



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO - IMPLANTODONTIA

GABRIEL LEONARDO MAGRIN

**SÍNTESE DE PÓS DE  $\beta$ -TCP E CARACTERIZAÇÃO DE  
SCAFFOLDS DE  $\beta$ -TCP REVESTIDOS COM POLÍMEROS  
BIOABSORVÍVEIS PARA REPARAÇÃO ÓSSEA**

FLORIANÓPOLIS – SC  
2016



Gabriel Leonardo Magrin

**SÍNTESE DE PÓS DE  $\beta$ -TCP E CARACTERIZAÇÃO DE  
*SCAFFOLDS* DE  $\beta$ -TCP REVESTIDOS COM POLÍMEROS  
BIOABSORVÍVEIS PARA REPARAÇÃO ÓSSEA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Odontologia, Área de Concentração de Implantodontia.  
Orientador: Prof. Dr. César Augusto Magalhães Benfatti  
Coorientador: Prof. Dr. Júlio César Matias Souza

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Magrin, Gabriel Leonardo

Síntese de pós de beta-TCP e caracterização de scaffolds de beta-TCP revestidos com polímeros bioabsorvíveis para reparação óssea / Gabriel Leonardo Magrin ; orientador, César Augusto Magalhães Benfatti ; coorientador, Júlio César Matias Souza. - Florianópolis, SC, 2016.

88 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós Graduação em Odontologia.

Inclui referências

1. Odontologia. 2. Engenharia de Tecido Ósseo. 3. Implantes Dentários. 4. Arcabouço. 5. Biocerâmicas. I. Benfatti, César Augusto Magalhães. II. Souza, Júlio César Matias. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

Gabriel Leonardo Magrin

**SÍNTESE DE PÓS DE  $\beta$ -TCP E CARACTERIZAÇÃO DE  
SCAFFOLDS DE  $\beta$ -TCP REVESTIDOS COM POLÍMEROS  
BIOABSORVÍVEIS PARA REPARAÇÃO ÓSSEA**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, área de concentração Implantodontia, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Florianópolis, 19 de fevereiro de 2016.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Izabel Cristina Santos Almeida  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. César Augusto Magalhães Benfatti  
Presidente da Banca Examinadora (Orientador)  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Márcio Celso Fredel  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Bruno Alexandre Pacheco de Castro Henriques  
Universidade Federal de Santa Catarina



Dedico este trabalho aos meus pais, de quem o apoio para a realização do curso de Mestrado foi incondicional e indispensável. Esta conquista não é só minha, mas também deles.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a **Deus**, pela vida e pelos saberes que dela emanam. Por guiar-me pelos caminhos de minha profissão, que é, para mim, instrumento divino para ajudar o próximo.

Aos meus pais, **Luiz Carlos Magrin** e **Jussara Maria de Oliveira Magrin**, e à minha irmã, **Milena Giovana Magrin**, pelo amor, apoio e compreensão. Durante os últimos dois anos, eu os privei de minha companhia no ambiente familiar. Porém, em nenhum momento eu deixei de sentir a presença de vocês na minha vida, me dando incentivo, carinho e ajuda em todos os momentos que precisei. Vocês são o que tenho de mais precioso. Suas lições, aprendidas fora dos bancos escolares, perdurarão para sempre na constituição do meu ser.

À **Universidade Federal de Santa Catarina** e ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO)**, na figura da coordenadora **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Izabel Cristina Santos Almeida**, pelo acolhimento recebido nessa casa de ensino e pelo privilégio de fazer parte de seu corpo discente.

Ao **Centro de Ensino e Pesquisa em Implantes Dentários (CEPID)**, que se tornou a extensão de meu lar e que oportunizou agregar conhecimentos essenciais para a minha formação profissional.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. César Augusto Magalhães Benfatti**, por orientar meus primeiros passos no mundo acadêmico. Seus ensinamentos foram muito importantes na minha formação como Mestre, principalmente pelos exemplos de dedicação e conduta acadêmica. Obrigado por enfrentar comigo as adversidades de nossas pesquisas e por acreditar no meu potencial.

Ao **Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini**, por semear em mim ideias e sonhos de uma vida acadêmica de sucesso. Seu carinho e amizade tornam os momentos mais leves e suas palavras em sala de aula são inspiradoras. Obrigado por mostrar que ser professor tem a ver com paixão e vocação, não com a simples transmissão de conhecimentos.

Ao **Prof. Dr. Antônio Carlos Cardoso**, cujas palavras de inspiração ecoam na minha cabeça como se tivessem sido ditas momentos atrás, dedico especial agradecimento. Seu senso do dever com relação ao ensino e sua capacidade de transformar seus alunos são características marcantes e serviram de motivação para o meu crescimento profissional. Obrigado por confiar em mim e me mostrar que palavras aparentemente rudes, porém verdadeiras, podem conter grandes lições.

Ao **Prof. Dr. Marco Aurélio Bianchini**, por servir de modelo de vivência clínica e por oportunizar minhas primeiras publicações científicas. Sua determinação e incentivo à pesquisa me levaram mais longe.

Ao meu coorientador e principal mentor desta pesquisa, **Prof. Dr. Júlio César Matias Souza**, pela enorme contribuição na condução deste trabalho. Sua dedicação e talento para a pesquisa foram fundamentais durante o transcorrer do projeto.

Aos professores **Cláudia Ângela Maziero Volpato** e **Luis André Mendonça Mezzomo**, pelos conhecimentos compartilhados durante as aulas e pela orientação em trabalhos clínicos.

Aos professores **Márcio Celso Fredel** e **Bruno Alexandre Pacheco de Castro Henriques**, por aceitaram fazer parte da banca examinadora desta Dissertação e por contribuírem com suas competências para a elaboração de um trabalho de qualidade.

À minha dupla de clínica, **Patrícia Medeiros Araújo**, por sua amizade e parceria, dentro e fora da Universidade. Com certeza, eu aprendi tanto com você, quanto você aprendeu comigo. Muito obrigado pelo sentimento recíproco de carinho, companheirismo em momentos fáceis e difíceis, e pela presença constante na minha vida nos últimos dois anos.

À minha amiga **Débora Amgarten Ribeiro**, pela amizade e pelos conselhos. Você foi uma grande parceira nas horas complicadas de clínica ou laboratório e de viagens relaxantes. Suas palavras foram sempre adequadas e me ajudaram a enxergar minhas necessidades de mudança pessoal.

Às doutorandas e amigas **Caroline Freitas Rafael** e **Carolina Schäffer Morsch**, por serem modelos de alunas na pós-graduação. A amizade de vocês foi muito importante neste meu período como mestrando e presto aqui meus agradecimentos a toda ajuda que recebi. Vocês me inspiram a ser cada vez melhor.

À minha amiga **Bruna Barbosa Corrêa**, pelos momentos de amizade, pela franqueza de suas palavras e pela prestatividade em ajudar.

À mestranda **Madalena Lúcia Pinheiro Dias**, por revelar-se uma grande amiga neste período de pós-graduação. Obrigado pela parceria e pelos momentos agradáveis compartilhados.

Aos meus colegas de turma no CEPID, **Felipe Damerou Ouriques**, **Miguel Noronha**, **Eli Jair Ivich** e **José Daniel Suárez Rodríguez**, pelo companheirismo e pela troca de experiências.

Aos demais colegas de pós-graduação do CEPID, **Artur, Bernardo, Luiz Fernando, Haline, Abraão, Letícia, Juan Felipe, Maurício, Gabriella, Guenther, José Moisés, Camilo, Clessius, Isis, Cintia, Rafaela, Karin, Adriana, Thaíse, Mariane, Brendan, Javier, Nathalia, Renata, Edwin, Patrícia Pauletto, José Joaquin e Maria Elisa**, agradeço pela amizade e companheirismo. Obrigado por dividirem comigo suas experiências.

Ao **Departamento de Engenharia Mecânica** e ao **Núcleo de Pesquisas em Materiais Cerâmicos e Compósitos (CERMAT)**, na figura do **Prof. Dr. Márcio Celso Fredel**, agradeço por disponibilizar o local e os materiais do laboratório para realização de parte dos nossos experimentos. Foi por meio da colaboração do CERMAT que este trabalho pode ser realizado.

À aluna de iniciação científica **Isadora Schramm Deschamps**, por realizar a parte experimental e participar de quase todo o processo de elaboração deste trabalho de Dissertação. Você foi peça fundamental no desenvolvimento desta pesquisa. Agradeço também aos alunos de iniciação científica da Engenharia de Materiais, **Bruno Rogério Cândido, Anna Catharina Merz e Useche dos Santos Inchauspe**, que participaram em algumas etapas desta pesquisa.

Ao **Laboratório de Engenharia Biomecânica do Hospital Universitário da UFSC (LEBm-HU/UFSC)** pela prestatividade e contribuição com esta pesquisa, disponibilizando a máquina de ensaio universal para os ensaios de compressão.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia, que com presteza nos serviram e com carinho auxiliaram o bom andamento do curso, agradeço imensamente. De forma especial, agradeço a funcionária **Silvane Costa**, que é elemento importante para o funcionamento do CEPID e por quem partilho uma amizade fora do ambiente profissional.

Aos demais professores e colegas do PPGO, alunos de graduação da Odontologia e demais funcionários da UFSC, por quem tenho admiração e desenvolvi amizades, presto aqui os meus agradecimentos. Vocês ajudaram de forma direta ou indireta na elaboração deste trabalho e tornaram mais fácil a minha caminhada para chegar aqui. Muito obrigado!



A ciência se compõe de erros que, por sua vez,  
são os passos até a verdade. Nunca se fez nada  
grande sem uma esperança exagerada.

(Júlio Verne)



## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a síntese do pó de tricálcio fosfato em fase *beta* ( $\beta$ -TCP) e as propriedades mecânicas de arcabouços (*scaffolds*) compostos  $\beta$ -TCP recobertos com polímeros bioabsorvíveis, colágeno e poli L-co-D,L ácido láctico (PLDLA). O pó de  $\beta$ -TCP foi obtido por moagem reativa e, então, caracterizado por difração de raios-X e microscopia eletrônica de varredura (MEV/EDS). *Scaffolds* de  $\beta$ -TCP foram obtidos pelo método da replica, no qual esponjas de poliuretano são imersas em uma suspensão de  $\beta$ -TCP e submetidas a tratamento térmico para remoção do poliuretano e sinterização da cerâmica. Colágeno do tipo I ou PLDLA foram usados para recobrir os arcabouços de  $\beta$ -TCP pelo método de revestimento por imersão (*dip coating*). Os *scaffolds* foram separados em quatro grupos, dependendo do material de recobrimento: sem recobrimento (grupo A), duas imersões em colágeno (grupo B), duas imersões em PLDLA (grupo C) e dez imersões em PLDLA (grupo D). As amostras foram caracterizadas por testes de compressão e MEV/EDS. Análises químicas e microscópicas revelaram morfologia apropriada das partículas de pó e a presença ou ausência de recobrimento polimérico nos arcabouços. Os *scaffolds* recobertos com PLDLA apresentaram uma maior resistência à compressão (grupo D;  $0,11 \pm 0,054$  MPa / grupo C;  $0,025 \pm 0,015$ ) do que aqueles com recobrimento por colágeno (grupo B;  $0,022 \pm 0,012$  MPa) ou sem recobrimento (grupo A;  $0,024 \pm 0,012$  MPa). Todas as estruturas porosas formaram uma rede de poros altamente interconectada. A porosidade média dos *scaffolds* de  $\beta$ -TCP sem recobrimento foi de 86% e o tamanho de poro foi de 738  $\mu\text{m}$ , em média, enquanto os *scaffolds* recobertos com 10 camadas de PLDLA tiveram uma porosidade média de 44,6% e de 200 a 400  $\mu\text{m}$  de tamanho de poro. O método de recobrimento com PLDLA revelou-se uma potencial estratégia para aumentar a resistência mecânica de materiais cerâmicos porosos, possibilitando à estrutura desenvolvida uma aplicação clínica como enxerto ósseo *inlay*.

**Palavras-chave:** Engenharia de Tecido Ósseo 1.Implantes Dentários 2. Arcabouço 3. Biocerâmicas 4.



## ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the synthesis of beta phase tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) powder and mechanical properties of scaffolds composed of  $\beta$ -TCP coated with bioabsorbable polymers, namely collagen and poly D,L-lactic acid (PDLLA).  $\beta$ -TCP powder was obtained by reactive milling and then characterized by X-ray diffraction and scanning electron microscopy (SEM/EDS).  $\beta$ -TCP scaffolds were obtained by replica method, in which polyurethane foams are immersed in  $\beta$ -TCP suspension and thereafter submitted to a thermal treatment to remove the polyurethane and sinter the ceramic. Type-I collagen or PDLLA were used to coat the  $\beta$ -TCP scaffolds by dip coating method. The scaffolds were separated in four groups depending on the coating material: non-coated (group A), double immersion in collagen (group B), double immersion in PDLLA (group C) and ten immersions in PDLLA (group D). Samples were characterized by compressive tests and SEM/EDS. Chemical and microscopic analyses revealed appropriate morphology of powder particles and scaffolds, with or without polymeric coatings. Scaffolds coated with PDLLA showed higher compressive strength (group D;  $0.11 \pm 0.054$  MPa/ group C;  $0.025 \pm 0.015$ ) than those of collagen (group B;  $0.022 \pm 0.012$  MPa) or non-coated groups (group A;  $0.024 \pm 0.012$  MPa). All the porous structures formed a highly interconnected pore network. The mean porosity  $\beta$ -TCP scaffolds free of coatings was around 86% and mean pore size of 738  $\mu\text{m}$ , while scaffolds coated with 10 layers of PDLLA had a mean porosity of about 44.6% and 200 to 400  $\mu\text{m}$  of pore size. The coating method of  $\beta$ -TCP with PDLLA revealed a potential strategy to increase mechanical strength of porous ceramic materials, given to the developed structure a clinical application as inlay bone graft.

**Keywords:** Bone Tissue Engineering 1. Dental Implants 2. Scaffolds 3. Bioceramics 4.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Preenchimento de um alvéolo dental com biomaterial de origem xenógena (osso bovino liofilizado) (Bio-Oss®, Geistlich Pharma, Wolhusen, Suíça) .....	29
Figura 2 – Enxerto em bloco com osso bovino liofilizado (OrthoGen Bloco, Baumer, Mogi Mirim, São Paulo, Brasil) para ganho de espessura óssea em rebordo reabsorvido. Foto gentilmente cedida por Carlos Clessius Ferreira Xavier .....	29
Figura 3 – Desenho mostrando a remoção de uma área doadora de enxerto autógeno de um osso pélvico (crista ilíaca) (GIL-ALBAROVA & GIL-ALBAROVA, 2012) .....	32
Figura 4 – Enxerto ósseo autógeno removido da área doadora do ramo mandibular .....	32
Figura 5 – <i>Scaffold</i> de $\beta$ -TCP e PLDLA, produzido pelo método da réplica .....	35
Figuras do Artigo:	
Figura 1 - (A) Difração de raios-X padrão de $\beta$ -TCP. Radiação Cu-K $\alpha$ (1.54056 Å), taxa de varredura de 1.5°min <sup>-1</sup> , voltagem de 40 kV e corrente de 30 mA. (B) Micrografia de MEV das partículas de pó obtidas no modo de elétrons secundários a 15 kV. (C) Mapa de EDX do pó de $\beta$ -TCP. (D) Comportamento reológico da suspensão de $\beta$ -TCP.56	
Figura 2 - Valores médios de resistência à compressão registrados nos <i>scaffolds</i> de $\beta$ -TCP recobertos com PLDLA (2 e 10 imersões), colágeno (2 imersões) e sem recobrimento .....	57
Figura 3 - Imagens de MEV dos <i>scaffolds</i> . (A) <i>Scaffold</i> de $\beta$ -TCP sem recobrimento. <i>Scaffold</i> de $\beta$ -TCP recoberto com duas camadas de colágeno (B) ou PLDLA (C). (D) <i>Scaffold</i> de $\beta$ -TCP recoberto com 10 camadas de PLDLA .....	58
Figura 4 - <i>Scaffold</i> de $\beta$ -TCP recoberto com 10 camadas de PLDLA. Mapeamento por EDX (área vermelha) indicando a presença de PLDLA .....	59



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ® – Marca registrada  
NIH-EUA – Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América  
3D – Tridimensional  
 $\mu\text{m}$  – Micrometro  
Ca – Cálcio (elemento químico)  
P – Fósforo (elemento químico)  
HA – Hidroxiapatita  
 $\beta$  – *Beta*  
TCP – Tricálcio fosfato  
MPa – Megapascal  
 $\varepsilon$  – *Épsilon*  
PVA – Álcool polivinílico  
PCL – Poli- $\varepsilon$ -caprolactona  
PLA – Ácido polilático  
PGA – Ácido poliglicólico  
PHB – Polihifroxilbutirato  
PPF – Polipropileno fumarato  
PLGA – Ácido polilático-co-glicólico  
PLDLA – Poli L-co-D,L ácido láctico  
% - Percentagem  
CERMAT – Núcleo de Pesquisas em Materiais Cerâmicos e Compósitos  
EMC – Departamento de Engenharia Mecânica  
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina  
CEPID – Centro de Ensino e Pesquisa em Implantes Dentários  
PPGO – Programa de Pós-Graduação em Odontologia  
ODT – Departamento de Odontologia  
DDS – *Doctor in Dental Science*  
MEV – Microscópio eletrônico de varredura  
EDS – Espectroscopia de raios-X por energia dispersiva  
g – Grama (unidade de medida)  
ml – Mililitro  
EUA – Estados Unidos da América  
 $\lambda$  – Comprimento de onda (*lambda*)  
nm – Nanômetro  
kV – Quilovolt  
mA – Miliampére  
° - Grau  
s – Segundo (unidade de medida)

DRX – Difração de raios-X  
ppi – Poros por polegada  
wt – Em peso  
rpm – Rotações por minuto  
h – hora  
™ - Marca comercial  
Pa – Pascal  
°C – Grau Celsius  
RJ – Rio de Janeiro (Estado)  
 $\rho_{th}$  – Densidade teórica  
 $\rho_{app}$  – Densidade aparente  
mm – Milímetro  
min – Minuto  
N – Newton  
 $n$  – Tamanho da amostra  
 $F$  – Força  
 $w$  – Área da secção transversal  
Ag – Prata (elemento químico)  
Pd – Paládio (elemento químico)  
EDX – Espectroscopia de raios-X por energia dispersiva  
 $p$  – Nível de significância estatística  
< - Menor que  
~ - Congruente  
CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
Å - Angström

## SUMÁRIO

CAPÍTULO I .....	25
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>257</b>
1.1. REVISÃO DE LITERATURA .....	28
1.1.1. Tratamento das alterações decorrentes da extração dentária...28	
1.1.2. Biomateriais para enxertia óssea .....	30
1.1.3. Materiais para síntese de <i>scaffolds</i> .....	32
1.2. OBJETIVOS .....	35
1.2.1. Objetivo Geral .....	35
1.2.2. Objetivos Específicos.....	35
 CAPÍTULO II .....	 37
<b>ARTIGO - VERSÃO EM PORTUGUÊS</b> .....	<b>39</b>
<b>ARTICLE - ENGLISH VERSION</b> .....	<b>61</b>
 CAPÍTULO III .....	 81
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>83</b>



## CAPÍTULO I



## 1. INTRODUÇÃO

Com o advento dos implantes dentários, o entendimento do processo de cicatrização do rebordo ósseo alveolar após a extração dentária passou a ser tema de grande destaque. Estudos clínicos, radiográficos e histológicos realizados nas últimas décadas comprovaram que a perda do elemento dental leva a um remodelamento acentuado no osso alveolar, diminuindo o seu volume e dificultando a instalação de implantes osseointegráveis (SCHROPP et al., 2003; CARDAROPOLI et al., 2003; ARAÚJO & LINDHE, 2005). Assim, as terapias reparativas do rebordo alveolar ganharam importância, pois a correta instalação de implantes depende de um volume ósseo alveolar adequado (JOVANOVIC, 2007). Contudo, as técnicas e os materiais de enxertia autógena utilizados até aquele momento apresentavam diversas desvantagens, como alta morbidade cirúrgica, altas taxas de remodelamento do material enxertado e a disponibilidade limitada no sítio doador, estimulando as pesquisas para desenvolvimento de novos biomateriais (ACOCCELLA et al., 2010).

Almejando a excelência na manutenção e no aumento do volume do rebordo alveolar, a engenharia de tecido ósseo busca desenvolver materiais que mimetizem os tecidos humanos em sua qualidade e estrutura. Neste cenário, surgem os *scaffolds* cerâmicos, estruturas tridimensionais e altamente porosas, constituídas de cerâmicas bioabsorvíveis que permitem a adesão e migração celular, além de permitirem a formação de vasos sanguíneos para nutrição do tecido neoformado (DAMIEN & PARSONS, 1991; LEGEROS, 2008; BOYAN & SCHWARTZ, 2011; HABIBOVIC & BARRALET, 2011; SCHROEDER & MOSHEIFF, 2011; SAMAVEDI et al., 2013; OKAMOTO & JOHN, 2013; LIU et al., 2013; PHILIPPART et al., 2015). Porém, a baixa resistência mecânica da estrutura cerâmica trouxe um problema para a aplicação clínica dos *scaffolds*. Estudos recentes (MIAO et al., 2008; KANG et al. 2011; OKAMOTO & JOHN, 2013; LIU et al., 2013; PHILIPPART et al., 2015) encontraram na incorporação de polímeros uma possível solução, mostrando um aumento considerável da resistência à compressão destas estruturas quando polímeros bioabsorvíveis recobriam os *scaffolds* cerâmicos. Assim, o propósito deste estudo foi sintetizar e caracterizar *scaffolds* compostos de  $\beta$ -TCP recobertos com polímeros bioabsorvíveis, colágeno e PLDLA, para uso na regeneração óssea alveolar.

Este trabalho de pesquisa foi desenvolvido no Centro de Ensino e Pesquisa em Implantes Dentários (CEPID), no Departamento de

Odontologia, em parceria com o Núcleo de Pesquisas em Materiais Cerâmicos e Compósitos (CERMAT), no Departamento de Engenharia Mecânica, ambos na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Brasil. A presente dissertação encontra-se dividida nas seguintes seções: Capítulo I, onde é apresentada uma Introdução, uma Revisão de Literatura sobre o tema e os Objetivos almejados durante o trabalho; Capítulo II, onde a pesquisa é apresentada no formato de um artigo escrito em duas versões, uma em português e outra em inglês, nas normas para publicação no periódico internacional *Journal of Applied Oral Science*; e Capítulo III, onde consta a lista com as Referências consultadas durante a elaboração desta Dissertação.

## 1.1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1.1. Tratamento das alterações decorrentes da extração dentária

A manutenção das dimensões do rebordo alveolar após as extrações dentárias é de fundamental importância para um resultado favorável na terapia com implantes dentários. Contudo, o processo de remodelamento dos tecidos que ocorre após a remoção do dente leva a perdas no volume original e, conseqüentemente, a resultados inferiores e pouco previsíveis (AMLER et al., 1960; SCHROPP et al., 2003; CARDAROPOLI et al., 2003; ARAÚJO & LINDHE, 2005). O processo alveolar, porção óssea que se encontra ao redor dos dentes, depende da presença do dente para sua persistência e se desenvolve junto com a erupção dentária (SCHROEDER, 1986). Sendo assim, após a perda do elemento dental, o rebordo alveolar passa por alterações dimensionais de perda volumétrica que podem dificultar a reabilitação oral por meio de implantes dentários.

De uma forma simples, existem duas abordagens cirúrgicas possíveis para o tratamento dos defeitos ósseos alveolares causados pela extração do elemento dental: uma abordagem preventiva, através do preenchimento da cavidade óssea deixada pelo dente após a extração (alvéolo) (ACKERMANN, 2009; CARDAROPOLI et al., 2012; PERELMAN-KARMON et al., 2012) (Figuras 1); e uma abordagem reparativa, a partir de técnicas regenerativas de enxertia para ganho de volume ósseo após a cicatrização do rebordo (MISCH, 1997; CHIAPASCO et al., 2009)(Figuras 2). Para ambas as situações, a utilização de biomateriais de enxertia se faz necessária.



Figura 1 – Preenchimento de um alvéolo dental com biomaterial de origem xenógena (osso bovino liofilizado) (Bio-Oss®, Geistlich Pharma, Wolhusen, Suíça). Fonte: Autoria própria.



Figura 2 – Enxerto em bloco com osso bovino liofilizado (OrthoGen Bloco, Baumer, Mogi Mirim, São Paulo, Brasil) para ganho de espessura óssea em rebordo reabsorvido. Fonte: Foto gentilmente cedida por Carlos Clessius Ferreira Xavier.

### 1.1.2. Biomateriais para enxertia óssea

Apesar das diversas definições utilizadas, o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH-EUA) define como biomaterial qualquer material (não farmacológico) ou combinação de substâncias, naturais ou sintéticas, utilizados como uma parte ou um todo de um sistema que substitui tecidos, órgãos ou funções de um corpo (WILLIAMS, 1987). Em uma definição atualizada (RATNER et al., 2013), um biomaterial seria qualquer material ou dispositivo que interage com um sistema biológico, o que torna o conceito de biomaterial ainda mais geral e abrangente.

O processo de seleção dos materiais para uso *in vivo* deve levar em consideração suas propriedades, pois estas vão refletir diretamente no desempenho do biomaterial. Genericamente, as características dos biomateriais podem ser divididas em duas categorias: propriedades de corpo (*bulk properties*) e propriedades de superfície (*surface properties*) (BINYAMIN et al., 2006; RATNER et al., 2013). As propriedades de corpo são determinadas pela composição química, ligações interatômicas e microestrutura do biomaterial, e resultam nas suas propriedades físicas, químicas e biológicas. Dentre as propriedades de corpo fundamentais à aplicação clínica, destacam-se a resistência mecânica, comportamento térmico e degradação em ambiente biológico (RATNER et al., 2013). As propriedades de superfície descrevem as interações que ocorrem na interface com o ambiente biológico em que o material é aplicado. Uma propriedade chave para os materiais implantados em organismos humanos é a biocompatibilidade, ou seja, como o organismo reage com a superfície do material e o impacto que este material causa ao sistema imunológico (ANDERSON, 2001; BINYAMIN et al., 2006; RATNER et al., 2013).

Classicamente, os enxertos ósseos autógenos, aqueles removidos de uma área doadora do próprio paciente receptor, são utilizados como enxertos “padrão-ouro” devido às suas características osteocondutoras, de biocompatibilidade, de bioabsorção e de angiogênese (BURCHARDT, 1983; GOLDBERG & STEVENSON, 1987; ARDEN & BURGIO, 1992; TESSIER et al., 2005) (Figuras 3 e 4). Contudo, a necessidade de um sítio doador para coleta óssea, disponibilidade limitada de osso para remoção, a morbidade cirúrgica aumentada e as altas taxas de remodelação óssea levaram ao desenvolvimento de materiais biointegráveis alternativos para o tratamento do rebordo alveolar atrófico (ACOCCELLA et al., 2010). Mesmo para o preenchimento de alvéolos dentais pós-extração, o osso autógeno

apresentou pior desempenho na manutenção do volume alveolar, quando comparado a enxertos de origem xenógena (osso bovino liofilizado) (CARDAROPOLI & CARDAROPOLI, 2008; ARAÚJO & LINDHE, 2011). Sendo assim, materiais osteocondutores e de absorção lenta ganharam a preferência e têm demonstrado bons resultados na preservação do volume do rebordo alveolar, quando analisados ao longo do tempo (CARDAROPOLI & CARDAROPOLI, 2008; LANDSBERG, 2008; ARAÚJO & LINDHE, 2011; CANEVA et al., 2012; CARDAROPOLI et al. 2012; PERELMAN-KARMON et al., 2012).

Arcabouços (*scaffolds*) sintéticos bioabsorvíveis surgiram como uma possibilidade interessante, diminuindo a morbidade cirúrgica e revelando baixas taxas de remodelamento ósseo (DAMIEN & PARSONS, 1991; LEGEROS, 2008; BOYAN & SCHWARTZ, 2011; HABIBOVIC & BARRALET, 2011; SCHROEDER & MOSHEIFF, 2011; SAMAVEDI et al, 2013). *Scaffolds* são estruturas tridimensionais (3D) que reproduzem a função da matriz extracelular no suporte à adesão, migração e proliferação de células, culminando na regeneração do tecido desejado (BINYAMIN et al., 2006; SHIMAUCHI et al., 2013). Tais arcabouços devem seguir certos requisitos, como: apresentar alta biocompatibilidade; ser composto de um material que possua biabsorção controlada, ou seja, servir de estrutura temporária a ser substituída pelo novo tecido ao longo do tempo; possuir propriedades mecânicas adequadas ao manuseio e para implantação, suportando as cargas intraorais na região do defeito; possuir uma arquitetura de poros interconectados de tamanho apropriado (100-500 µm de diâmetro) para permitir a integração e vascularização do tecido ósseo; apresentar alta molhabilidade de superfície, induzindo a adsorção e proliferação celular; permitir a esterilização; e apresentar uma viabilidade industrial para ser sintetizado em tamanhos e formatos específicos (GAZDAG et al., 1995; OKAMOTO & JOHN, 2013; LIU et al., 2013).



Figura 3 – Desenho mostrando a remoção de uma área doadora de enxerto autógeno de um osso pélvico (crista ilíaca). Fonte: GIL-ALBAROVA & GIL-ALBAROVA, 2012 (Ref.).



Figura 4 – Enxerto ósseo autógeno removido da área doadora do ramo mandibular. Fonte: Autoria própria.

### 1.1.3. Materiais para síntese de *scaffolds*

Tradicionalmente conhecidas por serem frágeis e com alta dureza, as cerâmicas possuem diversas propriedades desejáveis para aplicação

como biomaterial, como a alta resistência à compressão e a relativa inércia química em contato com tecidos biológicos. As cerâmicas biocompatíveis são tipicamente classificadas em três categorias: cerâmicas bioinertes, como a zircônia e a alumina, que mantêm a sua estrutura após a implantação; cerâmicas bioativas, como o biovidro, que desempenham uma atividade de interação química e biológica com os tecidos biológicos circundantes; e as cerâmicas bioabsorvíveis, como os fosfatos de cálcio, que degradam ao longo do tempo e são substituídos por tecido endógeno, a partir da osteocondução e integração de células osteogênicas. Devido às suas características específicas, as cerâmicas bioabsorvíveis encontraram um lugar de destaque na engenharia do tecido ósseo (BINYAMIN et al., 2006; HABIBOVIC & BARRALET, 2011; LIU et al., 2013; SAMAVEDI et al., 2013).

Substitutos ósseos cerâmicos baseados em fosfato de cálcio (Ca/P) como a hidroxiapatita (HA) e o  $\beta$ -tricálcio fosfato ( $\beta$ -TCP) têm sido usados com segurança na Odontologia (DAMIEN & PARSONS, 1991; HÄMMERLE et al., 1997; LEGEROS, 2008; CHEN & JIN, 2010; BOYAN & SCHWARTZ, 2011; HABIBOVIC & BARRALET, 2011; SCHROEDER & MOSHEIFF, 2011; SAMAVEDI et al., 2013). Esses arcabouços precisam ter um tamanho de poro adequado que depende principalmente da técnica de obtenção. Diversos métodos são empregados para geração de poros nos *scaffolds*, sendo eles: método da réplica, método de incorporação direta de gás, *freeze casting*, método do sacrifício do modelo e, mais recentemente, impressão 3D (KARAGEORGIU & KAPLAN, 2005; LIU et al., 2013; DO et al., 2015). Estes materiais de enxertia apresentam uma absorção completa, sendo substituído por osso em um período de 6 a 10 meses (HOROWITZ et al., 2009). Mesmo possuindo excelente comportamento biológico, a resistência mecânica dos *scaffolds* cerâmicos é baixa, principalmente devido à sua alta porosidade. Após a sinterização, os *scaffolds* de HA/ $\beta$ -TCP produzidos pelo método da réplica alcançam um valor médio de resistência à compressão de 0,05 MPa (MIAO et al., 2008; KANG et al. 2011). Este valor ainda encontra-se bastante aquém do valor do tecido ósseo esponjoso, que se apresenta na faixa de 2 a 10 MPa (KANG et al. 2011; OKAMOTO & JOHN, 2013).

Uma grande variedade de polímeros bioabsorvíveis naturais ou sintéticos tem sido estudada nas últimas décadas com bons resultados (MIAO et al., 2008; OKAMOTO & JOHN, 2013; LIU et al., 2013; PHILIPPART et al., 2015). Polímeros são longas cadeias de moléculas compostas de unidades repetitivas chamadas de monômeros. Existem diversas vantagens de se usar polímeros como biomateriais, incluindo

seu grande histórico de uso no campo dos biomateriais e sua versatilidade. Vários fatores contribuem para as propriedades resultantes de um polímero, dentre eles: a escolha dos monômeros, o arranjo das cadeias poliméricas, o comprimento da cadeia (peso molecular), grau de cristalinidade, temperatura de transição vítrea, entre outras (BINYAMIN et al., 2006).

Alguns exemplos comuns de polímeros utilizados na área de biomateriais são: celulose, colágeno, glicosaminoglicanas, álcool polivinílico (PVA), poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL), ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA), polihidroxilbutirato (PHB), polipropilenofumarato (PPF), ácido polilático-co-glicólico (PLGA) e poli L-co-D,L ácido láctico (PLDLA). Polímeros bioabsorvíveis podem ser usados como material de enxerto de forma independente ou em associação com estruturas metálicas ou cerâmicas (CHEN & JIN, 2010; OKAMOTO & JOHN, 2013; LIU et al., 2013; SHIMAUCHI et al., 2013; PHILIPPART et al., 2015). Considerando a degradação desses polímeros em componentes não tóxicos, o PLA, o PGA e seus copolímeros são utilizados extensivamente no campo da engenharia tecidual (OKAMOTO & JOHN, 2013). Ainda, estes materiais podem ser misturados às estruturas frágeis para melhorar suas propriedades mecânicas (KANG et al. 2011; PHILIPPART et al., 2015). No estudo de Kim et al. (2004), *scaffolds* de HA foram recobertos com PCL, aumentando a resistência à compressão das estruturas quase três vezes, de 0,16 MPa para 0,45 MPa. Miao et al. (2008) descrevem que a força compressiva de *scaffolds* de HA/ $\beta$ -TCP confeccionados pelo método da réplica aumentou de 0,05 MPa para 0,6 MPa após o recobrimento com PLGA. Além disso, antibióticos e fatores de crescimento podem ser incorporados na estrutura polimérica, proporcionando ao *scaffold* uma capacidade de distribuição de drogas (LIU et al., 2013; PHILIPPART et al., 2015).

Atualmente, a área da engenharia de tecido ósseo investiga estruturas e materiais que possam mimetizar as propriedades dos tecidos humanos. O osso é um tecido complexo que pode ser descrito como um compósito natural, composto de 70% de hidroxiapatita (HA) e 30% de colágeno, detentor de uma estrutura porosa natural com gradiente funcional de propriedades (PHILIPPART et al., 2015). Assim, *scaffolds* sintéticos para formação óssea devem possuir uma estrutura porosa similar de compósito, com fases cerâmicas e poliméricas que se interpenetram (MIAO et al., 2008) (Figura 5). Considerando suas aplicações, *scaffolds* estão sujeitos a cargas mecânicas, desde sua manipulação prévia à instalação no leito ósseo até a sua incorporação

pelo organismo (PHILIPPART et al., 2015). Desta forma, os arcabouços precisam resistir à carga aplicada pelo cirurgião durante a adaptação das estruturas nas áreas de defeito (IKADA, 2006). Também, capacidade de suportar cargas intraorais é importante para manter o volume ósseo e evitar o remodelamento tecidual após a instalação do *scaffold*. Esse fato deve ser evidenciado quando materiais de enxerto são aplicados nas terapias regenerativas periodontais e perimplantares, uma vez que estes materiais podem ser submetidos a vários estresses mecânicos originados por forças oclusais (SHIMAUCHI et al., 2013).



Figura 5 – *Scaffold* de  $\beta$ -TCP e PLDLA, produzido pelo método da réplica. Fonte: Autoria própria.

## 1.2. OBJETIVOS

### 1.2.1. Objetivo Geral

O objetivo principal deste estudo foi sintetizar pós de  $\beta$ -TCP e caracterizar *scaffolds* compostos de  $\beta$ -TCP recobertos com polímeros bioabsorvíveis, colágeno e PLDLA, para uso na reparação do rebordo ósseo residual.

### 1.2.2. Objetivos Específicos

Realizar a caracterização química e morfológica do pó de  $\beta$ -TCP empregado na confecção dos *scaffolds*.

Caracterizar morfológicamente a estrutura dos *scaffolds* produzidos neste estudo, com valores de porosidade e tamanho dos poros.

Caracterizar mecanicamente os *scaffolds* obtidos, por meio de ensaios de compressão, bem como comparar o resultado entre os grupos de *scaffolds* com recobrimento polimérico (de colágeno ou PLDLA) e sem recobrimento.

## CAPÍTULO II



**ARTIGO – VERSÃO EM PORTUGUÊS**

**SÍNTESE DE PÓS DE  $\beta$ -TCP E CARACTERIZAÇÃO DE  
SCAFFOLDS DE  $\beta$ -TCP REVESTIDOS COM POLÍMEROS  
BIOABSORVÍVEIS PARA REPARAÇÃO ÓSSEA**

Este artigo está formatado sobre as normas da revista *Journal of Applied Oral Science*



## **Síntese de pós de $\beta$ -TCP e caracterização de *scaffolds* de $\beta$ -TCP revestidos com polímeros bioabsorvíveis para reparação óssea**

Isadora S. Deschamps<sup>1</sup>, Gabriel L. Magrin<sup>2</sup>, Bruno A. P. C. Henriques<sup>1</sup>, Aguedo Aragonés<sup>2</sup>, Ricardo S. Magini<sup>2</sup>, Márcio C. Fredel<sup>1</sup>, Cesar A. M. Benfatti<sup>2</sup>, Júlio C. M. Souza<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Núcleo de Pesquisas em Materiais Cerâmicos e Compósitos (CERMAT), Departamento de Engenharia Mecânica (EMC), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 88040-900, Santa Catarina, Brasil

<sup>2</sup> Centro de Ensino e Pesquisas em Implantes Dentários (CEPID), Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO), Departamento de Odontologia (ODT), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 88040-900, Santa Catarina, Brasil

### **Autor de correspondência:**

Gabriel Leonardo Magrin, DDS  
Centro de Ensino e Pesquisas em Implantes Dentários (CEPID),  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO), Departamento de  
Odontologia (ODT), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)  
Campus Trindade, s/n, Trindade, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil  
CEP: 88040-900  
Tel/Fax: +55 48 3721-9077  
e-mail: glmagrin@gmail.com



## Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a síntese do pó de tricálcio fosfato em fase *beta* ( $\beta$ -TCP) e as propriedades mecânicas de arcabouços (*scaffolds*) compostos  $\beta$ -TCP recobertos com polímeros bioabsorvíveis, colágeno e poli L-co-D,L ácido láctico (PLDLA). O pó de  $\beta$ -TCP foi obtido por moagem reativa e, então, caracterizado por difração de raios-X e microscopia eletrônica de varredura (MEV/EDS). *Scaffolds* de  $\beta$ -TCP foram obtidos pelo método da replica, no qual esponjas de poliuretano são imersas em uma suspensão de  $\beta$ -TCP e submetidas a tratamento térmico para remoção do poliuretano e sinterização da cerâmica. Colágeno do tipo I ou PLDLA foram usados para recobrir os arcabouços de  $\beta$ -TCP pelo método de revestimento por imersão (*dip coating*). Os *scaffolds* foram separados em quatro grupos, dependendo do material de recobrimento: sem recobrimento (grupo A), duas imersões em colágeno (grupo B), duas imersões em PLDLA (grupo C) e dez imersões em PLDLA (grupo D). As amostras foram caracterizadas por testes de compressão e MEV/EDS. Análises químicas e microscópicas revelaram morfologia apropriada das partículas de pó e a presença ou ausência de recobrimento polimérico nos arcabouços. Os *scaffolds* recobertos com PLDLA apresentaram uma maior resistência à compressão (grupo D;  $0,11 \pm 0,054$  MPa / grupo C;  $0,025 \pm 0,015$ ) do que aqueles com recobrimento por colágeno (grupo B;  $0,022 \pm 0,012$  MPa) ou sem recobrimento (grupo A;  $0,024 \pm 0,012$  MPa). Todas as estruturas porosas formaram uma rede de poros altamente interconectada. A porosidade média dos *scaffolds* de  $\beta$ -TCP sem recobrimento foi de 86% e o tamanho de poro foi de 738  $\mu\text{m}$ , em média, enquanto os *scaffolds* recobertos com 10 camadas de PLDLA tiveram uma porosidade média de 44,6% e de 200 a 400  $\mu\text{m}$  de tamanho de poro. O método de recobrimento com PLDLA revelou-se uma potencial estratégia para aumentar a resistência mecânica de materiais cerâmicos porosos, possibilitando à estrutura desenvolvida uma aplicação clínica como enxerto ósseo *inlay*.

*Palavras-chave:* Engenharia de Tecido Ósseo. Implantes Dentários. Arcabouços. Biocerâmicas.

## 1. Introdução

Após a perda do elemento dental, o rebordo alveolar passa por alterações dimensionais que podem dificultar a reabilitação oral por meio de implantes dentários<sup>3</sup>. Nessas situações, classicamente, enxertos ósseos autógenos são utilizados devido às suas características osteocondutoras, de bioabsorção e de angiogênese<sup>5,29</sup>. Contudo, a necessidade de um sítio doador para coleta óssea, a morbidade cirúrgica aumentada e as altas taxas de remodelação óssea levaram ao desenvolvimento de materiais alternativos para o tratamento do rebordo alveolar atrófico<sup>1</sup>.

Arcabouços (*scaffolds*) sintéticos bioabsorvíveis surgiram como uma possibilidade interessante, diminuindo a morbidade cirúrgica e revelando baixas taxas de remodelamento ósseo<sup>4,12,17,25,26</sup>. A estrutura porosa tridimensional (3D) dos *scaffolds* sintéticos estimula o crescimento, migração e diferenciação de células humanas para reparação do osso. Tais *scaffolds* devem seguir certos requisitos, como: possuir poros interconectados de tamanho apropriado (100-500 µm de diâmetro) para permitir a integração e vascularização do tecido ósseo; alta molhabilidade superficial, induzindo a adsorção e proliferação celular; biointegração e bioabsorção controladas; adequada resistência a compressão, entre 2 e 10 MPa (uma resistência a compressão comparável ao do osso esponjoso); e uma viabilidade industrial para ser fabricado em tamanhos e formas específicos<sup>11,22</sup>.

Substitutos ósseos baseados em fosfato de cálcio (Ca/P) como a hidroxiapatita (HA) e o β-tricálcio fosfato (β-TCP) têm sido usados com segurança na Odontologia<sup>6,12,17,18,25</sup>. Esses arcabouços cerâmicos precisam ter um tamanho de poro adequado que depende principalmente da técnica de obtenção. Diversos métodos são empregados para geração de porosidades nos *scaffolds*, dentre eles: método da réplica, método de incorporação direta de gás, *freeze casting*, método do sacrifício do modelo e, mais recentemente, impressão 3D<sup>9,15,18</sup>. Estes materiais de enxertia têm apresentado uma reabsorção completa, sendo substituído por osso em um período de 6 a 10 meses<sup>13</sup>. Mesmo possuindo excelente comportamento biológico, a resistência mecânica dos *scaffolds* cerâmicos é baixa, principalmente devido à sua estrutura porosa frágil. Após a sinterização, os *scaffolds* de HA/β-TCP alcançam um valor médio de resistência à compressão de 0,05 MPa<sup>14,20</sup>.

Uma grande variedade de biomateriais baseados em polímeros naturais ou sintéticos tem sido estudada nos últimos anos com bons resultados<sup>18,20,22,23</sup>. Os exemplos mais comuns de polímeros são:

celulose, colágeno, álcool polivinílico (PVA), poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL), ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA), polihidroxilbutirato (PHB), polipropilenofumarato (PPF), ácido polilático-co-glicólico (PLGA) e poli L-co-D,L ácido láctico (PLDLA). Eles podem ser usados como material de enxerto de forma independente ou em associação com estruturas metálicas ou cerâmicas<sup>6,18,22,23,28</sup>. Considerando a degradação desses polímeros em componentes não tóxicos, o PLA, o PGA e seus copolímeros são utilizados extensivamente no campo da engenharia tecidual<sup>22</sup>. Ainda, estes materiais podem ser misturados às estruturas frágeis para melhorar suas propriedades mecânicas<sup>14,20,23</sup>. Além disso, antibióticos e fatores de crescimento podem ser incorporados na estrutura polimérica, proporcionando ao *scaffold* uma capacidade de distribuição de drogas<sup>18,23</sup>.

Atualmente, a área da engenharia de tecido ósseo investiga estruturas e materiais que imitem as propriedades dos tecidos humanos. O osso é um tecido complexo que pode ser descrito como um compósito natural, composto de 70% de hidroxiapatita (HA) e 30% de colágeno, detentor de uma estrutura porosa natural com gradiente funcional<sup>23</sup>. Assim, *scaffolds* sintéticos para formação óssea devem possuir uma estrutura porosa similar de compósito, com fases cerâmicas e poliméricas que se interpenetram<sup>20</sup>. Considerando suas aplicações, *scaffolds* estão sujeitos a cargas mecânicas, desde sua manipulação prévia à instalação no leito ósseo até a sua incorporação pelo organismo<sup>23</sup>. Desta forma, os arcabouços precisam resistir à carga aplicada pelo cirurgião durante a adaptação das estruturas nas áreas de defeito. Também, capacidade de suportar carga é importante para manter o volume ósseo e evitar o remodelamento tecidual após a instalação do *scaffold*. Esse fato deve ser evidenciado quando materiais de enxerto são aplicados nas terapias reparativas periodontais e perimplantares, uma vez que estes materiais podem ser submetidos a vários estresses mecânicos originados por forças oclusais<sup>28</sup>.

De fato, a engenharia de tecido ósseo tem experimentado muitas mudanças na busca de um *scaffold* funcional para defeitos ósseos alveolares. As propriedades mecânicas dos *scaffolds* durante a reparação do osso são uma preocupação clínica, que pode ser solucionada por meio de diferentes materiais. O propósito deste estudo foi sintetizar um adequado pó de  $\beta$ -TCP e avaliar a resistência à compressão de *scaffolds* compostos de  $\beta$ -TCP recobertos com polímeros bioabsorvíveis, colágeno e PLDLA, para uso na reparação alveolar e perimplantar.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Síntese e caracterização do pó de $\beta$ -TCP

O pó de  $\beta$ -TCP foi sintetizado por moagem reativa usando proporções estequiométricas como vistas na Equação 1:



A dosagem dos componentes foi realizada por análise gravimétrica (Bel, MARK210, Monza, Itália). Cada rota de síntese consistiu de 30 g  $\text{CaCO}_3$ , 22 g  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  e 500 ml de etanol. O etanol foi escolhido como solvente por ser um composto inerte e de fácil remoção após a síntese do produto. A mistura de reagentes passou por moagem em jarro de ágata, contendo corpos esféricos de alumina de diferentes tamanhos, seguindo as recomendações do fabricante (U.S. Stoneware, Youngstown, Ohio, EUA). Após o processo de moagem reativa, a mistura foi derramada em peneira de aço inoxidável coberta com filtro de papel, para que o etanol fosse totalmente removido por evaporação. O pó seco foi moído grosseiramente em almofariz com pistilo de ágata (Jung, LF0612, Blumenau, Santa Catarina, Brasil) e calcinado.

A difratometria de raios-X foi realizada para identificar fases cristalinas por meio de um equipamento Philips X'Pert (PANalytical, Almelo, Holanda). A fonte de radiação foi semelhante à linha Cu-K $\alpha$  ( $\lambda=0,15141$  nm), com 40 kV e 30 mA. A análise foi feita continuamente em regulagem 2-teta de 0 a 100° com passo de 0,02°, e um tempo contínuo de 2 segundos (s) por passo. Os parâmetros de rede do pó resultante foram analisados por difração de raios-X (DRX) (Philips X'pert). A morfologia da partícula e a presença de aglomerados foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplada à espectroscopia de raios-X por energia dispersiva (MEV/EDS) (JEOL JSM-6510LV, Tóquio, Japão).

### 2.2. Processamento dos *scaffolds*

Os *scaffolds* foram confeccionados pelo método da replica utilizando como padrão esponjas de poliuretano com 45 poros por polegada (*pores per inch* - ppi) e uma suspensão cerâmica de  $\beta$ -TCP (barbotina)<sup>27</sup>. O método da replica consiste na imersão de uma esponja polimérica em uma suspensão cerâmica, resultando em uma estrutura

porosa revestida com o material cerâmico. Propriedades reológicas adequadas são necessárias para assegurar o recobrimento do *scaffold*, uma vez que o fluido precisa escoar quando uma tensão de cisalhamento é aplicada para a remoção do excesso de barbotina da estrutura porosa. Após secagem, o conjunto foi submetido a tratamento térmico a fim de remover a esponja polimérica (pirólise) e sinterizar o pó cerâmico. O resultado desse processo é uma replica em cerâmica da esponja polimérica usada como padrão.

Nesse estudo, a barbotina era composta de 57 % em peso (wt) de H<sub>2</sub>O, 43 % wt de  $\beta$ -TCP, e os seguintes aditivos: 2 % wt de carboximetil celulose (1922 EMFAL, Betim, Minas Gerais, Brasil), 3 % wt de álcool polivinílico (P1763 Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e 3 % wt de ácido cítrico (A1026.01.AH, Synth, Diadema, São Paulo, Brasil). Estes compostos foram misturados em um jarro de bolas revestido com ágata (U.S. Stoneware, Youngstown, Ohio, EUA), a 300 rotações por minuto (rpm) por 1 hora (h). O comportamento reológico de todos os componentes da barbotina foi avaliado diretamente após o processo de moagem, em um cilindro de rotação coaxial (SV2P) por meio de um viscosímetro (HAAKE™ Viscotester™ 550, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Baden-Württemberg, Alemanha) a uma taxa de cisalhamento de 1/s de 0 até 600 Pa e, então, de 600 a 0 Pa, a temperatura ambiente (25 °C). Após imersão da esponja polimérica na suspensão de  $\beta$ -TCP, as amostras foram secas ao ar por 24 hs antes do tratamento térmico. Uma taxa de aquecimento de 1 °C/min foi aplicada para degradar lentamente a esponja polimérica mantendo a estrutura do *scaffold* e evitando resíduos de queima incompleta<sup>6</sup>.

### 2.3. Recobrimento dos *Scaffolds* de $\beta$ -TCP com polímero

As amostras de *scaffolds* cerâmicos foram divididas em quatro grupos (A, B, C e D). Amostras do grupo B foram recobertas com 0,5% de colágeno tipo I de origem porcina (Collagen Research Institute, Kiel, Schleswig-Holstein, Alemanha) dissolvido em água destilada. Amostras dos grupos C e D foram recobertas com 0,5% de PLDLA dissolvido em clorofórmio (Proquímios, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As coberturas poliméricas foram depositadas nos arcabouços cerâmicos pelo método do revestimento por imersão (*dip coating*) em uma solução a 2% de cada polímero. Após imersão, as amostras foram secas em temperatura ambiente antes de cada repetição do processo de *dip coating*. Amostras dos grupos B e C foram imersas duas vezes enquanto as amostras do

grupo D foram imersas 10 vezes. Amostras do grupo A (grupo controle) não foram recobertas.

A porosidade total dos *scaffolds* foi mensurada utilizando gravimetria, de acordo com a Equação 2:

$$\text{Porosidade (\%)} = (1 - \rho_{app}/\rho_{th}) \times 100 \quad (2)$$

onde  $\rho_{th}$  é a densidade teórica do material, obtida por combinação entre o peso molecular e o volume celular unitário, e  $\rho_{app}$  é a densidade aparente, obtida através da divisão do peso pelo volume geométrico.

#### 2.4. Ensaios mecânicos

A resistência à compressão dos *scaffolds* foi obtida por meio de teste de compressão a uma taxa de 1 mm/min, usando uma célula de carga de 100 N de capacidade (DL3000, EMIC, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil). Os ensaios foram realizados a 23 °C utilizando uma máquina de ensaios universal (Instron 8874, Boston, Massachusetts, EUA). Os espécimes ( $n = 5$  para cada grupo) foram posicionados verticalmente na base da máquina de testes e submetidos a uma carga compressiva axial até a sua fratura. As curvas de tensão compressiva foram obtidas usando o *software* Trapezium (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) e os valores de força compressiva foram calculados através da equação  $F/w$ , onde  $F$  é a carga máxima durante a fratura e  $w$  a área de secção transversal do espécime<sup>54</sup>.

#### 2.5. Microscopia eletrônica de varredura

Os *scaffolds* foram desidratados por meio de banhos sequenciais de etanol (50, 70, 80, 90 e 100%) e, então, foram incluídos em resina histológica a base de metilmetacrilato. Depois, as amostras foram seccionadas em fatias (*slices*) com 100 µm de espessura em um micrótomo de precisão (EXAKT 300/310 CP, Norderstedt, Schleswig-Holstein, Alemanha). As amostras de cada grupo foram recobertas com Ag-Pd e observadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV, JEOL JSM-6390LV, Peabody, Massachusetts EUA) acoplado a aparato de espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDX, JEOL JSM-6390LV). As análises foram realizadas em elétrons secundários e retroespalhados a 15 kV. O *software* Adobe Photoshop (Adobe Systems Software, Dublin, Irlanda) foi utilizado para analisar as imagens em preto e branco, com o preto representando os poros e o branco

representando o material sólido. A porosidade percentual foi quantificada por meio do *software* ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA).

## 2.6. Análise estatística

Os resultados foram estatisticamente analisados através do teste ANOVA com um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) por meio do *software* SPSS 17.0 para Windows (Windows Corporation, Chicago, Illinois, EUA). Além disso, análise de Tukey foi aplicada para comparação entre grupos.

## 3. Resultados

### 3.1. Caracterização química, reológica e microscópica do pó

A difração de raios-X e as imagens de MEV do pó de  $\beta$ -TCP, assim como a reologia da barbotina, estão representadas na Figura 1. Como visto em Fig. 1A, a DRX do pó cerâmico confirmou a presença de  $\beta$ -TCP, de acordo com os dados da literatura<sup>10</sup>. As análises de MEV do pó mostraram partículas em escala nanométrica dispostas em aglomerados (Fig. 1B). A análise de EDS revelou a presença de cálcio e fósforo (Fig. 1C). A barbotina mostrou comportamento pseudoplástico, diminuindo sua viscosidade quando estresses de cisalhamento estão aumentados (Fig. 1D). Tal comportamento é desejável no método da replica, uma vez que a barbotina que oclui os poros pode ser removida durante a compressão da amostra, enquanto a aderência da suspensão cerâmica à estrutura é mantida quando o estresse cessa.

### 3.2. Testes mecânicos

Os valores médios de resistência à compressão nos *scaffolds* de  $\beta$ -TCP recobertos com 10 camadas de PLDLA (ver Fig. 2) foram significativamente maiores que aqueles encontrados nos outros grupos ( $p < 0,05$ ). Os valores médios mais altos de resistência à compressão registrados foram do grupo de *scaffolds* recobertos com 10 camadas de PLDLA (grupo D), com valores de  $0,11 \pm 0,054$  MPa. Os *scaffolds* recobertos com duas camadas de PLDLA (grupo C) apresentaram uma força de resistência à compressão de, em média,  $0,025 \pm 0,015$  MPa, enquanto os *scaffolds* recobertos com duas camadas de colágeno (grupo

B) apresentaram um valor médio de resistência à compressão de  $0,022 \pm 0,012$  MPa. As amostras de  $\beta$ -TCP não recobertas (grupo A) revelaram um valor médio de resistência à compressão de  $0,024 \pm 0,012$  MPa.

### 3.3. Análise morfológica dos *scaffolds*

As imagens de MEV dos *scaffolds* obtidas por elétrons retroespalhados estão nas Figuras 3 e 4. A rede de poros interconectados do padrão de poliuretano foi bem replicada, com pouquíssimas obstruções dos poros, como visto na Figura 3. Os arcações cerâmicos sinterizados mantiveram a estrutura original e o formato dos poros da esponja padrão. O tamanho do macroporo esférico da esponja com 45 ppi (~1000  $\mu\text{m}$ ) resultou em estruturas com um tamanho médio de poro de 738  $\mu\text{m}$  (Fig. 3A). Contudo, os *scaffolds* recobertos com 10 camadas de PLDLA revelaram um tamanho de poro entre 200 e 400  $\mu\text{m}$  (Figuras 3D e 4). Todas as estruturas porosas formaram uma rede de poros altamente interconectada (Figuras 3 e 4). A porosidade média dos *scaffolds* de  $\beta$ -TCP sem recobrimento foi de 86 %, enquanto os *scaffolds* recobertos com 10 camadas de PLDLA tiveram uma porosidade média de 44,6%.

## 4. Discussão

Esse estudo objetivou avaliar tanto a rota de síntese do pó de  $\beta$ -TCP quanto a morfologia e resistência mecânica de *scaffolds* compostos de  $\beta$ -TCP e dois diferentes polímeros: colágeno e PLDLA. Os resultados do presente estudo rejeitam a hipótese nula. Foi possível observar que os *scaffolds* de  $\beta$ -TCP sintetizados pelo método da réplica apresentaram uma estrutura porosa interconectada de tamanho e morfologia de poro adequados. Adicionalmente, o recobrimento dos *scaffolds* de  $\beta$ -TCP com PLDLA aumentou significativamente a resistência mecânica das estruturas porosas ( $p < 0,05$ ).

Neste estudo, a composição química utilizada para sintetizar os *scaffolds* foi baseada em estudos *in vitro* e *in vivo*, considerando a biocompatibilidade e a reparação óssea<sup>6,13-15,20,22,23,25,28</sup>. Diversos materiais cerâmicos compostos de Ca/P têm sido empregados na reparação do tecido ósseo com resultados previsíveis<sup>6,9,11-15,17,18,20,22,23,25,28</sup>. Cerâmicas semelhantes às apatitas, como o  $\beta$ -TCP, estão disponíveis comercialmente devido às suas excelentes

osteocondutividade e biodegradabilidade. Porém, a busca por um substituto ósseo sintético biodegradável levou os clínicos e a comunidade científica a considerar os *scaffolds* cerâmicos como uma possibilidade factível<sup>2,4,6,8,9,11-20,23,25,28</sup>.

Nos *scaffolds* de  $\beta$ -TCP sintetizados neste estudo, a porosidade em torno de 86% e o tamanho de poro de 738  $\mu\text{m}$  em média (Fig. 3) estão apropriados para a angiogênese, a migração celular e o crescimento ósseo, de acordo com estudos anteriores<sup>1,4,5,8,12-18,20,23,25,26,28</sup>. *Scaffolds* recobertos com 10 camadas de PLDLA mostraram uma porosidade em torno de 44,6% e um tamanho médio de poro de 200-400  $\mu\text{m}$  e, portanto, revelando uma estrutura porosa interconectada (Figures 3D e 4). Dependendo do método de confecção, os *scaffolds* podem apresentar uma porosidade entre 50 e 80% e um tamanho de poro entre 100 e 800  $\mu\text{m}$ <sup>6,8,13-16,18,20,23,28</sup>. Uma rede interconectada de micro e macroporos é criticamente importante para induzir o crescimento ósseo dentro da estrutura. A habilidade de reter o coágulo sanguíneo através do arcabouço proporciona um caminho por onde células osteogênicas podem migrar (osteocondução). De fato, *scaffolds* precisam de uma arquitetura 3D que mimetize o osso trabecular natural humano<sup>4,6,8,9,11-18,20,22,23,25,26,28</sup>. O osso trabecular formado após a degradação do arcabouço permite a carga funcional e a instalação de implantes dentários<sup>8</sup>.

Apesar da porosidade e do tamanho do poro facilitarem o crescimento ósseo, estes afetam negativamente as propriedades mecânicas dos *scaffolds*, como encontrado no presente estudo (Fig. 2) e na literatura<sup>15</sup>. Um comportamento mecânico adequado é importante, desde a manipulação durante o procedimento cirúrgico até a aplicação da carga após adaptação do arcabouço no defeito ósseo<sup>6,15,23</sup>. Assim, *scaffolds* para procedimentos de reparação óssea precisam resistir à compressão, tanto dos tecidos moles quanto das forças oclusais da mastigação<sup>8,23,28</sup>. Neste estudo, o PLDLA foi utilizado como material de cobertura para a estrutura cerâmica, aumentando a resistência à compressão do *scaffold* (Fig. 2). Os grupos com recobrimento por PLDLA (grupos C e D) mostraram uma resistência à compressão significativamente maior do que a de *scaffolds* sem PLDLA ( $p < 0,05$ ). O aumento significativo na resistência à compressão registrado por *scaffolds* recobertos com uma espessa camada de PLDLA (grupo D) deve ser evidenciado neste estudo. Isso indica a influência da espessura polimérica no aumento da resistência mecânica das estruturas porosas. Essa tendência de melhora nas propriedades mecânicas aparentemente poderia ocorrer com outros polímeros, como o colágeno deste estudo, se

mais imersões poliméricas fossem realizadas. Ainda assim, o uso deste biomaterial estaria restrito aos enxertos *inlay*, como cavidades de alvéolos pós-extração e seio maxilar. Os valores de resistência à compressão ainda estão muito aquém daqueles do osso trabecular (entre 2 e 10 MPa)<sup>22</sup>, minimamente desejáveis para enxertos *onlay*.

*Scaffolds* compostos de fases cerâmica e polimérica combinam propriedades desejáveis de ambos os materiais para alcançar um efeito sinérgico nas propriedades resultantes do arcaço<sup>8,13,14,18,20,23,25,28</sup>. De fato, *scaffolds* baseados em  $\beta$ -TCP recobertos com polímeros bioabsorvíveis são uma nova estratégia para obtenção de uma boa resistência mecânica, mantendo a alta biocompatibilidade, biodegradabilidade e osteocondutividade. A estrutura formada pelas fases cerâmica e polimérica que se interpenetram é provavelmente responsável pelo fortalecimento do *scaffold*. A infiltração do polímero nos microporos e microfissuras formadas na estrutura cerâmica reduz a propagação de trincas durante a carga<sup>19</sup>. Outro mecanismo que pode fornecer resistência aos *scaffolds* é a “união de fissuras”, fenômeno similar ao *crack bridging*, uma vez que o polímero pode deformar de forma elástica evitando a abertura da fissura<sup>14,21</sup>. Miao et al.<sup>20</sup> (2008) indicou que a resistência à compressão do *scaffold* de HA/ $\beta$ -TCP recoberto com PLGA era maior (0,6 MPa) do que aquela registrada em *scaffolds* livres de polímero (0,05 MPa). Kang et al.<sup>14</sup> (2011) também apontou uma melhora significativa no desempenho mecânico de *scaffolds* porosos de  $\beta$ -TCP recobertos com PLGA.

Recentemente, polímeros naturais como o colágeno têm sido estudados como material de recobrimento de *scaffolds* cerâmicos, melhorando suas características biológicas para procedimentos de aumento do tecido ósseo. Alcaide et al.<sup>2</sup> (2010) mostrou que *scaffolds* de HA/agarose recobertos com colágeno tipo I estimularam a adesão de osteoblastos e, ainda, diminuíram a morte celular programada. No presente estudo, *scaffolds* cerâmicos recobertos com colágeno (grupo B) foram avaliados em relação à resistência mecânica. Apesar do colágeno não ter demonstrado influência alguma na resistência à compressão dos *scaffolds* (acredita-se que este fato derive da pouca incorporação de camadas poliméricas), ele poderia acelerar a reparação óssea, melhorando a biointegração, a migração celular e a angiogênese.

## 5. Conclusão

Por meio desse estudo, pode-se concluir que *scaffolds* de  $\beta$ -TCP sintetizados pelo método da réplica mostraram uma estrutura adequada,

com morfologia e tamanho de poros em uma rede interconectada compatível para o uso como substituto ósseo, supostamente utilizável como enxerto *inlay*. Além disso, o recobrimento de *scaffolds* de  $\beta$ -TCP com polímeros bioabsorvíveis como o PLDLA é um método vantajoso para aumentar a resistência mecânica de materiais cerâmicos porosos. Apesar de melhorar a migração celular, a organização vascular e, conseqüentemente, a reparação óssea, o recobrimento com colágeno não demonstrou benefício mecânico algum para a estrutura do *scaffold* no presente estudo. Novos estudos devem abordar o efeito sinérgico da combinação de polímeros bioabsorvíveis sintéticos e naturais na migração celular e no aumento do tecido ósseo *in vivo*.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem o apoio financeiro da CAPES e do CNPq.

### **Referências**

1. Acoccella A, Bertolai R, Colafranceschi M, Sacco R. Clinical, histological and histomorphometric evaluation of the healing of mandibular ramus bone block grafts for alveolar ridge augmentation before implant placement. *J Craniomaxillofac Surg.* 2010;38:222-230.
2. Alcaide M, Serrano MC, Roman J, Cabañas MV, Peña J, Sánchez-Zapardiel E, et al. Suppression of anoikis by collagen coating of interconnected macroporous nanometric carbonated hydroxyapatite/agarose scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2010;95(3):793-800.
3. Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol.* 2005;32(2):212-8.
4. Binyamin G, Shafi BM, Mery CM. Biomaterials: A primer for surgeons. *Semin Pediatr Surg.* 2006;15(4):276-83.
5. Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1983;(174):28-42.
6. Chen F-M, Jin Y. Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16(2):219-55.
7. Colombo P. Conventional and novel processing methods for cellular ceramics. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* 2006;364:109-24.
8. Davies JE, Matta R, Mendes CV, Perri de Carvalho PS. Development, characterization and clinical use of a biodegradable

- composite scaffold for bone engineering in oro-maxillo-facial surgery. *Organogenesis*. 2010;6(3):161-6.
9. Do AV, Khorsand B, Geary SM, Salem, AK. 3D printing of scaffolds for tissue regeneration applications. *Adv Healthc Mater*. 2015;4(12): 1742-62.
  10. Frondel C. Mineralogy of the Calcium Phosphates in Insular Phosphate Rock. *Am Mineral*. 1943;28:215-32.
  11. Gazdag A, Lane J, Glaser D, Forster R. Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications. *J Am Acad Orthop Surg*. 1995;3(1):1-8.
  12. Habibovic P, Barralet JE. Bioinorganics and biomaterials: Bone repair. *Acta Biomater*. 2011;7(8):3013-26.
  13. Horowitz RA, Mazor Z, Miller RJ, Krauser J, Prasad HS, Rohrer MD. Clinical evaluation of alveolar ridge preservation with a  $\beta$ -tricalcium phosphate socket graft. *Compend Contin Educ Dent*. 2009;30(9):588-604.
  14. Kang Y, Scully A, Young DA, Kim S, Tsao H, Sen M, et al. Enhanced mechanical performance and biological evaluation of a PLGA coated  $\beta$ -TCP composite scaffold for load-bearing applications. *Eur Polym J*. 2011;47(8):1569-1577.
  15. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005;26(27):5474-91.
  16. Kido HW, Tim CR, Bossoni PS, Parizotto NA, de Castro CA, Crovace MC, et al. Porous bioactive scaffolds: characterization and biological performance in a model of tibial bone defect in rats. *J Mater Sci Mater Med*. 2015;26(2):74.
  17. LeGeros RZ. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem Rev*. 2008;108(11):4742-53.
  18. Liu Y, Lim J, Teoh SH. Review: Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering. *Biotechnol Adv*. 2013;31(5):688-705.
  19. Martínez-Vásquez FJ, Perera FH, Miranda P, Pajares A, Guiberteau F. Improving the compressive strength of bioceramic robocast scaffolds by polymer infiltration. *Acta Biomater*. 2010;6(11):4361-8.
  20. Miao X, Tan DM, Li J, Xiao Y, Crawford R. Mechanical and biological properties of hydroxyapatite/tricalcium phosphate scaffolds coated with poly(lactic-co-glycolic acid). *Acta Biomater*. 2008;4(3):638-45.
  21. Nalla RK, Kinney JH, Ritchie RO. Mechanical fracture criteria for the failure of human cortical bone. *Nat Mater*. 2003;2:164-68.

22. Okamoto M, John B. Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds. *Prog Polym Sci.* 2013;38:1487–503.
23. Philippart A, Boccaccini AR, Fleck C, Schubert DW, Roether JA. Toughening and functionalization of bioactive ceramic and glass bone scaffolds by biopolymer coatings and infiltration: a review of the last 5 years. *Expert Review of Medical Devices.* 2015;12(1):93–111.
24. Rodrigues DS, Buciumeanu M, Martinelli AE, Nascimento RM, Henriques B, Silva FS, et al. Mechanical Strength and Wear of Dental Glass-Ionomer and Resin Composites Affected by Porosity and Chemical Composition. *J Bio Tribo Corros.* 2015;1:24.
25. Samavedi S, Whittington AR, Goldstein AS. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomater.* 2013;9(9):8037–45.
26. Schroeder JE, Mosheiff R. Tissue engineering approaches for bone repair : Concepts and evidence. *Injury.* 2011;42(6):609–13.
27. Schwartzwalder K, Somers AV. Method of making porous ceramics articles. Patent. US Pat. No. 3 090 094, May 21, 1963.
28. Shimauchi H, Nemoto E, Ishihata H, Shimomura M. Possible functional scaffolds for periodontal regeneration. *Japanese Assoc Dental Sci.* 2013;49(4):118-130.
29. Tessier P, Kawamoto H, Matthews D, Posnick J, Raulo Y, Tulasne JF, et al. Autogenous bone grafts and bone substitutes--tools and techniques: I. A 20,000-case experience in maxillofacial and craniofacial surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2005;116(5 Suppl):6S – 24S; discussion 92S – 94S.

## Figuras

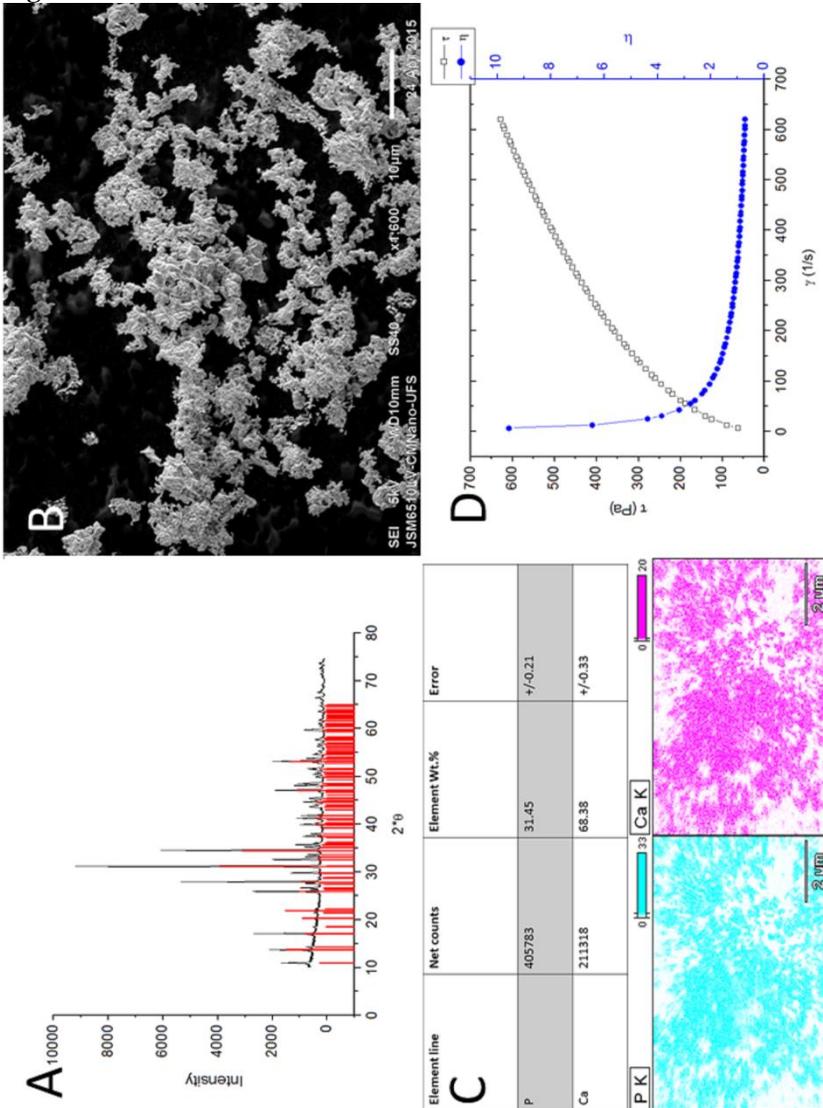


Figura 1. (A) Difração de raios-X padrão de  $\beta$ -TCP. Radiação Cu-K $\alpha$  (1.54056 Å), taxa de varredura de 1.5°min<sup>-1</sup>, voltagem de 40 kV e corrente de 30 mA. (B) Micrografia de MEV das partículas de pó obtidas no modo de elétrons secundários a 15 kV. (C) Mapa de EDX do pó de  $\beta$ -TCP. (D) Comportamento reológico da suspensão de  $\beta$ -TCP.

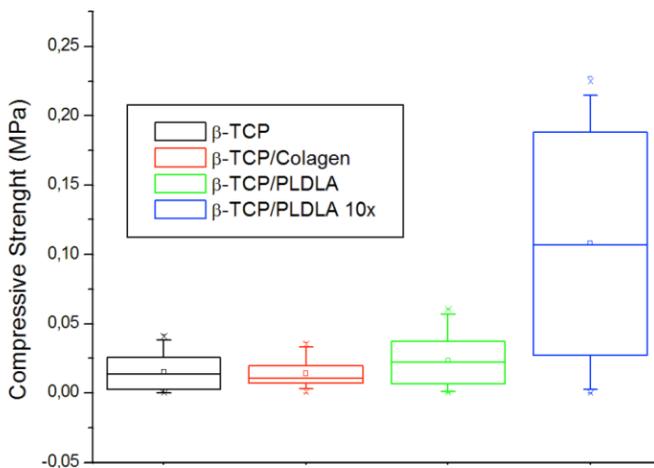


Figura 2. Valores médios de resistência à compressão registrados nos *scaffolds* de  $\beta$ -TCP recobertos com PLDLA (2 e 10 imersões), colágeno (2 imersões) e sem recobrimento.

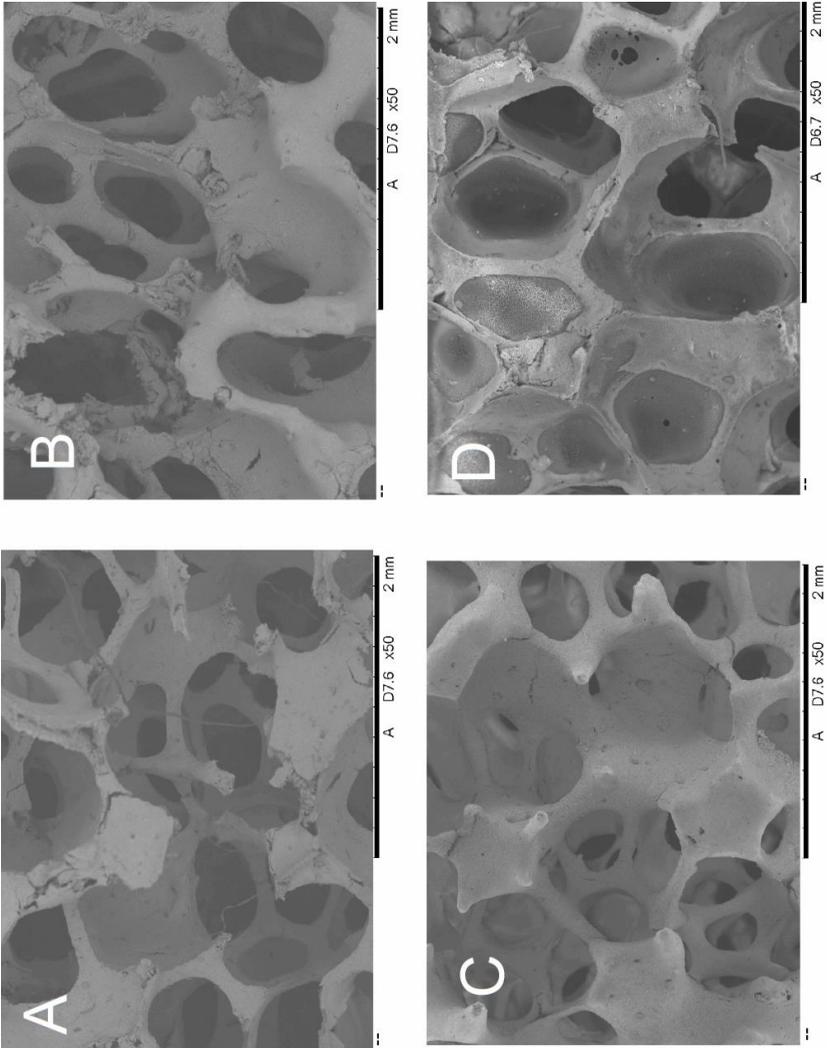


Figura 3. Imagens de MEV dos *scaffolds*. (A) *Scaffold* de  $\beta$ -TCP sem recobrimento. *Scaffold* de  $\beta$ -TCP recoberto com duas camadas de colágeno (B) ou PLDLA (C). (D) *Scaffold* de  $\beta$ -TCP recoberto com 10 camadas de PLDLA.

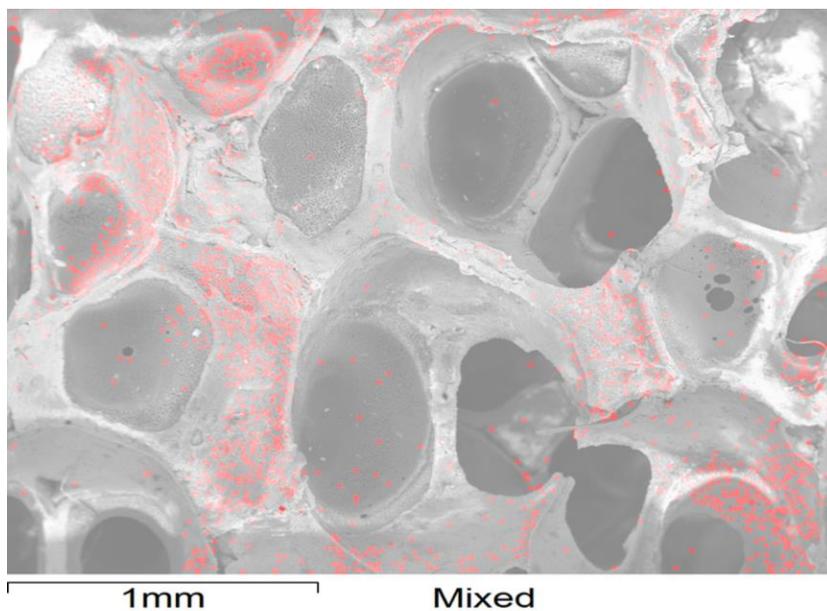


Figura 4. *Scaffold* de  $\beta$ -TCP recoberto com 10 camadas de PLDLA. Mapeamento por EDX (área vermelha) indicando a presença de PLDLA.



**ARTICLE – ENGLISH VERSION**

**SYNTHESIS OF  $\beta$ -TCP POWDERS AND CHARACTERIZATION  
OF  $\beta$ -TCP SCAFFOLDS COATED WITH BIOABSORBABLE  
POLYMERS FOR BONE REPARATION**

This article is formatted on standards of the journal *Journal of Applied  
Oral Science*



## **Synthesis of $\beta$ -TCP powders and characterization of $\beta$ -TCP scaffolds coated with bioabsorbable polymers for bone reparation**

Isadora S. Deschamps<sup>1</sup>, Gabriel L. Magrin<sup>2</sup>, Bruno A. P. C. Henriques<sup>1</sup>, Aguedo Aragonés<sup>2</sup>, Ricardo S. Magini<sup>2</sup>, Márcio C. Fredel<sup>1</sup>, Cesar A. M. Benfatti<sup>2</sup>, Júlio C. M. Souza<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ceramic and Composite Materials Research Laboratories (CERMAT), Department of Mechanical Engineering (EMC), Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 88040-900, Santa Catarina, Brazil

<sup>2</sup> Center of Education and Research on Dental Implants (CEPID), Post-Graduation Program in Dentistry (PPGO), Department of Dentistry (ODT), Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 88040-900, Santa Catarina, Brazil

### **Corresponding author details:**

Gabriel Leonardo Magrin, DDS

Center of Education and Research on Dental Implants (CEPID), Post-Graduation Program in Dentistry (PPGO), Department of Dentistry (ODT), Federal University of Santa Catarina (UFSC)

Campus Trindade, s/n, Trindade, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

Zip code: 88040-900

Tel/Fax: +55 48 3721-9077

e-mail: glmagrin@gmail.com

## Abstract

The purpose of this study was to evaluate the synthesis of beta phase tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) powder and mechanical properties of scaffolds composed of  $\beta$ -TCP coated with bioabsorbable polymers, namely collagen and poly D,L-lactic acid (PDLLA).  $\beta$ -TCP powder was obtained by reactive milling and then characterized by X-ray diffraction and scanning electron microscopy (SEM/EDS).  $\beta$ -TCP scaffolds were obtained by replica method, in which polyurethane foams are immersed in  $\beta$ -TCP suspension and thereafter submitted to a thermal treatment to remove the polyurethane and sinter the ceramic. Type-I collagen or PDLLA were used to coat the  $\beta$ -TCP scaffolds by dip coating method. The scaffolds were separated in four groups depending on the coating material: non-coated (group A), double immersion in collagen (group B), double immersion in PDLLA (group C) and ten immersions in PDLLA (group D). Samples were characterized by compressive tests and SEM/EDS. Chemical and microscopic analyses revealed appropriate morphology of powder particles and scaffolds, with or without polymeric coatings. Scaffolds coated with PDLLA showed higher compressive strength (group D;  $0.11 \pm 0.054$  MPa/ group C;  $0.025 \pm 0.015$ ) than those of collagen (group B;  $0.022 \pm 0.012$  MPa) or non-coated groups (group A;  $0.024 \pm 0.012$  MPa). All the porous structures formed a highly interconnected pore network. The mean porosity  $\beta$ -TCP scaffolds free of coatings was around 86% and mean pore size of 738  $\mu\text{m}$ , while scaffolds coated with 10 layers of PDLLA had a mean porosity of about 44.6% and 200 to 400  $\mu\text{m}$  of pore size. The coating method of  $\beta$ -TCP with PDLLA revealed a potential strategy to increase mechanical strength of porous ceramic materials, given to the developed structure a clinical application as inlay bone graft.

**Keywords:** Bone Tissue Engineering. Dental Implants. Scaffolds. Bioceramics.

## 1. Introduction

After tooth loss, dimensional alterations take place on alveolar bone ridge, that result in complications for oral rehabilitation supported by dental implants<sup>3</sup>. In those situations, autogenous bone grafts are classically used due to their osteoconductive, bio-absorption and angiogenesis characteristics<sup>5,29</sup>. However, the need of a donor site for bone harvesting, increased surgical morbidity and high rates of bone remodeling leading to the development of alternative materials for atrophic alveolar ridge treatment<sup>1</sup>.

Synthetic bio-absorbable scaffolds have emerged as an interesting possibility, decreasing the surgical morbidity and therefore showing low rates of bone remodeling<sup>4,12,17,25,26</sup>. The porous three-dimensional (3D) structure of synthetic scaffolds stimulates growth, migration and differentiation of human cells for bone reparation. Such scaffolds should follow certain requirements, such as: possessing interconnected pores of proper size (100-500  $\mu\text{m}$  in diameter) to allow the integration and vascularization of the bone tissue; high wettability of the surface inducing cell adsorption and proliferation; controlled bio-integration and bio-absorption; adequate compressive strength ranging from 2 up to 10 MPa (a compressive strength comparable to cancellous bone); and industrial viability to be manufactured in specific shapes and sizes<sup>11,22</sup>.

Calcium phosphate (Ca/P) based bone substitutes such as hydroxyapatite (HA) and  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) have been safely used in dentistry<sup>6,12,17,18,25</sup>. Those ceramic scaffolds might have a proper pore size which mainly depends on the manufacture technique. Several methods have been used to generate porosity in scaffolds, namely: replica foaming, direct gas foaming, freeze casting, model subtraction, and, more recently, 3D printing<sup>9,15,18</sup>. Those graft materials have been shown to resorb fully, being replaced by bone over a period from 6 up to 10 months<sup>13</sup>. Even though ceramic scaffolds possess excellent biological behavior, their mechanical strength is low, especially because of the brittle porous structure. After sintering, a HA/ $\beta$ -TCP scaffold acquires compressive strength mean values of about 0.05 MPa<sup>14,20</sup>.

A large variety of polymer-based synthetic and natural biomaterials have been studied in the last years revealing good results<sup>18,20,22,23</sup>. The most common examples of polymers are named as follow: cellulose, collagen, polyvinyl alcohol (PVA), poly ( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL), poly(lactic acid) (PLA), poly(glycolic acid) (PGA), poly(hydroxyl butyrate) (PHB), poly(propylene fumarate)

(PPF), poly(lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA) and poly (D,L-lactic acid) (PDLA). They can be used as graft materials themselves or in association with metallic or ceramic structures<sup>6,18,22,23,28</sup>. Considering the degradation of those polymers in non-toxic components, PLA, PGA and their copolymers have been extensively used in the field of tissue engineering<sup>22</sup>. Additionally, those materials can be mixed with fragile structures to improve mechanical properties<sup>14,20,23</sup>. Also, antibiotics and growth factors can be embedded into polymeric structure to be released in bone tissue, providing a drug delivery capacity to the scaffold<sup>18,23</sup>.

Nowadays, the field of bone tissue engineering has investigated structures and materials that mimic human tissues properties. Bone is a complex tissue described as a natural composite of 70% hydroxyapatite (HA) and 30% collagen, possessing a natural functionally graded porous structure<sup>23</sup>. Thus, synthetic scaffolds for bone formation should have a similarly porous composite structure with interpenetrating ceramic and polymer phases<sup>20</sup>. Considering application, scaffolds are subjected to mechanical loads since their handling prior to bone placement up to osseointegration<sup>23</sup>. Thus, the scaffold structure must withstand loading applied by the surgeon during placement into the defect site. Also, load bearing capacity is important to maintain bone volume and avoid tissue remodeling after placement of the scaffold. This fact might be highlighted when applying graft materials for periodontal and peri-implant reparative therapies, once these materials can be under several mechanical stresses originated from occlusal forces<sup>28</sup>.

In fact, bone tissue engineering has experienced many challenges in the pursuit of a functionally scaffold for alveolar bone defects. The mechanical properties of the scaffolds during bone reparation are a clinical concern that can be overcome by using different materials. The purpose of this study was to synthesize an adequate  $\beta$ -TCP powder and to evaluate the compressive strength of  $\beta$ -TCP scaffolds coated with bioabsorbable polymers, namely PDLA and collagen, for alveolar and peri-implant reparation.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Synthesis and characterization of $\beta$ -TCP powders**

The  $\beta$ -TCP powder was synthesized by reactive milling using stoichiometric proportions as seen in Equation 1:



The dosage of the compounds was performed by gravimetric analysis (Bel, MARK210, Monza, Italy). Each synthesis route consisted of 30 g  $\text{CaCO}_3$ , 22 g  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  and 500 ml ethanol. Ethanol was selected as solvent due to its inertness to the compounds and easy removal after the synthesis. The mixture of compounds was milled in agate milling device, containing alumina milling bodies of different sizes, following company's recommendations (U.S. Stoneware, Youngstown, Ohio, USA). After the reactive milling process, the mixture was compacted into a stainless steel mold covered with filter paper up to the full evaporation of ethanol. The dry powder was then roughly milled in an agate mortar (Jung, LF0612, Blumenau, Santa Catarina, Brazil), and calcinated.

X-ray diffractometry was carried out to identify crystalline phases using a Philips X'Pert equipment (PANalytical, Almelo, Netherlands). The radiation source was  $K\alpha$  line of copper ( $\lambda=0.15141$  nm), with 40 kV and 30 mA. The scan was done continuously in 2-theta setting from 0 to 100° with step size of 0.02°, and a counting time of 2 seconds (s) per step. The lattice parameters of the resulting powders were measured by energy-dispersive X-ray diffraction (Philips X'pert). Particle morphology and presence of agglomerations were analyzed by scanning electron microscopy (SEM) coupled to energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDS) (JEOL USA JSM-6510LV, Tokyo, Japan).

## 2.2 Scaffold manufacturing

The scaffolds were manufactured by replica method using 45 pores per inch (ppi) polyurethane foam pattern and a  $\beta$ -TCP slurry<sup>27</sup>. The replica method consists on dipping a polymeric foam into a ceramic slurry resulting in a porous structure coated with the ceramic material. Proper rheological properties are required in order to ensure the coating, since the fluid must flow when shear stress is applied, to remove excess of fluid within the foam. After drying, the assembly was submitted to a thermal treatment to remove the polymeric foam and to sinter the ceramic powder. The result of the process is a ceramic replica from the polymeric foam pattern.

In this study, the ceramic slurry was composed of 57 %wt  $\text{H}_2\text{O}$ , 43 %wt  $\beta$ -TCP, and the following additives: 2 %wt carboxymethyl cellulose (1922 EMFAL, Betim, Minas Gerais, Brazil), 3 %wt Poly(vinyl alcohol) (P1763 Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

and 3 %wt citric acid (A1026.01.AH, Synth, Diadema, São Paulo, Brazil). Those components were mixed in the ball milling device (U. S. Stoneware, Youngstown, Ohio, USA), at 300 rpm for 1 h. The rheological behavior of all slurry components was evaluated directly after the milling process in a rotational coaxial cylinder (SV2P) using a viscometer (HAAKE™ Viscotester™ 550, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Baden-Württemberg, Germany) at shear rate of 1/s from 0 up to 600 Pa and then from 600 down to 0 Pa at room temperature (25 °C). After immersion of the polymeric foam in the  $\beta$ -TCP slurry, samples were air dried for 24 h prior to thermal treatment. The initial heating rate at 1 °C/min was performed to degrade slowly the polymeric foam maintaining the scaffold structure and to avoid residues of incomplete firing<sup>6</sup>.

### 2.3. $\beta$ -TCP scaffolds coated with bio-absorbable polymers

Ceramic scaffold samples were separated into four groups (A, B, C and D). Samples from group B were coated with 0.5% type I porcine collagen (Collagen Research Institute, Kiel, Schleswig-Holstein, Germany) dissolved in distilled water. Samples from group C and D were coated with 0.5% PDLA dissolved in chloroform (Proquímios, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). The polymer veneers were deposited on ceramic scaffolds by dip coating method into a solution of 2% of each polymer. After immersion, samples were dried at room temperature before each repetition of the dip coating process. Samples from the groups B and C were immersed twice while samples from group D were immersed 10 times. Samples in group A (control group) were not coated.

Total porosity of the scaffolds was measured using gravimetry, according to Equation 2:

$$\text{Porosity (\%)} = (1 - \rho_{app}/\rho_{th}) \times 100 \quad (2)$$

where  $\rho_{th}$  is the theoretical density of the material, obtained by combining the molecular weight with unit cell volume, and  $\rho_{app}$  is the apparent density, obtained by the weight divided by the geometrical measurement of the volume.

## 2.4. Compressive strength tests

The compressive strength of the scaffolds was obtained by compressive tests at a rate of 1 mm/min, using a load cell with 100 N capacity (DL3000, EMIC, São José dos Pinhais, Paraná, Brazil). The tests were performed at 23 °C using a universal testing machine (Instron 8874, Boston, Massachusetts, USA). Specimens ( $n = 5$  from each group) were positioned vertically on the testing machine base and subjected to axial compressive loading up to fracture. The compressive force curves were recorded using the Trapezium (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) software and the compressive strength values were calculated by using the equation  $F/w$ , whereas  $F$  is the maximum load at fracture and  $w$  cross section area of the specimen<sup>24</sup>.

## 2.5. Scanning electron microscopy

Scaffolds were dehydrated through a series of graded ethanol (50, 70, 80, 90 and 100%) and then were embedded in methyl methacrylate histological resin. After, they were cross-sectioned in 100  $\mu\text{m}$  thick slices using a precise cutting machine (EXAKT 300/310 CP, Norderstedt, Schleswig-Holstein, Germany). Samples on each group were sputter-coated with Ag-Pd and then inspected using scanning electron microscope (SEM, JEOL JSM-6390LV, Peabody, Massachusetts, USA) coupled to an energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX, JEOL JSM-6390LV). Analyses were performed at secondary and back-scattered electron mode at 15 kV. The software *Adobe Photoshop* (Adobe Systems Software, Dublin, Ireland) was used to analyze black and white images, with the black representing the pores and the white the bulk material. The porosity percentage was quantified by using *ImageJ* software (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

## 2.6. Statistical analyses

The results were statistically analyzed via two-way ANOVA at a significance level of  $p < 0.05$  by using the SPSS 17.0 software for Windows (Windows Co., Chicago, Illinois, USA). Also, Tukey's analysis was applied to compare groups.

### 3. Results

#### 3.1. Chemical, rheological and microscopic characterization of powders

X-ray diffraction and SEM images on  $\beta$ -TCP powders as well as rheology of ceramic slurry for scaffolds are shown in Figure 1. As seen in Fig. 1A, XRD analyses of the powder confirmed the presence of  $\beta$ -TCP in accordance with the database<sup>10</sup>. SEM analysis of the powder showed nano-scale particles disposed in agglomerates (Fig. 1B). EDS analysis revealed the presence of calcium and phosphor (Fig. 1C). The slurry showed a pseudoplastic behavior, decreasing its viscosity when shear stress was increased (Fig. 1D). Such behavior is desirable on the replica method, since the slurry which block the pores can be released during compression of the sample, while it can adhere to the struts when the stress is ceased.

#### 3.2. Compressive strength

The mean values of compressive strength recorded on the  $\beta$ -TCP scaffolds coated with 10 layers of PDLLA (see Fig. 2) were significantly higher than those recorded on the other groups ( $p < 0.05$ ). The highest mean values of compressive strength recorded on scaffolds coated with 10 layers of PDLLA (group D) were at  $0.11 \pm 0.054$  MPa. The scaffolds coated with double layer of PDLLA (group C) revealed compressive strength mean values of about  $0.025 \pm 0.015$  MPa while scaffolds coated with double layer of collagen (group B) showed compressive strength mean values at  $0.022 \pm 0.012$  MPa. The non-coated  $\beta$ -TCP scaffolds (group A) showed compressive strength mean values at  $0.024 \pm 0.012$  MPa.

#### 3.3. Morphological analyses of the scaffolds

SEM images of the scaffolds obtained by backscattered electrons are shown in Figures 3 and 4. The interconnected pore network of the polyurethane template was well replicated with very little blocking of the pores, as seen in Figure 3. The sintered ceramic foams maintained the original strut and pore shape of the template foam. The spherical macro pore size of previous 45 ppi ( $\sim 1000$   $\mu\text{m}$ ) resulted in structures with mean pore size at of about 738  $\mu\text{m}$  (Fig. 3A). However, the scaffolds coated with 10 layers of PDLLA revealed a pore size ranging

from 200 up to 400  $\mu\text{m}$  (Figures 3D and 4). All the porous structures formed a highly interconnected pore network (Figures 3 and 4). The mean porosity  $\beta$ -TCP scaffolds free of coatings was around 86% while scaffolds coated with 10 layers of PDLLA had a mean porosity of about 44.6%

#### 4. Discussion

This study aimed to evaluate the synthesis route of the  $\beta$ -TCP powder as well as the morphological and mechanical strength of  $\beta$ -TCP scaffolds, coated with two different polymers: collagen and PDLLA. The results of the present study support the rejection of the null hypothesis. Results showed that  $\beta$ -TCP scaffolds synthesized by the replica method provide proper size and morphology of the interconnected pore network. Additionally, the coating of the  $\beta$ -TCP scaffolds with PDLLA significantly increased the mechanical strength of the porous structures ( $p < 0.05$ ).

In this study, the chemical composition used to synthesize the scaffolds was based on *in vitro* and *in vivo* results concerning biocompatibility and bony repair<sup>6,13-15,20,22,23,25,28</sup>. Several ceramic materials composed of Ca/P have been used in bone tissue repair with predictable results<sup>6,9,11-15,17,18,20,22,23,25,28</sup>. Apatite-like ceramics such as  $\beta$ -TCP are commercially available due to their excellent osteoconductivity and biodegradability. However, the pursuit of a biodegradable synthetic bone substitute has led clinicians and the scientific community to look upon the ceramic scaffolds as a feasible possibility<sup>2,4,6,8,9,11-20,23,25,28</sup>.

On the  $\beta$ -TCP scaffolds synthesized in this study, the porosity around 86% and pore size at about 738  $\mu\text{m}$  (Fig. 3) are proper for angiogenesis, cellular migration and bone growth, as found in previous studies<sup>1,4,5,8,12-18,20,23,25,26,28</sup>. Scaffolds coated with 10 layers of PDLLA showed porosity around 44.6% and pore size at about 200-400  $\mu\text{m}$  and therefore revealing an interconnected pore network (Figures 3D and 4). Depending on manufacture method, scaffolds can display a porosity ranging from 50 up to 80% and a pore size ranging from 100 up to 800  $\mu\text{m}$ <sup>6,8,13-16,18,20,23,28</sup>. A network of interconnected micro and macro-sized pores is critically important to induce bone growth into the structure. The ability of retain blood clot throughout the scaffold provides a pathway where osteogenic cells can migrate (osteoconduction). In fact, scaffolds might have a 3D architecture that mimics natural human trabecular bone<sup>4,6,8,9,11-18,20,22,23,25,26,28</sup>. The trabecular bone left after the

degradation of the structure allows functional loading and a dental implant placement<sup>8</sup>.

Although increased porosity and pore size facilitate bone ingrowth, porosity negatively affects the mechanical properties of scaffolds<sup>15</sup> as found in the present study (Fig. 2). A proper mechanical behavior is important since the manipulation during the surgical procedure until loading after implantation in the bone defect<sup>6,15,23</sup>. Thus, scaffolds for bone augmentation procedures must resist to compression from soft tissues as well as occlusal stress from mastication<sup>8,23,28</sup>. In this study, PDLLA was used as coating material for the ceramic structure increasing the compressive strength of the scaffold (Fig. 2). The groups with PDLLA coating (groups C and D) revealed significantly higher compressive strength when compared to scaffolds free of PDLLA ( $p < 0.05$ ). The significant increase in compressive strength recorded for scaffolds coated with a thick layer of PDLLA (group D) should be highlighted in this study. That indicates the influence of the polymeric thickness on the compressive strength of the scaffold. This trend of improvement in the mechanical properties apparently could occur with other polymers, as collagen in this study, if more polymeric immersions were performed. Nevertheless, the use of this biomaterial would be restricted to inlay grafts, as well post extraction sockets and maxillary sinus. Compressive strength values are still well below those of cancellous bone (between 2 and 10 MPa)<sup>22</sup>, the least desirable for onlay grafts.

Scaffolds composed of polymer and ceramic phases combine desirable properties of both materials in order to achieve a synergistic effect on their resultant properties<sup>8,13,14,18,20,23,25,28</sup>. Indeed,  $\beta$ -TCP-based scaffolds coated with bioabsorbable polymers are a novel strategy to achieve good compressive strength, maintaining high biocompatibility, biodegradability and osteoconductibility. The interpenetrating structure formed is probably responsible for the strengthening of the scaffold. The infiltration of the polymer in micropores and microcracks forms layered structures that reduces the propagation of cracks on loading<sup>19</sup>. Another mechanism that can provide toughness to scaffolds is the "crack union", a phenomenon similar to crack bridging, once the polymer can present elastic deformation avoiding crack opening<sup>14,21</sup>. Miao et al.<sup>20</sup> (2008) stated that the compressive strength of HA/ $\beta$ -TCP scaffold coated with PLGA was higher (0.6 MPa) than that recorded on scaffolds free of polymer (0.05 MPa). Kang et al.<sup>14</sup> (2011) also pointed to a significant improvement on mechanical performance of porous  $\beta$ -TCP scaffolds coated with PLGA.

Recently, natural polymers such as collagen have been studied to coat ceramic scaffolds enhancing biological effects for bone augmentation. Alcaide et al.<sup>2</sup> (2010) showed that HA/agarose scaffolds coated with type-I collagen stimulated osteoblasts adhesion and therefore decreased the programmed cell death. In the present study, ceramic scaffolds coated with collagen (group B) were evaluated concerning mechanical strength. Even though the collagen has not shown any influence on the compressive strength of the scaffolds (it is believed that this fact derives from the low incorporation of polymeric layers), it could accelerate the bone reparation considering biointegration, cell migration and angiogenesis.

## 5. Conclusion

Within the limitations of this study, it can be concluded that  $\beta$ -TCP scaffolds synthesized by the replica method showed proper morphology and size of interconnected pores to be used as bone substitute, supposedly usable as inlay graft. Also, coating  $\beta$ -TCP scaffolds with biodegradable polymers such as PDLA is an advantageous method to increase mechanical strength of porous ceramic materials. Despite enhancing cell migration, vascular organization and consequent bone growth, collagen coating did not reveal mechanical benefits on the scaffold structure in the present study. Further studies should address the synergistic effect of combining synthetic and natural bioabsorbable polymers on cell migration and *in vivo* bone augmentation.

## Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support provided by CAPES and CNPq.

## References

1. Acoccella A, Bertolai R, Colafranceschi M, Sacco R. Clinical, histological and histomorphometric evaluation of the healing of mandibular ramus bone block grafts for alveolar ridge augmentation before implant placement. *J Craniomaxillofac Surg.* 2010;38:222-230.
2. Alcaide M, Serrano MC, Roman J, Cabañas MV, Peña J, Sánchez-Zapardiel E, et al. Suppression of anoikis by collagen coating of

- interconnected macroporous nanometric carbonated hydroxyapatite/ agarose scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2010;95(3):793-800.
3. Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*. 2005;32(2):212–8.
  4. Binyamin G, Shafi BM, Mery CM. Biomaterials: A primer for surgeons. *Semin Pediatr Surg*. 2006;15(4):276–83.
  5. Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res*. 1983;(174):28–42.
  6. Chen F-M, Jin Y. Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010;16(2):219–55.
  7. Colombo P. Conventional and novel processing methods for cellular ceramics. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2006;364:109-24.
  8. Davies JE, Matta R, Mendes CV, Perri de Carvalho PS. Development, characterization and clinical use of a biodegradable composite scaffold for bone engineering in oro-maxillo-facial surgery. *Organogenesis*. 2010;6(3):161-6.
  9. Do AV, Khorsand B, Geary SM, Salem, AK. 3D printing of scaffolds for tissue regeneration applications. *Adv Healthc Mater*. 2015;4(12): 1742-62.
  10. Frondel C. Mineralogy of the Calcium Phosphates in Insular Phosphate Rock. *Am Mineral*. 1943;28:215-32.
  11. Gazdag A, Lane J, Glaser D, Forster R. Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications. *J Am Acad Orthop Surg*. 1995;3(1):1–8.
  12. Habibovic P, Barralet JE. Bioinorganics and biomaterials: Bone repair. *Acta Biomater*. 2011;7(8):3013–26.
  13. Horowitz RA, Mazor Z, Miller RJ, Krauser J, Prasad HS, Rohrer MD. Clinical evaluation of alveolar ridge preservation with a  $\beta$ -tricalcium phosphate socket graft. *Compend Contin Educ Dent*. 2009;30(9):588-604.
  14. Kang Y, Scully A, Young DA, Kim S, Tsao H, Sen M, et al. Enhanced mechanical performance and biological evaluation of a PLGA coated  $\beta$ -TCP composite scaffold for load-bearing applications. *Eur Polym J*. 2011;47(8):1569-1577.
  15. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005;26(27):5474-91.
  16. Kido HW, Tim CR, Bossoni PS, Parizotto NA, de Castro CA, Crovace MC, et al. Porous bioactive scaffolds: characterization and

- biological performance in a model of tibial bone defect in rats. *J Mater Sci Mater Med.* 2015;26(2):74.
17. LeGeros RZ. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem Rev.* 2008;108(11):4742–53.
  18. Liu Y, Lim J, Teoh SH. Review: Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering. *Biotechnol Adv.* 2013;31(5):688–705.
  19. Martínez-Vásquez FJ, Perera FH, Miranda P, Pajares A, Guiberteau F. Improving the compressive strength of bioceramic robocast scaffolds by polymer infiltration. *Acta Biomater.* 2010;6(11):4361-8.
  20. Miao X, Tan DM, Li J, Xiao Y, Crawford R. Mechanical and biological properties of hydroxyapatite/tricalcium phosphate scaffolds coated with poly(lactic-co-glycolic acid). *Acta Biomater.* 2008;4(3):638–45.
  21. Nalla RK, Kinney JH, Ritchie RO. Mechanical fracture criteria for the failure of human cortical bone. *Nat Mater.* 2003;2:164-68.
  22. Okamoto M, John B. Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds. *Prog Polym Sci.* 2013;38:1487–503.
  23. Philippart A, Boccaccini AR, Fleck C, Schubert DW, Roether JA. Toughening and functionalization of bioactive ceramic and glass bone scaffolds by biopolymer coatings and infiltration: a review of the last 5 years. *Expert Review of Medical Devices.* 2015;12(1):93–111.
  24. Rodrigues DS, Buciumeanu M, Martinelli AE, Nascimento RM, Henriques B, Silva FS, et al. Mechanical Strength and Wear of Dental Glass-Ionomer and Resin Composites Affected by Porosity and Chemical Composition. *J Bio Tribo Corros.* 2015;1:24.
  25. Samavedi S, Whittington AR, Goldstein AS. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomater.* 2013;9(9):8037–45.
  26. Schroeder JE, Mosheiff R. Tissue engineering approaches for bone repair : Concepts and evidence. *Injury.* 2011;42(6):609–13.
  27. Schwartzwalder K, Somers AV. Method of making porous ceramics articles. Patent. US Pat. No. 3 090 094, May 21, 1963.
  28. Shimauchi H, Nemoto E, Ishihata H, Shimomura M. Possible functional scaffolds for periodontal regeneration. *Japanese Assoc Dental Sci.* 2013;49(4):118-130.
  29. Tessier P, Kawamoto H, Matthews D, Posnick J, Raulo Y, Tulasne JF, et al. Autogenous bone grafts and bone substitutes--tools and techniques: I. A 20,000-case experience in maxillofacial and

craniofacial surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2005;116(5 Suppl):6S – 24S; discussion 92S – 94S.

## Figure captions

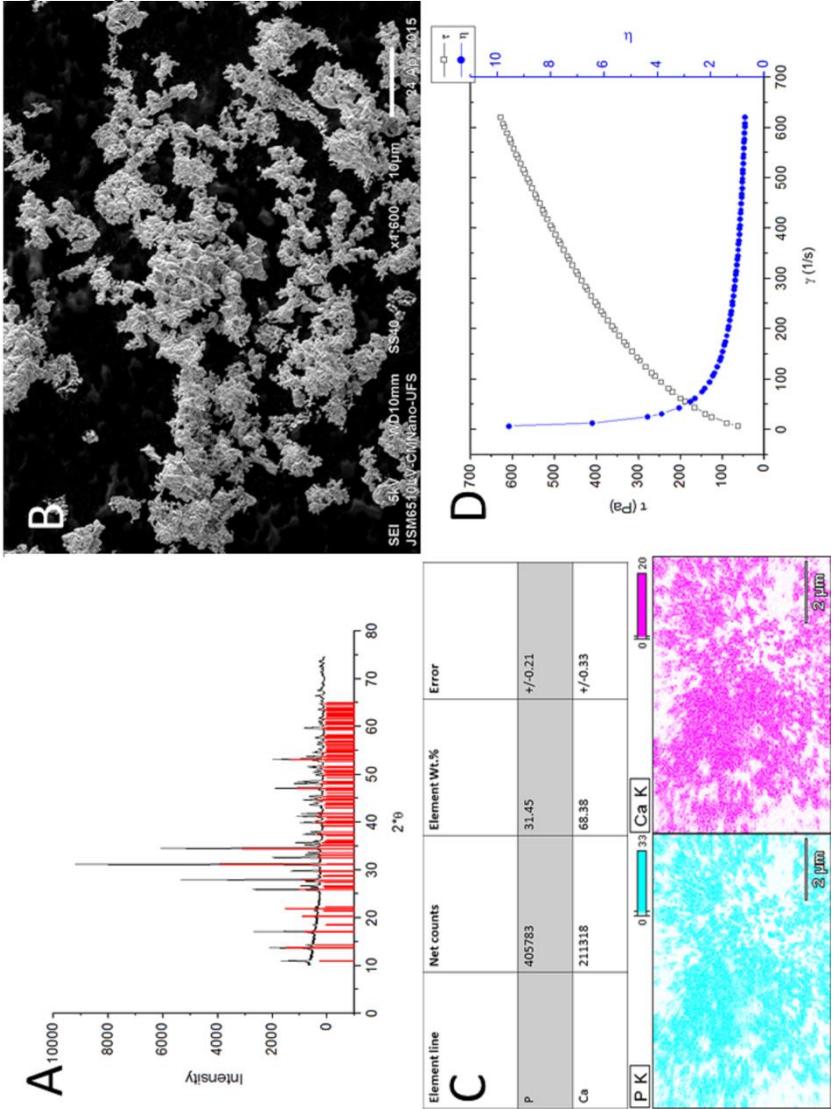


Figure 1. (A) X-ray diffraction patterns of  $\beta$ -TCP. Cu-K $\alpha$  radiation (1.54056 Å), scanning rate of 1.5°min<sup>-1</sup>, voltage of 40 kV and current of 30 mA. (B) SEM micrograph of the powder particles obtained by secondary electron mode at 15 kV. (C) EDX map of the  $\beta$ -TCP powder. (D) Rheological behavior of the  $\beta$ -TCP slurry.

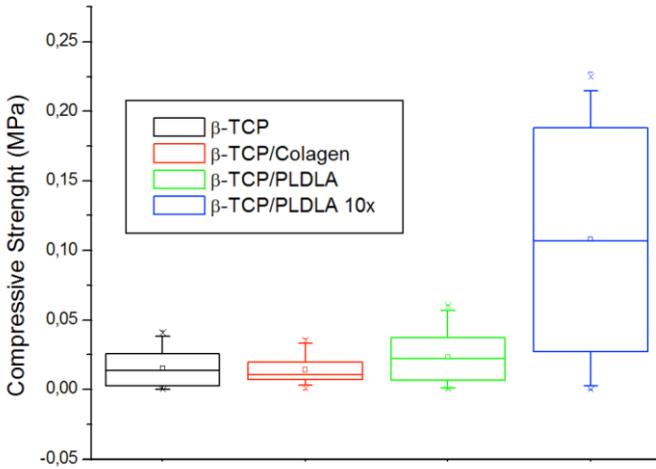


Figure 2. Mean values of compressive strength recorded on  $\beta$ -TCP scaffolds coated with PLDLA or collagen.

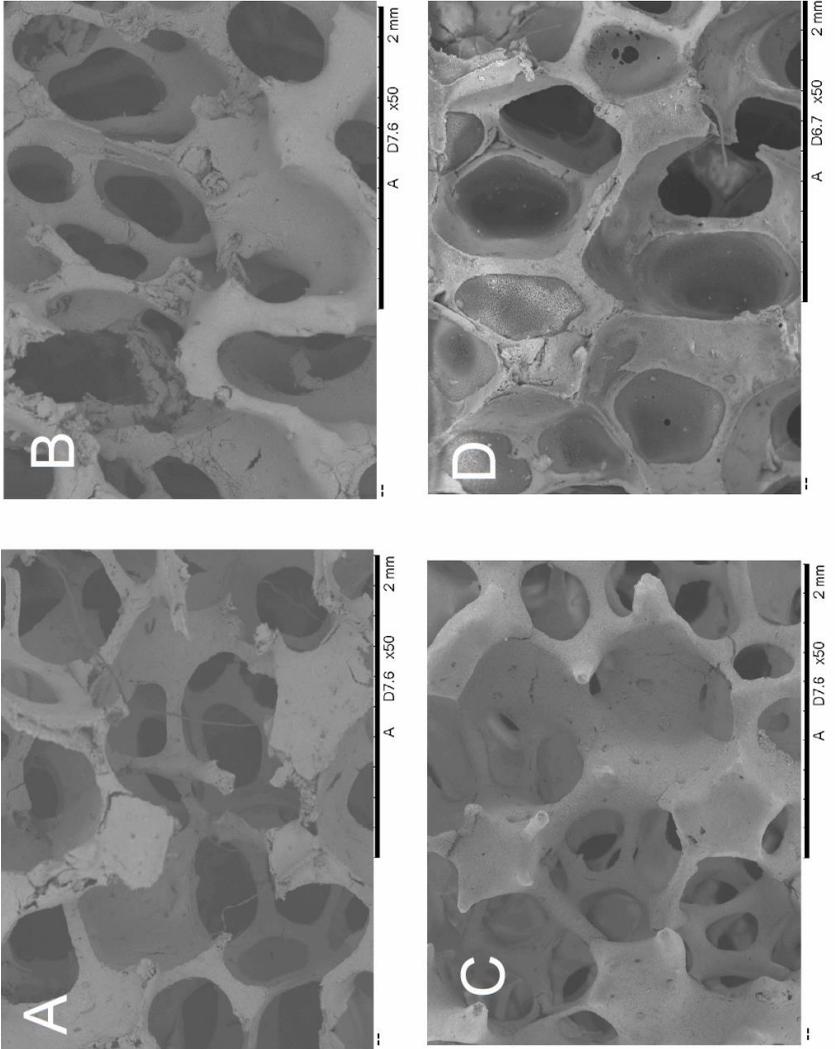


Figure 3. SEM images of the scaffolds. (A) Non coated  $\beta$ -TCP scaffold.  $\beta$ -TCP scaffold coated with double layer of (B) collagen or (C) PDLLA. (D)  $\beta$ -TCP scaffold coated with 10 layers of PDLLA.

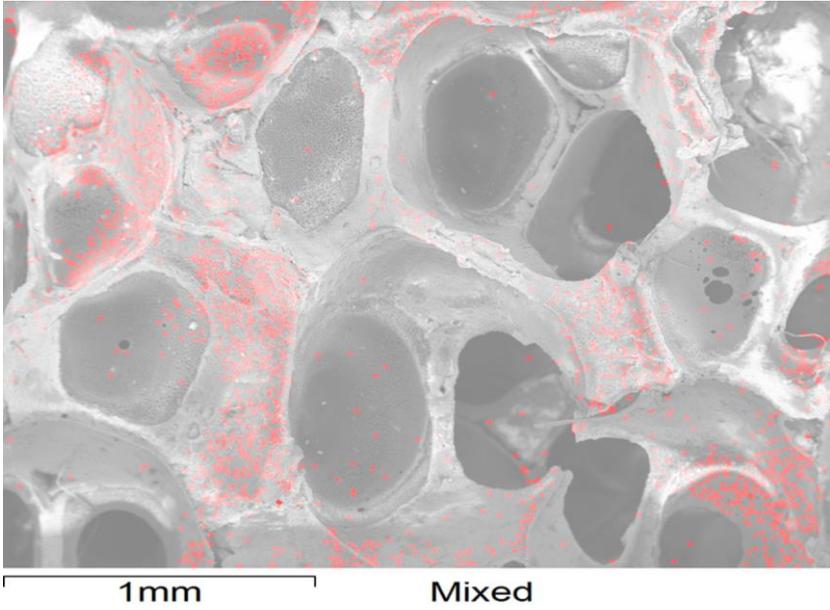


Figure 4.  $\beta$ -TCP scaffold coated with 10 layers of PDLLA. EDX mapping (red area) indicating the PDLLA composition.

### CAPÍTULO III



## REFERÊNCIAS

- Ackermann KL. Extraction site management using a natural bone mineral containing collagen: rationale and retrospective case study. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2009; 29:489-97.
- Acoccella A, Bertolai R, Colafranceschi M, Sacco R. Clinical, histological and histomorphometric evaluation of the healing of mandibular ramus bone block grafts for alveolar ridge augmentation before implant placement. *J Craniomaxillofac Surg.* 2010;38:222-230.
- Amler MH, Jhonson PL, Salman I. Histological and histochemical investigation of human alveolar socket healing in disturbed extraction wounds. *J Am Dent Assoc.* 1960;61: 46-48.
- Anderson JM. Biological responses to materials. *Ann Rev Materials Res.* 2001;31(1):81-110.
- Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol.* 2005;32: 212-218.
- Araújo MG, Lindhe J. Socket grafting with the use of autologous bone: an experimental study in the dog. *Clin Oral Impl Res.* 2011;22: 9-13.
- Arden RL, Burgio DL. Bone autografting of the craniofacial skeleton: Clinical and biological considerations. *Am J Otolaryngol.* 1992;13(6):328-41.
- Binyamin G, Shafi BM, Mery C. Biomaterials: a primer for surgeons. *Semin Pediatr Surg.* 2006;15:276-83.
- Boyan BD, Schwartz Z. Regenerative medicine: Are calcium phosphate ceramics “smart” biomaterials? *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7(1):8-9.
- Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1983(174):28-42.
- Caneva M, Botticelli D, Morelli F, Cesaretti G, Beolchini M, Lang NP. Alveolar process preservation at implants installed immediately into

extraction sockets using deproteinized bovine bone mineral – an experimental study in dogs. *Clin Oral Impl Res.* 2012;23:789-796.

Cardaropoli D, Cardaropoli G. Preservation of the postextraction alveolar ridge: A clinical and histologic study. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2008;5(28): 469 – 477.

Cardaropoli D, Tamagnone L, Roffredo A, Gaveglione L, Cardaropoli G. Socket preservation using bovine bone mineral and collagen membrane: a randomized controlled clinical trial with histologic analysis. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2012;32:421-30.

Cardaropoli G, Araújo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 809-818.

Chen F-M, Jin Y. Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16(2):219–55.

Chiapasco M, Casentini P, Zaniboni M. Bone augmentation procedures in implant dentistry. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009;24(Suppl):237-59.

Damien CJ, Parsons JR. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater.* 1991;2(3):187–208.

Do AV, Khorsand B, Geary SM, Salem, AK. 3D printing of scaffolds for tissue regeneration applications. *Adv Healthc Mater.* 2015;4(12): 1742-62.

Gazdag A, Lane J, Glaser D, Forster R. 1995 Alternatives to autogenous bone graft : efficacy and indications. *J Am Acad Orthop Surg* 3(1):1–8.

Gil-Albarova J, Gil-Albarova R. Donor site reconstruction in iliac crest tricortical bone graft: surgical technique. *Injury.* 2012;43(6):953-6.

Goldberg VM, Stevenson S. Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop Relat Res.* 1987;(225):7–16.

- Habibovic P, Barralet JE. Bioinorganics and biomaterials: Bone repair. *Acta Biomater.* 2011;7(8):3013–26.
- Hämmerle CH, Olah AJ, Schmid J, Flückiger L, Gogolewski S, Winkler JR, et al. The biological effect of natural bone mineral on bone neoformation on the rabbit skull. *Clin Oral Implants Res.* 1997;8(3):198–207.
- Horowitz RA, Mazor Z, Miller RJ, Krauser J, Prasad HS, Rohrer MD. Clinical evaluation of alveolar ridge preservation with a  $\beta$ -tricalcium phosphate socket graft. *Compend Contin Educ Dent.* 2009;30(9):588–604.
- Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface.* 2006;3(10):589–601.
- Jovanovic, SA. Bone rehabilitation to achieve optimal aesthetics. *Pract Proced Aesthet Dent.* 2007;19(9):569–76.
- Kang Y, Scully A, Young DA, Kim S, Tsao H, Sen M, Yang Y. Enhanced mechanical performance and biological evaluation of a PLGA coated  $\beta$ -TCP composite scaffold for load-bearing applications. *Eur Polym J.* 2011;47(8):1569–1577.
- Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials.* 2005;26(27):5474–91.
- Kim HW, Knowles JC, Kim HE. Hydroxyapatite/poly( $\epsilon$ -caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. *Biomaterials.* 2004;25:1279–87.
- Landsberg CJ. Implementing socket seal surgery as a socket preservation technique for pontic site development: surgical steps revisited--a report of two cases. *J Periodontol.* 2008;79(5):945–54.
- LeGeros RZ. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem Rev.* 2008;108(11):4742–53.
- Liu Y, Lim J, Teoh SH. Review: Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering. *Biotechnol Adv.* 2013;31(5):688–705.

Miao X, Tan DM, Li J, Xiao Y, Crawford R. Mechanical and biological properties of hydroxyapatite/tricalcium phosphate scaffolds coated with poly(lactic-co-glycolic acid). *Acta Biomater.* 2008;4(3):638–45.

Misch CM. Comparison of intraoral donor sites for onlay grafting prior to implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1997;12:767-76.

Okamoto M, John B. Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds. *Prog Polym Sci.* 2013;38:1487–503.

Perelman-Karmon M, Kozlovsky A, Lilov R, Artzi Z. Socket site preservation using bovine bone mineral with and without a bioabsorbable collagen membrane. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2012;32:459-65.

Philippart A, Boccaccini AR, Fleck C, Schubert DW, Roether JA. Toughening and functionalization of bioactive ceramic and glass bone scaffolds by biopolymer coatings and infiltration: a review of the last 5 years. *Expert Review of Medical Devices.* 2015;12(1):93–111.

Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. *Biomaterials science: An introduction to materials in Medicine.* Third Edition. London: Elsevier Academic Press. 2013.

Samavedi S, Whittington AR, Goldstein AS. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomater.* 2013;9(9):8037–45.

Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: A clinical and radiographic 12- month prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2003; 23: 313-323.

Shimauchi H, Nemoto E, Ishihata H, Shimomura M. Possible functional scaffolds for periodontal regeneration. *Japanese Assoc Dental Sci.* 2013;49(4):118-130.

Tessier P, Kawamoto H, Matthews D, Posnick J, Raulo Y, Tulasne JF, et al. Autogenous bone grafts and bone substitutes--tools and techniques: I. A 20,000-case experience in maxillofacial and

craniofacial surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2005;116(5 Suppl):6S – 24S; discussion 92S – 94S.

Williams DF. Definitions in biomaterials. In: *Progress in Biomaterial Engineering*, 1987.

