers of poly vinyl pyrrolidone and zinc oxide nanoparticles modified carbon paste electrode for electrochemical detection of curcumin, *Mater. Sci. Eng. C.* 68 (2016) 789–797. doi:10.1016/j.msec.2016.07.038.
- [35] J. Yang, T. Long, N.F. He, Y.P. Guo, Z.A. Zhu, Q.F. Ke, Fabrication of a chitosan/bioglass three-dimensional porous scaffold for bone tissue engineering

- applications, *J. Mater. Chem. B.* 20 (2014) 6611–6618. doi:10.1039/c4tb00940a.
- [36] K. Rezwani, Q.Z. Chen, J.J. Blaker, A.R. Boccaccini, Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials.* 27 (2006) 3413–3431. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.039.
- [37] S. Chen, Y. Shi, X. Zhang, J. Ma, 3D printed hydroxyapatite composite scaffolds with enhanced mechanical properties, *Ceram. Int.* 45 (2019) 10991–10996. doi:10.1016/j.ceramint.2019.02.182.
- [38] M. Gomez Perez, L. Fourcade, M.A. Mateescu, J. Paquin, Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds, *Anal. Biochem.* 535 (2017) 43–46. doi:10.1016/j.ab.2017.07.027.
- [39] M.M. Soltan-Dallal, M. Validi, M. Douraghi, J. Fallah-Mehrabadi, L. Lormohammadi, Evaluation the cytotoxic effect of cytotoxin-producing *Klebsiella oxytoca* isolates on the HEP-2 cell line by MTT assay, *Microb. Pathog.* 113 (2017) 416–420. doi:10.1016/j.micpath.2017.11.003.
- [40] E. Grela, J. Kozłowska, A. Grabowiecka, Current methodology of MTT assay in bacteria – A review, *Acta Histochem.* 120 (2018) 303–311. doi:10.1016/j.acthis.2018.03.007.
- [41] C.T.N. Pham, D.G. Thomas, J. Beiser, L.M. Mitchell, J.L. Huang, A. Senpan, G. Hu, M. Gordon, N.A. Baker, D. Pan, G.M. Lanza, D.E. Hourcade, Application of a hemolysis assay for analysis of complement activation by perfluorocarbon nanoparticles, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 10 (2014) 651–660. doi:10.1016/j.nano.2013.10.012.
- [42] S.K. Roy Chowdhury, A. Mishra, B. Pradhan, D. Saha, Wear characteristic and biocompatibility of some polymer composite acetabular cups, *Wear.* 256 (2004) 1026–1036. doi:10.1016/S0043-1648(03)00535-0.

**CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO DE SCAFFOLDS  
COMPOSTOS POR HIDROXIAPATITA E GOMA GELANA –  
SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO**



# DESENVOLVIMENTO DE *SCAFFOLDS* COMPOSTOS POR HIDROXIAPATITA E GOMA GELANA – SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO

Marcus Vinicius Beserra dos Santos<sup>1</sup>, Ana Leite Oliveira<sup>2</sup>, Josy Antevéli Osajima<sup>3</sup>,  
Edson Cavalcanti Silva Filho<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Piauí ; [mvbeserradossantos@gmail.com](mailto:mvbeserradossantos@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Católica Portuguesa-Porto; [aloliveira@porto.ucp.pt](mailto:aloliveira@porto.ucp.pt)

<sup>3</sup>Universidade Federal do Piauí; [josy\\_osajima@yahoo.com.br](mailto:josy_osajima@yahoo.com.br)

<sup>4</sup>Universidade Federal do Piauí; [edsonfilho@ufpi.edu.br](mailto:edsonfilho@ufpi.edu.br)

## Resumo

O avanço nas estratégias para tratamentos de defeitos ósseos tem passado pelo desenvolvimento dos *scaffolds*. Dentre os materiais utilizados na confecção dos *scaffolds*, a hidroxiapatita (HAp) sintética consegue simular a HAp encontrada no tecido ósseo humano. Substituições iônicas têm sido empregadas para aprimorar as características da HAp sintetizada, entre elas pode-se citar a troca iônica de íons  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Ce}^{3+}$ . Biopolímeros, como a goma gelana (GG), tem potencializado a utilização da HAp agindo com agente estruturante na composição. Neste estudo é proposto a sínteses de dois materiais, o *scaffold*  $S_H$ , composto por HAp com GG e o *scaffold*  $S_{CH}$  composto por Ce-HAp e GG, para ambos serem aplicados em defeitos ósseo. FTIR, DRX, TG e MEV foram aplicados para desvendar a composição, estrutura e morfologia dos *scaffolds*, mostrando que a fase de HAp e o biopolímero estão presentes nos *scaffolds*, além de revelar a porosidade. O teste mecânico mostrou que os *scaffolds* apresentam resistência suficiente para serem aplicados como osso esponjoso, resultados que conferem aos *scaffolds* potencial aplicação no reparo e regeneração óssea.

Palavras-chave: Hidroxiapatita, Biopolímeros e *Scaffolds*.

## Abstract

Advances in bone defect treatment strategies have been the development of scaffolds. Among the materials used to make scaffolds, synthetic hydroxyapatite (HAp) can

simulate HAp found in human bone tissue and is used in the synthesis of scaffolds. Ion substitutions have been employed to enhance the characteristics of synthesized HAp, among them the ion exchange of  $\text{Ca}^{2+}$  ions for  $\text{Ce}^{3+}$ . Biopolymers, gellan gum (GG), have potentiated the use of HAp acting as structuring agent in the composition. In this study we propose the synthesis of two unpublished materials, the scaffolds  $S_H$ , composed by HAp with GG and the scaffolds  $S_{CH}$  composed by Ce-HAp and GG, to be applied to bone defects. FTIR, XRD, TG and SEM were applied to unravel the composition of the scaffolds, showing that the HAp phase and biopolymer are present in the scaffolds, besides revealing the porosity of the scaffolds. The mechanical test showed that the scaffolds have sufficient strength to be applied as cancellous bone, results that give the scaffolds potential application in bone repair and regeneration.

Keywords: Hydroxyapatite, Biopolymers and Scaffolds.

## 1.0 Introdução

Estudos que buscam novas estratégias para auxiliar no tratamentos de defeitos ósseos têm passados pelo desenvolvimento dos *scaffolds* [1–5]. Os *scaffolds* são, em geral, materiais sintéticos provenientes ou não da combinação de, polímeros sintéticos, biopolímeros, biocerâmicos e até materiais metálicos, que podem ser classificados como biocompósitos, desenvolvidos para oferecer suporte estrutural para tecidos debilitados, através do uso de implantes e próteses [6–8].

Entre as classes de materiais citados, uma biocerâmica tem ganho destaque por sua utilização no desenvolvimento de *scaffolds* é a hidroxiapatita (HAp) [6]. A HAp é um mineral cerâmico que tem fórmula molecular  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  e apresenta propriedades semelhante à HAp encontrada no organismo humano. Acerca das propriedades da HAp sintética, pode-se listar a bioatividade, biocompatibilidade, porosidade e resistência mecânica. Por esta razão a HAp sintética tem sido amplamente utilizada como biomaterial no reparo e substituições de tecidos ósseo e também tecido dentário [5,9].

Embora as propriedades já mencionadas da HAp sintética a torne um excelente material para aplicações na área ortopédica e dentária, a HAp sintética poderá ter suas propriedades aprimoradas por meio de substituições iônicas, o que lhe permitirá

uma diversificação e direcionamento na aplicação[4,10–12]. Na HAp, os íons de cálcio podem ser substituídos por diversos íons que apresentem dupla ou tripla valência, como exemplos  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Ce}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ti}^{2+}$ . Estas substituições são permitidas pela semelhança existente nas propriedades periódicas de raio atômico e eletronegatividade [9,10,13–17].

Dentre as diversas possibilidades de substituição de íons, os íons  $\text{Ce}^{3+}$  têm sido amplamente utilizados na composição de fármacos devido sua ação antibacteriana, onde a ação biocida ocorre em baixas concentrações de cério, acrescido o fato da longa duração do efeito [18–20]. É importante citar que o cério pode ser acumulado no organismo humano em pequenas quantidades. Logo, a possibilidade de síntese de hidroxiapatita contendo cério na sua composição acaba por gerar a Ce-HAp, com propriedades antibacterianas, e que em procedimentos cirúrgicos de implantes ou próteses, o material já contribuirá para se evitar infecções pós-operatórias. [4,21,22].

No desenvolvimento dos *scaffolds*, os biopolímeros acrescentam características fundamentais quando participam da composição, que vão da facilidade na modelagem da estrutura do *scaffold* às propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade. A goma gelana (GG) é um biopolímero atóxico composto por unidades repetidas do 1,3 $\beta$ -D-glucose, 1,4  $\beta$ -D-ácido glucurônico, 1,4  $\beta$ -D-glucose e 1,4  $\alpha$ -L-ramnose, que se apresentam de forma linear [23–26]. Este polissacarídeo aniônico é produto da excreção de bactérias tipo *Sphingonomas elodea* (ATCC31461) através de fermentação aeróbica.

A estabilidade térmica e capacidade de formar géis translúcidos apresentadas pela GG são propriedades que, somadas as características já citadas, tornam a GG componente essencial no desenvolvimento dos *scaffolds* [27,28]. Assim, o estudo tem como objetivo sintetizar e caracterizar *scaffolds* de HAp e goma gelana,  $S_H$ , e Ce-HAp com goma gelana,  $S_{CH}$ , para serem aplicados como enxerto ósseo. Os *scaffolds* foram caracterizados por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difratometria de raios X (DRX), análise termogravimétrica (TG), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e teste mecânico de compressão.

## 2.0 Materiais E Método

### 2.1 Materiais

O desenvolvimento do scaffold ocorreu com a utilização de hidróxido de cálcio –  $\text{Ca(OH)}_2$  (ENSURE<sup>®</sup>); Fosfato de amônio dibásico –  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (Sigma-Aldrich); Nitrato de cério(III) hexahidratado –  $\text{Ce(NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich); meio DMEM F12 (Sigma-Aldrich); 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich); Dimetilsulfóxido (DMSO) (Mallinckrodt Chemicals); água destilada e Goma Gelana, gentilmente fornecida pela KelcoGel<sup>®</sup>. Todos os materiais foram utilizados sem prévia purificação.

### 2.2 Síntese de HAp e Ce-HAp

A HAp foi sintetizada por meio reação de precipitação simples, com reação entre as soluções de hidróxido de cálcio e fosfato de amônio dibásico. Para a síntese de 2,0 g de HAp, dissolveu-se 1,4750 g de  $\text{Ca(OH)}_2$  em 50,0 mL de água destilada. A solução de  $\text{Ca(OH)}_2$  foi misturada com a solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , preparada por dissolução de 1,5775 g de em 50,0 mL de água. A mistura permaneceu sob agitação magnética por 4 horas a temperatura de 25 °C. Após a agitação, solução permaneceu em repouso por 12 horas. A síntese foi continuada com a centrifugação do pó de HAp obtido e posterior lavagem do material com água destilada. A HAp foi lavada por 3 vezes, onde cada lavagem é composta por acréscimo de água destilada e centrifugação. Por fim, a síntese é finalizada com secagem em estufa a temperatura de 100 °C por 24 horas.

A síntese da hidroxiapatita dopada com íons cério ocorreu através do preparo de três soluções iniciais, onde 1,4077 g de  $\text{Ca(OH)}_2$ , 1,5744 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  e 0,4342 g de  $\text{Ce(NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  foram dissolvidas em 50,0 mL de água destilada, cada solução preparada separadamente. As soluções de  $\text{Ca(OH)}_2$  e de  $\text{Ce(NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  foram transferidas para o béquer que continha a solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , com a mistura permanecendo sob agitação magnética por 4 horas. O processo de repouso, lavagem e secagem da Ce-HAp ocorreu de forma semelhante a síntese de HAp.

### 2.3 Preparo dos Scaffolds

Duas formulações de *scaffolds* foram preparadas. O scaffold S<sub>H</sub> foi preparado através da combinação de 1,0 g de HAp com 0,20 g de goma gelena. O scaffold S<sub>CH</sub> foi

preparado com a mistura de 1,0 g de Ce-HAp e 0,20 g de goma gelana. O preparo dos dois *scaffolds* ocorreu de maneira semelhante, sendo que a única diferença no processo é a utilização de HAp ou de Ce-HAp.

Para o *scaffold* S<sub>H</sub>, a síntese ocorreu com a mistura dos pós de HAp e GG através da agitação magnética, durando 20 minutos. Após a mistura, 10,0 mL de água destilada foi adicionada à mistura dos pós. A solução viscosa obtida foi colocada em moldes cilíndricos, seguindo para processo de congelamento a -20 °C por 24 horas. A síntese foi concluída como processo de secagem a vácuo por 24 horas. Para o *scaffold* S<sub>CH</sub>, os pós misturados foram a Ce-HAp e a GG, com todo o procedimento seguindo a mesma metodologia do S<sub>H</sub>.

## **2.4 Caracterizações físico-químicas**

### **2.4.1 Difração de Raios-X (DRX)**

A determinação das fases cristalinas presente nos *scaffolds* ocorreu através da difração de raios X com o LABX – XDR 600, Shimadzu, Cu – K $\alpha$  ( $\lambda = 1,5406\text{\AA}$ ) com 2 theta no intervalo de 10 a 75°, taxa de varredura de 2°/min e tempo médio de exposição de aproximadamente 40 minutos. As amostras que foram refinadas através do método de refinamento Rietveld tiveram intervalo 2 theta de 10 a 110°, com taxa de varredura de 1°/min com tempo de exposição de 100 minutos.

### **2.4.2 Espectrofotometria de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

A análise de FTIR ocorreu em um Espectromômetro FTIR modelo Vertex 70 do fabricante Bruker Optics por ATR para identificar os grupos funcionais presentes na estrutura dos *scaffolds*. Cada amostra foi estudada com 64 scans, com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>, em intervalo de varredura de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>.

### **2.4.3 Análise termogravimétrica (TG)**

A estabilidade térmica dos *scaffolds* foram testadas em equipamento SDT Q 600 V20.9 Build 20 da TA Instruments, com atmosfera de nitrogênio e fluxo de 100mL/min. A taxa de aquecimento foi de 10°/min.

## **2.5 Morfologia**

O estudo da morfologia dos scaffolds ocorreu através de microscópio eletrônico de varredura (MEV) com canhão de emissão por campo, modelo Quanta FEG 250 da marca FEI e tensão de aceleração de 1 a 30 KV. O equipamento vem com EDS de SDD (Silicon drift detectors), da marca Ametek, modelo HX-1001 e detector Apollo X-SDD. A deposição das amostras aconteceu em fita adesiva de carbono de dupla face e recobertas por ouro através de metalizadora da marca Quorum, modelo Q150R a 20 miliampères durante 50 segundos, por meio do plasma gerando em atmosfera de argônio. As análises de MEV e EDS foram realizadas no mesmo equipamento.

## **2.6 Testes de compressão**

O teste de compressão foi realizado para checar o módulo de compressão e o módulo elástico apresentado pelos scaffolds. O teste foi realizado com auxílio de máquina de teste universal, modelo EMIC DL20000, com os scaffolds se apresentando em formato cilíndrico (diâmetro médio de 14,00 mm e altura média de 13,50 mm). A taxa de compressão aplicada foi de 5 mm/min.

## **3.0 Resultados E Discussão**

### **3.1 DRX**

Os materiais utilizados no desenvolvimento dos scaffolds e os *scaffolds* obtidos foram analisados por difratometria de raios X. A Figura 2 mostra os difratogramas da HAp, Ce-HAp, GG, S<sub>H</sub> e Sc<sub>H</sub>. Com o auxílio do software *X'Pert HighScorePlus*, foi possível relacionar os difratogramas obtidos experimentalmente com o cartão cristalográfico JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction and Standards) 00-003-0747 da HAp, que se mostrou equiparável com os dados obtidos experimentalmente.

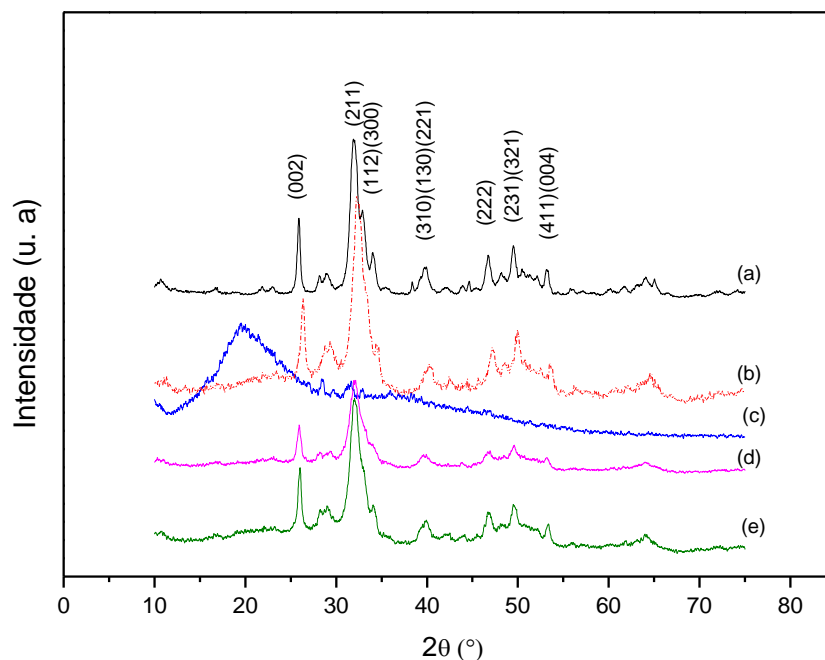


Figura 1: DRX dos materiais precursores e dos scaffolds. (a) HAp, (b) Ce-HAp, (c) Goma gelana, (d)  $S_H$  e (e)  $S_{CH}$ .

A comparação dos difratogramas com os dados do cartão 00-003-0747 revela a presença dos seguintes planos na estrutura cristalina (0 0 2), (2 1 1), (1 1 2), (3 0 0), (3 1 0), (1 3 0), (2 2 1), (2 2 2), (2 3 1), (3 2 1), (4 1 1) e (0 0 4). A presença dos planos citados revela que a síntese da HAp ocorreu de forma satisfatória. É válido perceber que os picos encontrados na HAp também se fizeram presentes na Ce-HAp e nos scaffolds  $S_H$  e  $S_{CH}$ , resultado indicador de que todos os materiais obtidos possuem hidroxiapatita em sua composição, e que com a formação dos *scaffolds* não houve alterações significantes no difratograma [29–33].

A análise do difratograma da goma gelana revelou a existência de pico único, alargado e difuso na região de  $2\theta$  de  $20^\circ$ , resposta característica de materiais amorfos que apresentam baixa organização estrutural como também baixo grau de cristalinidade. Resposta comumente atribuída a polímeros e biopolímeros [34,35]. Vale ressaltar que a presença da goma gelana na composição do scaffold não alterou a fase da HAp.

Partindo do ponto de que a diferença de composição dos *scaffolds* reside na presença/ausência do cério pela dopagem da HAp, escolheu-se o scaffold S<sub>CH</sub> para uma análise estrutural mais detalhada através do refinamento pelo método Rietveld. Com o auxílio do software *EXPGUI GSAS*, o refinamento mostrou que a estrutura cristalina presente no S<sub>CH</sub> é do tipo hexagonal com grupo espacial *P/63m* e simetria de *Laue 6/m*, com os seguintes valores para os parâmetros de rede: a: 9,445529 Å, b: 9,445529 Å e c: 6,892328 Å, com a célula unitária apresentando volume de 532,536 Å<sup>3</sup>. A Figura 3 apresenta o refinamento executado, que apresentou fator de convergência menos do que 2,  $\chi^2 = 1,576$ , coeficiente matemático estatístico que indica um refinamento executado com êxito.

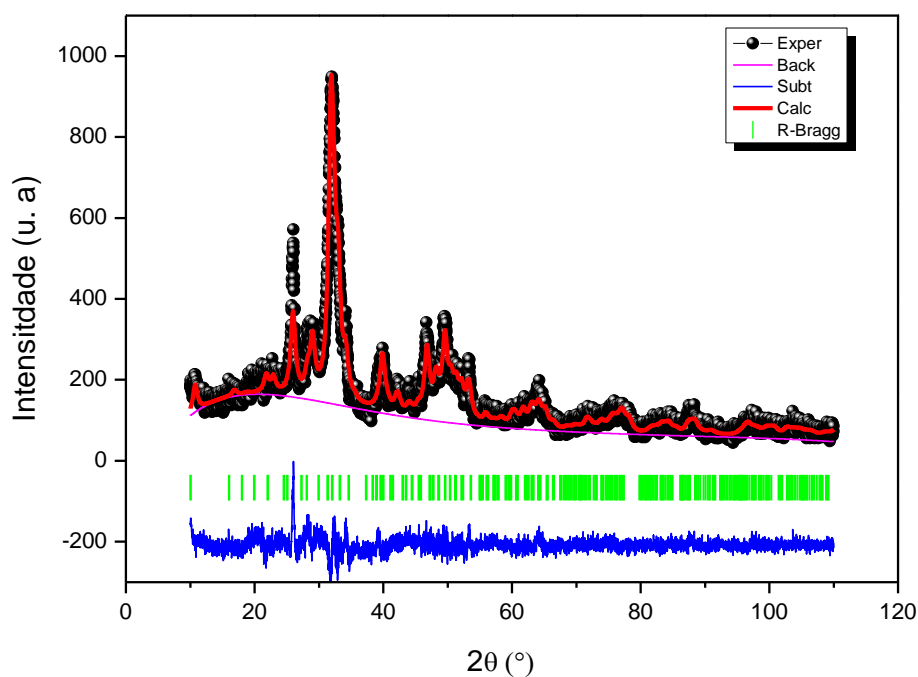


Figura 2: Refinamento do difratogramas do scaffold S<sub>CH</sub>.

Os dados obtidos com o refinamento Rietveld forneceram informações para simular a organização estrutural da rede cristalina da Ce-HAp presente nos scaffolds S<sub>CH</sub>. A simulação da rede cristalina ocorreu com o auxílio do software VESTA (Visualization for Electronic and Structural Analysis)[36] e apresentada na Figura 4. A dopagem de cério



na figura simulada é observada através da área hachurada nos átomos de Ca1 e Ca2, área que corresponde a 5%.

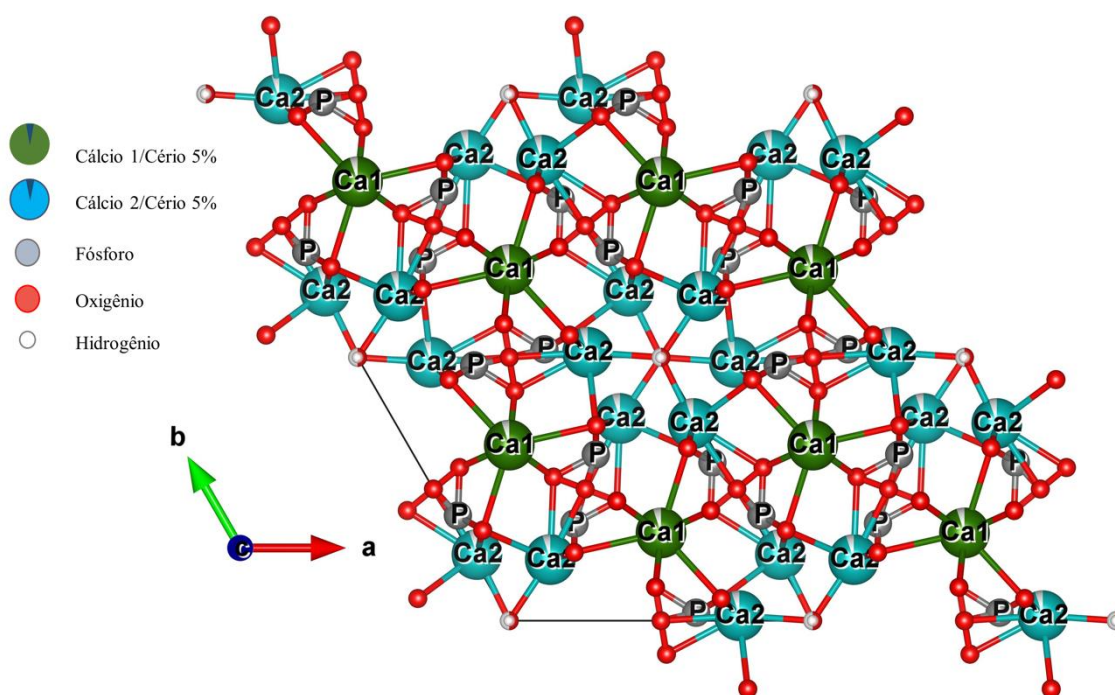


Figura 3: Simulação da rede cristalina do scaffold  $S_{CH}$ .

### 3.2 FTIR

Os espectros de FTIR obtidos com as análises das amostras revelam as presenças dos grupos iônicos e moleculares que compõe a hidroxiapatita e a goma gelana. A Figura 1 exibe os espectros obtidos. Ao analisar o espectro da HAp pura, é possível se observar uma banda em  $3300\text{ cm}^{-1}$ , sinal que corresponde ao estiramento de OH, presente na estrutura na HAp. Já a deformação referente ao grupo OH pode ser encontrado em  $1649\text{ cm}^{-1}$ . Bandas em  $1050\text{ cm}^{-1}$  e  $1098\text{ cm}^{-1}$  provenientes da deformação assimétrica dos grupos fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) foram encontradas no espectro da HAp. Para o fosfato, observou-se ainda a deformação assimétrica do P – O em  $611\text{ cm}^{-1}$ . Os resultados apresentados para a HAp também foram observados para o material Ce-HAp [37].

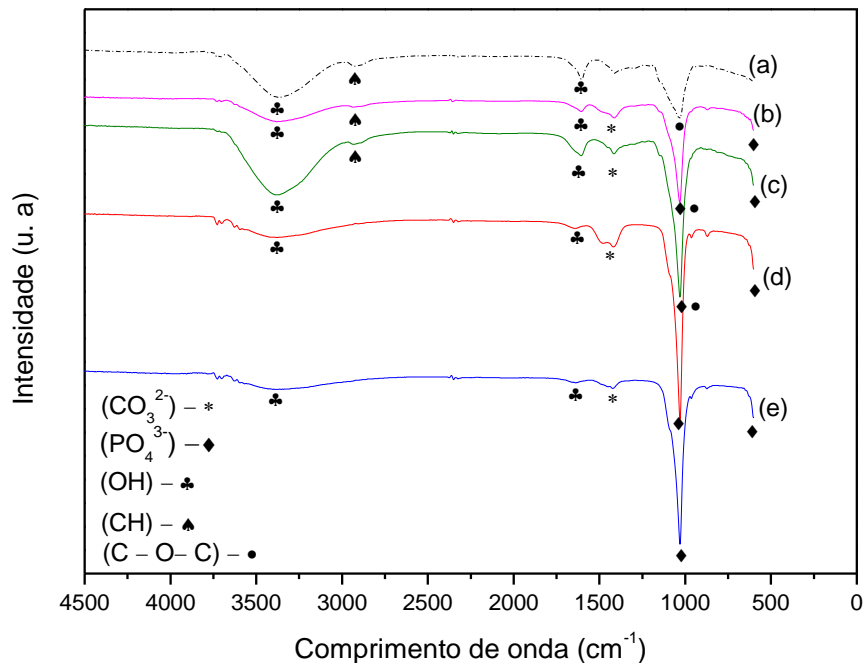


Figura 4: FTIR dos materiais precursores e dos scaffolds. (a) goma gelana, (b)  $S_H$ , (c)  $S_{CH}$ , (d) HAp e (e) Ce-HAp.

O espectro da goma gelana mostrou uma banda na região de  $3300\text{ cm}^{-1}$  relativo ao estiramento do grupamento OH. Na região próxima a  $2920\text{ cm}^{-1}$  observou-se uma banda larga referente ao estiramento de grupos CH, presente nos monômeros que constituem a goma gelana. O estiramento referente ao grupamento  $\text{COO}^-$  apareceu em  $1592\text{ cm}^{-1}$ . Em  $1035\text{ cm}^{-1}$  foi encontrada a banda correspondente ao estiramento do grupamento C – O – C, presentes nas ligações glicosídicas do biopolímero, representando a estrutura polissacarídica [38,39].

A análise dos espectros dos scaffolds,  $S_H$  e  $S_{CH}$ , revelaram a presença dos grupamentos presentes em seus precursores. Para o espectro do  $S_H$ , observou-se uma banda em  $3300\text{ cm}^{-1}$ , banda essa atribuída ao estiramento de grupos OH. A presença do fosfato é revelada com as bandas em  $1050\text{ cm}^{-1}$  e  $1098\text{ cm}^{-1}$ , referente aos grupos fosfatos (P-O e P-O-P). A goma gelana tem sua presença revelada pela banda encontrada em  $2920\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento de grupos C-H encontrado nos monômeros do biopolímero. A banda referente ao grupamento C – O – C presente nas ligações glicosídicas aparece

sobreposta com a banda referente à deformação assimétrica dos grupos fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). O espectro do scaffold  $S_{\text{CH}}$  apresentou comportamento análogo ao espectro do  $S_{\text{H}}$ , já que a diferença entre eles é a presença do cério [37–39].

### 3.3 TG/DTG

A estabilidade térmica da GG, HAp, Ce-HAp e dos *scaffolds* foi estudada com as curvas termogravimétricas. A Figura 5 mostra as curvas TG dos materiais.

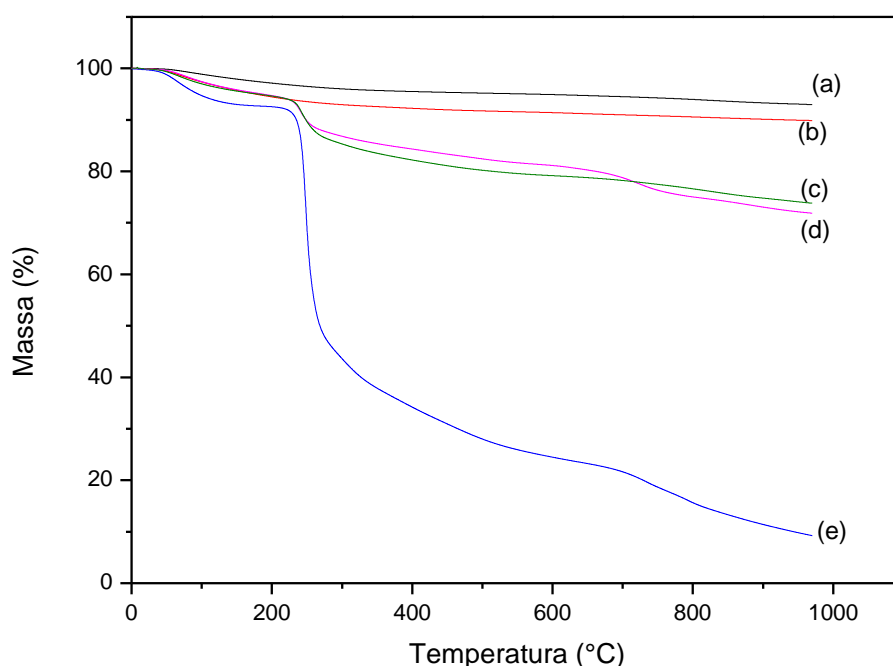


Figura 5 (a): TG dos materiais e dos scaffolds. (a) TG HAp, (b) TG Ce-HAp, (c) TG  $S_{\text{CH}}$ , (d) TG  $S_{\text{H}}$  e (e) TG goma gelana.

A análise das curvas TG da HAp mostrou a presença de um evento térmico na região de 100 °C. A perda que acontece se refere a saída de água adsorvida à superfície da HAp remanescente do processo da síntese. A perda de massa, em porcentagem, tem um valor de 1,63 %. O comportamento da curva termogravimétrica da Ce-HAp é semelhante a curva da HAp, com apenas uma perda, sendo ela em aproximadamente 100 °C. O motivo da perda refere-se a água residual proveniente da síntese, e tem valor de 3,45 %, em porcentagem de massa.

Analisando a curva TG da goma gelana, pode-se observar dois eventos térmicos. O primeiro evento está situado no intervalo de 40 a 121 °C, correspondendo a uma perda de massa de 5,61 %. Essa perda é atribuída a água presente na estrutura da goma gelana [40,41]. A segunda perda se encontra entre 214 a 340 °C, com uma perda de massa de 53,53 %. Esta perda de massa se refere a degradação polimérica que ocorre no polissacarídeo [40,41].

O estudo da curva TG do *scaffold* S<sub>H</sub> revelou a presença de dois eventos térmicos. O primeiro evento térmico se encontra no intervalo de 40 a 165 °C, correspondendo a uma perda de massa de 4,28%. A perda é referente a água adsorvida à superfície do *scaffold*, e é remanescente da síntese. [42,43]. O segundo evento térmico ocorre entre 205 e 374 °C. Este evento térmico ocorre devido à quebra da estrutura polissacarídica da goma gelana. A massa perdida foi de 9,74 % [40,41].

O *scaffold* S<sub>CH</sub> apresentou comportamento térmico semelhante ao *scaffold* S<sub>H</sub>, apresentando dois eventos, o primeiro referente a perda de água adsorvida à superfície, com valor de 4,35 % de perda de massa, ocorrendo de 95,44 a 99,79 °C. O segundo evento térmico ocorreu entre 205 e 383 °C, com uma perda de 11,91%. Este evento se refere a quebra da cadeia da goma gelana [40–43].

Após a exposição dos dados de perda de massa dos materiais, pode-se observar que os *scaffolds* S<sub>H</sub> e S<sub>CH</sub> apresentam eventos térmicos semelhantes aos encontrados nas curvas termogravimétrica da HAp, da Ce-HAp e da GG, individualmente. Essa observação ajuda a compreender que os materiais presentes no biocompósito não apresentaram modificações nas propriedades térmica em relação aos materiais que o compõe, apresentando apenas uma junção dos efeitos térmicos dos seus precursores. As informações foram obtidas por meio das curvas DTG, mostrada na figura 5(b).

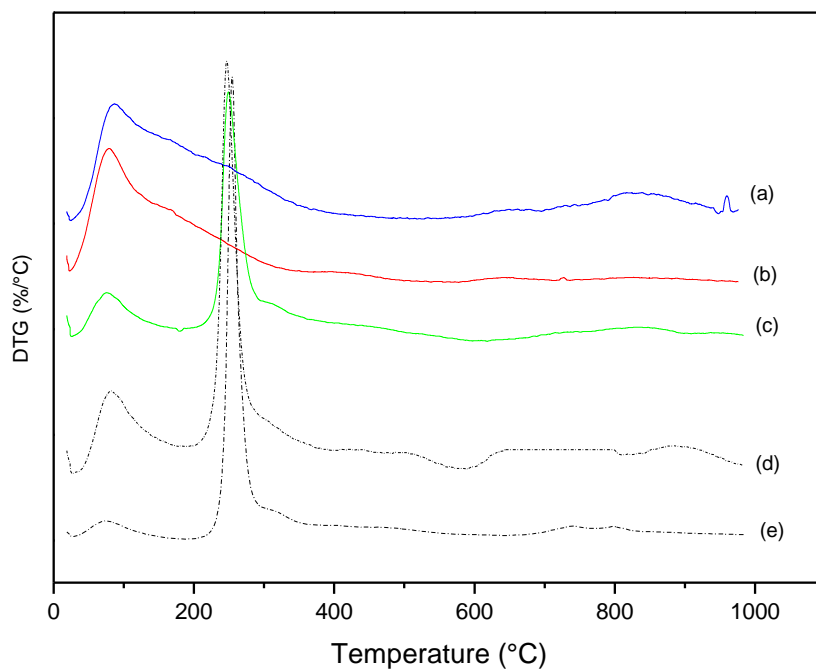


Figura 5 (b): DTG dos materiais e dos scaffolds. (a) DTG HAp, (b) DTG Ce-HAp, (c) DTG S<sub>CH</sub>, (d) DTG S<sub>H</sub> e (e) DTG Goma gelana.

### 3.4 MEV

A microscopia eletrônica de varredura contribui para elucidar a morfologia e a presença de poros nos *scaffolds*, ao tempo que o EDS contribuiu para revelar a composição, de forma semiquantitativa. A figura 6 mostra imagens dos *scaffolds* e os dados de EDS dos *scaffolds* S<sub>H</sub> e S<sub>CH</sub>. Analisando inicialmente as microscopias do S<sub>H</sub>, Figuras 6 (a) e 6 (b), é possível perceber a existência de uma camada translúcida e lisa, atribuída a goma gelana, na qual se encontra aglomerados dispersos e de diversos tamanhos, sendo estes aglomerados atribuídos a HAp. A Figura 6 (a) mostra a camada translúcida com os aglomerados. Outro dado importante apresentado pela Figura 6 (a) é a presença de poro, com diâmetro de 41  $\mu\text{m}$ . A presença de poros no S<sub>H</sub> também é mostrada na Figura 6 (b), onde os poros variaram o diâmetro entre 48 e 154  $\mu\text{m}$ . Utilizando o software *imageJ*, foi possível destacar os aglomerados de HAp no S<sub>H</sub>,

deixando a HAp na cor verde na figura 6 (b), mostrando homogeneidade na distribuição da HAp na rede polimérica da goma gelana.

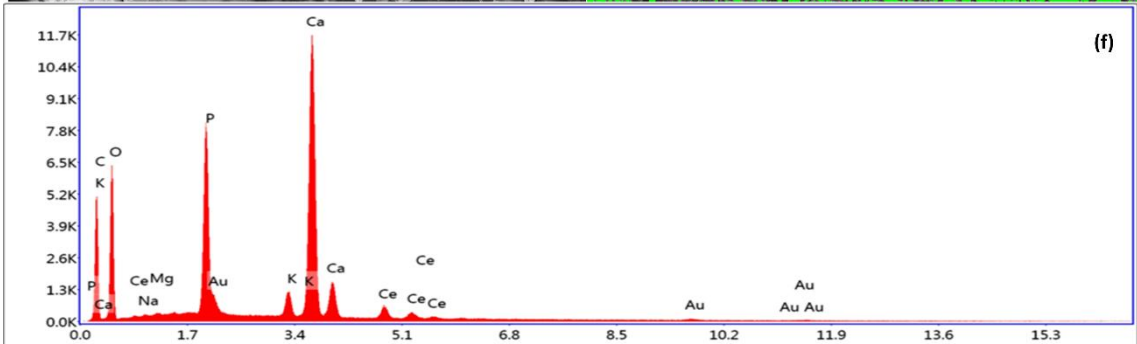
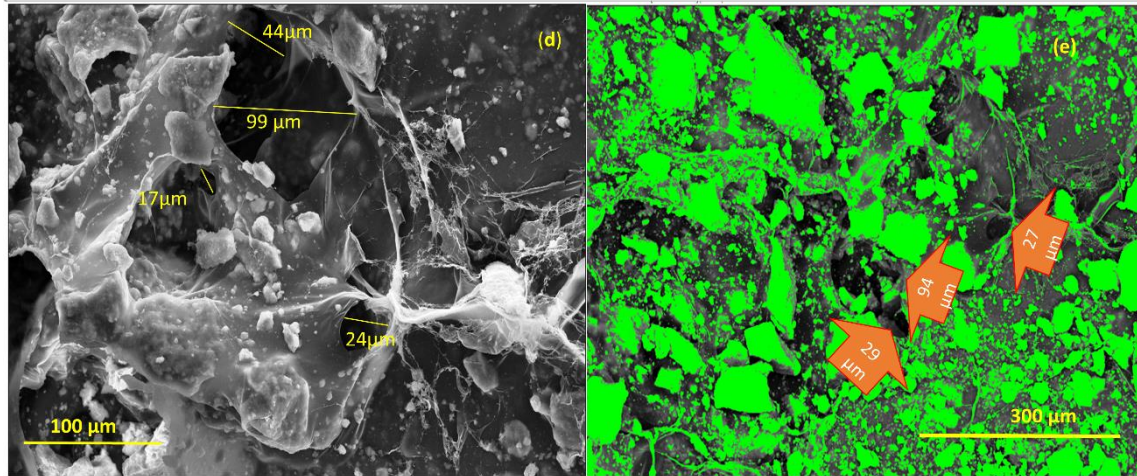
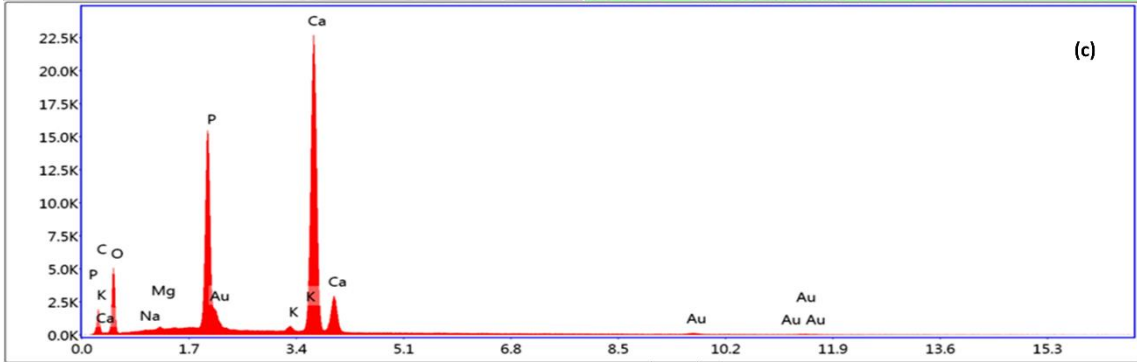
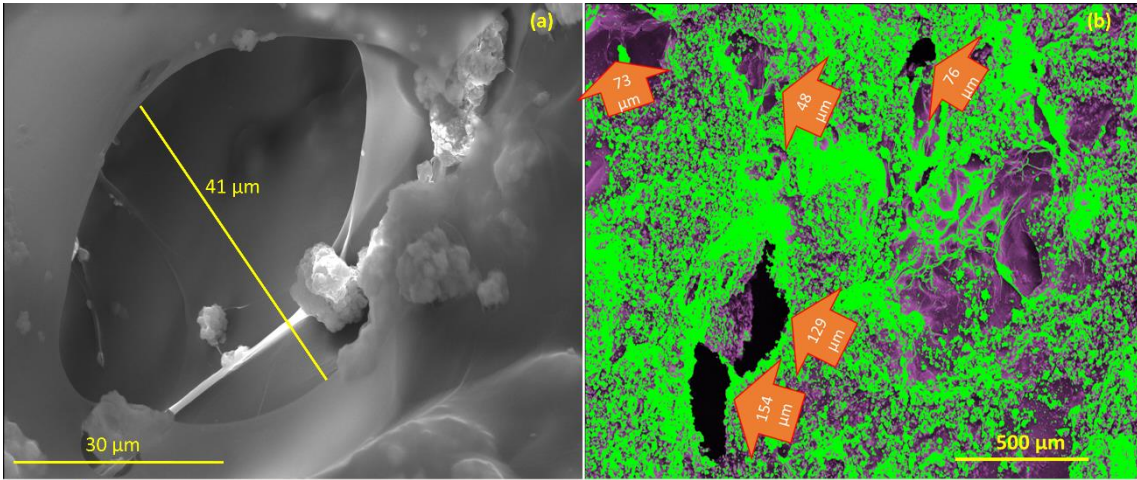


Figura 6: (a) MEV do scaffold  $S_H$ , (b) Distribuição da HAp sobre a GG no  $S_H$ , (c) EDS do  $S_H$ , (d) MEV do scaffold  $S_{CH}$ , (e) Distribuição da Ce-HAp na GG no  $S_{CH}$  e (f) EDS do  $S_{CH}$ .

As observações acerca do *scaffold*  $S_{CH}$  foram realizadas com análise das Figuras 6 (d) e 6 (e). O *scaffold*  $S_{CH}$  apresentou morfologia porosa, com a distribuição dos aglomerados de Ce-HAp sobre a rede polimérica da GG, como pode ser vista pelo destaque da coloração verde na Figura 6 (e). O destaque de cor foi conseguido com o auxílio do software *imageJ*. Os poros encontrados possuíam diâmetro entre 17 e 99  $\mu\text{m}$ .

Ao se falar de materiais desenvolvidos para aplicação em enxerto e substituição óssea, é necessário ter a presença de poros aliada a morfologia adequada, pois os poros contribuem com a disseminação de materiais biológicos, como moléculas, fluídos, proteínas e células que irão atuar na regeneração da lesão [44]. Somado a existência dos poros, o diâmetro do poro também é fundamental, pois diversos estudos mostram que os *scaffolds* sintetizados apresentaram êxito na aplicação quando os diâmetros dos poros variam entre 10 a 1000  $\mu\text{m}$  [2,45–47]. As propriedades elencadas acima são atendidas pelos *scaffolds*  $S_H$  e  $S_{CH}$ , propiciando a aplicação dos mesmos.

As Figuras 6 (c) e 6 (f) trazem as análises de espectroscopia por energia dispersiva, EDS, para os *scaffolds*  $S_H$  e  $S_{CH}$ , respectivamente. Uma comparação inicial entre os resultados revela que a diferença entre elas está na presença do cério, Ce. De fato, a dopagem da HAp com o cério fica comprovada para o *scaffold*  $S_{CH}$ , além de revelar que a presença do cério é a única diferença entre eles. Sobre a composição, o EDS revelou a presença do Ca, P e O, átomos constituintes da HAp. Os átomos Mg, Cl, Na e K são provenientes da composição do biopolímero goma gelana, dados obtidos através da ficha de segurança de produtos químicos – FISPQ. A ficha de segurança da goma gelana foi gentilmente fornecida junto da goma pela KelcoGel<sup>®</sup>. Os átomos de ouro que aparecem nos dois EDS são provenientes do processo de preparação da amostra para análise MEV-EDS.

Recentemente, diversos estudos estão fazendo uso dos dados de porcentagem atômica fornecidos pelo EDS [48–50]. Para este estudo, os dados de EDS mostraram que a razão semi-quantitativa de Ca/P para o scaffold  $S_H$  foi de 1,78 e o scaffold  $S_{CH}$  – (Ca +



Ce/P) – foi de 1,80. Estes valores de razão Ca/P dos scaffolds são harmônicos com valores já descritos para a hidroxiapatita encontrada no organismo humano, onde a estabilidade e a cristalinidade da HAp lhes permitem ter uma interação com os fluídos corporais [51,52], resultado diferente do que ocorre quando a razão Ca/P é de 1,67, onde a HAp tem elevada estabilidade e pouco interação com o corpo humano [53].

### 3.5 Teste Mecânico

É fundamental entender a resistência mecânica à compressão apresentada pelos *scaffolds* sintetizados, para assim direcionar sua aplicação, uma vez que o *scaffold* deverá vir a sustentar parte do corpo quando aplicado na substituição óssea. Entretanto, deve ser levado em consideração a proporcionalidade inversa que existe entre resistência à compressão e porosidade para assim se obter um scaffold capaz de resistir a ação mecânica, mais que também permita a disseminação de materiais biológicos [54]. Assim, os scaffolds  $S_H$  e  $S_{CH}$  foram submetidos a ensaio de compressão em máquina universal modelo EMIC DL20000, a figura 7 traz o resultado do teste de compressão.

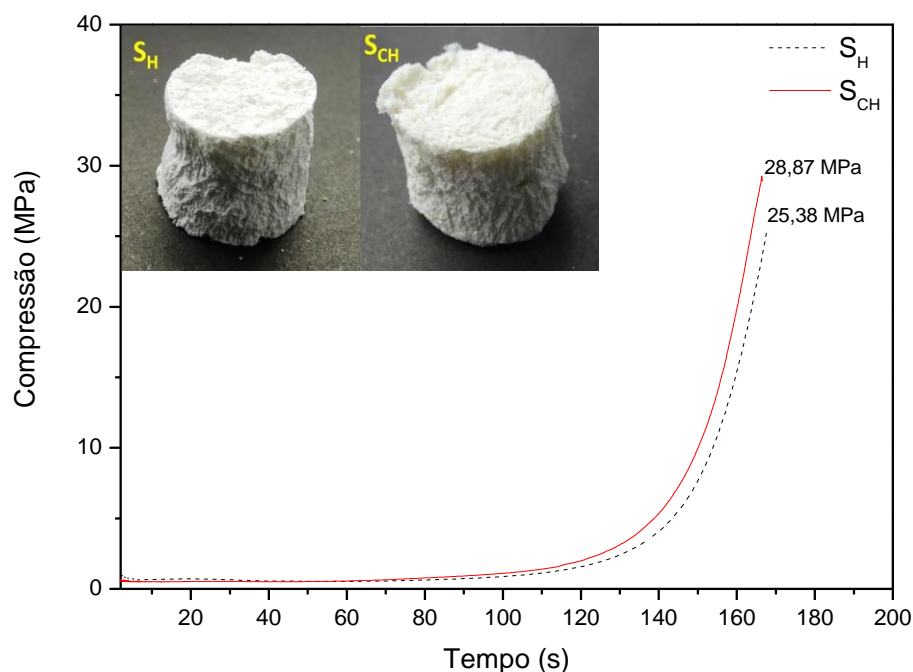


Figura 7: Curva de tensão para os scaffolds  $S_H$  e  $S_{CH}$ .

Os scaffolds  $S_H$  e  $S_{CH}$  apresentaram valores de resistência mecânica a compressão de 25,38 MPa e 28,87 MPa, respectivamente. A comparação destes valores apresentados pelos *scaffolds* com os valores de resistência mecânica a compressão de ossos do corpo humano mostra que ambos os *scaffolds* apresentaram resistência mecânica suficiente para serem aplicados na substituição de osso esponjo, já que a resistência mecânica do osso esponjoso varia entre 4 – 12 Mpa [54,55]. No que tange a resistência a compressão, a equivalência mecânica apresentada pelos *scaffolds*, comparada a do osso esponjoso, se mostra de grande valia, pois o aloenxerto esponjoso é apontado pelos cirurgiões como a melhor opção na substituição óssea clínica, ao ponto de ser chamada pelos especialistas da área como padrão-ouro[2].

#### **4.0 Considerações Finais**

O trabalho apresenta a síntese e caracterização de dois scaffolds que apresentaram grande potencial para aplicação na área ortopédica. Os scaffolds apresentaram resistência mecânica à compressão comparável ao do osso esponjoso, padrão ouro utilizado por especialistas em cirurgias de enxertos. As caracterizações mostraram que a síntese foi eficaz ao reproduzir a fase da HAp encontrado no osso, onde o DRX revelou a similaridade entre as fases da HAp sintética com a HAp encontrada no organismo humano. O FTIR revelou a presença das ligações químicas existentes no scaffolds, consolidando o resultado apresentado pelo DRX. A microscopia eletrônica de varredura revelou a existência dos poros, requisito indispensável para aplicação do material como scaffolds, ao tempo que o EDS apresentou a razão Ca/P = 1,78 e 1,80 para o  $S_H$  e  $S_{CH}$ , respectivamente. As caracterizações vêm comprovar o sucesso da síntese do material, como também mostrar que os scaffolds apresentaram resistência mecânica suficiente para aplicação em substituição ao osso esponjoso.

#### **5.0 Agradecimentos**

CAPES, CNPq, FAPEPI, UFPI e KELCOGEL pelo financiamento e suporte.

#### **6.0 Referências**

- [1] B. Kaczmarek, A. Sionkowska, M. Gołyńska, I. Polkowska, T. Szponder, D. Nehrbass, A.M. Osyczka, In vivo study on scaffolds based on chitosan, collagen, and hyaluronic acid with hydroxyapatite., Int. J. Biol. Macromol. 118 (2018) 938–

944. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.06.175.
- [2] S. Chen, Y. Shi, X. Zhang, J. Ma, 3D printed hydroxyapatite composite scaffolds with enhanced mechanical properties, *Ceram. Int.* 45 (2019) 10991–10996. doi:10.1016/j.ceramint.2019.02.182.
- [3] P. Deb, E. Barua, A.B. Deoghare, S. Das Lala, Development of bone scaffold using *Puntius conchonus* fish scale derived hydroxyapatite: Physico-mechanical and bioactivity evaluations, *Ceram. Int.* (2019). doi:10.1016/j.ceramint.2019.02.044.
- [4] B. Yilmaz, A.Z. Alshemary, Z. Evis, Co-doped hydroxyapatites as potential materials for biomedical applications, *Microchem. J.* 144 (2019) 443–453. doi:10.1016/j.microc.2018.10.007.
- [5] Y.S. Cho, S. Choi, S.H. Lee, K.K. Kim, Y.S. Cho, Assessments of polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffold with enhanced biomimetic mineralization by exposure to hydroxyapatite via a 3D-printing system and alkaline erosion, *Eur. Polym. J.* 113 (2019) 340–348. doi:10.1016/j.eurpolymj.2019.02.006.
- [6] A. Szcześ, L. Hołysz, E. Chibowski, Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications, *Adv. Colloid Interface Sci.* 249 (2017) 321–330. doi:10.1016/j.cis.2017.04.007.
- [7] A.P. Moreno Madrid, S.M. Vrech, M.A. Sanchez, A.P. Rodriguez, Advances in additive manufacturing for bone tissue engineering scaffolds, *Mater. Sci. Eng. C.* 100 (2019) 631–644. doi:10.1016/j.msec.2019.03.037.
- [8] S. MONDAL, U. Pal, 3D hydroxyapatite scaffold for bone regeneration and local drug delivery applications, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 39 (2019). doi:10.1016/j.jddst.2017.04.019.
- [9] N. Jiraborvornpongsa, T. Isobe, S. Matsushita, A. Yamaguchi, M. Miyauchi, M. Wakamura, A. Nakajima, Effects of MoO<sub>x</sub> modification on photocatalytic activity of hydroxyapatite and Ti-doped hydroxyapatite, *Adv. Powder Technol.* (2019).

doi:10.1016/j.appt.2019.05.010.

- [10] A.M. Pietak, J.W. Reid, M.J. Stott, M. Sayer, Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics, *Biomaterials*. 28 (2007) 4023–4032. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.05.003.
- [11] A. Sygnatowicz, M.; Keyshar, K.; Tiwari, Antimicrobial Properties of Silver-doped Hydroxyapatite Nano-powders and Thin Films, *Biol. Biomed. Mater.* 62 (2010) 65–70.
- [12] K.L. Wong, C.T. Wong, W.C. Liu, H.B. Pan, M.K. Fong, W.M. Lam, W.L. Cheung, W.M. Tang, K.Y. Chiu, K.D.K. Luk, W.W. Lu, Mechanical properties and in vitro response of strontium-containing hydroxyapatite/polyetheretherketone composites, *Biomaterials*. 30 (2009) 3810–3817. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.04.016.
- [13] R. V. Suganthi, K. Elayaraja, M.I.A. Joshy, V.S. Chandra, E.K. Girija, S.N. Kalkura, Fibrous growth of strontium substituted hydroxyapatite and its drug release, *Mater. Sci. Eng. C*. 31 (2011) 593–599. doi:10.1016/j.msec.2010.11.025.
- [14] S.J. Kalita, S. Bose, H.L. Hosick, A. Bandyopadhyay, CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Na<sub>2</sub>O-based sintering additives for hydroxyapatite (HAp) ceramics, *Biomaterials*. 25 (2004) 2331–2339. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.09.012.
- [15] T.J. Webster, E.A. Massa-Schlueter, J.L. Smith, E.B. Slamovich, Osteoblast response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations, *Biomaterials*. 25 (2004) 2111–2121. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.09.001.
- [16] M.I. Ahymah Joshy, K. Elayaraja, R. V. Suganthi, S. Chandra Veerla, S.N. Kalkura, In vitro sustained release of amoxicillin from lanthanum hydroxyapatite nano rods, *Curr. Appl. Phys.* 11 (2011) 1100–1106. doi:10.1016/j.cap.2011.02.003.
- [17] A. Yasukawa, K. Kandori, H. Tanaka, K. Gotoh, Preparation and structure of carbonated calcium hydroxyapatite substituted with heavy rare earth ions, *Mater.*

- Res. Bull. 47 (2012) 1257–1263. doi:10.1016/j.materresbull.2012.01.018.
- [18] L. Yingguang, Y. Zhuoru, C. Jiang, Preparation, Characterization and Antibacterial Property of Cerium Substituted Hydroxyapatite Nanoparticles, *J. Rare Earths*. 25 (2007) 452–456. doi:10.1016/S1002-0721(07)60455-4.
- [19] D.G. Greenhalgh, Topical Antimicrobial Agents for Burn Wounds, *Clin. Plast. Surg.* 36 (2009) 597–606. doi:10.1016/j.cps.2009.05.011.
- [20] J.P. Ball, B.A. Mound, A.G. Monsalve, J.C. Nino, J.B. Allen, Biocompatibility evaluation of porous ceria foams for orthopedic tissue engineering, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 103 (2015) 8–15. doi:10.1002/jbm.a.35137.
- [21] J. Emsley, *Nature's Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements*, New Editio, Oxford University Press, 2011.
- [22] M.A. Jakupec, P. Unfried, B.K. Keppler, Pharmacological properties of cerium compounds, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 153 (2005) 101–111. doi:10.1007/s10254-004-0024-6.
- [23] K.M. Zia, S. Tabasum, M.F. Khan, N. Akram, N. Akhter, A. Noreen, M. Zuber, Recent trends on gellan gum blends with natural and synthetic polymers: A review, *Int. J. Biol. Macromol.* 109 (2018) 1068–1087. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.11.099.
- [24] P.A. Jansson, P. E., Lindberg, B. Sandford, Structural Studies of Gellan Gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*, *Carbohydr. Res.* (1983) 135–139.
- [25] L.T. dos R. Corrêa, A.G.S. de Laia, H. de S. Costa, Processamento e caracterização de hidrogéis a base de alginato e goma gelana visando aplicações em articulações, 14º Congr. Da Soc. Lat. Am. Biomateriais, Órgãos Artif. e Eng. Tecidos - SLABO. (2017) 427–436.
- [26] G. Lorenzo, N. Zaritzky, A. Califano, Rheological analysis of emulsion-filled gels

- based on high acyl gellan gum, *Food Hydrocoll.* 30 (2013) 672–680. doi:10.1016/j.foodhyd.2012.08.014.
- [27] F. Alhaique, E. Santucci, M. Carafa, T. Coviello, E. Murtas, F.M. Ricciari, Gellan in sustained release formulations: Preparation of gel capsules and release studies, *Biomaterials.* 17 (1996) 1981–1986. doi:10.1016/0142-9612(96)00017-8.
- [28] J.A.P. Vilela, F.D.A. Perrechil, C.S.F. Picone, A.C.K. Sato, R.L. Da Cunha, Preparation, characterization and in vitro digestibility of gellan and chitosan-gellan microgels, *Carbohydr. Polym.* 117 (2015) 54–62. doi:10.1016/j.carbpol.2014.09.019.
- [29] M. Salarian, M. Solati-Hashjin, S.S. SHAFIEI, A. Goudarzi, R. Salarian, A. Nemati, Surfactant-assisted synthesis and characterization of hydroxyapatite nanorods under hydrothermal conditions, *Mater. Sci.* 27 (2009) 1–16. [http://www.materialsscience.pwr.wroc.pl/bi/vol27no4/articles/ms\\_03\\_2008\\_204sala.pdf](http://www.materialsscience.pwr.wroc.pl/bi/vol27no4/articles/ms_03_2008_204sala.pdf).
- [30] A. Kolodziejczak-Radzimska, M. Samuel, D. Paukszta, A. Piasecki, T. Jesionowski, Synthesis of hydroxyapatite in the presence of anionic surfactant, *Physicochem. Probl. Miner. Process.* 50 (2014) 225–236. doi:10.5277/ppmp140119.
- [31] A.M. Sofronia, R. Baies, E.M. Anghel, C.A. Marinescu, S. Tanasescu, Thermal and structural characterization of synthetic and natural nanocrystalline hydroxyapatite, *Mater. Sci. Eng. C.* 43 (2014) 153–163. doi:10.1016/j.msec.2014.07.023.
- [32] Y. Mu, K. Zhu, J. Luan, S. Zhang, C. Zhang, R. Na, Y. Yang, X. Zhang, G. Wang, Fabrication of hybrid ultrafiltration membranes with improved water separation properties by incorporating environmentally friendly taurine modified hydroxyapatite nanotubes, *J. Memb. Sci.* 577 (2019) 274–284. doi:10.1016/j.memsci.2019.01.043.
- [33] C. Sarkar, S.K. Sahu, A. Sinha, J. Chakraborty, S. Garai, Y. Mu, K. Zhu, J. Luan,

- S. Zhang, C. Zhang, R. Na, Y. Yang, X. Zhang, G. Wang, Facile synthesis of carbon fiber reinforced polymer-hydroxyapatite ternary composite: A mechanically strong bioactive bone graft, *J. Memb. Sci.* 97 (2019) 388–396. doi:10.1016/j.msec.2018.12.064.
- [34] T. de Souza Cezarino, E.P. da Rocha, J. Vicente, L.J.B. Pereira, G.R. Sá, E.E. Garcia-Rojas, O.D. Gamallo, M.G. de Carvalho, Microencapsulation of sacha inchi oil using emulsion-based delivery systems, *Food Res. Int.* 99 (2017) 612–622. doi:10.1016/j.foodres.2017.06.039.
- [35] M. Bashir, S. Haripriya, International Journal of Biological Macromolecules Assessment of physical and structural characteristics of almond gum, *Int. J. Biol. Macromol.* 93 (2016) 476–482. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.09.009.
- [36] K. Momma, F. Izumi, VESTA 3 for three-dimensional visualization of crystal, volumetric and morphology data, *J. Appl. Crystallogr.* 44 (2011) 1272–1276. doi:10.1107/S0021889811038970.
- [37] J.R. Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, Introduction to Spectroscopy, 4<sup>a</sup> edition, Cengage Learning, Belmont, USA, 2009.
- [38] N.A.O. Pitombeira, J.G. Veras Neto, D.A. Silva, J.P.A. Feitosa, H.C.B. Paula, R.C.M. De Paula, Self-assembled nanoparticles of acetylated cashew gum: Characterization and evaluation as potential drug carrier, *Carbohydr. Polym.* 117 (2015) 610–615. doi:10.1016/j.ijheatmasstransfer.2018.05.039.
- [39] P. V. Quelemes, A.R. de Araújo, A. Plácido, C. Delerue-Matos, J.S. Maciel, L.J. Bessa, A.S. Ombredane, G.A. Joanitti, M.J. dos S. Soares, P. Eaton, D.A. da Silva, J.R.S.A. Leite, Quaternized cashew gum: An anti-staphylococcal and biocompatible cationic polymer for biotechnological applications, *Carbohydr. Polym.* 157 (2017) 567–575. doi:10.1016/j.carbpol.2016.10.026.
- [40] F.G. Prezotti, B. Stringhetti, F. Cury, R.C. Evangelista, Mucoadhesive beads of gellan gum / pectin intended to controlled delivery of drugs, *Carbohydr. Polym.* 113 (2014) 286–295. doi:10.1016/j.carbpol.2014.07.021.

- [41] A. Verma, R. Nagarwal, Preparation and Characterization of Floating Gellan-Chitosan Polyelectrolyte Preparation and Characterization of Floating Gellan-Chitosan Polyelectrolyte Complex Beads, (2012).
- [42] F. Sun, B.K. Lim, S.C. Ryu, D. Lee, J. Lee, Preparation of multi-layered film of hydroxyapatite and chitosan, *Mater. Sci. Eng. C.* 30 (2010) 789–794. doi:10.1016/j.msec.2010.03.009.
- [43] J.K.M.C. Gonsalves, J.N.S. Ferro, E.O. Barreto, R.S. Nunes, M.E.G. Valerio, Influence of concentration of hydroxyapatite surface modifier agent on bioactive composite characteristics, 42 (2016) 17023–17031. doi:10.1016/j.ceramint.2016.07.210.
- [44] M. Fröhlich, W.L. Grayson, L.Q. Wan, D. Marolt, M. Drobnic, G. Vunjak-, *Tissue Engineered Bone Grafts : Biological Requirements , Tissue Culture and Clinical Relevance*, (2008) 254–264.
- [45] B. Thavornnyutikarn, N. Chantarapanich, K. Sitthiseripratip, G.A. Thouas, Q. Chen, *Bone tissue engineering scaffolding: computer-aided scaffolding techniques*, 2014. doi:10.1007/s40204-014-0026-7.
- [46] L. Roseti, V. Parisi, M. Petretta, C. Cavallo, G. Desando, I. Bartolotti, B. Grigolo, *Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives*, *Mater. Sci. Eng. C.* 78 (2017) 1246–1262. doi:10.1016/j.msec.2017.05.017.
- [47] A. Shavandi, A.E.D.A. Bekhit, Z. Sun, M.A. Ali, *Bio-scaffolds produced from irradiated squid pen and crab chitosan with hydroxyapatite/ $\beta$ -tricalcium phosphate for bone-tissue engineering*, *Int. J. Biol. Macromol.* 93 (2016) 1446–1456. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.04.046.
- [48] P. Kanchana, M. Navaneethan, C. Sekar, *Fabrication of Ce doped hydroxyapatite nanoparticles based non-enzymatic electrochemical sensor for the simultaneous determination of norepinephrine, uric acid and tyrosine*, *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.* 226 (2017) 132–140. doi:10.1016/j.mseb.2017.09.015.



- [49] Y.C. Yang, C.C. Chen, J.B. Wang, Y.C. Wang, F.H. Lin, Flame sprayed zinc doped hydroxyapatite coating with antibacterial and biocompatible properties, *Ceram. Int.* 43 (2017) S829–S835. doi:10.1016/j.ceramint.2017.05.318.
- [50] Y. Ren, H. Zhou, M. Nabiyouni, S.B. Bhaduri, Rapid coating of AZ31 magnesium alloy with calcium deficient hydroxyapatite using microwave energy, *Mater. Sci. Eng. C.* 49 (2015) 364–372. doi:10.1016/j.msec.2015.01.046.
- [51] M. Okada, T. Matsumoto, Synthesis and modification of apatite nanoparticles for use in dental and medical applications, *Jpn. Dent. Sci. Rev.* 51 (2015) 85–95. doi:10.1016/j.jdsr.2015.03.004.
- [52] T.I. Arifta, M.L. Munar, K. Tsuru, K. Ishikawa, Fabrication of interconnected porous calcium-deficient hydroxyapatite using the setting reaction of  $\alpha$  tricalcium phosphate spherical granules, *Ceram. Int.* 43 (2017) 11149–11155. doi:10.1016/j.ceramint.2017.05.162.
- [53] A. Sobczak-Kupiec, E. Olender, D. Malina, B. Tyliczszak, Effect of calcination parameters on behavior of bone hydroxyapatite in artificial saliva and its biosafety, *Mater. Chem. Phys.* 206 (2018) 158–165. doi:10.1016/j.matchemphys.2017.12.020.
- [54] K. Rezwan, Q.Z. Chen, J.J. Blaker, A.R. Boccaccini, Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials.* 27 (2006) 3413–3431. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.039.
- [55] J. Yang, T. Long, N.F. He, Y.P. Guo, Z.A. Zhu, Q.F. Ke, Fabrication of a chitosan/bioglass three-dimensional porous scaffold for bone tissue engineering applications, *J. Mater. Chem. B.* 20 (2014) 6611–6618. doi:10.1039/c4tb00940a.
- [56] J.C. Elliot, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*, 1st ed., New York, 1994.
- [57] S.R. Levitt, P.H. Crayton, E.A. Monroe, R.A. Condrate, Forming method for apatite prostheses, *J. Biomed. Mater. Res.* 3 (1969) 683–684.

doi:10.1002/jbm.820030413.

- [58] E.A. Monroe, W.V. Votava, D.B. Bass, J. McMullen, New calcium phosphate ceramic material for bone, *J. Dent. Res.* 50 (1971) 1–3. doi:10.1177/00220345710500041201.
- [59] N.A.M. Barakat, M.S. Khil, A.M. Omran, F.A. Sheikh, H.Y. Kim, Extraction of pure natural hydroxyapatite from the bovine bones bio waste by three different methods, *J. Mater. Process. Technol.* 209 (2009) 3408–3415. doi:10.1016/j.jmatprotec.2008.07.040.
- [60] A.H. Aparecida, M. Vinícius, L. Fook, M. Luis, C. Guastaldi, D. De Físico-química, I. De Química, U.E. Paulista, R.F. Degni, Estudo da influência dos iões  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $SO_4^{2-}$  e  $CO_3^{2-}$  na cristalização biomimétrica de fosfato de cálcio amorfo (ACP) e conversão a fosfato octacálcico (OCP), 30 (2007) 892–896.
- [61] A.E. Aguiar, M. de O. Silva, A.C.D. Rodas, C.A. Bertran, Mineralized layered films of xanthan and chitosan stabilized by polysaccharide interactions: A promising material for bone tissue repair, *Carbohydr. Polym.* 207 (2019) 480–491. doi:10.1016/j.carbpol.2018.12.006.
- [62] J. Liu, S. Willför, C. Xu, A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications, *Bioact. Carbohydrates Diet. Fibre.* 5 (2015) 31–61. doi:10.1016/j.bcdf.2014.12.001.
- [63] R.C.M. De Paula, F. Heatley, P.M. Budd, Characterization of *Anacardium occidentale* Exudate Polysaccharide, 45 (1998).
- [64] H.C.B. De Paula, E.F. De Oliveira, F.O.M.S. Abreu, R.C.M. De Paula, S.M. De Moraes, M.M.C. Forte, Esferas ( Beads ) de Alginato como Agente Encapsulante de Óleo de Croton Zehntneri Pax et Hoffm ALG / Ca Beads as an Encapsulation Agent of Croton Zehntneri Pax et Hoffm Essential Oil, 20 (2010) 112–120.
- [65] D. Nadvorny, J.L. Soares Sobrinho, L.C.C. Nunes, F.R.L. de Souza, C. Oliveira, F. Veiga, E.C. Silva-Filho, J.M.N.A. Bezerra, A.J. Ribeiro, M.F. de La Roca

- Soares, Gums' based delivery systems: Review on cashew gum and its derivatives, *Carbohydr. Polym.* 147 (2016) 188–200. doi:10.1016/j.carbpol.2016.02.042.
- [66] F.M.F. Monteiro, A.L.F. Porto, G.V. Schirato, A.M. dos A.C. Leão, F. de O. Silva, J.L. de Lima Filho, O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas, *Ciência Rural*. 36 (2006) 149–154. doi:10.1590/s0103-84782006000100022.
- [67] A.C. Ribeiro, P. Eaton, D.A. Campos, C. Eiras, M. Manuela Pintado, J.R.S.A. Leite, E.M. Costa, F.B. Araruna, F.K. Tavarina, J.C. Fernandes, Study of antimicrobial activity and atomic force microscopy imaging of the action mechanism of cashew tree gum, *Carbohydr. Polym.* 90 (2012) 270–274. doi:10.1016/j.carbpol.2012.05.034.
- [68] V.K. Shingala, A.K. Singh, S.K. Yadav, T. Sivakumar, Design and characterization of diclofenac sodium tablets containing *Mangifera indica* resin as release retardant, *Int. J. PharmTech Res.* 2 (2010) 2107–2111.
- [69] K. Ofori-Kwakye, Y. Asantewaa, S.L. Kipo, Physicochemical and binding properties of cashew tree gum in metronidazole tablet formulations, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2 (2010) 105–109.
- [70] R. da S.N. Lima, C.R. de S. and R. de A. , Jacira Rabelo Lima, Moreira, Cashew-tree (*Anacardium occidentale* L.) exudate gum: a novel bioligand tool, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 35 (2002) 45–53. doi:10.1042/BA20010024.
- [71] E. Gyedu-Akoto, I. Oduro, Physico-chemical properties of cashew tree gum, *African J. Food Sci.* 5 (2008) 60–64. <http://www.academicjournals.org/journal/AJFS/article-full-text-pdf/8B3B8E516526>.
- [72] United Nations Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, ONU. (2019) 1. <http://www.fao.org/3/ac451e/ac451e02.htm#TopOfPage>.

- [73] L. Augusto, L. Serrano, P. Felizardo, A. De Paula, Sistema de Produção do Caju Aspectos econômicos da cultura do cajueiro, (2016) 1–193.
- [74] M. Hu, F. Xiao, Q.F. Ke, Y. Li, X.D. Chen, Y.P. Guo, Cerium-doped whitlockite nanohybrid scaffolds promote new bone regeneration via SMAD signaling pathway, *Chem. Eng. J.* 359 (2019) 1–12. doi:10.1016/j.cej.2018.11.116.
- [75] C.E.S. Carvalho, E.P.C. Sobrinho-Junior, L.M. Brito, L.A.D. Nicolau, T.P. Carvalho, A.K.S. Moura, K.A.F. Rodrigues, S.M.P. Carneiro, D.D.R. Arcanjo, A.M.G.L. Citó, F.A.A. Carvalho, Anti-Leishmania activity of essential oil of *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All.: Composition, cytotoxicity and possible mechanisms of action, *Exp. Parasitol.* 175 (2017) 59–67. doi:10.1016/j.exppara.2017.02.012.
- [76] M. Steindel, E. Bachère, M.A. Barracco, L.C. Miletti, S.E. Löfgren, Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals, *Exp. Parasitol.* 118 (2007) 197–202. doi:10.1016/j.exppara.2007.07.011.
- [77] A. Fahami, B. Nasiri-Tabrizi, G.W. Beall, W.J. Basirun, Structural insights of mechanically induced aluminum-doped hydroxyapatite nanoparticles by Rietveld refinement, *Chinese J. Chem. Eng.* 25 (2017) 238–247. doi:10.1016/j.cjche.2016.07.013.
- [78] A. Uhart, J.B. Ledeuil, D. Gonbeau, J.C. Dupin, J.P. Bonino, F. Ansart, J. Esteban, An Auger and XPS survey of cerium active corrosion protection for AA2024-T3 aluminum alloy, *Appl. Surf. Sci.* 390 (2016) 751–759. doi:10.1016/j.apsusc.2016.08.170.
- [79] D.R. Pereira, J. Silva-Correia, J.M. Oliveira, R.L. Reis, A. Pandit, M.J. Biggs, Nanocellulose reinforced gellan-gum hydrogels as potential biological substitutes for annulus fibrosus tissue regeneration, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 14 (2018) 897–908. doi:10.1016/j.nano.2017.11.011.
- [80] M.W. Lee, H.F. Tsai, S.M. Wen, C.H. Huang, Photocrosslinkable gellan gum film

- as an anti-adhesion barrier, *Carbohydr. Polym.* 90 (2012) 1132–1138. doi:10.1016/j.carbpol.2012.06.064.
- [81] C.G. Mothé, M.A. Rao, Thermal behavior of gum arabic in comparison with cashew gum, *Thermochim. Acta.* 357–358 (2000) 9–13. doi:10.1016/S0040-6031(00)00358-0.
- [82] C.H. Leung, C.S.K. Mak, P.W.T. Pong, E.X. Wu, C.W. Leung, J. Shi, K.Y. Chan, C.M. Wong, N.M.M. Chan, K.Y. Mak, L. Li, Sterilization on dextran-coated iron oxide nanoparticles: Effects of autoclaving, filtration, UV irradiation, and ethanol treatment, *Microelectron. Eng.* 111 (2013) 310–313. doi:10.1016/j.mee.2013.02.021.
- [83] C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis., *Nat. Methods.* 9 (2012) 671–5. doi:10.1038/nmeth.2089.
- [84] A.A. HIRANI, S. DONG, K.R. COLACINO, M. ROMAN, Y.W. LEE, Cytotoxicity and Cellular Uptake of Cellulose Nanocrystals, *Nano Life.* 02 (2012) 1241006. doi:10.1142/s1793984412410061.
- [85] T. Niamsap, N.T. Lam, P. Sukyai, Production of hydroxyapatite-bacterial nanocellulose scaffold with assist of cellulose nanocrystals, *Carbohydr. Polym.* 205 (2019) 159–166. doi:10.1016/j.carbpol.2018.10.034.
- [86] S.K. Roy Chowdhury, A. Mishra, B. Pradhan, D. Saha, Wear characteristic and biocompatibility of some polymer composite acetabular cups, *Wear.* 256 (2004) 1026–1036. doi:10.1016/S0043-1648(03)00535-0.
- [87] J. Ramana Ramya, K. Thanigai Arul, P. Sathiamurthi, K. Asokan, S. Narayana Kalkura, Novel gamma irradiated agarose-gelatin-hydroxyapatite nanocomposite scaffolds for skin tissue regeneration, *Ceram. Int.* 42 (2016) 11045–11054. doi:10.1016/j.ceramint.2016.04.001.



**CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO DE SCAFFOLD  
COMPOSTO POR HIDROXIAPATITA DOPADA COM CÉRIO E  
GOMAS NATURAIS: PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E  
MECÂNICAS**

# DESENVOLVIMENTO DE SCAFFOLD COMPOSTO POR HIDROXIAPATITA DOPADA COM CÉRIO E GOMAS NATURAIS: PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E MECÂNICAS

*Marcus Vinicius Beserra dos Santos<sup>1</sup>, Lorena Bastos Nogueira Rocha<sup>2</sup>, Ewerton Gomes Vieira<sup>3</sup>, Ana Leite Oliveira<sup>4</sup>, Anderson Oliveira Lobo<sup>5</sup>, Maria Acelina Martins de Carvalho<sup>6</sup>, Josy Antevelli Osajima<sup>7</sup> and Edson Cavalcanti Silva-Filho<sup>8</sup>*

<sup>1</sup>Universidade Federal do Piauí; [mvbeserradossantos@gmail.com](mailto:mvbeserradossantos@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal do Piauí; [lorenna\\_nog@hotmail.com](mailto:lorenna_nog@hotmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal do Piauí; [ewertongv13@gmail.com](mailto:ewertongv13@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Católica Portuguesa-Porto; [aloliveira@porto.ucp.pt](mailto:aloliveira@porto.ucp.pt)

<sup>5</sup>Universidade Federal do Piauí; [lobo@ufpi.edu.br](mailto:lobo@ufpi.edu.br)

<sup>6</sup>Universidade Federal do Piauí; [mcelina@ufpi.edu.br](mailto:mcelina@ufpi.edu.br)

<sup>7</sup>Universidade Federal do Piauí; [josy\\_osajima@yahoo.com.br](mailto:josy_osajima@yahoo.com.br)

<sup>8</sup>Universidade Federal do Piauí; [edsonfilho@ufpi.edu.br](mailto:edsonfilho@ufpi.edu.br)

## Resumo

Hidroxapatita (HAp) é um material cerâmico que participa da composição da fase inorgânica dos ossos. As substituições iônicas melhoram as características do HAp, por exemplo, íons de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) por íons de cério ( $\text{Ce}^{3+}$ ). O uso de HAp é potencializado através de biopolímeros, goma de caju (GC) e goma de gelana (GG), uma vez que o CG/GG são agentes organizadores na modelagem de biocompósitos estruturados, scaffolds. O biocompósito Ce-HApGC foi sintetizado utilizando um método de precipitação química. O material obtido foi congelado ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h) e seco a vácuo por 24h. O Ce-HApGC foi caracterizado por DRX, XPS, FTIR, TG, DTG, microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo (FESEM) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS). DRX e FTIR mostraram que Ce-HApGC foi sintetizado com sucesso. DRX mostrou picos característicos em  $2\theta=25,87$  e  $32,05$ , correspondendo aos planos cristalinos (0 0 2) e (2 1 1), respectivamente, enquanto as bandas de fosfato estavam presentes em  $1\ 050\ \text{cm}^{-1}$  e  $1\ 098\ \text{cm}^{-1}$ , indicando o sucesso da síntese do compósito. FESEM revelou a presença de poros e de grânulos nanoestruturados de Ce-HApGC. O teste mecânico identificou que Ce-HApGC tem uma resistência à compressão semelhante à força do osso esponjoso e a de alguns aloenxertos usados em procedimentos cirúrgicos. Testes in vitro (MTT e hemólise) mostraram que o scaffold não foi tóxico, e que apresentou baixa atividade hemolítica. Assim, o Ce-HApGC tem potencial para aplicação em engenharia de tecido ósseo.



Palavra-chave: Fosfato de Cálcio, dopagem e scaffold.

## Abstract

Hydroxyapatite (HAp) is a ceramic material composing the inorganic portion of bones. Ionic substitutions enhance characteristics of HAp, for example, calcium ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ) by cerium ions ( $\text{Ce}^{3+}$ ). The use of HAp is potentialized through biopolymers, cashew gum (CG), and gellan gum (GG), since CG/GG is structuring agents in the modeling of structured biocomposites, scaffolds. Ce-HApCG biocomposite was synthesized using a chemical precipitation method. The obtained material was frozen ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 24 h), and then vacuum dried for 24 h. The Ce-HApCG was characterized by XRD, XPS, FTIR, TG, DTG, field emission scanning electron microscopy (FESEM), and energy dispersive spectroscopy (EDS). XRD and FTIR showed that Ce-HApCG was successfully synthesized. XRD showed characteristic peaks at  $2\theta = 25.87$  and  $32.05$ , corresponding to the crystalline planes (0 0 2) and (2 1 1), respectively, while phosphate bands were present at  $1,050\text{ cm}^{-1}$  and  $1,098\text{ cm}^{-1}$ , indicating the success of composite synthesis. FESEM showed pores and incorporated nanostructured granules of Ce-HApCG. The mechanical test identified that Ce-HApCG has a compressive strength similar to the cancellous bone's strength and some allografts used in surgical procedures. In vitro tests (MTT assay and hemolysis) showed that scaffold was non-toxic and exhibited low hemolytic activity. Thus, the Ce-HApCG has potential for application in bone tissue engineering.

**Keywords:** calcium phosphate; doping; scaffold

## 1.0 Introdução

A hidroxiapatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , HAp, é um dos biomateriais cerâmicos popular quem está sendo bastante pesquisado na atualidade. O fato motivador baseia-se na compatibilidade e similaridade química existente entre a hidroxiapatita e diversas partes do corpo humano, os tecidos ósseos e dentários[56].

Albee iniciou os estudos na década de 1930 com a utilização do fosfato tricálcico. Porém, foi somente em 1974 que Levitt[57] e Monroe *et al.*[58] publicaram a aplicação deste fosfato na odontologia. Atualmente, entre os fatores motivadores de interesse nestes biomateriais está no fato de os fosfatos de cálcio serem materiais

osteogênicos, osteocondutores e osteoindutores[4] somado a excelentes resultados quando usados como materiais para revestimentos de próteses ou até mesmo quando estes são utilizados como materiais substitutos de pequenas partes do corpo humano [4,56,59].

Todavia, a HAp pura pode apresentar baixa reabsorção pelo organismo[10], o que afeta sua bioatividade com o organismo. A baixa tenacidade que esta biocerâmica apresenta faz com que a HAp tenha facilidade em fraturar frente a possíveis esforços [4,11,12]. Frente a essas inabilidades, substituições iônicas se mostram como alternativa no objetivo de melhorar as propriedades mecânicas e biológicas da hidroxiapatita. Íons de  $\text{Ca}^{2+}$  podem ser substituído por vários íons divalentes e trivalentes, como o  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ce}^{3+}$ ,  $\text{La}^{3+}$  [10,13–17].

Íons de cério,  $\text{Ce}^{3+}$ , têm sido largamente utilizados como agentes antibacterianos, devido a ampla segurança que este íon apresenta. Fármacos que contém cério ganham destaque devido à necessidade de uma baixa concentração dos íons que se somam a longa duração da ação biocida. Biocompatibilidade e reabsorção são novas características incorporadas com a presença dos íons Cério[18–20].

O cério também pode funcionar de forma similar ao cálcio no organismo, já que estes podem se acumular nos organismos em pequenas quantidades, proporcionando assim, um estímulo ao organismo na região do tecido[21,22]. Propriedades como eletronegatividade e raio iônico assemelham íons de cálcio com íons de cério, sendo eletronegatividade e raio iônico, respectivamente, 1,01 e 0,100 nm para  $\text{Ca}^{2+}$  e 1,06 e 0,107 nm para o cério[18]. Esta semelhança de propriedades vem permitir a possibilidade da troca iônica de  $\text{Ca}^{2+}$  por Cério [60].

O desenvolvimento de novos compósitos tem passado pela utilização de diversos biopolímeros, que devido a sua origem natural, são abundantes na natureza, não tóxicos, e acrescentam características como biodegradabilidade e biocompatibilidade aos novos materiais[61,62]. Dentre os biopolímeros, a goma do cajueiro (GC) tem ganho destaque nos últimos anos. A GC é um polissacarídeo composto por galactose (72%), D-glicose (14%), ácido glucurônico (4,7%), arabinose (4,6%) e ramnose (3,2%)[63–65].

Dentre as propriedades dos biopolímeros já citadas, a GC pode agir como um bom agente de revestimento, além de possuir propriedade de agente anti-inflamatório, cicatrizante[66], agente antimicrobiano[67] além de características como agente ligante

ou adesivo [68,69]. A goma do cajueiro é obtida a partir da casca do caule do cajueiro (*Anacardium occidentale L.*, family: *Anacardiaceae*) e são produzidos nas células epiteliais da planta, o fluido de goma. [69–71].

Atualmente a *Anacardium occidentale L.* têm cerca de 1,12 milhões de hectares plantados ao redor do mundo, sendo o Brasil e a Índia responsáveis por 91% das exportações comerciais de produtos obtidos da *Anacardium occidentale L.*[72]. No último levantamento feito pelo IBGE no Brasil, 2016, o cajueiro apresentou mais de 586000 hectares de área plantada, deixando o Brasil entre os cinco maiores países produtores desta fruteira, sendo a região Nordeste, em especial os estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte como detentores de 90% de toda a área plantada no País[73].

A composição do scaffold é completada com a utilização da goma gelana (GG), um biopolímero que tem ganhado destaque por sua aplicação na indústria farmacêutica e alimentícia. Sua inserção na síntese do scaffold se encaixa de modo essencial por causa de uma característica singular em formar um gel transparente quando em solução aquosa ou quando se encontra na presença de íons metálicos[23].

A GG é um polissacarídeo aniônico extracelular que é produto da excreção de bactérias do tipo *Sphingonomas elodea* (ATCC31461), produzido através de fermentação aeróbica. A GG se apresenta com um monossacarídeo de unidades repetidas com um esqueleto linear, sendo as unidades: 1,3β-D-glucose, 1,4 β-D-ácido glucurônico, 1,4 β-D-glucose e 1,4 α-L-ramnose[23–26]. Com isso, este trabalho tem por objetivo sintetizar e caracterizar scaffold a base de hidroxiapatita dopada com cério, goma de cajueiro e goma gelana para aplicações biomédicas em enxertos ósseos. Assim como avaliar as suas propriedades mecânicas e biológicas por meio dos ensaios MTT e hemólise.

## **2.0 Parte Experimental**

### **2.1 materiais e reagentes**

Para o desenvolvimento do trabalho, foram utilizados os seguintes reagentes: hidróxido de cálcio – Ca(OH)<sub>2</sub> (ENSURE<sup>®</sup>); Fosfato de amônio dibásico – (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma- Aldrich); Nitrato de cério(III) hexahidratado – CeN<sub>3</sub>O<sub>9</sub>.6H<sub>2</sub>O (Sigma- Aldrich);

Hidróxido de Sódio – NaOH (ISOFAR); meio DMEM F12 (Sigma- Aldrich); 3-[4,5dimetiltiazol-zil]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich); Dimetilsulfóxido (DMSO) (Mallinckrodt Chemicals); Goma de cajueiro isolada; água destilada e Goma Gelana, gentilmente fornecida pela KelcoGel®.

## **2.2 Isolamento da goma do cajueiro**

O isolamento da goma do cajueiro ocorreu com a coleta do exsudato presente em fissuras encontradas nos caules das árvores *Anacardium occidentale L.*, conhecida como cajueiro. As árvores que ocorreram a coleta se encontram na Universidade Federal do Piauí – UFPI, SISGEN: ABD61DA. Após a coleta, o exsudato foi quebrado em partes pequenas, onde também ocorreu a separação inicial do exsudado de pequenos pedaços de madeira provenientes do caule do cajueiro. Após sua quebra, o exsudato foi dissolvido em água destilada na proporção de 10.0 gramas para cada 100.0 mL de água. A dissolução do exsudato aconteceu através de agitação mecânica por 24 horas.

A solução obtida foi filtrada à vácuo para retirar as impurezas restantes, em seguida o pH da solução foi ajustado para 7 com adição de NaOH. Após o ajuste do pH, a goma do cajueiro foi precipitada por adição de álcool, ao tempo em que a solução era agitada. A proporção de álcool adicionada à solução de exsudato foi de 3:1. Já precipitada, a goma do cajueiro foi centrifugada e lavada com acetona por três vezes. O processo de isolamento da goma foi finalizado com a secagem em estufa por um período de 24 horas a 50°C.

## **2.3 Síntese do compósito de hidroxiapatita dopada com Cério e GC**

A síntese do compósito é iniciada pela dissolução de 1.0 g da goma de cajueiro isolada em 20.0 mL água destilada. Após a dissolução da goma de cajueiro isolada, avança-se para a síntese da HAp dopada na solução de goma.

A síntese da HAp ocorreu através da reação de precipitação entre os reagentes precursores de íons de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$  –  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) e íons fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$  –  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ). A dopagem da HAp com íons de cério ( $\text{Ce}^{3+}$  –  $\text{CeN}_3\text{O}_9.6\text{H}_2\text{O}$ ) aconteceu simultaneamente na reação de precipitação. Para a síntese de 2.0 g de hidroxiapatita dopada com 5% de cério, pesou-se, 0.4342 g de  $\text{CeN}_3\text{O}_9.6\text{H}_2\text{O}$ , 1.4077 g de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e 1.5788 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , dissolvendo cada massa individualmente em 10.0 mL de água destilada.

Após a dissolução, em separado, de cada precursor e do dopante, eles foram transferidos para o béquer que continha a solução da goma do cajueiro. Inicialmente transferiu-se o fosfato de amônio dibásico, e em seguida adicionou-se, concomitantemente, as soluções de hidróxido de cálcio e de nitrato de cério hexahidratado. A mistura foi mantida em agitação por 4 horas a temperatura ambiente, onde permaneceu em repouso por 12 horas.

O procedimento seguiu com a centrifugação da solução, e descarte do sobrenadante. Posteriormente, foi acrescentado água destilada ao material para este ser lavado, seguido de centrifugação e descarte do sobrenadante. A procedimento da lavagem do material foi feito por 3 vezes, obtendo-se o compósito. Por fim o compósito foi colocado para secar em estufa a 100 °C por 24 horas, sendo que os grãos secos obtidos foram macerados para se obter o material na forma de pó. A proporção da síntese de Ce-HAp e da GC foi de 2:1, respectivamente. O compósito foi nomeado Ce-HApGC.

#### ***2.4 Síntese Dos Scaffolds***

O scaffold foi sintetizado misturando-se 1.0 g de pó do compósito Ce-HApGC com 0.2 g de pó da GG. Após a homogeneização da mistura dos pós, adicionou-se 10.0 mL de água destilada, com a mistura sendo agitada mecanicamente por 10 minutos. Obteve-se um gel que foi colocada em molde cilíndrico, que serviu para se obter o scaffold. O gel foi congelado em seguida a -20 °C por 24 horas, concluindo a formulação do scaffold com 24 horas de secagem a vácuo. O scaffold obtido (Ce-HApGC/GG) foi denominado de  $S_{HG}$ .

#### ***2.5 Caracterização Físico-Química Dos Materiais***

A caracterização dos materiais precursores, do compósito e scaffold, ocorreram com as seguintes especificações. A difração de raios foi realizada em um LABX – XDR 600, Shimadzu, Cu – K $\alpha$  ( $\lambda = 1,5406\text{\AA}$ ) com  $2\theta$  no intervalo de 10° a 75° e 10° a 110°, para o caso do refinamento, com taxa de varredura de 2°.min<sup>-1</sup> com tempo de exposição de 40 minutos. A espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-X (XPS) foi realizada com um sistema de espectrômetro (ESCA+, Scienta-Omicron) equipado com um analisador hemisférico (EA125) e uma fonte de radiação monocromada Al K $\alpha$  (Xm1000, 1486,7 eV). A fonte de raios-X foi usada com uma potência de 280 W, enquanto o espectrômetro trabalhava em um modo de passos de energia constante de 50

eV. A análise térmica foi executada no equipamento SDT Q 600 V20.9 Build 20 da TA Instruments, na atmosfera de nitrogênio com fluxo de 100 mL/min e taxa de aquecimento de 10°/min. As micrografias foram conseguidas com um microscópio eletrônico de varredura (MEV) com canhão de emissão por campo, da marca FEI, e modelo Quanta FEG 250, com tensão de aceleração de 1 a 30 kV, equipado com EDS de SDD (Silicon drift detectors), marca Ametek, modelo HX-1001, detector Apollo X-SDD, com deposição das amostras em fita adesiva de carbono de dupla face e recobertas por ouro em metalizadora da marca Quorum, modelo Q150R durante 50 segundos, a 20 miliampères, por plasma gerando em atmosfera de argônio. As análises de EDS foram realizadas no mesmo equipamento, com os espectros das amostras coletados a 25 kV e spot 5. A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier foi realizada em um Espectromômetro FTIR modelo Vertex 70 do fabricante Bruker Optics com 64 scans para cada amostra, com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>, por ATR. O teste de compressão foi realizado em uma máquina de teste universal EMIC DL20000, em scaffolds cilíndricos ( $\varnothing = 13,48$  mm e altura,  $h = 13,54$  mm) com uma taxa de compressão de 5 mm/min.

## ***2.6 Testes de caracterização In Vitro***

### ***2.6.1 Teste de degradação***

O teste de degradação aconteceu com a imersão dos scaffolds em solução de fluido corporal simulado (PBS). Os scaffolds foram inicialmente pesados sendo em seguida submersos em solução de PBS e levado à incubadora de crescimento celular à temperatura de 37 °C. O intervalo de permanência na estufa variou nos seguintes intervalos: 1, 7, 14, 21 e 28 dias. Após cada período, os scaffolds foram retirados da estufa, congelados e secos por liofilização, passando por uma pesagem final. O cálculo da degradação foi realizado pela equação:  $W = \frac{(W_{ini} - W_{fin})}{W_{ini}}$  [74].

### ***2.6.2 Ensaio de MTT e Hemólise***

#### ***2.6.2.1 Ensaio MTT***

A citotoxicidade das soluções do scaffold  $S_{HG}$  foi avaliada utilizando-se o teste do brometo de 3-[4,5dimetiltiazol-zil]-2,5-difeniltetrazolio (MTT). O scaffold  $S_{HG}$  foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) a fim de se obter uma solução-mãe de 80 mg.mL<sup>-1</sup>. Em cada ensaio, a solução-mãe foi diluída em meio de cultura DMEM F12 para

ensaios com célula tronco mesenquimal (CTM) armazenadas no Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-tronco (*NUPCelt/UFPI*) para atingir as concentrações desejadas, não ultrapassando a quantidade de 0.2% de DMSO. Em placas separadas de 96 poços, adicionou-se 100 µL de meio DMEM F12 suplementado e cerca de  $2 \cdot 10^3$  CTM em cada poço. Essas células foram incubadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas até ocorrer a adesão celular, seguindo-se de duas lavagens com meio DMEM F12 suplementado para retirada das células que não aderiram. Posteriormente, em cada placa, foram adicionados 100 µL de DMEM F12 suplementado com diferentes concentrações das soluções testadas separadamente (25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 e 3200 µg.mL<sup>-1</sup>).

Em seguida, as células foram incubadas por 48 horas e, após este período, foram adicionados 10 µL de MTT diluído em meio DMEM F12 a 5 mg.mL<sup>-1</sup>. Foram incubados por mais 4 horas em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 100 µL de DMSO em todos os poços. As placas foram colocadas sob agitação por 30 minutos em agitador de Kline (modelo AK 0506), a temperatura ambiente para dissolução completa do formazan. Por último, foi realizada a leitura a 550 nm em leitora de placa Biotek (modelo ELx800). O procedimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem e em concentração citotóxica para 50% das CTM (CC50) sendo o grupo controle considerado como 100% [75]. O controle negativo foi realizado com meio DMEM F12 a 0.2% de DMSO.

#### **2.6.2.2 Hemólise (Ensaio de atividade hemolítica)**

Para a avaliação da atividade hemolítica foram utilizados eritrócitos de caprinos coletados com anticoagulante (EDTA). O teste foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA/UFPI), nº117/15. Após a coleta, os eritrócitos foram diluídos em 80 µL de PBS, ajustando a concentração do sangue para 5 % de hemácias. Em seguida foi adicionado o extrato do scaffold *SHG* a ser analisado diluído em volume de 20 µL de PBS. Logo após, foram incubados durante 1 hora a 37 °C e a reação foi interrompida pela adição de 200 µL de PBS. A suspensão foi centrifugada a 1000 G, por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi submetido à espectrofotometria a um comprimento de onda de 550 nm para quantificar a atividade hemolítica. A ausência (controle negativo) e 100% de hemólise (controle positivo) foram determinadas,

substituindo a solução de amostra testada com igual volume de PBS e água ultrapura, respectivamente. O procedimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem e em concentração hemolítica para 50% dos eritrócitos (CH50) considerando o controle positivo como 100% de hemólise[76].

### 3.0 Resultados e Discussão

#### 3.1 Caracterização dos Compósitos.

O scaffold foi obtido através de um molde cilíndrico, se apresentando de forma correspondente ao molde utilizado na síntese, fato que apresenta a capacidade de modelação do  $S_{HG}$  de acordo como se deseja produzi-lo. De cor levemente amarelada, o scaffold sintetizado exibiu um comprimento de base e diâmetro de 15.74 e 13.48 mm, respectivamente. A nível macroscópico, os scaffolds se apresentam homogeneamente, sem fissuras, sem arranhuras ou marcas que demonstrassem rachaduras, sendo perfeita a integridade estrutural do  $S_{HG}$ . Ao ser tocado, o scaffold se mostra um material esponjosos, apresentando um certo grau de rigidez à compressão. A Figura 1 mostra a imagem do scaffold obtido.



Figura 1 - Scaffold obtido nesse estudo.

HAp, Ce-HAp, Ce-HApGC e  $S_{HG}$  foram sintetizadas com sucesso pelo método de precipitação simples. Comparando-se os difratogramas obtidos experimentalmente com o banco de dados no software *X'Pert HighScorePlus*, pode-se indexar os picos dos materiais sintetizados e observar que eles se equiparam aos mesmos picos que o cartão cristalográfico do Joint Committee on Powder Diffraction and Standards, JCPDS, 00-003-0747 da HAp. A comparação entre os difratogramas mostram



a presença dos planos (0 0 2), (2 1 1), (1 1 2), (3 0 0), (3 1 0), (1 3 0), (2 2 1), (2 2 2), (2 3 1), (3 2 1), (4 1 1) e (0 0 4) em comum[10,29–33].

É importante notar que a hidroxiapatita dopada com cério não apresentou modificações em relação à hidroxiapatita pura. A figura 2 apresenta os difratogramas da HAp, Ce-HAp, Ce-HApGC, Scaffold  $S_{HG}$  e das gomas de cajueiro e gelana. Os difratogramas das gomas se apresentam de maneira bastante semelhante, com um pico alargado e difuso na região  $2\theta$  de  $20^\circ$ , comportamento comum de materiais amorfos. Essa resposta indica um baixo grau de cristalinidade e baixa organização estrutural, comumente atribuído a polímeros [34,35].

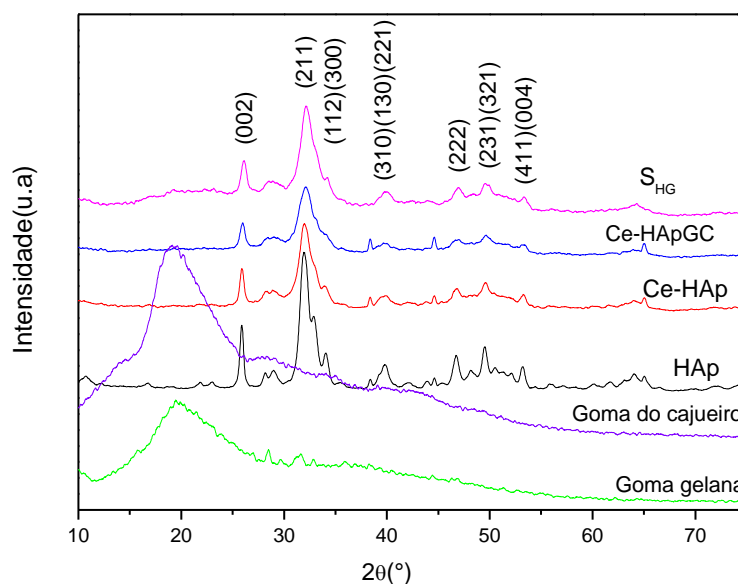


Figure 2: XRD patterns of powders HAp, Ce-Ce-HAp, Ce-HApGC,  $S_{HG}$ , cashes gum and gellan gum.

Uma informação importante que o difratograma mostra refere-se a incorporação da goma do cajueiro e da presença da goma gelana na composição do scaffold, pois o DRX do  $S_{HG}$  não acrescentou modificações nos picos da nanohidroxiapatita dopada, como pode ser observado através da comparação entre os difratogramas da Ce-HApGC com o do  $S_{HG}$ , havendo apenas uma pequena alteração na linha de base, principalmente na região  $2\theta$  de  $15$  a  $30^\circ$  onde aparece as principais informações das gomas no difratograma. A modificação na linha de base pode ser

observada na figura 3. O difratograma do scaffold  $S_{HG}$  comprova a permanência dos picos e a continuidade a estrutura cristalina[32,33].

O refinamento pelo método Rietveld foi feito para o difratograma do scaffold  $S_{HG}$ , com o auxílio do software *EXPGUI GSAS*, mostrou que a estrutura cristalina presente no  $S_{HG}$  é do tipo hexagonal com grupo espacial  $P/63m$  e simetria de *Laue*  $6/m$ , apresentando parâmetros de rede:  $a$ ,  $b$  e  $c$  de 9.447481, 9.447481 e 6.897580 Å, respectivamente, e volume de célula unitária de 533.162328 Å<sup>3</sup> [77]. A figura 3 mostra o resultado do refinamento, que teve um fator de convergência menor que 2,  $\chi^2 = 1.47$ , fator matemático que indica um refinamento bem-sucedido.

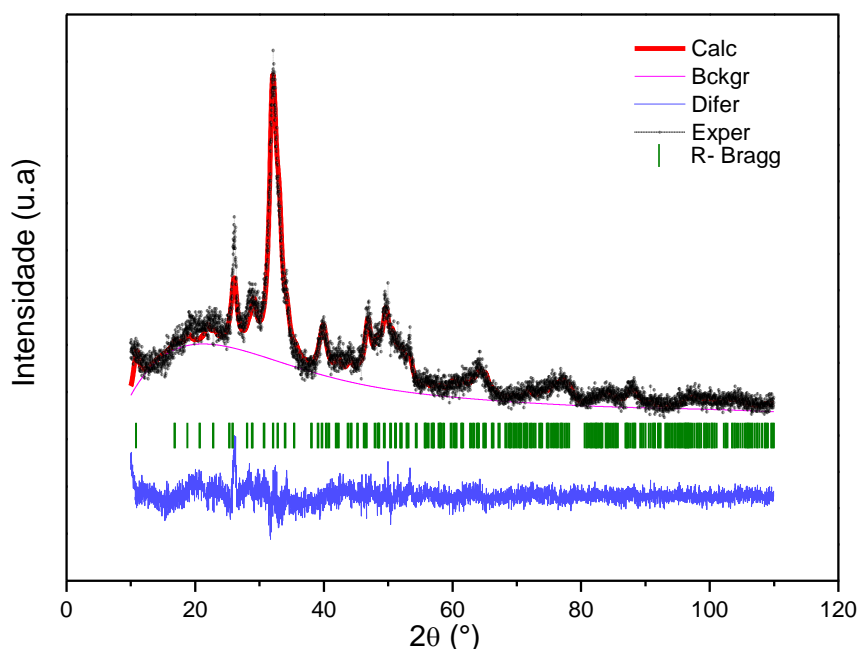


Figura 3: Perfil de refinamento do scaffold  $S_{HG}$ .

A figura 4 apresenta a visualização da célula unitária da hidroxiapatita dopada com cério sintetizada no trabalho, e utilizada no desenvolvimento do SHG. A figura foi simulada com a utilização do software VESTA (Visualization for Electronic and Structural Analysis)[36], com os dados obtidos através do refinamento do difratograma do SHG pelo método Rietveld. A simulação através do software não permite a substituição de

átomos, assim os 5% de cério utilizados para dopar a HAp aparecem através da pequena parte hachurada de amarelo nos átomos de Ca1 e Ca2.

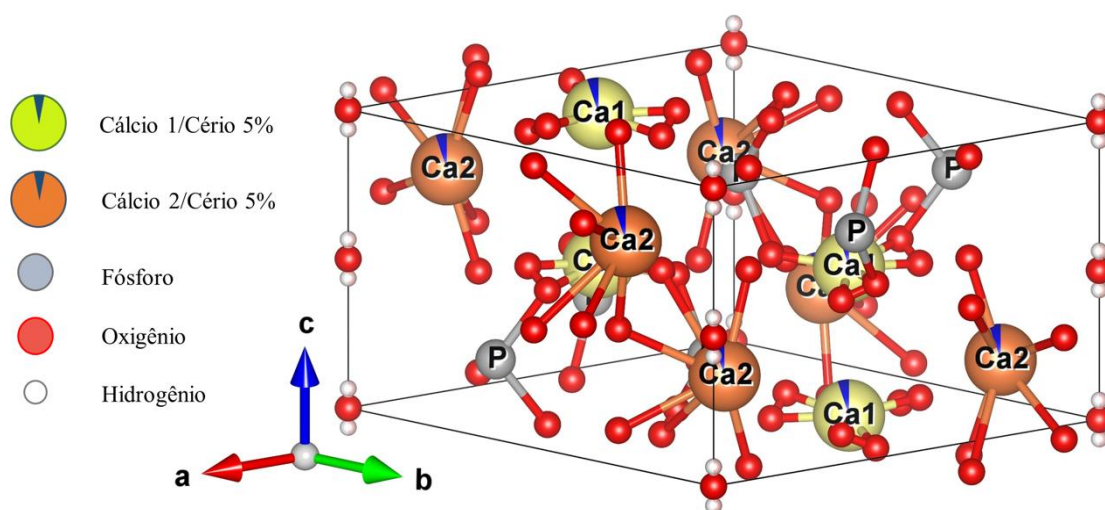


Figura 4: Representação da Célula unitária da Ce-HAp presente no  $S_{HG}$ .

A Figura 5 mostra os espectros de XPS obtido para o Ce-HAp. Foram detectados os elementos que compõem a hidroxiapatita. São eles: o cálcio (Ca2s (430 eV) e Ca2p (347 eV)), o fósforo (P<sub>2s</sub> (188 eV) e P<sub>2p</sub> (132 eV)) e o oxigênio (O<sub>1s</sub> (530 eV)). É possível observar ainda as linhas de emissão (875-925 eV) discretas relativas as energias de ligação dos elétrons dos orbitais 3d do cério (Figura 5b). O estado eletrônico atribuído a posição v e u revelou excitações na energia de ligação no acoplamento spin-orbita para os dubletes 3d<sub>5/2</sub> e 3d<sub>3/2</sub>. Esse tipo de acoplamento objetiva e corrobora com a existência do cério na hidroxiapatita [78].

Os espectros de FTIR obtidos dos materiais precursores para síntese do scaffold, como o espectro do  $S_{HG}$  estão dispostos na Figura 6. Ao se analisar o espectro da Ce-HAp, é possível observar uma banda em 3400 cm<sup>-1</sup> como sinal de vibração de estiramento de grupos OH proveniente da estrutura da hidroxiapatita dopada com Cério, como também da hidroxila advinda da água fisisorvida na superfície do material, remanescente do processo de síntese. Outra banda referente a OH aparece em 1649cm<sup>-1</sup>, proveniente de movimento de deformação. No espectro da Ce-HAp observa-se na região de 1050 cm<sup>-1</sup> e 1098 cm<sup>-1</sup> a deformação assimétrica dos grupos fosfatos (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>). A presença de grupos fosfatos aparece ainda em 611 cm<sup>-1</sup> referente à deformação

assimétrica P – O. O grupamento P – O(H) apresenta uma banda em  $566\text{ cm}^{-1}$  referente a deformação assimétrica do  $\text{HPO}_4^{2-}$  [37].

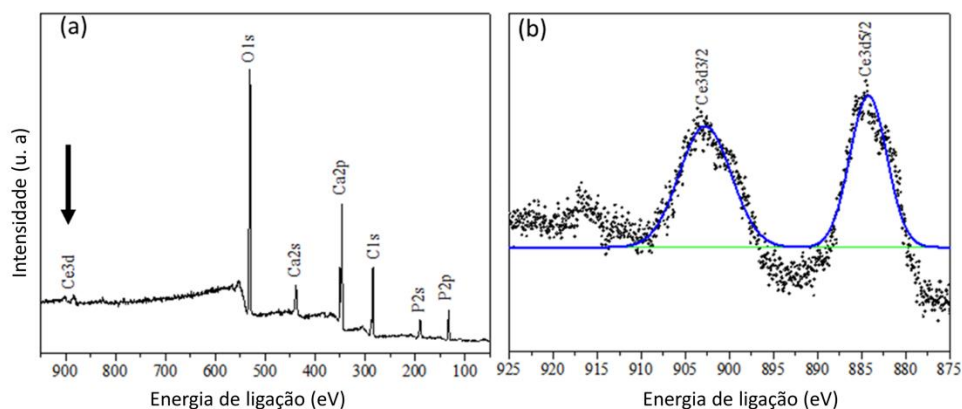


Figura 5: Espectro de XPS para a (a) Ce-HAp e (b) linhas de emissão relativas ao duplete de elétrons ejetados dos orbitais 3d do Ce.

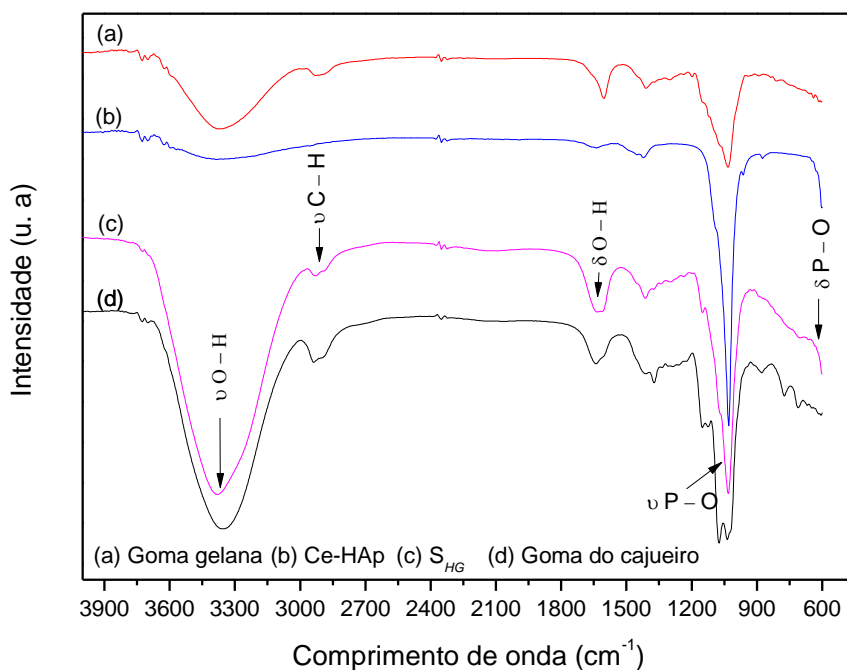


Figura 6: Espectros de FTIR do  $S_{HG}$  e dos materiais precursores: (a) Gellan Gum; (b) Ce-HAp; (c)  $S_{HG}$  e (d) Cashew Gum.

No espectro da goma do cajueiro observa-se uma banda em  $3300\text{ cm}^{-1}$  atribuída a estiramentos de grupos OH. Outra banda que está presente, mesmo que com

um sinal menor, é em  $2920\text{ cm}^{-1}$ . Esta bande se refere à presença de grupos C – H das cadeias carbônicas dos monômeros que constituem a goma do cajueiro e que apresentam modo de vibração de alongamento. Em  $1649\text{ cm}^{-1}$  ocorre uma banda referente a vibrações de deformação de OH [38]. Os picos em  $1150$ ,  $1074$  e  $1035\text{ cm}^{-1}$  no espectro da goma do cajueiro são referentes às ligações glicosídicas C – O – C[37–39].

O espectro da goma gelana apresentou um pico de estiramento de OH na região de  $3300\text{ cm}^{-1}$ . Na região e  $2920\text{ cm}^{-1}$  encontra-se o pico referente ao estiramento de grupos C – H. Pico referente ao estiramento de grupos  $\text{COO}^-$  apareceu em  $1592\text{ cm}^{-1}$ , enquanto o pico que apareceu em  $1035\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento do grupamento C – O – C das ligações glicosídicas encontradas no biopolímero[79,80].

Observando-se o espectro do scaffold, pode-se encontrar características dos materiais precursores. Na região de  $3400\text{ cm}^{-1}$  se encontra uma banda de vibração de estiramento de grupos OH, presente na composição química da Ce-HAp e dos monômeros que constituem as gomas do cajueiro e a gelana. Observa-se também uma banda em  $1649\text{ cm}^{-1}$ , proveniente de movimento de deformação de OH. A banda que aparece no espectro do  $S_{HG}$  na região de  $1051\text{ cm}^{-1}$  e  $1098\text{ cm}^{-1}$  é referente a deformação assimétrica dos grupos fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). A presença de grupos fosfatos aparece ainda em  $611\text{ cm}^{-1}$  referente à deformação assimétrica P – O. Tais bandas são características da Ce-HAp[37].

Outra banda que está presente, com intensidade menor, é em  $2920\text{ cm}^{-1}$ . Esta bande se refere à presença de grupos C – H das cadeias carbônicas dos monômeros que constituem a goma do cajueiro e a goma gelana. A banda em  $1149\text{ cm}^{-1}$  presente no espectro do scaffold é proveniente do C – O presente nos monômeros de ambas as gomas, da mesma forma que as banda presente em  $1627$  e  $1409\text{ cm}^{-1}$ , que se referem ao grupamento  $\text{COO}^-$ [37–39,79,80]. Na região de  $1035\text{ cm}^{-1}$  observa-se a presença da banda referente as ligações glicosídicas das duas gomas[37–39,79,80].

A análise dos materiais precursores e do  $S_{HG}$  em relação à temperatura ocorreu pela TG/DTG. A Figura 7 traz o TG dos materiais precursores do scaffold e do  $S_{HG}$ . Analisando a curva termogravimétrica da goma do cajueiro, observou-se a ocorrência de dois eventos. O primeiro evento térmico ocorreu em aproximadamente  $35\text{ }^\circ\text{C}$ , finalizando em  $129\text{ }^\circ\text{C}$ . Esse evento é causado perda de água existente na amostra, resultando em 1.78% de massa da goma do cajueiro. O segundo evento se encontra próximo a  $286\text{ }^\circ\text{C}$ .

Esta perda refere-se à quebra da estrutura polissacarídica, resultando em sua decomposição, além da decomposição de alguns resíduos presentes na goma, com perda de massa de 73.05% [81].

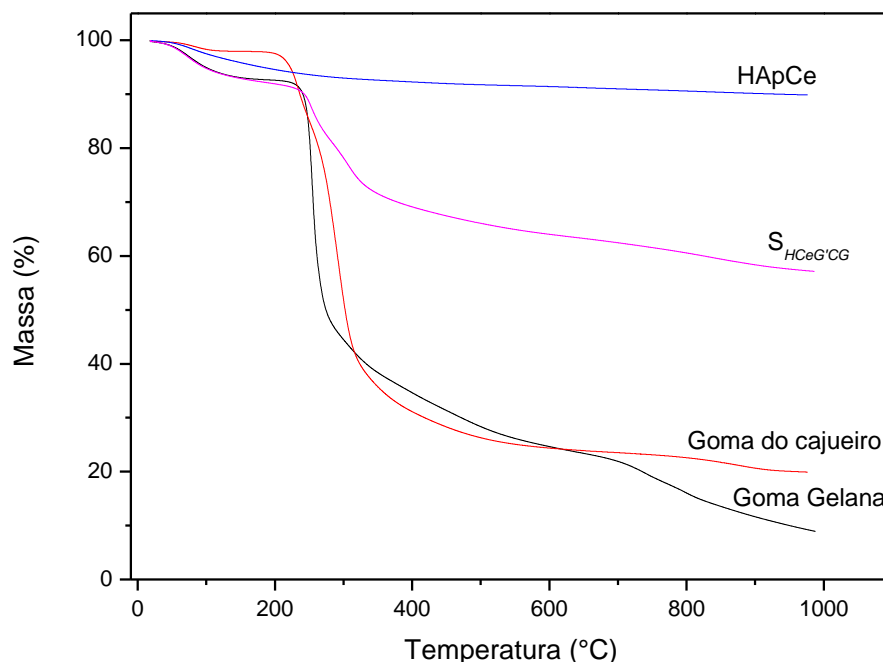


Figura 7: TG dos materiais precursores e do  $S_{HG}$ .

Para a curva TG da hidroxiapatita dopada com Cério, percebe-se apenas um evento térmico relacionada à perda de massa, na temperatura de aproximadamente 100 °C. Essa perda é atribuída a saída de água adsorvida à superfície da Ce-HAp. O valor da perda de massa nesse evento foi de 2.7% [42,43]. A análise da curva TG da goma gelana apresentou dois eventos térmicos, com primeiro evento ocorrendo no intervalo de 27 a 124 °C, correspondendo a 5.87% da perda de massa, atribuída a água existente na goma gelana [40,41]. O segundo evento térmico ocorre entre 195 e 353 °C, referente a degradação do polímero, com a massa variando em 54.54% [40,41].

A curva TG do  $S_{HG}$  mostra que o scaffold apresentou os mesmos eventos térmicos que os materiais precursores apresentaram. Entre 28,81 e 130 °C encontra-se a primeira perda de massa do  $S_{HG}$ , perda atribuída a água encontrada no scaffold, com variação de 6.15%. Ao se comparar o valor, em porcentagem, da perda da Ce-HAp, nota-

se um acréscimo no valor da massa perdida. O acréscimo é atribuído ao somatório da massa de água da Ce-HAp à massa das duas gomas presentes na estrutura do scaffold. O segundo evento térmico apareceu no intervalo de 200 a 572 °C, com uma perda de massa de 27.44%. Essa perda de massa é atribuída à quebra da estrutura polissacarídica das gomas de cajueiro e gelana presente no  $S_{HG}$ [40,41,81].

A Figura 8 mostra o dTG da goma do cajueiro, da Ce-HAp, do  $S_{HG}$  e da goma gelana. A partir dos dados obtidos da curva dTG, foi possível elucidar o número de eventos térmicos citados e discutidos acima através das curvas TG.

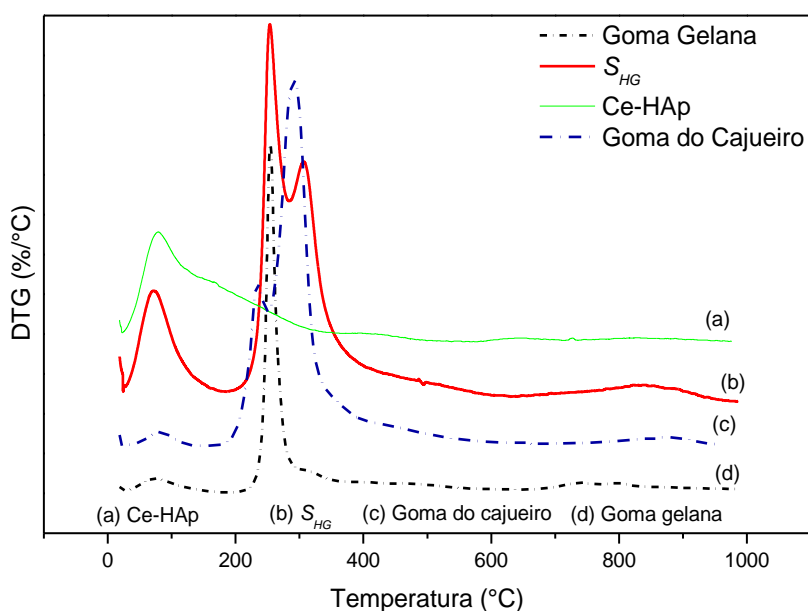


Figura 8: (a) dTG da Ce-HAp, (b) dTG do  $S_{HG}$ , (c) dTG da goma do cajueiro e (d) dTG da goma gelana.

A partir da curva de degradação térmica do scaffold  $S_{HG}$ , pode-se pensar na possibilidade de esterilização do material através da utilização de autoclave, visto que a até 120 °C o evento térmico que ocorre refere-se a perda de água. Sendo o scaffold um material quer será aplicado na área biomédica, essa informação ganha destaque pelo fato

de a esterilização em autoclave ser um dos métodos mais comum praticado em laboratórios biomédicos[82].

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) traz imagens do scaffold  $S_{HG}$ . A imagem mostra uma camada lisa e translúcida, com agregados distribuídos tanto por sua superfície como também em camadas mais internas. A camada lisa que aparece é atribuída à rede polimérica da goma gelana, constatação obtida ao se observar o MEV da goma gelana isolada, mostrada na figura 9 (a). A Figura 9 (b) apresenta a morfologia do scaffold. A observação da figura 9 (b) mostra pequenos aglomerados brancos, atribuídos a Ce-HApGC, dispersos sobre a rede polimérica da gelana. É possível perceber uma distribuição uniforme dos grânulos da Ce-HApGC.

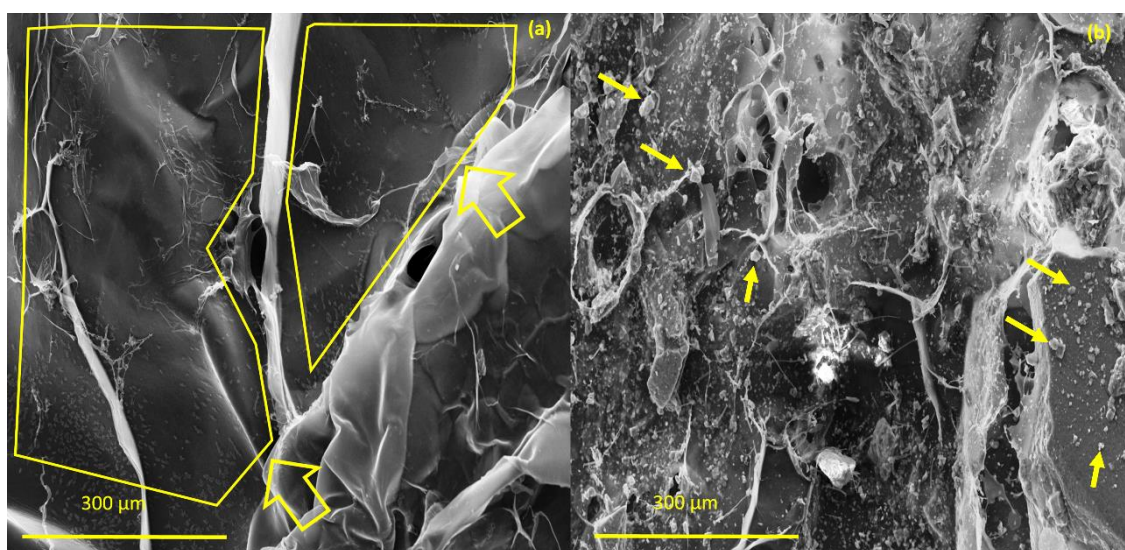


Figura 9: MEV da goma gelana pura (a) e MEV do scaffold  $S_{HG}$  (b).

Com o auxílio do software *ImageJ*[83] foi possível observar a disposição dos grânulos de Ce-HApGC distribuídos na rede polimérica da GG através do destaque feito pela cor verde, como mostrado na Figura 10 (a). O destaque mostrado pela coloração permite observar as diferenças de tamanho existente da Ce-HAp no compósito, onde grande parte dos aglomerados distribuídos se apresentam sob a forma de pequenos grânulos com tamanho médio na ordem de 2 µm. Entretanto é possível observar a existência de alguns grânulos maiores.



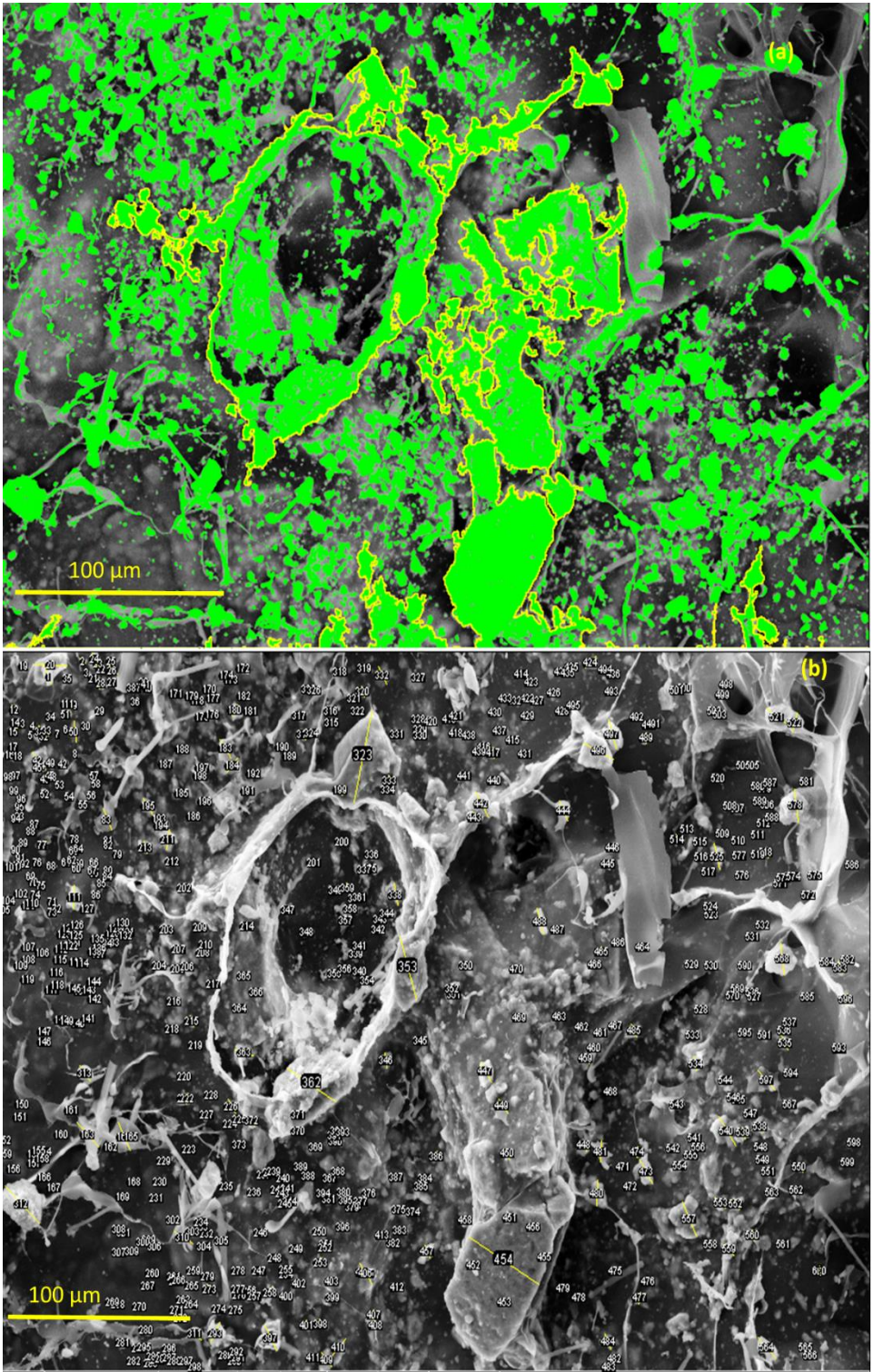


Figura 10: Destaque da distribuição da Ce-HApGC na compósito (a). Marcação da contagem do comprimento de grânulos (b).

A Figura 10 (b) mostra a marcação do tamanho dos grânulos de Ce-HApGC feito com o auxílio de uma das ferramentas do software *ImageJ*. Através da marcação de 600 pontos na imagem, foi possível preparar um histograma com a frequência do tamanho dos grânulos no compósito. O histograma é apresentado na Figura 11. A partir dos dados do histograma pode-se perceber que 89.5% dos grânulos medidos possuem comprimento médio próximo a 2.5  $\mu\text{m}$ . Entretanto ao se observar a Figura 12, nota-se a presença de grânulos em escala nanométrica.

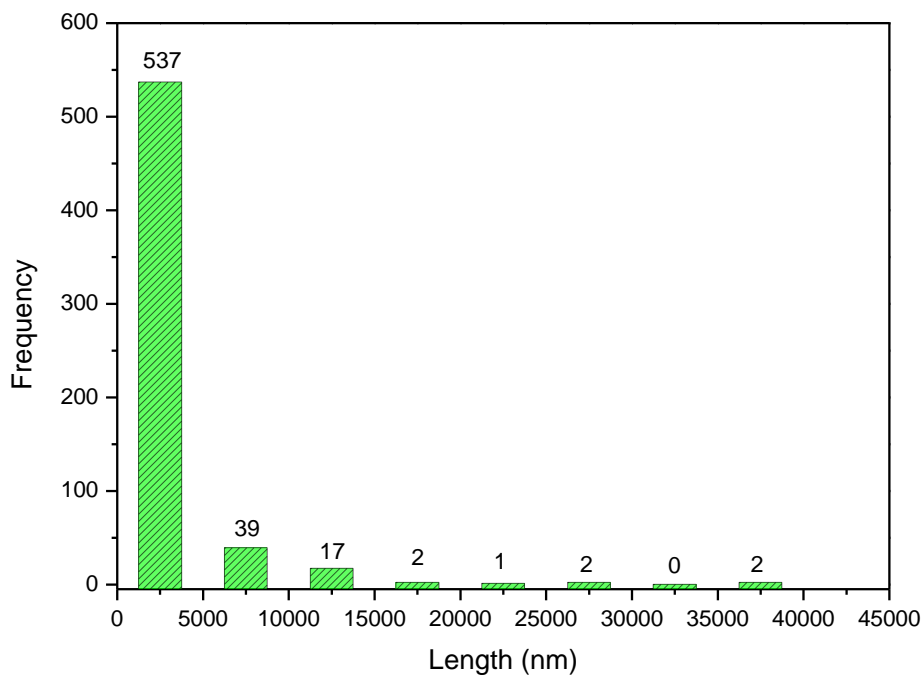


Figura 11: Frequência do tamanho dos grânulos do compósito Ce-HApGC.

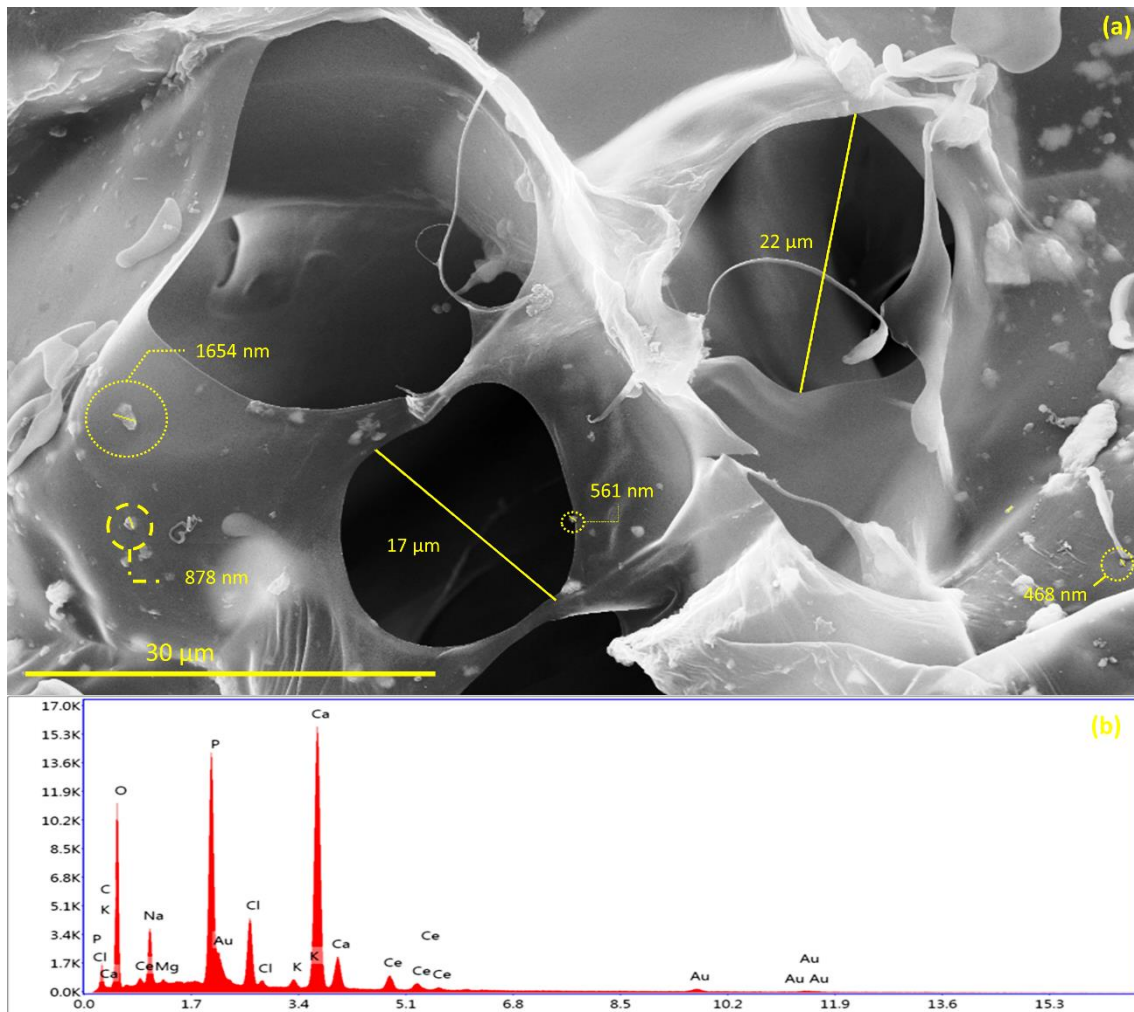


Figura 12: Identificação e medição de grânulos de Ce-HApGC e de poros no  $S_{HG}$  (a). EDS do  $S_{HG}$  (b).

A Figura 12 (a) revela a existência de poros na estrutura do  $S_{HG}$ , poros com tamanho na ordem de 17 a 22  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Os estudos apontam uma grande diversidade no tamanho dos poros nos scaffolds sintetizados, com a variação acontecendo entre 10 a 1000  $\mu\text{m}$ . Essa variação de tamanho ocorre devido as diferentes morfologias ósseas encontradas no organismo humano e local de aplicação do scaffold [2,45–47].

O espectro EDS, mostrado na Figura 12 (b) para o  $S_{HG}$ , revelou a composição, de forma qualitativa. Pôde-se encontrar os íons Ca, P, O, provenientes da hidroxiapatita. Foi possível também observar a presença dos íons de cério incorporados na dopagem da HAp. Os íons Na, Cl, Mg e K são provenientes da composição da goma gelana. Estes dados vêm descritos na ficha de segurança de produto químicos – FISPQ – da goma

gelana fornecido gentilmente pela KelcoGel<sup>®</sup>. O ouro presente no EDS decorre do processo de preparação da amostra para a análise.

Dados fornecidos pelo EDS relativos à porcentagem atômica têm sido utilizados para obtenção da razão Ca/P de hidroxiapatita sintetizadas[48–50]. Os dados obtidos no EDS mostram que a razão semi-quantitativa (Ca+Ce)/P presente no scaffold  $S_{HG}$  é de 1.87. Esse resultado condiz com valores já relatados para hidroxiapatita encontrada no organismo humano ao se comparar cristalinidade e teor de cálcio, pois não possuindo a elevada estabilidade da hidroxiapatita com alta cristalinidade que tem razão Ca/P igual a 1.67[53], consegue interagir com maior facilidade com os fluidos fisiológicos corporais, como já relatado em outros estudos[51,52].

### ***3.2 Caracterização In Vitro***

A variação de massa, em módulo, do scaffold  $S_{HG}$  após o estudo da degradação em PBS é apresentado na Figura 13. O estudo mostrou que o scaffold possui a capacidade de incorporar íons provenientes da solução de PBS em sua estrutura, mostrando que o scaffold pode interagir com os fluidos corporais[51,52] e que, considerando-se o desvio padrão, nota-se uma variação constante na massa, independentemente da quantidade de dias de imersão no SBF. Essa informação foi obtida através da comparação dos valores da massa final com a massa inicial. A quantidade de massa de HAp na estrutura do scaffold é fundamental para o ganho de massa, como relatado por Deb et al. pois a estrutura cristalina do material influencia para o material não sofrer perda de massa, degradação, aliado ao fato da HAp ter a capacidade de absorver o SBF em sua estrutura cristalina[3]. O MEV do scaffold após imersão em SBF, figura 14, mostra uma fina película incorporada ao  $S_{HG}$ , resultado que corrobora com a incorporação de íons e o aumento de massa no biomaterial.

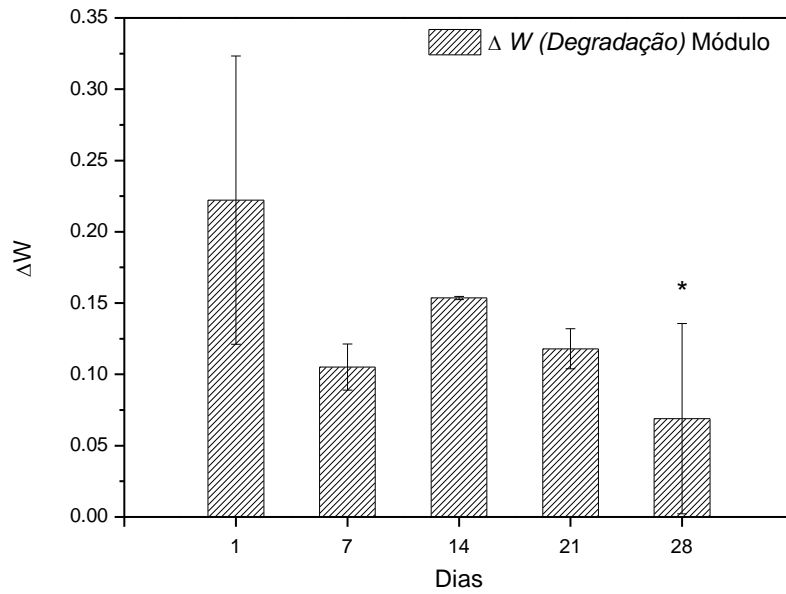


Figura 13: Variação de peso da estrutura  $S_{HG}$  durante períodos de 1, 7, 14, 21 e 28 dias. As diferenças entre os grupos foram analisadas pela análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, comparando os grupos com o valor de 1 dia, \* representando diferença estatisticamente significativa com 1 dia.

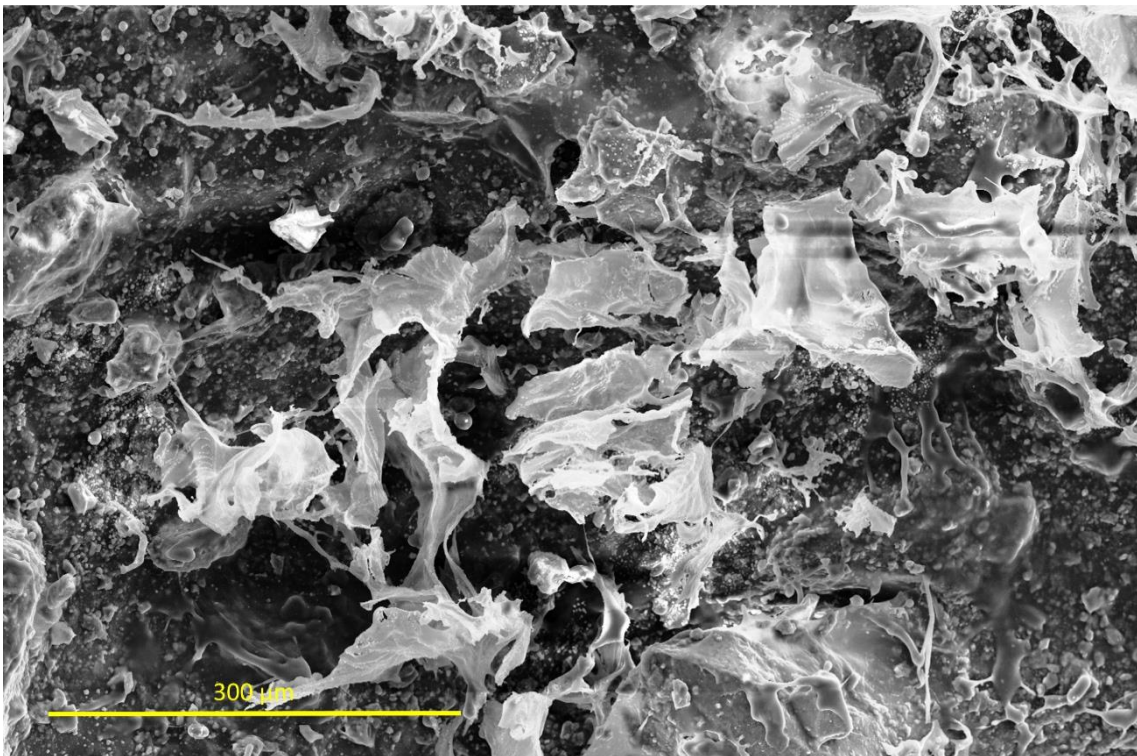


Figura 14: MEV do  $S_{HG}$  após 7 dias de imersão em SFB.

A determinação de viabilidade celular aconteceu com o teste de MTT. O MTT foi realizado para se observar a citotoxicidade do scaffold com concentrações seriadas frente a CTM (CC<sub>50</sub>). O controle positivo é dado com 100% de viabilidade celular. O estudo mostrou que o número de células cultivadas foi expressivamente maior que o controle positivo. Dentre as diversas diluições testadas, nota-se que nenhuma delas se mostrou tóxica afetando o crescimento celular. Ao contrário do efeito tóxico, o resultado mostra que o  $S_{HG}$  apresentou propriedades de estímulo ao crescimento celular, conferindo ao scaffold uma promissora utilização na regeneração óssea. Com o limiar de viabilidade celular acima de 75%, pode-se considerar o  $S_{HG}$  como um material que não apresenta potencial tóxico[84,85]. A Figura 14 mostra que o ensaio de MTT.

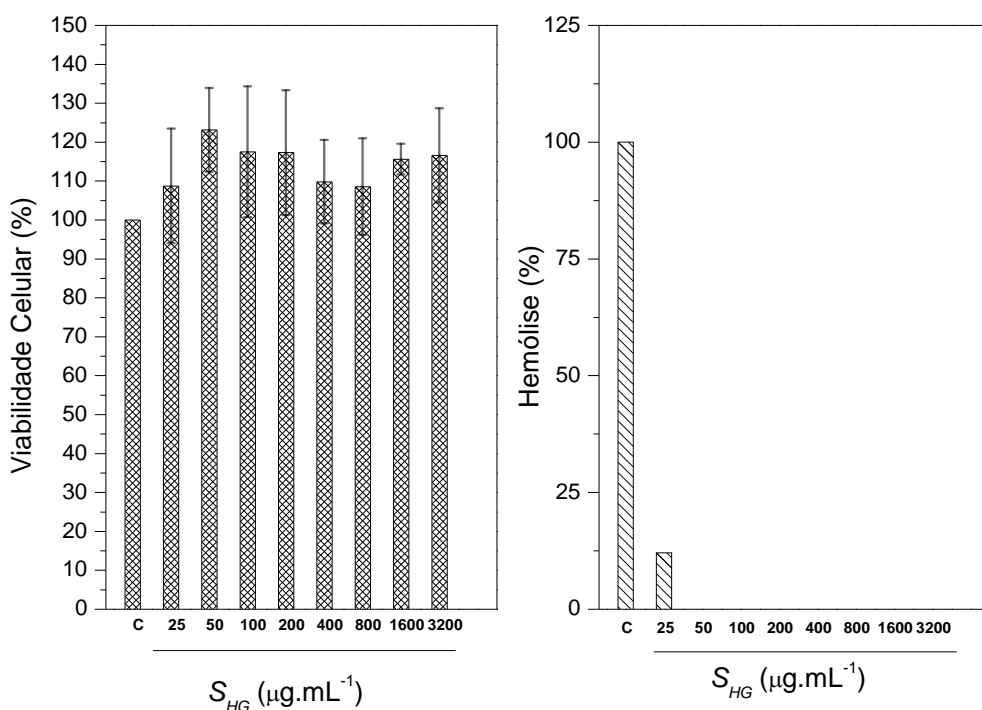


Figura 14: Ensaio de MTT e Hemólise para o scaffold  $S_{HG}$ .

O ensaio contra eritrócitos mostrou a capacidade que o scaffold tem para provocar hemólise nas células sanguíneas dos caprinos através da ruptura total ou por provocar erupções celulares. Com a água ultrapura sendo o controle negativo, causando 100% de hemólise, observou-se que o  $S_{HG}$  apresentou pequena ação hemolítica na concentração de 25 µg.mL<sup>-1</sup>, onde induziu 12,03% de hemólise. Ramya et al. cita os padrões da norma ASTM[86] onde materiais que apresentem hemólises menor que 5% são considerados com elevada hemocompatibilidade e materiais com mais de 20% de

hemólise não são hemocompatíveis[87]. A comparação da norma com o resultado mostra que o  $S_{HG}$  é hemocompatível. A Figura 14 apresenta o ensaio contra eritrócitos.

### 3.3 Teste Mecânico

Conhecer a resistência à compressão do scaffold é importante para guiar o desenvolvimento do scaffold de acordo com sua aplicação e com a carga necessária que o scaffold suportará, pois a proporcionalidade inversa entre porosidade e rigidez exige escolha adequada de qual propriedade é desejada[54]. O teste mecânico do scaffold ocorreu através do ensaio de compressão. O  $S_{HG}$  apresentou resistência a compressão de 19.19 MPa e módulo elástico de 0.24 GPa.

Os valores obtidos colocam o  $S_{HG}$  como um material que possui comportamento mecânico promissor para aplicação como substituinte de osso esponjoso, pois a resistência a compressão possui valor próximo a tensão máxima do osso esponjoso, ao tempo que módulo elástico permanece no intervalo encontrado na literatura. É importante ressaltar que o aloenxerto esponjoso se apresenta como a melhor opção em cirurgias ósseas, sendo chamado de padrão ouro por especialistas[2], constatação que corrobora para aplicação do  $S_{HG}$ . Uma comparação entre os valores obtidos e os valores encontrados na literatura é mostrado na tabela 1.

Tabela 1: Comparação entre módulos de compressão e elasticidade do  $S_{HG}$ , osso esponjoso e osso cortical.

Amostra	Tensão (MPa)	Módulo Elástico (GPa)
$S_{HG}$	19.19	0.24
Osso Esponjoso[54,55]	4 – 12	0.1 – 0.5
Osso Cortical[54,55]	130 – 180	12 – 18

### 4.0 Considerações Finais

O estudo traz a síntese de um scaffold inovador com promissor potencial para aplicação em enxertos ósseos, obtido por meio da combinação de um material inorgânico modificado, Ce-HAp, combinado com biopolímero de fonte renovável, atóxico e de baixo custo. As caracterizações estruturais, DRX e FTIR, exibem o sucesso da obtenção da Ce-

HAp por meio da precipitação simples, formando um compósito inovador composto de goma do cajueiro e Ce-HAp. O XPS mostra a presença do cério no compósito, assim como o EDS, que além da presença do cério, mostra a razão semi-quantitativa (Ca+Ce)/P de 1.87, valor encontrado para a hidroxiapatita encontrada no organismo. A análise térmica vem complementar os indícios da presença de GC e Ce-HAp no biocompósito. As microscopias revelaram a morfologia do scaffold, mostrando a dispersão dos grânulos nanométricos de Ce-HApGC na matriz polimérica de GG. As micrografias também mostraram a existência de poros, necessários no processo de osteoindução. O teste de degradação mostrou que o scaffold interagiu com os íons do SBF através de aumento de massa. A microscopia corroborou mostrando a camada que se deposita sobre o  $S_{HG}$ . O scaffold mostrou que possui resistência à compressão e que se adequa para substituir o osso esponjoso. Os testes de MTT e Hemólise revelaram que o material não é tóxico e está apto a ser testado *in vivo*.

## 5.0 Agradecimentos

A CAPES, CNPQ, FAPEPI, UFPI, NUPCelt, UCP - Porto e KELCOGEL®

## 6.0 Referências

- [1] B. Kaczmarek, A. Sionkowska, M. Gołyńska, I. Polkowska, T. Szponder, D. Nehrbass, A.M. Osyczka, In vivo study on scaffolds based on chitosan, collagen, and hyaluronic acid with hydroxyapatite., *Int. J. Biol. Macromol.* 118 (2018) 938–944. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.06.175.
- [2] S. Chen, Y. Shi, X. Zhang, J. Ma, 3D printed hydroxyapatite composite scaffolds with enhanced mechanical properties, *Ceram. Int.* 45 (2019) 10991–10996. doi:10.1016/j.ceramint.2019.02.182.
- [3] P. Deb, E. Barua, A.B. Deoghare, S. Das Lala, Development of bone scaffold using *Puntius conchonus* fish scale derived hydroxyapatite: Physico-mechanical and bioactivity evaluations, *Ceram. Int.* (2019). doi:10.1016/j.ceramint.2019.02.044.
- [4] B. Yilmaz, A.Z. Alshemary, Z. Evis, Co-doped hydroxyapatites as potential materials for biomedical applications, *Microchem. J.* 144 (2019) 443–453. doi:10.1016/j.microc.2018.10.007.
- [5] Y.S. Cho, S. Choi, S.H. Lee, K.K. Kim, Y.S. Cho, Assessments of polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffold with enhanced biomimetic



- mineralization by exposure to hydroxyapatite via a 3D-printing system and alkaline erosion, *Eur. Polym. J.* 113 (2019) 340–348. doi:10.1016/j.eurpolymj.2019.02.006.
- [6] A. Szczeń, L. Hołysz, E. Chibowski, Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications, *Adv. Colloid Interface Sci.* 249 (2017) 321–330. doi:10.1016/j.cis.2017.04.007.
- [7] A.P. Moreno Madrid, S.M. Vrech, M.A. Sanchez, A.P. Rodriguez, Advances in additive manufacturing for bone tissue engineering scaffolds, *Mater. Sci. Eng. C.* 100 (2019) 631–644. doi:10.1016/j.msec.2019.03.037.
- [8] S. MONDAL, U. Pal, 3D hydroxyapatite scaffold for bone regeneration and local drug delivery applications, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 39 (2019). doi:10.1016/j.jddst.2017.04.019.
- [9] N. Jiraborvornpongsa, T. Isobe, S. Matsushita, A. Yamaguchi, M. Miyauchi, M. Wakamura, A. Nakajima, Effects of MoO<sub>x</sub> modification on photocatalytic activity of hydroxyapatite and Ti-doped hydroxyapatite, *Adv. Powder Technol.* (2019). doi:10.1016/j.appt.2019.05.010.
- [10] A.M. Pietak, J.W. Reid, M.J. Stott, M. Sayer, Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics, *Biomaterials.* 28 (2007) 4023–4032. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.05.003.
- [11] A. Sygnatowicz, M.; Keyshar, K.; Tiwari, Antimicrobial Properties of Silver-doped Hydroxyapatite Nano-powders and Thin Films, *Biol. Biomed. Mater.* 62 (2010) 65–70.
- [12] K.L. Wong, C.T. Wong, W.C. Liu, H.B. Pan, M.K. Fong, W.M. Lam, W.L. Cheung, W.M. Tang, K.Y. Chiu, K.D.K. Luk, W.W. Lu, Mechanical properties and in vitro response of strontium-containing hydroxyapatite/polyetheretherketone composites, *Biomaterials.* 30 (2009) 3810–3817. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.04.016.
- [13] R. V. Suganthi, K. Elayaraja, M.I.A. Joshy, V.S. Chandra, E.K. Girija, S.N. Kalkura, Fibrous growth of strontium substituted hydroxyapatite and its drug release, *Mater. Sci. Eng. C.* 31 (2011) 593–599. doi:10.1016/j.msec.2010.11.025.
- [14] S.J. Kalita, S. Bose, H.L. Hosick, A. Bandyopadhyay, CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Na<sub>2</sub>O-based sintering additives for hydroxyapatite (HAp) ceramics, *Biomaterials.* 25 (2004)

- 2331–2339. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.09.012.
- [15] T.J. Webster, E.A. Massa-Schlueter, J.L. Smith, E.B. Slamovich, Osteoblast response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations, *Biomaterials*. 25 (2004) 2111–2121. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.09.001.
- [16] M.I. Ahymah Joshy, K. Elayaraja, R. V. Suganthi, S. Chandra Veerla, S.N. Kalkura, In vitro sustained release of amoxicillin from lanthanum hydroxyapatite nano rods, *Curr. Appl. Phys.* 11 (2011) 1100–1106. doi:10.1016/j.cap.2011.02.003.
- [17] A. Yasukawa, K. Kandori, H. Tanaka, K. Gotoh, Preparation and structure of carbonated calcium hydroxyapatite substituted with heavy rare earth ions, *Mater. Res. Bull.* 47 (2012) 1257–1263. doi:10.1016/j.materresbull.2012.01.018.
- [18] L. Yingguang, Y. Zhuoru, C. Jiang, Preparation, Characterization and Antibacterial Property of Cerium Substituted Hydroxyapatite Nanoparticles, *J. Rare Earths*. 25 (2007) 452–456. doi:10.1016/S1002-0721(07)60455-4.
- [19] D.G. Greenhalgh, Topical Antimicrobial Agents for Burn Wounds, *Clin. Plast. Surg.* 36 (2009) 597–606. doi:10.1016/j.cps.2009.05.011.
- [20] J.P. Ball, B.A. Mound, A.G. Monsalve, J.C. Nino, J.B. Allen, Biocompatibility evaluation of porous ceria foams for orthopedic tissue engineering, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 103 (2015) 8–15. doi:10.1002/jbm.a.35137.
- [21] J. Emsley, *Nature's Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements*, New Editio, Oxford University Press, 2011.
- [22] M.A. Jakupec, P. Unfried, B.K. Keppler, Pharmacological properties of cerium compounds, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 153 (2005) 101–111. doi:10.1007/s10254-004-0024-6.
- [23] K.M. Zia, S. Tabasum, M.F. Khan, N. Akram, N. Akhter, A. Noreen, M. Zuber, Recent trends on gellan gum blends with natural and synthetic polymers: A review, *Int. J. Biol. Macromol.* 109 (2018) 1068–1087. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.11.099.
- [24] P.A. Jansson, P. E., Lindberg, B. Sandford, Structural Studies of Gellan Gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*, *Carbohydr. Res.* (1983) 135–139.
- [25] L.T. dos R. Corrêa, A.G.S. de Laia, H. de S. Costa, Processamento e caracterização

- de hidrogéis a base de alginato e goma gelana visando aplicações em articulações, 14º Congr. Da Soc. Lat. Am. Biomateriais, Órgãos Artif. e Eng. Tecidos - SLABO. (2017) 427–436.
- [26] G. Lorenzo, N. Zaritzky, A. Califano, Rheological analysis of emulsion-filled gels based on high acyl gellan gum, *Food Hydrocoll.* 30 (2013) 672–680. doi:10.1016/j.foodhyd.2012.08.014.
- [27] F. Alhaique, E. Santucci, M. Carafa, T. Coviello, E. Murtas, F.M. Ricciari, Gellan in sustained release formulations: Preparation of gel capsules and release studies, *Biomaterials.* 17 (1996) 1981–1986. doi:10.1016/0142-9612(96)00017-8.
- [28] J.A.P. Vilela, F.D.A. Perrechil, C.S.F. Picone, A.C.K. Sato, R.L. Da Cunha, Preparation, characterization and in vitro digestibility of gellan and chitosan-gellan microgels, *Carbohydr. Polym.* 117 (2015) 54–62. doi:10.1016/j.carbpol.2014.09.019.
- [29] M. Salarian, M. Solati-Hashjin, S.S. SHAFIEI, A. Goudarzi, R. Salarian, A. Nemati, Surfactant-assisted synthesis and characterization of hydroxyapatite nanorods under hydrothermal conditions, *Mater. Sci.* 27 (2009) 1–16. [http://www.materialscience.pwr.wroc.pl/bi/vol27no4/articles/ms\\_03\\_2008\\_204sala.pdf](http://www.materialscience.pwr.wroc.pl/bi/vol27no4/articles/ms_03_2008_204sala.pdf).
- [30] A. Kolodziejczak-Radzimska, M. Samuel, D. Paukszta, A. Piasecki, T. Jesionowski, Synthesis of hydroxyapatite in the presence of anionic surfactant, *Physicochem. Probl. Miner. Process.* 50 (2014) 225–236. doi:10.5277/ppmp140119.
- [31] A.M. Sofronia, R. Baies, E.M. Anghel, C.A. Marinescu, S. Tanasescu, Thermal and structural characterization of synthetic and natural nanocrystalline hydroxyapatite, *Mater. Sci. Eng. C.* 43 (2014) 153–163. doi:10.1016/j.msec.2014.07.023.
- [32] Y. Mu, K. Zhu, J. Luan, S. Zhang, C. Zhang, R. Na, Y. Yang, X. Zhang, G. Wang, Fabrication of hybrid ultrafiltration membranes with improved water separation properties by incorporating environmentally friendly taurine modified hydroxyapatite nanotubes, *J. Memb. Sci.* 577 (2019) 274–284. doi:10.1016/j.memsci.2019.01.043.
- [33] C. Sarkar, S.K. Sahu, A. Sinha, J. Chakraborty, S. Garai, Y. Mu, K. Zhu, J. Luan,

- S. Zhang, C. Zhang, R. Na, Y. Yang, X. Zhang, G. Wang, Facile synthesis of carbon fiber reinforced polymer-hydroxyapatite ternary composite: A mechanically strong bioactive bone graft, *J. Memb. Sci.* 97 (2019) 388–396. doi:10.1016/j.msec.2018.12.064.
- [34] T. de Souza Cezarino, E.P. da Rocha, J. Vicente, L.J.B. Pereira, G.R. Sá, E.E. Garcia-Rojas, O.D. Gamallo, M.G. de Carvalho, Microencapsulation of sachinchi oil using emulsion-based delivery systems, *Food Res. Int.* 99 (2017) 612–622. doi:10.1016/j.foodres.2017.06.039.
- [35] M. Bashir, S. Haripriya, International Journal of Biological Macromolecules Assessment of physical and structural characteristics of almond gum, *Int. J. Biol. Macromol.* 93 (2016) 476–482. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.09.009.
- [36] K. Momma, F. Izumi, VESTA 3 for three-dimensional visualization of crystal, volumetric and morphology data, *J. Appl. Crystallogr.* 44 (2011) 1272–1276. doi:10.1107/S0021889811038970.
- [37] J.R. Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, Introduction to Spectroscopy, 4<sup>th</sup> edition, Cengage Learning, Belmont, USA, 2009.
- [38] N.A.O. Pitombeira, J.G. Veras Neto, D.A. Silva, J.P.A. Feitosa, H.C.B. Paula, R.C.M. De Paula, Self-assembled nanoparticles of acetylated cashew gum: Characterization and evaluation as potential drug carrier, *Carbohydr. Polym.* 117 (2015) 610–615. doi:10.1016/j.ijheatmasstransfer.2018.05.039.
- [39] P. V. Quelemes, A.R. de Araújo, A. Plácido, C. Delerue-Matos, J.S. Maciel, L.J. Bessa, A.S. Ombredane, G.A. Joanitti, M.J. dos S. Soares, P. Eaton, D.A. da Silva, J.R.S.A. Leite, Quaternized cashew gum: An anti-staphylococcal and biocompatible cationic polymer for biotechnological applications, *Carbohydr. Polym.* 157 (2017) 567–575. doi:10.1016/j.carbpol.2016.10.026.
- [40] F.G. Prezotti, B. Stringhetti, F. Cury, R.C. Evangelista, Mucoadhesive beads of gellan gum / pectin intended to controlled delivery of drugs, *Carbohydr. Polym.* 113 (2014) 286–295. doi:10.1016/j.carbpol.2014.07.021.
- [41] A. Verma, R. Nagarwal, Preparation and Characterization of Floating Gellan-Chitosan Polyelectrolyte Preparation and Characterization of Floating Gellan-Chitosan Polyelectrolyte Complex Beads, (2012).
- [42] F. Sun, B.K. Lim, S.C. Ryu, D. Lee, J. Lee, Preparation of multi-layered film of

- hydroxyapatite and chitosan, *Mater. Sci. Eng. C.* 30 (2010) 789–794. doi:10.1016/j.msec.2010.03.009.
- [43] J.K.M.C. Gonsalves, J.N.S. Ferro, E.O. Barreto, R.S. Nunes, M.E.G. Valerio, Influence of concentration of hydroxyapatite surface modifier agent on bioactive composite characteristics, 42 (2016) 17023–17031. doi:10.1016/j.ceramint.2016.07.210.
- [44] M. Fröhlich, W.L. Grayson, L.Q. Wan, D. Marolt, M. Drobnic, G. Vunjak-, *Tissue Engineered Bone Grafts : Biological Requirements , Tissue Culture and Clinical Relevance*, (2008) 254–264.
- [45] B. Thavornnyutikarn, N. Chantarapanich, K. Sitthiseripratip, G.A. Thouas, Q. Chen, *Bone tissue engineering scaffolding: computer-aided scaffolding techniques*, 2014. doi:10.1007/s40204-014-0026-7.
- [46] L. Roseti, V. Parisi, M. Petretta, C. Cavallo, G. Desando, I. Bartolotti, B. Grigolo, *Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives*, *Mater. Sci. Eng. C.* 78 (2017) 1246–1262. doi:10.1016/j.msec.2017.05.017.
- [47] A. Shavandi, A.E.D.A. Bekhit, Z. Sun, M.A. Ali, *Bio-scaffolds produced from irradiated squid pen and crab chitosan with hydroxyapatite/ $\beta$ -tricalcium phosphate for bone-tissue engineering*, *Int. J. Biol. Macromol.* 93 (2016) 1446–1456. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.04.046.
- [48] P. Kanchana, M. Navaneethan, C. Sekar, *Fabrication of Ce doped hydroxyapatite nanoparticles based non-enzymatic electrochemical sensor for the simultaneous determination of norepinephrine, uric acid and tyrosine*, *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.* 226 (2017) 132–140. doi:10.1016/j.mseb.2017.09.015.
- [49] Y.C. Yang, C.C. Chen, J.B. Wang, Y.C. Wang, F.H. Lin, *Flame sprayed zinc doped hydroxyapatite coating with antibacterial and biocompatible properties*, *Ceram. Int.* 43 (2017) S829–S835. doi:10.1016/j.ceramint.2017.05.318.
- [50] Y. Ren, H. Zhou, M. Nabiyouni, S.B. Bhaduri, *Rapid coating of AZ31 magnesium alloy with calcium deficient hydroxyapatite using microwave energy*, *Mater. Sci. Eng. C.* 49 (2015) 364–372. doi:10.1016/j.msec.2015.01.046.
- [51] M. Okada, T. Matsumoto, *Synthesis and modification of apatite nanoparticles for use in dental and medical applications*, *Jpn. Dent. Sci. Rev.* 51 (2015) 85–95. doi:10.1016/j.jdsr.2015.03.004.

- [52] T.I. Arifta, M.L. Munar, K. Tsuru, K. Ishikawa, Fabrication of interconnected porous calcium-deficient hydroxyapatite using the setting reaction of  $\alpha$  tricalcium phosphate spherical granules, *Ceram. Int.* 43 (2017) 11149–11155. doi:10.1016/j.ceramint.2017.05.162.
- [53] A. Sobczak-Kupiec, E. Olender, D. Malina, B. Tyliczszak, Effect of calcination parameters on behavior of bone hydroxyapatite in artificial saliva and its biosafety, *Mater. Chem. Phys.* 206 (2018) 158–165. doi:10.1016/j.matchemphys.2017.12.020.
- [54] K. Rezwan, Q.Z. Chen, J.J. Blaker, A.R. Boccaccini, Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials.* 27 (2006) 3413–3431. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.039.
- [55] J. Yang, T. Long, N.F. He, Y.P. Guo, Z.A. Zhu, Q.F. Ke, Fabrication of a chitosan/bioglass three-dimensional porous scaffold for bone tissue engineering applications, *J. Mater. Chem. B.* 20 (2014) 6611–6618. doi:10.1039/c4tb00940a.
- [56] J.C. Elliot, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*, 1st ed., New York, 1994.
- [57] S.R. Levitt, P.H. Crayton, E.A. Monroe, R.A. Condrate, Forming method for apatite prostheses, *J. Biomed. Mater. Res.* 3 (1969) 683–684. doi:10.1002/jbm.820030413.
- [58] E.A. Monroe, W.V. Votava, D.B. Bass, J. McMullen, New calcium phosphate ceramic material for bone, *J. Dent. Res.* 50 (1971) 1–3. doi:10.1177/00220345710500041201.
- [59] N.A.M. Barakat, M.S. Khil, A.M. Omran, F.A. Sheikh, H.Y. Kim, Extraction of pure natural hydroxyapatite from the bovine bones bio waste by three different methods, *J. Mater. Process. Technol.* 209 (2009) 3408–3415. doi:10.1016/j.jmatprotec.2008.07.040.
- [60] A.H. Aparecida, M. Vinícius, L. Fook, M. Luis, C. Guastaldi, D. De Físico-química, I. De Química, U.E. Paulista, R.F. Degni, Estudo da influência dos íões  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $SO_4^{2-}$  e  $CO_3^{2-}$  na cristalização biomimétrica de fosfato de cálcio amorfo (ACP) e conversão a fosfato octacálcico (OCP), 30 (2007) 892–896.
- [61] A.E. Aguiar, M. de O. Silva, A.C.D. Rodas, C.A. Bertran, Mineralized layered films of xanthan and chitosan stabilized by polysaccharide interactions: A

- promising material for bone tissue repair, *Carbohydr. Polym.* 207 (2019) 480–491. doi:10.1016/j.carbpol.2018.12.006.
- [62] J. Liu, S. Willför, C. Xu, A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications, *Bioact. Carbohydrates Diet. Fibre.* 5 (2015) 31–61. doi:10.1016/j.bcdf.2014.12.001.
- [63] R.C.M. De Paula, F. Heatley, P.M. Budd, Characterization of *Anacardium occidentale* Exudate Polysaccharide, 45 (1998).
- [64] H.C.B. De Paula, E.F. De Oliveira, F.O.M.S. Abreu, R.C.M. De Paula, S.M. De Moraes, M.M.C. Forte, Esferas ( Beads ) de Alginato como Agente Encapsulante de Óleo de Croton Zehntneri Pax et Hoffm ALG / Ca Beads as an Encapsulation Agent of Croton Zehntneri Pax et Hoffm Essential Oil, 20 (2010) 112–120.
- [65] D. Nadvorny, J.L. Soares Sobrinho, L.C.C. Nunes, F.R.L. de Souza, C. Oliveira, F. Veiga, E.C. Silva-Filho, J.M.N.A. Bezerra, A.J. Ribeiro, M.F. de La Roca Soares, Gums' based delivery systems: Review on cashew gum and its derivatives, *Carbohydr. Polym.* 147 (2016) 188–200. doi:10.1016/j.carbpol.2016.02.042.
- [66] F.M.F. Monteiro, A.L.F. Porto, G.V. Schirato, A.M. dos A.C. Leão, F. de O. Silva, J.L. de Lima Filho, O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas, *Ciência Rural.* 36 (2006) 149–154. doi:10.1590/s0103-84782006000100022.
- [67] A.C. Ribeiro, P. Eaton, D.A. Campos, C. Eiras, M. Manuela Pintado, J.R.S.A. Leite, E.M. Costa, F.B. Araruna, F.K. Tavarria, J.C. Fernandes, Study of antimicrobial activity and atomic force microscopy imaging of the action mechanism of cashew tree gum, *Carbohydr. Polym.* 90 (2012) 270–274. doi:10.1016/j.carbpol.2012.05.034.
- [68] V.K. Shingala, A.K. Singh, S.K. Yadav, T. Sivakumar, Design and characterization of diclofenac sodium tablets containing *Mangifera indica* resin as release retardant, *Int. J. PharmTech Res.* 2 (2010) 2107–2111.
- [69] K. Ofori-Kwakye, Y. Asantewaa, S.L. Kipo, Physicochemical and binding properties of cashew tree gum in metronidazole tablet formulations, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2 (2010) 105–109.
- [70] R. da S.N. Lima, C.R. de S. and R. de A. , Jacira Rabelo Lima, Moreira, Cashew-tree (*Anacardium occidentale* L.) exudate gum: a novel bioligand tool, *Biotechnol.*

- Appl. Biochem. 35 (2002) 45–53. doi:10.1042/BA20010024.
- [71] E. Gyedu-Akoto, I. Oduro, Physico-chemical properties of cashew tree gum, *African J. Food Sci.* 5 (2008) 60–64. <http://www.academicjournals.org/journal/AJFS/article-full-text-pdf/8B3B8E516526>.
- [72] United Nations Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, ONU. (2019) 1. <http://www.fao.org/3/ac451e/ac451e02.htm#TopOfPage>.
- [73] L. Augusto, L. Serrano, P. Felizardo, A. De Paula, Sistema de Produção do Caju Aspectos econômicos da cultura do cajueiro, (2016) 1–193.
- [74] M. Hu, F. Xiao, Q.F. Ke, Y. Li, X.D. Chen, Y.P. Guo, Cerium-doped whitlockite nanohybrid scaffolds promote new bone regeneration via SMAD signaling pathway, *Chem. Eng. J.* 359 (2019) 1–12. doi:10.1016/j.cej.2018.11.116.
- [75] C.E.S. Carvalho, E.P.C. Sobrinho-Junior, L.M. Brito, L.A.D. Nicolau, T.P. Carvalho, A.K.S. Moura, K.A.F. Rodrigues, S.M.P. Carneiro, D.D.R. Arcanjo, A.M.G.L. Citó, F.A.A. Carvalho, Anti-Leishmania activity of essential oil of *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All.: Composition, cytotoxicity and possible mechanisms of action, *Exp. Parasitol.* 175 (2017) 59–67. doi:10.1016/j.exppara.2017.02.012.
- [76] M. Steindel, E. Bachère, M.A. Barracco, L.C. Miletti, S.E. Löfgren, Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals, *Exp. Parasitol.* 118 (2007) 197–202. doi:10.1016/j.exppara.2007.07.011.
- [77] A. Fahami, B. Nasiri-Tabrizi, G.W. Beall, W.J. Basirun, Structural insights of mechanically induced aluminum-doped hydroxyapatite nanoparticles by Rietveld refinement, *Chinese J. Chem. Eng.* 25 (2017) 238–247. doi:10.1016/j.cjche.2016.07.013.
- [78] A. Uhart, J.B. Ledeuil, D. Gonbeau, J.C. Dupin, J.P. Bonino, F. Ansart, J. Esteban, An Auger and XPS survey of cerium active corrosion protection for AA2024-T3 aluminum alloy, *Appl. Surf. Sci.* 390 (2016) 751–759. doi:10.1016/j.apsusc.2016.08.170.
- [79] D.R. Pereira, J. Silva-Correia, J.M. Oliveira, R.L. Reis, A. Pandit, M.J. Biggs,



- Nanocellulose reinforced gellan-gum hydrogels as potential biological substitutes for annulus fibrosus tissue regeneration, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 14 (2018) 897–908. doi:10.1016/j.nano.2017.11.011.
- [80] M.W. Lee, H.F. Tsai, S.M. Wen, C.H. Huang, Photocrosslinkable gellan gum film as an anti-adhesion barrier, *Carbohydr. Polym.* 90 (2012) 1132–1138. doi:10.1016/j.carbpol.2012.06.064.
- [81] C.G. Mothé, M.A. Rao, Thermal behavior of gum arabic in comparison with cashew gum, *Thermochim. Acta.* 357–358 (2000) 9–13. doi:10.1016/S0040-6031(00)00358-0.
- [82] C.H. Leung, C.S.K. Mak, P.W.T. Pong, E.X. Wu, C.W. Leung, J. Shi, K.Y. Chan, C.M. Wong, N.M.M. Chan, K.Y. Mak, L. Li, Sterilization on dextran-coated iron oxide nanoparticles: Effects of autoclaving, filtration, UV irradiation, and ethanol treatment, *Microelectron. Eng.* 111 (2013) 310–313. doi:10.1016/j.mee.2013.02.021.
- [83] C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis., *Nat. Methods.* 9 (2012) 671–5. doi:10.1038/nmeth.2089.
- [84] A.A. HIRANI, S. DONG, K.R. COLACINO, M. ROMAN, Y.W. LEE, Cytotoxicity and Cellular Uptake of Cellulose Nanocrystals, *Nano Life.* 02 (2012) 1241006. doi:10.1142/s1793984412410061.
- [85] T. Niamsap, N.T. Lam, P. Sukyai, Production of hydroxyapatite-bacterial nanocellulose scaffold with assist of cellulose nanocrystals, *Carbohydr. Polym.* 205 (2019) 159–166. doi:10.1016/j.carbpol.2018.10.034.
- [86] S.K. Roy Chowdhury, A. Mishra, B. Pradhan, D. Saha, Wear characteristic and biocompatibility of some polymer composite acetabular cups, *Wear.* 256 (2004) 1026–1036. doi:10.1016/S0043-1648(03)00535-0.
- [87] J. Ramana Ramya, K. Thanigai Arul, P. Sathiamurthi, K. Asokan, S. Narayana Kalkura, Novel gamma irradiated agarose-gelatin-hydroxyapatite nanocomposite scaffolds for skin tissue regeneration, *Ceram. Int.* 42 (2016) 11045–11054. doi:10.1016/j.ceramint.2016.04.001.

## ***Considerações Finais***

O estudo desenvolvido revelou, com a prospecção tecnológica, o quanto a pesquisa com a temática de engenharia de tecidos ainda é recente, já que as primeiras publicações são datadas da década de 1990, resultado apenas em aproximadamente 30 anos de estudos. Foi possível perceber também, que quando se trata de tecidos ósseos, materiais cerâmicos, em especial a HAp, tem destaque por conta de suas propriedades. A parte experimental mostrou a possibilidade de se obter a HAp sintética na mesma fase da HAp encontrada no corpo humano, sendo uma excelente alternativa de obtenção, visto que o processo de síntese é simples e com baixo custo. Acerca dos *scaffolds*, o trabalho mostra, através de caracterizações físico-químicas, que a HAp sintética foi obtida com sucesso. O MEV revela a existência de poros, elementos essenciais para os *scaffolds* enquanto que testes mecânicos mostram que os *scaffolds*  $S_H$ ,  $S_{CH}$  e  $S_{HG}$  apresentaram resistência à compressão semelhante aos ossos esponjosos – padrões ouro em cirurgias de enxertos ósseo. Os testes de MTT e hemólise complementam os resultados revelando que não há toxicidade nos *scaffolds*, indicando o caminho para continuidade da pesquisa através dos testes *In Vivo*. O estudo deixa um leque de possibilidades para a continuidade da pesquisa, pois modificações na metodologia como a variação das proporções das gomas nos *scaffolds* ou a substituição do  $Ca^{2+}$  por outro cátion ou combinações de cátions poderão gerar resultados diferentes dos encontrados nesta pesquisa. O capítulo 2 e o capítulo 3 já estão publicados em periódicos com os doi's: [doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.10.104](https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.10.104) e [doi:10.3390/ma12152389](https://doi.org/10.3390/ma12152389), respectivamente.