



Efeitos de fosfatos de cálcio nanoestruturados na formação e arquitetura óssea

Victor Ramón Martínez Zelaya

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Física).

Orientador: Alexandre Malta Rossi
Co-orientadora: Nathaly Lopes Archilha

Rio de Janeiro

Mai de 2019



“EFEITOS DE FOSFATOS DE CÁLCIO NANOESTRUTURADOS NA
FORMAÇÃO E ARQUITETURA ÓSSEA”

VICTOR RAMÓN MARTINEZ ZELAYA

Tese de Doutorado em Física apresentada no
Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas do
Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação.
Fazendo parte da banca examinadora os
seguintes professores:

Alexandre Malta Rossi – Presidente/Orientador/CBPF

Carlos Sato Baraldi Dias

Mateus Borba Cardoso

Ricardo Tadeu Lopes

Ivan dos Santos Oliveira Junior

Rio de Janeiro, 17 de maio de 2019.

Martínez Zelaya, Victor Ramón. **Efeitos de fosfatos de cálcio nanoestruturados na formação e arquitetura óssea.** 133 f. Tese (Doutorado em Física) – Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, Rio de Janeiro, RJ, 2019.

Resumo

Neste trabalho foram investigados aspectos ainda não abordados ou compreendidos sobre o crescimento do osso em defeitos induzidos em ratos Wistar, na ausência e na presença de microesferas de hidroxiapatita carbonatada (cHA) e hidroxiapatita carbonatada dopada com zinco (Zn-cHA) nanoestruturadas, utilizando técnicas de microtomografia e microfluorescência de raios X por radiação síncrotron, SEM-FIB (*Slice and View*) e a microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Foram estudados dois modelos de defeito: tibia e calvária. No modelo de tibia, dois aspectos foram avaliados: i) a arquitetura da rede de trabéculas criadas na ausência e na presença do biomaterial em tempos iniciais da formação óssea; e ii) as características do crescimento ósseo em 3D na superfície do biomaterial para isso, foram implantadas microesferas de cHA por um período de 3 semanas, e comparada com os coágulos (defeitos sem material) de 1, 2 e 3 semanas. Mostramos que a arquitetura do osso trabecular recém-formado segue o princípio da tensegridade, e é geneticamente estabelecida. A presença do biomaterial não modifica esta arquitetura. A adesão do osso na superfície do biomaterial ocorre através da formação de tecido mineralizado dentro dos submicroporos. No modelo de calvária foi estudada a biodegradação *in vivo* dos biomateriais, para isso foram implantadas microesferas de cHA e Zn-cHA durante 6 meses. Os resultados revelaram que a alta liberação de Ca e Zn para o meio biológico constituiu num fator decisivo para inibir a formação óssea.

Palavras-chave: Arquitetura óssea, Regeneração óssea, Radiação Síncrotron, Hidroxiapatita carbonatada, Hidroxiapatita carbonatada dopada com Zn, Nanomateriais.

Martínez Zelaya, Victor Ramón. **Effects of nanostructured calcium phosphates on the bone architecture and formation.** 133 f. Thesis (PhD. Physics) – Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, Rio de Janeiro, RJ, 2019.

Abstract

In this work, we investigate aspects neither addressed or well understood about the bone growth in induced defects in Wistar rats, in absence and presence of nanostructured carbonated hydroxyapatite (cHA) and Zinc-doped carbonated hydroxyapatite (Zn-cHA) microspheres. The study was conducted using techniques such as Synchrotron Radiation-based X-ray microtomography and microfluorescence, SEM–FIB (Slice and View), and TEM. We studied two defect models: tibia and calvaria. In the tibia model, two issues were addressed: i) The trabecular architecture in the early times of bone formation in absence and presence of the biomaterial; and ii) The 3D profile of bone and mineral tissue formed on the biomaterial surface. For this purpose, cHA microspheres were implanted for a period of 3 weeks and compared to their coats (defects without material) of 1, 2 and 3 weeks. We showed that the architecture of the newly formed bone followed the tensegrity principle, and is genetically established. The presence of the biomaterial does not modify bone architecture. The adhesion of bone to the biomaterial’s surface occurs through the formation of mineralized tissue within submicropores. In the calvarial model, we studied the *in vivo* biodegradation of biomaterials, evaluating the response of cHA and Zn-cHA microspheres 6 months after implantation. The results revealed that the high release of Ca and Zn to the biological medium constituted a decisive factor to inhibit bone formation.

Keywords: Bone architecture, Bone regeneration, Synchrotron Radiation, Carbonated hydroxyapatite, Zn-doped hydroxyapatite, Nanomaterials.

Agradecimientos

Primeramente, agradezco a Dios por darme la vida y acompañarme siempre.

Un agradecimiento muy especial a mis padres, Simona y Ramón. Por todo el amor incondicional, el inmenso cariño, el apoyo que me brindan desde la distancia, los consejos, y sobre todo por creer en mí siempre. Son los mejores padres que uno puede tener! y estoy muy orgulloso de tenerlos! Los amo mucho!

A mis hermanos, Alba, Milner, Guido y Arístides. Por las fuerzas, el cariño, el apoyo, y las buenas vibras de siempre!

A mis sobrinos, Manu, Alheli, Luji, Fran, y Joaquín. Me llenan de alegría cada día que comparto con ustedes, son lo más!

A mi compañera amada y colega, Bianca. Por el inmenso amor de todos los días, por cada abrazo, por apoyarme siempre y hacerme mejor persona, por estar ahí en las buenas y en las malas, por creer en mí. Te amo mucho mi amor!

A mis amigos eternos de mi país Paraguay, César, Marcos, Rubén y Ángel. Son geniales! A mi cuñado Eduardo, por el grandísimo apoyo de siempre, y por el espíritu enérgico y alegre.

A mi eterno profesor y gran amigo Silvio Báez, por ser una de las personas responsables de que yo esté aquí hoy, un grandísimo profesional, una grandísima persona, gracias por ser un ejemplo y por el apoyo de siempre!

A mi profesor y amigo Alejandro Peruzzi. Por ser un ejemplo como persona y profesional, por el apoyo y las buenas vibras de siempre!

A mi amiga Eli, por toda la alegría el apoyo y cariño de siempre!

A la familia Rodriguez López, por todo el cariño y la alegría que les caracterizan.

A mis tíos y primos, que siempre me recuerdan y me mandan su apoyo.

A mis amigos y colegas paraguayos Edher, Diego, Vale, Sergio y Alexis, por todo el apoyo, la amistad y la buena onda, en lo personal y profesional.

A la familia Galeano Villar, y la extensión de los Villar. Por todo el cariño y el carisma.

A mis colegas hispanohablantes del CBPF y la UFRJ. Ury, Ubaldo, Cristofer, Gissel, Grecia y Miguel. Por la amistad y las geniales reuniones con asados!

Ao meu orientador, o prof. Alexandre Rossi. Pela orientação, os conselhos, críticas, e apoio tanto no profissional quanto no pessoal; mais que um orientador, um grande amigo. À minha coorientadora, Nathaly Archilha. Pela orientação, conselhos, críticas, e apoio, pelas boas energias e a alegria contagiante, uma grande amiga que me deu o doutorado. Ao professor Marcos Farina, pelas críticas, conselhos, um orientador mais, um grande amigo e colega. Também por nós abrir as portas no seu laboratório, o Laboratório de Biomineralização do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ.

À professora Mônica Calasans e pessoal. Pela colaboração e implantação dos materiais utilizados nesta tese, também por ser uma excelente pessoa, mais uma amiga para mim. Aos professores: Flávio Garcia e André Rossi. Pela grande amizade, os conselhos, as críticas e sugestões durante o meu doutorado.

Aos meus colegas, Riccardo, Erich, Ivana, Gabi, Max, Josiê, e Grécia; pela grande amizade e bons momentos.

À minha colega e grandíssima amiga, María Daniela. Pelos grandes momentos, a infinita amizade, o carinho, apoio, ajuda, e por ser uma pessoa muito importante para mim, uma amiga eterna!

Ao meu colega Leonardo Ospedal, pelos prezados conselhos e a grande amizade.

Aos meus colegas, Pablo, Leo Cirto, Iván, Syed, Jade, pela grande amizade.

Aos meus colegas e amigos do CBPF em geral.

Ao professor Fabrício Borghi. Pelas dicas e amizade.

Ao pessoal do Laboratório de Biomateriais do CBPF pela síntese das amostras: A Sílvia, Francisco, e demais integrantes.

Ao pessoal do Laboratório de Cultura de Células do CBPF.

Ao Richard, pelos conselhos e pelos ensinamentos em geral.

À Gisele Dalmônico, pela grande amizade, carinho, apoio, ensino, e por ser uma grandíssima pessoa, com um enorme coração, um exemplo. Eu aprecio e admiro muito muito você!

Ao Jacques, Mari, Raquel, Cilene e Lia, pelo apoio, ensino e amizade.

Ao professor Mauro Granjeiro.

Ao professor Daniel Avalos, pela grande amizade.

Ao pessoal da linha de Luz IMX do LNLS: a Nathaly, o Sato, os Gabrieis, Miqueles, Murilo, Frank, Paola, etc. Um pessoal muito amável, carismático, grandes colegas e amigos!

Ao Carlos Perez, da linha de luz XRF do LNLS.

Ao Harry Westfahl do LNLS, pelos valiosos conselhos e sugestões.

Aos meus colegas de sala e amigos, Wesley, Torrão, Adrián, Bia, Ota. Pelas amizade e grandes momentos compartilhados.

Ao pessoal do laboratório de Química do LNLS.

Ao Carlos Ospina, Jefferson, e João do LNNano.

Ao Tomas, e pessoal da Thermo Fisher Scientific. Pela amizade e a disponibilização das Licencias do software Avizo.

À Natalie e Vika. Pela amabilidade de providenciar os códigos e guias do software ITA.

À todas as pessoas que de certa maneira contribuirão neste logro.

Ao LabNANO do CBPF, pelo acesso aos microscópios.

Ao LNNano e LNLS.

À Capes, CNPq e FAPERJ pelo apoio financeiro.

Sumário

Sumário	viii
Lista de Figuras	xii
Lista de Tabelas	xvi
Lista de abreviações e símbolos	xvii
1 Contextualização da pesquisa	1
1.1 Objetivos	6
1.1.1 Objetivo Geral	6
1.1.2 Objetivos Específicos	6
2 Conceitos básicos	8
2.1 Aspectos biológicos	8
2.1.1 Tecido ósseo	8
2.1.1.1 Organização hierárquica do osso	9
2.1.1.2 Microestrutura óssea	10
2.1.1.3 Mecanismos de mineralização óssea	12
2.1.1.4 Mecanismos biológicos de reparo ósseo	12
2.2 Fosfatos de cálcio	13
2.2.1 Hidroxiapatita carbonatada	14
2.3 Princípio da tensegridade	15

2.4	Radiação Síncrotron	17
2.5	Propriedades da radiação síncrotron	18
2.6	Fonte de radiação por dipolo (<i>Bending Magnets</i>)	20
2.7	UVX - Laboratório Nacional de Luz Síncrotron	23
2.8	Linha de Luz IMX	25
2.8.1	Caraterística do feixe incidente	27
2.9	Interação de raios X com a matéria	28
2.10	Microtomografia de raios X	30
2.11	Reconstrução tomográfica	31
2.11.1	Método de retroprojeção filtrada (FBP)	31
2.12	Microfluorescência de raios X por radiação síncrotron (μ XRF)	34
2.13	Geração de imagem por SEM	35
3	Síntese e preparação de amostras	36
3.1	Sínteses das nanopartículas (pó)	37
3.2	Processamento das microesferas	38
3.3	Modelos <i>in vivo</i> estudados	38
3.4	Implantação dos biomateriais	39
4	Técnicas experimentais e métodos analíticos	41
4.1	Caracterização físico-química das nanopartículas	42
4.1.1	Difração de raios X	42
4.1.2	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier	43
4.1.3	Análise química e Brunauer–Emmett–Teller (BET)	43
4.2	Técnicas de tomografia	43
4.2.1	Microtomografia de raios X por radiação síncrotron	44
4.2.1.1	Preparação de amostras para SR- μ CT	44
4.2.1.2	Adquisição de dados de SR- μ CT	45

4.2.1.3	Segmentação das imagens	47
4.2.2	Tratamento de dados e quantificação	49
4.2.2.1	Microesferas não implantadas (Quantificação A1)	50
4.2.2.2	Microesferas implantadas (Quantificação A2)	51
4.2.2.3	Esqueletização das redes de trabéculas	51
4.2.2.4	Quantificação de ângulos	53
4.2.2.5	Quantificação de porosidade e tamanho de poros	53
4.2.3	Crescimento ósseo na superfície do material implantado	53
4.3	Tomografia SEM-FIB (<i>Slice and View</i>)	54
4.3.1	Reconstrução dos dados de <i>Slice and View</i>	55
4.4	Microscopia ótica	55
4.5	Microfluorescência de raios X por radiação síncro- tron (SR- μ XRF)	56
4.5.1	Medidas de SR- μ XRF	56
4.5.2	Tratamento de dados das medidas de SR- μ XRF	56
4.6	Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	57
4.6.1	Preparação de amostras para TEM	57
4.6.2	Adquirição das imagens por TEM	57
5	Resultados e discussões	60
5.1	Composição química das nanopartículas de cHA e Zn-cHA	60
5.1.1	Caracterização por difração de raios X e FTIR	60
5.1.2	Morfologia das nanopartículas	64
5.2	Arquitetura trabecular em defeitos criados em tibia (coágulos)	65
5.2.1	Quantificação individual dos segmentos que constroem a rede de	
	trabéculas	66
5.2.2	Topologia e arquitetura de crescimento na formação de redes de	
	trabéculas	67

5.3	Microesferas antes e após implantação	77
5.4	Crescimento ósseo na presença do biomaterial	80
5.5	Crescimento ósseo na superfície do material implantado	85
5.6	Formação de tecido mineralizado (TM) na superfície do biomaterial	88
5.7	Liberação de íons para o meio	92
5.8	Degradação e biodisponibilização de hidroxiapatitas carbonatadas dopadas	
	com zinco em defeitos ósseo em calvaria.	93
5.8.1	Mapeamento de cHA por SR- μ XRF	93
5.8.2	Mapeamento de Zn-cHA por SR- μ XRF	96
5.8.3	Análise por TEM	101
6	Conclusões e propostas futuras	102
6	Referências Bibliográficas	104
A	Procedimento cirúrgico (modelo 1)	126
B	Parâmetros do <i>software</i> ITA App e <i>PoreNetworkExtraction</i>	129
B.1	<i>Inter-trabecular Angle</i> (ITA App)	129
B.2	<i>Pore Network Extraction</i>	130

Lista de Figuras

2.1 Organização hierárquica do osso	9
2.2 Partes do osso longo (tíbia)	10
2.3 Esquema de seção de osso cortical a nível microscópico	11
2.4 Visão da estrutura atômica da hidroxiapatita	14
2.5 Modelos estruturais de tensegidade	16
2.6 Espectro eletromagnético	17
2.7 Esquema de fluxo de radiação produzido por um <i>Bending Magnet</i>	21
2.8 Campus CNPEM	24
2.9 Espectro do fluxo do D6 da IMX em função da energia.	25
2.10 Esquema experimental da IMX	26
2.11 Fluxo do feixe disponível que incide na amostra.	27
2.12 Dois mecanismos de atenuação dos fótons de raios X	28
2.13 Princípio da microtomografia por raios-X	30
2.14 Ilustração da retroprojeção filtrada	32
2.15 Reconstrução das imagens	33
2.16 Interação de elétrons primários incidentes com a amostra	35
3.1 Fluxograma representando o processo de preparação de amostras	37
3.2 Modelos de defeitos estudados	39
4.1 Fluxograma das caracterizações das amostras	42

4.2	Corte de amostras para μ CT	45
4.3	Setup experimental de medidas de μ CT	46
4.4	Representação de recorte da região de interesse	47
4.5	Processo de segmentação de fases a partir de uma reconstrução	49
4.6	Fluxograma das etapas de quantificação utilizando técnicas de tomografia	50
4.7	Separação de fases das microesferas	51
4.8	Processo de esqueletização da rede de trabéculas	52
4.9	Esquema da tomografia SEM-FIB	55
4.10	TEM Jeol 2100F	58
4.11	Microscópio eletrônico de transmissão TITAN themis	59
5.1	DRX das amostras de cHA37, cHA90 e Zn-cHA90	62
5.2	FTIR das amostras de cHA37, cHA90 e Zn-cHA90	63
5.3	Imagens de TEM das nanopartículas de cHA	65
5.4	Segmentos analisados por cada amostra	66
5.5	Representação dos coágulos e esqueletos	68
5.6	Estruturas geométricas primárias da rede trabecular	69
5.7	Distribuição de ângulos intertrabeculares dos coágulos	71
5.8	Abundância de nodos 3N, 4N e 5N nos coágulos	72
5.9	Orientações dos segmentos das redes de trabéculas dos coágulos	73
5.10	Planaridade dos nodos 3N para o grupo de coágulos	74
5.11	Comprimento de segmentos, representando cada trabécula individual do grupo de coágulos	75
5.12	Distribuição de diâmetro médio de trabéculas crescidas na região do defeito para o grupo de coágulos	76
5.13	Microesferas de cHA antes e após implantação	78
5.14	Distribuição de tamanho de poros da microesfera de cHA	79

5.15 Tamanho médio de fragmentos	80
5.16 Representação 3D do Implante de cHA após 3 semanas	81
5.17 Identificação de regeneração óssea na região do defeito em tibia	82
5.18 Distribuição de diâmetro médio de trabéculas com o material implantado	83
5.19 Arquitetura e orientação de trabéculas no implante após 3 semanas	84
5.20 Exemplos de iteração e crescimento de osso sobre a superfície dos fragmentos de microesferas	86
5.21 Relação entre volume e superfície de osso crescido sobre a superfície disponível de cada fragmento.	87
5.22 Correlação entre micro e nanotomografia, por SR- μ CT e SEM-FIB (Slice and View) respectivamente	88
5.23 Região analisada no modo <i>Slice and View</i> (BSE)	89
5.24 EDS da região da interface na amostra de cHA implantada durante 3 semanas	90
5.25 Região analisada no modo <i>Slice and View</i> (BSE)	91
5.26 Mapeamento por SR- μ XRF do implante cHA após 3 semanas	92
5.27 Radiografia mostrando as regiões analisadas no defeito de calvaria	93
5.28 Mapeamento elementar por μ XRF da amostra de cHA implantada durante 6 meses (região 2)	94
5.29 Mapeamento elementar por μ XRF da amostra de cHA implantada durante 6 meses (região 1)	95
5.30 Mapeamento da razão de massa Ca/P (região 1) da amostra de cHA	96
5.31 Mapeamento elementar por μ XRF da amostra de Zn-cHA implantada durante 6 meses (região 2)	98
5.32 Mapeamento elementar por μ XRF da amostra de Zn-cHA implantada durante 6 meses (região 1)	99
5.33 Mapeamento da razão de massa Ca/P (região 1) da amostra de Zn-cHA	100
5.34 Mapeamento da razão de massa Zn/Ca (região 1) da amostra de Zn-cHA	100

5.35 Imagens de TEM das microesferas após 6 meses de implantação 101

Lista de Tabelas

2.1	Caraterísticas do feixe para as suas determinadas fontes de radiação	24
4.1	Condições experimentais para cada medida	46
5.1	Caraterísticas fisico-química das nanopartículas	61
5.2	Tamanho médio de cristalito das nanopartículas	61
B.1	Parâmetros utilizados no <i>software</i> ITA	130

Lista de abreviações e símbolos

Abreviações

μ XRF	Microfluorescência de raios X
BET	<i>Brunauer–Emmett–Teller</i>
BMag	<i>Bendig Magnets</i> (Dipolos)
BSE	<i>Backscattered Electrons</i> (Elétrons retroespalhados)
CCD	<i>Charge-coupled device</i> (Dispositivo de carga acoplada)
cHA	Hidroxiapatita carbonatada
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
CT	<i>Computed Tomography</i> (Tomografia Computarizada)
DBA	<i>Double-Bend Achromats</i> (Acromáticos de dupla curva)
DRX	Difração de Raios X
EDS	<i>Energy Dispersive X-ray Spectroscopy</i> (Espectroscopia de raios X por dispersão de energia)
ESRF	<i>European Synchrotron Radiation Facility</i>
FBP	<i>Filtered Backprojection</i> (Retroprojeção filtrada)
FC	Fosfatos de cálcio
FIB	<i>Focused Ion Beam</i> (Feixe de Ions Focalizado)
FTIR	<i>Fourier-transform Infrared Spectroscopy</i> (Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier)
HA	Hidroxiapatita

ICRP	<i>International Commission on Radiological Protection</i> (Comissão Internacional de Proteção Radiológica)
IMX	Linha de luz de Microtomografia por raios X
ITA	<i>Inter-trabecular Angle</i> (Ângulo Inter-trabecular)
LabNANO	Laboratório Multiusuário de Nanociência e Nanotecnologia
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
LNNano	Laboratório Nacional de Nanotecnologia
pH	Potencial de hidrogênio
SAED	<i>Selected Area electron diffraction</i> (Difração de área selecionada)
SE	<i>Secondary Electrons</i> (Elétrons Secundários)
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i> (Microscopia Eletrônica de Varredura)
STEM	<i>Scanning Transmission Electron Microscopy</i> (Microscopia Eletrônica de Transmissão)
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i> (Microscopia Eletrônica de Transmissão)
TM	Tecido Mineralizado
UFRJ	Universidade Federal de Rio de Janeiro
wt	<i>weight percent</i> (percentagem em peso)
Zn-CHA	Hidroxiapatita carbonatada dopada com zinco

Símbolos

γ	divergência
\hbar	constante de Planck
\mathcal{E}	energia cinética
ω_0	frequência
ω_c	frequência crítica
ψ	ângulo sólido

ρ	raio orbital
ε_c	$\hbar\omega_c$
B	Campo magnético
<i>A</i>	textitampere
<i>c</i>	velocidade da luz
<i>e</i>	carga do elétron
<i>eV</i>	elétron volts
<i>GeV</i>	Giga elétron volts
<i>I</i>	Intensidade
<i>m</i>	metros
<i>MeV</i>	Mega elétron volts
<i>mrad</i>	miliradianos
<i>s</i>	segundos
<i>T</i>	Tesla
<i>V</i>	<i>volts</i>
<i>v</i>	velocidade
w_i	fração em peso
E	energia
m	massa

Capítulo 1

Contextualização da pesquisa

Problemas ósseos causados por acidentes, traumas ou doenças degenerativas resultam em incapacidade parcial ou total de milhões de pessoas todos os anos [1,2]. Um dos desafios da bioengenharia óssea é desenvolver matrizes biocompatíveis que auxiliem o reparo de tecidos lesados ou totalmente perdidos, assegurando a funcionalidade e a mecânica do osso [3-7]. A eficiência do biomaterial dependerá da qualidade das suas interações com células, tecidos e constituintes do meio hospedeiro. Do ponto de vista da pesquisa em novos materiais para a regeneração óssea, é necessário investigar os possíveis efeitos do biomaterial nos complexos mecanismos de formação óssea nos seus vários níveis de estruturas hierárquicas [8], tais como: a produção de moléculas colagênicas [9,10] e não colagênicas [11,12] pelas células; a formação de fibrilas de colágeno e sua mineralização; a organização de feixes de fibrilas mineralizadas com estruturas e orientações específicas [13-15]; a montagem da estrutura 3D com uma arquitetura otimizada às demandas funcionais do osso, cortical e trabecular [16-19].

Nos últimos anos, a pesquisa científica e tecnológica teve grandes avanços em duas direções: i) nas técnicas de preparação e processamento dos materiais, em especial com o uso clínico de sistemas nanoestruturados e ii) no conhecimento da estrutura óssea na micro e nanoescala. Esta última área da pesquisa foi fortemente beneficiada pelo uso crescente de técnicas analíticas tridimensionais com resolução micro e nanométrica, tais

como a microtomografia dos raios X, a microscopia eletrônica de transmissão (TEM), e a microscopia eletrônica de varredura com feixe de íons focalizado (SEM-FIB) [8,20-23]. Estas técnicas trouxeram novas informações sobre a estrutura e arquitetura óssea e os mecanismos da mineralização na superfície do biomaterial [20].

Em trabalhos recentes, Natalie Reznikov, Steave Weiner e colaboradores reconstruíram a arquitetura da rede de trabéculas de ossos de fêmur humanos adultos e mandíbulas de porco [23,24]. Eles mostraram que as redes trabeculares eram formadas por conjuntos de 3 (3N), 4 (4N) e 5 (5N) segmentos interligados por nódulos, formando estruturas triangulares, tetraédricas e pentaédricas. A medida dos ângulos inter-trabeculares confirmou a existência de um padrão topológico baseado no princípio de tensegridade [25,26], que maximiza a ocupação do espaço usando um mínimo de volume de osso. Do ponto de vista mecânico, esta topologia redistribui as tensões dando alta estabilidade a estrutura óssea. Além disso, a arquitetura com tensegridade facilita mudanças locais de orientação das trabéculas quando o osso é submetido a contínuas tensões direcionais. Duas perguntas devem ser colocadas a partir da importante descoberta: i) o osso trabecular recém formado já apresenta a topologia baseada no princípio da tensegridade? ii) esta arquitetura óssea poderia ser sensível quando entra em contato com algum biomaterial e as mudanças físico-químicas do meio biológico por ele produzido?

Os mecanismos da osseointegração e a estrutura do ósseo recém formado na interface entre o osso e o biomaterial são temas especialmente importantes para o desenho de novos biomateriais [27-31]. Apesar do grande número de estudos já realizados, os processos de crescimento ósseo na superfície do biomaterial ainda não são totalmente compreendidos. Vários trabalhos tem apontando a importância da microporosidade e nanoporosidade como elementos indispensáveis para melhorar a osteocondução [20,21,32]. Recentemente, Marc Bohner et al. [21] e Laurence E. Rustom et al. [20] fizeram contribuições significa-

tivas para os mecanismos de formação óssea em microporos na superfície de arca-bouços de fosfatos de cálcio. Os autores observaram a formação de tecido mineralizado (TM) em poros maiores que $1 \mu m$, e enfatizaram a importância da topografia e da microporosidade dos implantes no reparo ósseo e na mecânica (adesão) osso/implante. A mineralização mediada ou não por células foi considerada como um possível mecanismo para descrever a formação de TM em microporos. No entanto, a natureza do TM formado na microporosidade do biomaterial permanece como uma questão em aberto.

Os fosfatos de cálcio em especial a hidroxiapatita (HA), $Ca_{10}(PO_{14})_6(OH)_2$, constituem um dos mais importantes biomateriais para a substituição e regeneração óssea [33-36]. O grande desafio da pesquisa é produzir fosfatos de cálcio com características físico-químicas e morfológicas tais que, quando implantadas nas regiões lesadas, estimulem a osteogênese propiciando a formação de estruturas semelhantes aos elementos de matriz extracelular, facilitando a mobilização, expansão e integração de populações de células regenerativas internas, fomentando o reparo de lesões ou a renovação de tecidos degenerados. Além o material deve ser reabsorvível pelo organismo permitindo que o tecido ósseo formado ocupe o volume lesado [37]. Esta característica é alcançada quando a hidroxiapatita é usada na aplicação clínica na forma nanoestruturada [38].

Neste trabalho acompanhamos os processos de reparo ósseo em defeitos criados em tibia [39] e calvária de ratos [40] implantados com microesferas de hidroxiapatita carbonatada (cHA) e hidroxiapatita carbonatada dopada com zinco (Zn-cHA) [41].

A hidroxiapatita carbonatada não cerâmica foi o material escolhido para implantação devido a sua natureza nanoestruturada, a sua alta área específica e sua favorável taxa de dissolução, *in vivo*. As microesferas contendo cHA ou Zn-cHA, e o biopolímero alginato*

*Este biopolímero tem uma alta compatibilidade com a HA e também é usado como sustentador do

(elemento sustentador e quem dá a morfologia esférica) foram produzidas de forma a degradarem em inúmeros fragmentos, após a sua implantação. A degradação do material, expondo as nanopartículas no meio biológico, é intensificada pela dissolução do polímero no meio biológico. O controle do processo de degradação é importante para: i) acelerar a reabsorção do biomaterial, ii) disponibilizar espaço para o crescimento de osso novo, iii) aumentar a área disponível do material, acelerando assim a osteocondução. É importante ressaltar que esferas com alto grau de degradação[†] deixam pouco espaço disponível para a formação óssea, enquanto as esferas densas tiveram baixa fragmentação oferecendo menos superfície para a formação óssea. O comportamento *in vivo* deste tipo de arcabouço depende ainda de fatores intrínsecos da estrutura da apatita tais com a estequiometria, a cristalinidade, e o tamanho de partículas.

Para este projeto de tese escolheu-se dois modelos de defeitos em animais para avaliar diferentes aspectos da formação óssea. O modelo de defeito não crítico em tíbia de ratos foi usado por favorecer o reparo espontânea de osso, sem a presença do biomaterial. O modelo é adequado ao estudo comparativo da arquitetura da rede de trabéculas ósseas criada, na ausência e na presença do biomaterial. Além disto, o modelo é favorece o estudo das características do tecido mineralizado formado na superfície do biomaterial.

O modelo de defeito crítico em calvária de rato é geralmente usado para avaliar a eficiência osteocondutora de um biomaterial. Neste modelo, o reparo completo do defeito só ocorre na presença de um biomaterial osteocondutor. Por esta razão, o modelo de calvária foi usado para avaliar a influência da degradação e da bioreabsorção da cHA e da Zn-cHA no reparo ósseo.

material nanoestruturado em diferentes morfologias além da esférica [42-44]

[†]Não mantem a forma, empacotando-se uma com outras formando uma massa densa

A complexidade dos sistemas estudados exigiu o uso de um amplo conjunto de técnicas experimentais para analisar os materiais antes e após a implantação, assim como o osso recém formado. A estrutura, morfologia e porosidade dos materiais foram analisadas por difração de raios X (DRX), espectroscopia de infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (SEM) e transmissão (TEM); isotermas de adsorção e dessorção pela técnica Brunauer–Emmett–Teller (BET), Microtomografia de Raios X por radiação síncrotron (SR- μ CT). O estudo do crescimento ósseo em defeito de tíbia e calvária e o comportamento osteocondutor do material foi conduzido por SR- μ CT, nanotomografia SEM–FIB no modo *Slice and View*, microfluorescência de Raios X por radiação síncrotron (SR- μ XRF), microscopia óptica de luz polarizada, SEM e TEM. O trabalho concentrou-se principalmente em três aspectos: i) a arquitetura da rede de trabéculas criadas na ausência e na presença do biomaterial em tempos iniciais da formação óssea, ii) as características do crescimento ósseo tridimensional na superfície do biomaterial, e em especial a formação de TM nos microporos com dimensões inferiores a $1 \mu m$, e iii) a influência da degradação e bioreabsorção do material nanoestruturado na formação óssea. As técnicas analíticas utilizadas no projeto forneceram informações físico-químicas estruturais e morfológicas dos materiais em ambiente biológico, desde a microescala até a nanoescala. O desafio principal foi correlacionar as estruturas analisadas na micro e na nanoescala. Isto porque, muitos dos processos físicos, topológicos e dinâmicos que são identificados na escala micrométrica, tem como origem a escala nanométrica, um exemplo disto é a estrutura e arquitetura das trabéculas ósseas [45].

Esta tese contribui para um entendimento do processos de regeneração óssea em presença de um biomaterial e mostra que a análise do sistema com técnicas em 3D são absolutamente necessárias para se obter informações mais conclusivas sobre aspectos ainda não completamente discutidos ou compreendidos sobre o crescimento do osso trabecular em defeitos implantados com arcabouços nanoestruturados de fosfatos de cálcio [46, 47].

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

- Estudar a organização das estruturas hierárquicas do osso na multiescala, na ausência e presença de um material osteocondutor.

1.1.2 Objetivos Específicos

1. Produzir microesferas a base de fosfatos de cálcio nanoestruturados e o biopolímero alginato de sódio caracterizando a estrutura interna do compósito na micro e nanoescala.
2. Avaliar a influência de microesferas de fosfatos de cálcio nanoestruturados na dinâmica de crescimento ósseo, na micro- e nanoescala em defeitos de tíbia e calvaria de ratos.
3. Caracterizar a arquitetura trabecular do osso neoformado, na região do defeito em tíbias por microtomografia de raios X por radiação síncrotron
4. Estabelecer um protocolo de correlação entre a escala micro- submicro- e nanométrica para a caracterização da interface osso/biomaterial.
5. Analisar os possíveis processos de mineralização em poros com dimensões micrométricas e nanométricas, utilizando técnicas de microscopia eletrônica de varredura e transmissão.
6. Caracterizar a degradação in vivo do biomaterial e a disponibilização de íons e nanopartículas, após a implantação em defeitos de tíbia e calvaria de ratos por técnicas de microtomografia e microfluorescência de raios X.

7. Avaliar a biodisponibilidade de cálcio e zinco e a sua influência nos processos de reparo tecidual em defeitos de tibia e calvaria.

Capítulo 2

Conceitos básicos

Neste capítulo, serão apresentados conceitos gerais que dão suporte ao presente trabalho. Primeiramente, são apresentados aspectos biológicos, materiais utilizados, princípios físicos e/ou topológicos para a interpretação dos resultados obtidos, e por fim, uma breve descrição dos conceitos das principais técnicas analíticas empregadas para a caracterização.

2.1 Aspectos biológicos

2.1.1 Tecido ósseo

O osso é um tecido conjuntivo denso mineralizado, altamente especializado e complexo, fornece suporte mecânico, permitindo a hematopoese e estabelecendo a homeostase mineral do organismo [48,49]. O tecido ósseo é dinâmico, altamente vascularizado e com a capacidade única de regeneração e remodelação [50,51]. Tal diversidade funcional requerida ao tecido ósseo, reflete na complexidade de sua arquitetura [8,16,52].

Este tecido é composto por uma matriz orgânica e inorgânica. A matriz orgânica é formada por aproximadamente 95 % de fibras colagênicas, tipo I e III, e proteínas não-colágenas. Já a matriz inorgânica é constituída de água, 65-70 % de compostos de fosfato de cálcio, principalmente na forma de cristais de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

(HA), e composta ainda por bicarbonato, magnésio, potássio, sódio, citrato em pequenas quantidades [53]. Diferencia-se de outros tecidos conjuntivos pelo fato de sua matriz tornar-se mineralizada. Este tecido é composto por osteoblastos, osteoclastos, células mesenquimais osteoprogenitoras e osteócitos [54-56].

2.1.1.1 Organização hierárquica do osso

O osso é hierarquicamente organizado nas diferentes escalas, desde a escala macroscópica até a nanoescala, como é mostrado na Figura 2.1

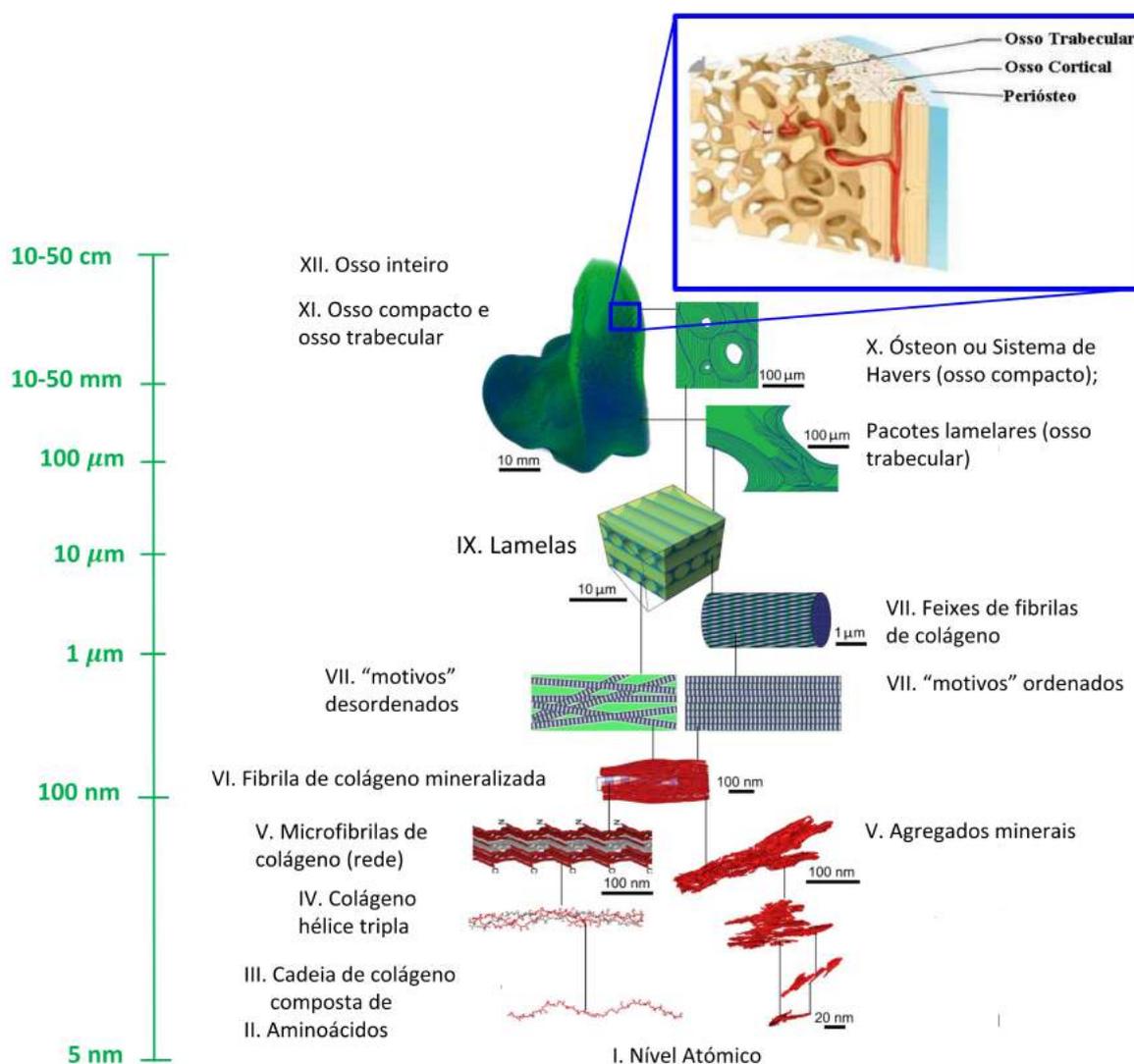


Figura 2.1: Organização hierárquica do osso. Figura adaptada de [22]

A compreensão atual da estrutura hierárquica do osso é que os componentes orgânicos e inorgânicos se misturam no nível sub-micrométrico para gerar fibrilas de colágeno mineralizadas, como mostrado na Figura 2.1.

2.1.1.2 Microestrutura óssea

Segundo a sua morfologia existem dois tipos de osso: osso cortical ou compacto e osso trabecular ou esponjoso. Na Figura 2.2 se mostra as partes de um osso longo (tíbia).

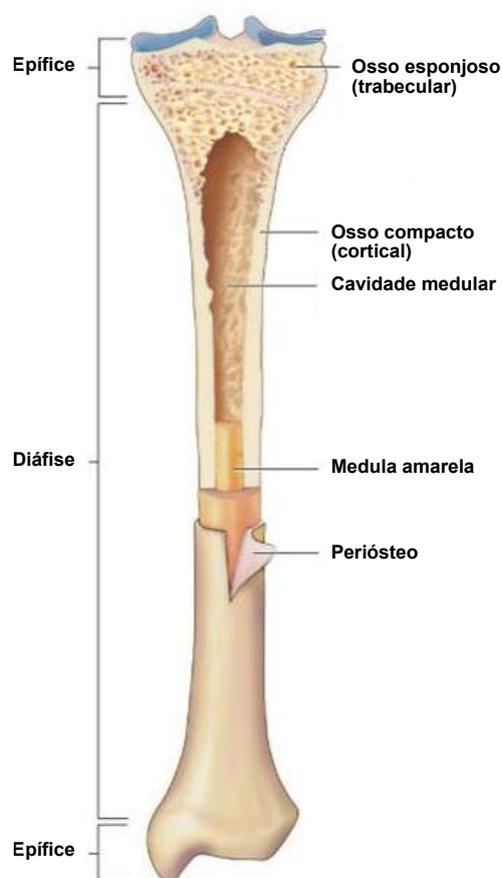


Figura 2.2: Partes do osso longo (tíbia). Figura adaptada de [57].

O osso cortical não contém cavidades, é o componente mais resistente do osso e forma a maior parte da diáfise dos ossos longos. Encontra-se sempre na parte exterior, formando um denso cilindro concêntrico ao eixo que rodeia a cavidade central (cavidade medular). A Figura 2.3 representa um esquema do osso cortical maduro a nível microscópico, é composto principalmente por unidades cilíndricas chamadas osteons ou sistemas de Havers [58], de diâmetro compreendido entre 10 e 500 μm , e cujo eixo longitudinal é paralelo ao eixo maior do osso. O sistema de Havers estão constituídos por pequenas laminas concêntricas de matriz óssea mineralizada, chamadas lamelas, e dispostas ao redor de um conduto central, denominado canal ou conduto de Havers, que contém vasos e nervos. A lamela, que constitui a unidade principal do osso lamelar, mede entre 3 e 7 μm [59], e é composta por fibrilas de colágeno mineralizado que à sua vez compõe uma matriz extra-fibrilar de cristais minerais [60].

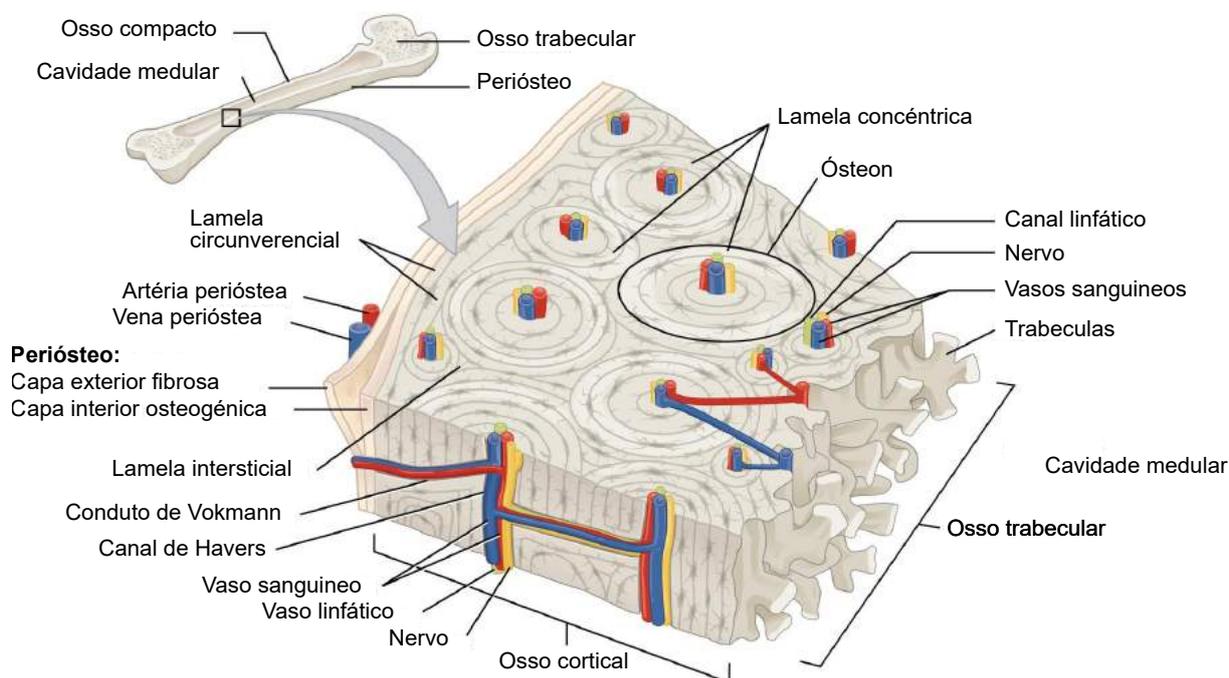


Figura 2.3: Esquema de seção de osso cortical a nível microscópico. Figura adaptada de [61].

O osso trabecular situa-se maioritariamente nos extremos dos ossos longos, e em menor quantidade na cavidade medular. Apresenta uma estrutura porosa com forma de nido de

abelha, formando uma rede de segmentos chamados trabéculas.

2.1.1.3 Mecanismos de mineralização óssea

Os mecanismos de mineralização da matriz óssea consistem num conjunto de reações bioquímicas complexas controladas por células específicas [62]. Os minerais são bombeados para dentro da célula, especialmente íons Ca^{2+} , fosfolipídeos e fosfatases, e acumulados no interior de vesículas onde o ambiente supersaturado favorece a precipitação dos cristais [63, 64]. Tais vesículas são liberadas para o meio extracelular e "descarregam" o conteúdo mineral sobre a matriz osteoide rica em colágeno, onde a água ocupa os espaços da estrutura orgânica. Esse conteúdo mineral, numa reação química com a água preexistente nos espaços intermoleculares, culmina na formação dos cristais insolúveis HA que "deslocam" a água à medida que agregam mais conteúdo mineral das vesículas continuamente liberadas dos osteoblastos [65, 66]. Como a concentração mineral dos íons cálcio e fosfato não é suficiente para a precipitação espontânea dos cristais, o papel das vesículas criadas pelas células é fundamental, pois o primeiro cristal formado será o centro de nucleação [67]. A matriz de colágeno funciona também como centro de nucleação heterogênea para a deposição de cristais de HA, onde fibrilas de colágeno, fibronectina e glicoproteínas como a osteonectina e a osteopontina, determinam a orientação e organização destes cristais minerais ósseos [68-70].

2.1.1.4 Mecanismos biológicos de reparo ósseo

O tecido ósseo tem a singular capacidade de se regenerar, a depender do volume da região que foi danificada. O grande diferencial do osso é a habilidade de reparar o tecido sem o desenvolvimento de cicatriz fibrosa, a qual geralmente está presente durante a cicatrização de feridas em tecidos moles. Isto é alcançado através dos estágios complexos e interdependentes do processo de cicatrização, o qual mimetiza o desenvolvimento altamente regulado do esqueleto [71-73].

Os mecanismos biológicos de reparo ósseo associados aos biomateriais podem ser classificados em: osteogênese [73], osteoindução [74], osteocondução [75,76] e osteopromoção [77]. A osteogênese se caracteriza pela atividade de osteoblastos e préosteoblastos viáveis transplantados com o enxerto para o defeito ósseo a partir de uma área doadora do próprio indivíduo. A osteoindução induz formação de tecido ósseo através da diferenciação e estimulação de células mesenquimais por meio das proteínas ósseo indutoras (formação óssea espontânea) [74]. A osteocondução se refere ao crescimento ósseo a partir da parede do osso preexistente em direção à superfície do biomaterial [78,79]. Por fim, a osteopromoção utiliza barreiras mecânicas ou membranas de proteção que evitam a proliferação do tecido conjuntivo no defeito ósseo, permitindo que o mesmo seja ocupado por células osteoprogenitoras [80].

2.2 Fosfatos de cálcio

Os fosfatos de cálcio (FC) constituem um dos biomateriais mais utilizados como substituo ósseo [81,82]. Eles estão presentes nos ossos, dentes, e nos tendões dos mamíferos, conferindo dureza e estabilidade à esses órgãos. Existem 11 tipos de fosfatos de cálcio [83], com uma razão molar de Ca/P entre 0.5 e 2. A Hidroxiapatita (HA) é o FC mais utilizado em aplicações médicas. Entre essas aplicações destacam-se o uso como agente de liberação de fármacos [84,85], como agente de entrega de genes [86], matriz de biocompósitos, e como revestimentos bioativos em implantes ósseos metálicos [87]. Além disso, estudos recentes mostraram que as partículas de HA inibem o crescimento de muitos tipos de células cancerígenas [88].

A Figura 2.4 ilustra a estrutura da HA com simetria hexagonal com quatro tipos diferentes de posições cristalográficas na célula unitária [89,90]. Quatro íons de cálcio por célula unitária, chamados Ca (I), estão em colunas paralelas ao longo do eixo de máxima simetria da HA c . Eles são circundados por nove átomos de oxigênio. Outros íons de

cálcio, seis por célula unitária, chamados Ca (II), formam dois triângulos equiláteros ao longo do eixo c em $z = 1/4$ e $3/4$. O eixo c denominado de canal aniônico, é tipicamente ocupado por ânions monovalentes (comumente OH^- , F^- , Cl^-) e por CO_3^{2-} . O espaço entre os íons de Ca (II) permite o movimento do ânion ao longo do eixo da coluna. A estrutura é completada por seis ânions PO_4^{3-} , onde cada átomo de P é coordenado por quatro átomos de oxigênio [91]. O HA tem uma estrutura hexagonal com o grupo espacial $\text{P6}_3/\text{m}$, com parâmetros de rede de $a = b = 9.432$, $c = 6.881 \text{ \AA}$, e $\gamma = 120^\circ$. A fase estequiométrica de apatita possui uma razão molar de Ca/P de 1.67. Ela constitui o sal de fosfato de cálcio mais estável a temperaturas de até 1100°C e pH entre 4 e 12 [92].

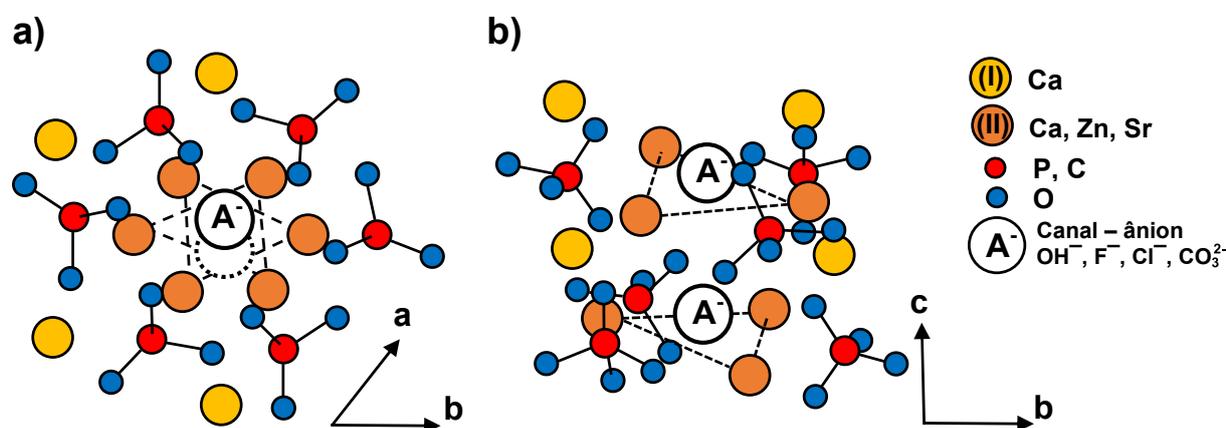


Figura 2.4: Visão da estrutura atômica da hidroxiapatita. a) no eixo c ; e b) perpendicularmente ao eixo c . Figura adaptada de [91]

2.2.1 Hidroxiapatita carbonatada

O número de substituições iônicas nas bioapatitas é menor do que as apatitas geológicas, devido ao número limitado de elementos presentes nos fluidos corporais [91]. As dopagens de íons conhecidos e/ou relatados em apatitas ósseas e dentárias são F, Cl, Na, K, Fe^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , citrato e o carbonato. No entanto, existem limites estruturais que determinam quanto de um determinado íon pode ser incorporado [91]. Os principais substituintes na apatita biológica são os carbonatos (CO_3^{2-}), que ocorrem no mineral ósseo em níveis tipicamente de 5-8% em peso. Cristalitos ósseos com alta concentração

de CO_3^{2-} também expressam uma morfologia plaquetária que interage muito eficazmente com fibrilas de colágeno [93]. O íon carbonato pode substituir em dois locais na estrutura da apatita, ou seja, a posição hidroxila (tipo-A) e a posição do íon fosfato, dando hidroxiapatita carbonatada tipo-B. A substituição dos íons de fosfatos por carbonatos aumentam a taxa de dissolução das HA [94].

As hidroxiapatitas carbonatadas nanoestruturadas (cHA) têm sido sintetizadas por muitas rotas de processamento químico, incluindo precipitação química úmida (utilizada nesta tese), co-precipitação [95-97], métodos de emulsão [98,99], síntese sol-gel [100], métodos mecanoquímicos [101], reações bioquímicas-mecanoquímicas [102] e precipitação por micro-ondas [103]. As cHA também podem ser sintetizadas por uma rota de co-substituição aniônica-catiônica, dando origem à uma substituição simultânea de, por exemplo: Zn^{2+} e CO_3^{2-} na estrutura da HA [41,104].

2.3 Princípio da tensegridade

Uma das principais contribuições importantes do artista, matemático e inventor R. Buckminster Fuller para a ciência foi enunciar os princípios da tensegridade a partir de estruturas arquitetônicas [105]. No princípio da tensegridade, as estruturas são estabilizadas por tensão contínua (tensão + integridade = tensegridade) com compressão descontínua. Em contraste, a maioria das estruturas feitas pelo homem é estabilizada por compressão gravitacional contínua [106]. Por exemplo, o monumento Stonehenge* [107] mantém sua forma e estabilidade devido à força de compressão da gravidade. Se fosse levado para o espaço, as peças de pedra individuais de Stonehenge se separariam e a estrutura desmoronaria. Os sistemas baseados no princípio da tensegridade, por outro lado, manteriam sua forma na ausência de gravidade [108]. A partir da descoberta de

*"Stonehenge" é um dos mais importantes monumentos da pré-história europeia, e sempre foi considerado pelos visitantes como uma das maravilhas da Grã-Bretanha.

Fuller, a ocorrência do princípio da tensegridade começou a ser investigada em sistemas da natureza, em especial os sistemas biológicos.

Existem 2 classes amplas de estruturas de tensegridade: de protensão e geodésico [105] (Figura 2.5). As estruturas de tensegridade pré-tensionada são formadas a partir de uma série de elementos descontínuos resistentes à compressão contidos em uma rede de elementos de tensão contínua (Figura 2.5a). Essas estruturas podem ser alteradas ajustando-se a quantidade de protensão tensional dentro da estrutura ou reposicionando os elementos resistentes à compressão intermitente. Em contraste, as estruturas de tensegridade geodésica são estabilizadas através da triangulação de força (Figura 2.5b). As estruturas geodésicas também estão sob pré-esforço. Elas diferem dos sistemas de tensegridade de protensão, porque os elementos individuais são capazes de alternar entre os movimentos de geração de tensão e de resistência à compressão, dependendo de como uma força externa é aplicada à estrutura. As estruturas de tensegridade geodésica podem ser alteradas ajustando-se o número, e a colocação de elementos individuais de compressão-tensão dentro do sistema, o que também altera o nível de pré-esforço de repouso dentro do sistema [108,109].

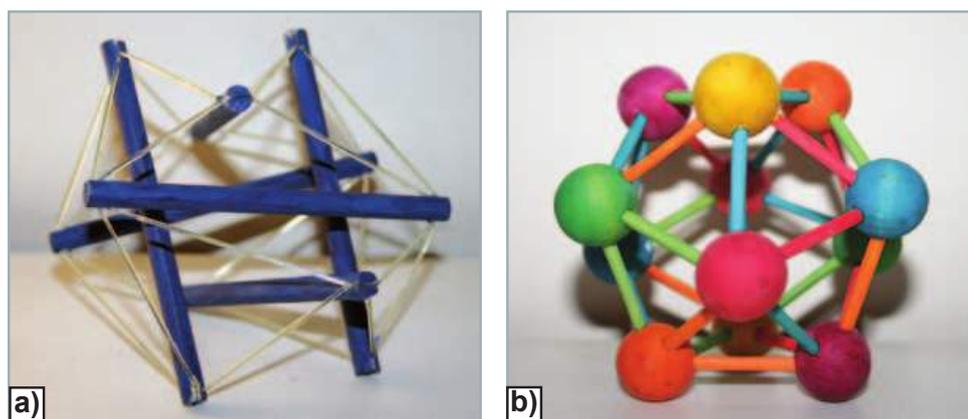


Figura 2.5: Modelos estruturais de tensegridade: a) Protendido, e b) geodésicas. As duas classes de sistemas de tensegridade foram fundadas por R. Buckminster Fuller. Figura adaptada de [108].

2.4 Radiação Síncrotron

A radiação síncrotron é gerada por partículas carregadas, por exemplo, elétrons, que são acelerados numa órbita circular à velocidades próximas à da luz por um campo eletromagnético de alta frequência que é sincronizado com a trajetória de aceleração das partículas. O nome síncrotron vem da palavra sincro (sincronização) e ciclotron [110]. Estas partículas são estabilizadas por fortes campos magnéticos em um sistema de tubos em ultra-alto vácuo.

A radiação síncrotron é um tipo de radiação eletromagnética altamente polarizada, de alto fluxo e alto brilho, e tem uma ampla faixa espectral, desde o infravermelho até o raio-X (Figura 2.6).

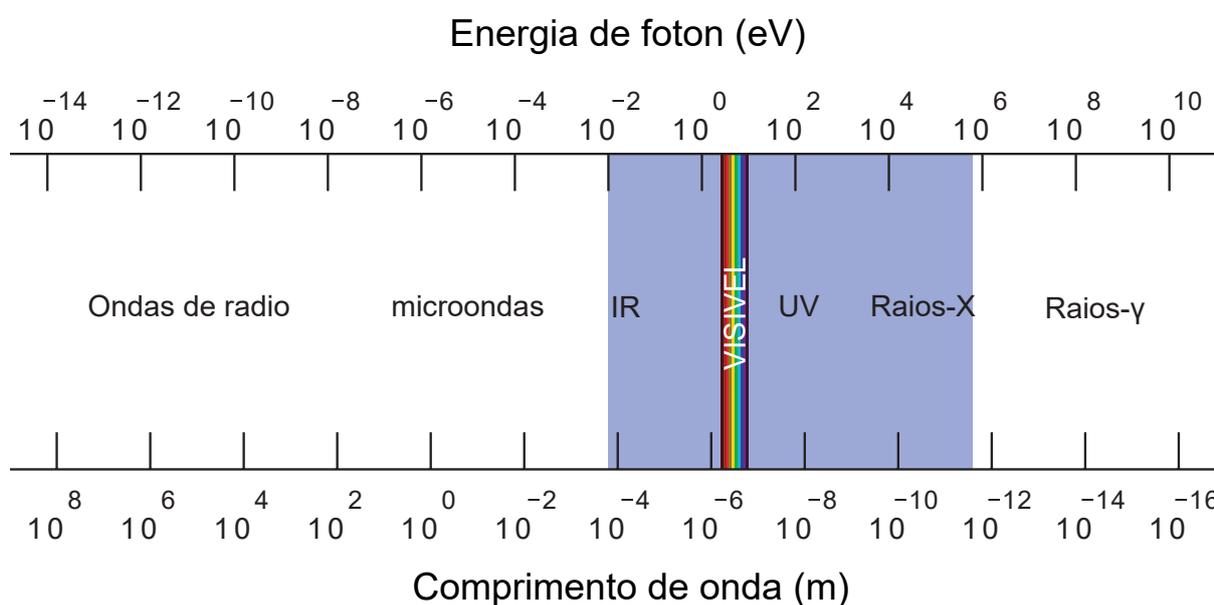


Figura 2.6: Espectro eletromagnético. Os síncrotrons cobrem as energias de fótons desde do infravermelho em torno de 0.01 eV até os raios-X muito duros, $5 \times 10^5 \text{ eV}$, como é indicado pela região azul. Figura adaptada de [111].

2.5 Propriedades da radiação síncrotron

As propriedades da radiação síncrotron são sintonizáveis e podem ser compreendidas pelas leis de eletrodinâmica clássica [112]. Quando uma partícula carregada (elétron) se movimenta seguindo uma trajetória circular com uma energia muito menor que a sua energia no estado fundamental ($mc^2 = 0.51 \text{ MeV}$), ela se comporta como um dipolo fraco que irradia isotropicamente. Na condição relativística, esta energia é irradiada tangencialmente à trajetória do elétron forma um cone estreito com um ângulo sólido ψ . Devido à colimação de fótons irradiados em um ângulo tão pequeno, o cone resulta em um feixe de radiação e potência altamente intensos na direção de propagação [111]–[113].

De acordo com a teoria especial da relatividade, a energia cinética (\mathcal{E}) de qualquer partícula de massa em repouso viajando a uma velocidade v é dada por

$$\begin{aligned}\mathcal{E} &= \frac{mc^2}{\sqrt{1 - (v/c)^2}} \\ &= \frac{mc^2}{\sqrt{1 - \beta^2}} \\ \rightsquigarrow \gamma &= \frac{1}{\sqrt{1 - \beta^2}},\end{aligned}\tag{2.1}$$

onde $\beta = v/c$, e $\gamma = \mathcal{E}/mc^2$. À medida que a partícula aproxima-se da velocidade da luz, ela "ganha massa" (massa inercial) num fator de γ . Como teria massa infinita em $v = c$, só pode se aproximar assintoticamente desse limite. Então manipulando a Equação (2.1) temos que

$$\beta = \left(1 - \frac{1}{\gamma^2}\right)^{1/2}.\tag{2.2}$$

Para valores típicos de γ de 10^4 , $1/\gamma^2$ é muito pequeno, e então podemos ignorar todos os termos da expansão de Taylor (2.2), exceto os dois primeiros, e assim obter:

$$\beta \approx 1 - \frac{1}{2\gamma^2}.\tag{2.3}$$

Os elétrons no anel de armazenamento são desviados para uma órbita circular fechada. Tal fato é devido ao campo magnético[†] que induz uma força de Lorentz sobre uma partícula carregada, perpendicular ao movimento da mesma e ao vetor do campo magnético (é proporcional ao produto vetorial de v e B). Classicamente, a força de Lorentz é igualada a uma força centrípeta, tal que

$$e\mathbf{v} \times \mathbf{B} = \frac{mv^2}{\rho}, \quad (2.4)$$

onde ρ é o raio orbital do arco. Suponhamos que o campo magnético seja perpendicular ao caminho do elétron, de modo que o produto vetorial $\mathbf{v} \times \mathbf{B}$ seja simplesmente $|v||B|$. Como estamos lidando com elétrons relativísticos, devemos substituir m pela massa relativística γm , e v por c . Então

$$\begin{aligned} ecB &= \frac{\gamma mc^2}{\rho} \\ \rightsquigarrow \rho &= \frac{\gamma mc}{eB} \\ &= \frac{\mathcal{E}}{ceB}. \end{aligned} \quad (2.5)$$

Se expressamos \mathcal{E} em GeV , podemos reescrever esta equação usando unidades práticas para que

$$\rho[m] = 3.3 \frac{\mathcal{E}[GeV]}{B[T]}. \quad (2.6)$$

Definindo agora a frequência característica ou frequência crítica ω_c associada a uma dada fonte de síncrotron em termos de γ e ω_0 , temos que

$$\omega_c = \frac{3}{2}\gamma^3\omega_0 = \frac{3}{2}\gamma^3\frac{c}{\rho}. \quad (2.7)$$

A energia crítica, $E_c = \hbar\omega_c$ divide exatamente o total da energia emitida pelo *Bending magnet* pela metade. Como ρ é proporcional a \mathcal{E} (Equação (2.5)), podemos reexpressar a

[†]A magnitude de um campo elétrico radial necessário para induzir uma força centrípeta comparável à força de Lorentz induzida por um campo magnético seria um valor de 109 Vm^{-1} !

equação acima em unidades práticas [111]

$$\hbar\omega_c[keV] = 0.665\mathcal{E}^2[GeV]B[T]. \quad (2.8)$$

Existem basicamente duas grandezas importantes que podem ser usadas para caracterizar as propriedades do feixe emitido de várias fontes de luz: o fluxo e o brilho [114]. O fluxo é definido como o número total de fótons por segundo por unidade 0.1 \% de largura de banda "bandwidth", em unidade angular θ ao longo do plano orbital, e integrado ao longo do ângulo vertical de abertura. O brilho descreve essencialmente como o fluxo é distribuído no espaço e na faixa angular e determina o menor ponto no qual o feixe de raio-x pode, em princípio, ser focalizado [111, 115, 116]. Ambos são definidos como:

$$Fluxo = \frac{d\phi}{d\phi} [f\acute{o}tons/s/0.1\%bw/mrad\theta] \quad (2.9)$$

$$Brilho = \frac{d^2 F_B}{d\theta d\psi} [f\acute{o}tons/s/0.1\%bw/mrad^2]. \quad (2.10)$$

2.6 Fonte de radiação por dipolo (*Bending Magnets*)

Em geral, a radiação é caracterizada pelos seguintes termos: faixa espectral, fluxo de fótons, densidade de fluxo de fótons, brilho e polarização. O fluxo de fótons é o fluxo total coletado por um experimento e atingindo a amostra, a densidade de fluxo de fótons é o fluxo por área na amostra, e o brilho é o fluxo por área e ângulo de abertura.

Os *Bending Magnets* (BMag) nos anéis de armazenamento são as principais fontes de radiação. O objetivo principal do BMag é fazer circular o feixe de elétrons em um caminho fechado. Como o elétron é forçado a se mover em um arco através do campo magnético por BMag, ele produz radiação em um cone achatado (Figura 2.7b) [111-113]. A fonte BMag produz um feixe de ângulo de abertura vertical fixo $\psi \approx \gamma^{-1}$ (divergência

A forma e intensidade da radiação cônica de acordo com a teoria do Schwinger é dado por:

$$\frac{d^2 F_B}{d\theta d\psi} = \frac{3\alpha}{4\pi^2} \gamma^2 \frac{\Delta\omega}{\omega} \frac{I}{e} y^2 (1 + X^2) \left[K_{2/3}^2(\xi) + \frac{X^2}{1 + X^2} K_{1/3}^2(\xi) \right], \quad (2.11)$$

onde:

F_B = Fluxo de fótons (número de fótons por segundo).

θ = ângulo de observação no plano horizontal.

ψ = ângulo de observação no plano vertical.

α = constante de estrutura fina = (1/137).

γ = $\mathcal{E}/m_e c^2$ (\mathcal{E} = energia do elétron, m_e = massa do elétron, c = velocidade da luz).

ω = frequência angular do fóton ($\varepsilon = \hbar\omega$ = energia de fóton).

I = Corrente de feixe.

e = carga do elétron = 1.602×10^{-19} coulomb.

y = $\omega/\omega_c = \varepsilon/\varepsilon_c$.

ω_c = frequência crítica.

ρ = raio de curvatura instantanea da trajetoria do elétron.

E = energia do feixe de elétrons.

B = campo magnético.

$\varepsilon_c = \hbar\omega_c$

$X = \gamma\psi$.

$\xi = y(1 + X^2)^{3/2}/2$.

As expressões de K são as funções de Bessel modificadas de segunda espécie.

O fluxo de fótons da radiação síncrotron proveniente de um BMag é dado pela equação (2.11), integrada ao longo de todo o ângulo vertical. No plano horizontal, o cone emitido

é constante e, portanto, o fluxo de fóton é proporcional ao ângulo θ aceito no plano horizontal:

$$\frac{dF_B(y)}{d\theta} = 2.458 \cdot 10^{13} \frac{\text{pótons}}{s \cdot 0.1\%bw \cdot mrad} \cdot E(\text{GeV}) \cdot I(A) \cdot \theta(\text{mrad}) \cdot G_1\left(\frac{\varepsilon}{\varepsilon_c}\right) \quad (2.12)$$

Na direção horizontal ($\psi = 0$), a equação (2.11) torna-se:

$$\left. \frac{d^2 F_B}{d\theta d\psi} \right|_{\psi=0} = \frac{3\alpha}{4\pi^2} \gamma^2 \frac{\Delta\omega}{\omega} \frac{I}{e} H_2(y), \quad (2.13)$$

onde

$$H_2(y) = y^2 K_{2/3}^2(y/2). \quad (2.14)$$

Em unidades práticas [$\text{fótons} \cdot s^{-1} \cdot \text{mrad}^2 \cdot (0.1\%bw)^{-1}$] [120],

$$\left. \frac{d^2 F_B}{d\theta d\psi} \right|_{\psi=0} = 1.327 \times 10^{13} E^2[\text{GeV}] I[A] H_2(y). \quad (2.15)$$

2.7 UVX - Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

O UVX é uma Fonte de Luz Síncrotron de segunda geração [121] situado no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) na cidade de Campinas - SP - Brasil (Figura 2.8), opera com feixes de elétrons à energia de 1.37 GeV. O sistema de injeção inclui um acelerador linear de 120 MeV, e um *Booster* de 500 MeV [122].

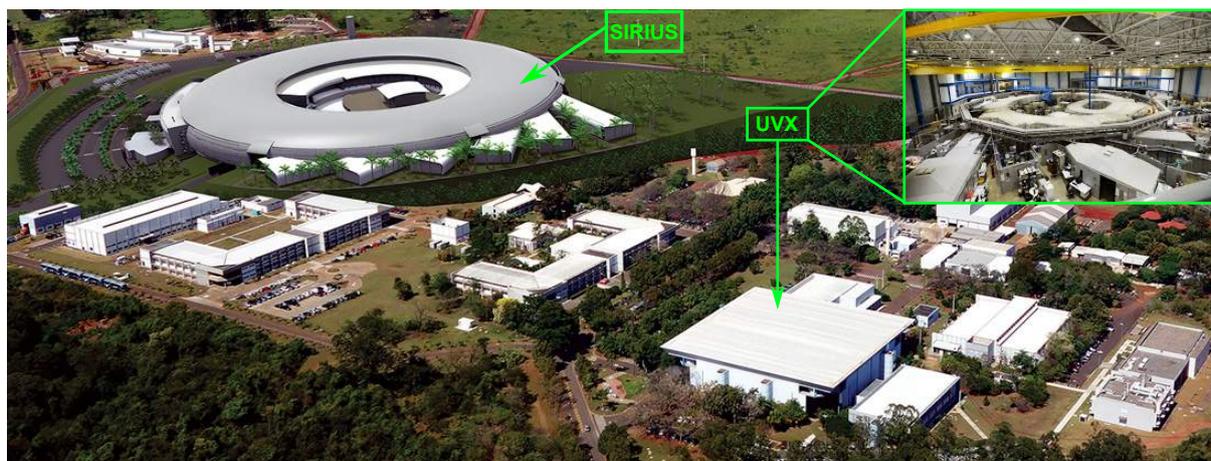


Figura 2.8: Campus CNPEM - LNLS - Campinas, Brasil. Figura adaptada de [123]

É composto por uma rede "*double-bend achromats*" DBA (acromáticos de dupla curva) [124] de simetria sextupla. Esta rede inclui 12 dipolos de $1.67\ T$, 36 quadrupolos e 18 sextupolos. A rede magnética do síncrotron *Booster* inclui 12 dipolos em dois arcos acromáticos de 180° baseados em células FODO [125].

Considerando as duas saídas de cada dipolo de $1.67\ T$, a 4° e 15° , a simetria sextuplada rede resulta em quatro tipos de fonte de radiação de acordo com o tamanho e divergência do feixe síncrotron, que é detalhado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Características do feixe para as suas determinadas fontes de radiação [122].

Fonte	Tamanho FWHM (mm)	Divergência FWHM ($mrad$)
Dipolos a 14°	0.87×0.17	1.9×0.05
Dipolos (pares) a 4°	0.92×0.15	3.0×0.05
Dipolos (ímpares) a 4°	1.10×0.20	0.9×0.05

2.8 Linha de Luz IMX

A linha de luz de microtomografia por raios X (IMX) coleta a radiação síncrotron emitida por um dipolo D6 de campo magnético de $1.67 T$ e raio de curvatura de $2.736 m$. Esta linha foi projetada para operar com feixe monocromático ou policromático. No caso de feixe policromático, o monocromador é removido do caminho do feixe, utilizando assim um feixe branco (rosa)[‡] cujo espectro de energia abrange desde $5 keV$ a $20 keV$ [123]. O fluxo que sai do anel para a linha IMX pode ser calculado utilizando a equação 2.15 com os parâmetros do UVX ($E = 1.37 GeV$ e $I = 0.25 A$), a Figura 2.9 apresenta o fluxo em função da energia.

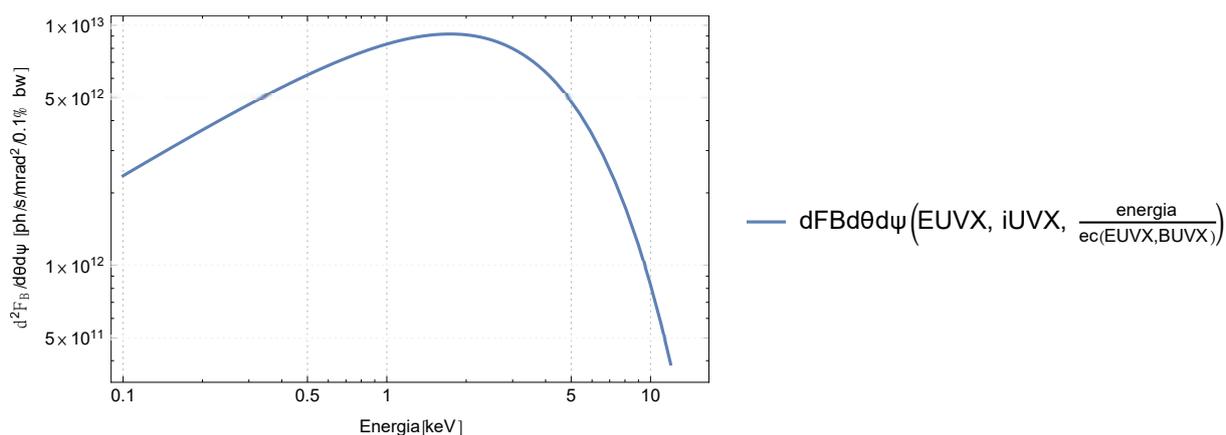


Figura 2.9: Espectro do fluxo do D6 da IMX em função da energia.

Na Figura 2.10 se apresenta o esquema experimental da IMX. Na entrada da linha de luz, o feixe policromático é condicionado por fendas, garantindo que o feixe tenha um tamanho e formato adequados. Em seguida, o feixe atravessa uma janela de Berílio (com $125 \mu m$ de espessura) resfriada por água na entrada da câmara que abriga o monocromador. Na sequência, ele atravessa uma nova janela de Berílio já na saída da câmara do monocromador e que também separa um pequeno trecho já sem vácuo do alto vácuo

[‡]O feixe efetivo incidindo na amostra é um feixe rosa, devido a que o feixe branco sofre efeitos de filtragem durante o trajeto até atingir à amostra

da câmara. Em frente a essa segunda janela está montado um obturador que controla o tempo de incidência do feixe na amostra. O feixe passa por um caminho de vácuo, selado por janelas de Kapton (espessura de $25\ \mu\text{m}$) evitando assim a atenuação do feixe. Para melhor controle da energia do feixe policromático, está disponível um sistema de filtros composto por três filtros de $350\ \mu\text{m}$ e um de $200\ \mu\text{m}$ de espessura de Silício (Si) altamente polidos e controlados remotamente pelo usuário da linha. Esses filtros auxiliam na medição de amostras muito densas que absorvem os raios X ou para amostras muito frágeis, pois bloqueiam a passagem do espectro de mais baixa energia. Por fim, mais um último sistema de fendas faz o condicionamento, com alta precisão, do tamanho e formato do feixe antes do contato com a amostra [123].

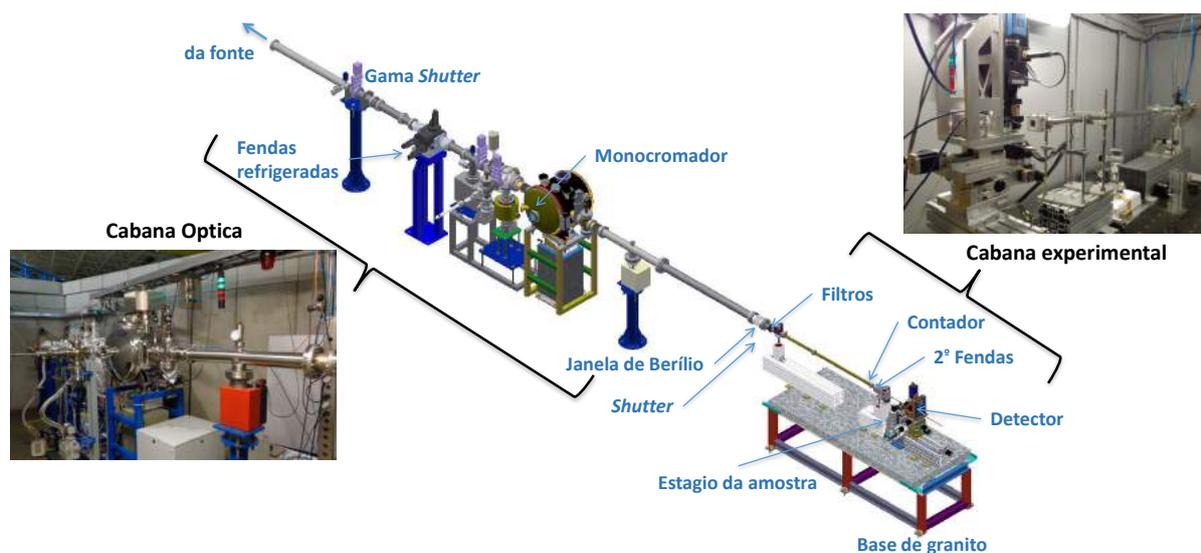


Figura 2.10: Esquema experimental da linha de luz IMX (LNLS).

2.8.1 Caraterística do feixe incidente

No presente trabalho, todas as medidas de SR- μ CT foram feitas utilizando o feixe policromático (ou feixe rosa). Os filtros utilizados para as medidas foram de 550, 700 e 900 μ m de Si. Na figura 2.11 se mostra a simulação do fluxo do feixe (Espectro mostrado na Figura 2.9) sem filtro e junto com cada espessura de filtro, pode-se notar que os filtros afetam até uma ordem de grandeza na intensidade do fluxo, bloqueando os fótons de baixas energias progressivamente conforme aumenta a espessura.

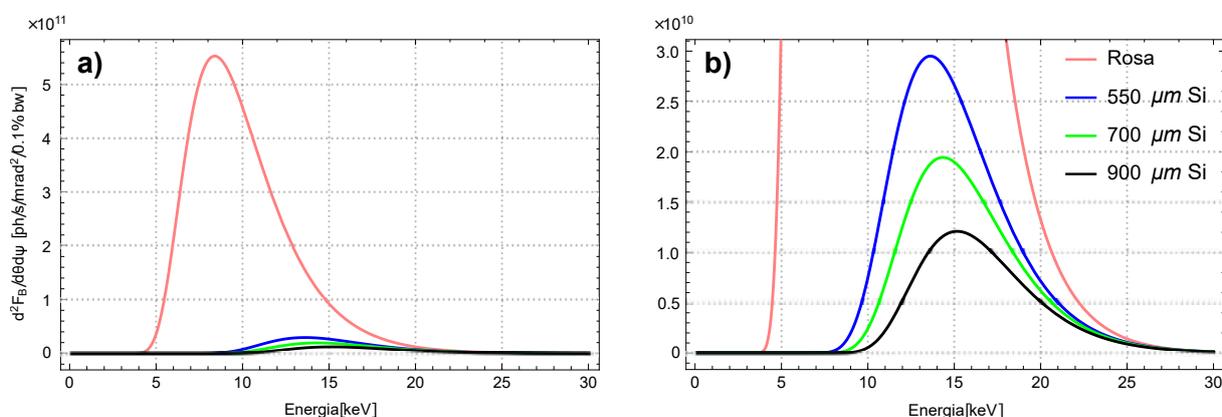


Figura 2.11: Fluxo do feixe disponível que incide na amostra. A figura apresenta o fluxo do a) Feixe rosa (sem nenhum filtro) e com diferentes filtros (detalhados em b)).

Esta configuração influencia diretamente na qualidade e tempo de medida de SR- μ CT devido à diminuição do fluxo de raio-X o tempo total para cada medida aumenta consideravelmente, mas o fato de bloquear as baixas energias e endurecer o feixe garante um bom feixe transmitido a traves da amostra.

2.9 Interação de raios X com a matéria

Para obter uma imagem por meio de raios X, uma amostra requer interação com a radiação e a penetração na amostra, para produzir um contraste na tela do detector. A imagem é devida ao fato de que os raios X atenuam-se quando viajam através de um material [127]. As imagens de transmissão registram a atenuação em uma forma de mapas de atenuação 2D. A atenuação é causada principalmente pela absorção fotoeletrônica e espalhamento de Compton (Figura 2.12) [128].

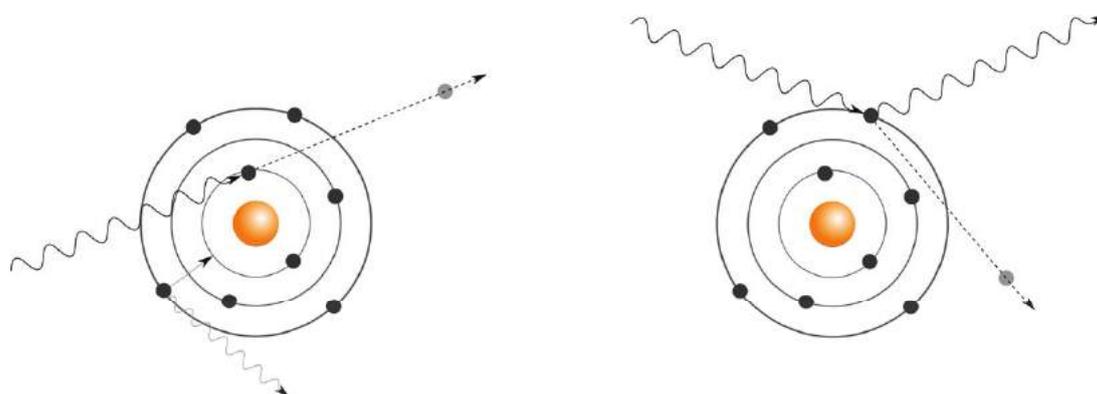


Figura 2.12: Dois mecanismos de atenuação dos fótons de raios X. Na absorção fotoeletrônica (esquerda), os fótons são removidos do feixe; e no espalhamento Compton (direita), a direção dos fótons é alterada. Figura adaptada de [128]

Para raios X de comprimento de onda simples, a atenuação pode ser descrita pela lei de Beer-Lambert [129]:

$$I = I_0 \cdot e^{-\mu x}, \quad (2.16)$$

e para um feixe policromático a equação (2.16) torna-se:

$$I = \int I_0(E) e^{-\mu(E)x} dE, \quad (2.17)$$

onde I é a intensidade de raio X transmitido, I_0 é a intensidade inicial do raio X, μ é o coeficiente de atenuação linear, e x é a espessura do material. Na equação (2.17), E descreve a

energia, e a integral é calculada sobre o espectro dado. O coeficiente μ correlaciona-se com a densidade do material e, portanto, a intensidade total do raio-X transmitido depende da espessura e da densidade do material. Muitas vezes o coeficiente de atenuação linear é normalizado com a densidade do material, resultando num coeficiente de atenuação de massa μ/ρ . A função de atenuação se torna:

$$\frac{I}{I_0} = e^{\left(-\frac{\mu}{\rho} m_x\right)},$$

onde m_x é a espessura da massa do material (ou seja, espessura multiplicada pela densidade). O coeficiente de atenuação de massa depende da energia e é determinado individualmente para cada material. A equação (2.16) pode ser escrita como:

$$\frac{\mu}{\rho} = -\frac{\ln \frac{I}{I_0}}{x}.$$

Nesta equação, o coeficiente de atenuação da massa pode ser determinado para o fator de atenuação desejado e a energia do feixe correspondente. Para misturas e compostos, o coeficiente de atenuação da massa é determinado por:

$$\frac{\mu}{\rho} = \sum_i w_i \cdot \left(\frac{\mu}{\rho}\right)_i,$$

onde, w_i é a fração em peso do i -componente atômico e $(\mu/\rho)_i$ é o coeficiente de atenuação de massa correspondente.

2.10 Microtomografia de raios X

A palavra tomografia vem do grego tomo (corte) ou tomos (parte ou seção) e graphein (gravação). Tomografia computadorizada (CT) significa inspecionar um objeto para obter uma imagem tridimensional dele, incluindo a estrutura interna. Isso é feito tirando uma série de imagens de projeção radiográfica de uma ou duas dimensões de um objeto que gira num único eixo de rotação. As projeções são adquiridas por uma câmera detetora (CCD). No caso de projeção unidimensional, apenas uma linha de detector seria computada para a reconstrução da fatia de um objeto. No caso bidimensional, isso deve ser feito para qualquer detector ou linha de pixels, respectivamente. Desse modo, no caso bidimensional, ganha-se uma pilha de fatias de reconstrução bidimensionais do objeto em paralelo e, portanto, uma imagem tridimensional em termos de um pacote de fatias de uma vez [126]. A esquematização dos processos desde a aquisição até a reconstrução é mostrada na Figura 2.13.

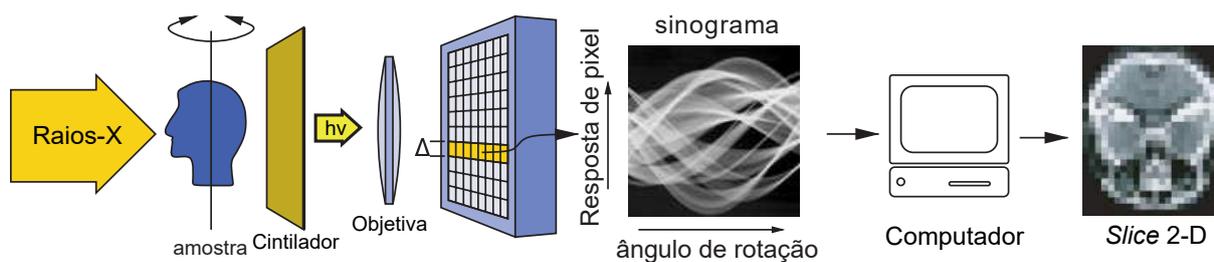


Figura 2.13: Princípio da microtomografia por raios-X. Um feixe paralelo de raios X é permitido passar através de uma amostra, e o sinal transmitido é detectado por um cintilador, que é opcionalmente ampliado usando uma lente objetiva de microscópio em uma câmera CCD. A resposta de cada fileira de pixels (altura) como uma função do ângulo de rotação da amostra, os chamados "sinogramas", é coletada em um computador, a partir do qual tomogramas bidimensionais são gerados. Finalmente, a reconstrução 3-D é criada a partir da pilha de tomogramas 2-D. Figura adaptada de [111]

2.11 Reconstrução tomográfica

Uma tomografia é uma imagem 3D de um objeto, reconstruída a partir de projeções de raios-X tiradas de diferentes ângulos de um objeto, conforme apresentado na seção 2.10. As imagens de projeção radiográfica tomadas devem ser transferidas matematicamente em imagens projetadas, a fim de reconstruí-las para uma imagem tomográfica.

A maioria dos softwares de reconstrução usa a transformada de Radon [130] e seu inverso como a base matemática para a reconstrução de imagens tomográficas [127]. Esta função é muitas vezes referida como um sinograma devido a que a transformação de Radon de uma fonte pontual fora do centro é uma sinusóide [131].

2.11.1 Método de retroprojeção filtrada (FBP)

Cada tomografia é reconstruído a partir do seu respectivo sinograma usando um dos vários algoritmos baseados na Transformada de Radon, como foi dito anteriormente, o método de retroprojeção filtrada, FBP, por suas siglas em inglês (*Filtered Backprojection*) pode ser descrito considerando um disco absorvente 2D como mostrado na Figura 2.14. Em uma direção, o perfil de absorção radiográfica é registrado. Essa projeção é executada de volta pela imagem, onde a intensidade da projeção é distribuída igualmente entre todos os pixels ao longo de cada caminho do feixe. Isso é repetido para um conjunto de ângulos de projeção de 0-180 graus, sendo que para cada ângulo a projeção é adicionada à imagem. Quanto menor o deslocamento angular, mais próximo o conjunto final de projeções posteriores se assemelha ao objeto original (Figura 2.14)

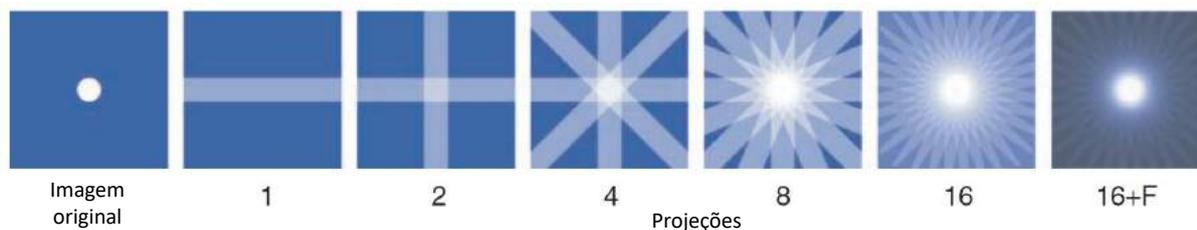


Figura 2.14: Ilustração da retroprojeção filtrada. O perfil de transmissão de um disco absorvente gravado em várias direções. As regiões no espaço em que as projeções posteriores se sobrepõem são somadas. Quanto mais projeções são adicionadas, mais próximo o somatório delas se assemelha ao objeto original. No entanto, isso gera artefatos de deslocalização na imagem reconstruída, mas que podem ser suprimidos aplicando um filtro (F). Figura adaptada de [111]

A operação de retroprojeção simplesmente propaga o sinograma medido de volta ao espaço da imagem ao longo dos caminhos de projeção. A reconstrução é feita por fórmulas analíticas ou métodos iterativos. A abordagem matemática clássica é dada pelo algoritmo clássico de retroprojeção filtrada [132].

A figura [2.15] representa as fatias (*slices*) de uma reconstrução 3D. Cada (*Slice*) dentro de um bloco é representada por uma função bidimensional $f(x)$, sendo x um pixel bidimensional na imagem reconstruída. Uma sequência de projeções P é medida, cada uma para ângulo θ , determinando uma imagem G com coordenadas (t, θ) [133].

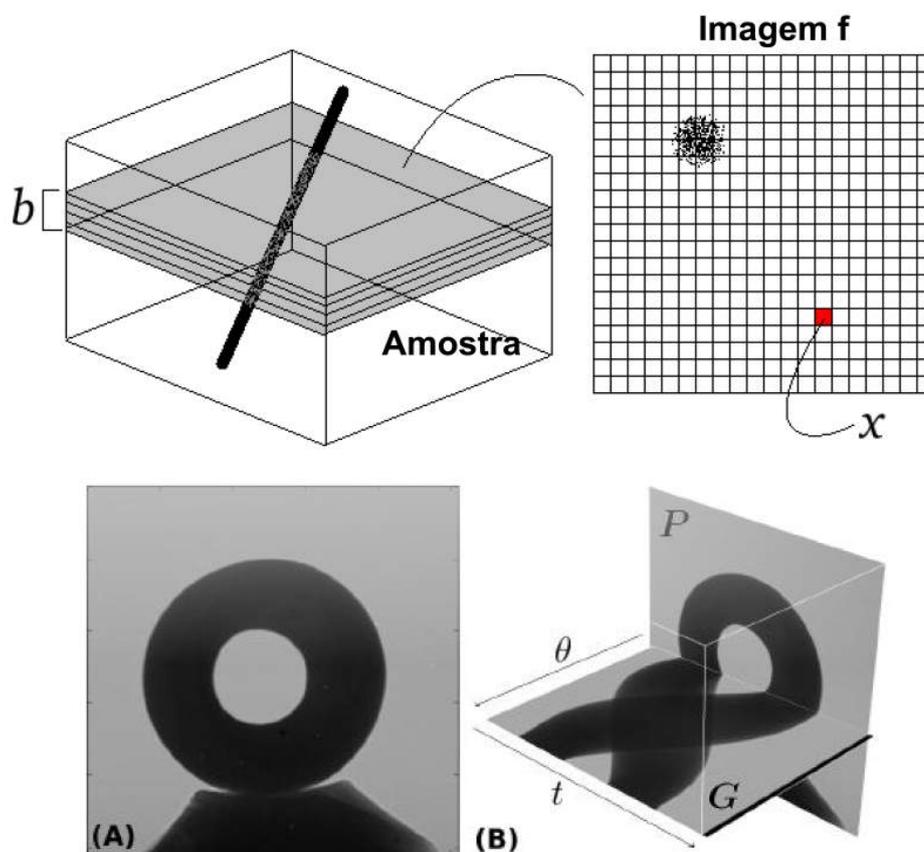


Figura 2.15: Reconstrução das imagens. Esquerda: representação 3D de uma amostra arbitrária. Direita: representação de imagem de uma fatia dentro de um bloco de tamanho b . A imagem P indica uma imagem de projeção, enquanto G é referenciada como um sinograma. [133]

Cada pixel x tem uma intensidade $f(x)$ indicando o coeficiente de absorção linear. A imagem $G(t, \theta)$ é uma realização discreta da transformação Radon (\mathcal{R}), um operador integral definido como:

$$G(t, \theta) = \int_{\mathbb{R}^2} f(x) \delta(t - x \cdot \xi_\theta) dx, \quad \xi_\theta = (\cos \theta, \theta),$$

Se $G = \mathcal{R}f$, e f é uma função de fonte pontual (uma distribuição delta), a função G comporta-se como uma sinusóide no espaço (t, θ) . Esta é a razão pela qual as imagens G são chamadas de sinogramas. A transposição da Transformada de Radon fornece outro operador integral, chamado de retroprojeção \mathcal{B} . O operador de retroprojeção \mathcal{B} opera sobre sinogramas fornecendo uma versão desfocalizada da função original f . A ação de \mathcal{B}

sobre um sinograma é determinar uma média das medições em todas as linhas retas que passam por um pixel x . A definição de \mathcal{B} sobre o sinograma H é:

$$\mathcal{B}H(x) = \int_0^\pi H(x \cdot \xi_\theta, \theta) d\theta.$$

onde H é uma filtragem passa baixa de G sobre o eixo t , $\mathcal{B}H$ determina o inverso de f por meio do algoritmo de retroprojeção filtrada. Um filtro passa baixa é calculado através de uma convolução, normalmente calculada usando outro operador integral, a transformada de Fourier [133].

Na reconstrução, artefatos típicos como *rings* e *arcs* são corrigidos e reduzidos. O algoritmo de reconstrução é chamado de RAFT [134].

2.12 Microfluorescência de raios X por radiação síncrotron (μ XRF)

Entre os métodos de microsonda de raios X baseados na radiação síncrotron, a microfluorescência de raios X (μ XRF) é um método diferenciado. Essa técnica tem sido usada com sucesso em círculos acadêmicos em diversas aplicações, como ciências materiais, arqueológicas e biológicas. Esta técnica analítica fornece informações sobre a composição química. Quando o raio X incide na amostra, ele interage por efeito fotoelétrico com a superfície do material que emite radiação característica dos átomos presentes na amostra. Essa radiação emitida é chamada de radiação fluorescente de raios X e é específica para cada material. As radiografias fluorescentes emitidas pelo material são coletadas por um detector de estado sólido e, quando associadas a um analisador multicanal, produzem um espectro que envolve a intensidade característica dos raios X (número de contagens por segundo) de cada elemento químico e sua energia. Quando a fluorescência de raios X está associada a uma fonte de radiação síncrotron, muitas vantagens, como alta energia, sintonização e polarização dos raios X, podem ser alcançadas com relação à fonte de raios

X usual [135].

2.13 Geração de imagem por SEM

De maneira geral, existem dois tipos diferentes de respostas eletrônicas ao feixe de elétrons na superfície da amostra: elétrons retroespalhados (BSE) e elétrons secundários (SE) [136]. Elétrons primários, que são espalhados através de 90° e 180° , e emergem de volta da superfície da amostra são chamados BSE. Os elétrons primários transmitidos e BSE podem ter experimentado dispersão elástica ou inelástica. Os SE são gerados por vários mecanismos de dispersão inelásticos. Os mais comuns são os SE lentos, que são ejetados com pouca energia ou elétrons de valência com energias de entre $0-50\text{ eV}$ muito baixas [137]. A intensidade é visualizada pelo detector de BSE, que está localizado diretamente sob a saída da coluna de elétrons (Figura 2.16), fornecendo material de contraste.

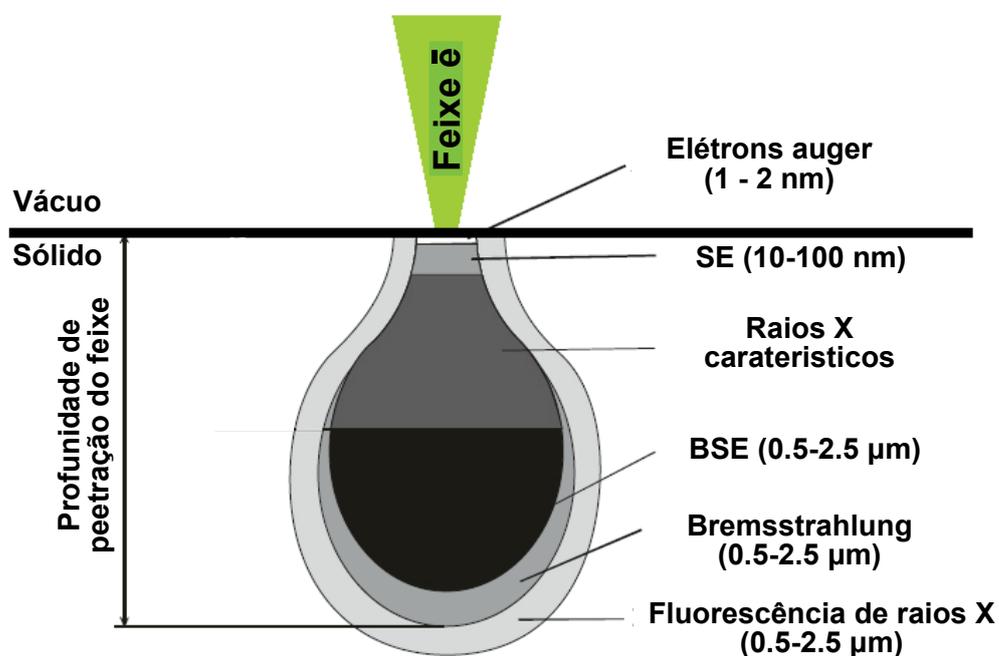


Figura 2.16: Interação de elétrons primários incidentes com a amostra. Diferentes interações conforme aumenta a profundidade. Figura adaptada de [126]

Capítulo 3

Síntese e preparação de amostras

Este capítulo apresenta os procedimentos utilizados para: i) a síntese da hidroxiapatita carbonatada (cHA) e da hidroxiapatita carbonatada dopada com zinco (Zn-cHA), ii) o processamento das microesferas dos biomateriais, iii) os modelos animais estudados, e iv) a implantação das amostras em defeitos de tíbia e calvaria de ratos junto com o controle (defeito sem material). O fluxograma da Figura [3.1](#) representa os processos de preparação de amostras.

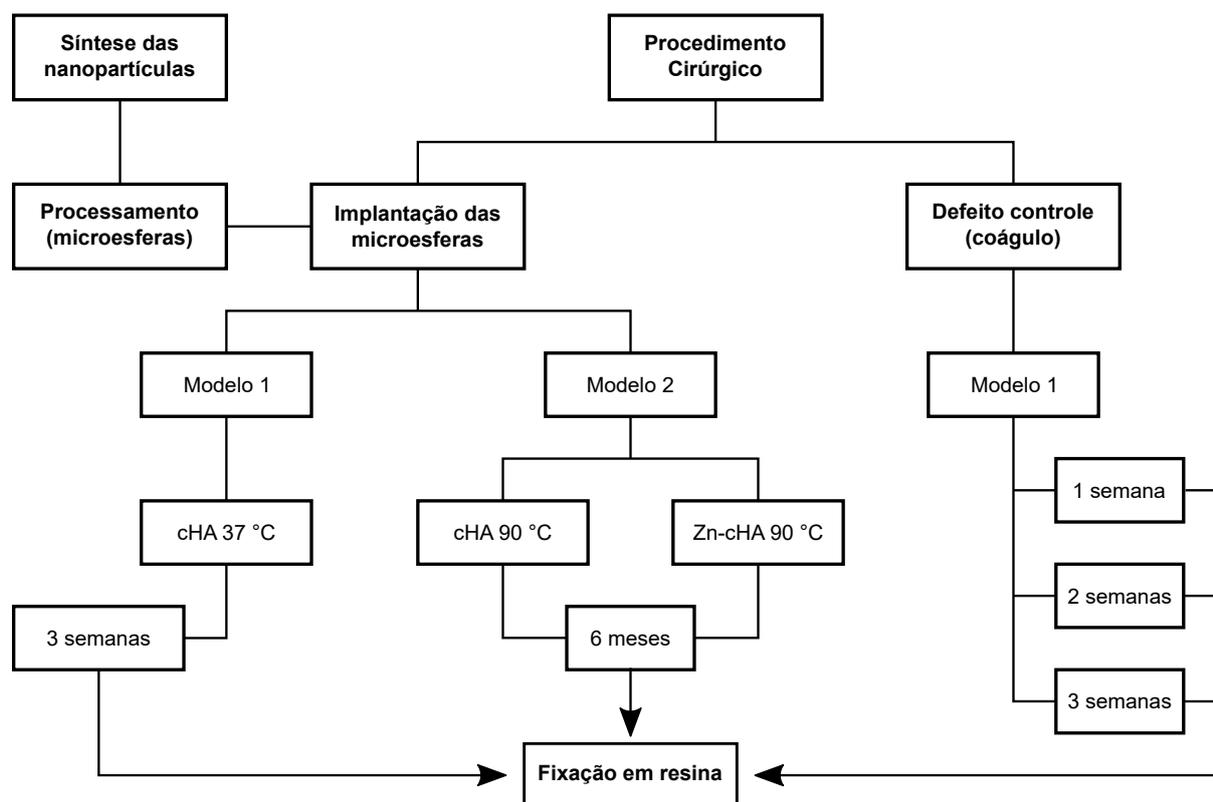


Figura 3.1: Fluxograma representando o processo de preparação de amostras. Começando com a síntese e processamento da microesfera para implante no modelo 1 (defeito em tibia) e modelo 2 (defeito em calvaria), utilizando como controle um defeito unicamente com coágulo.

3.1 Sínteses das nanopartículas (pó)

As amostras foram sintetizadas no laboratório de Biomateriais do CBPF. A síntese das nanopartículas de cHA e Zn-cHA foi feita por via úmida com teor teórico de 6% wt CO_3 , 5 % wt de zinco (para o Zn-cHA) e razão Ca/P ~ 1.67 . O método consiste em: adicionar uma solução aquosa de 0.12M de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, contendo 0.0012M de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ a uma solução de 0.2M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Para a síntese da Zn-cHA adiciona-se 0.00098M de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ à solução de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. A precipitação ocorre em pH= 9 e temperatura de 37 e 90 °C. Utilizou-se uma taxa de adição dos reagentes de 30 mL/min e agitação mecânica 240 rpm. Após a adição, o precipitado é envelhecido por 180 min, sob agitação. Uma vez que a fase de digestão é concluída, o precipitado é separado do meio

reacional por filtração, e lavado com água MiliQ até a neutralização do pH (pH= 7). O sólido é seco por liofilização e separado segundo a faixa de granulometria $< 75 \mu m$.

3.2 Processamento das microesferas

O processamento do pó na forma de microesferas é realizado pelo método de extrusão de uma mistura da cHA ou Zn-cHA e o biopolímero alginato de sódio. O pó de cHA ou Zn-cHA é disperso numa solução aquosa de 10 mg/ml de alginato de sódio em uma razão de alginato/apatita de 1:15. Em seguida, a mistura é gotejada numa solução de $CaCl_2$ 0.15M utilizando uma seringa e agulha de 0.7 mm de diâmetro. As microesferas são formadas após a geleificação do alginato durante 24 hs, na solução de $CaCl_2$ por 24 hs. O material é, então, seco durante 12 hs a 30 °C, em estufa.

3.3 Modelos *in vivo* estudados

No presente trabalho utilizou-se dos modelos de defeitos criados em ratos wistar. No primeiro modelo (Modelo 1), produz-se uma abertura circular de 2 mm de diâmetro na região central da diáfise da tíbia por meio de um processo cirúrgico (detalhes no Apêndice A). No segundo modelo (Modelo 2), realiza-se uma abertura circular de 8 milímetros na região mediana do crânio. As regiões dos modelos são ilustrados na Figura [3.2](#). O modelo 2 denomina-se defeito crítico. Ele estabelece uma dimensão para o defeito (8 mm de diâmetro) onde o sistema não tem condição de repará-lo completamente de forma espontânea, sendo requerido um agente externo (enxerto ou materiais osteocondutores) [\[138\]](#).

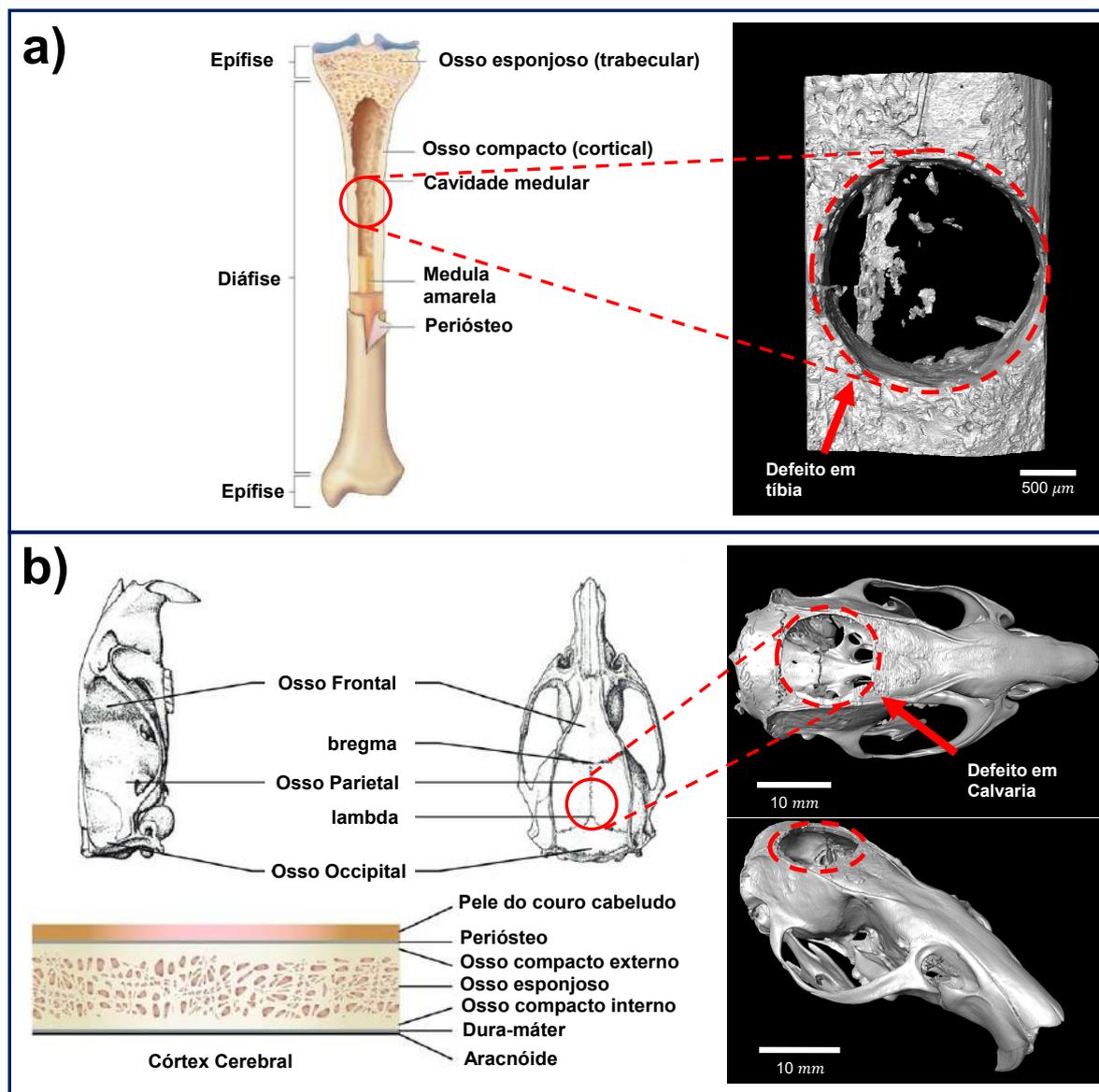


Figura 3.2: Modelo de defeitos estudados. Esquerda, regiões do defeito; direita, μCT de cada modelo. a) Defeito em tíbia; b) defeito crítico em calvaria.

3.4 Implantação dos biomateriais

As microesferas de cHA e Zn-cHA foram esterilizadas num irradiador gama do programa de Engenharia Nuclear da COPPE/UFRJ com doses de 25 kGy. Para os testes biológicos foram utilizados ratos wistar. O procedimento cirúrgico para a implantação dos materiais em defeito de tíbia (2 mm) e em calvaria (8 mm) foi executado pelo grupo

do Departamento de Cirurgia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense. Os tempos experimentais entre a cirurgia e a eutanásia do animal foram de 1, 2 e 3 semanas em tibia; e 6 meses em calvaria.

No modelo de tibia, selecionou-se tempos experimentais curtos (1, 2, e 3 semanas) para estudar a fase inicial do crescimento ósseo, onde os efeitos de cargas mecânicas na arquitetura do osso trabecular ainda não são predominantes. Para o modelo 2, escolheu-se tempos longos para identificar os efeitos da biodegradação do nanomaterial no reparo ósseo.

Após a eutanásia do animal, as tibias e calvarias foram em resina para posterior processamento. Detalhes do procedimento de implantação e das etapas de preparação das amostras em bloco de resina para as análises de microtomografia e microfluorescência de raios X e microscopia eletrônica são detalhados no Apêndice A desta tese.

Capítulo 4

Técnicas experimentais e métodos analíticos

Neste capítulo serão detalhadas as técnicas experimentais utilizadas nas diferentes etapas da tese, junto com os métodos analíticos utilizados para o tratamento dos dados. Uma representação esquemática das diferentes etapas de análise é mostrado no fluxograma da Figura [4.1](#)

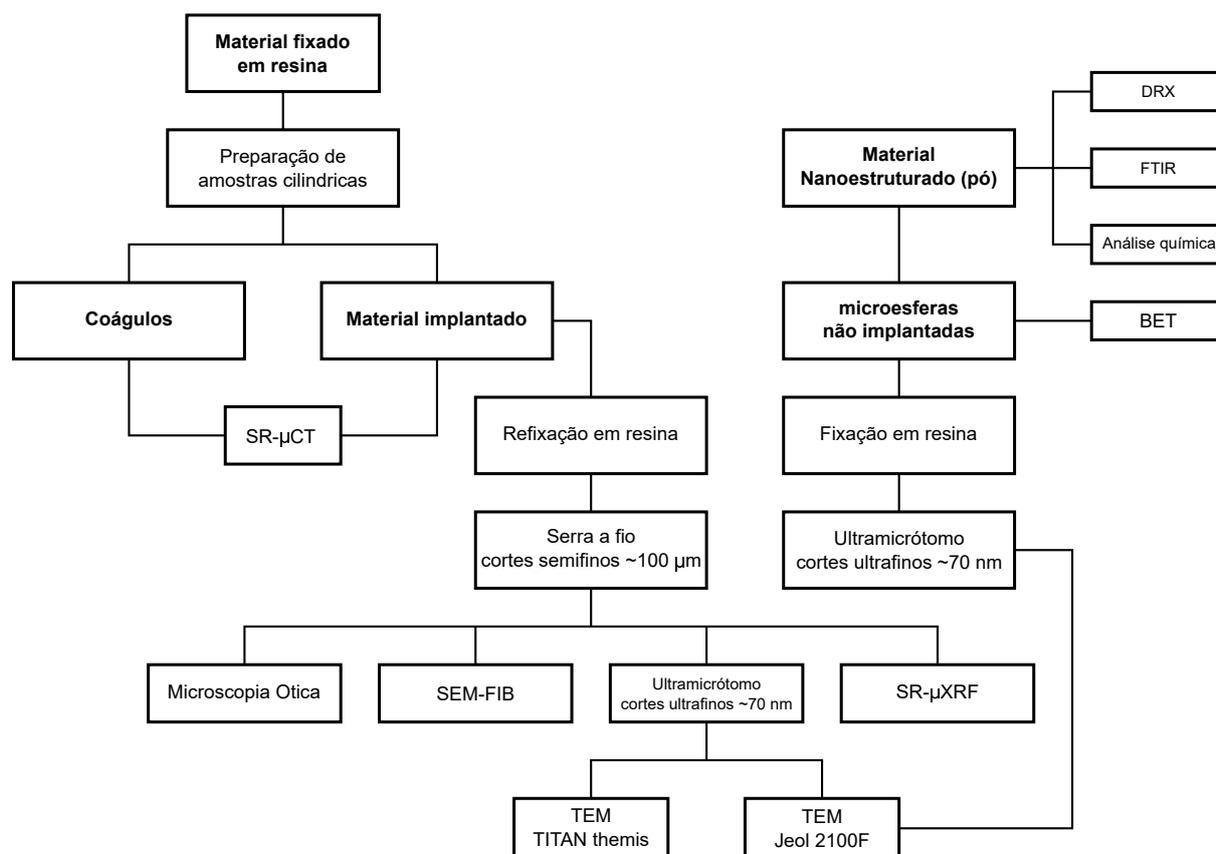


Figura 4.1: Fluxograma representando as etapas de caracterização das amostras junto com os respectivos processamentos necessários para cada técnica.

4.1 Caracterização físico-química das nanopartículas

A estequiometria, estrutura e área específica das amostras cHA e Zn-cHA na forma de pó, foram analisadas por análise química elementar, Difração de raios X (DRX), Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e pela técnica de Brunauer–Emmett–Teller (BET).

4.1.1 Difração de raios X

Para a análise de DRX foi utilizado um difratômetro de pó disponível no Laboratório Multiusuários de Raios X do CBPF, da marca PANalytical, modelo X'Pert Pro, com geometria Bragg-Brentano, cuja fonte de raios X é um tubo de cobre com uma energia de

8.04 keV e comprimento de onda $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$. As condições experimentais das medidas foram numa faixa angular de 10-80°, com passos de 0.02°.

4.1.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

As análises por FTIR foram conduzidas em um espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier IRPrestige-21 Series, do Laboratório de Biomateriais do CBPF, utilizando-se pastilhas de KBr, contendo material numa razão de 1000 (KBr) para 1 (de amostra). A aquisição e análise dos dados foram realizados com o programa Shimadzu IRsolution, com 4 cm^{-1} de resolução.

4.1.3 Análise química e Brunauer–Emmett–Teller (BET)

As análises elementares de Ca e P (e Zn para o Zn-CHA) e relação molar Ca/P foram realizadas com um raio X PW 2400 Espectrômetro Philips a 30 kV. As amostras foram preparadas por fusão com tetraborato de lítio ($\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$). O teor de carbonato foi medido utilizando um Analisador de Enxofre e Carbono SC-144DR (LECO Corp). As amostras foram pulverizadas e mantidas em um forno em uma atmosfera de oxigênio super seco a uma temperatura de 1350 °C, onde foram submetidas a um processo de oxidação e o carbono presente na amostra foi convertido em CO_2 . A área de superfície, o tamanho dos poros e o volume de poros foram determinados pelo método de BET usando um equipamento ASAP 2020 (Micromeritics).

4.2 Técnicas de tomografia

O modelo 1 (defeito em tibia) foi principalmente analisado por técnicas de tomografia, SR- μ CT e nanotomografia SEM-FIB (*Slice and View*), e também, os coágulos como meio de controle e análise da formação óssea desde o início do seu crescimento. Com a finalidade de caracterizar morfologicamente o ordenamento destas estruturas foi estabelecido uma

sequência de análise desde a micro à nanoescala.

4.2.1 Microtomografia de raios X por radiação síncrotron

Primeiramente, partindo da microescala, foi feito um estudo por SR- μ CT analisando internamente a qualidade da formação óssea e como ela interage com o material implantado.

4.2.1.1 Preparação de amostras para SR- μ CT

Os blocos de resina contendo as tíbias com defeitos sem os biomateriais (coágulos) ou com os biomateriais foram processados para as análises de SR- μ CT. A preparação consistiu em cortar os blocos de resina (contendo as amostras) com uma cerra a fio (espessura de fio $\approx 150 \mu m$) disponível no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), no formato de um paralelepípedo (Figura 4.2 e 4.3a-c). Posteriormente, com a ajuda de uma lima foram eliminadas as arestas laterais do bloco, até atingir o formato de cilindros de 1.5 mm e 2.5 mm de diâmetro. Todo o processo foi feito com o cuidado de preservar a maior parte da região de interesse (região do defeito), como é mostrado das Figuras 4.3b,c, em amarelo.

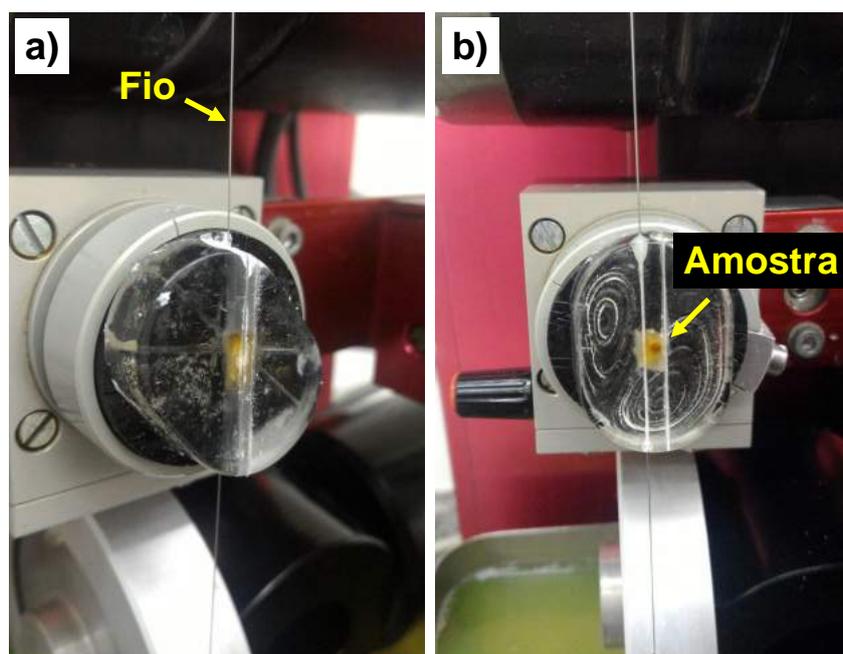


Figura 4.2: Corte de amostras para μ CT. a) Corte inicial; b) Corte da espessura ideal mantendo a região de interesse. Serra: *3242 Precision Vertical Diamond Wire Saw*.

4.2.1.2 Adquisição de dados de SR- μ CT

As medidas de μ CT por radiação síncrotron foram feitas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), na linha de luz de microtomografia por raios X (IMX) [139,140]. O esquema experimental da IMX é representado na Figura 2.10. Foram utilizados dois *setups* experimentais: medidas por contraste de fase com objetiva de $\times 10$ e com objetiva de $\times 5$.

Para a aquisição das imagens, a amostra é colocada na frente do detetor (cintilador) como é mostrado na Figura 4.3d, e iluminada com um feixe policromático (4 – 24 keV). Foi utilizado o modo contraste, podendo assim enxergar detalhes que não são vistos no modo transmissão. Foram adquiridas 1024 e 2048 projeções para medidas de 180° e 360° respectivamente, colocou-se filtros de Si de até $950 \mu m$ para evitar efeitos de *beam hardening* [141]. As características do feixe foi explicado na seção 2.8.1. Na tabela 4.1 se mostram os filtros utilizados para os determinados grupos de amostras.

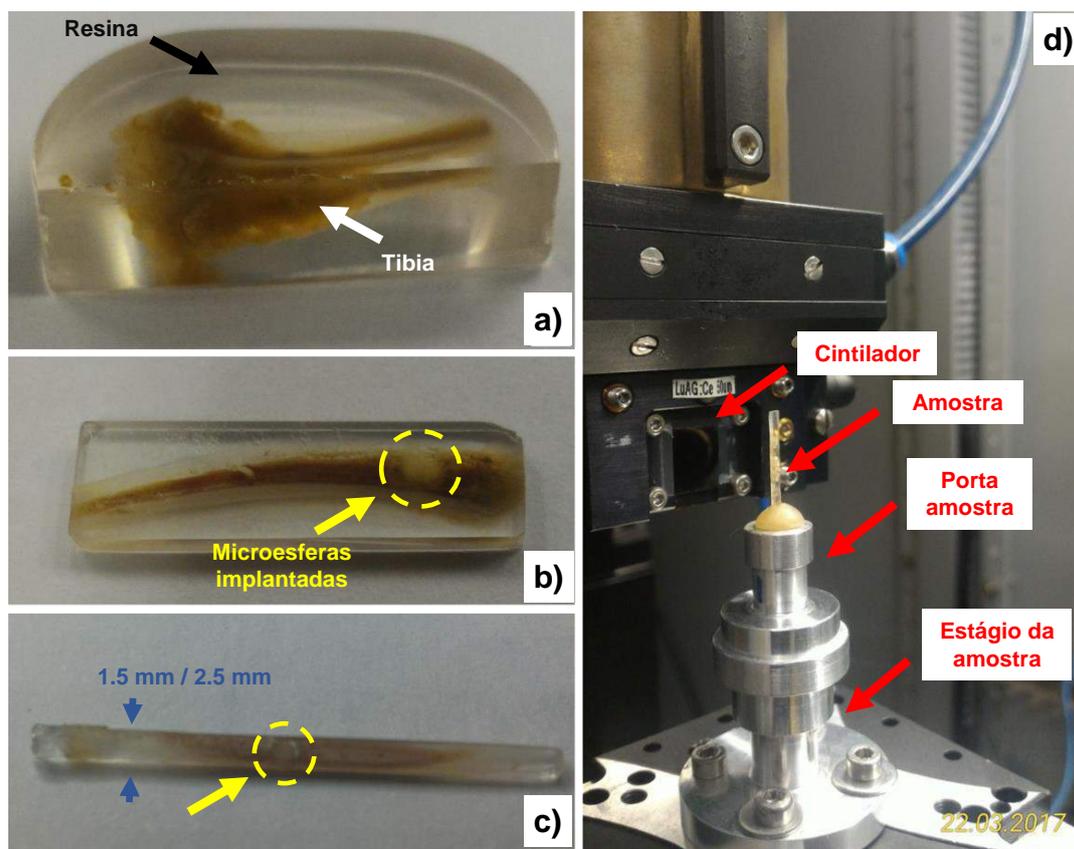


Figura 4.3: *Setup* experimental de medidas de μ CT.

Tabela 4.1: Condições experimentais para cada medida

Amostra	Diâmetro (mm)	Lente Objetiva	Contagem de saturação	Adquisição ($^{\circ}$)	Filtros de Si (μm)
Microesferas	–	$\times 10$	220000	180	550
Coágulo 1 sem	~ 2.5	$\times 10$	290000	360	550
Coágulo 2 sem	~ 2.5	$\times 10$	280000	360	550
Coágulo 3 sem	~ 2.5	$\times 5$	280000	180	900
Implante 3 sem	~ 1.5	$\times 10$	250000	180	700

A reconstrução das imagens foi feita pelo método RAFT [134, 142–144]. Devido ao grande tamanho dos dados foi preciso fazer um recorte prévio da região de interesse. Com isto, pode-se diminuir o tamanho da reconstrução para um melhor desempenho no processamento das imagens. Nesta etapa, utilizou-se o *software* FIJI (ImageJ), [145, 146]. Um exemplo deste procedimento é mostrado na Figura 4.4, onde o dado reconstruído tem um volume em pixels de $2048 \times 2048 \times 2048$ (8GB). Ao recortar somente a região da amostra

o dado a ser processado fica em torno de 55% mais leve $1964 \times 963 \times 2048$ (3.6GB); este redimensionamento depende exclusivamente do tamanho da amostra em relação ao campo de visão da medida.

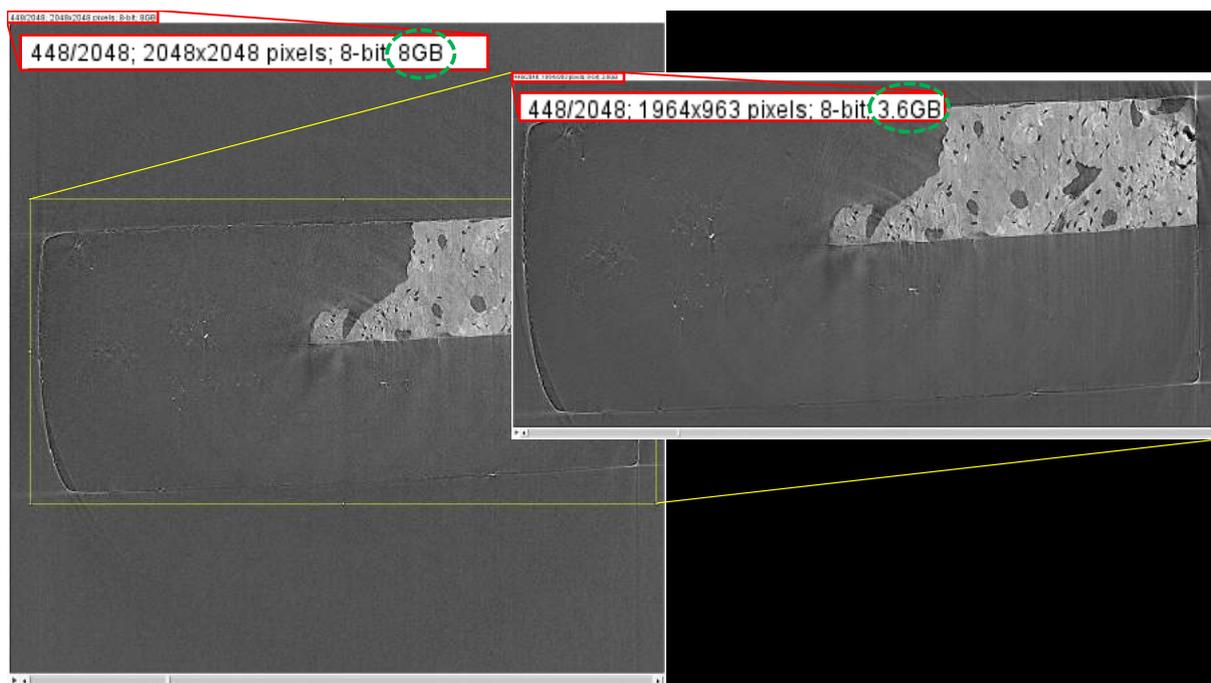


Figura 4.4: Representação de recorte da região de interesse diminuindo drasticamente o tamanho do dado.

4.2.1.3 Segmentação das imagens

Os *software's* FIJI [145] e Avizo 9.5 foram utilizados para cortar e segmentar as imagens nas fases correspondentes, tanto para as microesferas não implantadas quanto para os coágulos e esferas implantadas.

Primeiramente, utilizando o *software* Avizo 9.5, foi aplicado um filtro *non-local means* para diminuir artefatos de reconstrução (ruído, efeito de anéis, etc [147]). Uma vez filtrada a imagem, se procede à segmentação das fases desejadas.

O procedimento tem início com a identificação das fases existentes na amostra analisada: i) biomaterial, poros, e *background* para as esferas não implantadas; e, ii) biomaterial, poros, osso preexistente, osso novo, e *background*, para as amostras implantadas (no caso das amostras de coágulos ignorasse o material). Cada uma destas fases apresentam um intervalo característico de intensidade de cinza (*threshold*) na escala de imagem de 8 bits (0–255). Uma vez identificado o intervalo de *threshold* de cada uma das fases, procede-se à seleção cada região dos elementos correspondentes, cuidando-se de não ultrapassar o intervalo da seleção de uma outra fase (Figura 4.5b). Após a seleção de pelo menos duas fases (tipicamente começando pelo material/osso e *background*) se procede à segmentação via *watershed*, [148] (Figura 4.5b,c). Para a segmentar um número maior de fases numa mesma imagem, executa-se uma segmentação simples via *threshold* e/ou utilizando a ferramenta "*Magic Wand*" do Avizo. Caso necessário, é feita uma segmentação via *watershed* para mais de 3 fases. Um exemplo é mostrado na Figura 4.5a-d, onde foi utilizado o *watershed* para separar o *background* do material. Um *threshold* simples foi suficiente para separar a fase porosa da fase correspondente ao biomaterial. Artefatos como voxéis isolados foram removidos obtendo-se uma segmentação fina para todas as amostras.

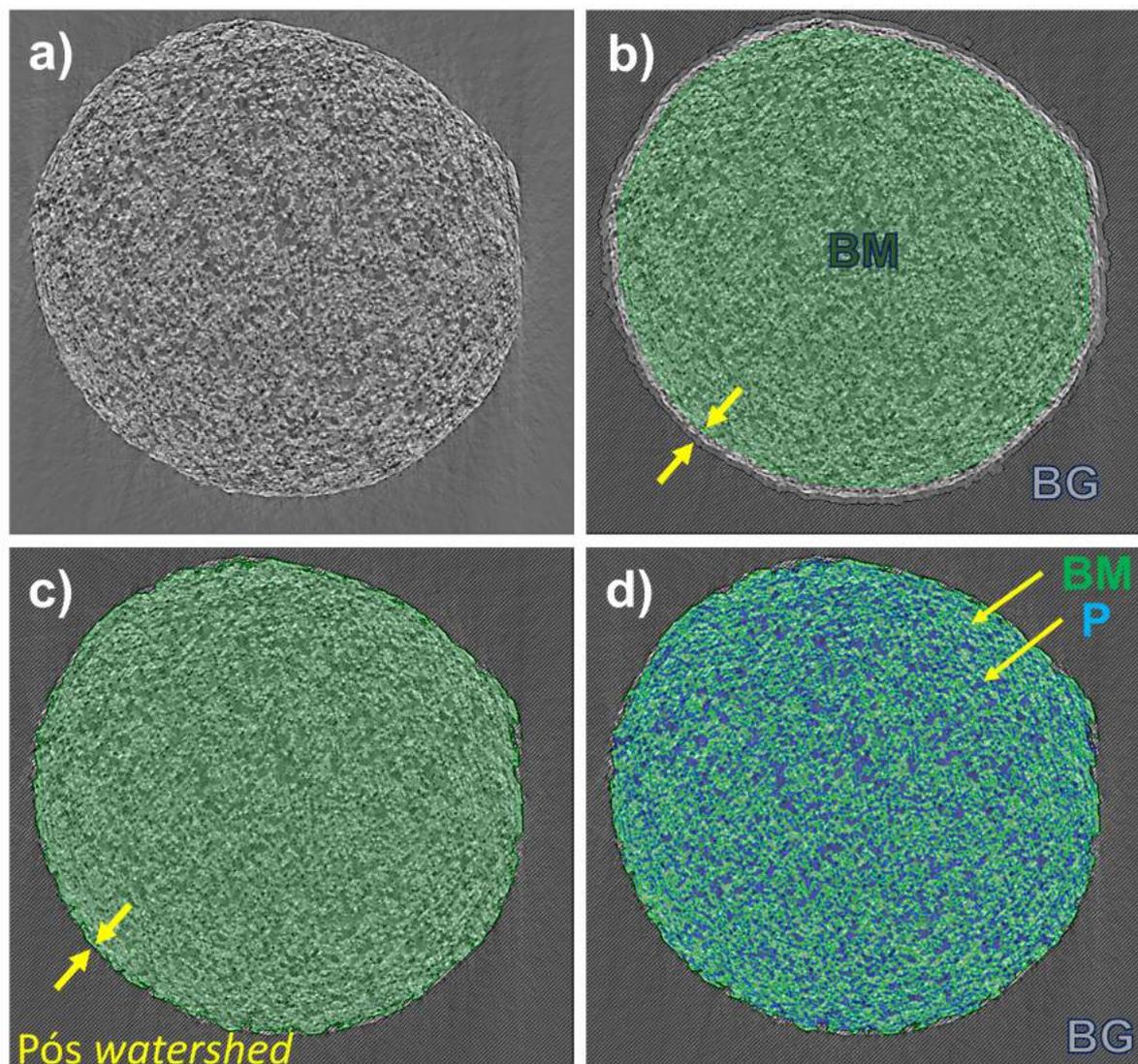


Figura 4.5: Processo de segmentação de fases a partir de uma reconstrução. a) *Slice* reconstruído na região central da microesfera de cHA; b) Seleção interior (BM: Biomaterial) e exterior (BG: *Background*) para a aplicação da segmentação via *watershed*; c) imagem segmentada após *watershed*; d) segmentação final das 3 fases, BM, BG e P (poros).

4.2.2 Tratamento de dados e quantificação

A Figura [4.6](#) mostra um fluxograma das etapas executadas para o tratamento e quantificação dos dados obtidos por SR- μ CT. Os itens seguintes desta secção descrevem cada etapa do processo.

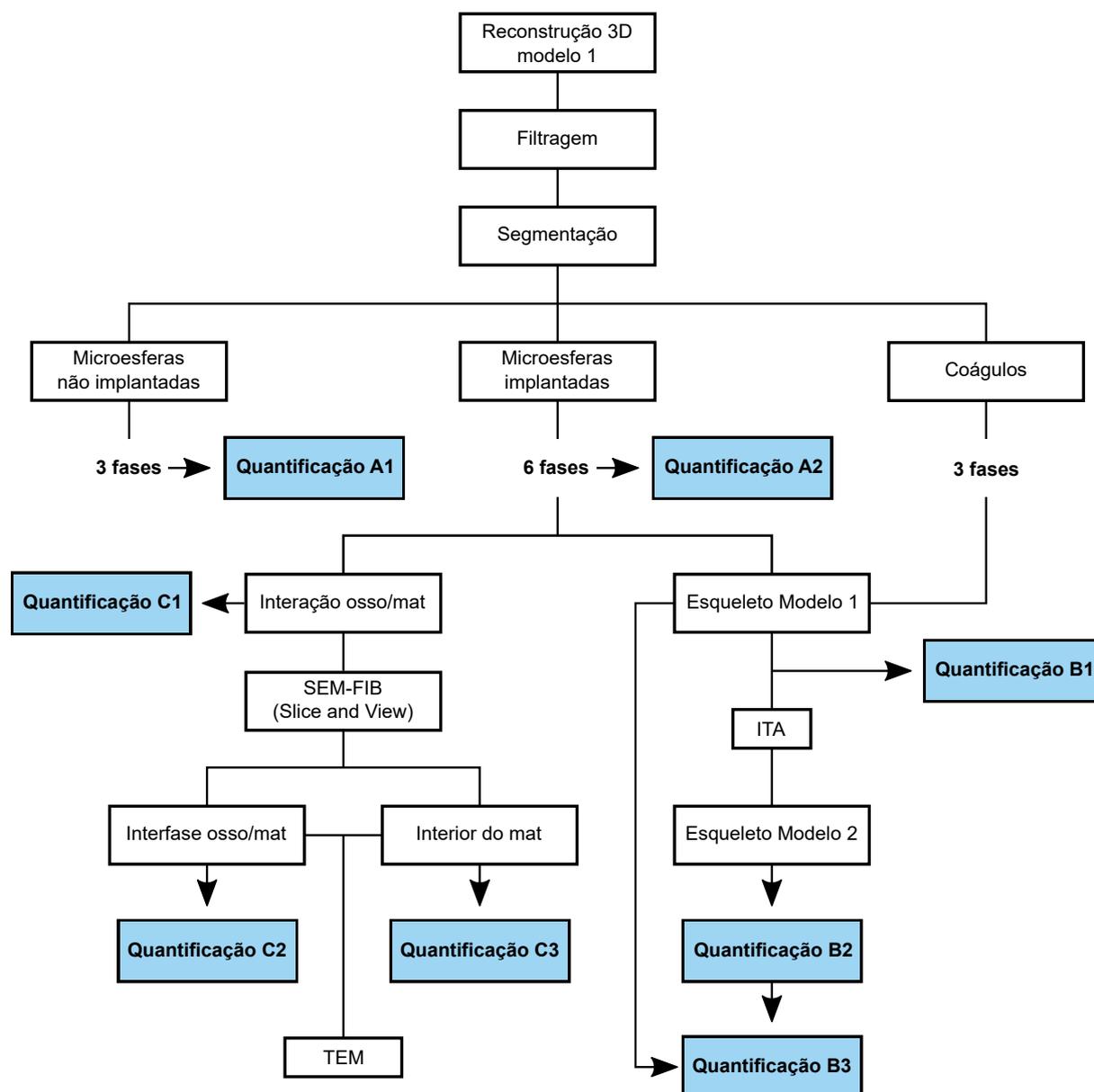


Figura 4.6: Fluxograma das etapas de quantificação utilizando técnicas de tomografia. A descrição de cada classificação é mostrada a continuação.

4.2.2.1 Microesferas não implantadas (Quantificação A1)

A partir dos dados segmentados foi possível quantificar a porosidade do material (Quantificação A1 – Figura 4.6) aplicando a ferramenta "*Volume Fraction*" no *software* Avizo. O procedimento é feito separando-se uma região interior da esfera, e a seguir isolando-se as fases do material e dos poros, Figura 4.7.

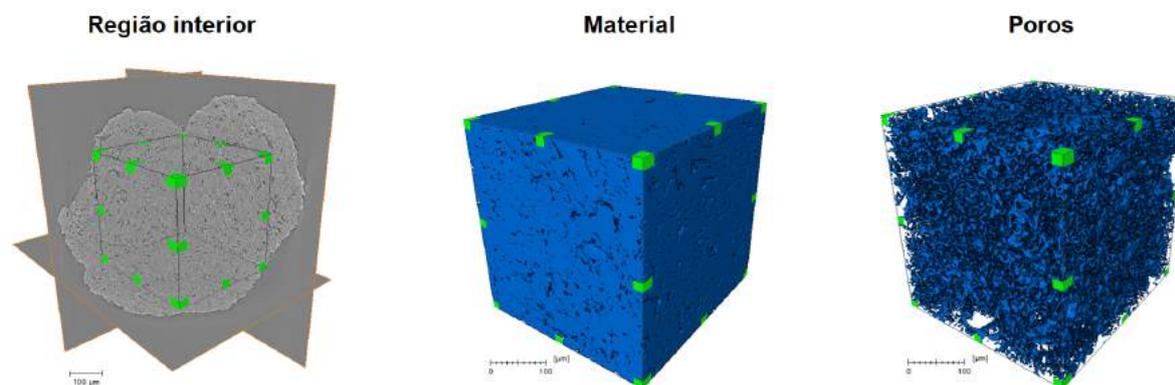


Figura 4.7: Separação de fases das microsferas. Região interior representativa, material, e poros

4.2.2.2 Microesferas implantadas (Quantificação A2)

As microsferas de cHA implantadas em tíbia apresentaram 6 fases: *background*, osso velho, osso novo A (trabéculas), osso novo B (crescido na superfície do material), bio-material, espaço poroso. Separando estas fases foi possível quantificar a percentagem e volume de osso, e de material ocupando o interior do defeito (na região analisada).

4.2.2.3 Esqueletização das redes de trabéculas

A fase "osso novo A", que corresponde às redes de trabéculas foi utilizada para criar o primeiro modelo de esqueleto que representa a rede. É importante ressaltar que existe uma conexão entre o osso trabecular novo e o material implantado, e quando o osso novo chega nas imediações do mesmo, já que neste ponto a morfologia de crescimento muda, esta região é removida da quantificação. De fato, esse osso corresponde à fase classificada como "osso novo B".

Para criar o primeiro modelo de esqueleto que representa a rede de trabéculas, utilizou-se a ferramenta *"thinner"* do Avizo, devido a que o algoritmo fornece parâmetros de controle que favorecem ou não a criação de ramificações (aspecto crítico na hora de construir um esqueleto representativo do sistema). Aqui é possível quantificar: i) a quantidade

de segmentos que conformam a rede, ii) a orientação dos segmentos, iii) a abundância de nodos, iv) o comprimento dos segmentos, e, fazendo um mapeamento de distância, é possível recuperar v) o raio médio dos segmentos. A nomenclatura utilizada para este conjunto de dados foi "quantificação B1".

O resultado da esqueletização por esta ferramenta é mostrado na Figura 4.8a-c. No esqueleto pode-se notar a presença de alguns nodos em sítios onde não deveriam existir, isto ocorre devido à sensibilidade do algoritmo *"thinner"*. Estes artefatos foram corrigidos utilizando o *software* ITA App, desenvolvido pelo grupo do departamento de Biologia Estrutural do Instituto de Ciência Weizmann, Rehovot, Israel a partir da plataforma MatLAB; que permite estabelecer um critério de combinação de vários nodos em um só. Utilizando-se os parâmetros adequados para cada amostra pode-se gerar um esqueleto mais representativo do sistema (Figura 4.8d). Foi estabelecido como critério de correção, a espessura média de cada amostra obtida a partir da "Quantificação B1", usando este parâmetro dentro do software ITA. Todos os resultados cuja quantificação de espessura fora menor do que o limite da resolução da técnica ($\sim 3 \mu m$) foram removidos da estatística. Aplicando então, todas as correções obtêm-se a "Quantificação B3".

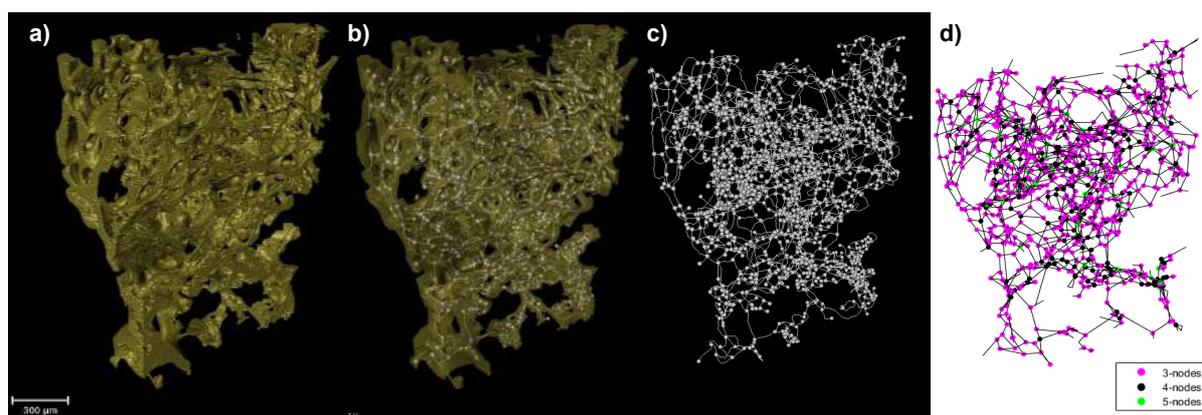


Figura 4.8: Processo de esqueletização da rede de trabéculas. a) Volume renderizado da região; b) volume com o esqueleto gerado pelo algoritmo *"thinner"*; c) esqueleto gerado pelo algoritmo *"thinner"*; e d) esqueleto final corrigido utilizando o ITA (código MatLab).

4.2.2.4 Quantificação de ângulos

Os segmentos de trabéculas ligados por nodos formam entre si ângulos denominados de ângulos inter-trabeculares (ITA). A quantificação dos ITA foi feita no *software* ITA App, que representa os ângulos entre a combinação de cada um dos segmentos que forma um nodo ("Quantificação B2"). Isto é, para nodos constituído por três segmentos (nodos 3N) um total de 3 ângulos serão quantificados; para nodos com quatro segmentos (nodos 4N), 6 ângulos são identificados; para nodos com cinco segmentos (nodos 5N), 10 ângulos são identificados. Os nodos de 3N, 4N, 5N representam mais que 97 % do total. Por isto, o trabalho estatístico resumiu-se a estes 3 grupos. Os parâmetros utilizados para a obtenção deste resultado, e do correspondente à secção 4.2.2.3 são mostrados no Apêndice B.1, e tabela B.1.

4.2.2.5 Quantificação de porosidade e tamanho de poros

A porosidade e tamanho de poros do material, antes e após a implantação, foram determinados com o código aberto de PoreNetworkExtraction, [149–151] (Apêndice B.2) desenvolvido pelo grupo de Departamento de Ciências e Engenharia da Terra do *Imperial Collage*, Londres, Reino Unido. Este código consiste em identificar a gargantas entre poros e considerar cada poro como um volume individualizado. O algoritmo é baseado no crescimento máximo de esferas que preenchem o espaço completo com o mínimo de perda possível. As condições de mínimas esferas são consideradas para determinar a presença de cada garganta, e a máxima esfera inscrita na região determina o poro [150]. Estes dados correspondem ao grupo da "Quantificação A2".

4.2.3 Crescimento ósseo na superfície do material implantado

O volume de osso formado na superfície do material implantado foi também identificado e quantificado. Para isso seguiu-se o procedimento descrito anteriormente separando-se as fases de "osso novo B" e do biomaterial. Foi possível quantificar: i) o volume de

osso crescido na superfície do material, ii) a área externa do material disponível para o crescimento ósseo, e iii) a superfície de contato entre o osso novo e o material. Este grupo foi nomeado como "Quantificação C1". Tudo isto foi analisado dentro dos limites da resolução da técnica. Para uma análise com resolução espacial sub-micrométrica foi utilizada a técnica de tomografia SEM-FIB no modo "*Slice and View*".

4.3 Tomografia SEM-FIB (*Slice and View*).

Para poder descrever a interação entre o osso novo e o material implantado foi preciso fazer uma análise na escala submicrométrica utilizando a técnica de tomografia SEM-FIB (*Slice and View*), esta técnica permitiu caracterizar a interface entre o osso novo e o material implantado, trazendo nova informação sobre o tipo de adesão do osso novo (ou TM) com a superfície do material ("Quantificação C2", e "Quantificação C3").

As medidas de SEM-FIB (*Slice and View*) foram feitas utilizando-se um microscópio eletrônico de feixe duplo LYRA-3 (TESCAN, Brno, República Tcheca), equipado com um espectrômetro de raios-X por energia dispersiva (EDS) Oxford Instruments, High Wycombe, Reino Unido). Os *slices* foram adquiridos aplicando uma tensão de 10 *kV* e usando um detector de elétrons retroespalhados (BSE) (Oxford Instruments). O esquema de aquisição das imagens é mostrado na Figura 4.9, onde o feixe de íons de Gálio pulveriza a amostra com um passo de 50 *nm*, e subsequentemente são adquiridas as imagens via SEM. As dimensões das imagens registradas foram 1024×1144 pixels e o tempo de permanência foi 30 μs /pixel.

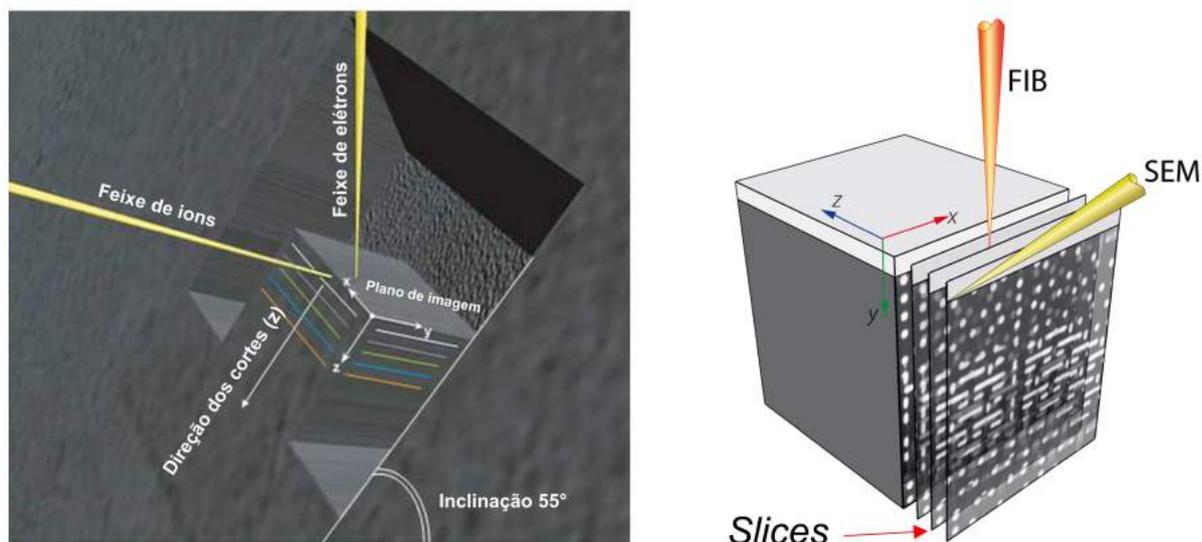


Figura 4.9: Esquema do processo de aquisição das imagens para a tomografia SEM-FIB no modo *Slice and View*. Figura adaptada de [152]

4.3.1 Reconstrução dos dados de *Slice and View*

A reconstrução das imagens foi feita utilizando o programa Avizo, com a ferramenta *SEM-FIB alignment*, cortando a imagem, ajustando o deslocamento delas e normalizando o contraste. Posteriormente procede-se à segmentação como foi descrito na Seção 4.2.1.3.

4.4 Microscopia ótica

Neste trabalho a microscopia ótica e de polarização foi uma técnica importante para avaliar a qualidade do processamento das amostras dos defeitos ósseos. Além disto, com a microscopia ótica foi possível identificar as microesferas no interior dos defeitos e as interfaces entre osso novo e osso velho devido à birrefringência do osso. As amostras foram cortadas em laminas semifinas de aproximadamente $100 \mu m$ e analisadas com aumentos de $\times 20$ e $\times 40$ vezes. Foi utilizado um microscópio óptico Zeiss Axioplan entre polarizadores cruzados, disponível no Laboratório de Biomineralização do Instituto de Ciências Biomédicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

4.5 Microfluorescência de raios X por radiação síncrotron (SR- μ XRF)

Para este tipo de estudo as amostras processadas em blocos foram cortadas em laminas que posteriormente foram afinadas com lixa de água de 600, 1500 e 2400 até atingir uma espessura lisa de aproximadamente 100 μm (condição de filme fino).

4.5.1 Medidas de SR- μ XRF

As medidas foram feitas na linha de luz D09B XRF no LNLS – Campinas. [153] O sistema de focagem de raios-X (fabricado pelo grupo de optica de raios-X do European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) em Grenoble, França) [154] pode produzir um microfeixe de raios-X de $12 \times 22 \mu m$ de tamanho. As medidas foram realizadas sob condições normais de pressão e temperatura. Um filtro de alumínio foi colocado na frente do feixe de entrada para reduzir a distorção dos espectros de SR-XRF, devido à alta intensidade de fluorescência de raios-X das linhas Ca-K provenientes da matriz da amostra. As amostras foram colocadas no plano de foco com uma precisão de 1 μm . Um microscópio óptico (aumento de $\times 500$) foi usado para localizar com precisão as áreas irradiadas. Os mapeamentos 2D-XRF foram gerados em modo de operação de varredura contínua (passos de 30 μm) [155].

A composição elementar por pixel foi determinada em uma geometria padrão ($45-45^\circ$), usando um detector de Si (KETEK GmbH, Munich, Alemanha) com uma resolução de 140 eV (FWHM) a 5.9 keV.

4.5.2 Tratamento de dados das medidas de SR- μ XRF

O processamento espectral e mapeamento elementar foi feito usando o software PyMca [156]. Para a análise semiquantitativa dos espectros de XRF usou-se uma amostra de referência de osso de calvária (área de 16×16 em tamanho de pixel). A concentração

elementar na matriz óssea foi determinada pelo método dos parâmetros fundamentais [157]. Devido à fina espessura da amostra, considerou-se a condição de filme fino para o fator de absorção de raios X ($A=1$) [158]. A concentração de elementos na região da calvária e no osso, assim como o modelo de imagem elementar das amostras foram estimados a partir de um material de osso cortical cientificado (ICRP) [159]. Os dados quantitativos da imagem elementar de Ca, P e Zn foram gerados em frações de massa. As ferramentas RBG do PyMca foram usadas para construir o perfil de concentração, gráficos de dispersão e imagens de Ca / P e Zn / Ca, pixel por pixel.

4.6 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

Neste trabalho, as informações sobre a morfologia e tamanho das nanopartículas de cHA e da Zn-cHA foram determinadas por TEM. Esta técnica foi também essencial para caracterizar a interface osso/biomaterial.

4.6.1 Preparação de amostras para TEM.

As amostras foram primeiramente fixadas com glutaraldeído (2.5 %) e paraformaldeído (4 %) em tampão cacodilato (0,1 M, pH 7,3) e lavadas em tampão cacodilato, posteriormente foram desidratadas em acetona (em soluções de 30 % a 100 %), e Embebido em resina epóxi a 70 °C por 24 h. Cortes ultrafinos foram obtidos utilizando um ultramicrotomo (PT-XL PowerTome, RMC Boeckeler, Tuscon, AZ, EUA) equipado com uma faca de diamante.

4.6.2 Adquisição das imagens por TEM

As amostras foram analisadas num microscópio eletrônico de transmissão JEOL 2100F operado a 200 kV (Figura 4.10). As imagens e os padrões de difração de elétrons da área selecionada (SAED) foram registrados com uma câmera CCD de 11 megapixels (Orius; GATAN Inc., Pleasanton, CA, EUA).

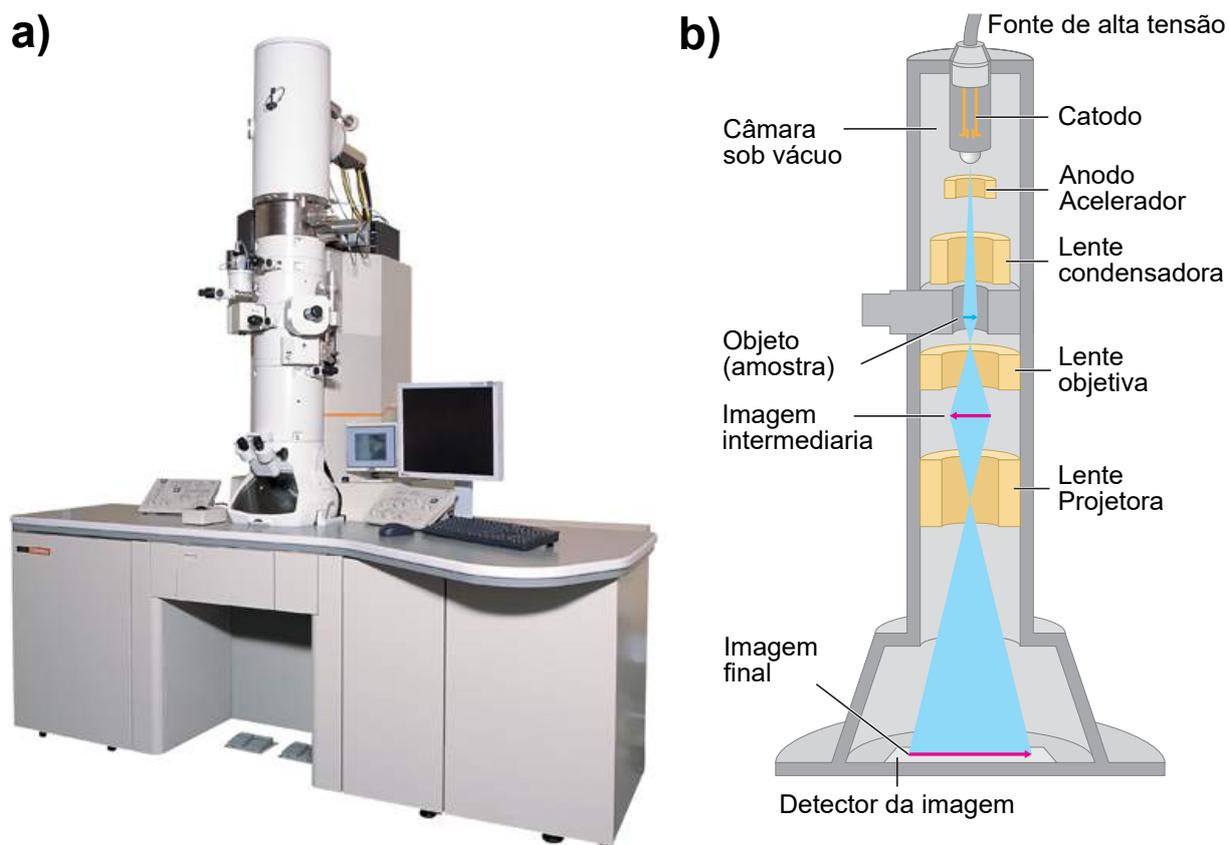


Figura 4.10: Microscópio eletrônico de Transmissão Jeol 2100F [160].

As amostras foram também analisadas por um microscópio eletrônico de transmissão TEM TITAN Themis, operando a 300 kV, disponível no LNNano (Figura 4.11). O microscópio foi operado nos modos TEM e STEM; as imagens de média e alta resolução [161,162], e os padrões de difração foram adquiridos utilizando uma câmera CETA 4k×4k CMOS-based FEI.

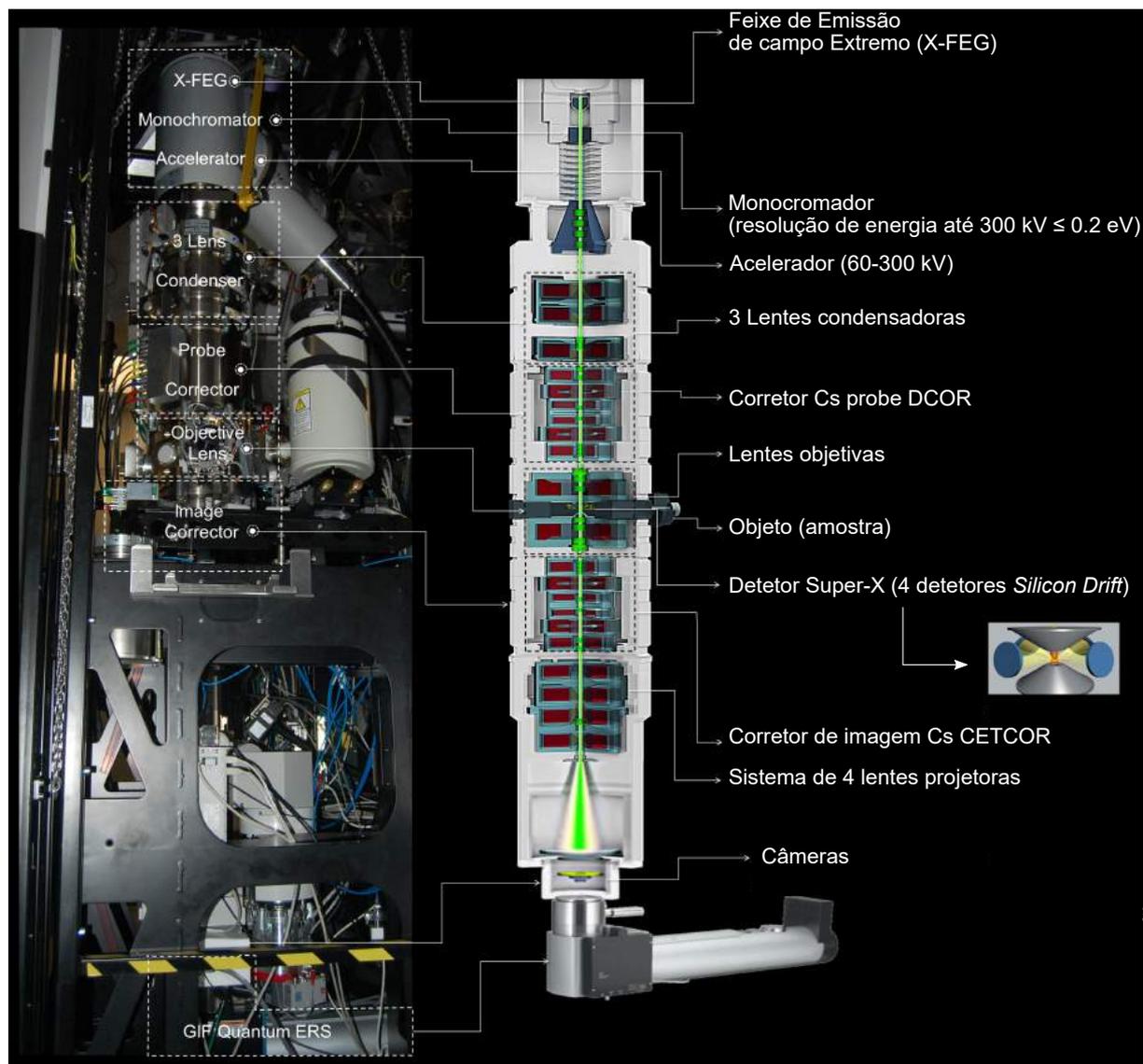


Figura 4.11: Microscópio eletrônico de Transmissão TITAN themis, representando esquematicamente os componentes [163].

Capítulo 5

Resultados e discussões

Neste capítulo, apresenta-se os resultados das análises feitas nas amostras de cHA e Zn-cHA, em pó e na forma de microesferas, antes e após a implantação em defeitos de tibia e calvária. As amostras implantadas exigiram um estudo por diferentes técnicas analíticas tais como SR- μ CT, a microscopia de luz polarizada (para identificar as regiões de interface entre osso novo e velho), SR- μ XRF, SEM-FIB no modo *Slice and View* e TEM.

5.1 Composição química das nanopartículas de cHA e Zn-cHA.

5.1.1 Caracterização por difração de raios X e FTIR

A composição química dos pós das amostras cHA sintetizadas a 37° C e 90° C e Zn-cHA são mostradas na Tabela [5.1](#). As razões Ca/P das amostras são próximas a da HA (Ca/P = 1.67) e o teor de zinco na amostra substituída foi de 3.2% em peso com uma razão (Ca + Zn)/Ca de 1.66 ± 0.02 . Pequenas quantidades de carbono foram associadas a estrutura das apatitas (0.8%, 1.1% e 0.3% para cHA 37 e 90 °C e Zn-cHA 90°C, respectivamente).

Tabela 5.1: Características físico-química das nanopartículas e análise por BET. AS: área superficial; TnP: tamanho de nanoporos.

Amostra	Ca (wt%)	P (wt%)	Zn (wt%)	C (wt%)	AS (m^2/g)	TnP (nm)
cHA37	40.3	18.3	-	0.8	120	8.5
cHA90	39.9	18.3	-	1.1	91	33
Zn-cHA90	37.2	18.4	3.2	0.3	89	18

As amostras apresentaram padrões de difração típicos da fase apatita, sem a presença de picos característicos de fosfatos de cálcio não apatíticos ou óxidos de cálcio, como mostra a Figura 5.1. As amostras de cHA sintetizada a temperatura de 37 °C e a Zn-cHA dopadas com zinco apresentaram baixa cristalinidade e tamanho médio de cristalito inferior a da amostra cHA sintetizada em 90 °C (30 nm (Zn-cHA), 42 nm (cHA90), e 18.5 nm (cHA37), ao longo do plano (002), calculado pela equação de Scherrer com $K = 0.89$ [164]) (Tabela 5.2). Este resultado é esperado pois o abaixamento da temperatura de síntese e a dopagem com zinco promovem a desordem na estrutura e diminuição da cristalinidade da hidroxiapatita [104, 165-167].

Tabela 5.2: Tamanho médio de cristalito das nanopartículas

Amostra	FWHM	Tamanho médio (nm)
cHA90	0.19213	~42
Zn-cHA90	0.27258	~30
cHA37	0.43527	~18.5

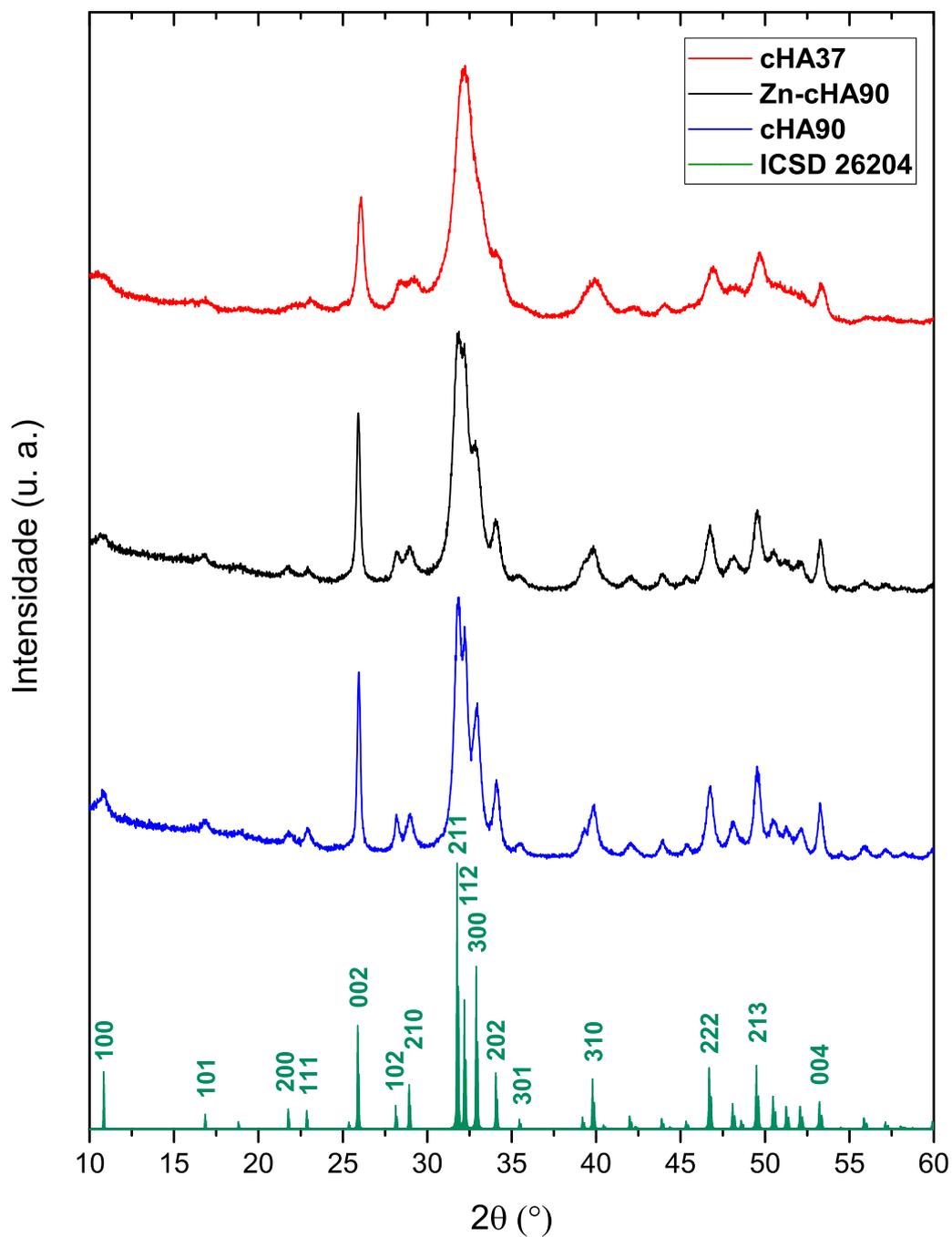


Figura 5.1: DRX das amostras de cHA37, cHA90 e Zn-cHA90. Como referência foi utilizado o padrão ICSD 2604 da HA [168].

Os espectros de FTIR das três amostras exibiram modos vibracionais característicos da hidroxiapatita (Figura 5.2). Foram identificadas as bandas de OH^- em 3575.7 e 632

cm^{-1} e bandas de fosfato em 1092 cm^{-1} (ν_3), 1036 cm^{-1} (ν_3), 962 cm^{-1} (ν_1), 603 cm^{-1} (ν_4), e 566 cm^{-1} (ν_4). Também foram detectadas as bandas de carbonato em 876 e $1420\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$. Para a amostra de cHA sintetizada a $37\text{ }^\circ\text{C}$ foram identificadas só as bandas 1036 cm^{-1} (ν_3), 962 cm^{-1} (ν_1), e 603 cm^{-1} (ν_4) [169]. A presença de água na estrutura também é típico para esta rota de síntese nas temperaturas escolhidas. Medidas pela técnica de BET mostraram que os pós possuem área específica e porosidade característica de materiais nanoestruturados.

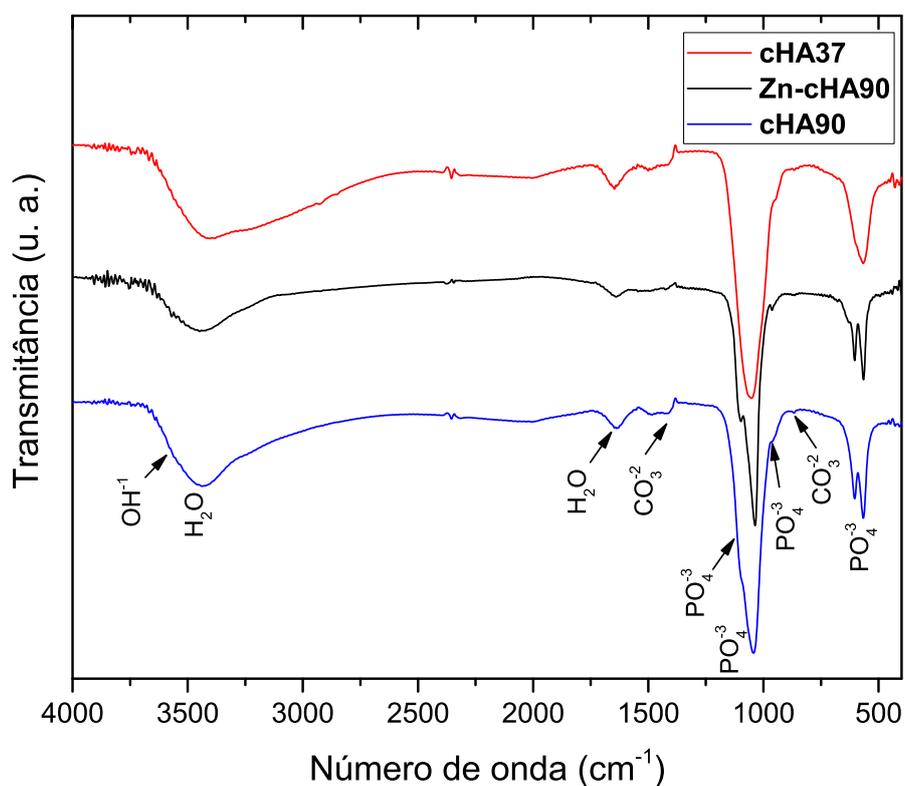


Figura 5.2: FTIR das amostras de cHA37, cHA90 e Zn-cHA90, identificando as bandas características dos fosfatos de cálcio.

5.1.2 Morfologia das nanopartículas

Medidas de TEM revelaram que as amostras de cHA sintetizadas em temperaturas de 37 e 90 °C são constituídas por nanopartículas com diferentes morfologias. As nanopartículas de cHA37C apresentaram uma morfologia do tipo "plaquetas", e as de cHA90C do tipo bastões, como se mostram nas Figuras 5.3a,b respectivamente. Das análises por SAED conclui-se que a amostra de cHA sintetizada a 37 °C tem um grau menor de cristalinidade, quando comparada com a sintetizada a 90 °C (Figuras 5.3a,b (inserida)). Os anéis do padrão de SAED, 0.34 *nm* (mais interno) e 0.28 *nm* (mais externo), correspondem aos planos (002) e (211) da HA, respectivamente. Estes resultados reforçam aqueles obtidos nos difratogramas de raios X, e demonstram a natureza nanoestruturada das amostras.

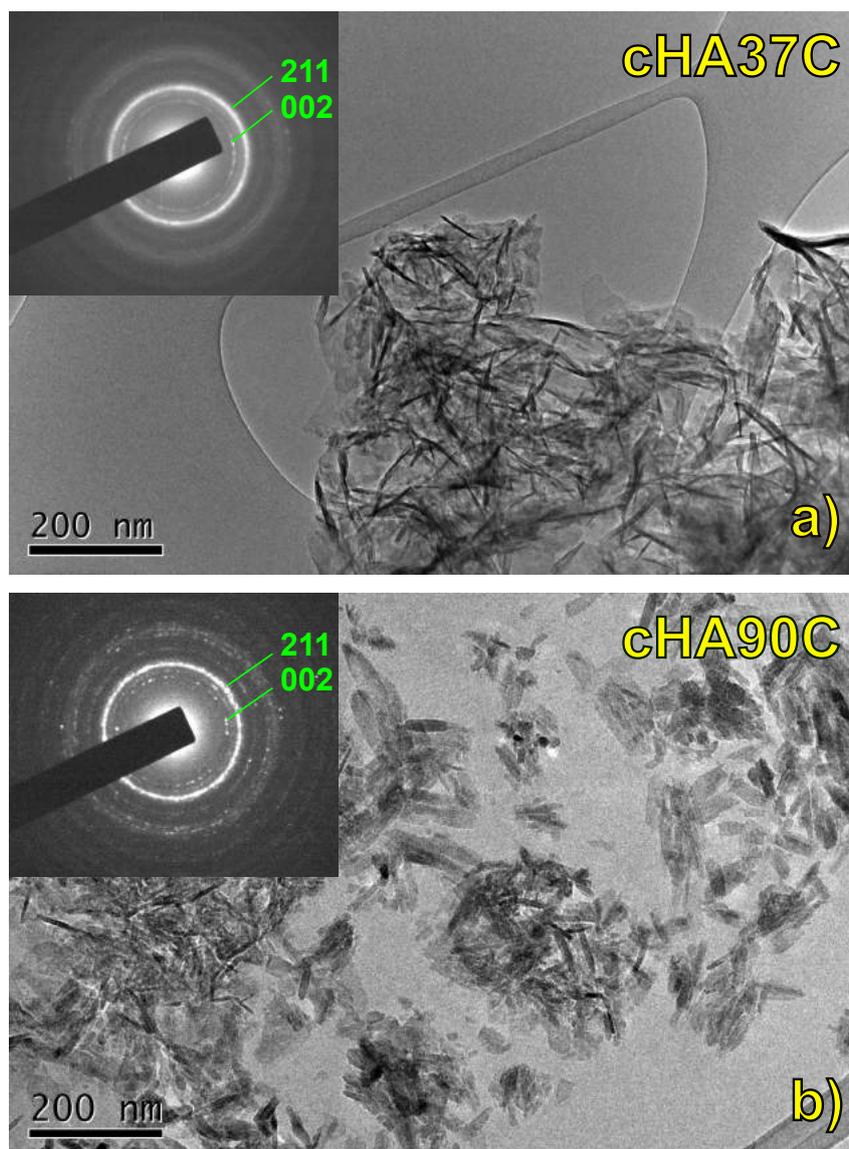


Figura 5.3: Imagens de TEM das nanopartículas de cHA. a) cHA sintetizada a 37 °C; b) cHA sintetizada a 90 °C. Inserido: Padrões de SAED indicando os índices de Miller de cada anel.

5.2 Arquitetura trabecular em defeitos criados em tíbia (coágulos)

Para este tipo de modelo, foi avaliada a arquitetura da rede de trabéculas criadas na ausência do biomaterial em tempos iniciais da formação óssea.

5.2.1 Quantificação individual dos segmentos que constroem a rede de trabéculas

A arquitetura da rede de trabéculas formada no defeito de tíbia sem a presença do biomaterial foi estudada por SR- μ CT, em tempos iniciais da formação óssea (1, 2, e 3 semanas). Foram identificados um total de 4840 segmentos de trabéculas para o coágulo de 1 semana, 7653 segmentos para o coágulo de 2 semanas, 1802 para o coágulo de 3 semanas, e 2110 para o defeito com material implantado por 3 semanas (Figura 5.4). Esta grande diferença no número de fragmentos deveu-se a eliminação de regiões do defeito com artefatos induzidos pela preparação da amostra (formação de bolhas no processo de fixação).

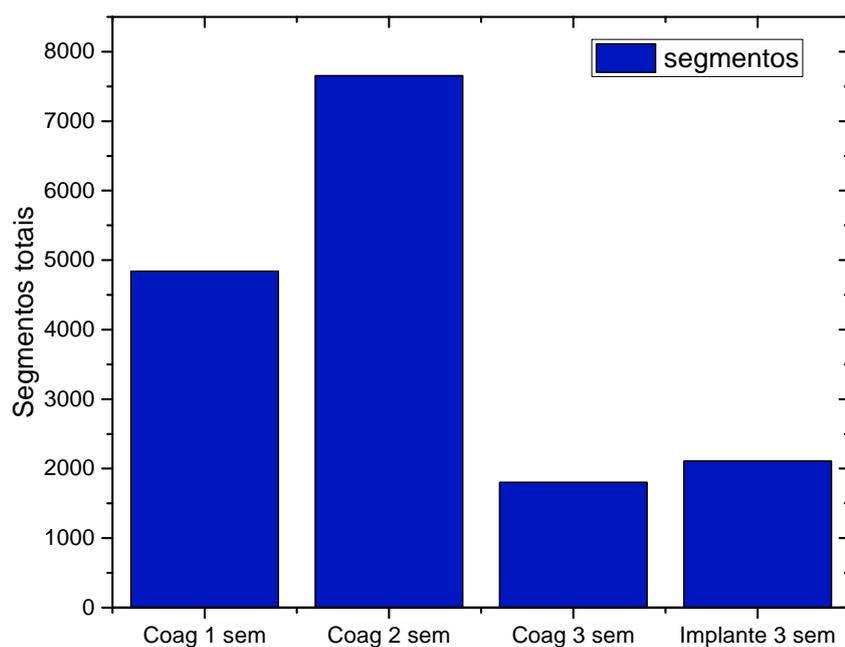


Figura 5.4: Segmentos analisados por cada amostra.

5.2.2 Topologia e arquitetura de crescimento na formação de redes de trabéculas

A segmentação renderizada obtida a partir da reconstrução dos dados das tomografias dos coágulos após 1, 2 e 3 semanas da cirurgia são apresentados nas Figura 5.5a-c juntamente com a primeira fase do esqueleto gerado. Pode-se identificar uma grande diferença no processo de reparo ósseo e crescimento de trabéculas para os três tempos analisados. O coágulo de 1 semana apresenta a formação de pequenas trabéculas a partir da parede interior do osso cortical (preexistente), em direção ao centro do defeito (Figura 5.5a). No coágulo de 2 semanas já destaca-se um maior volume de osso trabecular recém formado quase preenchendo completamente o defeito (Figura 5.5b); já no coágulo de 3 semanas se mostra um defeito completamente preenchido por osso neoformado, com crescimento trabecular em regiões fora do defeito (Figura 5.5c). Este último efeito pode ser associado à influência de fatores de crescimento existentes na interface entre o cortical e periósteo, como resposta a formação da lesão.

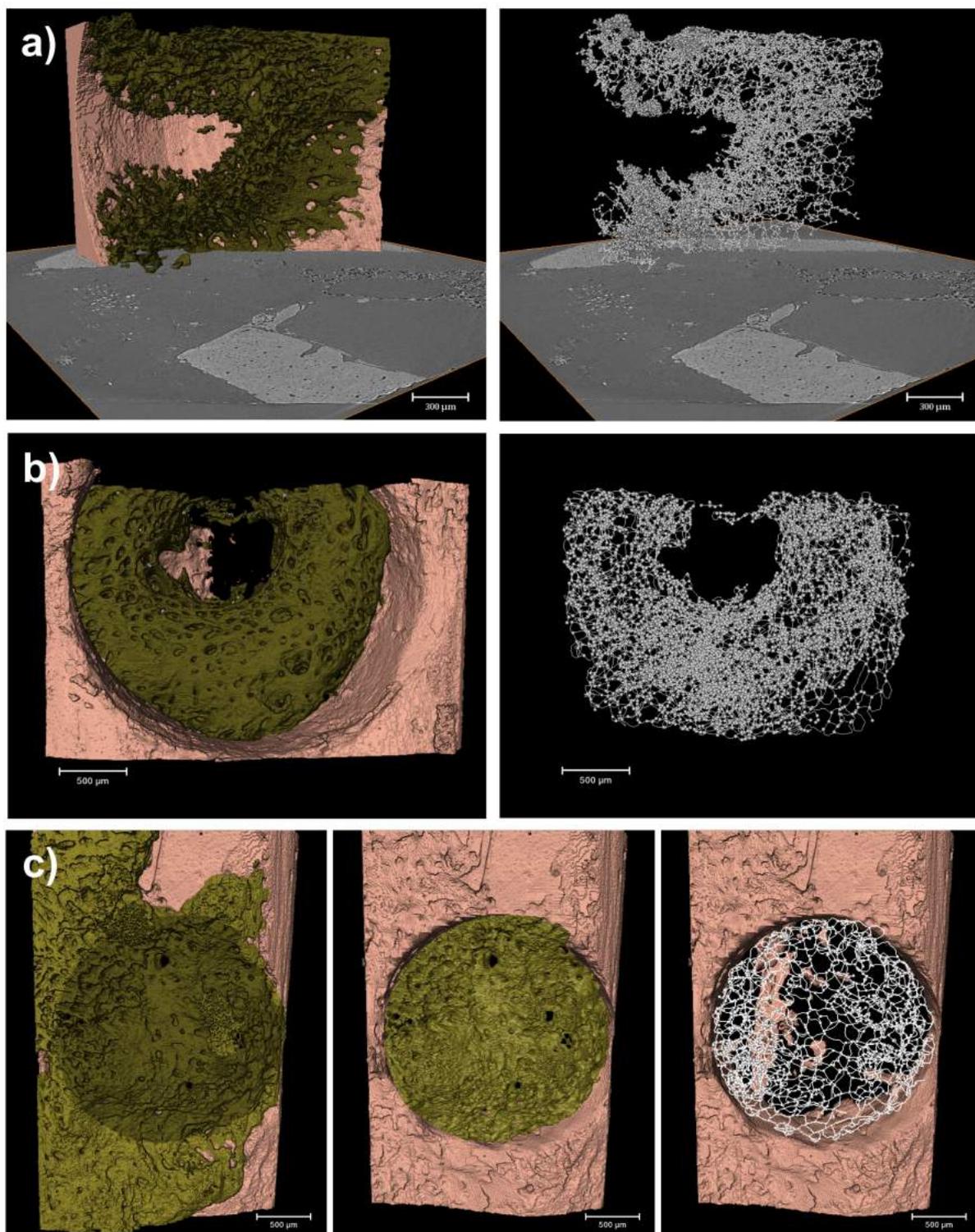


Figura 5.5: Representação de coágulos e esqueletos. a) Coágulo 1 semana; b) Coágulo 2 semanas; c) coágulo 3 semanas.

A partir dos esqueletos gerados e corrigidos, a arquitetura da rede de trabéculas formada no defeito foi analisada. Verificou-se que a rede trabecular é organizada a partir de estruturas primárias formadas por 3, 4 e 5 segmentos interconectados a nodos cuja representação é mostrada na Figura 5.6. Os nodos com 3, 4 e 5 segmentos foram denominados de 3N, 4N e 5N.

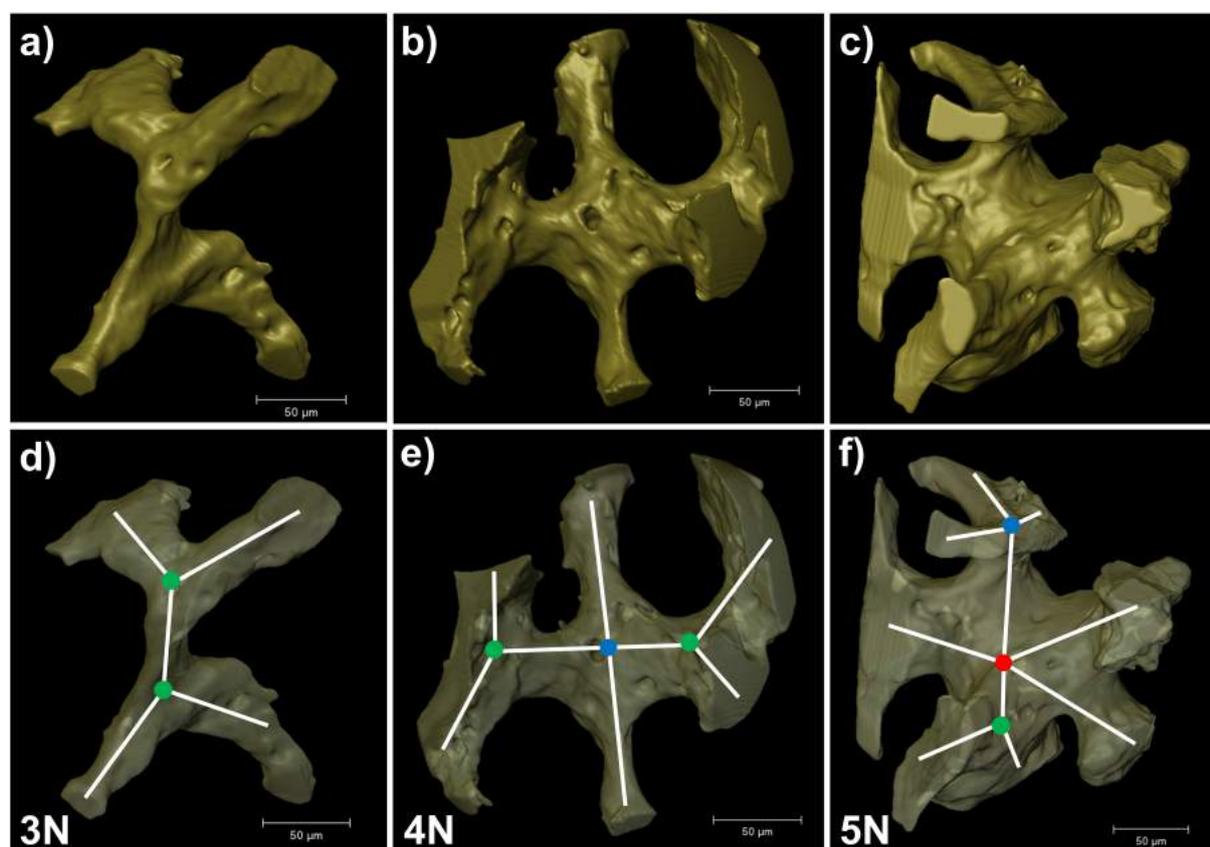


Figura 5.6: Estruturas geométricas primárias da rede trabecular representando os tipos de nodos. a-c) 3N, 4N, e 5N; d-f) 3N, 4N e 5N esquematizado.

O coágulo de 1 semana seguiu um padrão topológico similar ao obtido por Natalie Reznikov et al. [23] para ossos de humanos adultos. Os nodos 3N com estrutura muito próxima a planar foram majoritários frente aos 4N e 5N (Figura 5.7d). Observou-se uma diminuição da quantidade de nodos 5N e 4N em relação aos nodos 3N com o tempo pós-cirúrgico sugerindo que a arquitetura trabecular é estabilizada com conexões entre 3

segmentos (Figura 5.8). Os ângulos inter-trabeculares 3N seguiram uma distribuição do tipo gaussiana com um máximo em 117.8° , indicando que a topologia da rede teve preferência por estruturas triangulares planares (Figura 5.7a). As medidas de planaridade mostraram que 85% os nodos possuem um desvio de planaridade menor que 10° (Figura 5.7d).

A distribuição dos nodos minoritários 4N seguiu também uma distribuição gaussiana com um máximo centrado em 106° que é muito próximo ao ângulo entre os segmentos de estruturas tetragonais regulares (ângulos de 109.5°) (Figura 5.7b). Apesar de ambas distribuições de ângulos inter-trabeculares serem largas, as estruturas triangulares e tetraédricas regulares foram dominantes na arquitetura da rede de trabéculas formadas em 1 semana após a cirurgia. A topologia desta rede segue o princípio da tensegridade que maximiza a ocupação do volume do defeito com um mínimo de emprego de massa óssea. Do ponto de vista mecânico, esta arquitetura otimiza a distribuição de tensões e compressões dando estabilidade mecânica à estrutura. A arquitetura das redes trabeculares de 2 e 3 semanas reproduziram as características da de 1 semana com ângulos inter-trabeculares muito próximos. As distribuições dos ângulos inter-trabeculares foram ligeiramente mais estreitas e bimodais para os nodos 4N de 3 semanas e 5N de 2 e 3 semanas) (Figura 5.7b,c). A existência desta segunda estrutura nos nodos de 5N também foi identificada por [23], mas sua natureza não está ainda completamente esclarecida.

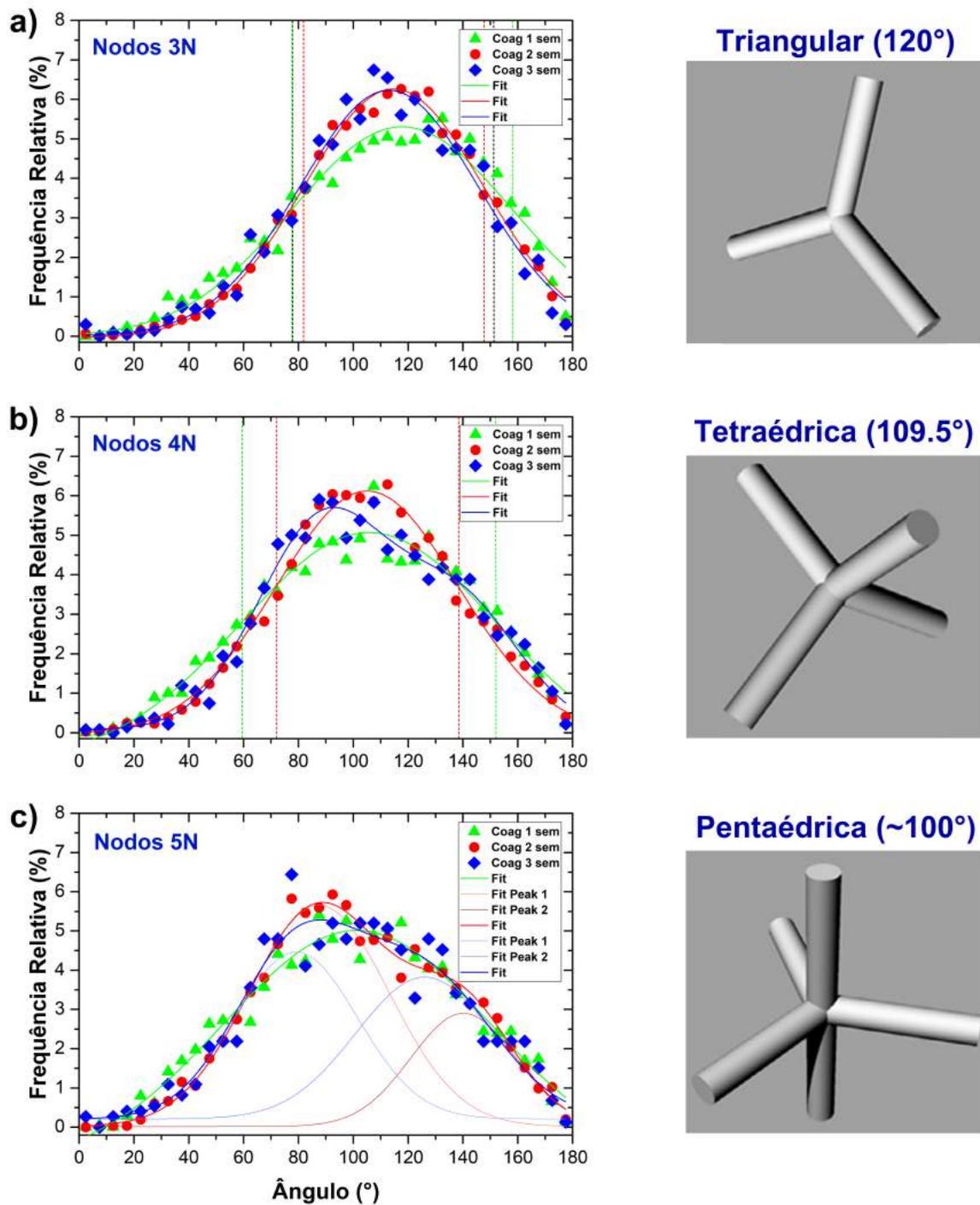


Figura 5.7: Distribuição de ângulos intertrabeculares dos coágulos. a) 3N; b) 4N; c) 5N.

Os resultados deste trabalho reforçam a hipótese lançada por [23], que esta organização topológica constitui uma estrutura hierárquica intrínseca do osso trabecular. Esta arquitetura é determinante para a adaptação do osso às suas demandas funcionais, em

especial às de origem mecânicas.

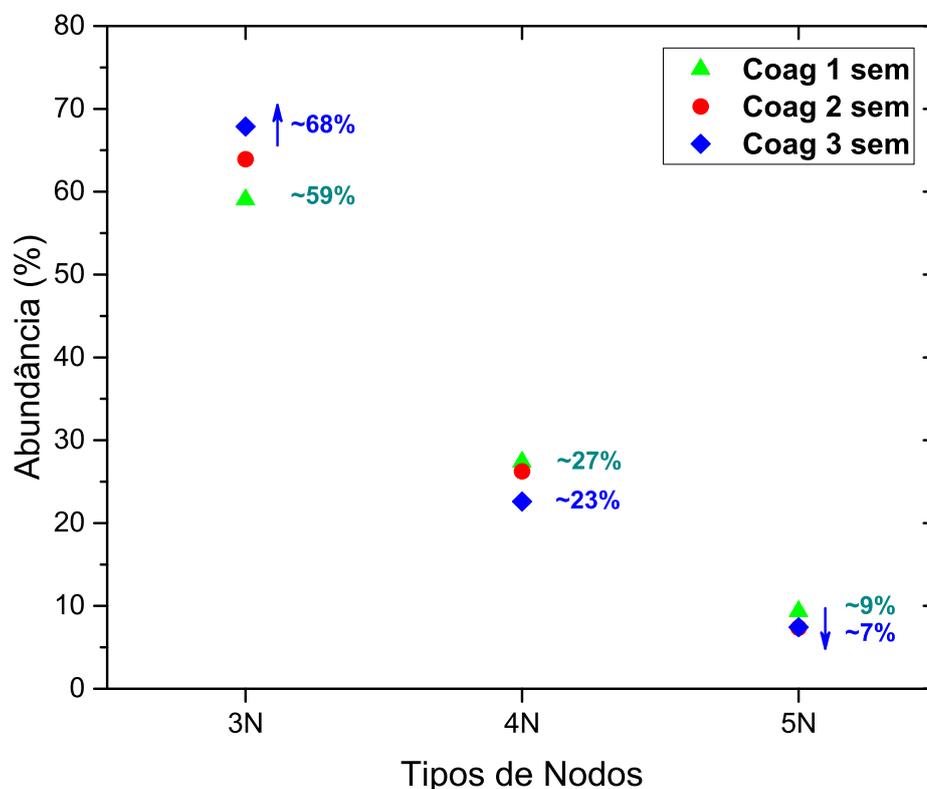


Figura 5.8: Abundância de nodos 3N, 4N e 5N nos coágulos.

Outro ponto importante a destacar é que o crescimento trabecular orienta-se de forma a preencher o defeito. Isto é, as trabéculas crescem em direção radial ao centro, como pode ser confirmado pela orientação ϕ que representam o ângulo da projeção de cada segmento na base (plano xy) com o eixo x. Este parâmetro indica uma distribuição homogênea de 0 a 360° para todos os grupos analisados (Figura 5.9a). Um outro parâmetro espacial de orientação é a orientação θ que representa o ângulo do segmento com o eixo z positivo dentro de um intervalo de $[0,90^\circ]$ e indica o sentido direcional a cada segmento. Este parâmetro mostra uma tendência à um ângulo de 90° (Figura 5.9b) o que reforça a interpretação de crescimento radial das trabéculas em direção ao centro do defeito.

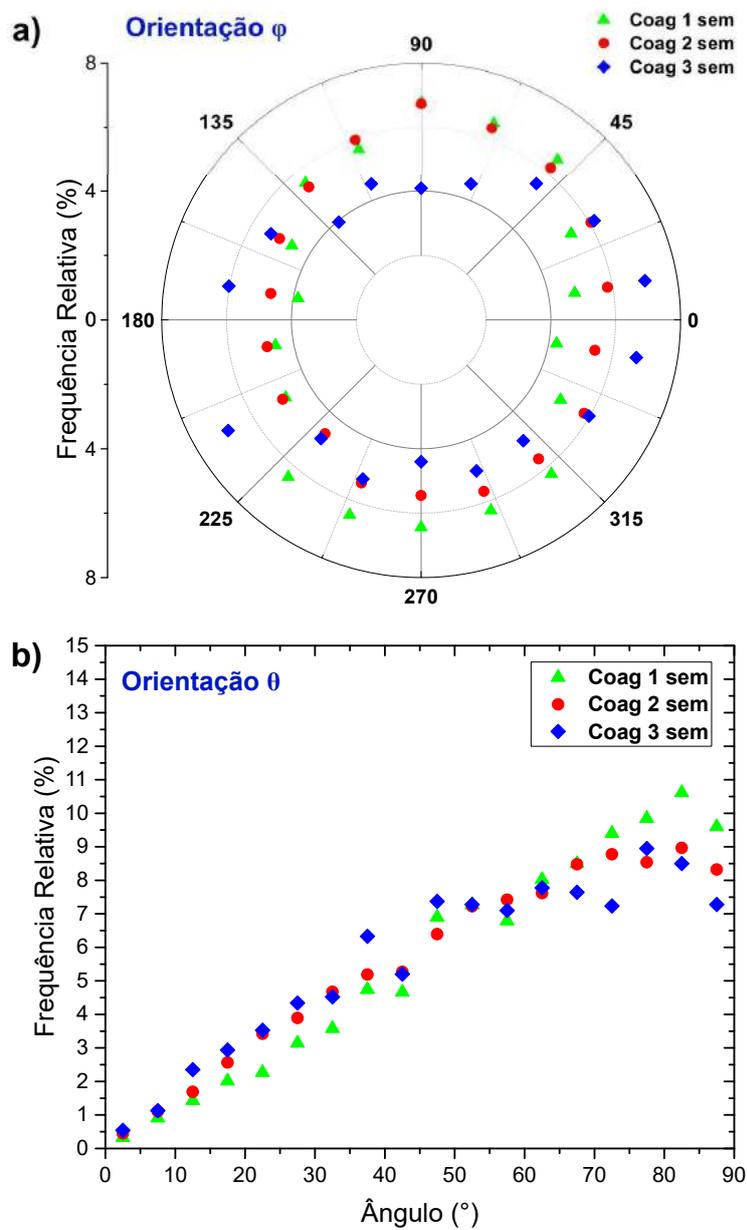
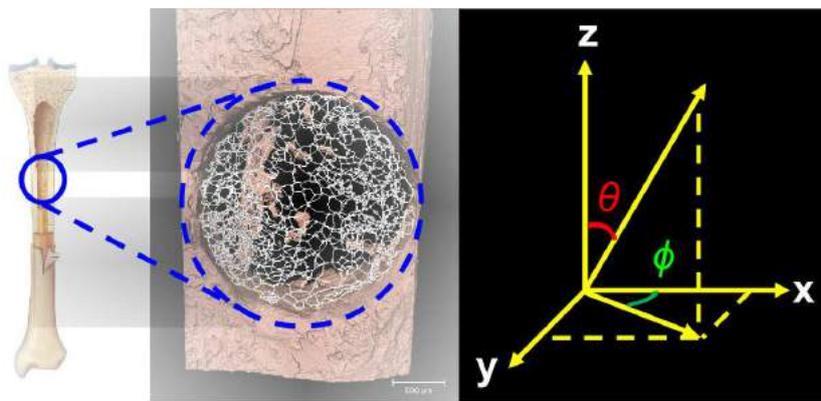


Figura 5.9: Orientações dos segmentos das redes de trabéculas dos coágulos. a) Orientação ϕ ; b) Orientação θ .

As redes de trabéculas formadas nos defeitos após 1, 2 e 3 semanas apresentaram um crescimento a partir do osso cortical em direção ao centro do defeito com pequena ocupação das regiões internas e medulares da tíbia (Figura 5.5). Após 3 semanas da cirurgia a rede de trabéculas recém formadas fechou o defeito, sem ocupar regiões no interior da tíbia. Tal como foi observado por Natalie Reznikov et al., as trabéculas recém formadas nos defeitos de tíbia também se organizam em uma estrutura constituída por nodos com segmentos 3N, 4N e 5N. Observou-se uma diminuição da quantidade de nodos 5 N e 4N em relação aos nodos 3N com o tempo pós-cirúrgico sugerindo que a arquitetura trabecular é estabilizada com conexões entre 3 segmentos (Figura 5.8). As medidas de planaridade mostraram que 85% os nodos possuem um desvio de planaridade menor que 10° (Figura 5.10).

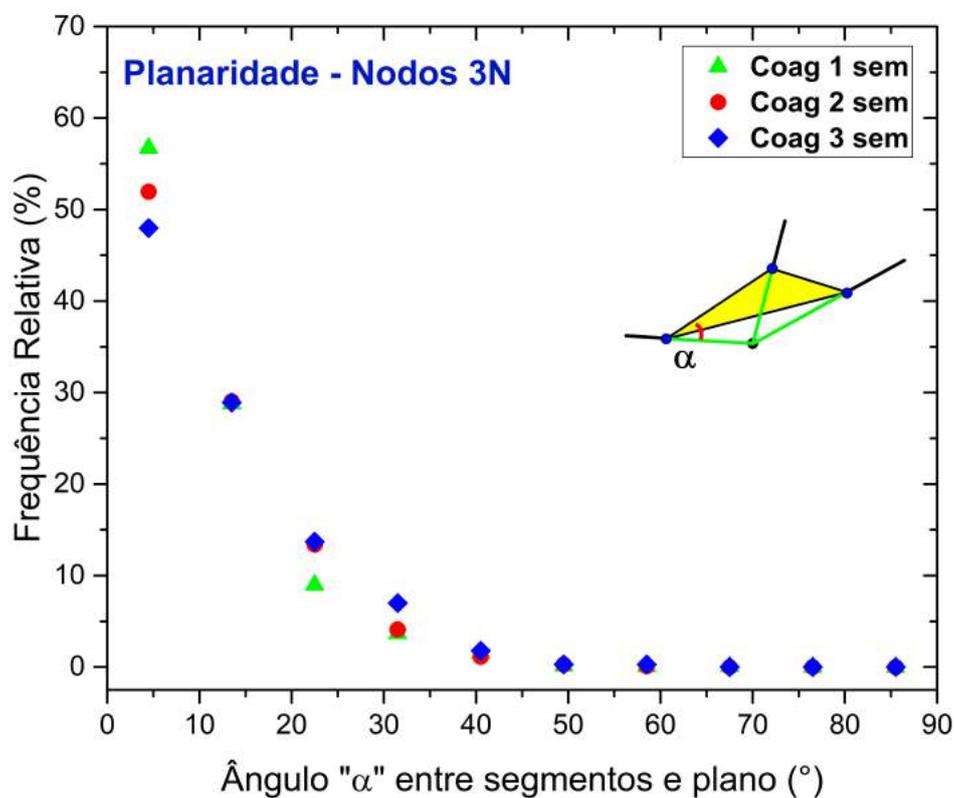


Figura 5.10: Planaridade dos nodos 3N para o grupo de coágulos.

Os valores de comprimento dos segmentos seguiram uma distribuição larga para as quatro amostras (coágulos e implante) indicando a existência de trabéculas em diferentes estágios de crescimento nos períodos estudados (Figura 5.11). No período de 1 semana 60% dos segmentos possuem comprimentos entre 5 e 20 μm . Nas amostras com 2 e 3 semanas o número de segmentos menores que 20 μm cai para 30% e aumenta os segmentos entre 40 e 100 μm . Este resultado nos leva a interpretar que o comprimento de trabéculas tende a se estabilizar a partir da segunda semana de crescimento e o parâmetro de vai variando com o tempo é a espessura e forma das trabéculas.

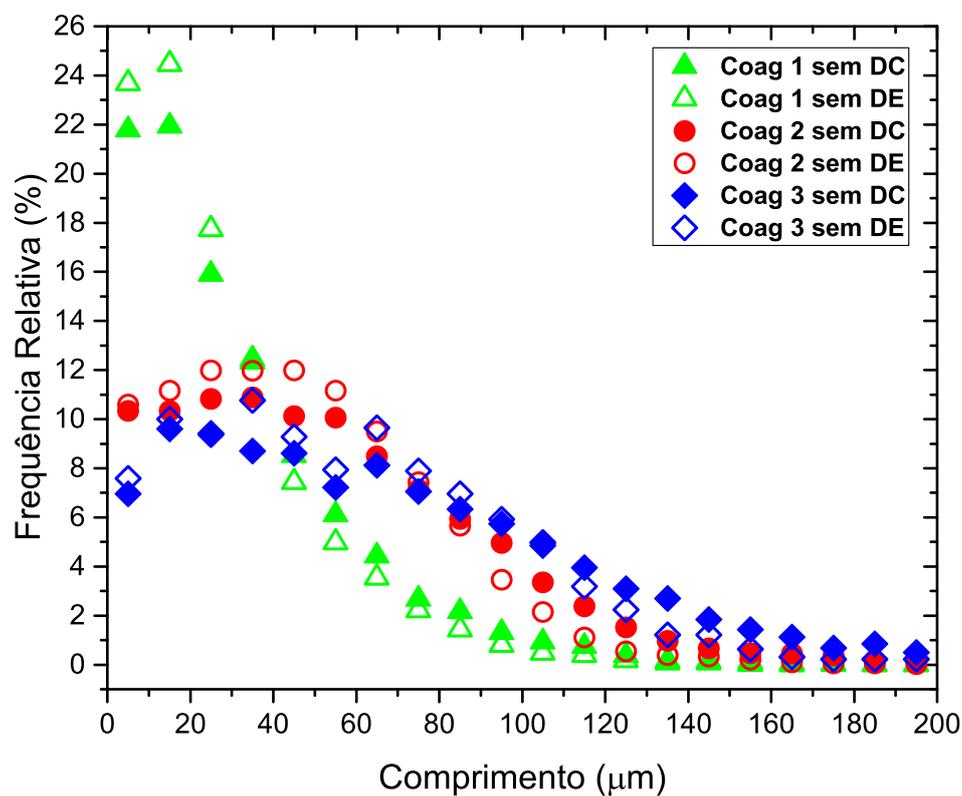


Figura 5.11: Comprimento de segmentos, representando cada trabécula individual do grupo de coágulos. DC (distância curva): representa o comprimento total de cada trabécula; DE (distância euclidiana): representa a distância euclidiana entre o início e o fim de cada trabécula.

As distribuições de espessura das trabéculas são mostradas na Figura 5.12. Verifica-se

que a espessura trabecular média é de $16 \mu m$ no coágulo de 1 semanas e de $36 \mu m$, no coágulo de 2 semanas. O coágulo de 3 semanas apresenta duas populações de trabéculas: uma, de menor tamanho $30 \mu m$ e outra de $58 \mu m$. Estas duas populações são atribuídas à a formação de trabéculas com forma de bastão (*roads*) que são características da fase inicial do crescimento ósseo e à forma de placas (*plates*) que se formam em fase mais avançadas do reparo onde começam a ocorrer a junção de trabéculas em estruturas mais espesas. Essa hipótese é reforçada pela dinâmica de reparo ósseo: preencher completamente o defeito até recompor à estrutura de osso cortical preexistente.

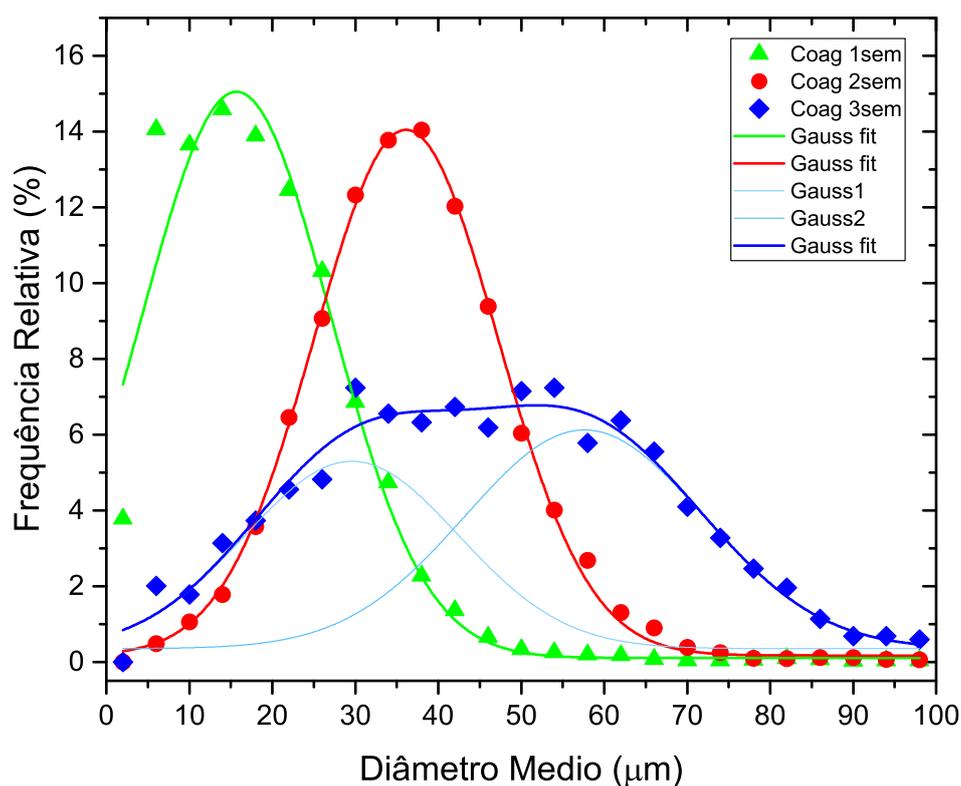


Figura 5.12: Distribuição de diâmetro médio de trabéculas crescidas na região do defeito para o grupo de coágulos.

É importante observar que as espessuras de trabéculas crescem à medida que aumenta o tempo pós cirúrgico, sem que o mesmo comportamento aconteça com o comprimento

delas (Figura 5.11). Esta dinâmica leva ao fechamento dos espaços entre trabéculas até chegar a um reparo completo da região, na forma de um novo osso com características de cortical.

5.3 Microesferas antes e após implantação

A microesfera de cHA antes da implantação e sua morfologia interna são mostrados nas Figuras 5.13a,b. O espaço poroso, Figura 5.13c, indica a formação de poros com morfologia irregular e com um tamanho médio de $5.6 \mu m$ (Figura 5.14a).

Uma vez implantado, o biomaterial é sometido a mudanças tais como: a diminuição do pH devido ao processo inflamatório agudo, interação com o fluido biológico e fatores de crescimento ósseo existentes, assim como a bioabsorção do polímero alginato (agente responsável pela estabilidade esférica do material). Isto resulta na diminuição drástica do tamanho médio de poros de $5.6 \mu m$ para 250 nm na amostra implantada por 3 semanas, como é mostrado nas Figuras 5.13d-f e 5.14b.

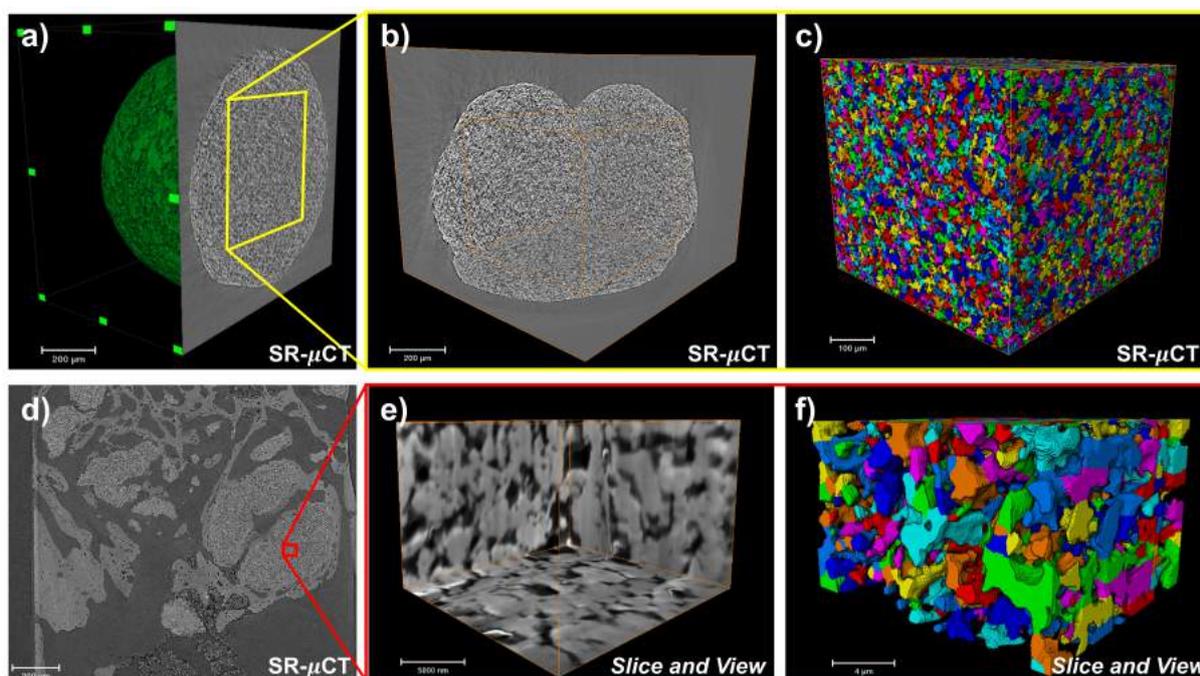


Figura 5.13: Microesferas de CHA antes e após implantação. a-c) Microesfera não implantada: a) Volume renderizado da microesfera (verde) com um *slice* central, b) *slices* ortogonais mostrando a morfologia interior da microesfera, e c) espaço poroso separado em poros individuais correspondentes à uma região central da microesfera (medida correspondente à SR- μ CT); d-f) Microesfera após implantação: d) Corte coronal da região central do defeito com material implantado por 3 semanas, e) *slices* ortogonais da região interior da microesfera (imagens adquiridas por *Slice and View* (SEM-FIB), e posteriormente reconstruídas, e f) espaço poroso separado em poros individuais.

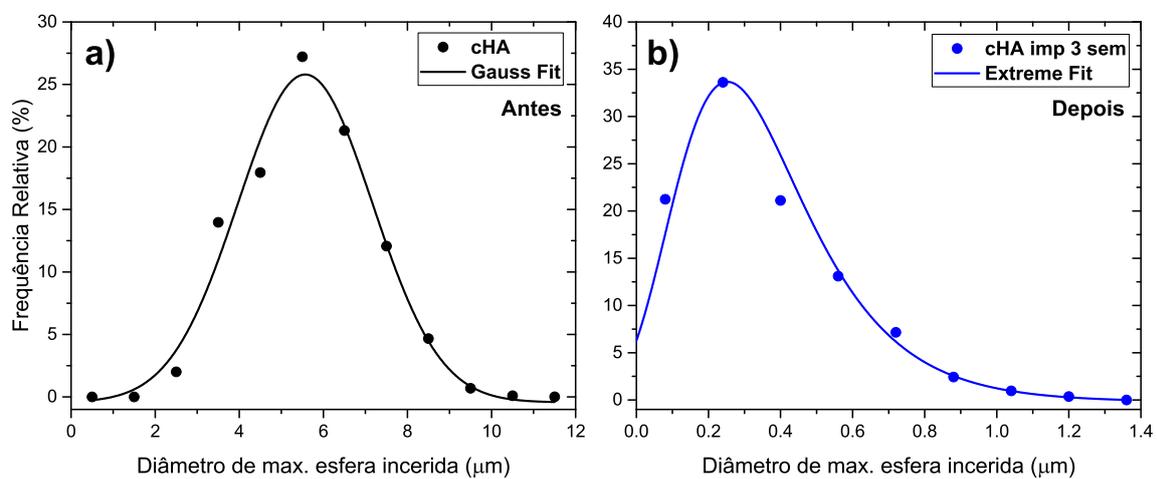


Figura 5.14: Distribuição de tamanho de poros representados pelo diâmetro da esfera máxima inserida. Microesfera de cHA: a) antes da implantação apresentando uma distribuição gaussiana com centro em $5,6 \mu\text{m}$; e b) após implantação apresentando um comportamento de distribuição generalizada de valores extremos GEV com $k = 0$ [170], com centro em $0,25 \mu\text{m}$.

5.4 Crescimento ósseo na presença do biomaterial

As esferas de cHA implantadas por 3 semanas implantadas apresentaram uma forte fragmentação no interior do defeito, como mostra as imagens de SR- μ CT da Figura 5.15a. Identificou-se 89 fragmentos do biomaterial com formas irregulares e tamanhos variáveis, entre 20 e 400 μm de diâmetro equivalente (Figura 5.15a,b).

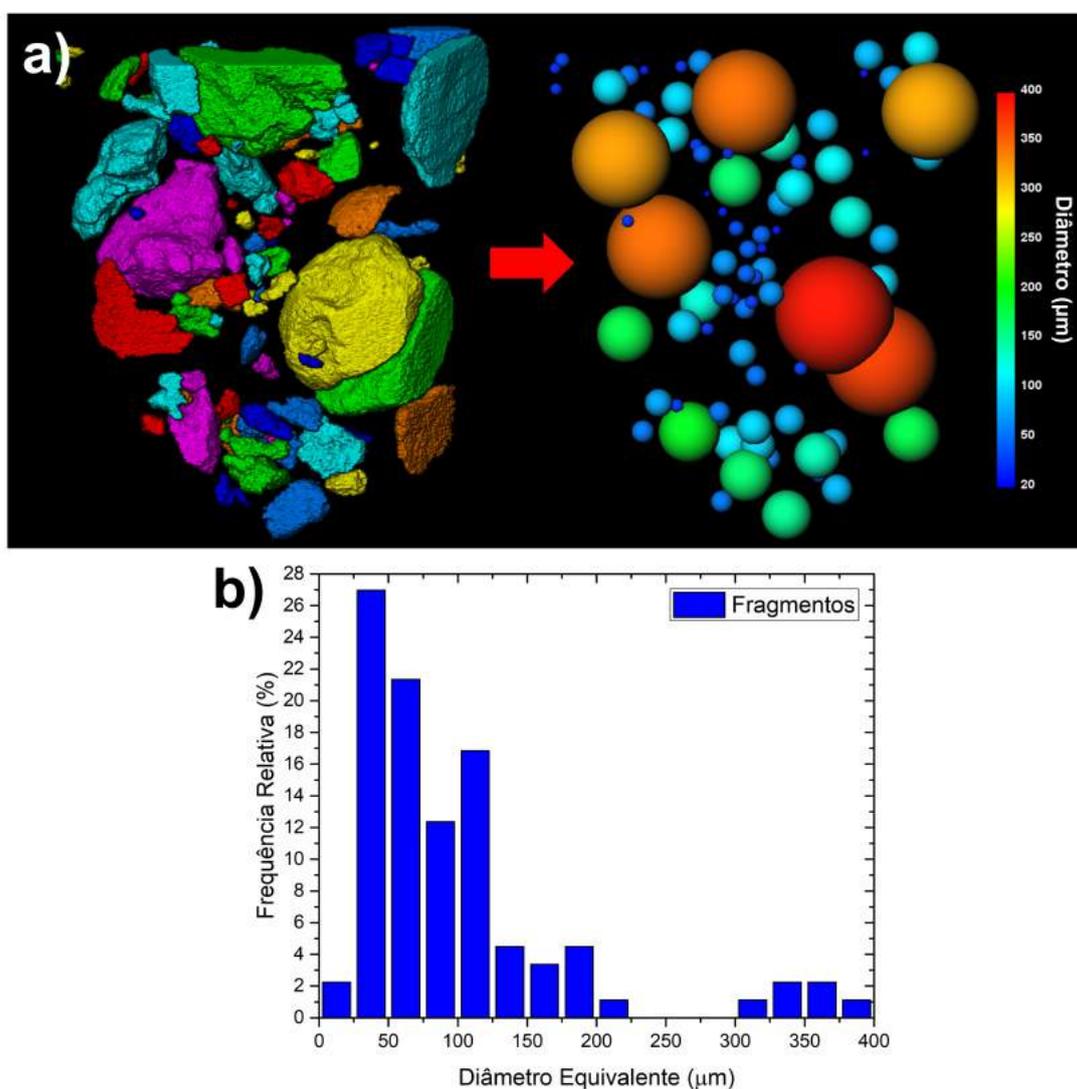


Figura 5.15: Tamanho médio de fragmentos. a) Fragmentos individuais do material representados por esferas de volume equivalente; b) Histograma mostrado a frequência relativa de diâmetros equivalentes dos fragmentos.

O osso trabecular recém formado cresceu a partir do osso cortical pré-existente ocupando o espaço entre os fragmentos de cHA e a maior parte do volume do defeito como mostra as imagens obtidas por SR- μ CT (Figura 5.16a-c). As trabéculas formaram ligações com a superfície de 70 % dos fragmentos, como será detalhado adiante. As imagens de microscopia ótica confirmam o resultado das análises por SR- μ CT, sendo possível também a identificação da interface entre o osso novo e o osso velho; as Figuras 5.17a-d mostra separa claramente o frente de osso crescendo a partir da parede do defeito, pode-se identificar na Figura 5.17c (indicado em amarelo) uma região onde o osso novo (laranja) vai crescendo a partir da parede do osso velho (azul) na região do defeito.

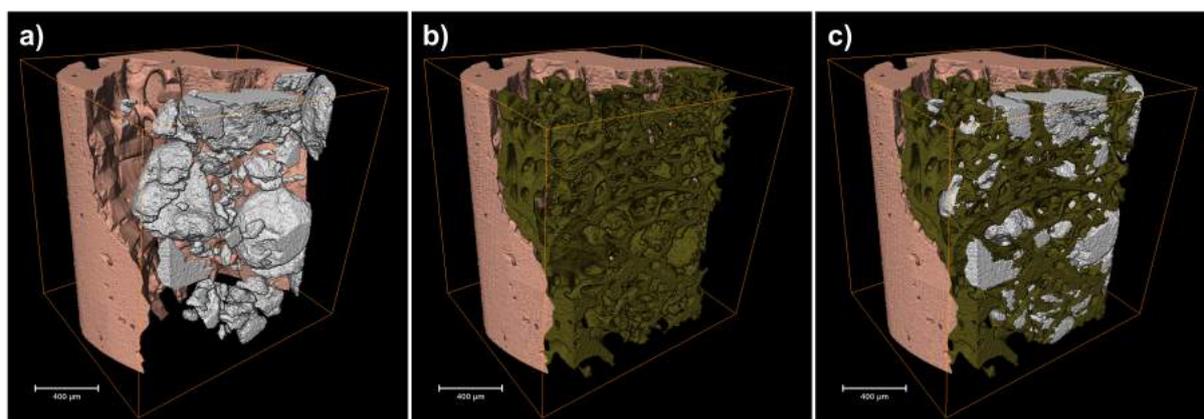


Figura 5.16: Representação 3D do Implante de cHA após 3 semanas. a) Osso preexistente (rosa) e biomaterial fragmentado (branco); b) Osso preexistente junto com osso novo crescido (verde); c) osso preexistente, osso novo e biomaterial fragmentado.

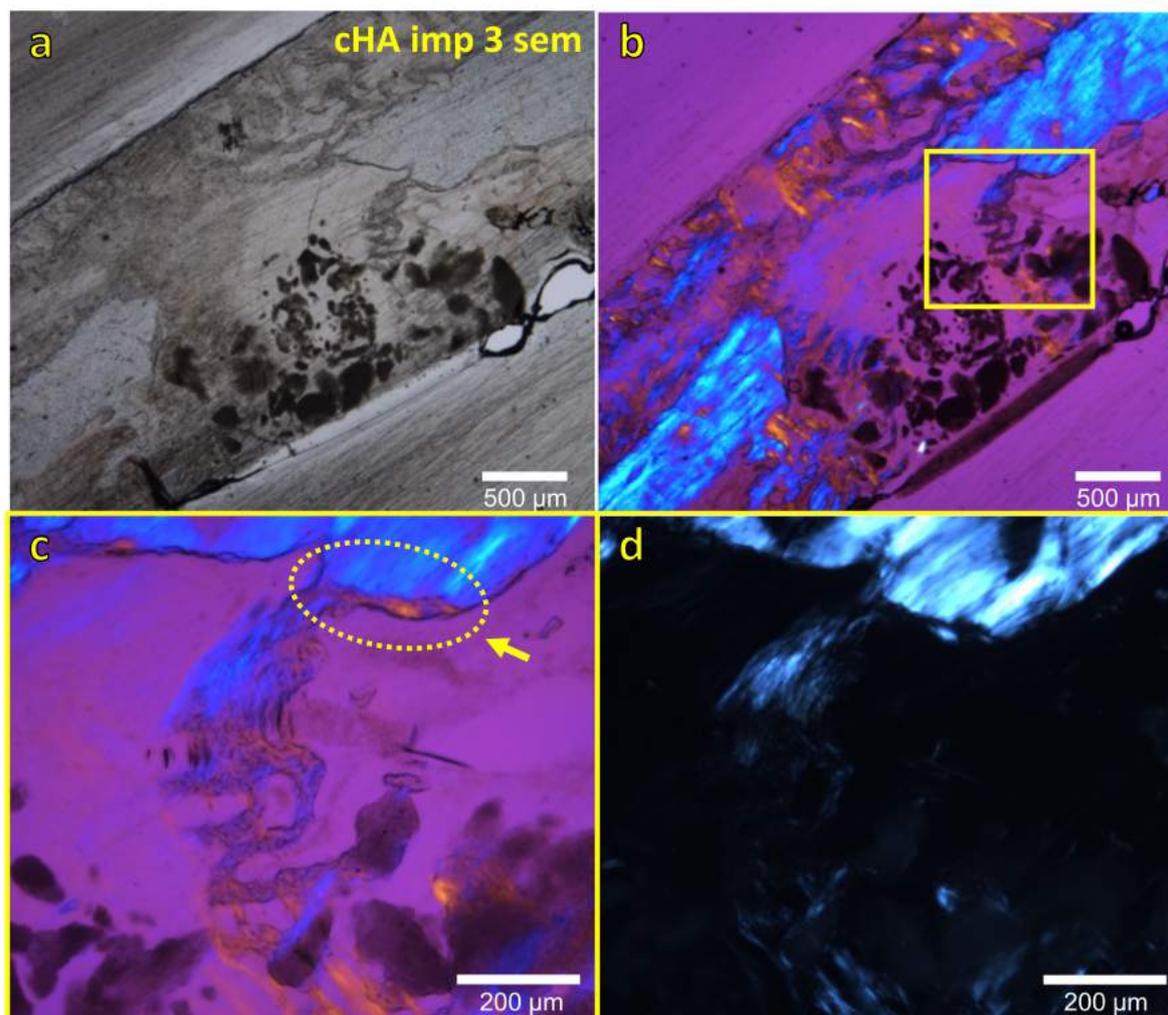


Figura 5.17: Identificação de regeneração óssea na região do defeito em tíbia. a) Imagem ótica; b) Imagem de luz polarizada com compensador; c,d) Imagem de luz polarizada, com e sem compensador, mostrando a interface osso velho/novo. Aumentos de $\times 10$ e $\times 20$ vezes.

A espessura média das trabéculas com a presença do biomaterial foi de $31 \mu m$, enquanto que o tamanho médio das trabéculas mais maduras no coágulo sem o biomaterial foi de $58 \mu m$ no mesmo tempo de implantação (Figura 5.18). A distribuição de tamanho das trabéculas no defeito contendo o biomaterial também apresentou uma maior frequência para menores valores de comprimento de trabéculas. Este resultado revela que a presença do biomaterial atrasa o crescimento das trabéculas, em especial a espessura. Isto pode ser atribuído a diminuição do espaço disponível para o crescimento ósseo na

presença do material.

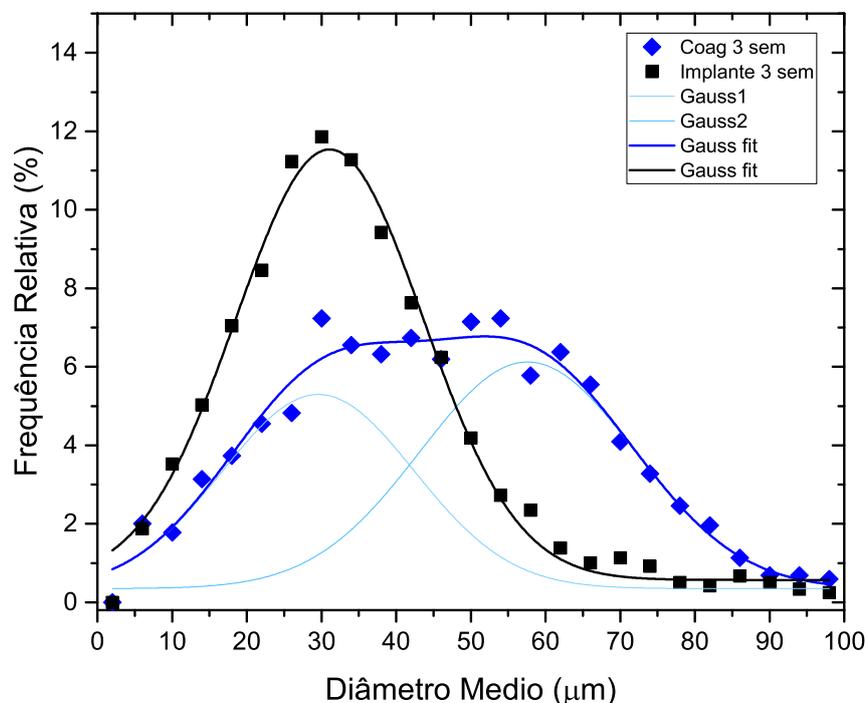


Figura 5.18: Distribuição de diâmetro médio de trabéculas com o material implantado durante 3 semanas, comparado com o coágulo equivalente.

Apesar do biomaterial atuar como fator inibidor das dimensões das trabéculas, a formação óssea expandiu-se para o interior do canal medular da tíbia, com a presença dos fragmentos do biomaterial. Este efeito não foi verificado no crescimento da rede trabecular nos coágulos de 1, 2 e 3 semanas, e confirma a atividade osteocondutora da hidroxiapatita quando presente em fragmentos distribuídos no interior do defeito (Figura [5.16](#)).

Um dos principais objetivos do trabalho foi avaliar se o biomaterial nanoestruturado na forma de microesferas interfere na "memória genética" da formação óssea modificando a arquitetura trabecular baseada nos princípios da tensegridade. O resultado significativo mostrado pela distribuição do ângulos inter-planares foi que a presença do material osteocondutor (cHA) não modificou os parâmetros de arquitetura (ângulos para nodos

de 3N, 4N e 5N) nem a orientação do crescimento das trabéculas (Figuras 5.19a-f). Este resultado revela pela primeira vez que a presença do biomaterial não altera a arquitetura natural do osso trabecular.

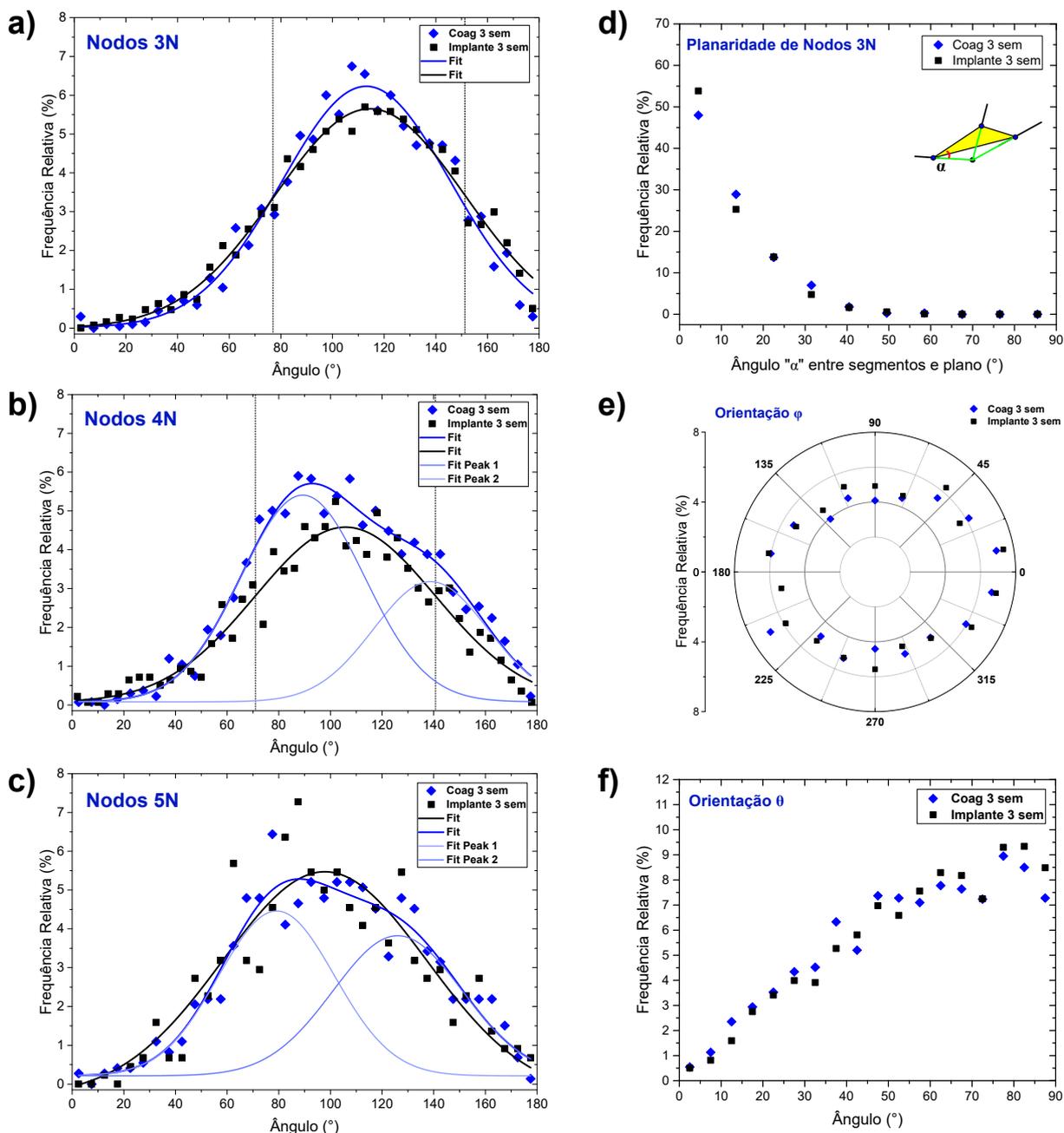


Figura 5.19: Arquitetura e orientação de trabéculas no implante após 3 semanas. Comparação entre o coágulo e o biomaterial implantado durante 3 semanas: a-c) Distribuição de ângulos dos nodos 3N, 4N e 5N; d) Planaridade dos nodos 3N; orientação e) ϕ , e f) θ dos segmentos de trabéculas individuais.

5.5 Crescimento ósseo na superfície do material implantado

As medidas de SR- μ CT permitiram caracterizar o tipo de ancoramento das trabéculas no biomaterial em 3D e o perfil do crescimento ósseo na superfície dos fragmentos. Como foi comentado anteriormente, a maior parte dos fragmentos (70%) estavam conectados a uma ou mais trabéculas após 3 semanas de implantação. A interação trabécula/biomaterial ocorreu a partir da superfície terminal de segmento como também de pequenas regiões da sua superfície lateral das trabéculas, como mostram as Figura [5.16](#)a-c e [5.20](#)a-d. A estrutura de nodos e segmentos é mantida nas proximidades da superfície dos fragmentos ($\geq 150 \mu m$). Em alguns casos pode-se observar que os segmentos de trabéculas circundam a superfície do fragmento. Após o contato com a superfície do biomaterial, o osso recém formado passa a crescer ao longo da superfície mantendo uma espessura aproximadamente constante em valores de $20 \mu m$ como mostram as Figuras [5.20](#)a-h. O volume total de osso formado na superfície aumenta de forma linear com o valor da superfície ocupada (Figura [5.21](#)), mantendo assim uma espessura máxima constante como já foi mencionado.

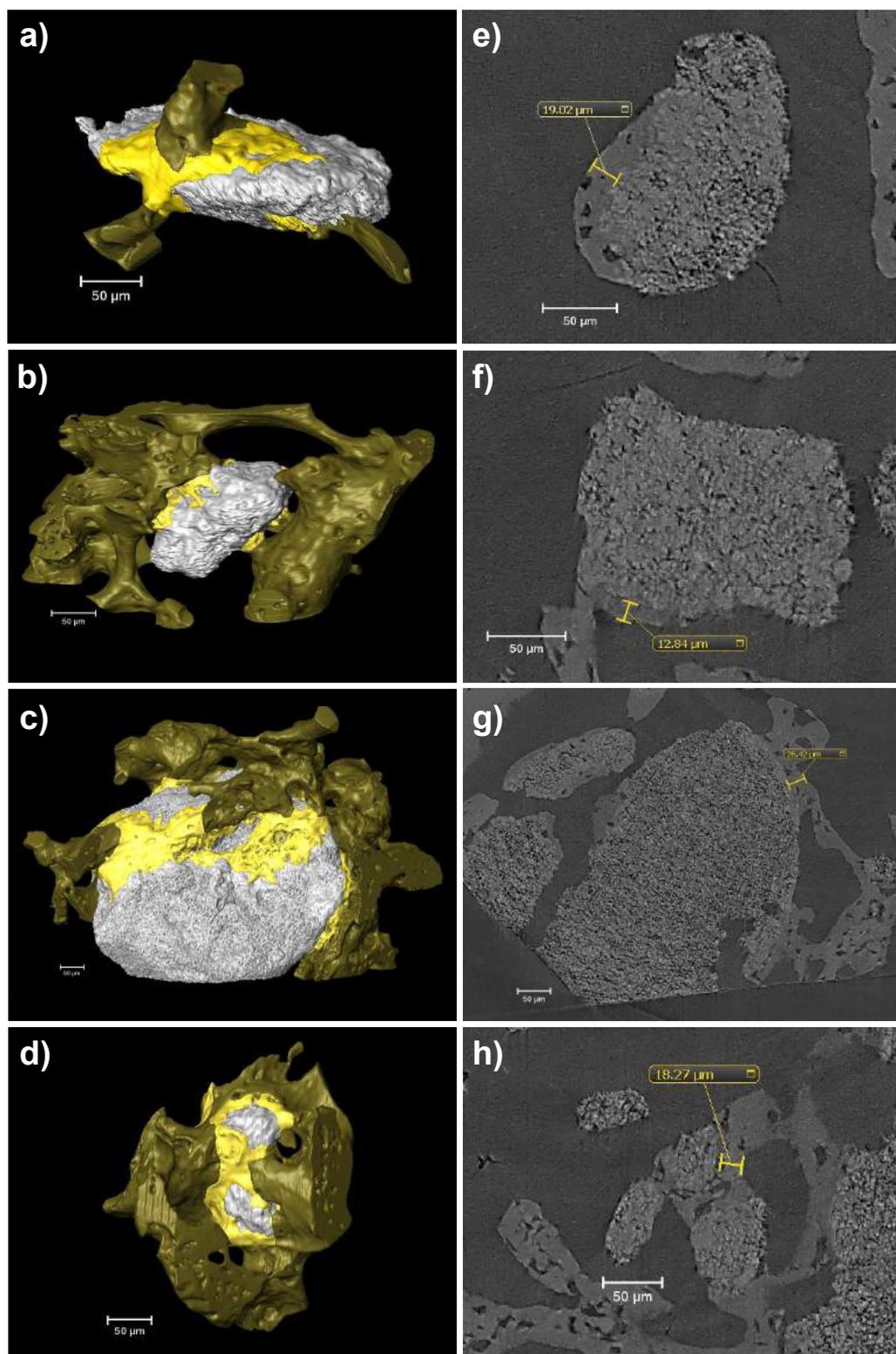


Figura 5.20: Exemplos de iteração e crescimento de osso sobre a superfície dos fragmentos de microsferas para a amostra implantada durante 3 semanas. a-d) representação 3D dos fragmentos (branco) e a sua interação com o osso novo (verde escuro) e o osso novo crescido na superfície do material (amarelo); e-h) *Slices* reconstruídos correspondentes às imagens da esquerda. Barra de escala: 50 μm .

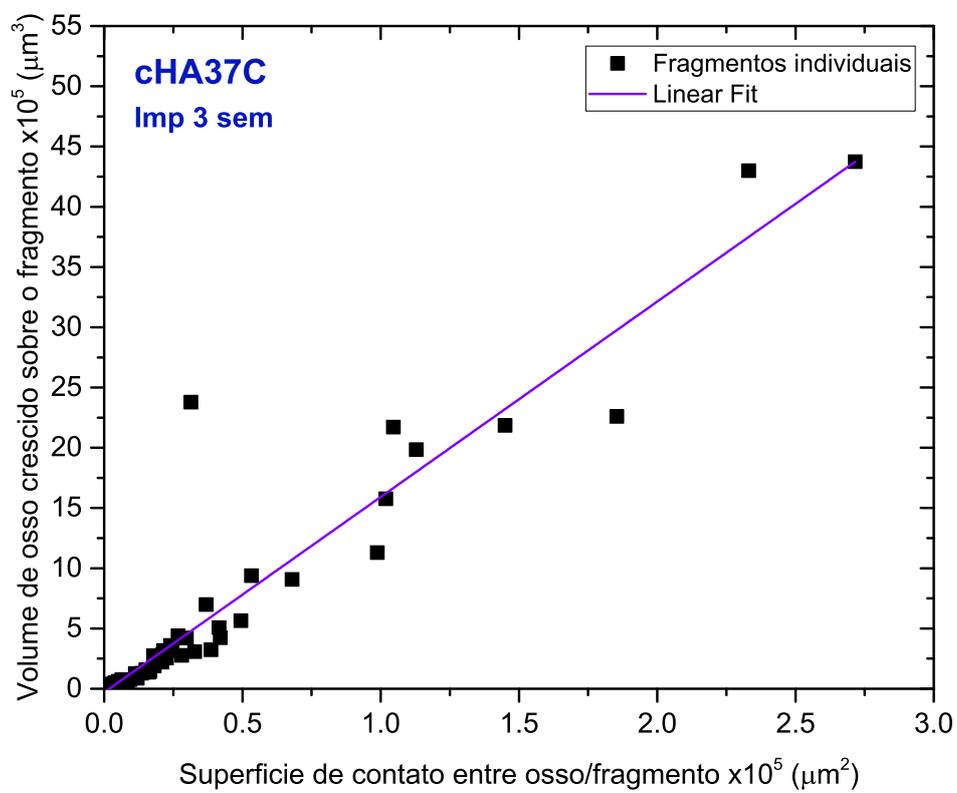


Figura 5.21: Relação entre volume e superfície de osso crescido sobre a superfície disponível de cada fragmento.

5.6 Formação de tecido mineralizado (TM) na superfície do biomaterial

Nesta parte do trabalho foi estudado a interface entre o osso e o biomaterial na escala sub-micrométrica com a técnica SEM-FIB. Foi selecionada e identificada a região de interesse a partir de uma correlação entre medidas de SR- μ CT e o SEM-FIB. A Figura 5.22 mostra uma imagem de SR- μ CT indicando a região na interface entre o biomaterial e o osso, onde foi feita a trincheira para a medida de SEM-FIB usando a técnica de *Slice and View*.

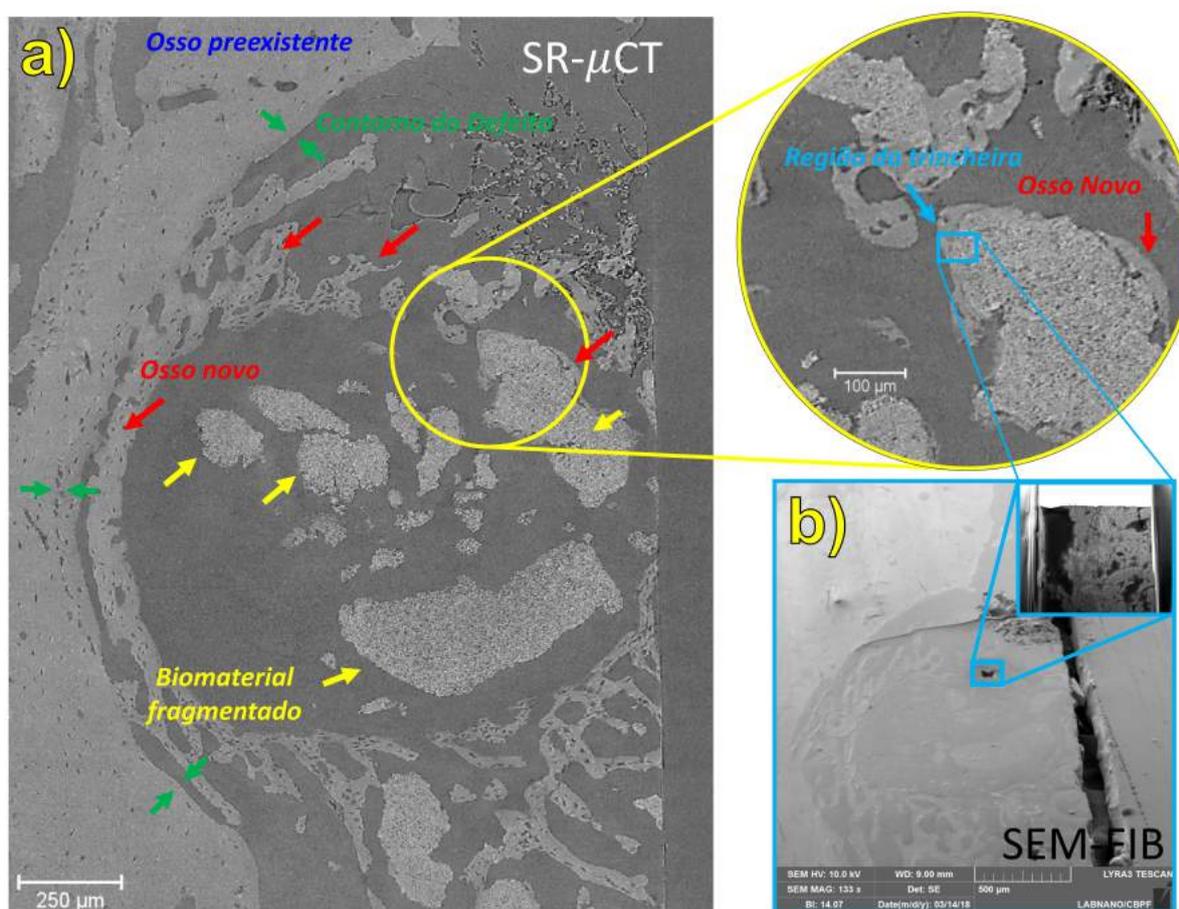


Figura 5.22: Correlação entre micro e nanotomografia, por SR- μ CT e SEM-FIB (*Slice and View*) respectivamente. Se mostra pelas duas técnicas a região correspondente onde foi analisada a amostra. a) *Slice* ortogonal da reconstrução da microesfera de cHA implantada por 3 semanas; e b) Imagem SEM, mostrando a região onde foi feita a trincheira para a nanotomografia (*Slice and View*).

A tomografia de elétrons por *Slice and View* revelou a presença de tecido mineral dentro dos poros do material, foi analisada uma região da interface entre o "osso" e o material (Figura 5.23a). O volume renderizado da região é mostrado na Figura 5.23b, claramente tem tecido mineral em regiões internas do material compondo inclusive um 32% do espaço disponível (porosidade), as imagens indicam a formação de TM em regiões de 1 μm ou menor (Figura 5.23c-e).

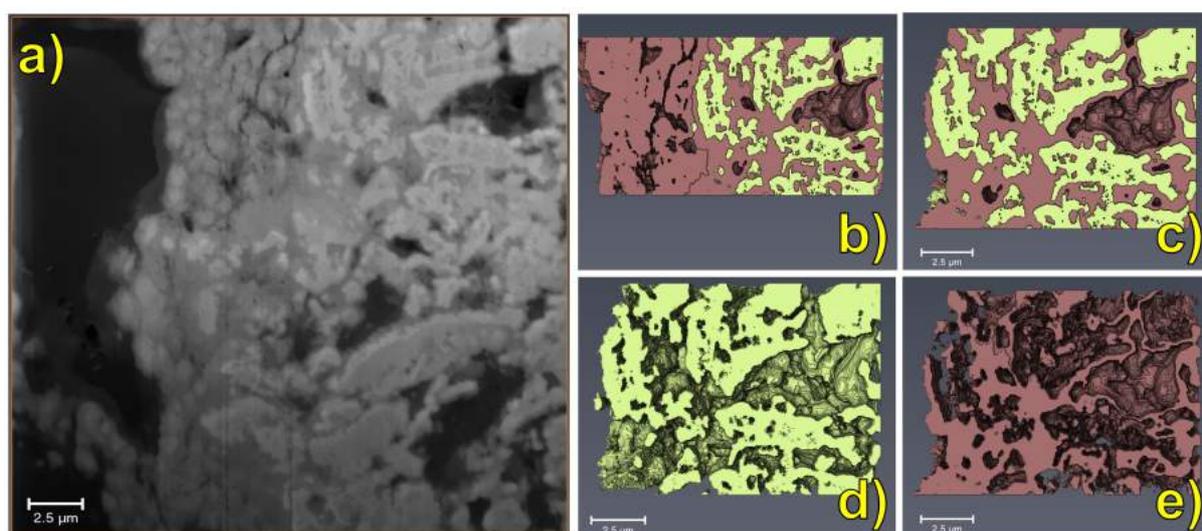


Figura 5.23: Região analisada no modo *Slice and View* (BSE). a) Imagem BSE; b) segmentação mostrando a fase do tecido mineralizado (marrão), material (verde) e poros; c) região interior do material mostrando osso crescendo dentro dos poros; d) volume renderizado do material; e e) volume renderizado do osso dentro dos poros do material.

Uma das evidências que nos leva a interpretar este tecido mineral como uma fase óssea não completamente formada é o resultado da análise de EDS em determinadas regiões que corresponderiam ao osso. Observou-se a presença, principalmente de Ca e P nas regiões analisadas, tanto para a região ocupada pelo material, quanto para a do osso (Figuras 5.24a-e).

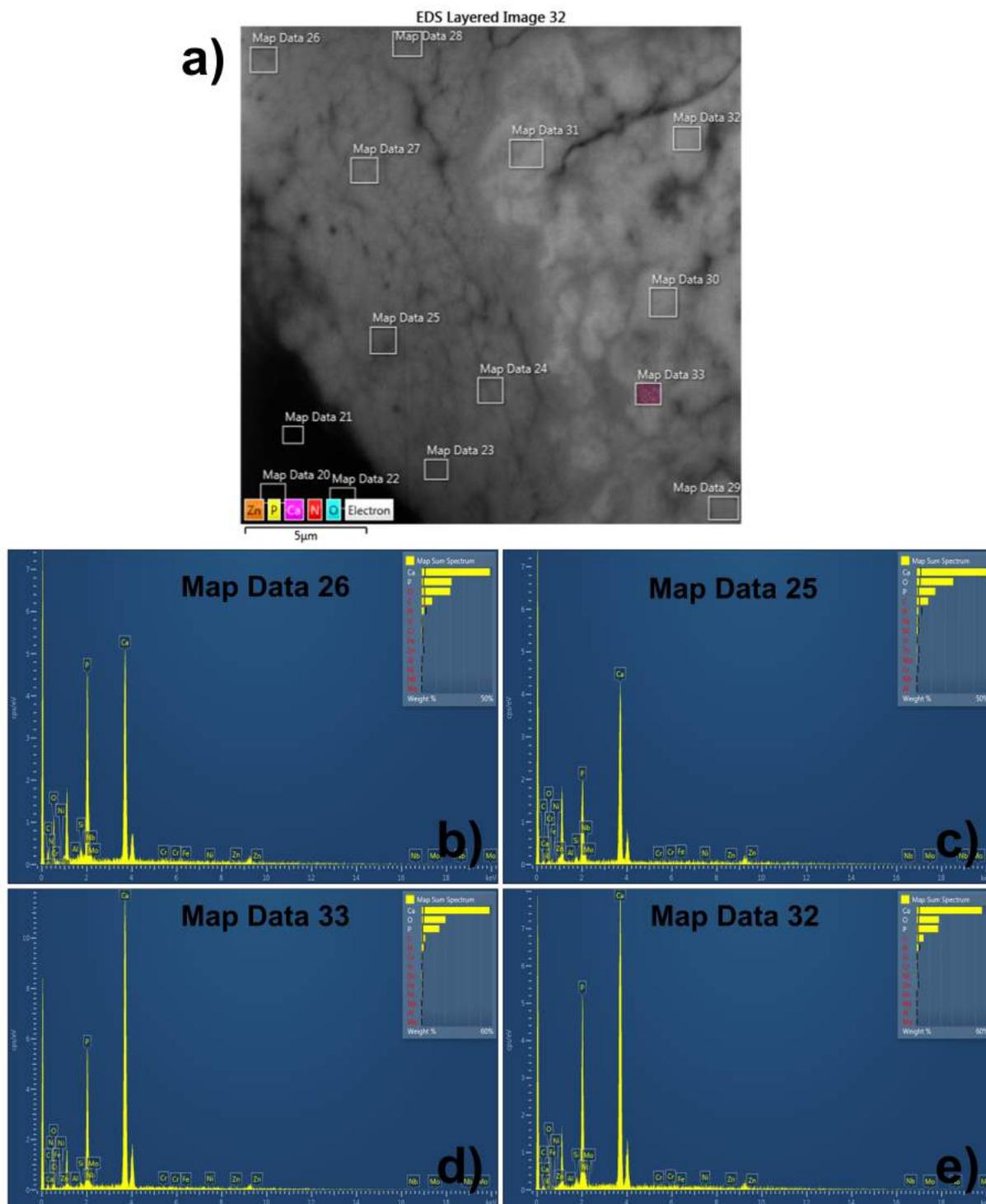


Figura 5.24: EDS da região da interface na amostra de cHA implantada durante 3 semanas. a) Imagem BSE; b-e) Mapeamento 26, 25, 33 e 32 respectivamente.

Finalmente as imagens de TEM na região interior da microesfera, mostraram que efetivamente existe um tecido mineral, ligeiramente organizado no interior dos poros, inclusive este apresenta uma difração de elétrons típica de osso o que nos leva a interpretar que o crescimento de TM em regiões menores do que $1\ \mu\text{m}$ é possível (Figura 5.25a-d), contrário ao reportado por Laurence E. Rustom et al. [20], nas Figura 5.25b-d podem-se identificar tanto o material quanto a fase mineral ou TM, por SAED.

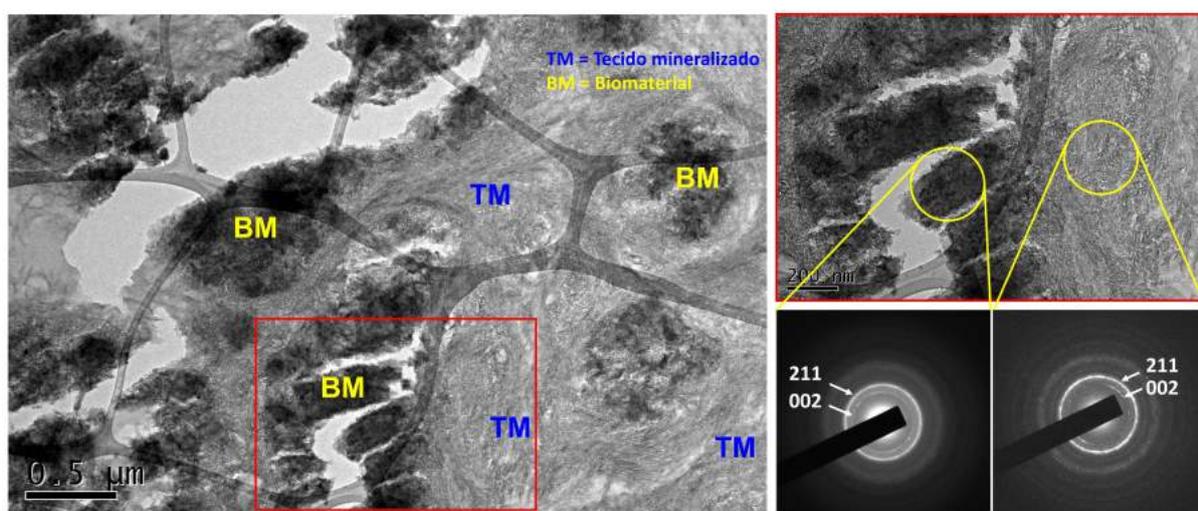


Figura 5.25: Imagem de TEM, da região interior da esfera. a) Região interior mostrando a presença de tecido mineralizado (TM) dentro dos poros do biomaterial. b-d) Identificação do biomaterial por difração de elétrons de área selecionada (SAED), mostrado os índices de Miller correspondentes aos planos da apatita, e a "meia lua" do 002 característico da apatita do osso.

Devido ao fato que não foi feita uma análise detalhada da qualidade do tecido crescido dentro da porosidade do material, não foi possível determinar seu grau de organização. Entretanto pode-se notar claramente o feixe de fibras circundado o biomaterial, motivo pelo qual foi chamado de tecido mineralizado (TM).

5.7 Liberação de íons para o meio

Análises de mapeamento elementar por SR- μ XRF mostraram que existe uma possível liberação de íons de Ca, P e Zn para o meio biológico, que, seguindo com a interpretação das análises por TEM, esta liberação seria em forma de nanopartículas (natureza originária do compósito cHA/alginato implantado) como é mostrado na Figura 5.26.

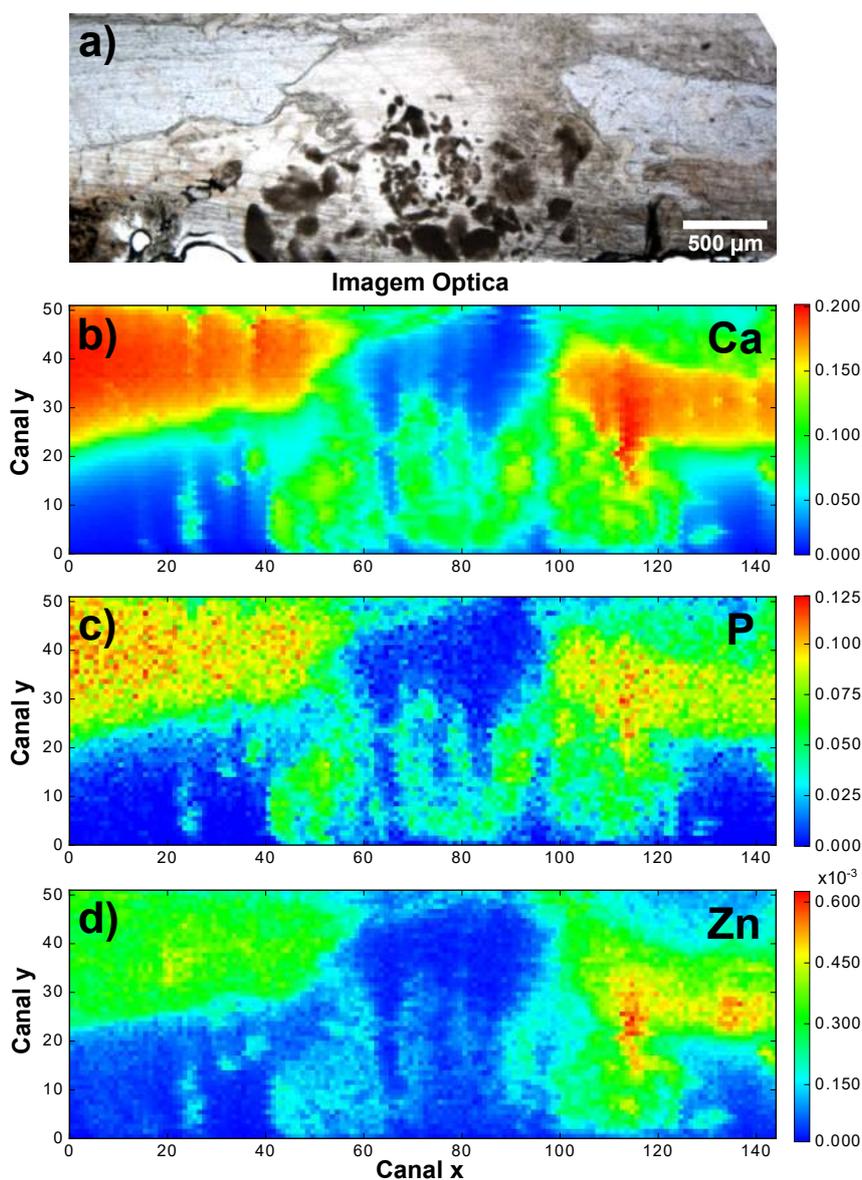


Figura 5.26: Mapeamento por SR- μ XRF do implante cHA após 3 semanas. a) Imagem optica da região; b) Mapeamento de Ca, c) P, e d) Zn.

5.8 Degradação e biodisponibilização de hidroxiapatitas carbonatadas dopadas com zinco em defeitos ósseo em calvaria.

Nesta parte do trabalho estudou-se a degradação *in vivo* das microesferas de cHA e Zn-cHA implantadas durante 6 meses, nas escalas micro e nano, utilizando SR- μ XRF e TEM. O mapeamento por SR- μ XRF detectou variações nas concentrações de Ca, P e Zn na vizinhança da microesfera. No entanto os aglomerados de nanopartículas identificados por TEM foram liberados no meio biológico.

5.8.1 Mapeamento de cHA por SR- μ XRF

Foram escolhidas duas regiões para análise por SR- μ XRF, no centro do defeito (região 1) e próximo ao osso preexistente na extremidade do defeito (região 2) (Figura 5.27).

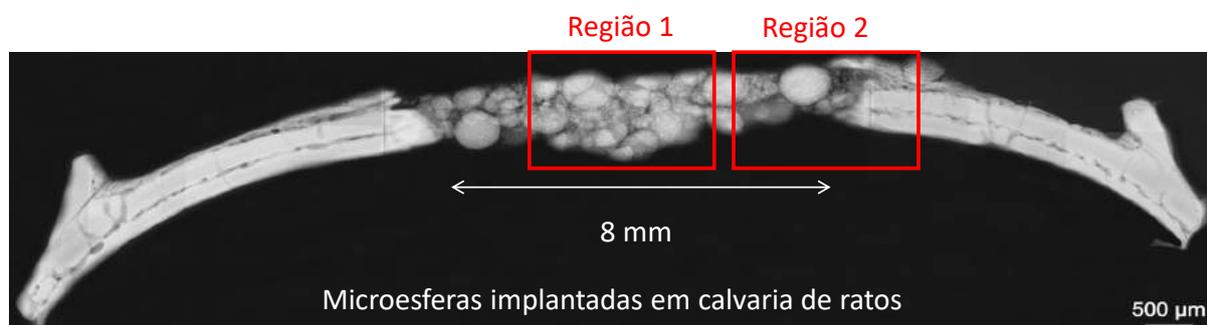


Figura 5.27: Radiografia mostrando as regiões analisadas no defeito de calvaria. Região 1 (centro do defeito) e região 2 (borda do defeito).

O mapeamento elementar das regiões analisadas revelou quantidades elevadas de Ca e P fora das microesferas para ambas amostras (Figuras 5.28, 5.29, 5.31, 5.32). A cHA apresenta um conteúdo de cálcio nas imediações da microesfera a 50% das quantidades observadas no interior dela como é mostrado nos perfis elementares de Ca, P e Zn (Figura 5.29b-d). O alto nível de Ca é atribuído a alta degradação do material, e em menor abundância mineralização local na vizinhança da microesfera.

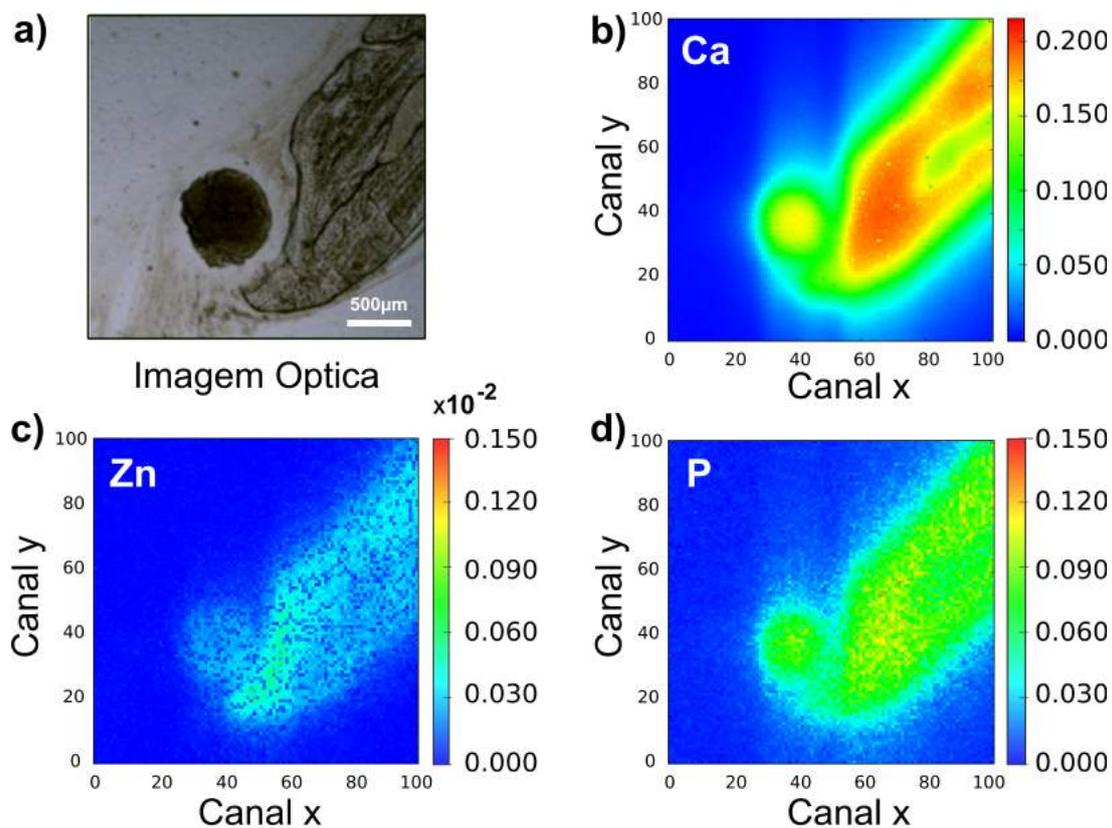


Figura 5.28: Mapeamento elemental por μ XRF da amostra de cHA implantada durante 6 meses (região 2). a) Imagem óptica; b-d) mapeamento de Ca, Zn e P respectivamente.

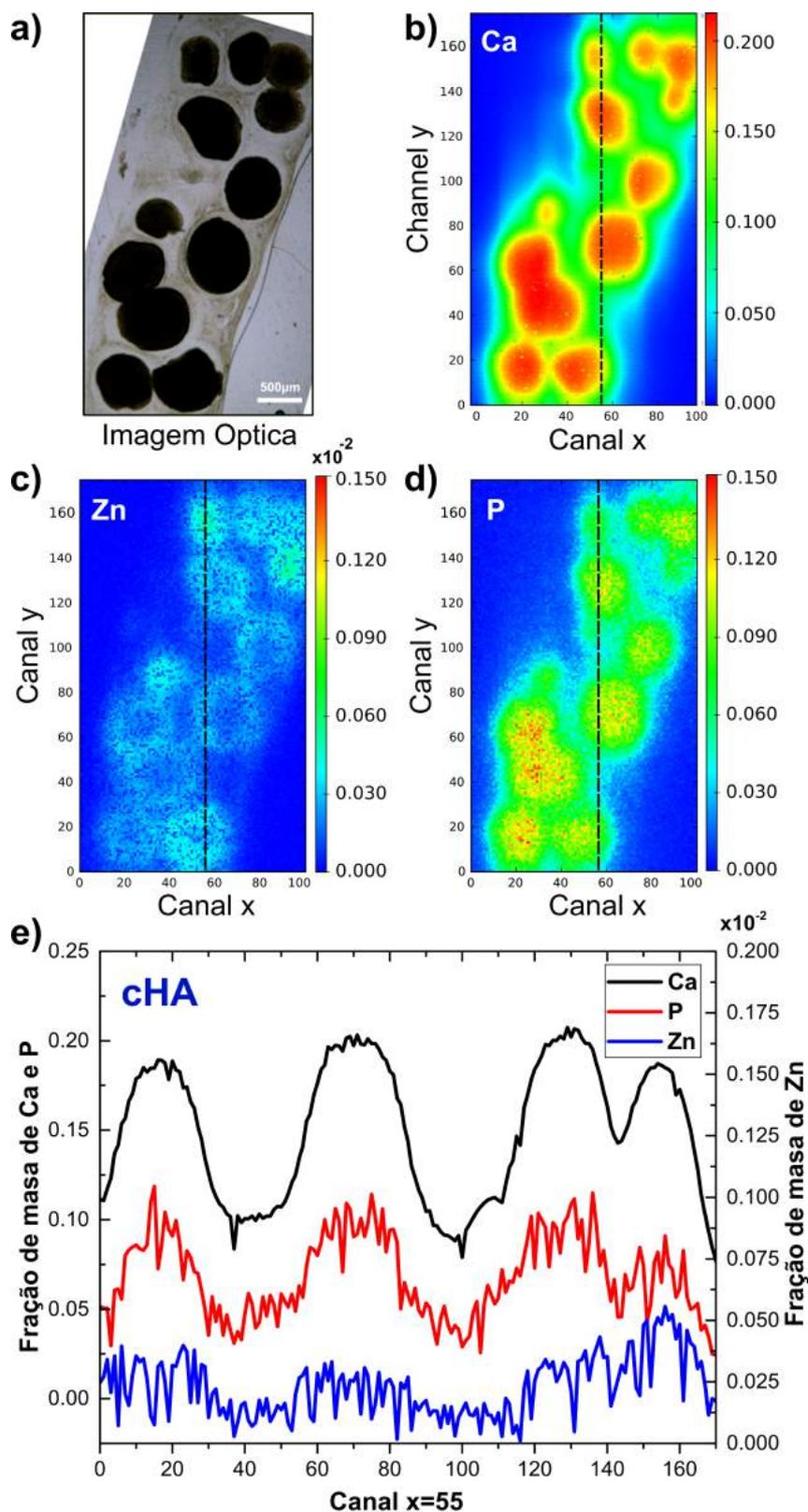


Figura 5.29: Mapeamento elementar por μ XRF da amostra de cHA implantada durante 6 meses (região 1). a) Imagem óptica; b-d) mapeamento de Ca, Zn e P respectivamente; e) Perfil elementar correspondente ao canal x=55.

A degradação do material libera altas quantidades de Ca e P no meio biológico durante o período experimental. Parte dos íons não foi absorvido pelo organismo e continuou re-tido nas vizinhanças das microesferas. As Figura 5.30a e b mostram um mapeamento da razão Ca/P na região 1. Vale a pena destacar que esta proporção aumentou em regiões fora da microesfera, o que indica a reabsorção não estequiométrica de Ca e P no fluido biológico. Embora as microesferas de cHA não contenha Zn, foram encontradas uma pequena quantidade nas proximidades delas e também associadas a elas. A quantidade de Zn associada às microesferas foi semelhante àquela ligada ao osso antigo da calvária e 10 vezes maior que o fundo de Zn encontrado em áreas distantes dos materiais implantados (Figura 5.28c).

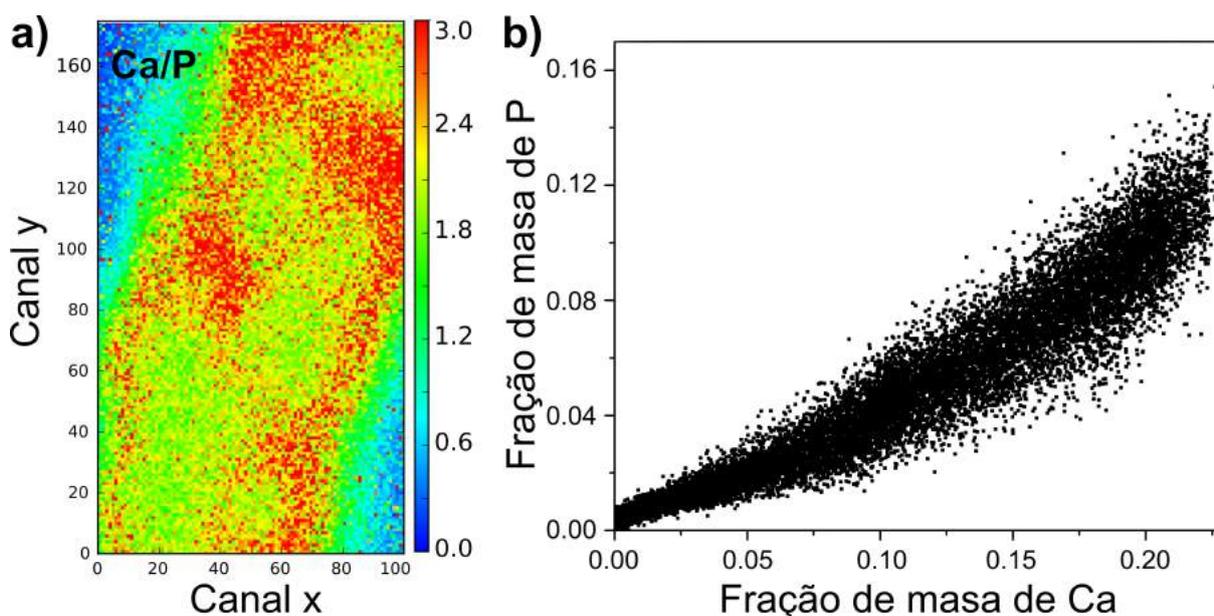


Figura 5.30: Mapeamento da razão de massa Ca/P (região 1) da amostra de cHA. a) Mapeamento da razão de massa Ca/P; b) Perfil da razão de massa Ca/P.

5.8.2 Mapeamento de Zn-cHA por SR- μ XRF

Para a amostra de Zn-cHA, tanto na região 1 quanto na região 2 não apresentou nenhuma formação de osso novo na vizinhança da microesfera (Figuras 5.31a e 5.32a). Os

mapas elementares das frações de massa Ca e P seguiram um perfil semelhante ao do grupo cHA (Figuras 5.31b,d e 5.32b,d). Pode-se observar grandes quantidades de Ca, P e Zn nas imediações da microesfera (Figuras 5.31b-d e 5.32b-d). Estes elementos estavam muito bem distribuídos, com uma razão de massa quase constante de Ca/P e Zn/Ca (Figuras 5.33a e 5.34a), semelhante ao interior das microesferas como mostrado nos perfis de massa de Zn e Ca e distribuições de Zn e Ca (Figura 5.32e e 5.34b). Um alto teor de Zn foi encontrado no interior das microesferas de Zn-cHA, com uma razão Zn/Ca próxima à do pó (~ 0.05).

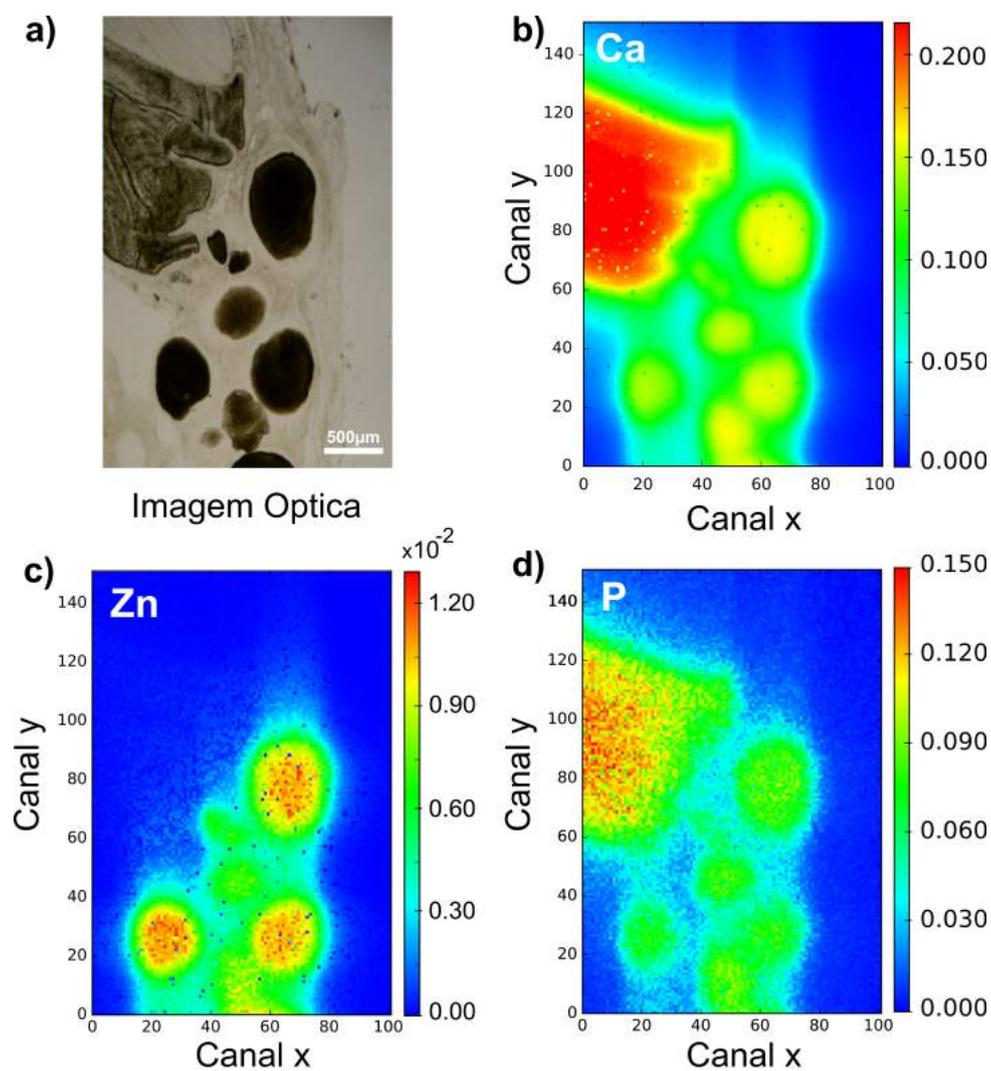


Figura 5.31: Mapeamento elemental por μ XRF da amostra de Zn-cHA implantada durante 6 meses (região 2). a) Imagem óptica; b-d) mapeamento de Ca, Zn e P respectivamente.

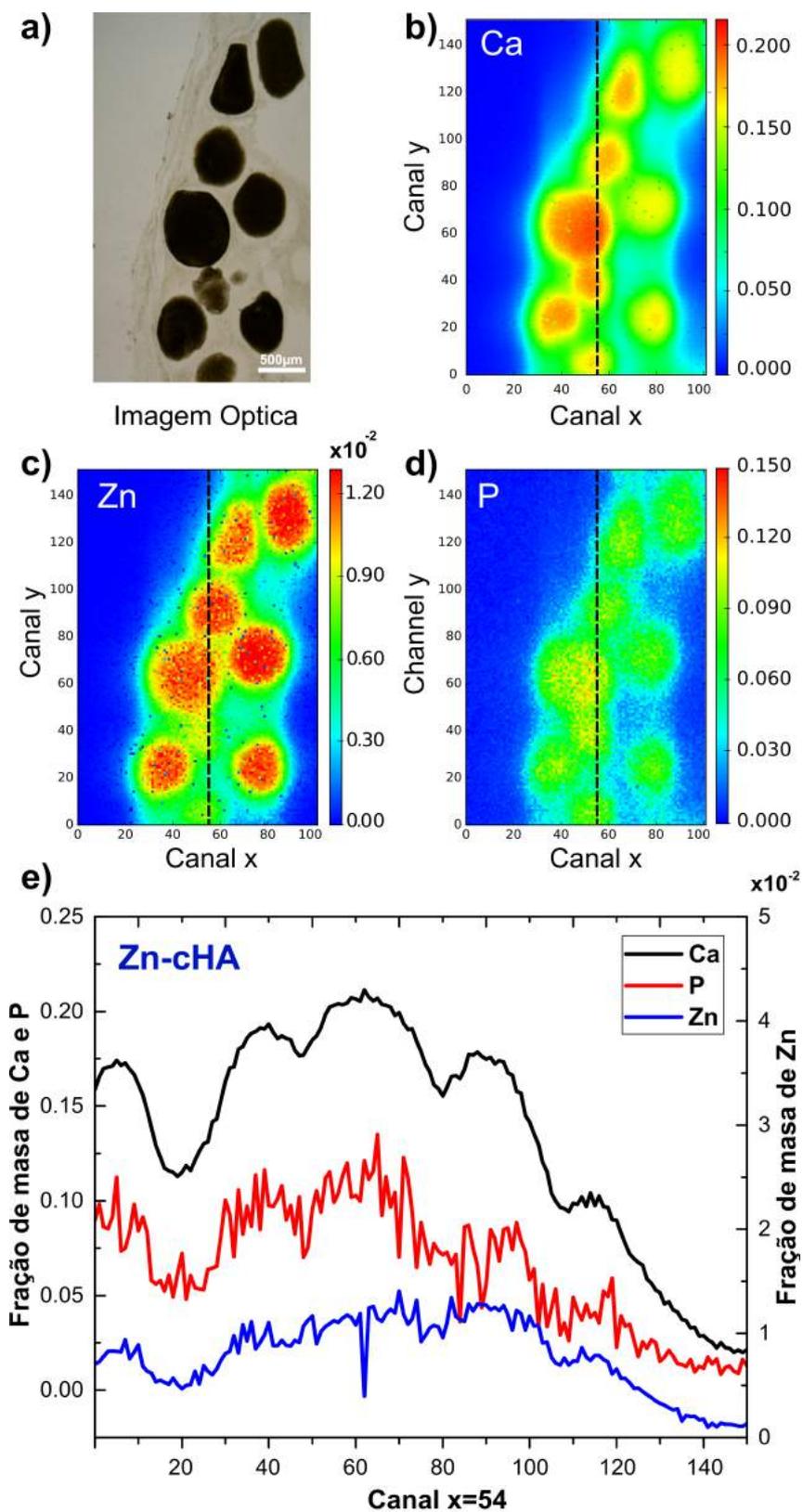


Figura 5.32: Mapeamento elemental por μ XRF da amostra de Zn-cHA implantada durante 6 meses (região 1). a) Imagem óptica; b-d) mapeamento de Ca, Zn e P respectivamente; e e) Perfil elemental correspondente ao canal x=54.

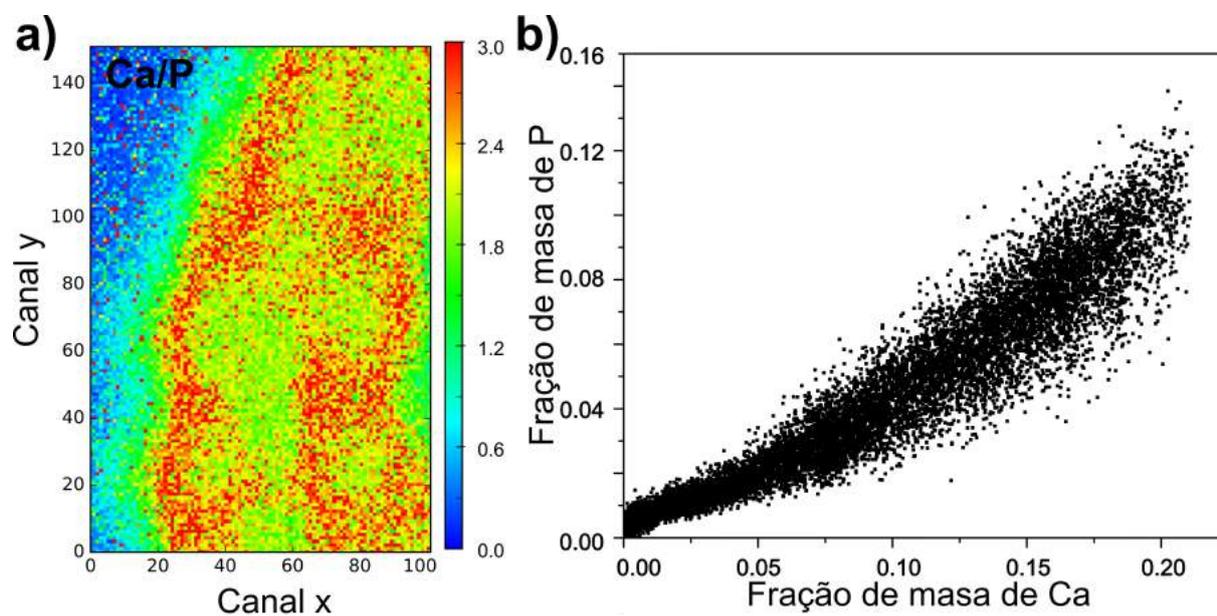


Figura 5.33: Mapeamento da razão de massa Ca/P (região 1) da amostra de Zn-cHA. a) Mapeamento da razão de massa Ca/P; b) Perfil da razão de massa Ca/P.

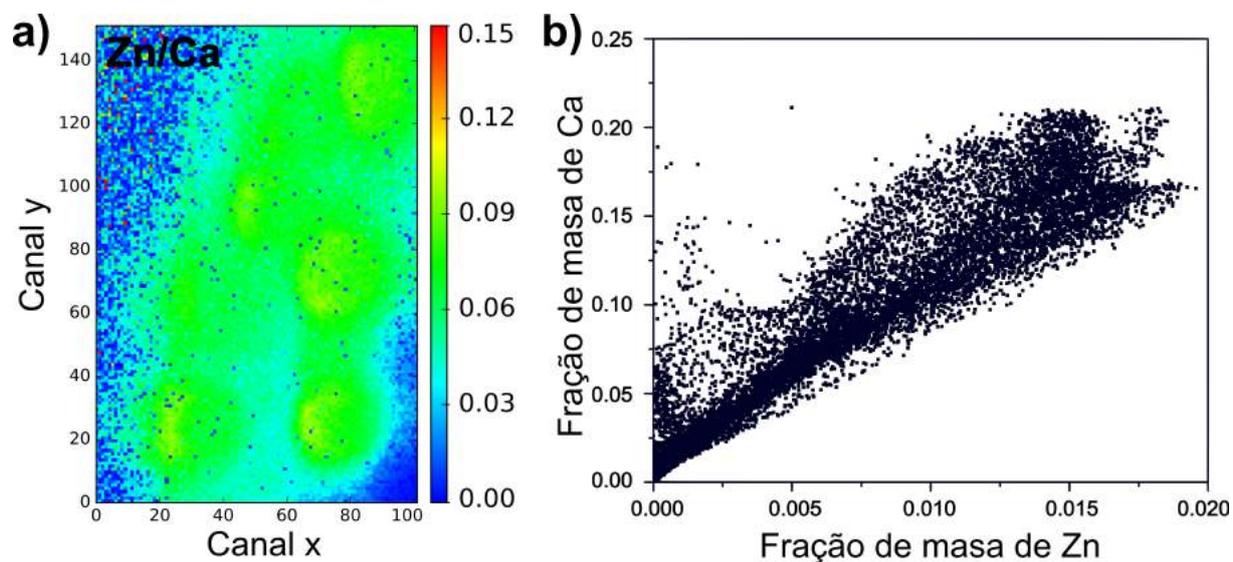


Figura 5.34: Mapeamento da razão de massa Zn/Ca (região 1) da amostra de Zn-cHA. a) Mapeamento da razão de massa Zn/Ca; b) Perfil da razão de massa Zn/Ca.

5.8.3 Análise por TEM

As análises de TEM foram realizadas com cortes ultrafinos (~ 70 nm) dos defeitos implantados por microesferas (período: 6 meses) em regiões próximas à superfície do material. As Figura 5.35a e d mostram o interior das microesferas cHA e Zn-cHA, respectivamente. Os anéis do padrão SAED corresponderam a 0.34 nm (mais internos) e 0.28 nm (mais externos), os quais foram relacionados aos planos 002 e 211 da HA, respectivamente. O interior das microesferas foi formado por agregados de partículas e espaços sem material inorgânico, com tamanhos inferiores a 600 nm. Na superfície (Figura 5.35b, c, e e f), as partículas semelhantes a agulhas e os agregados foram destacados das microesferas e dispensados para o meio biológico. Este efeito ocorreu principalmente na amostra de Zn-cHA, onde foram observadas pequenas partículas em forma de agulha fora das microesferas (Figura 5.35f).

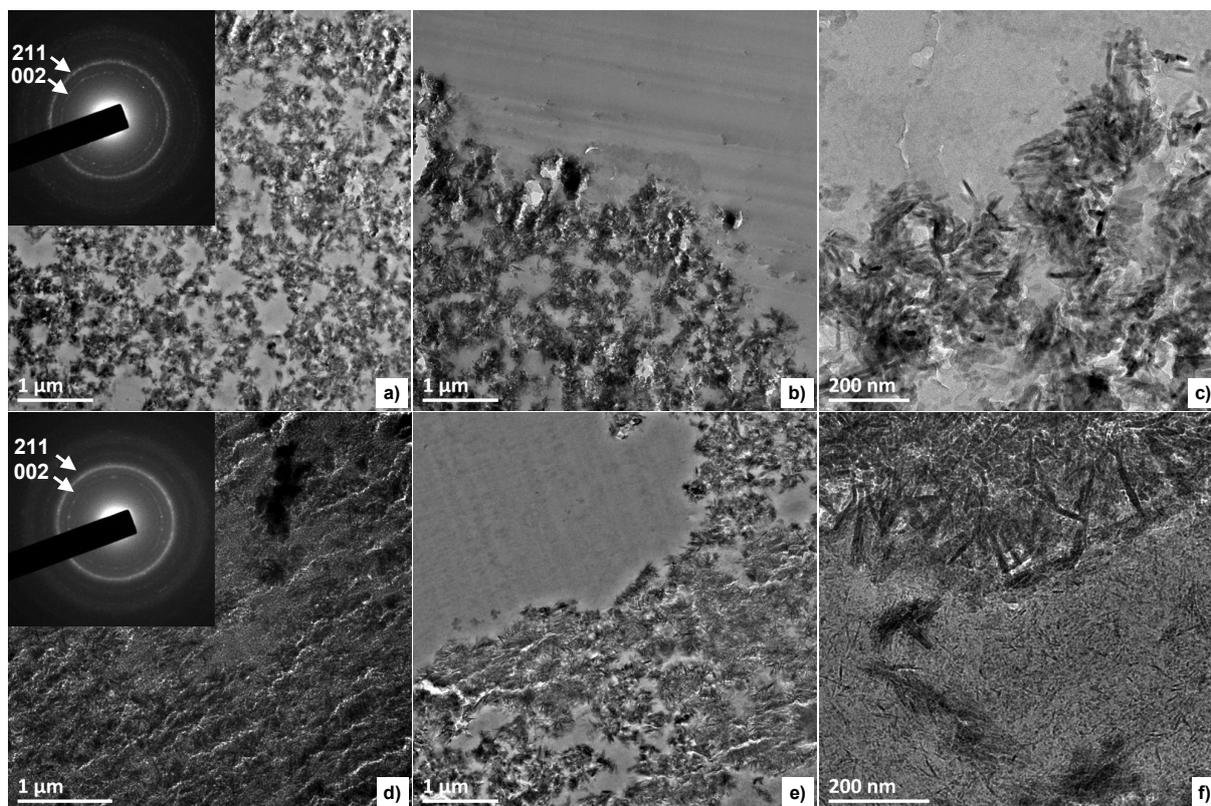


Figura 5.35: Imagens de TEM das microesferas após 6 meses de implantação. a-c) cHA; e d-f) Zn-cHA. Inserido: Padrões de SAED indicando os índices de Miller de cada anel.

Capítulo 6

Conclusões e propostas futuras

- i. Este trabalho mostrou que a arquitetura do osso trabecular recém formado é estabelecida geneticamente, e é anterior as mudanças de orientações das trabéculas devido as tensões e cargas mecânicas produzidas sobre o osso durante a vida do animal. O padrão topológico da estrutura trabecular segue o princípio da tensegridade.
- ii. Mostrou-se pela primeira vez que presença do biomaterial no defeito ósseo não modifica a arquitetura trabecular intrínseca do osso regenerado, apesar de atrasar o crescimento morfológico das trabéculas.
- iii. O biomaterial favoreceu um preenchimento mais homogêneo na região do defeito devido à sua propriedade osteocondutora, e alto índice de fragmentação.
- iv. O biomaterial nanoestruturado sofre importantes mudanças após a implantação, tais como, a fragmentação, a modificação na porosidade interna e a liberação de íons e partículas para o meio biológico.
- v. O mapeamento elementar de SR- μ XRF permitiu a caracterização da degradação in vivo das microesferas cHA e Zn-cHA. O alto nível de Ca e Zn que foram liberados das microesferas para o meio, e a baixa reabsorção desses metais no fluido biológico desempenharam papéis críticos na inibição da osteocondução e subsequente no comprometimento do reparo ósseo. O controle efetivo da taxa de dissolução é uma

questão crítica para o desenvolvimento de arcabouços eficientes de fosfato de cálcio nanoestruturado para regeneração óssea.

- vi. Mostrou-se pela primeira vez que TM com baixo grau de organização é formado em regiões internas do material, em poros $\leq 500 \mu m$, que segundo a literatura, não teria condição de mineralização. Os resultados sugerem que este tecido mineralizado está associado a fibrila de colágeno. Os processos de formação do TM apontam para um mecanismo de biomineralização mediado por células.
- vii. A análise da interface osso/biomaterial com técnicas analíticas 3D, com resolução na nanoescala revelou a estreita associação do tecido mineralizado com nanopartículas e nanoagregados do biomaterial, formando um sistema do tipo compósito.

Propostas futuras:

1. Estudar a arquitetura de crescimento ósseo em periodos de até 1 semana para entender como é estabelecida a construção da rede de trabéculas
2. Explorar a fase orgânica presente no sistema e analisar se existe uma implicância destes elementos na orientação e formação de redes de trabéculas.
3. Estudar os efeitos *in situ* de fluidos biológicos em biomateriais (MOGNO).
4. Experimentos *in vivo* (MOGNO).
5. Estudo de outros sistemas biológicos que apresentam estruturas organizadas hierarquicamente.

Referências Bibliográficas

- [1] Bone Graft Substitutes Market Report Forecast to 2027 | MRFR, 2017.
- [2] BONE GRAFTS AND SUBSTITUTES-GLOBAL ANALYSIS AND MARKET FORECASTS. Technical report, 2014.
- [3] H Autefage, F Allen, HM Tang, C Kallepitis, E Gentleman, N Reznikov, K Niti-putri, A Nommeots-Nomm, MD O'Donnell, C Lange, et al. Multiscale analyses reveal native-like lamellar bone repair and near perfect bone-contact with porous strontium-loaded bioactive glass. *Biomaterials*, 2019.
- [4] Hong Jiang, Yi Zuo, Qin Zou, Huanan Wang, Jingjing Du, Yubao Li, and Xiaochao Yang. Biomimetic spiral-cylindrical scaffold based on hybrid chitosan/cellulose/nano-hydroxyapatite membrane for bone regeneration. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 5(22):12036–12044, 2013.
- [5] Jinbing Wang, Dingyu Wu, Zhanzhao Zhang, Jun Li, Yi Shen, Zhenxing Wang, Yu Li, Zhi Yong Zhang, and Jian Sun. Biomimetically Ornamented Rapid Prototyping Fabrication of an Apatite-Collagen-Polycaprolactone Composite Construct with Nano-Micro-Macro Hierarchical Structure for Large Bone Defect Treatment. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(47):26244–26256, 2015.
- [6] P. K. Zysset, M. S. Ominsky, and S. A. Goldstein. A novel 3D microstructural model for trabecular bone: I. The relationship between fabric and elasticity. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, 1(4):321–331, 1998.

- [7] Jean-François Stoltz, Jacques Magdalou, Daniel George, Yun Chen, Yinping Li, Natalia De Isla, Xiaohua He, and Yves Remond. Influence of mechanical forces on bone: Introduction to mechanobiology and mechanical adaptation concept. *Journal of Cellular Immunotherapy*, 4(1):10–12, 2018.
- [8] Natalie Reznikov, Ron Shahar, and Steve Weiner. Bone hierarchical structure in three dimensions. *Acta Biomaterialia*, 10(9):3815–3826, 2014.
- [9] Slawomir Lukomski, Beth A Bachert, Flavia Squeglia, and Rita Berisio. Collagen-like proteins of pathogenic streptococci. *Molecular microbiology*, 103(6):919–930, 2017.
- [10] Barbara Brodsky and John AM Ramshaw. Bioengineered collagens. In *Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms*, pages 601–629. Springer, 2017.
- [11] HI Roach. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? the possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. *Cell biology international*, 18(6):617–628, 1994.
- [12] David JS Hulmes. Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. *Journal of structural biology*, 137(1-2):2–10, 2002.
- [13] Fabio Nudelman, Koen Pieterse, Anne George, Paul H.H. Bomans, Heiner Friedrich, Laura J. Brylka, Peter A.J. Hilbers, Gijsbertus De With, and Nico A.J.M. Sommerdijk. The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors. *Nature Materials*, 9(12):1004–1009, 2010.
- [14] Natalie Reznikov, Rotem Almany-Magal, Ron Shahar, and Steve Weiner. Three-dimensional imaging of collagen fibril organization in rat circumferential lamellar bone using a dual beam electron microscope reveals ordered and disordered sublamellar structures. *Bone*, 52(2):676–683, 2013.

- [15] Li Na Niu, Sang Eun Jee, Kai Jiao, Lige Tonggu, Mo Li, Ligu Wang, Yao Dong Yang, Ji Hong Bian, Lorenzo Breschi, Seung Soon Jang, Ji Hua Chen, David H. Pashley, and Franklin R. Tay. Collagen intrafibrillar mineralization as a result of the balance between osmotic equilibrium and electroneutrality. *Nature Materials*, 16(3):370–378, 2017.
- [16] F. Faot, M. Chatterjee, G. V. de Camargos, Joke Duyck, and K. Vandamme. Micro-CT analysis of the rodent jaw bone micro-architecture: A systematic review. *Bone Reports*, 2:14–24, 2015.
- [17] Natalie Reznikov, Oliver R. Boughton, Shaaz Ghouse, Anne E. Weston, Lucy Collinson, Gordon W. Blunn, Jonathan R.T. Jeffers, Justin P. Cobb, and Molly M. Stevens. Individual response variations in scaffold-guided bone regeneration are determined by independent strain- and injury-induced mechanisms. *Biomaterials*, 194:183–194, feb 2019.
- [18] John G. Skedros and Sidney L. Baucom. Mathematical analysis of trabecular 'trajectories' in apparent trajectorial structures: The unfortunate historical emphasis on the human proximal femur. *Journal of Theoretical Biology*, 244(1):15–45, 2007.
- [19] Arun K. Nair, Alfonso Gautieri, Shu Wei Chang, and Markus J. Buehler. Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone. *Nature Communications*, 4:1724–1729, 2013.
- [20] Laurence E. Rustom, Michael J. Poellmann, and Amy J. Wagoner Johnson. Mineralization in micropores of calcium phosphate scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 83:435–455, 2019.
- [21] Marc Bohner, Gamal Baroud, Anke Bernstein, Nicola Döbelin, Laetitia Galea, Bernhard Hesse, Roman Heuberger, Sylvain Meille, Pascal Michel, Brigitte von Rechenberg, Jorge Sague, and Howard Seeherman. Characterization and distribution of

- mechanically competent mineralized tissue in micropores of β -tricalcium phosphate bone substitutes. *Materials Today*, 20(3):106–115, 2017.
- [22] Natalie Reznikov, Matthew Bilton, Leonardo Lari, Molly M. Stevens, and Roland Kröger. Fractal-like hierarchical organization of bone begins at the nanoscale. *Science*, 360(6388), 2018.
- [23] Reznikov N., Chase H., Ben Zvi Y., Tarle V., Singer M., Brumfeld V., Shahar R., Weiner S., Natalie Reznikov, Hila Chase, Yehonatan Ben Zvi, Victoria Tarle, Matthew Singer, Vlad Brumfeld, Ron Shahar, and Steve Weiner. Inter-trabecular angle: A parameter of trabecular bone architecture in the human proximal femur that reveals underlying topological motifs. *Acta Biomaterialia*, 44:65–72, 2016.
- [24] Yehonatan Ben-Zvi, Natalie Reznikov, Ron Shahar, and Steve Weiner. 3D Architecture of Trabecular Bone in the Pig Mandible and Femur: Inter-Trabecular Angle Distributions. *Frontiers in Materials*, 4(September):1–15, 2017.
- [25] Rene Motro. Tensegrity systems: the state of the art. *International journal of space structures*, 7(2):75–83, 1992.
- [26] Donald E Ingber. Tensegrity i. cell structure and hierarchical systems biology. *Journal of cell science*, 116(7):1157–1173, 2003.
- [27] A. Petersen, A. Princ, G. Korus, A. Ellinghaus, H. Leemhuis, A. Herrera, A. Klaumünzer, S. Schreivogel, A. Woloszyk, K. Schmidt-Bleek, S. Geissler, I. Heschel, and G. N. Duda. A biomaterial with a channel-like pore architecture induces endochondral healing of bone defects. *Nature Communications*, 9(1), 2018.
- [28] G Harry van Lenthe, Marc Bohner, Ralph Müller, Brigitte von Rechenberg, Beat Gasser, Marie-Cécile von Doernberg, Gamal Baroud, Sonja Grünenfelder, Jörg

- Auer, and Robert Mathys. In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. *Biomaterials*, 27(30):5186–5198, 2006.
- [29] Michael Stiller, Alexander Rack, Simon Zabler, Jürgen Goebbels, Olaf Dalügge, Sebastian Jonscher, and Christine Knabe. Quantification of bone tissue regeneration employing β -tricalcium phosphate by three-dimensional non-invasive synchrotron micro-tomography – a comparative examination with histomorphometry. *Bone*, 44(4):619–628, 2009.
- [30] Marc Böhner, Laetitia Galea, and Nicola Doebelin. Calcium phosphate bone graft substitutes: Failures and hopes. *Journal of the European Ceramic Society*, 32(11):2663–2671, 2012.
- [31] Albert Barba, Yassine Maazouz, Anna Diez-Escudero, Katrin Rappe, Montserrat Espanol, Edgar B. Montufar, Caroline Öhman-Mägi, Cecilia Persson, Pedro Fontecha, Maria Cristina Manzanares, Jordi Franch, and Maria Pau Ginebra. Osteogenesis by foamed and 3D-printed nanostructured calcium phosphate scaffolds: Effect of pore architecture. *Acta Biomaterialia*, 79:135–147, 2018.
- [32] Tao Gong, Jing Xie, Jinfeng Liao, Tao Zhang, Shiyu Lin, and Yunfeng Lin. Nanomaterials and bone regeneration. *Bone Research*, 3, 2015.
- [33] Hongjian Zhou and Jaebeom Lee. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. 2011.
- [34] Jayachandran Venkatesan and Se-Kwon Kim. Nano-hydroxyapatite composite biomaterials for bone tissue engineering? a review. *Journal of biomedical nanotechnology*, 10(10):3124–3140, 2014.
- [35] Deepak Kumar Khajuria, Vijay Bhooshan Kumar, Dana Gigi, Aharon Gedanken, and David Karasik. Accelerated bone regeneration by nitrogen-doped carbon dots

- functionalized with hydroxyapatite nanoparticles. *ACS applied materials & interfaces*, 10(23):19373–19385, 2018.
- [36] Ting Huang, Chunquan Fan, Min Zhu, Yufang Zhu, Weizhong Zhang, and Lei Li. 3d-printed scaffolds of biomineralized hydroxyapatite nanocomposite on silk fibroin for improving bone regeneration. *Applied Surface Science*, 467:345–353, 2019.
- [37] Jin Zhang, He Liu, Jian-Xun Ding, Jie Wu, Xiu-Li Zhuang, Xue-Si Chen, Jin-Cheng Wang, Jing-Bo Yin, and Zhong-Ming Li. High-pressure compression-molded porous resorbable polymer/hydroxyapatite composite scaffold for cranial bone regeneration. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2(9):1471–1482, 2016.
- [38] Siti Maisurah Zakaria, Sharif Hussein Sharif Zein, Mohd Roslee Othman, Fang Yang, and John A Jansen. Nanophase hydroxyapatite as a biomaterial in advanced hard tissue engineering: a review. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19(5):431–441, 2013.
- [39] Weiguo Xu, Cornelia Ganz, Ulf Weber, Martin Adam, Gerd Holzhüter, Daniel Wolter, Bernhard Frerich, Brigitte Vollmar, and Thomas Gerber. Evaluation of injectable silica-embedded nanohydroxyapatite bone substitute in a rat tibia defect model. *International journal of nanomedicine*, 6:1543, 2011.
- [40] Gregory M Cooper, Mark P Mooney, Arun K Gosain, Phil G Campbell, Joseph E Losee, and Johnny Huard. Testing the "critical-size" in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-sized defect (csd). *Plastic and reconstructive surgery*, 125(6):1685, 2010.
- [41] VR Martinez-Zelaya, L Zarranz, EZ Herrera, AT Alves, MJ Uzeda, E Mavropoulos, AL Rossi, A Mello, JM Granjeiro, MD Calasans-Maia, and AM Rossi. In vitro and in vivo evaluations of nanocrystalline zn-doped carbonated hydroxyapatite/alginate

- microspheres: zinc and calcium bioavailability and bone regeneration. *International Journal of Nanomedicine*, 2019.
- [42] Gianluca Turco, Eleonora Marsich, Francesca Bellomo, Sabrina Semeraro, Ivan Donati, Francesco Brun, Micaela Grandolfo, Agostino Accardo, and Sergio Paoletti. Alginate/hydroxyapatite biocomposite for bone ingrowth: a trabecular structure with high and isotropic connectivity. *Biomacromolecules*, 10(6):1575–1583, 2009.
- [43] Yanming Wang, Xiaoxiang Ren, Xiaomin Ma, Wen Su, Yaping Zhang, Xiaosong Sun, and Xudong Li. Alginate-intervened hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanocrystals with nanopores. *Crystal Growth & Design*, 15(4):1949–1956, 2015.
- [44] Chhavi Sharma, Amit Kumar Dinda, Pravin D Potdar, Chia-Fu Chou, and Narayan Chandra Mishra. Fabrication and characterization of novel nano-biocomposite scaffold of chitosan–gelatin–alginate–hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 64:416–427, 2016.
- [45] Natalie Reznikov, Steve Weiner, Hila Chase, Vlad Brumfeld, and Ron Shahar. The 3D structure of the collagen fibril network in human trabecular bone: Relation to trabecular organization. *Bone*, 71:189–195, 2014.
- [46] Peter Varga, Alexandra Pacureanu, Max Langer, Heikki Suhonen, Bernhard Hesse, Quentin Grimal, Peter Cloetens, Kay Raum, and Françoise Peyrin. Investigation of the three-dimensional orientation of mineralized collagen fibrils in human lamellar bone using synchrotron X-ray phase nano-tomography. *Acta Biomaterialia*, 9(9):8118–8127, 2013.
- [47] Feng Zhao, Matthew Kirby, Anuradha Roy, Yizhong Hu, X. Edward Guo, and Xiaodu Wang. Commonality in the microarchitecture of trabecular bone: A preliminary study. *Bone*, 111:59–70, 2018.

- [48] M Michael Cohen Jr. The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *American journal of medical genetics part A*, 140(23):2646–2706, 2006.
- [49] Kyung Mi Woo, Jihye Seo, Ruiyun Zhang, and Peter X Ma. Suppression of apoptosis by enhanced protein adsorption on polymer/hydroxyapatite composite scaffolds. *Biomaterials*, 28(16):2622–2630, 2007.
- [50] Herve Petite, Veronique Viateau, Wassila Bensaid, Alain Meunier, Cindy de Pollak, Marianne Bourguignon, Karim Oudina, Laurent Sedel, and Genevieve Guillemain. Tissue-engineered bone regeneration. *Nature biotechnology*, 18(9):959, 2000.
- [51] Dimitrios J Hadjidakis and Ioannis I Androulakis. Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1092(1):385–396, 2006.
- [52] Susanne Schrof, Peter Varga, Bernhard Hesse, Martin Schöne, Roman Schütz, Admir Masic, and Kay Raum. Multimodal correlative investigation of the interplaying micro-architecture, chemical composition and mechanical properties of human cortical bone tissue reveals predominant role of fibrillar organization in determining microelastic tissue properties. *Acta Biomaterialia*, 44:51–64, 2016.
- [53] Anthony L Mescher. *Junqueira’s basic histology: text and atlas*. Mcgraw-hill, 2013.
- [54] T John Martin and Natalie A Sims. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends in molecular medicine*, 11(2):76–81, 2005.
- [55] K Anselme. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, 21(7):667–681, 2000.
- [56] Michael H Ross and Wojciech Pawlina. *Histology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
- [57] Kevin T Patton and Gary A Thibodeau. *Anthony’s Textbook of Anatomy & Physiology-E-Book*. Mosby, 2018.

- [58] Donald H Enlow. Functions of the haversian system. *American Journal of Anatomy*, 110(3):269–305, 1962.
- [59] Gastone Marotti. A new theory of bone lamellation. *Calcified Tissue International*, 53(1):S47–S56, 1993.
- [60] Ingomar Jäger and Peter Fratzl. Mineralized collagen fibrils: a mechanical model with a staggered arrangement of mineral particles. *Biophysical journal*, 79(4):1737–1746, 2000.
- [61] Lumen Learning. Human Anatomy and Physiology Lab (BSB 141). <https://courses.lumenlearning.com/ap1x94x1/>. [Online; acessado em 05-03-2019].
- [62] Davide Ruffoni, P Fratzl, P Roschger, K Klaushofer, and R Weinkamer. The bone mineralization density distribution as a fingerprint of the mineralization process. *Bone*, 40(5):1308–1319, 2007.
- [63] AL Boskey. The rote of calcium-phospholipid-phosphate complexes in tissue mineralization. *Metabolic Bone Disease and Related Research*, 1(2):137–142, 1978.
- [64] Marcin Balcerzak, Eva Hamade, Le Zhang, Slawomir Pikula, Gérard Azzar, Jacqueline Radisson, Joanna Bandorowicz-Pikula, and Rene Buchet. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta Biochimica Polonica*, 50(4):1019–1038, 2003.
- [65] Jeffrey S Nyman, Michael Reyes, and Xiaodu Wang. Effect of ultrastructural changes on the toughness of bone. *Micron*, 36(7-8):566–582, 2005.
- [66] Hidehiro Ozawa, Kazuto Hoshi, and Norio Amizuka. Current concepts of bone biomineralization. *Journal of Oral Biosciences*, 50(1):1–14, 2008.

- [67] H Clarke Anderson, Rama Garimella, and Sarah E Tague. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Front Biosci*, 10(1):822–837, 2005.
- [68] Melvin J Glimcher. Molecular biology of mineralized tissues with particular reference to bone. *Reviews of Modern Physics*, 31(2):359, 1959.
- [69] Nadine Nassif, Frederic Gobeaux, Jong Seto, Emmanuel Belamie, Patrick Davidson, Pierre Panine, Gervaise Mosser, Peter Fratzl, and Marie-Madeleine Giraud Guille. Self-assembled collagen-apatite matrix with bone-like hierarchy. *Chemistry of Materials*, 22(11):3307–3309, 2010.
- [70] Yan Wang, Thierry Azaïs, Marc Robin, Anne Vallée, Chelsea Catania, Patrick Legriél, Gérard Pehau-Arnaudet, Florence Babonneau, Marie-Madeleine Giraud-Guille, and Nadine Nassif. The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite. *Nature materials*, 11(8):724, 2012.
- [71] JM Kanczler, RO Oreffo, et al. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater*, 15(2):100–114, 2008.
- [72] Yunhao Qin, Ruixin Sun, Chuanlong Wu, Lian Wang, and Changqing Zhang. Exosome: a novel approach to stimulate bone regeneration through regulation of osteogenesis and angiogenesis. *International journal of molecular sciences*, 17(5):712, 2016.
- [73] Wei-Lin Yu, Tuan-Wei Sun, Chao Qi, Hua-Kun Zhao, Zhen-Yu Ding, Zhi-Wang Zhang, Ben-Ben Sun, Ji Shen, Feng Chen, Ying-Jie Zhu, et al. Enhanced osteogenesis and angiogenesis by mesoporous hydroxyapatite microspheres-derived simvastatin sustained release system for superior bone regeneration. *Scientific reports*, 7:44129, 2017.

- [74] Albert Barba, Anna Diez-Escudero, Yassine Maazouz, Katrin Rappe, Montserrat Espanol, Edgar B Montufar, Mar Bonany, Joanna M Sadowska, Jordi Guillem-Marti, Caroline O?hman-Ma?gi, et al. Osteoinduction by foamed and 3d-printed calcium phosphate scaffolds: effect of nanostructure and pore architecture. *ACS applied materials & interfaces*, 9(48):41722–41736, 2017.
- [75] Bong-Soon Chang, Kug-Sun Hong, Hyuk-Joon Youn, Hyun-Seung Ryu, Sung-Soo Chung, Kun-Woo Park, et al. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials*, 21(12):1291–1298, 2000.
- [76] T Albrektsson and C Johansson. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European spine journal*, 10(2):S96–S101, 2001.
- [77] Chinmaya Mahapatra, Rajendra K Singh, Jung-Ju Kim, Kapil D Patel, Roman A Perez, Jun-Hyeog Jang, and Hae-Won Kim. Osteopromoting reservoir of stem cells: bioactive mesoporous nanocarrier/collagen gel through slow-releasing fgf18 and the activated bmp signaling. *ACS applied materials & interfaces*, 8(41):27573–27584, 2016.
- [78] Andre L Rossi, Isabela C Barreto, William Q Maciel, Fabiana P Rosa, Maria H Rocha-Leão, Jacques Werckmann, Alexandre M Rossi, Radovan Borojevic, and Marcos Farina. Ultrastructure of regenerated bone mineral surrounding hydroxyapatite–alginate composite and sintered hydroxyapatite. *Bone*, 50(1):301–310, 2012.
- [79] Carlos Alberto Soriano-Souza, Andre L Rossi, Elena Mavropoulos, Moema A Hausen, Marcelo N Tanaka, Mônica D Calasans-Maia, Jose M Granjeiro, Maria Helena M Rocha-Leão, and Alexandre M Rossi. Chlorhexidine-loaded hydroxyapatite microspheres as an antimicrobial delivery system and its effect on in vivo

- osteo-conductive properties. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26(4):166, 2015.
- [80] Christer Dahlin, Per Alberius, and Anders Linde. Osteopromotion for cranioplasty: An experimental study in rats using a membrane technique. *Journal of neurosurgery*, 74(3):487–491, 1991.
- [81] Wouter Habraken, Pamela Habibovic, Matthias Epple, and Marc Bohner. Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future? *Materials Today*, 19(2):69–87, 2016.
- [82] MA Goldberg, VV Smirnov, A Yu Teterina, SM Barinov, and VS Komlev. Trends in development of bioresorbable calcium phosphate ceramic materials for bone tissue engineering. *Polymer Science, Series D*, 11(4):419–422, 2018.
- [83] Sergey Dorozhkin. Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine. *Materials*, 2(2):399–498, 2009.
- [84] Preeti Sahdev, Satheesh Podaralla, Radhey S Kaushik, and Omathanu Perumal. Calcium phosphate nanoparticles for transcutaneous vaccine delivery. *Journal of biomedical nanotechnology*, 9(1):132–141, 2013.
- [85] Ryan Trombetta, Jason A Inzana, Edward M Schwarz, Stephen L Kates, and Hani A Awad. 3d printing of calcium phosphate ceramics for bone tissue engineering and drug delivery. *Annals of biomedical engineering*, 45(1):23–44, 2017.
- [86] Babak Mostaghaci, Brigitta Loretz, and Claus-Michael Lehr. Calcium phosphate system for gene delivery: historical background and emerging opportunities. *Current pharmaceutical design*, 22(11):1529–1533, 2016.

- [87] Anup Kumar Keshri and Arvind Agarwal. Plasma processing of nanomaterials for functional applications? a review. *Nanoscience and nanotechnology letters*, 4(3):228–250, 2012.
- [88] Sarath Chandra Veerla, Jongjun Kim, Honglae Sohn, Sung Yun Yang, et al. Controlled nanoparticle synthesis of ag/fe co-doped hydroxyapatite system for cancer cell treatment. *Materials Science and Engineering: C*, 98:311–323, 2019.
- [89] Brigitte Wopenka and Jill D Pasteris. A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Materials Science and Engineering: C*, 25(2):131–143, 2005.
- [90] Jill D Pasteris, Brigitte Wopenka, and Eugenia Valsami-Jones. Bone and tooth mineralization: why apatite? *Elements*, 4(2):97–104, 2008.
- [91] Monika Šupová. Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: a review. *Ceramics international*, 41(8):9203–9231, 2015.
- [92] S Koutsopoulos. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 62(4):600–612, 2002.
- [93] Racquel Zapanta-LeGeros. Effect of carbonate on the lattice parameters of apatite. *Nature*, 206(4982):403, 1965.
- [94] Soon-Ho Kwon, Youn-Ki Jun, Seong-Hyeon Hong, and Hyoun-Ee Kim. Synthesis and dissolution behavior of β -tcp and ha/ β -tcp composite powders. *Journal of the European Ceramic Society*, 23(7):1039–1045, 2003.

- [95] JC Merry, IR Gibson, SM Best, and W Bonfield. Synthesis and characterization of carbonate hydroxyapatite. *Journal of materials science: Materials in medicine*, 9(12):779–783, 1998.
- [96] J Barralet, S Best, and W Bonfield. Carbonate substitution in precipitated hydroxyapatite: an investigation into the effects of reaction temperature and bicarbonate ion concentration. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials*, 41(1):79–86, 1998.
- [97] R Murugan and S Ramakrishna. Production of ultra-fine bioresorbable carbonated hydroxyapatite. *Acta Biomaterialia*, 2(2):201–206, 2006.
- [98] George C Koumoulidis, Alexandros P Katsoulidis, Athanasios K Ladavos, Phillippos J Pomonis, Christos C Trapalis, Antonios T Sdoukos, and Tiberius C Vaimakis. Preparation of hydroxyapatite via microemulsion route. *Journal of colloid and interface science*, 259(2):254–260, 2003.
- [99] WY Zhou, M Wang, WL Cheung, BC Guo, and DM Jia. Synthesis of carbonated hydroxyapatite nanospheres through nanoemulsion. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(1):103–110, 2008.
- [100] Carlos João, Rute Almeida, Jorge Silva, and João Borges. A simple sol-gel route to the construction of hydroxyapatite inverted colloidal crystals for bone tissue engineering. *Materials Letters*, 185:407–410, 2016.
- [101] Rasha A Youness, Mohammed A Taha, Hanan Elhaes, and Medhat Ibrahim. Molecular modeling, ftir spectral characterization and mechanical properties of carbonated-hydroxyapatite prepared by mechanochemical synthesis. *Materials Chemistry and Physics*, 190:209–218, 2017.

- [102] Wojciech L Suchanek, Pavel Shuk, Kullaiah Byrappa, Richard E Riman, Kevor S TenHuisen, and Victor F Janas. Mechanochemical–hydrothermal synthesis of carbonated apatite powders at room temperature. *Biomaterials*, 23(3):699–710, 2002.
- [103] Mohamad Nageeb Hassan, Morsi Mohamed Mahmoud, Ahmed Abd El-Fattah, and Sherif Kandil. Microwave-assisted preparation of nano-hydroxyapatite for bone substitutes. *Ceramics International*, 42(3):3725–3744, 2016.
- [104] G. Suresh Kumar, A. Thamizhavel, Y. Yokogawa, S. Narayana Kalkura, and E.K. Girija. Synthesis, characterization and in vitro studies of zinc and carbonate co-substituted nano-hydroxyapatite for biomedical applications. *Materials Chemistry and Physics*, 134(2-3):1127–1135, jun 2012.
- [105] Fuller Richard Buckminster. Tensile-integrity structures, November 13 1962. US Patent 3,063,521.
- [106] Anthony Pugh. *An introduction to tensegrity*. Univ of California Press, 1976.
- [107] Barbara Bender and Paul Aitken. *Stonehenge: making space*. Berg Oxford, 1998.
- [108] Randel L Swanson. Biotensegrity: a unifying theory of biological architecture with applications to osteopathic practice, education, and research? a review and analysis. *The Journal of the American Osteopathic Association*, 113(1):34–52, 2013.
- [109] Christopher S. Chen and Donald E. Ingber. Tensegrity and mechanoregulation: From skeleton to cytoskeleton. *Osteoarthritis and Cartilage*, 7(1):81–94, 1999.
- [110] F. E. Close, Michael Marten, and Christine. Sutton. *The particle odyssey : a journey to the heart of the matter*. Oxford University Press, 2004.
- [111] Philip Willmott. *An introduction to synchrotron radiation: techniques and applications*. Wiley, 2011.

- [112] Antonella Balerna and Settimio Mobilio. Introduction to synchrotron radiation. In *Synchrotron radiation*, pages 3–28. Springer, 2015.
- [113] Gopal Shenoy. Basic Characteristics of Synchrotron Radiation. *Structural Chemistry*, 14(1):3–14, 2003.
- [114] Settimio Mobilio, Federico Boscherini, and Carlo Meneghini. *Synchrotron Radiation*. Springer, 2016.
- [115] Donald H Bilderback, Pascal Elleaume, and Edgar Weckert. Review of third and next generation synchrotron light sources. *Journal of Physics B: Atomic, Molecular and Optical Physics*, 38(9):S773–S797, may 2005.
- [116] Amardeep Bharti and Navdeep Goyal. Fundamental of synchrotron radiations. In *Synchrotron Radiation*. IntechOpen, 2019.
- [117] Philip Duke. *Synchrotron radiation: production and properties*, volume 3. Oxford University Press, 2009.
- [118] Julian Schwinger. On the classical radiation of accelerated electrons. *Phys. Rev.*, 75:1912–1925, Jun 1949.
- [119] Safey Ahmad Abdelwahab, A Al-Adwan, E Al-Dmour, A Amro, M Attal, H Delsim-Hashemi, D Einfeld, A Elsis, D Foudeh, H Hassanzadegan, et al. The yellow book conceptual design report for the upgrading of sesame to 2.5 gev. SESAME Office, Amman, May, 2003.
- [120] Albert C Thompson, Douglas Vaughan, et al. *X-ray data booklet*, volume 8. Lawrence Berkeley National Laboratory, University of California Berkeley, CA, 2001.
- [121] Herman Winick. *Synchrotron radiation sources: a primer*, volume 1. World Scientific, 1995.

- [122] LNLs – UVX. <https://www.lnls.cnpem.br/uvx/>. [Online; acessado em 21-04-2019].
- [123] Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais - CNPEM. <http://http://ctbe.cnpem.br/o-ctbe/cnpem/>, 2019. [Online; acessado em 29-04-2019].
- [124] S.L. KRAMER, S. KRINSKY, and J. BENGTTSSON. Comparison of double bend and triple bend achromatic lattice structures and nsls-ii.
- [125] Stephan Russenschuck. Magnets for Accelerators. In *Field Computation for Accelerator Magnets*, chapter 1, pages 1–48. 2010.
- [126] Daniel Laipple. *Region of interest synchrotron nanotomography and nanodiffraction with FIB/SEM characterisation on engineering materials*. PhD thesis, Helmholtz-Zentrum Geesthacht, 2015.
- [127] Clint M Logan, Daniel J Schneberk, Peter J Shull, and Harry E Martz. *X-ray Imaging: fundamentals, industrial techniques and applications*. CRC Press, 2016.
- [128] Tuomas Turpeinen. Analysis of microtomographic images of porous heterogeneous materials. *Jyväskylä studies in computing*, (230), 2015.
- [129] DF Swinehart. The beer-lambert law. *Journal of chemical education*, 39(7):333, 1962.
- [130] Sigurdur Helgason and S Helgason. *The radon transform*, volume 2. Springer, 1999.
- [131] Jiang Hsieh et al. Computed tomography: principles, design, artifacts, and recent advances. SPIE Bellingham, WA, 2009.
- [132] Alexander Katsevich. An improved exact filtered backprojection algorithm for spiral computed tomography. *Advances in Applied Mathematics*, 32(4):681–697, 2004.

- [133] Gabriel Schubert, Gustavo Vasconcelos, Carlos Dias, Eduardo Miqueles, and Francis O'Dowd. *IMX Beamline: X-ray Imaging*. CNPEM, 2017.
- [134] Nikolay Koshev, Elias S. Helou, and Eduardo X. Miqueles. Fast Backprojection Techniques for High Resolution Tomography. pages 1–32, aug 2016.
- [135] RT Lopes, I Lima, GR Pereira, and CA Perez. Synchrotron radiation x-ray microfluorescence techniques and biological applications. *Pramana*, 76(2):271–279, 2011.
- [136] Joseph I Goldstein, Dale E Newbury, Joseph R Michael, Nicholas WM Ritchie, John Henry J Scott, and David C Joy. *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. Springer, 2017.
- [137] BJ Inkson. Scanning electron microscopy (sem) and transmission electron microscopy (tem) for materials characterization. In *Materials characterization using non-destructive evaluation (NDE) methods*, pages 17–43. Elsevier, 2016.
- [138] Aaron Nauth, Michael D. McKee, Thomas A. Einhorn, J. Tracy Watson, Ru Li, and Emil H. Schemitsch. Managing bone defects. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 25(8):462–466, 2011.
- [139] O F P Dowd, G B Z L Moreno, H H Slepicka, R Geraldles, and M.B. Cardoso. X-ray micro-tomography at the IMX beamline (LNLS). *Mechanical Engineering Design of Synchrotron Radiation Equipment and Instrumentation (MEDSI) 2014*, (March), 2014.
- [140] G B Z L Moreno, F P O Dowd, H H Slepicka, R Bongers, M B Cardoso, Cnpem Lnls, and Caixa Postal. on-the-Fly Scans for Fast Tomography At Lnls Imaging Beamline. pages 9–12, 2015.
- [141] R A Brooks and G Di Chiro. Beam hardening in X-ray reconstructive tomography. *Physics in Medicine and Biology*, 21(3):004, may 1976.

- [142] Gilberto Martinez, Janito V. Ferreira Filho, and Eduardo X. Miqueles. Low-complexity Distributed Tomographic Backprojection for large datasets. apr 2017.
- [143] Eduardo X Miqueles, Elias S Helou, and Alvaro R De Pierro. Generalized Back-projection Operator: Fast Calculation. *Journal of Physics: Conference Series*, 490(1):012148, mar 2014.
- [144] Eduardo X. Miqueles and Elias S. Helou. Fast Backprojection Operator for Synchrotron Tomographic Data. In *Progress in Industrial Mathematics at ECMI 2014*, pages 243–252. Springer, Cham, 2016.
- [145] Johannes Schindelin, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, Curtis Rueden, Stephan Saalfeld, Benjamin Schmid, Jean-Yves Tinevez, Daniel James White, Volker Hartenstein, Kevin Eliceiri, Pavel Tomancak, and Albert Cardona. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7):676–682, jul 2012.
- [146] Caroline A Schneider, Wayne S Rasband, and Kevin W Eliceiri. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7):671–675, jul 2012.
- [147] A. Buades, B. Coll, and J.-M. Morel. A Non-Local Algorithm for Image Denoising. In *2005 IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR'05)*, volume 2, pages 60–65. IEEE, 2005.
- [148] Gang Lin, Umesh Adiga, Kathy Olson, John F. Guzowski, Carol A. Barnes, and Badrinath Roysam. A hybrid 3D watershed algorithm incorporating gradient cues and object models for automatic segmentation of nuclei in confocal image stacks. *Cytometry*, 56A(1):23–36, nov 2003.
- [149] Hu Dong and Martin J. Blunt. Pore-network extraction from micro-computerized-tomography images. *Physical Review E*, 80(3):036307, sep 2009.

- [150] Ali Q. Raeini, Branko Bijeljic, and Martin J. Blunt. Generalized network modeling: Network extraction as a coarse-scale discretization of the void space of porous media. *Physical Review E*, 96(1):013312, jul 2017.
- [151] Tom Bultreys, Qingyang Lin, Ying Gao, Ali Q. Raeini, Ahmed Alratrout, Branko Bijeljic, and Martin J. Blunt. Validation of model predictions of pore-scale fluid distributions during two-phase flow. *Physical Review E*, 97(5), 2018.
- [152] L Holzer, F Indutnyi, Gasser P, B Münch, and M Wegmann. {3D} analysis of porous {BaTiO_3} ceramics using {FIB} nanotomography. *J. Microscopy*, 216(June):84–95, 2004.
- [153] Carlos A. Pérez, Martin Radtke, Héctor J. Sánchez, Helio Tolentino, Regis T. Neuenchwander, William Barg, Marcelo Rubio, María Izabel Silveira Bueno, Ivo M. Raimundo, and Jarbas J. R. Rohwedder. Synchrotron radiation X-Ray fluorescence at the LNLS: beamline instrumentation and experiments. *X-Ray Spectrometry*, 28(5):320–326, sep 1999.
- [154] L. Zhang, R. Hustache, O. Hignette, E. Ziegler, and A. Freund. Design optimization of a flexural hinge-based bender for X-ray optics. *Journal of Synchrotron Radiation*, 5(3):804–807, may 1998.
- [155] Carlos A. Pérez, Juliano F. J. Murari, Gabriel B. Z. L. Moreno, Jackson L. da Silva, and James R. Piton. Development of fast scanning X-ray fluorescence microscopy at the LNLS D09B-XRF beamline. In *AIP Conference Proceedings*, volume 1764, page 030001. AIP Publishing LLC, aug 2016.
- [156] V.A. Solé, E. Papillon, M. Cotte, Ph. Walter, and J. Susini. A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 62(1):63–68, jan 2007.

- [157] N. Broll. Quantitative x-ray fluorescence analysis. Theory and practice of the fundamental coefficient method. *X-Ray Spectrometry*, 15(4):271–285, oct 1986.
- [158] Inayá Lima, Marcelino J. Anjos, Maria Lucia F. Fleiuss, Doris Rosenthal, and Ricardo T. Lopes. Characterization of osteoporotic bone structures by bidimensional images through x-ray microfluorescence with synchrotron radiation. *X-Ray Spectrometry*, 37(3):249–254, may 2008.
- [159] Frank Herbert Attix. *Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Strauss GmbH, Morlenbach, 1986.
- [160] JEM-2100F Field Emission Electron Microscope – Products – Jeol Ltd. <https://www.jeol.co.jp/en/products/detail/JEM-2100F.html>, 2019. [Online; acessado em 26-04-2019].
- [161] Peter Buseck, John Cowley, and LeRoy Eyring. *High-Resolution Transmission Electron Microscopy: And Associated Techniques*. Oxford University Press, 1989.
- [162] John CH Spence. *High-resolution electron microscopy*. OUP Oxford, 2013.
- [163] Titan Themis S/TEM. <http://emc.rice.edu/titan/>, 2019. [Online; acessado em 26-04-2019].
- [164] Uwe Holzwarth and Neil Gibson. The Scherrer equation versus the 'Debye-Scherrer equation'. *Nature Nanotechnology*, 6(9):534–534, sep 2011.
- [165] Anna Ślósarczyk, Zofia Paszkiewicz, and Czesława Paluszkievicz. FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods. *Journal of Molecular Structure*, 744-747:657–661, jun 2005.
- [166] Wei Hu, Jun Ma, Jianglin Wang, and Shengmin Zhang. Fine structure study on low concentration zinc substituted hydroxyapatite nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 32(8):2404–2410, dec 2012.

- [167] José R. Guerra-López, Gustavo A. Echeverría, Jorge A. Güida, Raúl Viña, and Graciela Punte. Synthetic hydroxyapatites doped with Zn(II) studied by X-ray diffraction, infrared, Raman and thermal analysis. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 81:57–65, jun 2015.
- [168] Mariette Hellenbrandt. The inorganic crystal structure database (icsd)?present and future. *Crystallography Reviews*, 10(1):17–22, 2004.
- [169] Ihtesham Rehman and W Bonfield. Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic ftir spectroscopy. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 8(1):1–4, 1997.
- [170] Stuart Coles, Joanna Bawa, Lesley Trenner, and Pat Dorazio. *An introduction to statistical modeling of extreme values*, volume 208. Springer, 2001.

Apêndice A

Procedimento cirúrgico (modelo 1)

Metodologia para a implantação do biomaterial em tíbias de ratos

Para este estudo foram utilizados 10 ratos (*Rattus norvegicus albinus* Wistar) adultos fêmeas, divididos em cinco grupos experimentais (1 para SR- μ CT) e dois períodos experimentais de 7 e 21 dias. A amostra implantada foi: cHA 37 °C.

O procedimento cirúrgico é iniciado com uma medicação pré-anestésica através da aplicação de uma analgesia preemptiva utilizando cetoprofeno (5mg por kg subcutâneo).

Os animais foram submetidos à anestesia geral, utilizando 75 mg por kg de cetamina, 10 mg por kg de xilazina e mais 2 mg por kg de tramadol, misturado na mesma seringa. A dose calculada foi aplicada por via intraperitoneal. A cirurgia foi iniciada após a constatação do plano anestésico através da ausência do reflexo podal. Foi realizada a tricotomia e antisepsia na região tibial, com auxílio de tesoura e lâmina de barbear e polivinilpirrolidoniado (PVPI) degermante e alcoólico, respectivamente. Os campos cirúrgicos esterilizados foram posicionados e uma incisão reta de espessura total com cabo de bisturi número 03 e lâmina número 15 (aproximadamente de 1 cm).

Na sequência foi descolada a pele, tela subcutânea e periósteo conjuntamente com

o auxílio de um descolador do tipo Molt e cinzel de Ochsensbein nº 1, expondo assim a cortical óssea da região tibial a ser trepanada. Um defeito de 2 mm de diâmetro foi realizado com uma broca esférica cirúrgica de (2 mm) e micromotor cirúrgico acoplado ao contra-ângulo com irrigação abundante e contínua com solução fisiológico na região tibial para preenchimento com os biomateriais de acordo com os grupos experimentais. Após as terapias propostas segundo os grupos experimentais, o retalho de pele é reposicionado e suturado com fio de nylon 5.0.

Os animais foram acompanhados até a completa recuperação cirúrgica, e o pós-operatório foi feito com analgesia através do uso de tramadol 2mg por kg de 12 em 12 horas, associado com cetoprofeno uma vez ao dia por 36 horas.

Os ratos foram alojados em gaiolas individuais com ração peletizada e água ad libitum. Foram realizadas visitas pós-operatórias diárias e trocas semanais de água e maravalha.

Ao término do período experimental no biotério, os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica através de aplicação parenteral de 200mg por kg de cetamina 30mg por kg xilasina, até constatar o óbito do animal.

Constatada a morte do animal, uma necrópsia excisional retangular, englobando a área do defeito e sua periferia, é realizada utilizando um micromotor odontológico e disco de aço de carburundum. O material coletado foi fixado por 2 dias em formol 4% tamponado (pH 7.2).

Após a fixação das peças coletadas das tíbias dos ratos, elas foram lavadas em água corrente por 1 hora. As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico (1 banho de 70%, 80%, 90% e 3 banhos de 100%, 1 hora cada), foi feita tam-

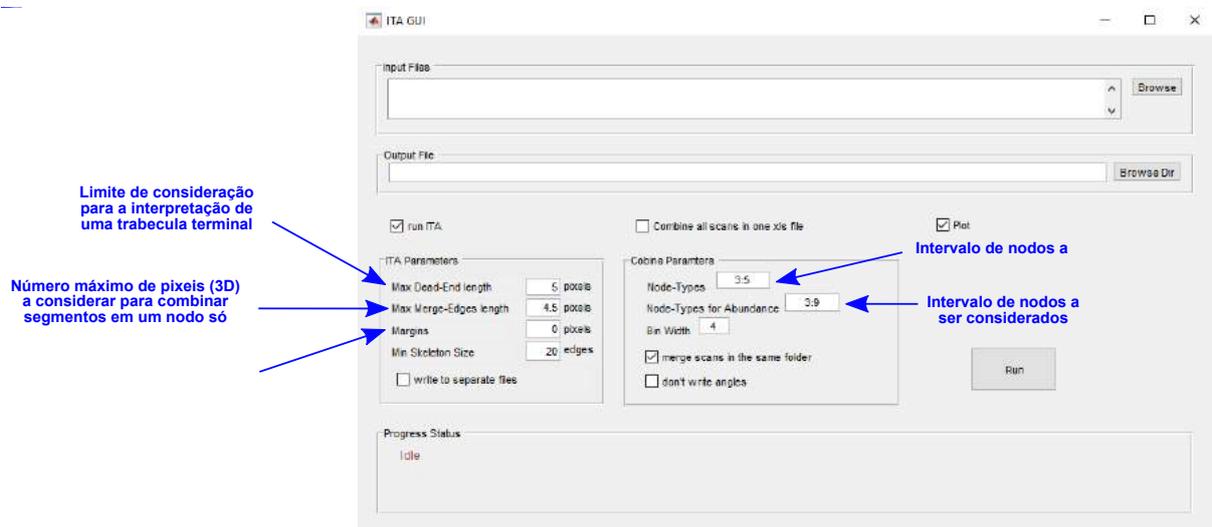
bém diafanização em 3 banhos de xilol (30 minutos cada), e inclusão em resina Technovic para as medidas de SR- μ CT.

Apêndice B

Parâmetros do *software* ITA App e *PoreNetworkExtraction*

B.1 *Inter-trabecular Angle* (ITA App)

ITA - interface:



Parâmetros das amostras:

Tabela B.1: Parâmetros utilizados no *software* ITA

Amostra	Dead ends (pixeis)	Merge (pixeis)	Margins (pixeis)	Skeleton size (número de segmentos)
Coágulo 1 semanas	5	20	30	20
Coágulo 2 semanas	5	20	30	20
Coágulo 3 semanas	5	25	30	20
Implante 3 semanas	5	25	30	20

B.2 *Pore Network Extraction*

Network extraction code – pnextract

pnextract extracts a conventional pore network from a microCT image. The algorithm is a rewrite of the Dong and Blunt (2009) code. There are major differences though. First, the pore and throat detection algorithm is revised; see Stages 1 and 2 described in Raeini et al. (2017) <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.96.013312>. Raeini et al. (2017) is an extension of this code. The shape of pores in this code are deduced from shape factors, the shape-factor equation is changed compared to the old definition, see Bultrys et al (2018, currently under-review).

1 Input file

The input file for the network extraction code is a mhd header file compatible with paraview and Fiji (ImageJ with plugins) with additional optional keywords specific to network extraction algorithm. See the file Image.mhd for a sample input.

1.1 Format specifications:

1. The order of the first 6 keywords should not be changed for compatibility with third-party software (ImageJ and Paraview)
2. Use “#” for comments
3. All keyword and its data should be given in a single line

Important keywords:

1 to 3rd keywords (should not be changed):

1. `ObjectType = Image`
2. `NDims = 3`
3. `ElementType = MET_UCHAR`
4. keyword: `DimSize` – used to assign the dimensions of the image: N_x , N_y and N_z
5. keyword: `ElementSpacing` – used for assigning voxel size: δx , δy and δz should be equal
6. keyword: `ElementDataFile` – specifies the name of binary 8bit data file (.raw), ascii (.dat), .raw.gz, and .tif files are supported too.

```

ObjectType = Image
NDims =      3
ElementType = MET_UCHAR

DimSize =      400   400   400
ElementSpacing = 5.345 5.345 5.345
Offset =        0     0     0

ElementDataFile = Berea.raw

```

Fig. 1: Sample input header file

Medial-surface settings:

The `medialSurfaceSettings` is an optional technical keyword which can be used for sensitivity analysis, for instance.

```
medialSurfaceSettings 0.1 0.9 0.7 0.5 1.5 1.21 7 0.25 1.6;
```

where the keyword arguments are `clipROutx` `clipROutyz` `midRFrac` `RMedSurfNoise` `lenNf` `vmvRadRelNf` `nRSmoothing` `RCorsf` `RCors`, respectively.

The `pnextract` code produces few lines showing the settings being used. something like:

```

medialSurfaceSettings: 0.05 0.98 0.7 2.75 0.6 1.1 3 0.15 1.75
medialSurfaceSettings:
clipROutx      : 0.05
clipROutyz    : 0.98
midRFrac       : 0.7
RMedSurfNoise : 2.75
lenNf          : 0.6
vmvRadRelNf   : 1.1
nRSmoothing   : 3
RCorsf        : 0.15
RCors         : 1.75

```

The first line is the keyword and its parameters and the rest are short names for each of the parameters and their values. In case you want to do a quick evaluation, you can copy the first line into the `pnextract` input, the `.mhd` file, and change the parameters and re-run the code. Here is a short explanation for these parameters:

`clipROutx` is used to limit the size of maximal-spheres extending outside the rock image in the x direction.

`clipROutyz` is used to limit the size of maximal-spheres extending outside the rock image in the y and z directions.

`midRFrac` is the relative size of the distance-map of the voxel between two maximal-spheres, for the spheres to be considered part of the same pore.

`RMedSurfNoise` is a measure of noise amplitude. Decreasing this will likely increase the number of pores, but it also affects the number of corners per throat.

`lenNf` is a relative distance for merging adjacent pores which are too close to each other.

`vmvRadReINf` is the relative size of the throat between the two pore considered for merging, the contraction should be less than this to merge the nearby pores (that are less than `lenNf` apart), otherwise the pore will not be merged. Decreasing these two will increase the number of pores.

`nRSmoothing` applies a small amount of Gaussian-like smoothing on the computed distance map, which in turn affect the rest of the computations. Decreasing this will probably increases the number of pores.

`RCorsf` controls the distance between the maximal spheres. This is a sensitive parameter, changing it may need changing other parameters to get good results.

`RCors` controls the minimum distance between (small) maximal-spheres. This is a sensitive parameter, changing it may need changing other parameters to get good results.

Contact:

For any queries please email:

Ali Q. Raeini : a.qaseminejad-raeini09@imperial.ac.uk

References:

See <http://www.imperial.ac.uk/earth-science/research/research-groups/perm/research/pore-scale-modelling/publications/>