UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
FABIANO VASCONCELOS

ENXERTO ÓSSEO HETERÓGENO/SINTÉTICO A BASE DE QUITOSANA EM ASSOCIAÇÃO COM ÉSTER FOSFÓRICO

Mogi das Cruzes, SP
2023

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

FABIANO VASCONCELOS

ENXERTO ÓSSEO HETERÓGENO/SINTÉTICO A BASE DE QUITOSANA EM ASSOCIAÇÃO COM ÉSTER FOSFÓRICO

Tese apresentada ao programa de pós- graduação em Engenharia Biomédica na Universidade de Mogi das Cruzes, como requisito para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.
Área de Concentração: Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Saúde.

Prof. Orientador: Dr. Fabio Dupart Nascimento

Mogi das Cruzes, SP

2023

Ficha catalográfica
Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Vasconcelos, Fabiano
V331e Enxerto ósseo heterógeno/sintético a base de quitosana e éster fosfórico / Fabiano Vasconcelos. -- Mogi das Cruzes, SP: Universidade de Mogi das Cruzes, 2023.
55 f. : il.

Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) -- Universidade de Mogi das Cruzes.
Orientador(a): Prof. Fabio Dupart Nascimento.
Inclui bibliografia.

1. Regeneração óssea 2. Substitutos ósseos 2. Materiais Biocompatíveis 3. Quitosana 4. Monoéster Fosfórico Hidrolases I. Nascimento, Fabio Dupart II. Universidade de Mogi das Cruzes III. Título

CDD 610.28

Elaborada por Maria Cristina Alves Silva Xavier – CRB-8/10077

Fls. 005-Livro II DR

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às dezesseis horas do dia trinta e um de julho de dois mil e vinte e três, pela Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa da tese intitulada "ENXERTO ÓSSEO HETERÓGENOS/SINTÉTICO A BASE DE QUITOSANA EM ASSOCIAÇÃO COM ÉSTER FOSFÓRICO". para obtenção do grau de doutor(a) pelo(a) candidato(a) **Fabiano Vasconcelos.** Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 74 (setenta e quatro), a saber: 38 unidades de crédito em disciplinas e atividades na pós-graduação e 36 unidades de crédito no preparo da tese, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de doutor(a). A comissão examinadora foi constituída pelos senhores professores doutores: Fábio Dupart Nascimento, Rafael de Oliveira Dias, e Mônica Ghislaine Oliveira Alves, da Universidade de Mogi das Cruzes, e Camila Batista da Silva de Araujo Candido, da Universidade Estadual de Campinas, e Marcelo Marcucci, da SES Hospital Heliópolis, sob a presidência do primeiro como orientador do(a) aluno(a). A sessão pública da defesa da tese foi aberta pelo senhor presidente da comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral de seu trabalho, ao final da qual seguiram-se as arguições pelos membros da comissão examinadora. A seguir, a comissão, em sessão secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

APROVADO (aprovado(a) /reprovado(a)) por UNANIMIDADE (unanimidade/maioria).

Mogi das Cruzes, 31 de julho de 2023.

Comissão Examinadora	Julgamento
Profª Drª Camila Batista da Silva de Araújo Candido	Aprovado (aprovado(a)/reprovado(a))
Prof. Dr. Marcelo Marcucci	Aprovado (aprovado(a)/reprovado(a))
Prof. Dr. Rafael de Oliveira Dias	Aprovado (aprovado(a)/reprovado(a))
Profª Drª Mônica Ghislaine Oliveira Alves	Aprovado (aprovado(a)/reprovado(a))
Prof. Dr. Fábio Dupart Nascimento	Aprovado (aprovado(a)/reprovado(a))

Dedico este trabalho a Deus por me dar forças para vencer desafios, à Universidade de Mogi das Cruzes pela oportunidade, ao meu orientador por tornar possível este Doutorado e a minha família, em especial minha esposa e meu filho, por tornarem esta caminhada mais leve.

Obrigado a todos!

Agradecimentos

Á Universidade de Mogi das Cruzes, por possibilitar através de sua infraestrutura a realização de parte deste projeto de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Fabio Dupart Nascimento, por dar esta oportunidade.

Ao Amigo João Roberto de Jesus, por toda dedicação e disponibilidade no desenvolvimento da parte química da presente pesquisa.

Ao meu ex-aluno Jonanthan Keruak Andrade Holanda, pelo acompanhamento das cirurgias experimentais desta pesquisa.

À ex-aluna de Graduação em Odontologia, Beatriz Cardoso, e minha orientada de PIBIC/PIVIC, pela realização das cirurgias deste projeto de pesquisa.

Ao professor Marcos de Oliveira Dias, por sua ajuda junto ao meu orientado na parte experimental das cirurgias nos ratos.

Ao professor Wagner Alves de Souza Júdice, por ceder aparelho para medir o teste de condutibilidade dos enxertos testados.

Ao Radiologista André Ricardo Paoli do Carmo, por ceder seu espaço radiológico CROM para nossa pesquisa e realizar análise das amostras no trabalho inicial de PIBIC que deu origem a presente tese de doutorado.

A todos os professores e alunos com os quais tive contato do curso de Engenharia Biomédica, pela contribuição positiva com reflexo direto ou indireto para a conclusão desta tese.

Em especial à minha esposa Kelly Cristina Pauletti Vasconcelos e meu filho Fabiano Vasconcelos Júnior, razão de minha alegria e apoio constante em mais este desafio.

Esforçai-vos, e ele fortalecerá o vosso coração, vós todos que esperais no Senhor.

Salmos 31:24

RESUMO

A diversidade de biomateriais para aplicação em enxertia no aumento ou manutenção do arcabouço ósseo tem crescido muito nos últimos anos, e cada vez mais novos biomateriais são ofertados, pois embora o osso autógeno seja o padrão ouro em resultados, sua obtenção e quantidade nem sempre são os desejáveis. Como propoentes em estímulo de formação óssea temos como principais opções no mercado as de origem homógena, heterógena e sintética, cada qual com suas características especificas, com indicações e contraindicações de uso, mas nenhum deles se aproxima em qualidade óssea neoformada obtida pela enxertia autógena. A presente pesquisa apresenta um novo biomaterial para enxertia e neoformação óssea, com conceitos bioquímicos diferentes dos ofertados no mercado, classificado como de origem “heterógena/sintética”, sendo o material heterógeno um polissacarídeo de origem orgânica a base de quitosana, e juntamente com um éster fosfórico de origem sintética. Em estudos paralelos publicados sobre este novo biomaterial, sob orientação do presente autor desta tese, apresentou resultados promissores de neoformação óssea similares ao obtido com enxerto autógeno e com índice de citotoxicidade similar à hidroxiapatita e ao osso bovino ofertados no mercado. A presente tese aborda especificamente a bioengenharia utilizada para a construção do enxerto, desde a metodologia de obtenção do éster fosfórico e do preparado de quitosana utilizados como matéria prima até a obtenção do produto pronta para uso. Em análise química/laboratorial comparativa entre o enxerto a base de quitosana e éster fosfórico em relação ao osso bovino e hidroxiapatita oferecidos no mercado para enxertia, observou-se características físicas de PH, condutibilidade e solubilidade/dispersão totalmente diferentes, tendo a proposta de enxertia um PH ácido enquanto as amostras comparadas são básicas, apresentou maior condutibilidade e característica de solução enquanto as amostras comparadas possuem características de solução. Este novo olhar na construção de um biomaterial para enxertia está na contramão da maioria das propostas utilizadas existentes no mercado, por este motivo possui uma relevância cientifica que justifica maior atenção e estudos, uma vez que abre um novo caminho no desenvolvimento de biomateriais para enxertia óssea.

Palavras Chaves: quitosana; biomaterial; enxerto heterólogo.

ABSTRACT

The diversity of biomaterials for application in grafting in the increase or maintenance of the bone framework has grown a lot in recent years, and more and more new biomaterials are offered, because although autogenous bone is the gold standard in results, its obtaining and quantity are not always the desirable ones. As proponents of bone formation stimulation, our main options on the market are those of homogeneous, heterogeneous and synthetic origin, each with its specific characteristics, with indications and contraindications for use, but none of them comes close in terms of newly formed bone quality obtained by autogenous grafting. This research presents a new biomaterial for bone grafting and neoformation, with biochemical concepts different from those offered on the market, classified as of “heterogenous/synthetic” origin, the heterogeneous material being a polysaccharide of organic origin based on chitosan, and together with a Phosphoric ester of synthetic origin. In parallel studies published on this new biomaterial, under the guidance of the present author of this thesis, it presented promising results of new bone formation similar to those obtained with autogenous graft and with a cytotoxicity index similar to hydroxyapatite and bovine bone offered in the market. This thesis specifically addresses the bioengineering used to construct the graft, from the methodology for obtaining the phosphoric ester and chitosan preparation used as raw material to obtaining the ready-to-use product. In a comparative chemical/laboratory analysis between the graft based on chitosan and phosphoric ester in relation to bovine bone and hydroxyapatite offered on the market for grafting, physical characteristics of pH, conductivity and totally different solubility/dispersion were observed, with the proposed grafting an acidic PH while the compared samples are basic, present greater conductivity and solution characteristics while the compared samples have solution characteristics. This new look at the construction of a biomaterial for grafting is against most of the proposals used in the market, for this reason it has a scientific relevance that justifies greater attention and studies, since it opens a new path in the development of biomaterials for bone grafting.

Key Words: Chitosan; Biomaterial; Heterografts.

Lista de Ilustrações

Figura 1 – Demonstração das lojas cirúrgicas 15
Figura 2 – Fluxograma de pesquisa de PIBIB/PIVIC concluído em 2018 explicando uso comparativo do enxerto a base de quitosana com os enxertos autógenos, osso bovino e hidroxiapatita 15
Figura 3 – Fêmur direito (D) e esquerdo (E) após 6 semanas com os materiais quitosana (Q), bonefill (B), hidroxiapatita (H) e autógeno (A).....16
Figura 4 - Radiografia do fêmur direito (D) e esquerdo (E) após 12 semanas com os materiais quitosana (Q), bonefill (B), hidroxiapatita (H) e autógeno (A). 16
Figura 5 – Quitosana/éster fosfórico após 6 semanas, corada com Picro-Sirius, aumento de100x 17
Figura 6 – Enxerto Autógeno após 6 semanas, corada com Picro-Sirius, aumento de100x. 17
Figura 7 – Estrutura química da quitina ou quitosana.....23
Figura 8 – Fórmula estrutural da fosfoetonolamina.....24
Figura 9 – Esquema de divisão da fórmula estrutural da fosfoetanolamina..... 25
Figura 10 – Dispersão sob agitação de 5 horas no agitador magnético 27
Figura 11 – Dispersão obtida foi filtrada a vácuo e posteriormente com o uso de um funil e papel filtro a fim de realizar a dispersão e eliminar impurezas da solução..... 28
Figura 12 – Mistura de 2-aminoetanol com ácido fosfórico, sob agitação e aquecimento 29
Figura 13 – Espectro da amostra e comparação com banco de dados. 30
Figura 14 – Espectro infravermelho de 2-aminoetil dihidrogenofosfato, fórmula C2H8NO4P 32
Figura 15 – Colação de pó de Éster Fosfórico em placa de vidro higienizada, e o gel de Quitosana ainda no tubo Falcon, que será inserido junto à placa..... 33
Figura 16 - Homogeneização de Éster Fosfórico e gel de Quitosana..... 33
Figura 17 - Aquecimento da mistura Éster fosfórico com gel de Quitosana 34
Figura 18 - Particulação da mistura após desidratação.....34
Figura 19 - Produto a base de quitosana e éster fosfórico finalizado e acondicionado 35
Figura 20 – Pesagem das amostras de enxerto 36
Figura 21 – Trituração das amostras de enxerto e com grau e pistilo 36

Figura 22 – Análise visual para caracterizar solução ou dispersão da amostra testada 37
Figura 23 – Teste de PH das amostras em solução e/ou dispersão.....37
Figura 24 – Método de utilização do medidor de condutividade 38
Figura 25 - Principais tipos de enxertos utilizados no mercado da esquerda para direita: Bonefill (osso bovino), Hidroxiapatita e a direita nova proposta de enxerto a base de Quitosana/Éster Fosfórico 39
Figura 26 – Obtenção da solução (aspecto límpido) da quitosana/éster fosfórico após trituração e diluição em água desmineralizada.....40
Figura 27 – Dispersão de osso bovino após trituração e acréscimo de água desmineralizada.....41
Figura 28 – Dispersão de osso hidroxiapatita após trituração e acréscimo de água desmineralizada.....41
Figura 29 – Metodologia da leitura do PH das diluições das amostras de enxerto 42

Lista de Tabelas e Gráficos

Gráfico 1 – Viabilidade celular pelo método de redução do MTT. Valores do Teste em duplicata 18

Gráfico 2 - Neoformação óssea média nos grupos. 19

Tabela 1 - Identificação dos possíveis grupamentos químicos de amostra..... 31

Tabela 2 - Análise comparativa dos enxertos na diluição a 5g/L.....40

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATR	Refletância Total Atenuado
AH	Acido Hialurônico
Ca-Mg-K-AEP	Cálcio / magnésio / potássioaminoetanolfosfato
CIIB	Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica
GAG	Glicosaminoglicanos
HA	Hidroxiapatita
MTT	Metil-tiazolil-tetrazólio
PIBIC	Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica
PIVIC	Programa Institucional Voluntário de Iniciação Científica
SENAI	Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial
UMC	Universidade de Mogi das Cruzes

Sumário

1. Introdução 13
2. Revisão de Literatura 20
2.1 Biomateriais para Enxertia 20
2.1.1 Enxerto Autógeno 20
2.1.2 Enxerto Alogênico 21
2.1.3 Enxerto Heterógeno 21
2.1.4 Enxerto de Hidroxiapatita 22
2.1.5 Quitosana 22
2.1.6 Éster Fosfórico 24
3.Objetivo 26
4. Metodologia 26
4.1 Obtenção do Gel de Quitosana 26
4.2 Obtenção do Éster Fosfórico 28
4.3 Homogeneização do gel de quitosana com éster fosfórico 32
4.4 Teste de Dispersão e/ou Solubilidade 35
4.5 Teste de PH 37
4.6 Teste de Condutibilidade 38
5. Resultados 39
6. Discussão 43
7. Conclusão 49
Referências 50
Anexos 53

1 INTRODUÇÃO

Segundo Anjos *et al.* (2021), os enxertos ósseos são amplamente utilizados na prática médica para tratar uma variedade de condições, como fraturas complexas, deficiências ósseas e procedimentos de cirurgia ortopédica e odontológica. No entanto, existem algumas limitações associadas a esses enxertos:

1. **Disponibilidade de Material:** A disponibilidade de material para enxertos ósseos pode ser limitada. Em alguns casos, o próprio paciente pode não ter quantidade suficiente de osso saudável para ser doado como enxerto, o que requer a busca por alternativas.
2. **Morbidade na Área Doadora:** Em casos em que o osso do próprio paciente é utilizado como enxerto, a remoção do osso do doador, pode causar dor, desconforto e morbidade na área doadora. Isso pode prolongar o tempo de recuperação e causar complicações.
3. **Taxa de Reabsorção:** Enxertos ósseos podem sofrer reabsorção gradual ao longo do tempo. Isso pode resultar na perda de volume ósseo e na necessidade de revisões ou procedimentos adicionais.
4. **Integração Incompleta:** A integração entre o enxerto e o osso hospedeiro nem sempre é perfeita. Em alguns casos, pode ocorrer falha na união dos tecidos e os enxertos podem não se integrar completamente, o que leva a resultados medianos.
5. **Risco de Infecção:** Como em qualquer procedimento cirúrgico, há um risco de infecção associado à utilização de enxertos ósseos. Infecções podem retardar a cicatrização, causar rejeição do enxerto e levar a complicações adicionais.
6. **Reações Imunológicas:** Em alguns casos, os enxertos ósseos podem desencadear reações imunológicas do sistema imunológico do receptor, o que pode resultar em inflamação e rejeição do enxerto.
7. **Complexidade Cirúrgica:** Os procedimentos de enxerto ósseo podem ser cirurgicamente complexos e exigir habilidades técnicas avançadas. Isso aumenta o risco de complicações durante a cirurgia.
8. **Limitações de Tamanho e Forma:** Enxertos ósseos muitas vezes têm limitações em termos de tamanho e forma. Isso pode limitar sua aplicabilidade em procedimentos que requerem enxertos específicos para preencher espaços ou reconstruir estruturas complexas.

9. **Custo e Recursos:** Alguns tipos de enxertos ósseos podem requerer recursos significativos em termos custo e de tempo, além de equipamentos.
10. **Variação Individual:** A resposta do corpo aos enxertos ósseos pode variar de pessoa para pessoa. Alguns pacientes podem ter uma recuperação mais rápida e uma melhor integração do enxerto, enquanto outros podem enfrentar complicações.

A restauração de defeitos ósseos em procedimentos odontológicos é uma área crucial para garantir o sucesso de implantes dentários, preservação de estruturas faciais e a função mastigatória adequada. Enxertos ósseos são frequentemente utilizados para superar deficiências de volume ósseo e promover a regeneração tecidual, proporcionando um suporte estável para implantes dentários e melhorando os resultados estéticos (FARDIN, 2010).

O presente trabalho aborda um novo biomaterial para enxertia óssea, que apresenta característica ímpar, pois associa em um mesmo material características heterógenas e sintéticas. Sua parte heterógena foi desenvolvida a partir de uma cadeia molecular biológica, pois possui em sua composição a quitosana, sendo um componente extraído da carapaça de crustáceos. A característica sintética se deu por conta da associação com éster fosfórico, mais especificamente a fosfoetanolamina, produzida laboratorialmente na presente pesquisa.

A obtenção do presente enxerto teve sua origem em um estudo de responsabilidade e orientação do presente autor desta tese, iniciado no Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica/Programa Institucional Voluntário de Iniciação Científica - PIBIC/PIVIC da Universidade de Mogi das Cruzes (UMC), com o projeto intitulado “COMPARATIVO ENTRE ENXERTOS AUTÓGENOS, HETERÓGENOS, HIDROXIAPATITA E QUITOSANA EM FÊMUR DE RATOS” , onde buscou-se testar a quitosana associada com ésteres fosfóricos a fim de compará-lo com os principais enxertos utilizados no mercado. Os resultados desta primeira pesquisa demonstraram não só ser biocompatível e viável para enxertia, mas também se mostraram com um crescimento ósseo muito similar ao osso autógeno (HOLANDA, 2018).

De maneira pouco convencional, na presente introdução, decreve-se abaixo os estudos prelimeinares ja publicados, para que se possa entender de maneira ampla desde os estudo iniciais, até o transcorrer de todos estudos investigativos até então realizados, de maneira que se posso ter uma visão do todo da presente pesquisa, tirar suas conclusões em relação à relevancia científica da presente tese.

Neste estudo piloto, operou-se 10 ratos winstar, ambos os fêmures, criando 4 lojas cirúrgicas, que foram preenchidas respectivamente com osso autógeno, osso bovino da marca bionnovation, comercialmente chamado de bonefill, e hidroxiapatita da bionnovation; e na quarta loja cirúrgica com o novo biomaterial a base de quitosana e éster fosfórico (Figura 1) (Holanda *et al.,* 2018).

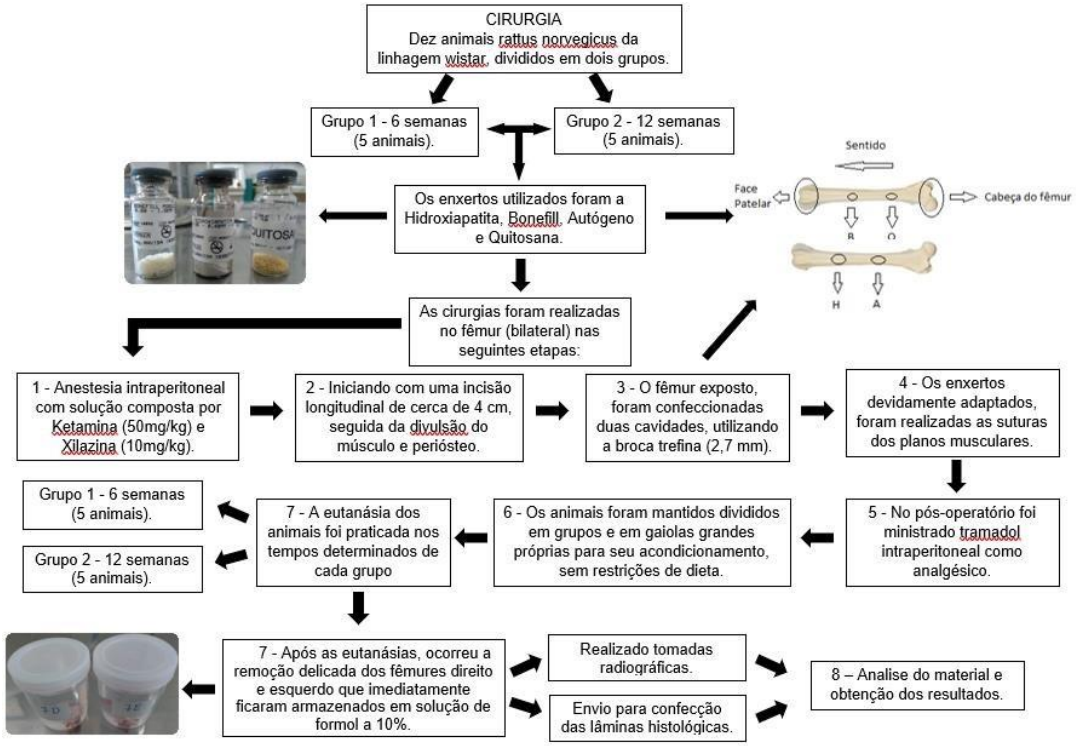
Figura 1: Demonstração das lojas cirúrgicas



Fonte: Holanda, *et al.* (2018)

A seguir, na figura 2 descrevemos através de um fluxograma como se deu o estudo inicial que deu origem a presente pesquisa (Holanda, *et al.* 2018).

Figura 2 – Fluxograma de pesquisa de PIBIB/PIVIC concluído em 2018 explicando uso comparativo do enxerto a base de quitosana com os enxertos autógenos, osso bovino e hidroxiapatita.



Fonte: Holanda, *et al.* (2018)

Este estudo inicial se restringiu em testar "*in vivo*" se o biomaterial proposto era ou não biocompatível, em que, onde se houvessem resultados negativos, a pesquisa se encerraria neste momento, e se atingisse resultados promissores, abriria espaço para investir em novos estudos, com mais testes e análises mais aprofundadas. Como os resultados iniciais foram relevantes cientificamente, houve espaço para continuação da pesquisa,focando em maiores estudos onde o presente autor desta tese atuou nos diversos estudos que ocorreram em paralelo e presente tese como orientador, uma vez que foi o responsável por desenvolver este novo biomaterial.

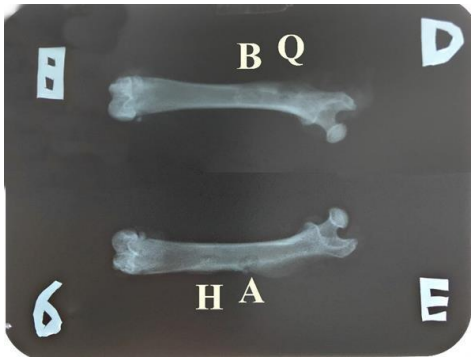
A Figura 3 mostra os fêmures extraídos para realizar as etapas seguintes de radiografias e histologia. O exame radiográfico dos fêmures, indicou radiopacidade também similar ao osso autógeno e em maior quantidade que do osso bovino e hidroxiapatita, conforme ilustrado na figura 4. Comparando no histológico das figuras 5 e 6, o osso autógeno com a quitosana associada a éster fosfórico se observou um ganho de neoformação óssea muito similares.

Figura 3 – Fêmur direito (D) Fêmur esquerdo (E) Após 6 semanas com os materiais quitosana (Q), bonefill (B), hidroxiapatita (H) e autógeno (A).



Fonte: Holanda, *et al.* (2018

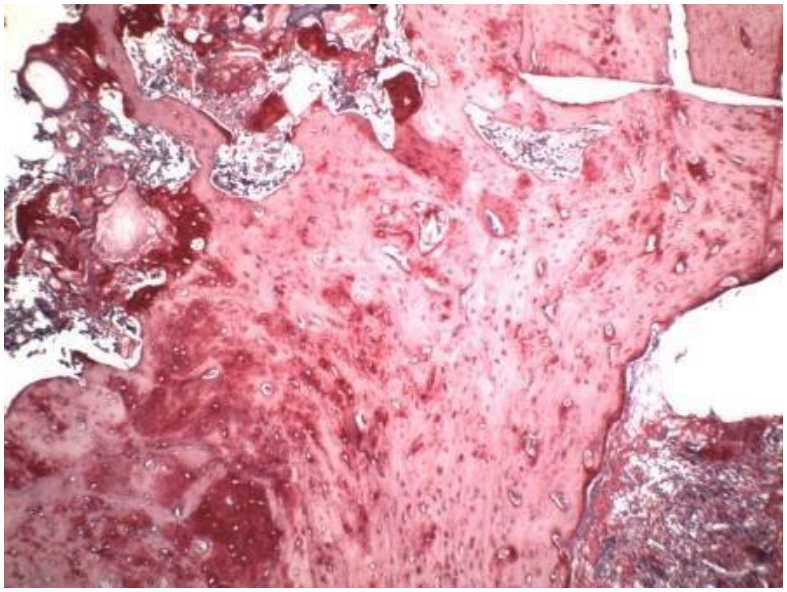
Figura 4 – Radiografia do fêmur direito (D) Radiografia do fêmur esquerdo (E) Após 12 semanas com os materiais quitosana (Q) Bonefill (B) Hidroxiapatita (H) Autógeno (A).



Fonte: Holanda, *et al.* (2018)

Comparando ambas as histologias das figuras 5 e 6 a seguir, foi observado que o material possuía diferenças significativas positivas no sentido de neoformação óssea, o que motivou a continuação de pesquisas utilizando este material.

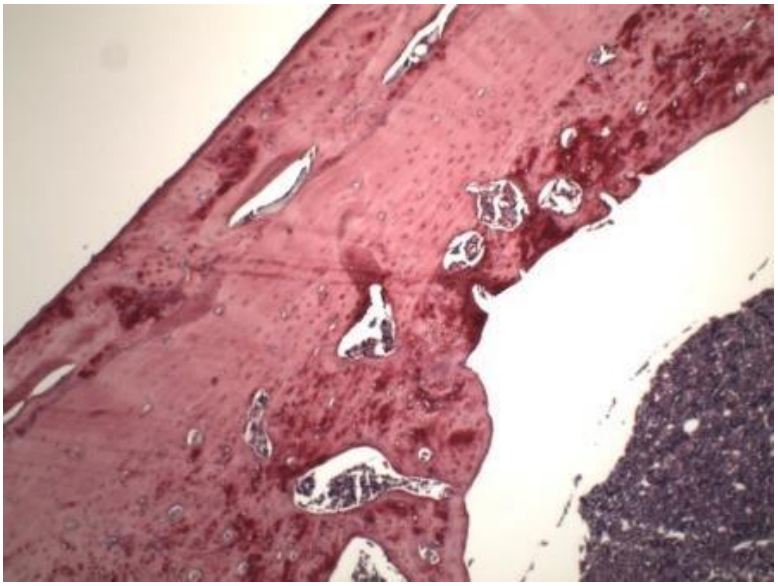
Figura 5 – Quitosana/éster fosfórico após 6 semanas, corada com Picro-Sirius, aumento de 100x.



Fonte: Holanda, *et al.* (2018)

Figura 6 – Enxerto Autógeno após 6 semanas, corada com Picro-Sirius, aumento de 100x.

Fonte: Holanda, *et al.* (2018)

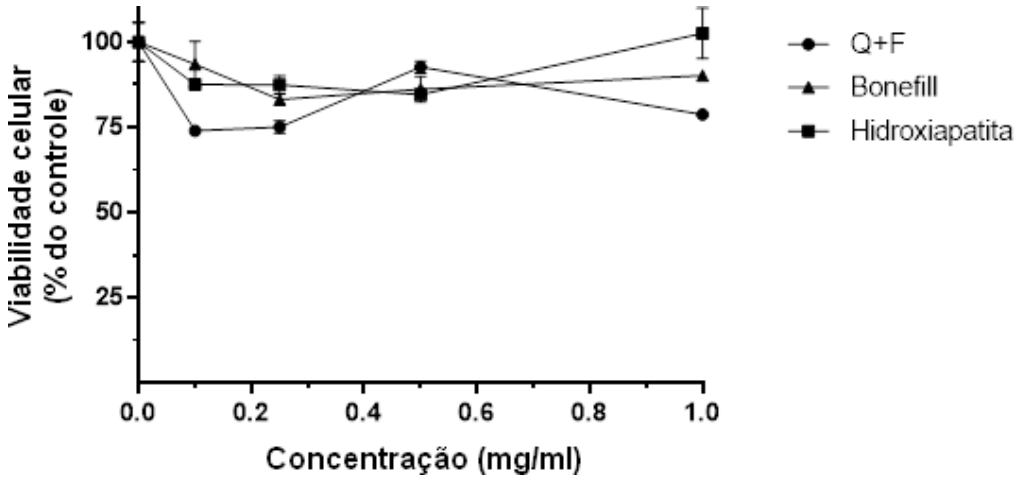


Em cima dos resulatados obtidos, o aluno Jonathan Keruak Andrade de Holanda deu continuidade na pesquisa em seu mestrado de engenharia biomédica na UMC, mas agora sob orientação do Professor Fabio Dupart Nascimento e ainda sob co-orientação do presente autor desta tese. Nos gráficos 1 e 2 abaixo observamos os testes de viabilidade celular da enxertia a base de quitosana e éster fosfórico, obtidos na continuação dos estudos, com comparação aos principais tipos de enxerto

existentes no mercado, por meio do teste de Metil-tiazolil-tetrazólio (MTT) (Holanda *et al.,* 2022).

O teste da citotoxicidade através do MTT, possibilitou avaliar em diferentes concentrações (1mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml e 0,1 mg/ml respetivamente) os possíveis danos celulares provocados pelos biomateriais, permitindo comparar a quitosana com a hidroxiapatita e o Bonefill (osso bovino). Apresentando resultados de forma equivalente entre os biomateriais (Gráfico 1), onde todos os materiais apresentaram resultados satisfatórios, com níveis de viabilidade celular superior a 75% (HOLANDA, 2022).

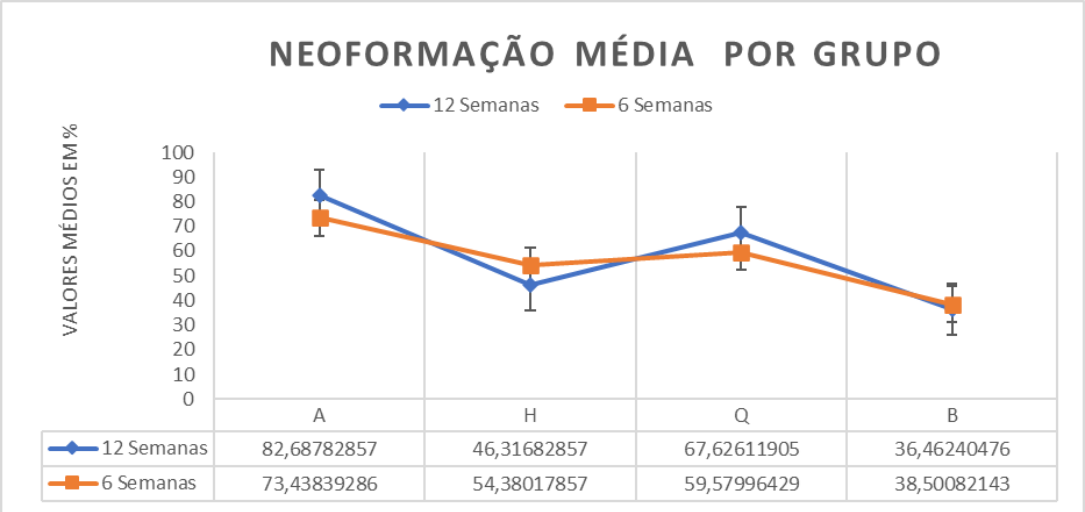
Gráfico 01 – Viabilidade celular pelo método de redução do MTT. Valores do Teste em duplicata.



Fonte: Holanda, *et al.* (2022)

No gráfico 2 temos a mensuração da neoformação óssea dos biomateriais testados com 6 e 12 semanas operados, confeccionados através de lâminas histológicas, representando a média em porcentagem, onde é possível observar comparativamente que nos grupos de 6 semanas, a quitosana com éster fosfórico obteve ganho de formação óssea ligeiramente maior que o osso bovino e de hidroxiapatita, e ligeiramente inferior ao osso autógeno. Já no grupo com 12 semanas o enxerto a base de quitosana e éster fosfórico tem um salto significativamente maior em formação óssea em relação ao osso bovino e hidroxiapatita e se manteve ligeiramente inferior a formação óssea do osso autógeno. Com esta análise, foi possível constatar que a presente proposta de biomaterial para enxertia possui relevância para a pesquisa científica.

Gráfico 2 – Neoformação óssea média nos grupos.



Fonte: Holanda, *et al.* (2022)

É importante relatar detalhadamente na presente introdução os principais aspectos científicos relacionados as pesquisas em paralelo relacionada ao assunto, pois são necessários para compreender a relevância cientifica e a aplicabilidade do presente enxerto baseado nos resultados iniciais, sendo respondidas totalmente ou pacialmente muitos questionamentos sobre esta nova proposta de enxertia, como por exemplo sua biocompatibilidade, taxa de reabsorção aceitável, integração ao tecido ósseo, tamanho e forma adequados e principalmente não provocar reação imunológica, pois embora importantes, não são o foco da presente tese. Claro que estes são os primeiros estudos já publicados sobre este projeto de enxertia, e logicamente cada estudo leva a mais questionamentos e consequentemente mais estudos, e é justamente isto que a presente pesquisa fomenta, cada vez mais estudos e questionamentos, para que mais pesquisadores possam se interessar por esta nova linha de bioengenharia na construção de enxertos ósseos.

Em nenhuma das publicações acima mencionadas sobre esta nova proposta de biomaterial de enxertia se abordou a maneira detalhada a bioengenharia utilizada para a elaboração e produção da presente proposta de enxertia a base de quitosana e éster fosfórico. Os alunos executores das pesquisas publicadas acima mesncionadas foram orientados nestas primeiras etapa a realizarem ensaios clínicos práticos e testes laboratoriais para avaliar a viabilidade deste enxerto, mas não faziam idéia de como era confeccionado o material, nem como foi o raciocínio debioengenharia utilizado na criação deste novo biomaterial. Sabiam apenas que era um material heterógeno e sintético a base de quitosana e éster fosfórico.

Na presente tese, explica-se pela primeira vez como se deu a bioengenharia para a construção deste biomaterial, bem como realiza-se mais testes laboratoriais como o de PH, condutibilidade e solubilidade/dispersão, comparando-se os resultados com enxerto ósseo bovino e hidroxiapatita existentes no mercado, a fim de fornecer ainda mais dados para que a comunidade cientifica tenha um ponto de partida mais sólido para continuar a estudar esta nova proposta de enxertia que possui características físico/químicas diferentes do ofertado predominantemente no mercado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biomateriais para Enxertia

Um biomaterial para enxertia precisa reunir diversas qualidades, segundo Potter & Ellis (2004), sendo quimicamente inerte, biocompatível, não alergênico, não cancerígeno, de custo aceitável, passível de esterilização sem que haja alteração de sua composição química, fácil manipulação durante a realização da cirurgia, de boa estabilidade com parafusos se necessário e, apresentar radiopacidade. Outro ponto importante é o material não ser uma fonte passível de crescimento bacteriano, além de ser totalmente reabsorvível e substituível por novo tecido ósseo, qualidade esta não encontrada na maioria dos biomateriais para enxertia existentes no mercado.

Dada gama de qualidades que devam ser reunidas, não existe um único material eleito que contemple todas as situações necessárias, devendo o profissional conhecer as qualidades e limitações de cada material disponível no mercado e utilizá-los conforme seu intuído de ganho. A escolha do material envolve dados como tamanho do defeito ósseo, quantas paredes da loja cirúrgica envolve o defeito ósseo, adaptação do contorno interno da área receptora de enxertia, quantidade de volume ósseo a ser restaurado, no caso de cirurgia na face, a presença ou não de cavitação nos seios da face, evitar o deslocamento do material enxertado, avaliar risco de trauma futuro tanto em reparo rápido como tardio. Desta maneira, é preciso entender todas as qualidades acima mencionadas para um enxerto ósseo (STEIN, 2009).

2.1.1 Enxerto Autógeno

O osso autógeno é considerado padrão ouro para realização de enxertos ósseos (FINKEMEIER, 2003), e sua osseointegração se dá por alguns princípios biológicos de formação óssea como a osteogênese, osteoindução e osteocondução.

A osteogênese inicia-se a partir das células transplantadas no enxerto, que multiplicam formando novo osteóide, e o volume ósseo gerado depende diretamente da quantidade de células ósseas transplantadas no procedimento de enxerto. A osteoindução é a diferenciação de fibroblastos do tecido conjuntivo para formar os osteoblastos. Na osteocondução existe um aumento de volume ósseo por meio de crescimento de capilares sanguíneos e células ósseas progenitoras, tanto dentro, como perifericamente ou no próprio enxerto ósseo, sendo uma ponte de ligação para formação do novo osso (FONSECA, 2015). Os enxertos autógenos de origem do próprio indivíduo fornecem células ósseas vivas imunocompatíveis, importantes para a fase I da osteogênese, responsável pela multiplicação das células ósseas, principalmente o osteóide, sendo assim, as células vivas transplantadas ajudam a formar uma maior quantidade de osso (PINTO *et al.,* 2007).

Temos como desvantagem nos enxertos autógenos a necessidade de um segundo sítio cirúrgico para a obtenção do enxerto, o que pode inviabilizar a escolha desta técnica, bem como a quantidade necessária de osso doador nem sempre é o suficiente para a área receptora (STEIN, 2009).

2.1.2 Enxerto Alogênico

Os enxertos alogênicos são obtidos de outro indivíduo da mesma espécie, sendo tratados para reduzir a antigenicidade, logo não existe células vivas, portanto não havendo a fase I da osteogênese como ocorre com o osso autógeno. Sua ação é passiva, oferecendo simplesmente uma matriz de tecido duro para a indução da fase II, onde temos a angiogênese e proliferação fibroblástica do local enxertado, seguido da osteogênese do tecido conjuntivo. O enxerto alogênico mais utilizado é o liofilizado. É obtido através de banco de ossos mediante processo burocrático específico, embora este tipo de enxerto não tenha atualmente grande procura na cirurgia bucomaxilofacial (BAPTISTA, 2003). Entretanto, o osso liofilizado possui certas desvantagens, como incompatibilidade do hospedeiro, potencial de contaminação de espécie, resultando na infecção do sítio receptor, e o potencial de transmissão de doenças do doador para o receptor do enxerto, embora as empresas que trabalhem com comercialização deste tipo de enxerto assegurem alta qualidade nos processos de tratamento e esterilização do enxerto alogênico (FINKEMEIER, 2003).

2.1.3 Enxerto heterógeno

Os enxertos ósseos heterógeno, também conhecido como xenógeno, são

aqueles obtidos de espécies diferentes de animais, o mais comumente utilizado é o osso bovino (DOS ANJOS, 2021). Esta modalidalidade de enxertia possui propriedades antigênicas mais proeminentes que o osso tipo alogênico, justamente por ser obtitido de especie animal diferente, por possuir carga genetica também muito diferente, e precisar de um processo de purificação para ser utilizado. Também não fornece células vivas viáveis para a formação da fase I da osteogênese, devido ao processo ao tratamento para utilização em seres humanos. O osso heterógeno mais comercializado e empregado no mercado é o osso bovino liofilizado (PETERSON, 1993).

2.1.4 Enxerto de Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HA) tem sido estudada desde 1970, sendo um fosfato de cálcio hidratado, o que compõe cerca de 95% da fase mineral dos ossos e dentes humanos. A hidroxiapatita, também classificada como um material de enxertia sintético, atua no corpo humano como reserva de cálcio e fósforo, tendo suas indicações no reparo de defeitos ósseos em cirurgias oral menores, cirurgias ortopédicas, aumento de rebordo alveolar, regeneração guiada de tecidos ósseos, reconstrução bucomaxilofacial, reparo e substituição de paredes orbitais e substituição do globo ocular (PARIS, 2002).

Dentre os materiais citados para enxeria anteriormente, a hidroxiapatita (HA) é sem dúvida um dos mais versáteis, mais usados e difundidos, por ser um componente químico natural e as respostas inflamatória ou tóxicas não são observadas nos tecidos circunvizinhos. A característica mais importante da HA está na osteocondutividade, induzindo crescimento ósseo no interior do enxerto, auxiliando na estabilidade e manutenção do volume ósseo (SHINDO, 1993).

2.1.5 Quitosana

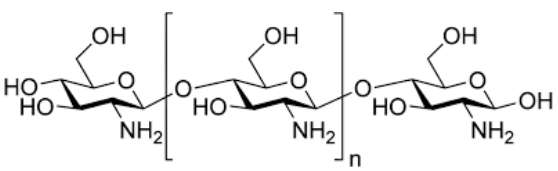
Não existe no mercado a quitosana como material para enxertia óssea, mas no meio científico existem alguns estudos “*in vitro*” cogitando esta possibilidade como por exemplo o perguisador Yex (2018). Na área da saúde em geral existem muitos estudos já com aplicabilidade em queimaduras de pele (PATRULEA *et al.*, 2015). Abaixo, descrevemos brevemente a quitosana, pois é um dos componentes utilizado no desenvolvimento de um novo biomaterial para enxertia óssea e indução de crescimento ósseo, sendo neste trabalho classificado como material heterógeno, por ser obtido a partir de outra espécie animal.

A quitosana originalmente pode ser obtida no mercado em diversos graus de pureza, desde um pó fino, até mesmo em um pó com granulações variáveis, géis ou membranas, sendo obtido a partir da carapaça de crustáceos principalmente. É um polissacarídeo hidrofílico, constituído basicamente por glicosamina e N-acetilglucosamida, ou seja, tem sua formação semelhante aos glicosaminoglicanos, o que faz parte de uma considerável porção da estrutura extracelular dos tecidos celulares (MORAES*,* 2017). A composição química da quitosana possui em comum o N-acetilglucosamida, sendo inclusive a composição básica do ácido hialurônico (AH) presente no preenchedores faciais utilizados na harmonização orofacial. Esta matriz de ácido hialurônico “atrai” e se liga quimicamente as moléculas de água, sendo esta característica hidrofílica (KIM, 1996).

Na área de engenharia de tecidos, existem estudos pesquisado o uso da quitosana com gel de ácido hialurônico na regeneração de cartilagens, pois trata-se de um biopolímero atraente para a fabricação de arcabouços artificiais para engenharia de tecidos por ser biocompatível e biodegradável. A biocompatibilidade do AH deve-se ao fato de estar presente na matriz extracelular nativa, deste modo, cria-se um ambiente propício que facilita a adesão, proliferação e diferenciação celular, além da existência de sinalização celular específica, o que contribui para a regeneração do tecido (NASCIMENTO, 2016). De maneira geral a quitosana possui características de induzir baixa resposta inflamatória, ou seja, melhor controle de edema local, além de propriedade antibacteriana, e ter em sua composição sólida características de porosidade (MARTINS, 2010).

Uma característica especial que encontramos na quitosana é sua atividade bactericida intrínseca, o que acelera a cicatrização dos tecidos e reduz tempo de tratamento, diminui a dor pós-operatória, além de proteger a superfície do tecido afetado (LARANJEIRA & FÁVERE, 2009). Nesse sentido, sabe-se que uma das causas de insucesso de enxertos é a sua contaminação e consequente infecção (MAIA, 2023), logo um biomaterial que já confira em sua composição básica propriedades antimicrobianas, é de se esperar por logica de raciocínio que possa aumentar as chances de sucesso de um procedimento de enxertia.

Figura 7 – Estrutura química da quitina ou quitosana



Fonte: Laranjeira & Fávere, 2009.

2.1.6 Éster Fosfórico

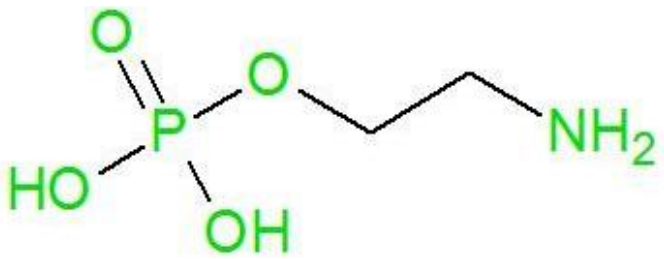
O éster fosfórico, por ser utilizado como uma das matérias primas na construção desta nova proposta de biomaterial para enxertia, foi aqui colocado para se entender suas propriedades, muito embora, não existe na literatura até o presente momento o uso do éster fosfórico para uso em enxertia óssea na odontologia.

Os ésteres fosfóricos são extremamente numerosos e podem ser classificados em mono-, di- e triésteres, de acordo com o número de grupos ésteres presentes, sendo que os triésteres não participam em processos biológicos. Os monoesteres do ácido fosfórico, utilizados neste estudo contêm grupos hidroxila na sua estrutura caracterizando-se, portanto, como ésteres com uma funcionalidade adicional equivalente à de ácidos dipróticos ou monopróticos, respectivamente (DOMINGOS, 2003).

De acordo com Westheimer (1968), "*todas as reações que envolvam a formação ou a quebra de ligações de ésteres fosfóricos são vitais para o entendimento dos sistemas vivos*", logo, a importância da química do átomo de fósforo por si só justificaria o estudo de seus compostos.

Os ácidos fosfóricos participam de diversas funções metabólicas, fornecendo energia, por este motivo o éster fosfórico foi escolhido para fazer parte do novo biomaterial para enxertia, pois tem grande potencial de participar das ligações químicas de neoformação óssea. Foi utilizado nesta presente pesquisa o éster fosfórico conhecido como fosfoetanolamina, que possui a fórmula química ($C_2H_8NO_4P$).

Figura 8 - Fórmula estrutural da fosfoetanolamina

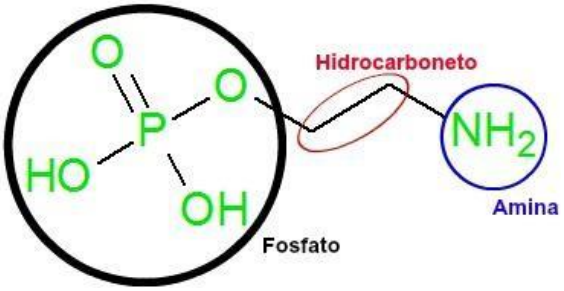


Fonte: Própria (2023)

A fosfoetanolamina é considerada uma amina primária, um monoéster, possui um grupo orgânico amina. Pelo fato de ser um éster fosfórico, isto já lhe confere

quimicamente características de participar de reações químicas que ocorrem no local onde se encontram (DOMINGOS, 2003).

Figura 9 – Esquema de divisão da fórmula estrutural da fosfoetanolamina



Fonte: Diego Lopes Dias: https://mundoeducacao.uol.com.br/quimica/propriedades-fosfoetanolamina.htm

Em publicação de Siqueira (1952), entendemos que os ésteres fosfóricos, e nesta classificação temos a fosfoetanolamina, cuja composição se dá por um grupo Fosfato (H_2PO_4), um grupo de Hidrocarboneto ($-C_2H_4$) e um grupo de Amina ($-NH_2$). Esta composição química, no organismo vivo, permite participar como reagente básico na formação de fosfolipídeos como a fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilcolina, que participam na das diversas atividades de equilíbrio celular, desempenhando funções como:

- Participação de vias de sinalização (indica desequilíbrio celular) para o macrófago;
- Composição da membrana celular;
- Carreamento de ácido graxo para as mitocôndrias;
- Síntese de substratos intermediários (auxilia na quebra dos nutrientes adquiridos na alimentação) no metabolismo;
- Participa de etapas da regulação do metabolismo celular, como o metabolismo mitocondrial;
- Participação na síntese de acetilcolina (substância que participa da transmissão do impulso nervoso);
- Auxílio da síntese hormonal;
- Auxílio na divisão celular.

3 OBJETIVO

O presente trabalho tem por finalidade descrever a técnica laboratorial empregada para obtenção desta nova proposta de enxertia óssea de origem heterógena/sintética, bem como uma análise laboratorial comparativa deste material com osso bovino e hidroxiapatita comercializados para fim de enxertia em relação ao PH, dispersão, solubilidade e condutibilidade.

4 METODOLOGIA

Não existe metodologia prévia semelhante na construção do presente biomaterial, por este motivo temos aqui a adaptação e/ou criação de métodos para criar o biomaterial, que serão descritos a seguir. A metodologia aqui apresentada é dividida em duas etapas, sendo, a primeira delas a obtenção propriamente dita do biomaterial e finalizando, a segunda etapa se relaciona com os testes laboratoriais comparativos de solubilidade, PH e condutibilidade.

A obtenção do novo biomaterial para enxertia se divide em 3 fases, sendo:

1) Confecção da matéria prima do preparado de quitosana;
2) Confecção da matéria prima do éster fosfórico fosfoetanolamina;
3) Homogeneização e granulação das duas matérias primas obtidas.

4.1 Obtenção do preparado de Quitosana

Primeiramente se procede na produção da dispersão de quitosana, cuja metodologia segue em parte a metodologia na dissertação de mestrado de Vasconcelos (2016), que também é autor da presente tese, onde o objetivo original da referida dissertação estava em realizar redução da prata em nanopartículas de prata utilizando preparado de quitosana para este fim. Neste estudo existia um subproduto que era descartado, porém sabia-se que tinha alto potencial bactericida, mas para aquela pesquisa em questão não havia utilidade. Na pressente tese, se aproveitou este subproduto que antigamente era descartado, aproveitando como matéria prima na obtenção da atual proposta de enxerto ósseo, na metodologia que descrita a seguir.

A dispersão de quitosana foi preparada por procedimento que consiste na dispersão do polímero sob agitação moderada em meio aquoso com pH ácido (4,75),

fazendo uso de ácido acético 0,5 mol/L, para uma concentração de quitosana dispersade 10 g/L e um período de 5 horas de agitação. Utilizamos 1 g de quitosana em solução contendo 1 ml de ácido acético (glacial) em 100 ml de H_2O destilada, obtendo assim uma dispersão de quitosana a 1%. Todo o procedimento foi realizado a temperatura ambiente. Os experimentos foram conduzidos nesta primeira etapa da pesquisa no Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica (CIIB) da Universidadede Mogi das Cruzes (UMC).

A solução foi submetida a uma agitação de 5 horas, em um agitador magnético, sendo este o tempo necessário para garantir formação da dispersão de quitosana.

FIGURA 10: Dispersão sob agitação de 5 horas no agitador magnético



Fonte: Vasconcelos (2016)

A dispersão obtida foi filtrada a vácuo com o uso de um funil e papel filtro a fim de eliminar impurezas da dispersão.

Figura 11: Dispersão obtida foi filtrada a vácuo com o uso de um funil e papel filtro a fim de realizar eliminação de impurezas da solução.



Fonte: Vasconcelos (2016).

Tanto a dispersão de quitosana filtrada propriamente dita como as impurezas retidas no filtro foram aproveitadas no processo de obtenção do material de enxertia aqui desenvolvido, sendo colocado em partes iguais em peso tanto da dispersão obtida como do filtrado. Este processo é importante para obter a “granulação” do produto, semelhante a granulação dos enxertos vendidos comercialmente.

4.2 Obtenção do Éster Fosfórico

A metodologia de obtenção do éster fosfórico seguiu a patente publicada em 2011 sob número PI0800460-9 A2, que se encontro nos anexos da presente tese. Na metodologia empregada para síntese do éster fosfórico de fosfoetanolamina na forma sólida com Cálcio, Magnésio e Zinco na forma de solução com monoetanolamina, seguiu patente que se encontra nos anexos, e utilizou como reagente de ácido fosfórico e 2-aminoetanol.

Em um balão de 3 bocas de 500 ml, colocou-se 1 mol de 2-aminoetanol sobre banho de gelo e agitação constante, adicionou-se lentamente 1 mol de ácido fosfórico 85% (m/m), sendo que, após a neutralização, o balão foi acondicionado em manta aquecedora e borbulhou-se a mistura com fluxo de gás nitrogênio, mantendo- se o sistema sob agitação com mesmo gás e temperatura controlada, e onde a adição do gás nitrogênio teve duas funções, sendo uma de retirar água por evaporação,

conforme a mistura era aquecida, bem como garantir uma atmosfera inerte de reação, evitando a oxidação do meio reacional, onde a água evaporada da mistura teve duas origens, sendo que uma parte da dissolução do próprio ácido fosfórico, e a outra parte formada como produto da reação de esterificação.

A temperatura foi elevada até 220 °C, e a mistura obtida se apresentou na forma de um líquido amarelo de alta viscosidade, e a esta mistura acrescentou-se água e posteriormente etanol hidratado a 95%, de modo que a mudança da constante dielétrica do meio permitisse a cristalização da fosfoetanolamina, sendo que o líquido viscoso, obtido dessa maneira, cristalizou-se após uma hora, e os cristais obtidos foram lavados com etanol anidro, tendo a reação apresentado rendimento de 90%; a partir dos cristais obtidos, preparou-se uma solução aquosa saturada, que foi deixada em repouso, sob refrigeração a 8°C , durante duas semanas, obtendo desta forma cristais bem definidos.

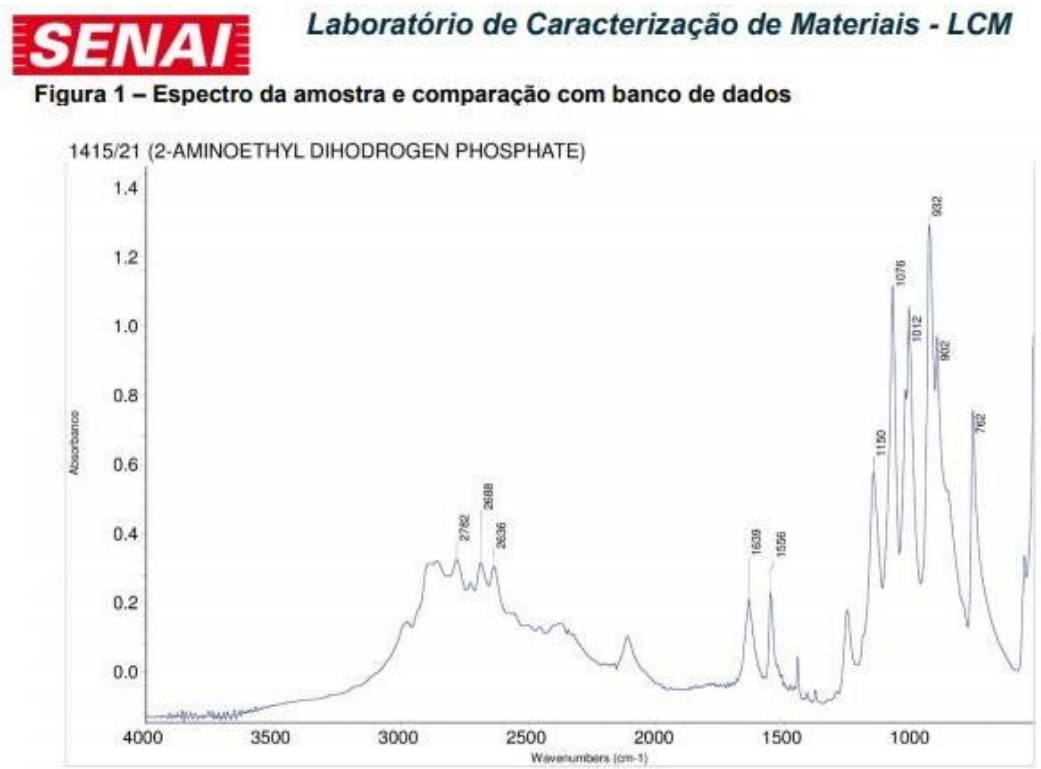
Figura 12: Mistura de 2-aminoetanol com ácido fosfórico, sob agitação e aquecimento



Fonte: Própria (2023).

Para verificar se a metodologia acima resultou em fosfoetanolamina, a amostra obtida foi submetida a espectroscopia no infravermelho (FT-IR – FOURIER TRANSFORM INFRARED) realizado pelo laboratório do SENAI de São Bernardo do Campo. A técnica de espectroscopia no infravermelho fornece evidências da presença de grupos químicos funcionais constituintes de uma amostra no espectro de infravermelho. O espectro obtido pode ser analisado e comparado com dados de referência de literatura e banco de dados de equipamentos, podendo assim, ser determinada a identidade ou composição química de uma amostra. Uma porção da amostra foi colocada no acessório de refletância total atenuada (ATR) de reflexão simples, com cristal de diamante Smart Orbit™. A faixa de leitura foi de 4000 a 525 cm-1, o número de varreduras de 50 e resolução de 4 cm-1.

FIGURA 13: Espectro da amostra e comparação com banco de dados



Spectrum: 1415/21 (2-AMINOETHYL DIHODROGEN PHOSPHATE)
Region: 3495.26-525.03
Search type: Correlation
Hit List:

Index	Match	Compound name	Library
2192	45.65	Halox BW-191	Coatings Technology
81	44.88	PHENYLPHOSPHONIC ACID, 98%	Aldrich Condensed Phase Sample Library
8864	44.88	Phenylphosphonic acid, 98%	Aldrich Condensed Phase
2191	44.52	Halox BW-111	Coatings Technology
148	43.69	CUPSAC Accelerator	Rubber Compounding Materials
1125	42.29	2-Bromoethanol, 95%	Aldrich Condensed Phase
2196	42.26	Halox CW-291	Coatings Technology
6027	41.78	Furfuryl mercaptan, 98%	Aldrich Condensed Phase
2194	41.75	Halox CW-111	Coatings Technology
2191	41.70	Halox BW-111	HR Coatings Technology

Fonte: Própria (2023).

Os resultados do espectro da amostra e comparação de dados do equipamento e interpretação mostram a obtenção de espectro de “2-aminoethyl dihidrogen phosphate” cuja fórmula química é ($C_2H_8NO_4P$), ou seja, uma fosfoetanolamina, e conclui-se que a amostra revela picos característico para a mistura de sal orgânico a base de fósforo e nitrogênio, o que significa que houve êxito na elaboração laboratorial de fosfoetanolamina.

A tabela abaixo, identifica os possíveis grupamentos químicos existente na amostra enviada ao SENAI para realização do teste de submetida a espectroscopia no infravermelho.

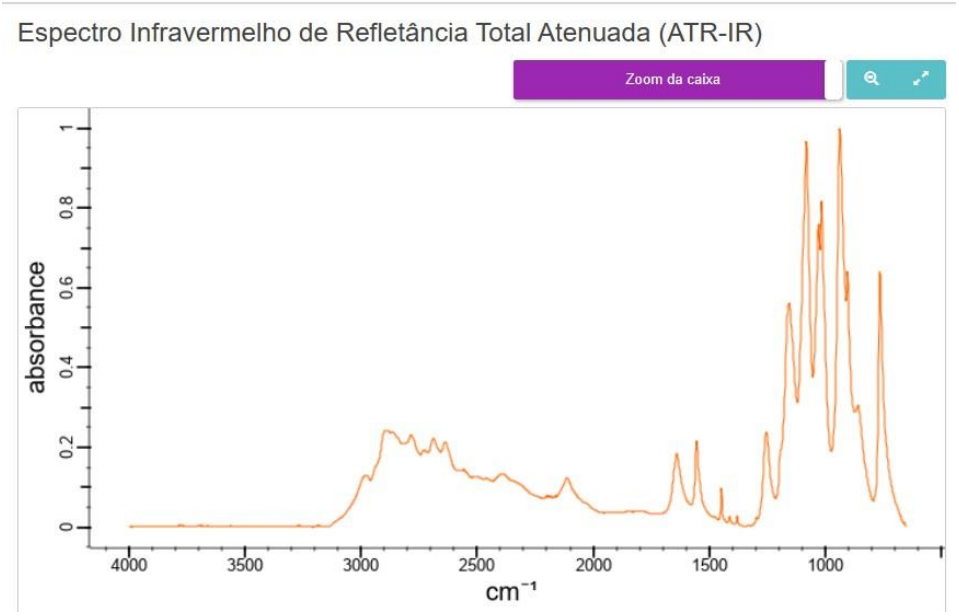
Tabela 1 – Identificação dos possíveis grupamentos químicos de amostra

BANDA (cm^{-1})	ATRIBUIÇÕES	BANDA (cm^{-1})	ATRIBUIÇÕES
2782	ν_A N – H	1076	ν C – O
2688	ν_S N – H	1012	γ C – O, ν P = O
2636	δ O – H	932	ν NH, ν_A COP
1639	δ_A NH_2^+	902	ν_A P – O
1556	δ_S NH_2^+	762	δ CH_2
1150	ν_S C – O – C	---	---
Abreviaturas : (ν) estiramento; ($\ldots_A$) assimétrico; (γ) deformação assimétrica no plano tipo tesoura -“scissoring”; (ω) deformação assimétrica fora plano tipo maneio/sacudida -“wagging”;		(δ) deformação; ($\ldots_S$) simétrico; (ρ) deformação simétrica no plano tipo balanço -“rocking”; (τ) deformação simétrica fora plano tipo torção - “twisting”;	

Fonte: Própria (2023).

Com a obtenção do espectro infravermelho do éster fosfórico obtido, realizou-se uma análise comparativa com a curva espectral do éster fosfórico obtido a partir de um banco de dados de química (Direitos autorais © 2018-2021 Sigma-Aldrich Co. LLC. - Database Compilation Copyright © 2018-2021 John Wiley & Sons, Inc. Todos os direitos reservados.). Esta analise comparativa da curva espectral do é importante para verificar se ambos são idênticos ou não, de maneira a comprovar eficácia na obtenção do éster fosfórico2-aminoetil dihidrogenofosfato. Caso as curvas espectrais comparativas não paresentem similaridades, significaria que não houve êxito na obtenção do éster fosfórico 2-aminoetil dihidrogenofosfato, mais comumente conhecido como fosfoetanolamina. É muito importante para a presente pesquisa obter a materia prima de fosfoetanolamina na sua forma mais pura possível, a fim de evitar contaminantes na amostra e com isto podendo comprometer os resultados da pesquisa.

Figura 14: Espectro infravermelho de 2-aminoetil dihidrogenofosfato, fórmula C2H8NO4P



Fonte: https://spectrabase.com/spectrum/7rLsQ7r0lkL:

4.3 Homogeneização do gel de quitosana com éster fosfórico

A metodologia aqui empregada para homogeneização do gel de quitosana com éster fosfórico foi criada na presente pesquisa, onde, com uma placa de vidro higienizada e estéril, se coloca partes iguais em volume de gel de quitosana e éster fosfórico de fosfoetanolamina.

Em seguida, com auxílio de uma espátula número 24, realiza-se uma aglutinação homogênea de toda mistura, podendo ser espatulado ou comprimido sobre a placa e a espátula caso deseje fragmentar grânulos maiores do éster fosfórico.

O material obtido, na análise visual ter um aspecto de consistência “dura”, porém a consistência obtida é ligeiramente macia, o que facilita sua condensação e selamento da cavidade cirúrgica a que venha a ser introduzido.

O material homogeneizado é introduzido em um recipiente de vidro sem tampa, previamente limpo e esterilizado, e com auxílio de uma estufa é aquecido a temperatura aproximada de 100°C. Esta etapa é importante para melhorar a homogeneização entre o éster e o gel de quitosana, e principalmente eliminar o excesso de água por evaporação, obtendo assim uma massa de consistência reológica de menor escoamento.

FIGURA 15: Colação de pó de Éster Fosfórico em placa de vidro higienizada, e o gel de Quitosana ainda no tubo Falcon, que será inserido junto à placa.



Fonte: Própria (2023)

.

FIGURA 16: Homogeneização de Éster Fosfórico e gel de Quitosana



Fonte: Própria (2023)

FIGURA 17: Aquecimento da mistura Éster Fosfórico com gel de Quitosana



Fonte: Própria (2023)

Após a desidratação da mistura, ela retorna para uma placa de vidro estéril, e sofre o processo de particulação com ajuda de uma espátula número 24. Esta etapa é importante pois determinará o tamanho das partículas que se deseja na enxertia, sendo possível confeccionar granulações dos tamanhos mais variados desejados.

Figura 18 – Particulação da mistura após desidratação



Fonte: Própria (2023)

O material de enxertia a base de quitosana e éster fosfórico é acondicionado em embalagem estéril de vidro, com tampa, pronta para utilização.

Figura 19 – Produto a base de quitosana e éster fosfórico finalizado e acondicionado



Fonte: Própria (2023)

4.4 Teste de Dispersão e/ou Solubilidade

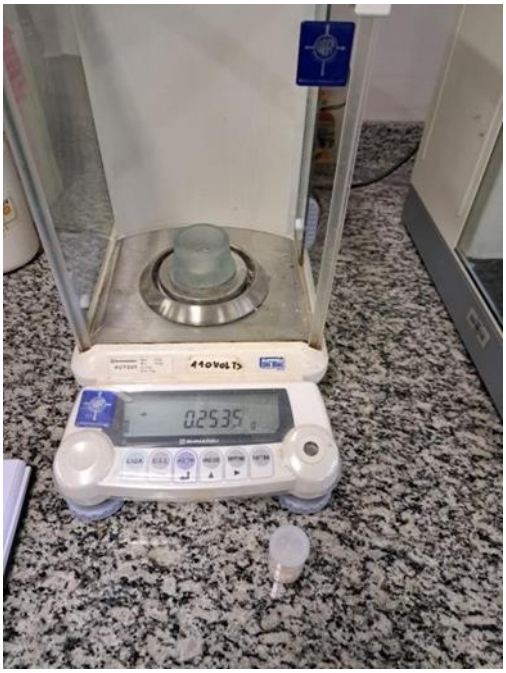
O teste de dispersão e/ou solubilidade não é referenciado nos materiais de enxertia existentes no mercado, sendo por este motivo criado na presente pesquisa uma metodologia de mensurar esta característica, de maneira a oferecer mais informações sobre estes materiais.

Após finalização da confecção do material de enxertia, realizou-se um teste de solubilidade e/ou dispersão do material obtido para realizar análise comparativa tanto com o enxerto bovino como o de hidroxiapatita existentes no mercado.

Esta análise consiste em triturar isoladamente as partículas tanto do osso bovino, hidroxiapatita e o novo o preparado a base de quitosana e éster fosfórico, e posterior análise comparativa entre eles. Nesta análise utilizou-se a 0,25 gramas, pesadas em balança de precisão com quatro casas decimais, da marca SHIMADZU (Figura 19) e em seguida trituradas com grau e pistilo e diluídas em 50 ml de água desmineralizada (Figura 20), ou seja, uma proporção de 5g/L.

Ao final se realizou a análise visual da amostra (Figura 21), bastando observar se formou um líquido límpido ou turvo. O líquido turvo significa que obtivemos uma dispersão, e se obter um líquido límpido, obtemos uma solução.

Figura 20 – Pesagem das amostras de enxerto



Fonte: Própria (2023)

A trituração se deu com a ajuda de grau e pistilo de vidro, de característica despolida tanto do grau como do pistilo, e aos poucos se acrescentou água desmineralizada junto ao processo de trituração mecânica dos enxertos ora testados.

Figura 21 – Trituração das amostras de enxerto com grau e pistilo



Fonte: Própria (2023)

Figura 22 – Análise visual para caracterizar solução ou dispersão da amostra testada



Fonte: Própria (2023)

4.5 Teste de PH

A aferição de PH de materiais para enxertia óssea não é referenciada pelos fabricantes dos materiais, logo este teste comparativo de PH foi criando na presente pesquisa a fim de fornecer maiores informações comparativas dos materiais de enxertia estudados.

Ao término de obtenção de solução e/ou dispersão descrita no item 4.4 desta tese, realizou-se o teste de PH das amostras tanto das amostras de osso bovino, hidroxiapatita bem como da mistura a base de quitosana e éster fosfórico, além de também analisar a água desmineralizada utilizada na presente pesquisa, paraposterior análise comparativa. Para esta análise utilizou-se um analisador de PH da marca DIGIMED, previamente calibrado antes de iniciar os testes.

Figura 23 – Teste de PH das amostras em solução e/ou dispersão



Fonte: Própria (2023)

4.6 Teste de Condutividade

Utilizando as amostras de solução e/ou dispersão a 5g/L descritas no item 4.4 da presente metodologia e da água desmineralizada utilizada no preparo das amostras para o presente teste, à temperatura de 25°C, para posterior análise comparativa dos enxertos. Realizou o teste condutibilidade em mS/cm (Siemens por centímetro) obtidas com a utilização de um aparelho condutímetro da marca HANNA INSTRUMENTS, modelo HI98304 DIST 4.

A condutividade elétrica é a grandeza física que mede a capacidade inerente a algum material de transportar cargas elétricas quando sujeito a uma diferença de potencial elétrico.

A condutividade elétrica de uma solução de nutrientes e água pode ser expressa como Siemens por cm (S/cm), milisimens por cm (mS/cm) ou Microsimens por cm (µS/cm). No caso da presente pesquisa, o medidor portátil utilizado utiliza a medição mS/cm.

Figura 24 – método de utilização do medidor de condutividade



Fonte: Própria (2023)

5 RESULTADOS

Uma das primeiras análises de um biomaterial é sua apresentação comercial para uso. No caso da presente pesquisa buscou-se uma particulação similar ao osso bovino e a hidroxiapatita vendida comercialmente. Neste quesito obteve-se êxito na obtenção do biomaterial para enxertia a base de quitosana e éster fosfórico, conforme se verifica na figura a seguir.

Figura 25: Principais tipos de enxertos utilizados no mercado da esquerda para direita: Bonefill (osso bovino), Hidroxiapatita e a direita nova proposta de enxerto a base de Quitosana/Éster Fosfórico.



Fonte: Holanda*, et. al*. (2018)

Em relação a obtenção da fosfoetanolamina, pode-se comprovar através da análise comparativa do espectro infravermelho realizado no éster fosfórico obtido nesta pesquisa com a curva espectral de um banco de dados de química (Direitos autorais © 2018-2021 Sigma-Aldrich Co. LLC. - Database Compilation Copyright © 2018-2021 John Wiley & Sons, Inc. Todos os direitos reservados.), mostrou comparativamente ambas as curvas espectrais são idênticas, comprovando o sucesso na presente pesquisa na obtenção laboratorial do éster fosfórico 2-aminoetil dihidrogenofosfato.

Na diluição de 5g/L das amostras de osso bovino, hidroxiapatita e quitosana com éster fosfórico realizamos as análises da diluição dos enxertos comparados da maneira da metodologia e os resultados são descritos na tabela abaixo.

Tabela 2– Análise comparativa dos enxertos na diluição a 5g/L

Diluição 5g/L	Solução/Dispersão	PH à 20°C	condutibilidade à 25°C
Osso Bovino	Dispersão	8,64	0,05 mS/cm
Hidroxiapatita	Dispersão	7,39	0,30 mS/cm
Quitosana + Ester	Solução	3,72	0,37 mS/cm
Água Desmineralizada	-	7,09	0,00 mS/cm

Fonte: Própria (2023)

Na análise da diluição previa-se que as amostras apresentariam característica de dispersão, mas não foi isso que ocorreu, pois a diluição da quitosana com éster fosfórico apresentou característica de solução, ou seja, a diluição ficou límpida, uma característica inédita para materiais de enxertia. No caso do osso bovino e da hidroxiapatita obtivermos aspecto turvo da diluição, o que caracteriza uma dispersão, como já era esperado por haver a presença de minerais.

Figura 26 – Obtenção da solução (aspecto límpido) da quitosana/éster fosfórico após trituração e diluição em água desmineralizada



Fonte: Própria (2023)

Figura 27 – Dispersão de osso bovino após trituração e acréscimo de água desmineralizada



Fonte: Própria (2023).

Figura 28 – Dispersão de osso hidroxiapatita após trituração e acréscimo de água desmineralizada



Fonte: Própria (2023)

Com esta mesma diluição a 5g/L realizamos o teste de PH da solução de quitosana e éster fosfórico e das dispersões de osso bovino e hidroxiapatita.

Figura 29 – Metodologia da leitura do PH das diluições das amostras de enxerto



Fonte: Própria (2023)

Pode-se observar que a dispersão de osso bovino obteve PH 8,64, o que lhe confere característica ligeiramente alcalina. Já com a hidroxiapatita encontramos um PH 7,79, o que indica característica mais próxima do neutro. Em contrapartida a solução a base de quitosana e éster fosfórico indicou um PH de 3,73, ou seja, característica ácida, o que indica outro ponto diferencial da nova proposta de enxertia.

A última análise das amostras foi o teste de condutibilidade medida, onde encontramos para o osso bovino uma condutibilidade de 0,05 mS/cm, o que indica baixíssima condutibilidade. A hidroxiapatita apresentou 0,30 mS/cm, o que se pode considerada baixa, mesmo assim superior ao osso bovino. A quitosana com éster fosfórico teve resultado ligeiramente superior à hidroxiapatita obtendo 0,37 mS/cm, o que indica também baixa condutibilidade, mas no comparativo possui maior condutibilidade.

6 DISCUSSÃO

Embora o objetivo da presente tese esteja focado no aspecto da bioengenharia da construção deste novo biomaterial, além dos testes laboratoriais comparativos, é muito importante entrelaçar nesta discussão os dados de pesquisas que ocorreram em paralelo à presente tese, de maneira a possibilitar a comunidade científica mensurar a relevância cientifica do estudo, ao se comparar os resultados já obtidos em trabalhos paralelos publicados como de Holanda (2018 e 2022) que apresenta dados promissores em relação à citotoxicidade, biocompatibilidade e capacidade de induzir a formação óssea, pois desta maneira podemos entender não só a metodologia para obtenção do presente enxerto, mas principalmente enxergar se realmente é promissor para o meio cientifico. Embora nas análise preliminares publicadas mostrem que o enxerto ósseo a base de quitosana e ésteres fosfóricos é superior ao osso bovino e hidroxiapatita (HOLANDA, 2018), é prudente entender que existe inúmeras marcas no mercado com inúmeras formas de processamento que acabam por definir enxertos com melhores e piores em desempenho, logo não podemos afirmar que a presente proposta é melhor que a maioria existente no mercado, mas sim que tem alto potencial promissor em superar boa parte dos enxertos existentes no mercado, pois tem em sua bioengenharia materiais com características bioquímicas muitos interessantes que merecem ser mais explorados e estudados.

A associação do éster fosfórico com o gel de quitosana trouxe características físicas de melhor plasticidade na manipulação do material obtido, pois ao misturar os dois materiais por espatulação, sendo um na forma de pó (éster fosfórico) e outro na forma de gel (quitosana), consegue-se obter uma consistência do material desejada para material de enxertia. A desidratação da mistura realizada logo em seguida atribui condições de granulação do material muito semelhante ao osso bovino ou hidroxiapatita vendida no mercado para o fim de enxertia. Inúmeros testes foram realizados na presente pesquisa até chegar ao resultado aqui apresentado. Como o objetivo era se obter um material granulado, semelhante ao osso bovino e à hidroxiapatita, não foram descritas outras formas apresentação final do produto, mas devido aos inúmeros testes realizados, podemos dizer que é possível realizar uma apresentação do biomaterial na forma de membrana, bloco em espessuras variadas, torná-lo mais rígido ou mais macio, tudo isto depende da maneira como desidratamos a mistura, na forma de comprimir ou particular o material.

É de se supor que a quitosana aumente o tempo de reabsorção do biomaterial, pois sendo a quitosana um polissacarídeo, sua reabsorção se daria por lógica mais lentamente, pois precisa ter suas cadeias quebradas para que possam ser reabsorvidas para dar lugar a neoformação óssea. Na publicação de Holanda (2018), na análise histológica é possível verificar uma boa formação óssea no enxerto a base de quitosana e éster fosfórico, o que vem a corroborar com esta teoria. Entendemos que, em havendo interesse da classe cientifica explorar mais este tópico, pode-se realizar estudos com enxertias somente com o éster fosfórico e somente com a quitosana para um estudo comparativo. Muito embora ja existam estudos preliminares utilizando apenas a quitosana, como o de Yex (2018), mas com resultados laboratoriais muito preliminares em relação a proposta aqui apresentada. Mas como estudos clínicos já publicados realizados em ratos (HOLANDA, 2018), já demonstram resultados satisfatórios, e entendendo que o comitê de ética avalia sempre o benefício que tal estudo comparativo pode trazer, acreditamos ser mais interessante no presente momento ampliar esforços em mais testes clínicos na formulação atual apresentada.

O éster fosfórico, no caso aqui utilizado a fosfoetanolamina, foi confeccionada na presente pesquisa para que houvesse previsibilidade e replicabilidade do testes, de maneira a garantir a pureza do material, sem contaminantes desconhecidos ou significativos, pois até pode ser obtida na forma de suplemento em cápsula, mas não teríamos a certeza de seu grau de pureza e quantidade por cápsula, podendo ter contaminantes indesejáveis, como por exemplo, em uma capsula de medicamento podemos ter o amido de milho ou talco, algo muito comum de ser encontrado em cápsulas ou comprimidos para Q.S.P. (Quantidade Suficiente Para) na fabricação de medicamentos. Esta mistura permitida pela indústria farmacêutica, no caso específico de ser utilizado para enxertia poderia trazer “contaminantes” que podem alterar a biocompatibilidade e consequentemente comprometer a sua capacidade de neoformação óssea, afetando assim a confiabilidade do presente biomaterial apresentado para enxertia, por este motivo a importância na presente pesquisa em fabricar a fosfoetanolamina e comprovar mediante testes que realmente se conseguiu uma fosfoetanolamina com alto grau de pureza. Na análise espectral tanto da amostra obtida nesta pesquisa e analisada pelo SENAI, como na curva espectral de um banco de dados, observamos que possuem um gráfico idêntico, o que tranquiliza em afirmar que houve êxito da presente pesquisa na obtenção da fosfoetanolamina de alto grau de pureza. Importante colocar que não foi simples obter a fosfoetanolamina, pois

embora seguiu-se uma patente, inúmeros ajustes deste a temperatura de aquecimento, fluxo de nitrogênio, potência da bomba vácuo, entre outros detalhes, tiveram de ser ajustados para se conseguir a fosfoetanolamina, pois a patente detalha de maneira geral da técnica, mas sua execução na prática exige muitos ajustes para que se obtivesse êxito na confecção deste material. Estes ajuste de técnica até são esperados, pois embora se utilize equipamentos com mesma finalidade, não são necessariamente identicos, pois alteração de potência, volume, marca, materia prima utilizada, enfim, tudo pode alterar em certo grau a metodologia de execução de uma técnica, mesmo que patenteada.

Tendo ciência de que um substituto ósseo deve ter propriedades físico-químicas parecidas com as do osso receptor de maneira a facilitar a regeneração óssea; ter a capacidade de associar propriedades osteoindutoras e osteocondutoras; ser biocompatível e reabsorvível (SPECTOR, 1999), uma das matérias primas escolhidas para compor a matriz de enxerto ósseo aqui desenvolvida foi o éster fosfórico, justamente por ser um precursor de dois dos quatro fosfolipídeos presentes na membrana plasmática dos organismos vivos, o que quimicamente aumenta a capacidade biointegrativa desta nova proposta de enxerto.

O éster fosfórico de fosfoetanolamina, possui uma composição de Ca-Mg-K-AEP (cálcio/magnésio/potássioaminoetanolfosfato), o que na verdade compõe parte da matriz original e de íons da matriz óssea de um indivíduo, oque se subentende aumentar as chances de biocompatibilidade, pois ao ser introduzida na loja de enxertia, a chance deste biomaterial ser reaproveitado na remodelação e/ou neoformação óssea da loja cirúrgica é muito maior, já que disponibiliza no sitio de enxertia os íons que podem ser aproveitados nas reações teciduais de regeneração da área de enxertia, fornecendo energia para as reações químicas teciduais, o que em teoria diminuiria o tempo de biointegração e neoformação óssea do sítio cirúrgico.

Outro desafio na atual pesquisa estava em escolher um outro material para ser unido ao éster fosfórico, pois ele puro apresenta propriedades físicas parecidas com um pó fino, tendo maisor possibilidade de não ficar por muito tempo retido no local a ser enxertado, havendo a necessidade de agregar um outro material que acrescentasse uma reologia mais consistente, que permitisse ser condensado em lojas cirúrgicas, além de características bactericidas, que diminuiriam chances de perdas de enxertos por contaminações pós-cirúrgicas. A quitosana foi o material escolhido, pois possui uma cadeia longa de polissacarídeo, o que ajuda a manter o volume do arcabouço ósseo preenchido com este biomaterial, levando a teorizar que

esta mistura permita uma degradação mais lenta dos ésteres fosfóricos, o que por consequência possa levar a uma melhor formação de tecido ósseo, uma vez que o tecido ósseo tem uma capacidade regenerativa mais lenta que o tecido mole, pois, a logica empregada é de que um material de enxertia que mantenha um arcabouço por mais tempo, permite que haja crescimento ósseo sem que o tecido mole, de crescimento mais rápido “invada” a loja cirúrgica enxertada.

Fazendo a leitura dos testes “*in vivo*” e “*in vitro*” que ocorreram em paralelo a presente pesquisa, como as cirurgias nos fêmures dos ratos, testes histológicos e de MTT, percebe-se que o material aqui apresentado possui citotoxidade similar ao osso bovino e hidroxiapatita (HOLANDA, 2022), uma biodegradabilidade e o presente enxerto favorece sua construção com os tamanhos de poros ou granulação variados, além de permitir biorreabsorbilidade (HOLANDA, 2018).

Em relação a diluição da quitosana na proporção de 5g/l em água desmineralizada, descrita na metodologia, era esperado que esse material apresentasse características de dispersão, como foi o caso do osso bovino e da hidroxiapatita. Mas supreendentemente a quitosana com éster fosfórico foi confeccionada nas proporções ideais que lhe conferiu característica de solução, o que é um fato inédito nas propostas de enxertia, merecendo atenção do meio científico no sentido de mais estudos testando comparativamente as taxas de biodegrabilidade e biorreabsorbilidade.

No caso do osso bovino e hidroxiapatita, por terem característica de presença de minerais não miscíveis em água, era esperado uma dispersão, ou seja, uma turbidez da diluição. No caso do uso destes enxertos “*in vivo*”, o organismo precisa reabsorver este material, e no lugar construir uma nova matriz óssea, utilizado parte dos minerais existentes do enxerto utilizado na construção deste novo tecido ósseo. Caso não exista aporte sanguíneo suficiente na região enxertada, não haverá formação de novo tecido ósseo (SPECTOR, 1999), e sempre existe a possibilidade de parte de enxerto migrar e ser expulso da lojacirúrgica ou simplesmente estes minerais ficarem inertes na loja cirúrgica, sem formar novo tecido ósseo. Para evitar a migração dos minerais obtidos a partir de osso bovino ou hidroxiapatita, no ato cirúrgico coloca-se membranas sobre quantidades grandes de enxerto granulado, para que não ocorra este efeito indesejado de migração e/ou expulsão de parte da enxertia utilizada e com isso ganhar tempo para que sejam absorvidos e reaproveitados na formação no novo tecido ósseo (FAVERANI, 2014).

No caso da quitosana com éster fosfórico, por ser solúvel, indica que caso ocorra alguma migração ou deslocamento do granulado de enxertia utilizado, ele terá menor incidência de ser expulso, e mesmo que não haja aporte sanguíneo necessário para formação de osso, é sabido que ele não ficara inerte no local enxertado como ocorre com a hidroxiapatita e osso bovino. Mas claro que seria interessante mais estudos para verificar se a solubilidade da quitosana “in vivo” e seu comportamento, muito embora os estudos em paralelo que ocorreram com este material já demonstraram seu potencial de regeneração óssea superior a hidroxiapatita e osso bovino testados.

Ao analisarmos o PH, o osso bovino teve PH de 8,64 e a hidroxiapatita PH de 7,39 e este PH a principio não causa grande irritação ao tecido onde será utilizado este enxerto, uma vez que este tipo de enxerto é amplamente comercializado no mercado, sem relatos de intercorrencia relacionado ao PH do material.

No caso da quitosana, este é um material biológico, de característica alcalina, e para conseguirmos fazer uma dispersão de quitosana foi utilizado nesta pesquisa o ácido acético, com um PH de 4,75 e uma agitação de horas, caso contrário não seria possível obter a dispersão de quitosana. No caso do éster fosfórico, para sua confecção utilizamos ácido fosfórico, o que lhe confere características de PH ácido. O que não se tinha previsão era qual comportamento teria a mistura da quitosana de característica alcalina com o éter fosfórico de característica ácida, e o resultado obtido foi um preparado de quitosana e éster fosfórico com PH de3,72. É uma característica ácida, na contramão dos enxertos existentes, mas se pensarmos que para reparação de um tecido precisamos de uma inflamação, e um tecido inflamado apresenta naturalmente característica ácida, o que ajuda na quimiotaxia, ou seja, na sinalização para que ocorra toda cascata inflamatória e a reparação tecidual. Assim sendo ao colocarmos um enxerto com características ácidas, era de se esperar embasado na fisiologia de reparo tecidual, que a acidez do enxerto ajudaria na quimiotaxia para reparação tecidual, partindo do princípio que uma injuria tecidual, no caso aqui potencializada pela acidez do enxerto, seria um fator corroborado no reparo tecidual.

É importante ressaltar que os ésteres fosfóricos possuem característica de participação de vias de sinalização (indica desequilíbrio celular) para o macrófago; composição da membrana celular; carreamento de ácido graxo para as mitocôndrias; síntese de substratos intermediários (auxilia na quebra dos nutrientes adquiridos na alimentação) no metabolismo; participa de etapas da regulação do metabolismo celular, como o metabolismo mitocondrial; participação na síntese de acetilcolina (substância que participa da transmissão do impulso nervoso); auxílio da síntese hormonal; auxílio na divisão celular, enfim, o enxerto já reúne em sua matéria prima

muitos benefícios que podem ser úteis na regeneração do tecido ósseo (WESTHEIMER, 1968).

E por fim, a análise de condutibilidade indica a facilidade de troca de elétrons em um meio. Lembrando que o osso bovino apresentou 0,05 mS/cm, a hidroxiapatita 0,30 mS/cm e o novo material a base de quitosana e éster fosfórico obteve 0,37 mS/cm, sendo o de maior facilidade de troca de elétrons, o que significa possuir maior potencial de interação de elétrons com os tecidos circunvizinhos onde ele for enxertado.

Existe uma máxima que diz que “se busca resultados diferentes, pare de fazer tudo igual”. Esta frase se aplica a presente proposta de enxertia que foi na contramão de tudo que existe no mercado, a começar por ter característica de solubilidade, enquanto os outros materiais são dispersões. Possui PH ácido, enquanto a maioria tem característica de PH neutra ou ligeiramente básica. Possui uma característica heterógena e sintética, enquanto os outros enxertos são apenas classificados por uma única característica de composição.

A quitosana, de origem heterógena, sendo um polissacarídeo de origem da carapaça dos crustáceos, tem inúmeros estudos de biocompatibilidade e cicatrização no tratamento de feridas e queimaduras de pele (LARANJEIRA, 2009), e em contra partida se associou a um material sintético a base de éster fosfórico para agregar as características ativas no metabolismo celular (WESTHEIMER, 1968), e com isto o enxerto passou a ter características protagonistas na interação com os tecidos vizinhos, o que não ocorre com os enxertos a base de osso bovino e hidroxiapatita por exemplo, que desempenham um papel passivo na neoformação óssea, dependendo exclusivamente que o tecido circunvizinho o reabsorva e forme um novo osso, onde a quimiotaxia se deve ao trauma cirúrgico (PINTO, 2007). Já a nova proposta de enxertia, é esperado que possua maior chance de quimiotaxia não só pelo trauma cirúrgico, mas também pela interação bioquímica do enxerto com os tecidos circunvizinhos. Toda esta visão promissora de bioengenharia na construção deste novo biomaterial de enxertia é embasada pelos estudos em paralelo que ocorreram e citados na introdução da presente pesquisa. Claro que mesmo sendo promissor, mais ainda se justifica serem realizados mais pesquisas em cima deste novo biomaterial, pois só se justifica ou se valoriza uma pesquisa se a mesma possui relevância cientifica de trazer benefício comum.

7 CONCLUSÃO

Pelo presente trabalho pode-se concluir que a associação do gel de quitosana com o éster fosfórico permitiu a confecção de um composto para enxertia com granulação e consistência semelhantes e adequadas comparativamente aos existentes no mercado para este fim. Tanto o éster fosfórico como a quitosana são materiais biocompatíveis e com características regenerativas e biointegrativas interessantes comprovada por literatura pregressa, logo a associação de ambos para obtenção de um novo biomaterial, criou o primeiro biomaterial para enxertia de origem heterógena/sintética, e tem se mostrado promissor do ponto de vista bioquímico. Possui características únicas de solubilidade, de PH ácido de 3,72, condutibilidade de 0,37 mS/cm, características estas não reunidas em nenhum outro material de enxertia existente no mercado.

REFERÊNCIAS

BAPTISTA, A. D. *et al*.. Estudo histológico dos enxertos ósseos homólogos humanos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 11, n. 4, p. 220–224, out. 2003.

CARLSON, E.R; MARX, R.E; BUCK, B.E. The potential for HIV transmission through allergenic bone. A review of risks and safety. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 80, p. 17-23, 1995.

DOMINGOS, J. B. *et al*. A química dos ésteres de fosfato. **Química Nova**, v. 26, n. 5 p. 745–753, 2003.

ANJOS, L. M. *et al*. Enxertos ósseos em odontologia – uma revisão integrativa da literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p. e522101220954-e522101220954, 2021.

FARDIN, Angélica Cristiane et al. Enxerto ósseo em odontologia: revisão de literatura. **Innovations Implant Journal**, v. 5, n. 3, p. 48-52, 2010.

FINKEMEIER, G. C. Current Concepts Review Boine-Grafting and Boine-Grafting Substitutes. **J Bone Joint Surg**, v. 84, p. 64-454, 2003.

FAVERANI, L. P. et al.. Surgical techniques for maxillary bone grafting - literature review. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 41, n. 1, p. 61–67, jan. 2014.

FONSECA, R. Trauma Bucomaxilofacial. Saunders Elsevier, 4 ed. 85-92,2015.

HOLANDA, J.K.A; PRESANIUK, R.A; SILVA, M.A.C; CREMASCO, L.G; DIAS, R.O; VASCONCELOS, F. Comparativos entre enxertos autógenos, heterógenos, hidroxiapatita e quitosana em fêmur de ratos. Mogi das Cruzes: **Revista Científica UMC**, v.3, n.3, 2018.

HOLANDA, J.K.A; VASCONCELOS, F; NASCIMENTO, F.D. **Análise da citotoxicidade in vitro do enxerto a base de quitosana e o comparativo entre enxertos autógeno, heterógeno e hidroxiapatita em fêmur de ratos**. 2022. 50 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, 2022.

KIM, J; YOO, S; OH, D.K; KWEON, Y; PARK, D; LEE, C. Selection of a Streptococcus equi mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. **Enzyme Microb Technol**. v.19, n.6, p. 440-5, 1996.

LARANJEIRA, M. C. M; FÁVERE, V. T. DE. Quitosana: biopolímero funcional com potencial biomédico industrial. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672–678, 2009.

MAIA DE OLIVEIRA, L. C.; DO VALE ARAÚJO, R. .; LIMA DO NORTE, A.; LOPES DE SÁ, J. . FATORES SISTÊMICOS E LOCAIS QUE CAUSAM INSUCESSO NA OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES DENTÁRIOS. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences** , *[S. l.]*, v. 5, n. 2, p. 70–85, 2023.

MARTINS, A. M.; ALVES C. M.; KURTIS KASPER, F.; MIKOS A. G.; REIS R. L. - Responsive and in situ-forming chitosan scaffolds for bone tissue engineering applications: an overview of the last decade - **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, p. 1638–1645, 2010.

MORAES, P. C.; MARQUES, I. C. S.; BASSO, F. G.; ROSSETTO, H. L.; PIRES-DE-SOUZA, F. C. P.; COSTA, C. A. S.; GARCIA, L. F. R. - Repair of Bone Defects with Chitosan-Collagen Biomembrane and Scaffold Containing Calcium Aluminate Cement. **Brazilian Dental Journal**, v. 28, n. 3, p. 287-295, 2017.

NASCIMENTO, M. H. M. DO .; LOMBELLO, C. B.. Hidrogéis a base de ácido hialurônico e quitosana para engenharia de tecido cartilaginoso. **Polímeros**, v. 26, n. 4, p. 360–370, out. 2016.

PARIS, M. F. Reconstrução de osso alveolar, em área dentada com uso de hidroxiapatita: estudo experimental em ratos Rattus novergicus albinus, cepa Wistar [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre: Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2002.

PATRUELA, V.; OSTAFE, V.; BORCHARD, G.; JORDAN, O. Chitosan como material de partida para aplicações de cicatrização de feridas. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 97, p26-417, 2015.

PETERSON, L. J.; *et al*. (ed.) Reconstrução Cirúrgica dos Defeitos da mandíbula. *In*: III ELLIS, Edward. **Cirurgia oral e maxilofacial contemporânea**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 606-616.

PINTO J. G. S., CIPRANDI M. T. O., DE AGUIAR R. C., LIMA P. V.P., HERNANDEZ P. A. G., JÚNIOR A. N. S. - Enxerto autógeno x biomateriais no tratamento de fraturas e deformidades faciais – uma revisão de conceitos atuais. **RFO**, v. 12, n. 3, p. 79-84, setembro/dezembro 2007.

POTTER, J. K.; ELLIS LLL, E. Biomaterials for reconstruction of the internal orbit. **J Oral Maxillofac Surg**, v.62, p. 97-1280, 2004.

SHINDO, M. L.; CONSTANTINO, P.D.; FRIEDMAN, D.; CHOW, L. C. Facial skeletal augmentation using hidroxiapatite cement. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg,** v. 119, p.185-90, 1993.

SIQUEIRA, E. C. D. .; FRANÇA, J. A. A. D. .; DOBOSZEWSKI, B. . OS DERIVADOS DE ÁCIDO FOSFÓRICO QUE DOMINAM O MUNDO VIVO. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, *[S. l.]*, v. 2, n. 3, p. 11, 2021. DOI: 10.51161/rems/1952.

SPECTOR, M. Basic principles of tissue engineering. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE, editors. Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics. **Chicago: Quintessence Pub. Co**, p.3-16, 1999.

STEIN R. S., SILVA J. B., DA SILVA V. D. - Estudo comparativo da neoformação óssea utilizando-se o enxerto autógeno e três substitutos: defeitos ósseos em ratos. **Rev Bras Ortop**. v. 44, n. 4, p. 330-5, 2009.

VASCONCELOS, F; GAMERO, E.J.P. **Avaliação das propriedades antimicrobianas de nanopartículas de prata em superfície de pvc e titânio**. 2016. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia em Saúde, Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, 2016.

WESTHEIMER, F. H. Pseudo-rotation in the hydrolysis of phosphate esters. **Accounts of Chemical Research**, v. 1, n. 3, p. 70-78, 1968.

YEX, Li. L.; LINZ, Yang; DUAN, Chen; XIAO, Chen Lu Y; ZHANG, Y.; Integrando 3D-impresso PHBV / sulfato de cálcio hemi-hidratada andaime e Quitosana Hidrogel para reforçada osteogénica imóvel, **Carbohydrate Polymers**, v. 202, p. 106-114, 2018.

Anexos

Patente utilizada na obtenção do éster fosfórico

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0800460-9 A2**

BRPI0800460A2

(22) Data de Depósito: 28/02/2008
(43) Data da Publicação: 28/06/2011
(RPI 2112)

(51) Int.Cl.:
C07F 9/38 2006.01
C07F 9/40 2006.01
A61K 31/685 2006.01
A61P 3/00 2006.01

(54) Título: **NOVA METODOLOGIA DE SÍNTESE DA FOSFOETANOLAMINA NA FORMA SÓLIDA COM CÁLCIO, MAGNÉSIO E ZINCO E NA FORMA DE SOLUÇÃO COM MONOETANOLAMINA**

(73) Titular(es): Antônio José Reimer, Gilberto Orivaldo Chierice, Marcos Vinicius de Almeida, Otaviano Mendonça Ribeiro Filho, Renato Meneguelo, Salvador Claro Neto, Sandra Vasconcellos Al-Asfour

(72) Inventor(es): Antônio José Reimer, Gilberto Orivaldo Chierice, Marcos Vinicius de Almeida, Otaviano Mendonça Ribeiro Filho, Renato Meneguelo, Salvador Claro Neto, Sandra Vasconcellos Al-Asfour

(57) Resumo: NOVA METODOLOGIA DE SÍNTESE DA FOSFOETANOLAMINA NA FORMA SÓLIDA COM CÁLCIO,MAGNÉSIO E ZINCO E NA FORMA DE SOLUÇÃO COM MONOETANOLAMINA. Que utiliza técnicas de espeetroscopia vibracional na região do Infravermelho e a análise elementar, e apresenta um rendimento final de 90%, sendo adicionado, ao cristal puro, carbonato de cálcio, magnésio e zinco, para neutralização completa da fosfoetanolamina na forma sólida, e onde a adição de monoetanolamina, para neutralização, pode ser uma estratégia para obtenção de um tampão que pode ser utilizado em disfunções celulares e metabólicas.

SENAI **Laboratório de Caracterização de Materiais - LCM**

RELATÓRIO DE ENSAIOS

DATA DE RECEBIMENTO	11/05/21	Nº PROPOSTA	457/21	NÚMERO DE RELATÓRIO	1415/21
AMOSTRA	2 AMINOETHYL DIHIDROGEN PHOSFATE				
EMPRESA	FABIANO VASCONCELOS				
ENDEREÇO	R.MANOEL RODRIGUES NEGREIRO, 81 - VILA ARMÊNIA. MOGI DAS CRUZES SP.				
DATA DE EMISSÃO	21/05/2021	CONDIÇÕES DE RECEBIMENTO	PÓ BRANCO		

ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (FT-IR – FOURIER TRANSFORM INFRARED)

1. METODOLOGIA

1.1 Descrição

A técnica de espectroscopia no infravermelho fornece evidências da presença de grupos químicos funcionais constituintes de uma amostra no espectro de infravermelho. O espectro obtido pode ser analisado e comparado com dados de referência de literatura e banco de dados de equipamentos, podendo assim, ser determinada a identidade ou composição química de uma amostra.

Uma porção da amostra foi colocada no acessório de refletância total atenuada (ATR) de reflexão simples, com cristal de diamante Smart Orbit™. A faixa de leitura foi de 4000 a 525 cm^{-1}, o número de varreduras de 50 e resolução de 4 cm^{-1}.

A norma utilizada foi a ASTM E-1252-98 – Standard Practice for General Techniques for Obtaining Infrared Spectra for Qualitative Analysis.

1.2 Equipamento

Espectrômetro de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) Thermo Nicolet, IS50.

2. RESULTADOS

De acordo com o espectro, banco de dados do equipamento e interpretação (Tabela 1 e Figura 1), conclui-se que a amostra revela picos característico para a mistura de sal orgânico a base de fósforo e nitrogênio.

Tabela 1 - Identificação dos possíveis grupamentos químicos

BANDA (cm^{-1})	ATRIBUIÇÕES	BANDA (cm^{-1})	ATRIBUIÇÕES
2782	ν_A N – H	1076	ν C – O
2688	ν_S N – H	1012	γ C – O, ν P = O
2636	ν O – H	932	ν NH, ν_A COP
1639	δ_A NH_3^+	902	ν_A P – O
1556	δ_S NH_3^+	762	δ CH_2
1150	ν_S C – O – C	---	---

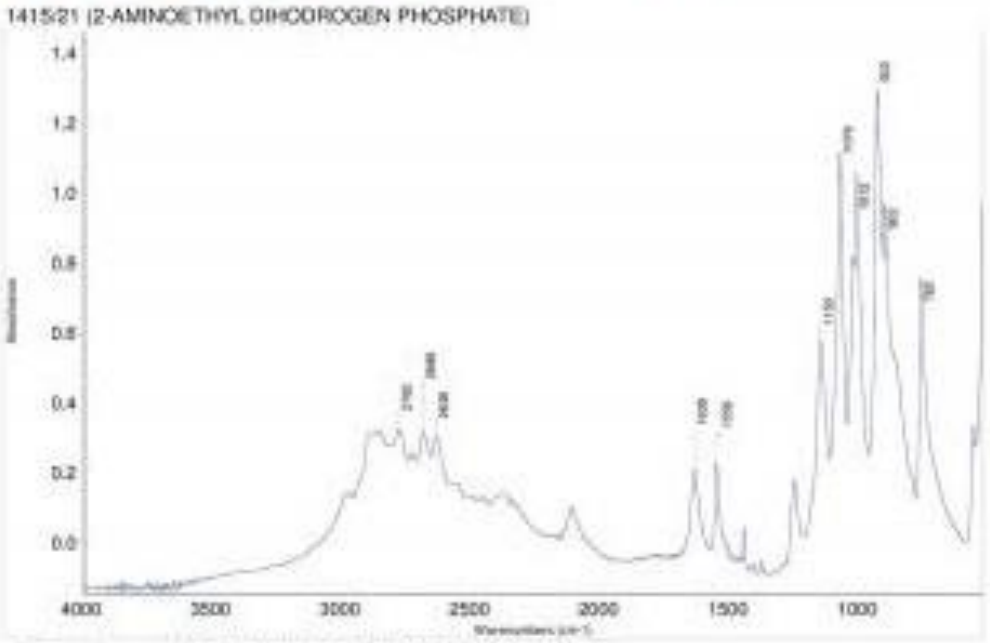
Abreviaturas: (ν) estiramento; (...$_A$) assimétrico; (γ) deformação assimétrica no plano tipo tesoura - "scissoring"; (ω) deformação assimétrica fora plano tipo manete/sacudida - "wagging"; (δ) deformação; (...$_S$) simétrico; (ρ) deformação simétrica no plano tipo balanço - "rocking"; (τ) deformação simétrica fora plano tipo torção - "twisting".

Rua Vitória Maria Médice Ramos, 330
Bairro Assunção - São Bernardo do Campo - SP - 09851-790
E-mail: ana.cleia@sp.senai.br e navarro.costa@sp.senai.br
Tel: (11) 4344-5000 – Ramal 5091
Site: marioamato.sp.senai.br

INSTITUTO SENAI DE INOVAÇÃO MATERIAIS AVANÇADOS

SENAI **Laboratório de Caracterização de Materiais - LCM**

Figura 1 – Espectro da amostra e comparação com banco de dados



Spectrum: 1415/21 (2-AMINOETHYL DIHODROGEN PHOSPHATE)
Region: 3466.26-525.03
Search type: Correlation
Hit List:

Index	Match	Compound name	Library
2192	45.65	Halox BW-191	Coatings Technology
81	44.88	PHENYLPHOSPHONIC ACID, 98%	Aldrich Condensed Phase Sample Library
9804	44.68	Phenylphosphonic acid, 98%	Aldrich Condensed Phase
2191	44.52	Halox BW-111	Coatings Technology
148	43.69	CUPSAC Accelerator	Rubber Compounding Materials
1125	42.29	3 Bromoethanol, 95%	Aldrich Condensed Phase
2196	42.26	Halox CW-291	Coatings Technology
9327	41.78	Furfuryl mercaptan, 98%	Aldrich Condensed Phase
2194	41.75	Halox CW-111	Coatings Technology
2191	41.70	Halox BW-111	HR Coatings Technology

CLÁUSULAS DE RESPONSABILIDADE

- Os resultados obtidos referem-se exclusivamente ao material submetido ao ensaio.
- A identificação do material analisado é responsabilidade do solicitante.
- O laboratório se responsabiliza em arquivar a contraprova do material ensaiado com o período de 30 dias após a emissão do ensaio.
- Não se admite qualquer responsabilidade referente à execução da amostragem, a menos que esta tenha sido efetuada mediante coleta própria supervisada. Salvo menção expressa, as amostras lhe entregues pelo solicitante.
- O laboratório de Caracterização de Materiais não se torna responsável pela divulgação ou uso que o solicitante, outras pessoas ou entidades venham a fazer dos resultados do presente relatório.
- O Laboratório de Caracterização de Materiais não se torna responsável em nenhum caso de interpretação ou uso indevido que se possa fazer deste documento.
- Este relatório só deve ser reproduzido por inteiro. Reprodução de partes requer aprovação por escrito do laboratório.

Obs.: Não há.

São Bernardo do Campo, 21 de maio de 2021.

Nayara Lima da Costa
Especialista em Tecnologia

Ana Clélia Babetto Ferreira
Especialista em Tecnologia

Rua Vitória Maria Médice Ramos, 330
Bairro Assunção - São Bernardo do Campo - SP - 09861-790
E-mail: ana.clelia@sp.senai.br e nayara.costa@sp.senai.br
Tel: (11) 4344-5000 – Ramal 5091
Site: mariocamato.sp.senai.br

INSTITUTO SENAI DE INOVAÇÃO