

# Biocomponentes à base de hidroxiapatita: Influência da esterilização na resistência mecânica

## *Biocomponents Based on Hydroxyapatite: Influence of Sterilization on the Mechanical Resistance*

Ivânio Tagliari<sup>1</sup>  Alan Menegaz Lerner<sup>2</sup>  Antônio Lourenço Severo<sup>3</sup>  Charles Leonardo Israel<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Departamento do Ensino e Pesquisa do Hospital São Vicente de Paulo (HSVP) e Instituto de Ortopedia e Traumatologia (IOT). Passo Fundo, RS, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Engenharia, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Coordenação do Programa de Residência Médica em Cirurgia da Mão e Microcirurgia da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), HSVP e IOT, Passo Fundo, RS, Brasil

**Endereço para correspondência** Ivânio Tagliari, Hospital São Vicente de Paulo (HSVP) e Universidade de Passo Fundo (UPF), RS, Brasil (e-mail: ivanio.tagliari@gmail.com).

Rev Bras Ortop 2022;57(6):1051–1059.

### Resumo

**Objetivo** O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da esterilização na resistência mecânica à compressão e flexão de biocomponentes à base de hidroxiapatita obtida a partir de osso bovino liofilizado e sua associação com quitosana.

**Métodos** O osso bovino liofilizado foi processado em partículas de 100 µm e misturado à quitosana em proporção de 50% de seu peso. A mistura foi acondicionada em moldes metálicos para preparo dos espécimes e esterilizada a 127°C em autoclave para posterior experimentação. Os espécimes foram submetidos a ensaios de compressão e flexão seguindo a norma 5833 da International Organization for Standardization (ISO); os espécimes eram blocos cilíndricos de 6 × 12 mm (para ensaios de compressão) e placas de 75 × 10 × 3,3 mm (para ensaios de flexão). As amostras foram divididas em quatro grupos de 20 espécimes cada, sendo 10 para ensaios de compressão e 10 para ensaios de flexão. Três grupos foram esterilizados (por autoclavagem, raios gama e óxido de etileno), enquanto o quarto grupo (controle) não foi. Os testes mecânicos obtidos nos diferentes processos de esterilização foram comparados por análise de variância (ANOVA,  $p < 0,05$ ) seguido pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey, com intervalo de confiança de 95%.

**Resultados** Os espécimes apresentaram resistências médias à compressão de 10,25 MPa para o grupo de controle e 3,67 MPa, 9,65 MPa e 9,16 MPa após esterilização com

### Palavras-chave

- ▶ materiais biocompatíveis
- ▶ quitosana
- ▶ transplante ósseo
- ▶ hidroxiapatita
- ▶ testes mecânicos

Trabalho desenvolvido no Hospital São Vicente de Paulo (HSVP) e Universidade de Passo Fundo (UPF), RS, Brasil.

### recebido

01 de Julho de 2021

### aceito

20 de Janeiro de 2022

### Publicado on-line

Julho 22, 2022

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0042-1744292>

10.1055/s-0042-1744292.

ISSN 0102-3616.

© 2022. Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. All rights reserved.

This is an open access article published by Thieme under the terms of the Creative Commons Attribution-NonDerivative-NonCommercial-License, permitting copying and reproduction so long as the original work is given appropriate credit. Contents may not be used for commercial purposes, or adapted, remixed, transformed or built upon. (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Thieme Revinter Publicações Ltda., Rua do Matoso 170, Rio de Janeiro, RJ, CEP 20270-135, Brazil

óxido de etileno, raios gama e autoclavagem, respectivamente. Os resultados do teste de flexão mostraram uma resistência média de 0,40 MPa no grupo de controle, e 0,15 MPa, 0,17 MPa e 0,30 MPa após esterilização com óxido de etileno, raios gama e autoclavagem, respectivamente. A compressão máxima observada no grupo esterilizado com óxido de etileno foi estatisticamente diferente à obtida no grupo de controle ( $p=0,0002$ ), esterilizado com raios gama ( $p=0,0003$ ) e autoclavado ( $p=0,0006$ ). A flexão máxima dos espécimes esterilizados com raios gama foi estatisticamente diferente à observada no grupo de controle ( $p=0,0245$ ). No entanto, a resistência à flexão foi baixa em todos os espécimes.

**Conclusão** A esterilização em autoclave não foi associada a diferenças estatisticamente significativas nos testes de compressão ou flexão. Assim, a autoclave foi a melhor opção de esterilização para os biocomponentes à base de hidroxiapatita neste estudo.

## Abstract

**Objective** This study aimed to evaluate the influence of sterilization on the compressive and flexural mechanical strength of hydroxyapatite-based biocomponents obtained through freeze-dried bovine bone, and its association with chitosan.

**Methods** Freeze-dried bovine bone was processed into 100  $\mu\text{m}$  particles and mixed with 50% of its weight in chitosan. The mixture was packed in metallic molds for preparing the specimens, and sterilized at 127°C using an autoclave for subsequent experimentation. The specimens were subjected to compression and flexion tests following norm 5833 of the International Organization for Standardization (ISO), with 6  $\times$  12 mm cylindrical blocks (for compression tests) and 75  $\times$  10  $\times$  3.3 mm plates (for flexion tests) as samples. The samples were divided into four groups of 20 specimens each, with 10 for compression and 10 for flexion tests. Three groups were sterilized (autoclave, gamma rays, and ethylene oxide), whereas the fourth group (control) was not. The mechanical tests obtained from the different sterilization processes were compared using analysis of variance (ANOVA,  $p < 0.05$ ), followed by the Tukey multiple comparison test of means, with a 95% confidence interval.

**Results** The specimens presented mean compressive strengths of 10.25 MPa for the control group and 3.67 MPa, 9.65 MPa, and 9.16 MPa after ethylene oxide, gamma ray, and autoclave sterilization, respectively. Flexion test results showed an average resistance of 0.40 MPa in the control group and 0.15 MPa, 0.17 MPa, and 0.30 MPa after ethylene oxide, gamma ray, and autoclave sterilization, respectively. There were statistically significant differences observed in the maximum compression of the ethylene oxide-sterilized group compared with that of the control group ( $p=0.0002$ ), gamma ray-sterilized ( $p=0.0003$ ) and the autoclaved ( $p=0.0006$ ) groups. There was a statistically significant difference in maximum flexion of the specimens sterilized by gamma rays when compared with the control group ( $p=0.0245$ ). However, low flexural strengths were observed in all specimens.

**Conclusion** The autoclave sterilization group did not result in statistically significant differences in either compression or flexion strength tests. Thus, the autoclave proved to be the best sterilization option for the hydroxyapatite-based biocomponents in this study.

## Keywords

- biocompatible materials
- chitosan
- bone transplantation
- hydroxyapatite
- mechanical tests

## Introdução

Os avanços na área da saúde, aliados à engenharia e outros ramos da ciência, motivados principalmente pelo aumento da expectativa e qualidade de vida, possibilitaram o desenvolvimento de técnicas que buscam restabelecer as funções totais ou parciais de órgãos ou tecidos de indivíduos que

sofreram algum tipo de mutilação ou foram acometidas por alguma doença.<sup>1</sup>

O envelhecimento faz com que as articulações e os ossos se tornem frágeis, causando dor e restringindo certos movimentos. Assim, implantes ortopédicos, odontológicos e veterinários têm sido aplicados com maior frequência e muitos estudos são realizados para obtenção de equipamentos e, neste caso,

materiais de implante como ossos que atendam às novas necessidades médicas.<sup>2</sup>

Os biomateriais são mais relevantes em dispositivos implantados de forma temporária ou permanente no corpo humano. Estes biomateriais melhoram o processo de reparação óssea nas áreas odontológica, ortopédica e veterinária, principalmente em fraturas e afecções ósseas, como pequeno defeito ósseo em casos de alongamento ou encurtamento de membros, osteotomias corretivas de adição ou subtração, próteses dentárias e ortopédicas, defeitos ósseos tumorais e pseudoartrose.

Esses materiais diferem dos demais por apresentarem uma combinação de propriedades mecânicas, químicas, físicas e biológicas que viabilizam sua utilização no corpo humano.<sup>2</sup> Dentre os diversos materiais constantemente testados e avaliados em laboratório, estão a hidroxiapatita – com comprovada função osteocondutora – e a quitosana, um biopolímero que pode estimular a liberação de citocinas celulares indutoras. A combinação desses biomateriais consolida suas vantagens em um único composto que acelera o processo de regeneração óssea, em especial nos casos de fraturas com união óssea de má qualidade ou tardia.<sup>3</sup>

A hidroxiapatita é uma das cerâmicas mais biocompatíveis devido à sua constituição mineral similar à de ossos e dentes humanos.<sup>4</sup> Tem diversas vantagens, como composição uniforme, alta biocompatibilidade, segurança – não sendo tóxica, alergênica ou cancerígena – e microestrutura completamente controlável (tamanho dos poros).<sup>5</sup> Por isso, tem sido analisada como possível material substituto em implantes ósseos e dentários.<sup>6</sup> Alguns estudos utilizaram a hidroxiapatita com diferentes proporções de cálcio e fósforo para verificar sua função na regeneração óssea com base em sua propriedade osteocondutora.<sup>7,8</sup>

Kong et al.<sup>9</sup> realizaram um estudo *in vitro* para investigação da bioatividade da quitosana/hidroxiapatita e observaram que o composto apresentou melhor bioatividade do que a quitosana sozinha. A quitosana é obtida a partir da quitina, um polissacarídeo encontrado em abundância na natureza, principalmente em crustáceos, insetos e fungos. A quitosana é derivada da quitina por um processo de desacetilação química ou enzimática.<sup>10</sup> As propriedades antimicrobianas e antioxidantes da quitosana levaram a inúmeras aplicações em diferentes campos, inclusive indústria alimentícia, produtos

cosméticos e de cuidados pessoais, tratamento de efluentes, produtos farmacológicos e materiais implantáveis.<sup>11,12</sup>

Neste estudo foi determinado que não é possível utilizar esses biomateriais, a hidroxiapatita e a quitosana, no corpo humano sem passar pelo processo de esterilização, que fragiliza a estrutura mecânica e altera a resistência desses componentes. Por isso, este estudo visa determinar o melhor método de esterilização que permita a utilização desses materiais sem alteração de suas características e perda de resistência. Portanto, são levantadas hipóteses sobre o melhor método de esterilização. Os métodos de esterilização podem ser divididos em físicos (calor, filtração e radiação) e químicos (compostos fenólicos, clorexidina, halógenos, álcoois, peróxidos, óxido de etileno, formaldeído, glutaraldeído e ácido peracético).

Este estudo, portanto, tem como objetivo analisar o efeito da esterilização na resistência mecânica do osso bovino liofilizado (hidroxiapatita) que foi processado e misturado à quitosana em proporção de 50% em peso. Os espécimes dos diferentes grupos foram submetidos a ensaios de compressão e flexão de acordo com a norma 5833 da International Organization for Standardization (ISO).

## Materiais e Métodos

Para este estudo, 10 fêmures bovinos foram obtidos de animais entre 2 e 3 anos de idade provenientes de frigoríficos da Região Sul do Brasil. Um fluxograma dos processos químico e mecânico do estudo foi elaborado para facilitar a execução (► Fig. 1).

A princípio, a porção muscular dos ossos foi removida e, em seguida, limpa e desengordurada com peróxido de hidrogênio e solução salina. As lâminas ósseas foram preparadas com serra de fita, submetidas ao ultracongelamento ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) e liofilizadas em equipamento Terroni LS3000 (Terroni Elec., São Carlos, SP, Brasil) (► Fig. 2). A liofilização foi realizada por um período de 5 dias para remoção de toda a umidade do osso por sublimação. Depois da liofilização, os ossos foram cortados em blocos, triturados e moídos em equipamento SPLabor (SPLabor. Presidente Prudente, SP, Brazil) modelo 16 com rotação média de 50 RPM utilizando 30 esferas de 8 mm de diâmetro e 80 esferas de 15 mm de diâmetro (► Fig. 3). A moagem foi realizada por 6 a 12 horas até atingir a

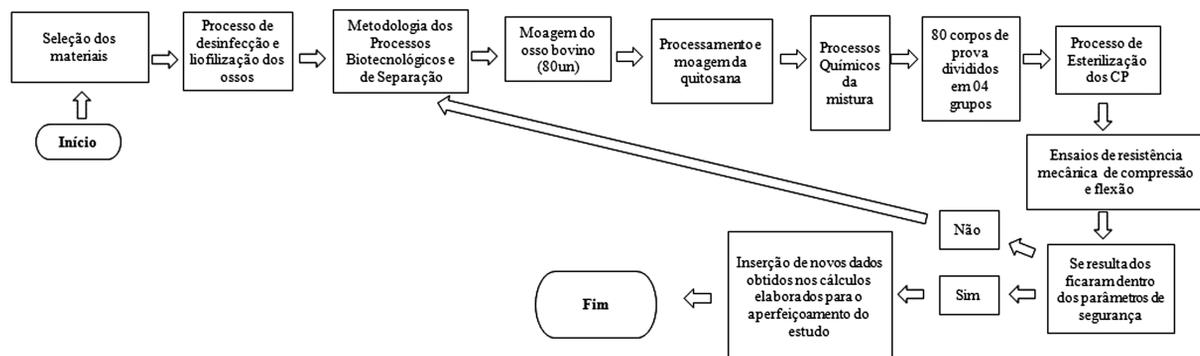
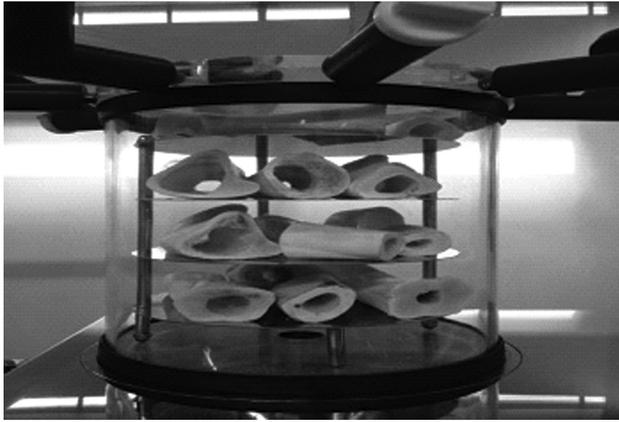


Fig. 1 Fluxograma dos processos químicos e mecânicos do estudo experimental.



**Fig. 2** Liofilizador Terroni modelo LS 3000.



**Fig. 3** Moinho periquito SPLabor modelo 16.

granulometria máxima de 100  $\mu\text{m}$  segundo o equipamento Mastersizer 3000 (Malvern Panalytical, Malvern, Reino Unido) (→ **Fig. 4**).

Para a mistura, os materiais foram primeiramente pesados em uma balança analítica Shimadzu, modelo AY220. A quitosana foi adicionada ao osso bovino liofilizado em proporção de 50% em peso em um misturador industrial Marconi (Marconi Ltda, Piracicaba, SP, Brasil) por um período de 3 minutos. Para fazer a liga, 3,5 mL de água destilada foram adicionados a cada 10 g de pó. Após a homogeneização, o composto foi inserido em moldes metálicos para confecção dos espécimes. A fabricação e padronização dos moldes obedeceu à norma ISO 5833. Os moldes foram preenchidos com a mistura óssea depois da aplicação do desmoldante WD-40 (Theron Marketing Ltda, Curitiba, PA, Brasil) nos orifícios para facilitar a posterior remoção dos componentes. Moldes metálicos com dimensões de 6  $\times$  12 mm (teste de compressão) e 75  $\times$  10  $\times$  3,3 mm (teste de flexão) foram utilizados (→ **Fig. 5A** e **5B**). Placas de aço 316L foram usadas nas extremidades inferior e superior dos moldes para facilitar a extração da amostra. Um paquímetro foi usado para assegurar a padronização dos espécimes.

Os moldes ficaram imóveis por 7 dias e a remoção foi auxiliada por uma ferramenta extrusora formada pelo cabo de um espelho bucal odontológico (tamanho n° 5). Em



**Fig. 4** Mastersizer 3000.

seguida, as amostras foram armazenadas ao abrigo da umidade e da luz, em temperatura média de 23°C, para evitar interferência até a aplicação das cargas mecânicas.

Após o processo de calibração, os espécimes foram esterilizados em quatro grupos de 20 unidades cada por meio de autoclave no primeiro grupo, raios gama no segundo e óxido de etileno no terceiro grupo.

Os resultados dos testes mecânicos obtidos após os diferentes processos de esterilização foram comparados por meio da análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey, com intervalo de confiança de 95%. A análise estatística foi realizada com o software Statistica (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA) versão 7.0. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

#### Autoclave

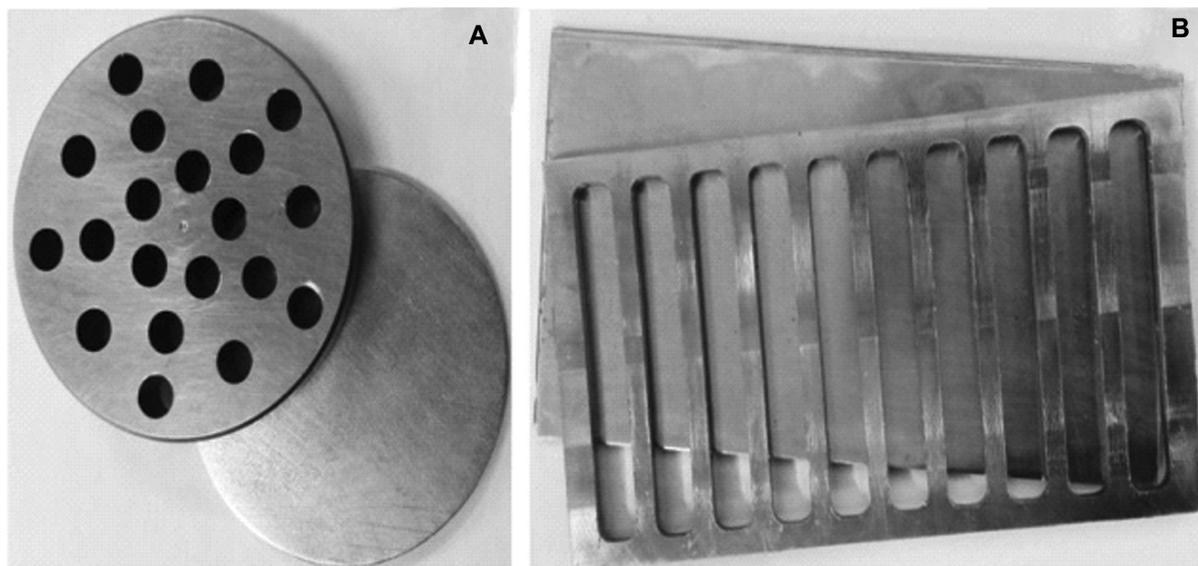
A esterilização em autoclave foi realizada no Centro de Esterilização do Hospital São Vicente de Paulo, em Passo Fundo, RS, Brasil. O material foi esterilizado à temperatura de ebulição da água, de 121°C, por 15 minutos.

Uma autoclave Industrial STERIS de 300 L, modelo SV 3043, (Future Health Concepts Inc. Sanford, FL, EUA) foi utilizada seguindo todos os protocolos exigidos pelas Normas Brasileiras de Vigilância Sanitária.

#### Raios Gama

Os espécimes foram enviados à Companhia Brasileira de Esterilização (EMBRARAD, Cotia, SP, Brasil) para aplicação de raios gama utilizando um Acelerador Linear de Cobalto 60 (Nordion Inc. Ottawa, ON, Canada), modelos JS 7500 e JS 9600.

Todos os controles e a documentação do processo foram realizados como previsto na norma ISO 9001. O processo foi realizado em três tempos de ciclo de 2'18" com o modelo JS 9600 e dois tempos de ciclo de 7'45" com o modelo JS 7500.



**Fig. 5** (A) Matriz de compressão. (B) Matriz de flexão.

### Óxido de Etileno

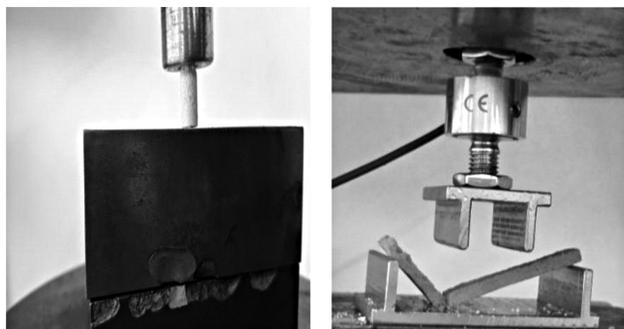
O método de esterilização com gás de óxido de etileno foi realizado em autoclave Baumer (Baumer, São Paulo, SP, Brazil) com capacidade de 700 L por 3 a 4 horas de exposição.

O gás de óxido de etileno é injetado na câmara assim que atinge os níveis de pressão e temperatura ajustados ao tempo de exposição. Após a exposição ao óxido de etileno, o material passa por uma fase de processamento a vácuo com sequência de injeção de nitrogênio para remoção completa do gás e redução do risco de intoxicação

### Testes Mecânicos

Os testes foram realizados em equipamento SCHENK (Hangzhou Jizhi Mechatronic Ltd. Hangzhou, China) do Laboratório de Engenharia Mecânica da Universidade de Passo Fundo, na Região Sul do Brasil.

Das 80 amostras, 40 unidades foram submetidas ao teste de flexão e 40 ao teste de compressão. As amostras foram divididas em 60 unidades que passaram pelos processos de esterilização, sendo 20 por autoclavagem, 20 com raios gama e 20 com óxido de etileno, enquanto as outras 20 amostras controles não foram esterilizadas. Os testes foram realizados de acordo com ISO 5833 (► **Fig. 6A**).



**Fig. 6** (A) Teste de compressão. (B) Teste de flexão.

### Teste de Compressão

De acordo com ISO 5833, as amostras para ensaio de compressão devem ser feitas em matrizes cilíndricas com 6 mm de diâmetro e 12 mm de comprimento. Neste estudo, a velocidade de aplicação da força compressiva foi constante, entre 19,8 e 25,6 mm/min.

### Teste de Flexão

O ensaio de flexão segue a norma ISO 5833, que propõe uma resistência mínima à flexão de 1.800 MPa e módulo de flexão superior a partir de 50 MPa. A norma também sugere o registro dos valores de flexão em carga igual a 15 N (inicial) e 50 N (► **Fig. 6B**), além da força de ruptura do espécime.

### Resultados

Todos os testes de compressão e flexão utilizaram cargas supra-fisiológicas para fratura dos espécimes.

Nos testes de compressão, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de controle e esterilizado por raios gama ( $p = 0,9634$ ), controle e esterilizado por autoclave ( $p = 0,8170$ ) e esterilizado por raios gama e autoclave ( $p = 0,9784$ ). No entanto, houve diferenças estatisticamente significativas na compressão máxima do grupo esterilizado com óxido de etileno em comparação ao grupo de controle ( $p = 0,0002$ ), esterilizado por raios gama ( $p = 0,0003$ ) e autoclave ( $p = 0,0006$ ). Esses resultados indicam que há perda de resistência à compressão quando as amostras de biomateriais são esterilizadas com óxido de etileno. Assim, o óxido de etileno não é uma boa alternativa para a esterilização do composto estudado.

Considerando a resistência à flexão, não houve diferença estatisticamente significativa entre os espécimes dos grupos de controle e esterilizados com óxido de etileno ( $p = 0,0764$ ), controle e esterilizados em autoclave ( $p = 0,5816$ ), esterilizados com óxido de etileno e autoclave ( $p = 0,4182$ ), esterilizados com óxido de etileno e raios gama ( $p = 0,9954$ ) e dos grupos

**Tabela 1** Valores médios de resistência de espécimes esterilizados por diferentes processos

Processo de esterilização	Compressão máxima (MPa) – Valor médio ( $\pm$ DP)	Flexão máxima (MPa) – Valor médio ( $\pm$ DP)
Controle	10,25 ( $\pm$ 3,14) <sup>a</sup>	0,40 ( $\pm$ 0,24) <sup>a</sup>
Óxido de etileno	3,67 ( $\pm$ 0,88) <sup>b</sup>	0,15 ( $\pm$ 0,06) <sup>a, b</sup>
Raios gama	9,65 ( $\pm$ 3,58) <sup>a</sup>	0,17 ( $\pm$ 0,07) <sup>b</sup>
Autoclave	9,16 ( $\pm$ 2,67) <sup>a</sup>	0,30 ( $\pm$ 0,17) <sup>a, b</sup>

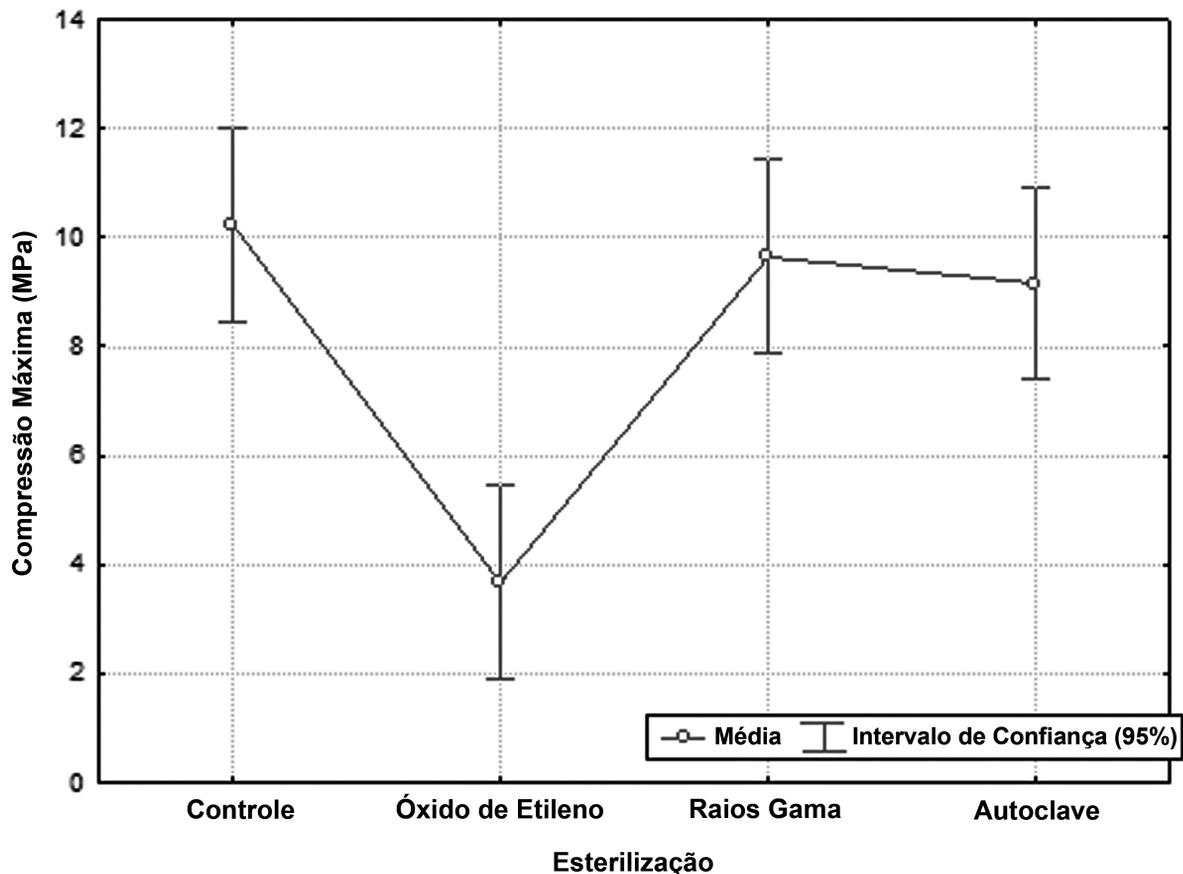
Síglas: DP, desvio padrão. Notas: <sup>a, b</sup> Letras iguais na mesma coluna indicam valores pertencentes a um mesmo grupo homogêneo, sem diferença estatisticamente significativa entre seus componentes segundo o teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%.

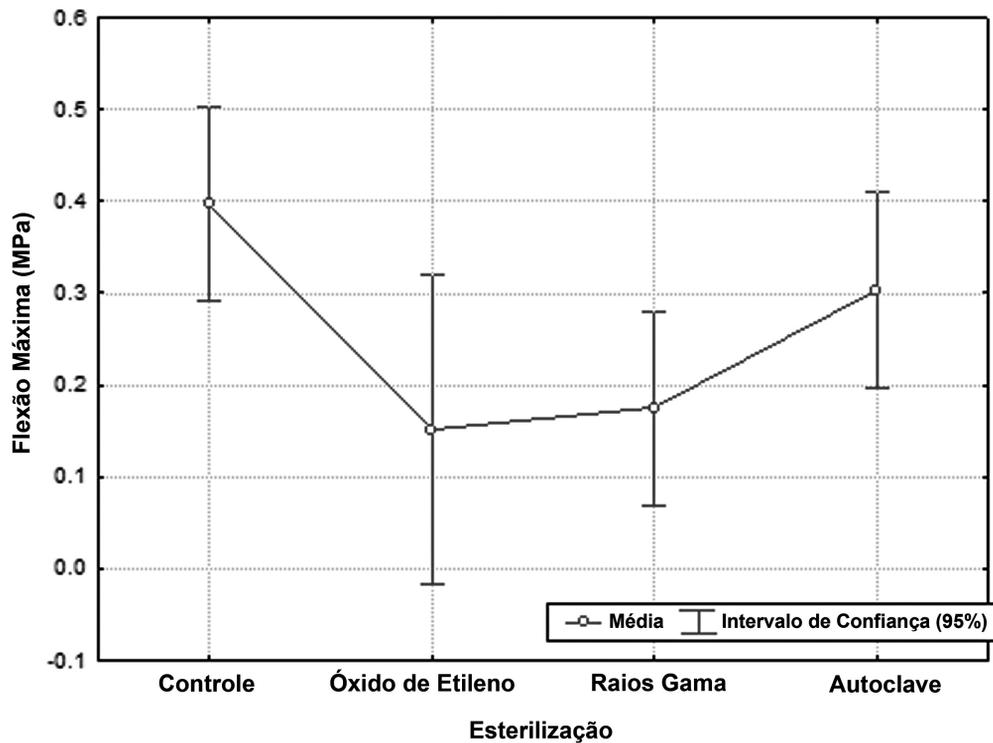
esterilizados com raios gama e autoclave ( $p = 0,3230$ ). No entanto, houve diferença estatisticamente significativa na flexão máxima dos espécimes esterilizados por raios gama em comparação ao grupo de controle ( $p = 0,0245$ ). Portanto, houve perda significativa de resistência à flexão quando comparando os espécimes que foram esterilizados com raios gama e aqueles do grupo de controle.

Embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas no grupo de controle quanto à resistência à flexão, o óxido de etileno causou uma importante perda de resistência do material. No entanto, baixas resistências à flexão foram observadas em todos os espécimes. Além disso, o grupo esterilizado em autoclave não apresentou diferenças estatisticamente significativas nos testes de compressão ou flexão. (►Tabela 1, ►Figs. 7 e 8).

## Discussão

Somfai et al.<sup>13</sup> (2010) mencionaram que é interessante utilizar um composto de hidroxiapatita e quitosana, combinando a característica osteocondutora da primeira com a biodegradabilidade e resistência mecânica da segunda. Esses autores relataram que não foi observada degradação completa dos biomateriais após 60 dias, neste caso, em cães. No entanto, Danilchenko et al.<sup>14</sup> (2009) relataram que o mesmo composto, implantado na tibia de ratos, apresentou boas propriedades osteocondutoras e que sua biodegradação foi praticamente completa, sugerindo que a substituição total do implante de hidroxiapatita/quitosana pelo tecido ósseo recém-formado dentro da falha óssea ocorre até o 24° dia após o implante. Esta diferença é provavelmente decorrente

**Fig. 7** Tensão média à compressão nos diferentes grupos.



**Fig. 8** Tensão média à flexão nos diferentes grupos.

da diferença entre as espécies (a taxa metabólica de ratos é maior do que de cães). Fontes<sup>15</sup> (2009) em um estudo com hidroxiapatita para avaliação da regeneração óssea alveolar em cães, verificou que o biomaterial ainda estava presente aos 60 dias. O autor concluiu que mais estudos são necessários para análise do tempo de biodegradação deste composto.

Segundo Rolim et al.<sup>16</sup> (2018), a resposta biológica é mais favorável quando a quitosana é associada a outros biomateriais. Portanto, é importante continuar as pesquisas científicas com o uso desses biopolímeros naturais, para entender melhor seu papel no comportamento celular e aprimorar metodologias de fabricação que possam ampliar seu uso clínico na regeneração óssea. Com as investigações científicas em curso em todas as áreas relevantes do conhecimento e em biomateriais, espera-se que muitas alterações ósseas – como perda óssea por traumatismo, ressecção óssea por tumores, envelhecimento ósseo e alterações esqueléticas, metabólicas ou genéticas – sejam tratadas por novos protocolos de regeneração óssea.

Como relata Rosito<sup>17</sup> (2006), o processo de liofilização pode causar danos às propriedades do osso, em especial a resistência. No entanto, outros estudos com enxertos ósseos humanos e bovinos liofilizados e congelados na reconstrução do acetábulo de pacientes encontraram similaridades nas propriedades de resistência desses enxertos. Os testes de compressão podem avaliar a resistência do osso liofilizado e observar a ausência de alteração das propriedades mecânicas.<sup>17</sup> Outro estudo sobre ossos liofilizados mostrou um enfraquecimento dos enxertos após os testes.<sup>18</sup> A resistência ao torque também foi aplicada a ossos liofilizados, mostrando uma perda alarmante de 88% da resistência original.<sup>19</sup>

Por outro lado, houve relatos de que menor umidade aumenta a resistência mecânica do osso.<sup>20</sup> Além disso, o osso humano liofilizado apresenta maior resistência mecânica à compressão do que o osso fresco.

Embora o aspecto biológico não seja o foco deste estudo, nota-se que Galia<sup>21</sup>(2004) e Kakiuchi et al.<sup>22</sup> (1996) analisaram biópsias realizadas em revisões de próteses de quadril e joelho e observaram sinais de integração do enxerto de hidroxiapatita, caracterizada pela presença de trabéculas ósseas necróticas envoltas por tecido ósseo recém-formado, medula hematopoiética e células adiposas.

Mendes<sup>23</sup> (2006) usou moldes metálicos contendo 48 orifícios cilíndricos com dimensões de 6 × 12 mm para preparar espécimes de cimento ósseo. O autor utilizou uma prensa de teste mecânica universal que foi fixada a uma célula de carga de 49.050 N (5.000 kgf) a uma velocidade de 20 mm/min. Este estudo foi feito com cinco amostras de cinco marcas de cimento ósseo encontradas no mercado. Os testes foram realizados como descrito em ISO 5833. Os testes terminaram quando o cilindro quebrou ou o limite de escoamento foi ultrapassado. Mendes<sup>23</sup> (2006) demonstrou que todas as marcas analisadas estavam de acordo com a norma, pois apresentavam resistência à compressão superior a 80 MPa, enquanto o valor mínimo exigido é de 70 MPa.

Diversos espécimes são analisados nos estudos de liofilização e não há padronização. Em amostras cúbicas, o comprimento varia entre 88 e 100 mm, com largura de 8 a 30 mm e espessuras de 2 a 15 mm.<sup>2,5,21,24</sup> As amostras cilíndricas variam menos e têm entre 10 e 8 mm.<sup>25,26</sup> Com base nesses estudos, escolhemos diferentes tamanhos de amostra para orientar o real significado, já que essa característica pode

influenciar o resultado do procedimento. Por fim, essas amostras foram descartadas devido à ausência de diferença significativa nos testes de compressão e flexão.

Para gerar uma amostra completamente seca sem perda de tempo, estudamos a mudança da massa a cada 24 horas do processo e concluímos que o período de 120 horas era satisfatório. Como etapa final antes do uso dos enxertos, a esterilização é necessária para inibir qualquer tipo de antigenicidade que possa prejudicar os pacientes.<sup>27</sup> Uma das primeiras técnicas de esterilização utilizou óxido de etileno como substrato. No entanto, com o tempo, essa técnica deixou de ser empregada por conta de seus efeitos tóxicos.<sup>28</sup> Doses de radiação gama iguais a 25 kGy têm se mostrado promissoras para esterilização de bactérias ósseas, sem prejuízo à resistência;<sup>2,18,27,29</sup> no entanto, há relatos de casos nos quais a persistência de príons (partículas de proteínas infecciosas) e do vírus da imunodeficiência humana (HIV) só podiam ser eliminados com doses maiores de radiação.<sup>27</sup> A perda de resistência mecânica é observada com doses mais altas de radiação gama.<sup>30,31</sup> O processo de autoclave, que prevê a aplicação de temperatura superior a 120°C para exterminar riscos de infecção ao receptor, pode ser utilizado como opção de esterilização.<sup>2,14,21,26,27</sup> Em contrapartida, esse processo reduz significativamente a resistência mecânica do enxerto ósseo.<sup>14</sup> Ainda não há consenso sobre o melhor método para esterilização de ossos liofilizados.<sup>25</sup>

Além disso, o processo de esterilização por óxido de etileno é normalmente realizado com temperatura na faixa de 40°C a 60°C, umidade relativa com ponto ótimo entre 40% e 80% e concentração de gás acima de 400 mg/L (ponto ótimo de eficiência), em ciclos com duração média de 3 a mais de 10 horas.<sup>30</sup> Este método foi utilizado devido à baixa temperatura no processo de esterilização, em que não há deformação dos insumos.

Em comparação a estudos anteriores, foi possível verificar que não houve diferença estatisticamente significativa na resistência à flexão entre os espécimes dos grupos de controle e esterilizados com óxido de etileno ( $p=0,0764$ ), controle e esterilizados em autoclave ( $p=0,5816$ ), esterilizados com óxido de etileno e autoclavagem ( $p=0,4182$ ), esterilizados com óxido de etileno e raios gama ( $p=0,9954$ ) e grupos esterilizados com raios gama e autoclavagem ( $p=0,3230$ ). No entanto, houve diferença estatisticamente significativa na flexão máxima dos espécimes esterilizados por raios gama quando comparados ao grupo de controle ( $p=0,0245$ ). Embora não tenha havido diferença significativa em relação ao grupo de controle, o óxido de etileno causou perda de resistência do material. Portanto, a autoclavagem parece ser a melhor opção para esterilização do biomaterial em análise, pois não provocou perdas significativas de resistência tanto à compressão quanto à flexão.

## Conclusão

O presente estudo avaliou a influência dos processos de esterilização (autoclave, óxido de etileno e raios gama) em biocomponentes contendo hidroxiapatita e quitosana na

proporção de 50% em peso. Os diferentes processos de esterilização avaliados podem causar diferentes perdas de resistência em relação ao biomaterial não esterilizado. O processo de esterilização em autoclave não causou perda significativa de resistência à compressão e flexão, mostrando-se uma boa opção para a esterilização dos biocomponentes à base de hidroxiapatita aqui estudados.

### Suporte Financeiro

Não houve suporte financeiro de fontes públicas, comerciais ou sem fins lucrativos.

### Conflito de Interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

## Referências

- Galia CR, Macedo CA, Rosito R, Mello TM, Camargo LM, Moreira LF. In vitro and in vivo evaluation of lyophilized bovine bone biocompatibility. *Clinics (São Paulo)* 2008;63(06):801–806
- Owusu-Dompreh F. Aplicação de tecnologias de manufatura rápida ao desenvolvimento integrado de produtos em clínicas e indústrias de manufatura médica [dissertação]. Ohio: Youngstown State University; 2013. Disponível em: [http://rave.ohiolink.edu/etdc/view?acc\\_num=ysu1389697786](http://rave.ohiolink.edu/etdc/view?acc_num=ysu1389697786)
- Teixeira ER. Superfícies dos implantes: o estágio atual. In: Dinato JC, Polido WD. *Implantes osseointegrados: cirurgia e prótese*. São Paulo: Artes Médicas; 2001:63–80
- Fook ACB, Aparecida AH, Fook MVL. Desenvolvimento de biocerâmicas porosas de hidroxiapatita para utilização como scaffolds para regeneração óssea. *Rev Matéria* 2010;15(03):392–399
- Ono I, Tateshita T, Nakajima T. Evaluation of a high density polyethylene fixing system for hydroxyapatite ceramic implants. *Biomaterials* 2000;21(02):143–151
- Pretorius JA, Melsen B, Nel JC, Germishuys PJ. A histomorphometric evaluation of factors influencing the healing of bony defects surrounding implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20(03):387–398
- Vital CC, Borges APB, Fonseca CC, et al. Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2006;58(02):175–183
- Rezende CMF, Borges APB, Bernis WO, Melo EG, Nobrega Neto PI. Aspectos clínicos cirúrgicos e radiográficos da hidroxiapatita sintética na diáfise proximal da tíbia de cães. *Arq Bras Med Vet Zootec* 1998;50(05):537–545
- Kong L, Yuan G, Lu G, Gong Y, Zhao N, Zhang X. A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Eur Polym J* 2006;42(12):3171–3179
- Costa Silva HSR, Santos KSCR, Ferreira EI. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Quim Nova* 2006;29(04):776–785
- Enescu D, Olteanu CE. Chitosan funcionalizado e a sua utilização na investigação farmacêutica, biomédica e biotecnológica. *Chem Eng Commun* 2008;195(10):1269–1291
- Cheung C. The future of bone healing. *Clin Podiatr Med Surg* 2005;22(04):631–641
- Somfai T, Noguchi J, Kaneko H, et al. Production of good-quality porcine blastocysts by in vitro fertilization of follicular oocytes vitrified at the germinal vesicle stage. *Theriogenology* 2010;73(02):147–156
- Danilchenko SN, Maksym PV, Kalinkevich OV, Kalinkevich AN. Chitosan-hydroxyapatite composite biomaterials made by a one step co-precipitation method: preparation, characterization and in vivo tests. *J Biol Phys Chem* 2009;9(03):119–126

- 15 Fontes EB. Hidroxiapatita sintética associada ou não à fração total de células mononucleares na regeneração de osso alveolar de cães [dissertação]. Santa Maria, RS: Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria; 2009
- 16 Rolim AE, Carvalho F, Costa R, Rosa FP. Chitosan Scaffolds - Physico-Chemical and Biological Properties for Bone Repair. *Rev Virtual Quim* 2018;10(02):211–228
- 17 Rosito R. Reconstrução acebular com enxerto ósseo liofilizado humano ou bovino associado a dispositivo de reforço [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina; 2006
- 18 Fosse L, Rønningen H, Benum P, Lydersen S, Sandven RB. Factors affecting stiffness properties in impacted morsellized bone used in revision hip surgery: an experimental in vitro study. *J Biomed Mater Res A* 2006;78(02):423–431
- 19 Iturria M, Rodriguez-Emmenegger C, Viegas R, et al. Basic design of lyophilization protocols for human bone tissues. *Lat Am Appl Res* 2010;40(02):147–151
- 20 Orsi VV, Collares MVM, Nardi NB, et al. Osso liofilizado bovino não-desmineralizado com células-tronco mesenquimais para engenharia tecidual: estudo experimental em sítio heterotópico. *Rev Soc Bras Cir Craniomaxilofac* 2007;10(04):133–139
- 21 Galia CR. Enxertos ósseos liofilizados impactados humano e bovino em revisão de artroplastia total de quadril [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2004
- 22 Kakiuchi M, Ono K, Nishimura A, Shiokawa H. Preparation of bank bone using defatting, freeze-drying and sterilisation with ethylene oxide gas. Part 1. Experimental evaluation of its efficacy and safety. *Int Orthop* 1996;20(03):142–146
- 23 Mendes R. Estudo experimental comparativo dos cimentos ósseos nacionais [dissertação]. Rio de Janeiro: Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro; 2006
- 24 Oliveira ACP. Comparação entre enxertos ósseos autólogo, homólogo congelado e homólogo liofilizado em cranioplastia de ratos [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina; 2007
- 25 Nather A, Thambyah A, Goh JC. Biomechanical strength of deep-frozen versus lyophilized large cortical allografts. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 2004;19(05):526–533
- 26 Fideler BM, Vangsness CT Jr, Lu B, Orlando C, Moore T. Gamma irradiation: effects on biomechanical properties of human bone-patellar tendon-bone allografts. *Am J Sports Med* 1995;23(05):643–646
- 27 Nguyen H, Morgan DA, Forwood MR. Sterilization of allograft bone: effects of gamma irradiation on allograft biology and biomechanics. *Cell Tissue Bank* 2007;8(02):93–105
- 28 Mikhael MM, Huddleston PM, Zobitz ME, Chen Q, Zhao KD, An KN. Mechanical strength of bone allografts subjected to chemical sterilization and other terminal processing methods. *J Biomech* 2008;41(13):2816–2820
- 29 Viceconti M, Toni A, Brizio L, Rubbini L, Borrelli A. The effect of autoclaving on the mechanical properties of bank bovine bone. *Chir Organi Mov* 1996;81(01):63–68
- 30 Taylor D. Inactivation of the BSE agent. *CR Biol* 2002;325(01):75–76
- 31 Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução RDC n. 156, de 11 de agosto de 2016. Dispõe sobre o registro, rotulagem e reprocessamento de produtos médicos, e dá outras providências. Disponível em: [https://www.saude.mg.gov.br/index.php?option=com\\_gmg&controller=document&id=896](https://www.saude.mg.gov.br/index.php?option=com_gmg&controller=document&id=896)